

**Anwendung der Trockenblutanalytik zur  
vereinfachten Überwachung der Nierenfunktion und  
zur Blutspiegelbestimmung von Metformin und  
Sitagliptin**



**DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Maike Scherf-Clavel**

aus Ulm

Würzburg 2017





Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter .....

2. Gutachter .....

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer .....

2. Prüfer .....

3. Prüfer .....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....





Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Petra Högger**

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie

des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.



Bislang aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen:

### **Originalpublikation**

Scherf-Clavel M. and Högger P., *Analysis of metformin, sitagliptin and creatinine in human dried blood spots*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2015) 997, 218-228

### **Posterbeiträge**

Scherf-Clavel, M., Högger, P., *The use of capillary blood to estimate the kidney function of diabetic patients*  
ChemSystM, 2016, Würzburg

Scherf-Clavel, M., Mülle, M. and Högger, P., *Sensitive quantification of selected polyphenols and drugs in human complex biological matrices with LC-ESI/MS/MS*.  
ChemSystM, 2014, Würzburg

Scherf-Clavel, M., Hohner, M., Unterecker, S., Högger, P., *Dried Blood Spot Analysis - the next level of therapeutic drug monitoring?*  
XI. Symposium Therapeutisches Drug Monitoring in der Psychiatrie, 2014, Würzburg

### **Preis**

Posterpreis für die innovativste Arbeit im Fachbereich Pharmazie und  
Lebensmittelchemie;  
ChemSystM, 2016, Würzburg



# Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Prof. Dr. Petra Högger für die freundliche Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und damit für die Möglichkeit, an diesem praxisnahen und sehr interessanten Thema arbeiten zu dürfen, bedanken. Ihre zu jeder Zeit offene Tür ermöglichte es stets wertvolle Hilfestellungen zu erhalten. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung, egal ob im Rahmen der Betreuung des LC-MS/MS Instruments, oder der Lehrtätigkeit im Fach Biochemie und klinische Chemie, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Ein großer Dank gilt auch dem Team der Praxis Dr. med. Stephan Zieher und Dr. med. Edwin Albert in Marktheidenfeld, vor allem Frau Sabrina Rösel. Ohne deren Engagement und Bereitschaft, sich an der klinischen Basisstudie maßgeblich zu beteiligen, wäre die Fertigstellung meiner Arbeit in dieser Form unmöglich gewesen. Des Weiteren gilt allen an der klinischen Feldstudie beteiligten Apotheken und Patienten ein herzliches Dankeschön. Jede einzelne Ihrer eingesandten Proben hat mir sehr geholfen.

Im Zuge der Basisstudie gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Anagnostis Valotis. Noti, ich danke dir für deine Unterstützung und deine Mühe in der Organisation der Studie, aber auch für dein Interesse an meiner Arbeit und deine stets abwechslungsreichen Besuche im Büro.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Bernd Reyer für die geduldige Unterstützung bei allen Angelegenheiten rund um Hard- und Software bedanken. Danke zudem, dass ich mich darauf verlassen konnte, dass du beim wiederkehrenden Feueralarm nie vergessen hast, in meinem versteckten Büro nach mir zu sehen.

Allen Assistenten des Praktikums des 5. Semesters, Fredi, Melli, David, Daniela, Stoyan, Klaus und Felix, gilt ein großer Dank für die unterhaltsame Zeit, die wir in wechselnder Besetzung miteinander verbracht haben. Sie wird mir immer in Erinnerung bleiben. Ein besonderer Dank gilt hierbei Dani und Stoyan. Danke dafür, dass wir uns zu jeder Zeit aufeinander verlassen konnten und wir als Drei-Mann/Frau-Truppe so gut funktioniert haben.

Mit der größte Dank gilt meinem AK. Dr. Martin Haas, Dr. Melanie Mülle, Lisa Schaaf, Dr. Steffen Jeßberger, Dr. Jianbo Xiao, Hui Cao, Andreas Pospiech, Stoyan Dirimanov, Linda Volpp, Florian Lang, Charlotte Beier und Roswitha Scheblein, danke ich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Lisa und Melli, euch danke ich besonders, dass ihr mich

in meiner Anfangsphase zum Bleiben überzeugt habt. Linda, ich danke dir für die schönen Tennismatches, die trotz unseres angeblich fehlenden Ehrgeizes oder den Spaghettiarmpjes immer Spaß gemacht haben. Charlotte und Linda, auch unsere Mädelsabende werden mir in sehr schöner Erinnerung bleiben. Roswitha, dir gebührt ein großes „Danke“ für deine Hilfe beim Erstellen der Probenkits. Vor allem aber danke ich dir, Melli, von ganzem Herzen. Ohne dich wäre meine Zeit hier in Würzburg nicht halb so schön geworden. Auch wenn wir mal nicht einer Meinung waren, so wussten wir doch, dass wir uns jederzeit blind aufeinander verlassen und uns der gegenseitigen Unterstützung in jeder Hinsicht absolut sicher sein konnten. Ich danke dir für die zahllosen tollen Abende, egal ob beim Kochen, auf dem Sofa, auf der Dachterrasse, oder auf dem Spinningrad. Auch die gemeinsamen Ausflüge dürfen nicht unerwähnt bleiben, genauso wie ich mich dafür bedanke, dass ich so viel von dir lernen durfte. Schön, dass wir uns kennengelernt haben.

Mama & Papa, Lena & Roman und Olli, euch gilt ein riesengroßes Dankeschön. Dass ihr mich immer unterstützt, wieder und wieder motiviert, aber auch abgelenkt und auf den Boden zurückgeholt habt, hat mir unglaublich viel geholfen und bedeutet. Es tut gut zu wissen, dass immer jemand da ist, egal ob zum Lachen oder zum Weinen. Danke dafür.

## Weihnachten 1987

Ein Kind ist Reichtum und ist Glück,  
ist stets ein vorwärts, kein zurück,  
ist Sorge, Ärger, mal Verdruss,  
ist unbequem und oft ein „Muss“,  
bedeutet Mühe, ist es klein,  
kann Mühe auch noch später sein,  
ist unbekümmert in die Welt  
gelangt und nun auf Euch gestellt!

Dass es ein ganzer Mensch nun werde,  
auf unsrer kunterbunten Erde,  
das wünsche ich mit aller Kraft....  
Nun seht mal zu, wie ihr das schafft!  
Ich sonne stolz in Omafreuden  
mich vor mir selbst und allen Leuten  
und bin, wie es den Omas geht,  
vor lauter Freude fast verdreht!

*Anneliese Scherf-Clavel (1922 – 2000)*





# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>DIABETES MELLITUS – EINE VOLKSKRANKHEIT IM BLICKPUNKT</b>	<b>3</b>
1.1	URSACHEN, ENTSTEHUNG, KRANKHEITSBILD	3
1.1.1	Diabetes mellitus Typ 1	4
1.1.2	Diabetes mellitus Typ 2	5
1.2	THERAPIE	7
1.2.1	Diabetes mellitus Typ 1	7
1.2.2	Diabetes mellitus Typ 2	7
1.3	FOLGEN DER ERKRANKUNG	9
<b>2</b>	<b>DRIED BLOOD SPOT ANALYTIK</b>	<b>10</b>
2.1	HINTERGRUND	10
2.2	PROBENSAMMLUNG	13
2.3	QUANTITATIVE ANALYSE	14
2.4	PROBENEXTRAKTION	18
2.5	METHODENVALIDIERUNG	19
2.5.1	Selektivität	20
2.5.2	Kalibrierfunktion	21
2.5.3	Lower Limit of Quantification	21
2.5.4	Richtigkeit und Präzision	21
2.5.5	Wiederfindung, Extraktionseffizienz und Carry-over	21
2.5.6	Robustheit	22
2.5.7	Matrixeffekte	22
2.5.8	Stabilität	23
<b>3</b>	<b>THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING</b>	<b>24</b>
3.1	DIE „STEADY-STATE“ KONZENTRATION UND DER THERAPEUTISCHE BEREICH EINES ARZNEISTOFFES	24
3.2	ANWENDUNG DER DBS ZUM THERAPEUTISCHEN DRUG MONITORING	25
3.3	DER EINFLUSS DER NIERENFUNKTION AUF DIE ARZNEIMITTELKONZENTRATION IM BLUT	26
3.3.1	Die renale Eliminierung	26
3.3.2	Kreatinin im Zusammenhang mit der Nierenfunktion	28
3.3.3	Abschätzung der Nierenfunktion nach Cockcroft und Gault	31
<b>4</b>	<b>PHARMAKOKINETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>33</b>
4.1	PHARMAKOLOGIE DES METFORMINS	33
4.1.1	Pharmakologische Eigenschaften und pharmakokinetische Parameter des Metformins	33
		XI

4.1.2	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Metformins	35
<b>4.2</b>	<b>PHARMAKOLOGIE DES SITAGLIPTINS</b>	<b>36</b>
4.2.1	Pharmakologische Eigenschaften und pharmakokinetische Parameter des Sitagliptins	36
4.2.2	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Sitagliptins	41
<b>4.3</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETIK</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>42</b>
<b>B</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b>	<b>45</b>
<hr/>		
<b>1</b>	<b>METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON KREATININ, METFORMIN UND SITAGLIPTIN AUS TROCKENBLUT</b>	<b>47</b>
1.1	HINTERGRUND	47
1.1.1	Auswahl der Arzneistoffe	47
1.1.2	Auswahl der Messmethoden	48
1.2	METHODENENTWICKLUNG	49
1.2.1	Entwicklung der HPLC-UV-Methode	49
1.2.2	Entwicklung der Extraktionsmethode	51
1.2.3	Einfluss des Sitagliptins auf die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin	62
1.2.4	Entwicklung der LC-MS/MS-Methode	66
1.2.5	Diskussion	72
1.3	VERGLEICH DER DRIED BLOOD SPOT-KARTEN UND BLOTTING PAPIER ALS TRÄGER DES TROCKENBLUTES	74
1.3.1	Ergebnisse	74
1.3.2	Diskussion	75
1.4	METHODENVALIDIERUNG	76
1.4.1	Ergebnisse	76
1.4.2	Diskussion	83
<b>2</b>	<b>KLINISCHE STUDIEN</b>	<b>85</b>
2.1	BASISSTUDIE	85
2.2	FELDSTUDIE	86
2.2.1	Diskussion	86
<b>3</b>	<b>ABSCHÄTZUNG DER NIERENFUNKTION MIT HILFE DER KREATININKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS</b>	<b>88</b>
3.1	BESTIMMUNG DER KREATININKONZENTRATION IN PATIENTENPROBEN DER KLINISCHEN STUDIEN	88
3.1.1	Basisstudie	88
3.1.2	Feldstudie	89
3.2	ERMITTLUNG EINES KORRELATIONSFAKTORS FÜR KREATININ ZUR BERECHNUNG DER NIERENFUNKTION	89
3.2.1	Hintergrund	89
3.2.2	Korrelation zwischen der Kapillarblut- und Plasmakonzentration des Kreatinins	91

3.2.3	Diskussion	96
<b>3.3</b>	<b>ABSCHÄTZEN DER NIERENFUNKTION MIT HILFE DER COCKCROFT UND GAULT FORMEL</b>	<b>98</b>
3.3.1	Basisstudie: Vergleich der Nierenfunktion	98
3.3.2	Feldstudie	100
3.3.3	Diskussion	100
<b>3.4</b>	<b>DER „TRIPLE WHAMMY“ EFFEKT</b>	<b>101</b>
3.4.1	Hintergrund	101
3.4.2	Ergebnisse	105
3.4.3	Diskussion	107
<b>4</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON METFORMIN</b>	<b>108</b>
<b>4.1</b>	<b>HINTERGRUND</b>	<b>108</b>
<b>4.2</b>	<b>BESTIMMUNG DER METFORMINKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS</b>	<b>109</b>
4.2.1	Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen <i>in-vitro</i>	109
4.2.2	Bestimmung der Metforminkonzentrationen in Patientenproben der klinischen Studien	111
<b>4.3</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE BETRACHTUNG</b>	<b>113</b>
4.3.1	Ergebnisse	113
4.3.2	Diskussion	115
<b>5</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON SITAGLIPTIN</b>	<b>118</b>
<b>5.1</b>	<b>HINTERGRUND</b>	<b>118</b>
<b>5.2</b>	<b>BESTIMMUNG DER SITAGLIPTINKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS</b>	<b>119</b>
5.2.1	Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen <i>in-vitro</i>	119
5.2.2	Bestimmung der Sitagliptinkonzentration in Patientenproben der klinischen Studien	121
<b>5.3</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE BETRACHTUNG</b>	<b>122</b>
5.3.1	Ergebnisse	122
5.3.2	Diskussion	124
<b>5.4</b>	<b>HÄMATOKRITABHÄNGIGKEIT UND INTER-INDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE DER SITAGLIPTINKONZENTRATION IM BLUT <i>IN-VITRO</i></b>	<b>126</b>
5.4.1	Hintergrund	126
5.4.2	Inkubationsversuche mit Blut mit unterschiedlichem Hämatokrit	128
5.4.3	Inter-individuelle Unterschiede der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen	131
5.4.4	Dialyseversuche	133
5.4.5	Schlussfolgerung	138
<b>C</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>139</b>
<b>1</b>	<b>HÄUFIG GENUTZTE REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>141</b>
1.1	HÄUFIG GENUTZTE CHEMIKALIEN	141
1.2	HUMANES VOLLBLUT	141
1.3	DRIED-BLOOD-SPOT TRÄGER UND KAPILLAREN	141
1.4	HPLC-UV-ANLAGE	141
1.5	LC-MS/MS-ANLAGE	142

<b>1.6</b>	<b>HÄUFIG GENUTZTE REAGENZIEN</b>	<b>142</b>
1.6.1	Stammlösungen für die Herstellung von Fließmittel	142
1.6.2	Interner Standard	142
1.6.3	Spikelösungen für die Kalibriergeraden	143
1.6.4	Extraktionsmittel	143
<b>1.7</b>	<b>SONSTIGE HÄUFIG GENUTZTE GERÄTE UND MATERIALEN</b>	<b>143</b>
<b>1.8</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>144</b>
<b>2</b>	<b>METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON KREATININ, METFORMIN UND SITAGLIPTIN AUS TROCKENBLUT</b>	<b>145</b>
<b>2.1</b>	<b>VERWENDETE REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>145</b>
2.1.1	Substanzen	145
2.1.2	Standardlösungen	145
2.1.3	Humanes Vollblut	150
2.1.4	Dried-Blood-Spot Träger und Kapillaren	150
2.1.5	HPLC-UV-Anlage und LC-MS/MS-Anlage	150
2.1.6	Sonstige Geräte und Materialien	150
<b>2.2</b>	<b>DURCHFÜHRUNG DER HPLC-UV-METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>151</b>
2.2.1	Entwicklung der HPLC-UV Methode für Metformin und Kreatinin aus Reinsubstanzen	151
2.2.2	Entwicklung der HPLC-UV Methode für Metformin und Kreatinin aus Trockenblut	154
<b>2.3</b>	<b>ENTWICKLUNG DER EXTRAKTIONSMETHODE</b>	<b>156</b>
2.3.1	Auswahl des Blutvolumens	156
2.3.2	Auswahl des Dried-Blood-Spot Trägers	156
2.3.3	Auswahl des Extraktionsmittels	156
2.3.4	Auswahl des Extraktionsmittelvolumens	157
2.3.5	Entwicklung und Optimieren des Extraktionsverfahrens	158
2.3.6	Anpassen der Konzentration des internen Standards	162
<b>2.4</b>	<b>EINFLUSS DES SITAGLIPTINS AUF DIE QUANTIFIZIERUNG VON METFORMIN UND KREATININ</b>	<b>162</b>
<b>2.5</b>	<b>ENTWICKLUNG DER LC-MS/MS METHODE</b>	<b>163</b>
2.5.1	Methodenentwicklung aus der Reinsubstanz	163
2.5.2	Entwicklung der HPLC-Methode und der Quellenparameter aus Matrixproben	165
<b>2.6</b>	<b>VERGLEICH DBS KARTEN MIT BLOTTING PAPIER</b>	<b>168</b>
<b>2.7</b>	<b>METHODENVALIDIERUNG</b>	<b>169</b>
2.7.1	Auswertung der Kreatininkonzentration	169
2.7.2	Unterschiede beim Auftragen des Blutes mit einer Pipette gegenüber einer Kapillare	169
2.7.3	Selektivität	170
2.7.4	Kalibrierfunktion	170
2.7.5	Lower Limit of Quantification (LLOQ)	171
2.7.6	Richtigkeit (Accuracy)	171
2.7.7	Präzision	172
2.7.8	Wiederfindung und Extraktionseffizienz	172
2.7.9	Carry over	173
2.7.10	Robustheit	173

2.7.11	Matrixeffekte	173
2.7.12	Stabilität	174
<b>3</b>	<b>KLINISCHE STUDIEN</b>	<b>176</b>
3.1	BASISSTUDIE	176
3.2	FELDSTUDIE	176
<b>4</b>	<b>ABSCHÄTZUNG DER NIERENFUNKTION MIT HILFE DER KREATININKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS</b>	<b>177</b>
4.1	VERWENDETE REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE	177
4.1.1	Substanzen	177
4.1.2	Spikelösungen für die Kalibriergerade, interner Standard, Extraktionsmittel und Stammlösungen für die Herstellung von Fließmitteln	177
4.1.3	Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger und Kapillaren	177
4.1.4	<i>In-vivo</i> -Proben	177
4.1.5	HPLC-UV-Anlage	177
4.1.6	Sonstige Geräte und Materialien	177
4.2	BESTIMMUNG DER <i>IN-VIVO</i> -PROBEN	178
4.2.1	Extraktion der <i>in-vivo</i> -Proben	178
4.2.2	Quantifizierung der <i>in-vivo</i> -Proben	178
<b>5</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON METFORMIN</b>	<b>179</b>
5.1	VERWENDETE REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE	179
5.1.1	Substanzen	179
5.1.2	Standardlösungen für die Bestimmung der Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen und die Validierung der Methoden	179
5.1.3	Standardlösungen für die Quantifizierung der <i>in-vivo</i> -Proben	180
5.1.4	Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger, Kapillaren und HPLC-UV-Anlage	180
5.1.5	<i>In-vivo</i> -Proben	180
5.1.6	Sonstige Geräte und Materialien	180
5.2	BESTIMMUNG DER METFORMINKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS	181
5.2.1	Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Metformin aus Vollblut und Blutzellen aus getrockneten Spots	181
5.2.2	Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen	185
5.2.3	Bestimmung von <i>in-vivo</i> -Blutproben	187
<b>6</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON SITAGLIPTIN</b>	<b>187</b>
6.1	VERWENDETE REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE	187
6.1.1	Substanzen	187
6.1.2	Standardlösungen für die Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen und die Validierung der Methoden	187
6.1.3	Standardlösungen für die Quantifizierung der <i>in-vivo</i> -Proben	189
6.1.4	Standardlösungen für die Bestimmung der Hämatokritabhängigkeit der Sitagliptinkonzentration im Blut	189
6.1.5	Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger, Kapillaren und LC-MS/MS-Anlage	189
6.1.6	<i>In-vivo</i> -Proben	190
6.1.7	Sonstige Geräte und Materialien	190

<b>6.2</b>	<b>BESTIMMUNG DER SITAGLIPTINKONZENTRATION AUS DRIED-BLOOD-SPOTS</b>	<b>190</b>
6.2.1	Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen aus getrockneten Spots	190
6.2.2	Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen	194
6.2.3	Bestimmung von <i>in-vivo</i> -Blutproben	194
6.2.4	Hämatokritabhängigkeit und inter-individuelle Unterschiede der Sitagliptinkonzentration im Blut	195
 <b><u>D</u> TABELLARISCHER ANHANG</b>		<b><u>199</u></b>
<b>1</b>	<b>METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON KREATININ, METFORMIN UND SITAGLIPTIN AUS TROCKENBLUT</b>	<b>201</b>
1.1	ENTWICKLUNG DER LC-MS/MS METHODE	201
1.1.1	Einfluss der MS1- sowie MS2-Resolution auf die Höhe sowie das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) des Signals für Sitagliptin	201
1.2	METHODENVALIDIERUNG	201
1.2.1	Lower Limit of Quantification	201
1.2.2	Richtigkeit und Präzision von Metformin	202
1.2.3	Richtigkeit und Präzision von Kreatinin	203
1.2.4	Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin	204
1.2.5	Einzelwerte für die Wiederfindung und Extraktionseffizienz der Analyten	205
1.2.6	Robustheit	205
1.2.7	Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Metformin	206
1.2.8	Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Kreatinin	206
1.2.9	Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Sitagliptin	207
1.2.10	Langzeitstabilität für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin	207
1.2.11	Erweiterte Langzeitstabilität für Sitagliptin	208
<b>2</b>	<b>KLINISCHE STUDIEN</b>	<b>209</b>
2.1	BASISSTUDIE	209
2.1.1	Klinische Parameter der 70 Patienten, die im Rahmen der Basisstudie Blut gespendet haben	209
<b>3</b>	<b>ABSCHÄTZUNG DER NIERENFUNKTION MIT HILFE DER KREATININKONZENTRATION AUS DRIED BLOOD SPOTS</b>	<b>211</b>
3.1	ERMITTLUNG EINES KORRELATIONSFAKTORS FÜR KREATININ ZUR BERECHNUNG DER NIERENFUNKTION	211
3.1.1	Konzentration des Kreatinins im Plasma im Vergleich zur Kapillarblutkonzentration bei 45 Patienten des Entwicklungssets	211
3.1.2	Gemessene Konzentration des Kreatinins im Plasma ( $C_{P_{gem}}$ ) im Vergleich zur Kapillarblutkonzentration sowie der berechneten Plasmakonzentration ( $C_{P_{ber}}$ ) mit zugehöriger Abweichung in den Proben des Verifizierungssets	212
3.2	ABSCHÄTZEN DER NIERENFUNKTION MIT HILFE DER COCKCROFT & GAULT FORMEL	213
3.2.1	Vergleich der Plasmakreatininspiegel der Studienpatienten der Basisstudie	213
3.2.2	Vergleich der Kreatinin-clearance der Studienpatienten der Basisstudie	214
3.2.3	Plasmakreatininspiegel und Kreatinin-clearance der Studienpatienten der Feldstudie	215

---

<b>4</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON METFORMIN</b>	<b>217</b>
4.1	VALIDIERUNG DER METHODEN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON METFORMIN AUS VOLLBLUT UND BLUTZELLEN AUS GETROCKNETEN SPOTS	217
4.1.1	Richtigkeit und Präzision von Metformin im Vollblut	217
4.1.2	Richtigkeit und Präzision von Metformin in den Blutzellen	218
4.1.3	Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Metformin im Vollblut	218
4.1.4	Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Metformin in den Blutzellen	219
4.1.5	Stabilität von Metformin im Vollblut	219
4.1.6	Stabilität von Metformin in den Blutzellen	220
4.2	VERTEILUNG VON METFORMIN ZWISCHEN PLASMA UND BLUTZELLEN	220
4.2.1	Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen	220
<b>5</b>	<b>POPULATIONSPHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG VON SITAGLIPTIN</b>	<b>221</b>
5.1	VALIDIERUNG DER METHODEN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON SITAGLIPTIN AUS PLASMA UND BLUTZELLEN AUS GETROCKNETEN SPOTS	221
5.1.1	Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin in Plasma	221
5.1.2	Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin in den Blutzellen	222
5.1.3	Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Sitagliptin im Plasma	222
5.1.4	Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Sitagliptin in den Blutzellen	223
5.1.5	Stabilität von Sitagliptin im Plasma	223
5.1.6	Stabilität von Sitagliptin in den Blutzellen	223
5.2	VERTEILUNG VON SITAGLIPTIN ZWISCHEN PLASMA UND BLUTZELLEN	224
5.2.1	Konzentrationen der Proben zur Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen	224
5.2.2	Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen	224
5.3	HÄMATOKRITABHÄNGIGKEIT DER SITAGLIPTINKONZENTRATION IM BLUT	225
5.3.1	Anteil des im Plasma bzw. den Blutzellen vorhandenen Sitagliptins bezogen auf die Nominalkonzentration im Vollblut nach Inkubation für 60 min in Blut mit verschiedenem Hämatokrit	225
5.3.2	Vergleich der Sitagliptinkonzentration im Vollblut gegenüber der im Plasma und den Blutzellen nach einer Inkubation für 60 min in Blut mit verschiedenem Hämatokrit und verschiedenen Konzentrationen	226
5.3.3	Einzelwerte für die Verteilungskoeffizienten $c_P/c_{BZ}$ des Sitagliptins in Blut mit verschiedenem Hämatokrit nach 60 minütiger Inkubation	226
5.4	INTER-INDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE DER VERTEILUNG DES SITAGLIPTINS ZWISCHEN PLASMA UND BLUTZELLEN	227
5.4.1	Sitagliptinkonzentration (Nominalkonzentration: 250 ng/mL) im Vollblut verschiedener Einzelspender mit unterschiedlichem Hämatokrit nach 60 minütiger Inkubation	227
5.4.2	Vergleich der Sitagliptinkonzentration im Vollblut gegenüber der im Plasma und den Blutzellen sowie Darstellung der Verteilungskoeffizienten $c_P/c_{BZ}$ nach einer Inkubation für 60 min in Blut verschiedener Einzelspender bei verschiedenem Hämatokrit	228
5.4.3	Inter-Individuelle Unterschiede des Verteilungskoeffizienten $c_P/c_{BZ}$ bei verschiedenen Hämatokritwerten	229
<b>E</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>231</b>

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>233</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>235</b>
<b><u>F</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>237</u></b>
<b><u>G</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>243</u></b>



**A**

**Einleitung**



# 1 Diabetes mellitus – Eine Volkskrankheit im Blickpunkt

## 1.1 Ursachen, Entstehung, Krankheitsbild

Diabetes mellitus ist eine weltweit häufig auftretende Stoffwechselerkrankung [1], die durch typische Symptome gekennzeichnet ist. Das wesentliche Merkmal ist der Insulinmangel, der entweder aufgrund einer gestörten Insulinwirkung oder einer gestörten Insulinsekretion zustande kommt [2, 3]. Der Mangel an Insulin tritt zusammen mit einer gleichzeitig bestehenden chronischen Hyperglykämie (Glukosekonzentration im Kapillarblut von  $> 6,15$  mmol/L bzw.  $> 110$  mg/mL im Nüchternzustand) auf [2, 4, 5]. Zusätzlich resultieren aus diesem Insulinmangel mit Hyperglykämie Störungen verschiedener Stoffwechselprozesse [4]. Nach längerem Verlauf der Krankheit kann es deshalb zu Spätkomplikationen kommen [4, 5]. Der Diabetes mellitus ist aufgrund der Folgeschäden auch die bedeutsamste Stoffwechselerkrankung in Deutschland [4]. Die zwei wichtigsten Typen des Diabetes mellitus, die hinsichtlich ätiologischen, pathogenetischen und klinischen Gesichtspunkten unterschieden werden, stellen der Diabetes mellitus Typ 1, der hauptsächlich durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet ist (Einleitung, A1.1.1) und Typ 2, bei dem meist ein relatives Insulindefizit besteht (Einleitung, A1.1.2) dar [1, 4]. Die Entstehung beider Typen wird sowohl von genetischen, als auch exogenen Faktoren beeinflusst [4]. Von den verschiedenen Typen entfallen ca. 90 - 95 % auf den Diabetes mellitus Typ 2 [2, 4, 6]. Es gibt sehr unterschiedliche Daten zur Häufigkeit des Auftretens der Krankheit. So wurde veröffentlicht, dass 5 bis 8 % der Gesamtbevölkerung in Deutschland betroffen sind, allerdings mit steigender Tendenz [4, 7]. In einem 2011 veröffentlichten Bericht wurde aufgezeigt, dass im Jahre 2009 8,8 % der Bevölkerung einen diagnostizierten Diabetes mellitus aufwiesen [1]. Palitzsch gab 2012 aufgrund einer Schätzung der „International Diabetes Federation“ an, dass in Deutschland 12 % der 20- bis 79-Jährigen an Diabetes mellitus erkrankt seien [6]. Unabhängig davon, welche Werte das genaue Bild in Deutschland widerspiegeln, liegt der prozentuale Anteil sehr hoch. Ein größeres Problem stellt der Prädiabetes dar, worunter man die gestörte Glukosetoleranz (2 h Wert des oralen Glukosetoleranztestes (oGTT)  $140 - 199$  mg/dL [2]) versteht, die bei ca. 16 % der deutschen Bevölkerung gefunden wird [4]. Auch weltweit steigt die Anzahl der Diabetes Erkrankungen. Schon 1980 waren 4,7 % der erwachsenen Weltbevölkerung an einem Diabetes erkrankt, 2014 waren es 8,5 % (422 Millionen Menschen) [3]. Alleine 2015 waren zwischen 387 und 415 Millionen Menschen von einem Diabetes mellitus Typ 2 betroffen, bis ins Jahr 2030 werden 592 Millionen Patienten erwartet, bis 2040 642 Millionen [8-10]. Dass die Krankheit ernst genommen werden muss, verdeutlichen die im

Jahre 2016 veröffentlichten Zahlen der WHO: 2012 starben 1,5 Millionen Menschen weltweit ursächlich an einem Diabetes mellitus bzw. den Folgen der Erkrankung, zusätzlich starben 2012 weitere 2,2 Millionen Menschen an den Folgen eines Prädiabetes assoziiert mit kardiovaskulären oder anderen Erkrankungen, 43 % der 3,7 Millionen Toten waren unter 70 Jahre alt [3]. Die Prävalenz des Diabetes steigt mit zunehmendem Alter [1, 7]. Wirtschaftlich gesehen ist diese Krankheit in Deutschland eine der teuersten chronischen Leiden [1].

### **1.1.1 Diabetes mellitus Typ 1**

#### *Ursachen und Entstehung*

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Autoimmunerkrankung, die zu einer progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans–Inseln des Pankreas führt, woraus ein absoluter Insulinmangel entsteht [4, 7]. Dieser Typ wird weiter untergliedert in eine immunmedierte und eine idiopathische Form [7]. Der immunmedierte Subtyp ist eine chronisch verlaufende Erkrankung, während der es aufgrund einer chronischen Entzündungsreaktion zur endgültigen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen im Pankreas kommt [2, 7]. Erst wenn 80 - 90 % der  $\beta$ -Zellen zerstört sind, kommt es zu einem klinisch relevanten Insulinmangel [7]. Charakteristische Merkmale dieser Autoimmunerkrankung sind das Auftreten von Autoantikörpern, eine Insulitis (entzündliche Infiltration der Inselzellen) oder auch eine familiäre Vorbelastung bzw. ein häufiges Auftreten der Erkrankung innerhalb einer Familie [7]. Über Triggerereignisse, durch die der Autoimmunprozess in Gang gesetzt wird, wird stark diskutiert. So werden unter anderem Virusinfektionen, Immunstimulatoren und Ernährungsfaktoren als mögliche Ursachen genannt [4, 7]. Weitere Faktoren, die im Zusammenhang mit dem Auftreten der Krankheit genannt werden, sind eine kurze Stillzeit, ein hoher sozialer Status und gute hygienische Verhältnisse [7]. Die genetische Disposition stellt nur einen schwachen Faktor bei der Krankheitsentwicklung dar [7]. Die idiopathische Form ist wesentlich seltener und ist eine nichtimmunogene, vererbare Form des Diabetes mellitus Typ 1 [7].

#### *Krankheitsbild*

Das klinische Erscheinungsbild des Diabetes mellitus Typ 1 ist individuell sehr unterschiedlich. Die Krankheit tritt zumeist im Jugendalter auf (ca. 14 Jahre), sie kann aber auch im Erwachsenenalter zum Vorschein kommen. Die ersten Symptome sind oft anhaltender Durst und sehr häufiges Wasserlassen sowie gesteigerter Appetit und Gewichtsverlust. Dieses Phänomen kommt zustande, da der erhöhte Blutzuckerspiegel eine Hyperosmolalität im Blut mit osmotischer Diurese und Stimulation der Durstzentren im Gehirn hervorruft. Glukagon sorgt dafür, dass aus Glykogen Glukose zum Decken des

Energiebedarfs bereitgestellt wird. Die Gegenregulation, also die Inhibition des Glukagons und somit der Glukoneogenese, wird durch das Insulin gesteuert. Fehlt dieses, wird trotz Hyperglykämie die Glukoneogenese weiter stimuliert und es kann in Folge davon zu schwersten katabolen Zuständen kommen. Die Folgen eines Insulinmangels sind somit ein erhöhter Blutzucker, ein intrazellulärer Glukosemangel, der zu einer mangelnden intrazellulären Energieversorgung führt und eine ungehemmte Glukagonwirkung, die zu Proteolyse, Glykogenolyse und überschießender Lipolyse mit Ketonkörperbildung führt. Es folgt eine körperliche Schwäche mit osmotischer Diurese und Exsikose und anschließender Ketoazidose [7].

### **1.1.2 Diabetes mellitus Typ 2**

#### *Ursachen und Entstehung*

Der Diabetes mellitus Typ 2 dagegen ist eine Erkrankung mit Insulinresistenz, verbunden mit einem Sekretionsdefizit der  $\beta$ -Zellen [4, 5, 7]. Dieser Diabetes Typ zeigt ein hohes Maß an Vererbbarkeit, allerdings folgt diese nicht den Vererbungsregeln nach Mendel, sondern einer komplexen, multifaktoriellen Vererbung [7]. Risikofaktoren für ein Auftreten sind vor allem eine androide Fettverteilung mit Bauchfett und schmalen Hüften, aber auch mit zunehmendem Grad einer Adipositas steigt das Risiko, an einem Typ 2 Diabetes zu erkranken [7]. Realisationsfaktoren für das Auftreten der Erkrankung sind vor allem Überernährung, Übergewicht und körperliche Inaktivität [4]. Die Pathogenese der Erkrankung sieht wie folgt aus: Der Patient entwickelt aufgrund einer genetischen Prädisposition und/oder diverser Risikofaktoren eine Insulinresistenz, die mit einer Insulinsekretionsstörung verbunden ist. Anfänglich wird die Insulinresistenz durch eine erhöhte Insulinsekretion kompensiert. Diese Hyperinsulinämie kann aber nicht lange aufrechterhalten werden und es kommt in der Folge davon zu einem Anstieg des Blutglukosespiegels. Es entwickelt sich meist im Rahmen des metabolischen Syndroms eine gestörte Glukosetoleranz. In Folge der anhaltenden vermehrten Insulinsekretion kommt es schließlich zu einem „Ausbrennen“ der  $\beta$ -Zellen und im letzten Schritt zu der Notwendigkeit einer Insulintherapie [7] (Abbildung 1). Zu einer Manifestation des Diabetes kommt es, wenn 55 bis 60 % der  $\beta$ -Zellen erschöpft sind [7]. Im Stadium der gestörten Glukosetoleranz kann mittels Veränderungen im Lebensstil (Bewegung, Raucherentwöhnung und gesunde Ernährung) und Medikamenten einer Diabetesmanifestation vorgebeugt werden [7, 11]. Ist das metabolische Syndrom (gestörter Glukose- und Insulinmetabolismus, Übergewicht, abdominale Fettansammlung, Dyslipidämie und Hypertonie) diagnostiziert, ist die Krankheit bereits fortgeschritten [4, 7]. Zudem gibt es bei den Patienten eine vermehrte Freisetzung von Glukagon und auch die Inkretinhormone

(Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und Glucose-dependent-insulinotropic Polypeptide (GIP)) unterliegen einer gestörten Freisetzung [7].

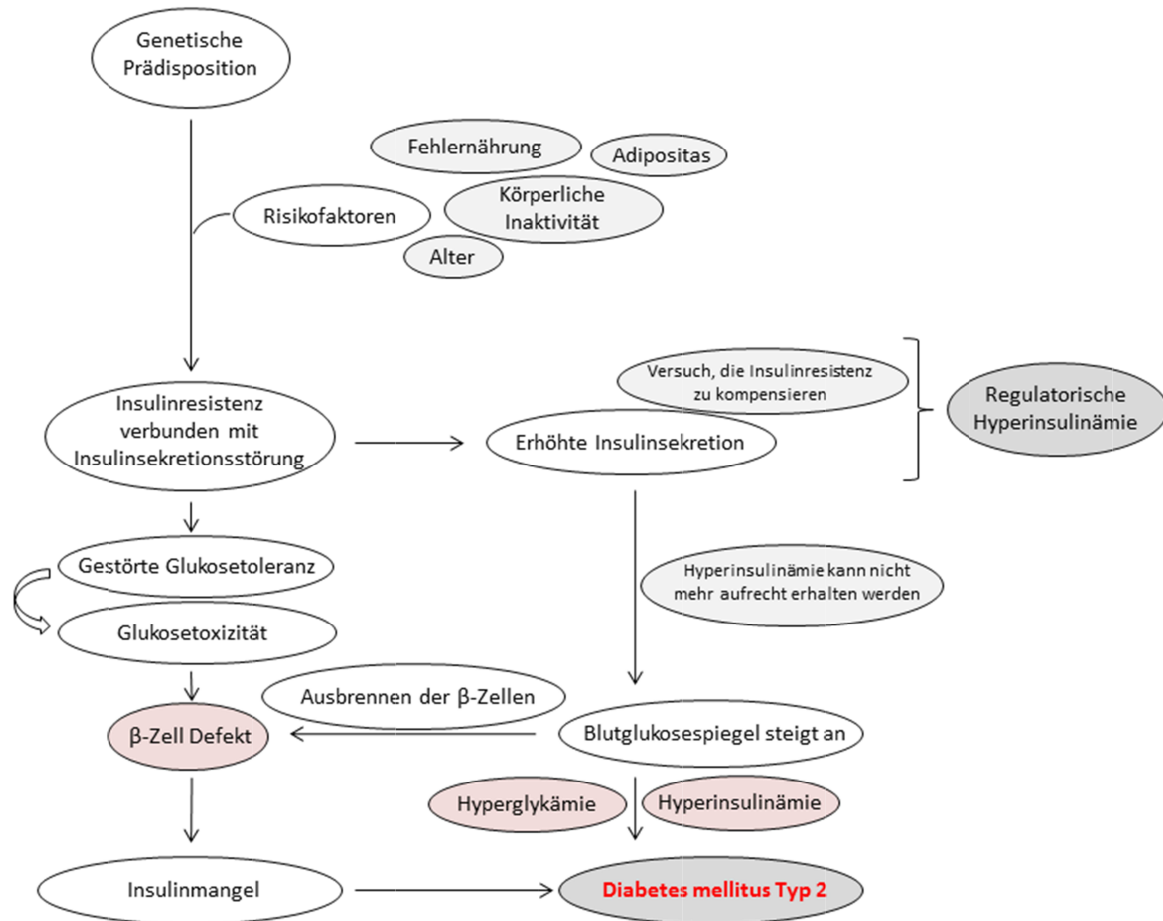


Abbildung 1: Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2.

### Krankheitsbild

Die Erstdiagnose der Krankheit erfolgt oft zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung. Initial ist der Diabetes mellitus Typ 2 sehr symptomarm, wodurch die Diagnosestellung erschwert wird [5]. Er wird deshalb auch als „stille Erkrankung“ bezeichnet [9]. Typ 2 Patienten sind zu 90 % adipös; Sehverschlechterungen oder ein schwankender Visus, der dadurch zustande kommt, dass die Linse die osmotischen Veränderungen nur langsam ausgleichen kann, sind ein Hinweis auf einen Diabetes mellitus Typ 2. Eine Begleiterscheinung ist die Dyslipidämie, da eine Insulinresistenz und die Adipositas zu einer vermehrten Freisetzung von Fettsäuren führen. Der Diabetes mellitus Typ 2 wird im Mittel immer noch 5 bis 8 Jahre zu spät diagnostiziert, oft erst, wenn Folgeerkrankungen auftreten [7].

## 1.2 Therapie

### 1.2.1 Diabetes mellitus Typ 1

Aufgrund des absoluten Insulinmangels stellen die subkutane Insulingabe sowie eine kontrollierte bzw. angepasste Ernährung die Therapiebasis dar [2]. Die intensiviertere konventionelle Insulintherapie mit regelmäßigen Selbstkontrollen des Blutzuckers ist die Therapie erster Wahl bei Typ 1 Patienten [7]. Neben dieser Therapieform existieren auch noch andere Regimes, z. B. die konventionelle Insulintherapie oder die Insulintherapie mittels Pumpe (kontinuierliche subkutane Insulininfusion) [2, 7].

### 1.2.2 Diabetes mellitus Typ 2

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 setzt sich zusammen aus zwei zentralen Elementen. Das erste Element ist die Basistherapie, bei der die Lebensgewohnheiten umgestellt werden sollten [7]. Durch diese Therapie kann nicht nur das Gewicht gesenkt, sondern auch der Stoffwechsel verbessert werden. Zudem kann der HbA<sub>1c</sub>-Spiegel (prozentualer Anteil des dauerhaft glykosylierten Hämoglobins, welches ein Maß für die durchschnittliche Höhe des Blutglukosespiegels der letzten 2 bis 3 Monate darstellt [12]), um etwa 0,7 % gesenkt werden, was vergleichbar ist mit dem Effekt einer medikamentösen Therapie [7]. Das zweite Element ist die Therapie mit oralen Antidiabetika und Insulin [7]. Dabei ist das Behandlungsziel das Erreichen eines individuellen HbA<sub>1c</sub>-Wertes [5, 7]. Es soll während dieser Therapie keine Gewichtszunahme erfolgen und auch das Auftreten einer Hypoglykämie soll vermieden werden [6]. Die nationale Versorgungsleitlinie hat 2013 eine Aktualisierung veröffentlicht, in dem die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben ist, wie sie in Deutschland empfohlen wird [5]. Die erste Therapiestufe beschreibt dabei die Basistherapie, welche Schulungen, Ernährungstherapien, Steigerung der körperlichen Aktivität und die Raucher-Entwöhnung umfasst [5]. Wird innerhalb von drei bis sechs Monaten der HbA<sub>1c</sub>-Zielkorridor von 6,5 % bis 7,5 % bzw. das individuelle HbA<sub>1c</sub>-Ziel nicht erreicht, geht man zur zweiten Therapiestufe über, was heißt, dass zusätzlich zur Basistherapie mit einer Pharmakon-Monotherapie begonnen wird [5]. Mittel der Wahl ist Metformin [5]. Besteht eine Unverträglichkeit gegenüber diesem Arzneistoff, so kann ein anderes Medikament, wie zum Beispiel ein Dipeptidylpeptidase-IV-Inhibitor (DPP-IV-Inhibitor) oder ein Sulfonylharnstoff gegeben werden oder mit der konventionellen Insulintherapie begonnen werden [5]. Wird das HbA<sub>1c</sub>-Ziel nach drei bis sechs Monaten wiederum nicht erreicht, folgt die dritte Therapiestufe, in der entweder eine Zweifachkombination an Pharmaka, in der Regel Metformin plus ein weiteres orales Antidiabetikum oder eine Insulintherapie begonnen wird [5]. Die vierte Therapiestufe beschreibt im Anschluss eine intensiviertere(re)

Insulintherapie und Kombinationstherapieformen, die vor allem bei adipösen Patienten mit Metformin unterstützt werden sollen [5].

Die Gruppe der oralen Antidiabetika setzt sich zusammen aus Arzneistoffen mit verschiedenen Wirkmechanismen. Metformin ist ein Biguanid, für den aktuell kein eindeutiger Wirkmechanismus angegeben werden kann (siehe dazu auch: Einleitung, A4.1.1) [4, 13]. Die Sulfonylharnstoffe, zu denen Glibenclamid oder auch Glimepirid gehören, und die Glinide, zum Beispiel Repaglinid, sind sogenannte insulinotrope orale Antidiabetika [14]. Sie öffnen durch Blockade der Kaliumkanäle ( $K^+_{ATP}$ -Kanal) in den  $\beta$ -Zellen die spannungsabhängigen Calciumkanäle, woraus wiederum eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration resultiert, die eine gesteigerte Exozytose von Insulin zur Folge hat [4]. Sie können allerdings nur wirken, wenn die  $\beta$ -Zellen noch funktionsfähig sind [14].  $\alpha$ -Glukosidase-Inhibitoren, wie Acarbose oder Miglitol hemmen die enzymatische Spaltung von Oligo- und Disacchariden, woraus eine verzögerte Resorption von Kohlenhydraten resultiert, was zur Vermeidung postprandialer Blutzuckerspitzen führt [4, 14]. Die Gliflozine, wie zum Beispiel Empagliflozin oder Dapagliflozin hemmen den Natrium-Glukose-Cotransporter-2 in der Niere, der ca. 90 % der Glukose rückresorbiert [15]. Eine weitere Gruppe oraler Antidiabetika stellen die Inkretinmimetika dar. Zu diesen gehören zum einen die DPP-IV-Inhibitoren, die sogenannten Gliptine wie Sitagliptin oder Saxagliptin (siehe dazu: Einleitung, A4.2.1). Zu den Inkretinmimetika zählen zudem die Glucagon-like-Peptide-1 Agonisten (GLP-1 Agonisten) wie Exenatide und Liraglutid, die eine ähnliche Aktivität wie das endogene Hormon aufweisen [16]. Im Arzneiverordnungsreport 2009 wurden die Glitazone (Pioglitazon oder Rosiglitazon) als orale Antidiabetika gelistet und 2008 in nicht unerheblicher Menge verordnet (DDD 68,6 Mio) [14]. Sie sind sogenannte Insulin-Sensitizer, die den PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor) stimulieren, wodurch es zu einer verstärkten Expression und Translokation von Glukosetransportern kommt, was die Glukoseaufnahme in die Zellen steigert [4]. Sie senken somit den Nüchternblutzucker und verbessern die Insulinresistenz [14]. Ihre Verordnungszahlen sanken aber, sodass sie im Verordnungsreport 2015 schon nicht mehr aufgeführt wurden [16].

Bei der Auswahl der angewandten Wirkstoffe hat der Arzt neben Kontraindikationen auch auf Patientenpräferenzen, Wirkmechanismus, Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil (z. B. Risiko einer Gewichtszunahme) zu achten [5].



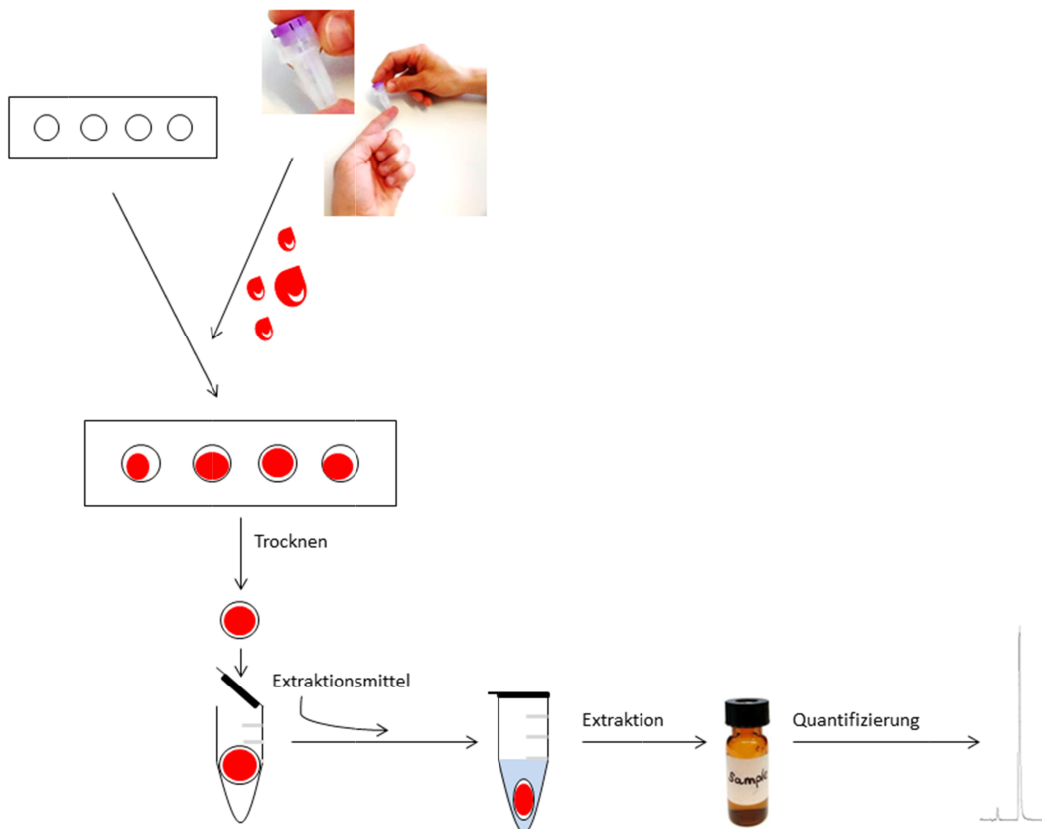
### 1.3 Folgen der Erkrankung

Die Folgen der chronischen Hyperglykämie sind die Hauptursachen für die erhöhte Morbidität und Mortalität der Diabetespatienten [7]. Zu diesen Folgen zählen Makroangiopathien (KHK, Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit), Mikroangiopathien (diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie) und die diabetische Neuropathie [7]. Aufgrund der dauerhaft hohen Glukosekonzentration im Blut geht die Glukose nicht-enzymatische Reaktionen mit einer Reihe von Körpereiwießen ein, woraus sich Struktur- und Funktionsveränderungen der Proteine ergeben [4]. Das bekannteste Beispiel stellt dabei Hämoglobin dar, das zu HbA<sub>1c</sub> reagiert [4]. Die Glykosylierung der Proteine führt zu einer Verdickung der Basalmembran und der Gefäßintima in der terminalen Strombahn, was Mikroangiopathien hervorruft, die vor allem in der Niere und der Netzhaut auftreten [4]. Die diabetische Nephropathie nimmt einen großen Stellenwert in der Therapie des Diabetes ein. Aus Daten von 1999 bis 2012 wird der Anteil der Patienten eines Diabetes mellitus Typ 2, die zugleich eine chronische Nierenerkrankung aufweisen insgesamt auf 44 % geschätzt [17]. Diabetespatienten, die von einer Nierenerkrankung betroffen sind, haben zudem ein deutlich erhöhtes Risiko eine kardiovaskuläre Komplikation zu erleiden [17]. Die Therapie des Diabetes mellitus wird vor allem bei bestehender Nierenerkrankung erschwert, da chronische Nierenerkrankungen mit einer erhöhten Insulinresistenz einhergehen und diese Patienten auch ein erhöhtes Risiko einer Hypoglykämie aufweisen [17]. Für die meisten oralen Antidiabetika gilt, dass sie bei schwerer Niereninsuffizienz nicht zugelassen sind und deshalb nicht oder nur mit Vorsicht angewandt werden dürfen [17]. Die Makroangiopathien, welche der Arteriosklerose des Nichtdiabetikers entsprechen, entstehen aufgrund der Dyslipidämie als Folge der Hyperglykämie [4]. Das Risiko zur Entwicklung einer Arteriosklerose ist bei Diabetespatienten um das 4- bis 5-fache erhöht im Vergleich zu einem Nicht-Diabetiker [7]. Die Neuropathie tritt im Schnitt bei jedem vierten Diabetiker auf, am häufigsten in den Beinen [7]. Die Lebenserwartung eines Diabetes mellitus Patienten sinkt infolge der Spätkomplikationen deutlich ab [7]. Zusammengefasst kann Diabetes mellitus das Herz, die Blutgefäße, die Augen, die Nieren und die Nerven in ihrer Funktion beeinflussen und führt unbehandelt aufgrund der Folgeschäden zum Tod [3].

## 2 Dried Blood Spot Analytik

### 2.1 Hintergrund

Die Dried Blood Spot (DBS) Analytik oder übersetzt die Trockenblutanalytik ist eine analytische Anwendung zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Analyten im Blut. Sie fand ihren Ursprung 1963, als sie von Guthrie und Susi zum ersten Mal eingesetzt wurde, um Neugeborene auf eine Phenylketonurie zu untersuchen [18]. Sie trugen eine kleine Menge Kapillarblut auf ein dickes Filterpapier auf, ließen es an der Luft trocknen und anschließend wurde ein Teil des Filters mit dem adsorbierten Blut ausgestanzt und analysiert [18]. Es war die erste beschriebene Alternative zur venösen Blutabnahme [19] und bis heute ist dieses Vorgehen mit kleinen Änderungen dasselbe geblieben (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vorgehensweise der Trockenblutanalytik.** Kapillarblut wird durch Punktion der Fingerbeere entnommen, auf einen Träger getropft, getrocknet, anschließend extrahiert und die Analyten im Extrakt quantifiziert.

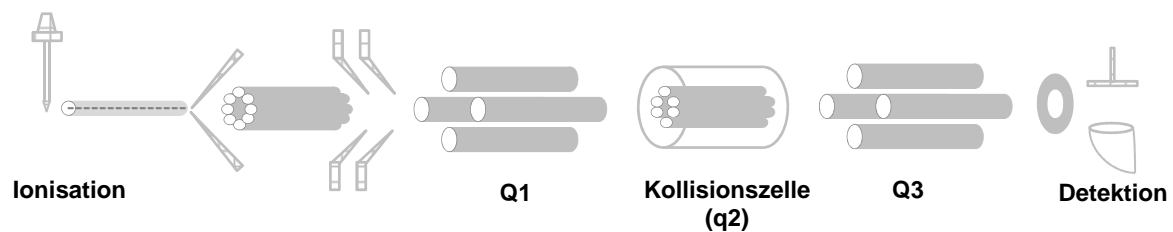
In der DBS Analytik werden die Analyten mit den Blutbestandteilen an einer festen Matrix adsorbiert und anschließend luftgetrocknet [19]. Aufgrund dieses trockenen Zustands sind sie sehr oft weniger reaktiv als in flüssigem Blut bzw. Plasma [19], somit ist für die

meisten Analyten eine sehr hohe Stabilität gewährleistet [19-21]. Ein weiterer Vorteil ist die Reduktion (z. B.: Hepatitis B) oder Elimination (HIV) biologischer Gefahren [19, 22-24]. Das Versenden der Proben erfordert kein Trockeneis oder andere speziellen Vorsichtsmaßnahmen, sondern sie können in herkömmlichen Umschlägen auf normalem Postweg versandt werden [20, 22, 24]. Gegenüber dem Umgang mit üblichen Plasma-proben bedeutet der mit Trockenblutproben deshalb eine immense Kostenreduzierung [19, 23, 25-28]. Die Lagerung bei Raumtemperatur und der Wegfall der Zentrifugation macht die Arbeit mit DBS Proben im Vergleich zu Plasmaproben auch wesentlich weniger aufwändig [23, 27, 29, 30].

Zusätzlich bietet die DBS Analytik auch in der Probensammlung einige Vorteile gegenüber der Abnahme von venösem Blut. Kapillarblut kann durch einen einfachen Stich in die Fingerbeere gewonnen werden, was durch das medizinische Personal oder eventuell vom Patienten selbst durchgeführt werden kann [19, 20, 22, 23, 30-32]. Sie ist somit eine minimalinvasive Methode der Blutabnahme [22, 23, 25, 26], die weniger schmerzhaft ist [23, 30] und von den Patienten besser akzeptiert wird als die venöse Blutabnahme [19, 23, 28, 32]. Das Vorgehen und die Abnahme des geringen Probenvolumens bietet vor allem für die Pädiatrie [19, 25, 32, 33], aber auch für sehr geschwächte und anämische Patienten große Vorteile [33]. Auch in Tierversuchen führt die Anwendung von DBS zu Vorteilen, da sie die 3R Regel für Tierversuche (reduction, refinement and replacement) unterstützt [33]. Auf der anderen Seite ist das minimale Probenvolumen eine Herausforderung, da die analytische Methode sehr empfindlich sein muss [19, 20, 23, 24, 32]. Dies war der Grund, warum die DBS Analytik für die breite Anwendung wenig zugänglich war und deshalb für Jahre nur sehr wenig genutzt wurde [19, 24]. Ein weiterer negativer Effekt gegenüber der venösen Blutabnahme ist, dass nur eine knapp bemessene Menge an Blut abgenommen wird und man so kein überschüssiges Volumen hat, um die Analytik eventuell wiederholen zu können [32, 33].

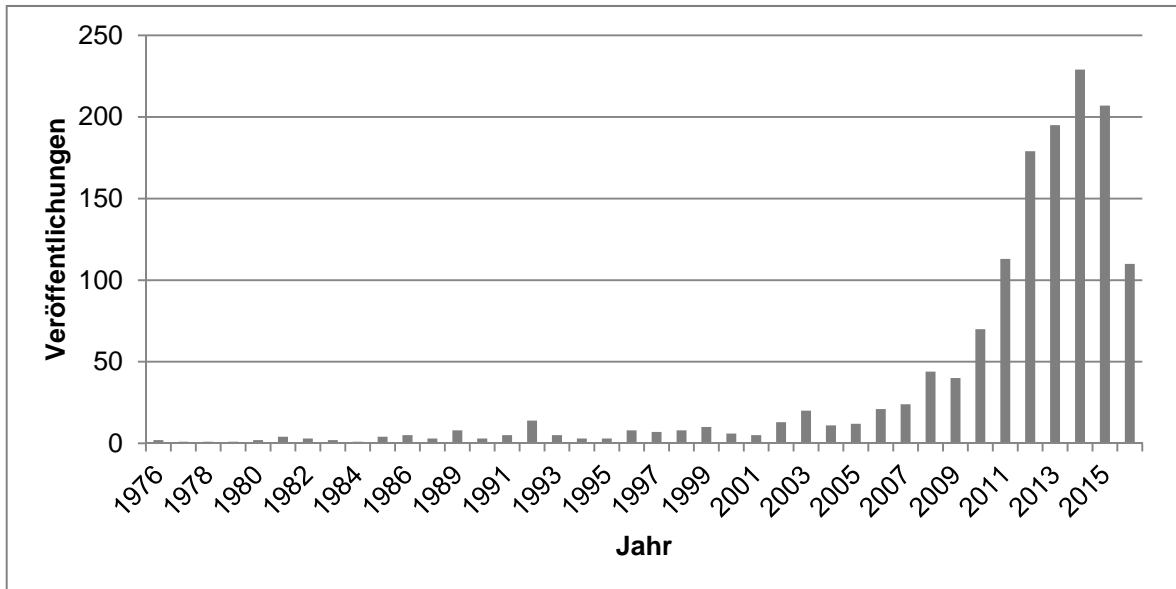
Die LC-MS/MS Methodik zum Vermessen von Dried Blood Spots ist eine relativ junge Methode in der pharmazeutischen Analytik [22]. Sie wurde 1993 zum ersten Mal angewandt [20] und hat in den letzten Jahren sehr an Aufmerksamkeit gewonnen und wird dementsprechend immer häufiger eingesetzt [34]. Während die bis 2009 publizierten Analysenmethoden für das Therapeutischen Drug Monitoring noch hauptsächlich HPLC-UV Methoden darstellten [21], wurden zwischen 2009 und 2014 weitestgehend LC-MS/MS Methoden publiziert [32]. Dies liegt unter anderem auch an der Einführung der „weichen“ Ionisation mittels Elektrospray (ESI) bei Atmosphärendruck (API) [34]. Hierbei wird die Probenlösung in die Ionenquelle gesprüht, in der sich ein Nebel aus sehr kleinen geladenen Tröpfchen bildet. Werden diese Tröpfchen durch das Drying Gas getrocknet,

rücken die Ladungen irgendwann so dicht zusammen, dass diese die Tröpfchen sprengen und somit wiederum kleinere Tröpfchen entstehen. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis nur noch die erwünschten geladenen Analytmoleküle zurückbleiben. Diese in der Gasphase enthaltenen Ionen gelangen anschließend durch die Glaskapillare in das Massenspektrometer [35]. Hier werden im ersten Quadrupol (Q1) die zu quantifizierenden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) selektiert. Im zweiten Schritt gelangt das gewählte Mutter- oder Precursor-Ion in den zweiten Quadrupol (q2), der als Kollisionszelle bezeichnet wird. Hier werden durch die „collision induced dissociation“ (CID) die Fragment-, Produkt- oder Tochterionen erzeugt. Im letzten Schritt werden im dritten Quadrupol (Q3) die Fragmentationen selektiert und anschließend werden diese detektiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometers.** In der Ionenquelle werden durch Ionisation geladene Analytmoleküle erzeugt, die durch die Glaskapillare in das Massenspektrometer gelangen. Im ersten Quadrupol (Q1) werden entsprechend dem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) die Mutterionen selektiert, in der Kollisionszelle (q2) werden diese dann fragmentiert und im dritten Quadrupol (Q3) werden anschließend die Tochterionen selektiert. Die Übergänge eines Mutterions zu einem bzw. zwei Tochterionen werden detektiert und anschließend quantifiziert.

Aufgrund dieses dreigeteilten Systems, in dem in einer MRM-Methode die Übergänge eines Mutterions zu einem bzw. zwei Tochterionen aufgenommen werden, ist der Triple-Quadrupol-MS-Detektor das sensitivste MS-Instrument für quantitative Analytik [34]. Die hohe Sensitivität verbunden mit der hohen Spezifität macht die MS/MS-Analyse somit zu einer sehr attraktiven Bestimmungsmethode, die immer mehr Einzug auch in die Routineanalytik findet [34]. Besonders für die Dried-Blood-Spot Analytik bietet sich die hochempfindliche Detektionsmethode des Triplequadrupol (TQ)-MS an. Mit ihrer Entwicklung und somit der Möglichkeit, Analyten sehr selektiv und empfindlich nachzuweisen nahm die Anwendung der Trockenblutanalytik zu [19, 20], was sehr deutlich an der rasant steigenden Anzahl an Veröffentlichungen zu sehen ist (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Anzahl der Publikationen, die den Term „Dried Blood Spot Analysis“ enthalten.** Die Daten stammen von der US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed) (Zugriff: 11.04.2016).

Die DBS Analytik ist aber, auch wenn sie ohne Frage aus ethischer und ökonomischer Sicht die beste Methode in Bezug auf die Probensammlung und das Versenden und Lagern der Proben ist [36], noch nicht so robust und akkurat, wie die Analytik aus venösen Vollblutproben [20]. Hier muss noch einiges an Forschung investiert werden, um sie als Routinemethode etablieren zu können, auch wenn sie diesem Ziel immer näher rückt [20, 21, 33, 37].

## 2.2 Probensammlung

### *Trägermaterialien*

Die Trägermaterialien, auf denen das Blut getrocknet wird, sollten verschiedene Eigenschaften erfüllen: Sie sollten kostengünstig und einfach in der Herstellung sein. Außerdem sollten sie gute Adsorptionseigenschaften aufweisen [19]. Hierzu zählen die Partikelretention, die Porengröße und die Dicke des Trägers, also Eigenschaften, welche die Ladekapazität und Spreitbarkeit des Blutes auf dem Träger beeinflussen [21, 22]. Insgesamt soll die Absorption der Probenflüssigkeit in die Karte akkurat und reproduzierbar sein [28]. Die am häufigsten genutzten Träger sind unbehandelte DBS Karten, die aus reiner Cellulose bestehen [19, 28, 30]. Innerhalb dieser Gruppe können die Träger sich aber hinsichtlich der chromatografischen Effekte, der Spreitbarkeit, der Analytstabilität oder auch der Matrixeffekte unterscheiden [19]. Die Celluloseträger können chemisch vorbehandelt oder imprägniert werden, z. B. um die Zellen zu lysieren,

Pathogene abzutöten oder um Proteine zu denaturieren [19, 20, 22, 38]. Durch diese Zusätze soll die Wiederfindung der Analyten verbessert werden [22]. Neben diesen klassischen DBS-Trägern können aber auch andere Materialien genutzt werden, wie zum Beispiel normales Filterpapier oder auch Materialien, die ursprünglich zur Chromatographie verwendet wurden [19]. Nicht-Cellulose-basierte Materialien, wie Glaspapierfilter, Polytetrafluorethylen-Filterpapier, Polyurethanmembranen oder auch Chitosan- oder Alginatschäume werden immer häufiger eingesetzt, auch wenn ihr Einsatz im Moment noch nicht sehr weit verbreitet ist [19, 39]. Mengerink et al. stellten 2015 eine neue DBS Karte vor, die aus hydrophil beschichteten, gewebten Polyesterfasern besteht, um einen immer gleich großen Spot unabhängig vom Hämatokrit des Blutes zu erhalten (Einleitung, A2.3) [40]. Auch Karten auf Basis eines Nicht-Cellulose Materials (Glasfasern), um exzellente Spothomogenität und reproduzierbare Extraktionsmöglichkeiten zu erhalten, sind mittlerweile im Handel erhältlich [19, 23, 41]. Sie versprechen das massenspektrometrische Signal zu verbessern indem nicht-spezifische Bindungen zwischen dem Analyt und dem Träger reduziert werden [23, 41]. Auch der Einsatz wasserlöslicher Materialien, die im Extraktionsmittel vollständig aufgelöst werden, wie z. B. Carboxymethylcellulose als Träger der DBS, wurde schon publiziert [42].

### *Blutabnahme*

Das aus der Fingerbeere entnommene Kapillarblut wird auf den Träger getropft und bei Raumtemperatur in horizontaler Lage für drei bis vier Stunden getrocknet [19, 20, 28], wobei es nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sein soll [20, 28]. Um eine inhomogene Verteilung zu vermeiden, soll das Blut frei auf den Träger tropfen [19, 20, 22, 30]. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass Kapillarblut nicht dieselbe Zusammensetzung zeigt wie venöses Blut und die Konzentrationen der Analyten somit nicht unbedingt gleichzusetzen sind [20, 32].

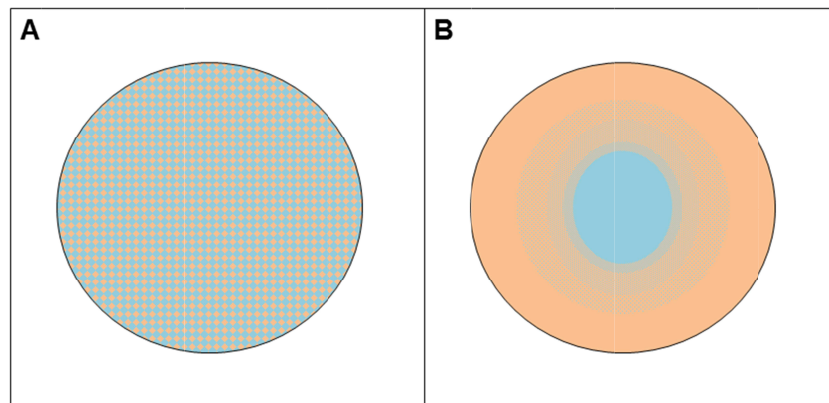
## **2.3 Quantitative Analyse**

Im Bereich der Trockenblutanalytik gibt es viele Faktoren, die die Quantifizierung eines Analyten beeinflussen und auch erschweren, die aber in der Analytik mit flüssigen Proben nicht unbedingt Anlass zur Diskussion bieten [19]. Der chromatografische Effekt, Effekte aufgrund des Hämatokrits (Hct), Volumeneffekte, aber auch die Gründe für Analytinstabilität, die Anwendung des internen Standards, die Herstellung der Qualitätskontroll (QC)-Probe oder die Methode, wie der Spot verwendet wird (nur ein Teil des Spots (Punch) vs. gesamter Spot) spielen hierbei eine wichtige Rolle [19]. Auch das genutzte Antikoagulanzen ist ein wichtiger Faktor; so wurde EDTA als Mittel zur Antikoagulation empfohlen [26, 43]. Die Validierung einer Dried-Blood-Spot Methode

muss dieselben Kriterien erfüllen wie die einer Methode aus flüssigen biologischen Proben, allerdings sollte sie um weitere Punkte ergänzt werden (Einleitung, A2.5) [44]. Im Weiteren werden die wichtigsten Faktoren näher erläutert.

#### *Chromatografischer Effekt*

Der chromatografische Effekt beschreibt die inhomogene Adsorption des Blutes auf den Träger [19]. Abhängig von der Stärke des Effektes ist die Zusammensetzung der Probe an unterschiedlichen Stellen im Spot verschieden und führt zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen in der Konzentration des Analyten (Abbildung 5) [19, 32].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des chromatografischen Effektes.** Gewünscht ist eine gleichmäßige Verteilung der Analyten (orange und türkis) im Spot (A). Der chromatografische Effekt dagegen wird beschrieben durch eine Auftrennung der Analyten während der Adsorption an den Träger, sodass die Analyten ungleichmäßig im Spot verteilt sind (B).

Er kommt zustande, indem der Analyt oder das Blut mit dem Trägermaterial interagiert [22]. Dieser Effekt kann in Abhängigkeit vom Träger oder auch vom Analyt mehr oder weniger stark ausgeprägt sein [19, 28] und sollte in der Methodenentwicklung untersucht werden [22, 37].

#### *Hämatokriteffekt*

Der Hämatokrit (Hct) des Blutes ist definiert als der prozentuale Anteil der Erythrozyten im Blut [19, 22, 32]. Er variiert mit dem Alter, dem Geschlecht, dem Gesundheitszustand und auch mit der ethnischen Zugehörigkeit [19, 25]. Er beeinflusst die Viskosität des Blutes und somit auch die Spreitbarkeit auf dem Träger [19, 20, 22, 32, 44]. Der Einfluss des Hct auf die Quantifizierung von Analyten aus DBS Proben ist der wohl am häufigsten und intensivsten diskutierte Parameter im Bereich der DBS Analytik [32, 33, 45]. Die Fläche des DBS nimmt mit zunehmenden Hct ab [19, 25]. Dies hat zur Folge, dass das gleiche Volumen an Blut in Abhängigkeit vom Hct unterschiedlich große Spots erzeugt [37]. Problematisch wird dieses Verhalten, wenn zur quantitativen Analyse ein definiert großer

Durchmesser aus dem gesamten Spot ausgestanzt und dieser zur Analytik verwendet wird, da das Volumen des darin enthaltenen Blutes unter Umständen variiert [19, 22]. Wird also nicht der gesamte Spot verwendet, muss der Effekt des Hct evaluiert und auch validiert werden [19, 44]. Der Hämatokriteffekt wird sehr stark durch das Trägermaterial und den Analyten beeinflusst [19, 28, 32] und ist somit von Fall zu Fall unterschiedlich [22, 37]. Durch einen variierenden Hct besteht die Möglichkeit, dass die Extraktion mit unterschiedlicher Effizienz erfolgt [19, 32]. Um dem Einfluss gerecht zu werden, wurden verschiedene Strategien vorgeschlagen, ihn zu kompensieren. Unter anderem wurde das Gesamtvolumen des Spots miteinbezogen oder über die Kaliumkonzentration der Hämatokrit berechnet [19, 32, 45, 46]. Die Korrelation mit Kalium wurde allerdings nicht im Kapillarblut, sondern im venösen Vollblut durchgeführt [32]. Die einfachste Möglichkeit, um den Hämatokriteffekt zu umgehen, ist die Extraktion des gesamten Spots, der dafür aber volumetrisch aufgetragen werden muss, was wiederum die Limitierung dieses Vorgehens darstellt [32, 33, 45]. Die von Mengerink et al. vorgestellte DBS Karte aus hydrophil beschichteten Polyesterfasern verspricht einen vom Hct unabhängigen, gleich großen, homogen verteilten Blutspot, sodass damit das Problem des Hämatokriteffekts aufgrund der Trägerbeschaffenheit umgangen wurde [40].

### *Volumeneffekte des Blutes*

Wird eine aus dem gesamten Spot ausgestanzte Fläche (Punch) zur Quantifizierung eines Analyten verwendet, so ist es wichtig zu wissen, welches Blutvolumen sich in diesem Punch befindet. Dieses ist allerdings, neben dem Hct, auch abhängig von Faktoren, wie der Sättigung des Trägers, dem Träger bzw. der Dicke und Dichte des Trägermaterials oder auch der Spreitung des Blutes auf dem Träger [19]. Die verschiedenen Trägermaterialien sind dabei nicht äquivalent und mit dem Auftragen von verschiedenen Blutvolumina kann die Quantifizierung unter Umständen fehlerhaft werden [19, 28]. Von verschiedenen Forschergruppen wurde gezeigt, dass dieser Fehler folgendem Prinzip folgt: Je höher das aufgetragene Blutvolumen, umso höher ist die Konzentration des Analyten [19]. Während der Methodenentwicklung sollte deshalb die Beziehung zwischen der Fläche des Spots und der Menge des gespotteten Blutvolumens untersucht werden [22].

### *Analytstabilität*

Im Allgemeinen wird für die DBS Analytik postuliert, dass die Proben von der Sammlung bis zur Analyse bei Raumtemperatur ohne viele Vorsichtsmaßnahmen gelagert werden können [19]. Die Realität zeigt aber, dass dies für jeden Analyten bzw. für jede Anwendung untersucht werden muss [19, 30]. Im Falle der Aminosäuren ist es zum Beispiel so, dass Valin in Trockenblutproben sehr stabil ist, die Konzentration an Serin



dagegen sehr schnell abnimmt und die an Arginin zunimmt [19]. Die Faktoren, welche die Analytstabilität beeinflussen, sind auf der einen Seite der Trocknungsprozess, auf der anderen Seite die Temperatur und Restfeuchte in der Probe während der Lagerung [19, 26]. Zudem haben auch das Trägermaterial und die Lagerungsdauer einen Einfluss [26]. Der Trocknungsprozess bei Raumtemperatur dauert mindestens ein bis drei Stunden [19, 22], abhängig vom Trägermaterial und dem aufgetragenen Volumen an Blut [22]. Um diese Zeit zu verkürzen, vor allem für konjugierte Verbindungen, die während des langen Trocknungsprozesses in die nicht-konjugierte Form umgewandelt werden können oder auch Prodrugs, wie z. B. 6-Acetylmorphin, gibt es die Möglichkeit, die Trocknung unter einem Strom von Stickstoff oder unter Mikrowellen durchzuführen, damit die Stabilität der Stoffe gewährleistet wird [19]. Auch durch die Zugabe von Additiven oder ein Erhitzen auf 95 °C kann die Matrix mit den Analyten stabilisiert werden [47]. Einen noch größeren Einfluss als der Trocknungsprozess haben die Temperatur und die Feuchte während der Lagerung der Spots [19, 21]. Von verschiedenen Forschungsgruppen wurden beim Versenden der Proben Temperaturen von bis zu 60 °C aufgezeichnet [19, 21]. Noch vorhandene Restfeuchte kann zu Hydrolysereaktionen führen und auch das Bakterienwachstum fördern [19-23]. Das Problem der Feuchtigkeit kann umgangen werden, indem die Proben in verschlossenen Plastiktüten zusammen mit Trockenmittel versandt werden [19, 21, 23, 24, 28]. Zusätzlich können auch Feuchteindikatoren hinzugegeben werden [21-23, 28, 30]. Die Stabilität der Trockenblutproben bei Raumtemperatur ist vergleichbar mit der von Plasmaproben bei 4 °C [19]. Für oxidationsempfindliche Stoffe ist die Methode der DBS allerdings nicht zu empfehlen [22]. Um die Stabilität im Spot zu verbessern, können verschieden Strategien getestet werden. Es kann das Trägermaterial getauscht, der pH-Wert der Probe verändert [26], die Träger mit stabilisierenden Chemikalien imprägniert oder die Probe mit Hitze behandelt werden [19]. Auch die Lagerung bei niedrigeren Temperaturen kann die Stabilität verbessern [22]. Lichtempfindliche Stoffe sollten im Dunkeln aufbewahrt werden [25]. Wie lange die Analyten in den DBS stabil sind ist stark analytabhängig und kann von einer Woche für Proteine bis hin zu Jahren für Nukleinsäuren variieren [23].

#### *Herstellung der Qualitätskontroll (QC)-Probe*

QC-Proben und die zu quantifizierenden Proben können nicht in derselben Matrix erhalten werden. Die QC-Proben werden aus venösem Vollblut hergestellt, da es nicht praktikabel ist, QC-Proben aus Kapillarblut zu erhalten, wohingegen die Patientenproben Kapillarblutproben sind [19]. Es sollte vermieden werden hämolysiertes [22] oder gealtertes venöses Blut für die Herstellung der QC-Proben zu verwenden [44]. Zudem sollte der Anteil an nicht-wässrigen Komponenten, der dem Blut zugegeben wird, möglichst gering gehalten werden, um Lösungsmittelleffekten vorzubeugen [44].

### *Extraktion eines Punches gegenüber der Extraktion des gesamten Spots*

Die Probleme, die durch den patientenindividuellen Hämatokrit oder den chromatografischen Effekt hervorgerufen werden, spielen eine Rolle, wenn nur ein Teil des Spots ausgestanzt und quantifiziert wird [19]. Die Extraktion des gesamten Spots ist im Falle von stark ausgeprägten, oben beschriebenen Effekten, oft die einzige Option für eine akkurate und präzise Quantifizierung [22]. Aus diesem Grund werden immer mehr neue Probenentnahmestrategien entwickelt, wie z. B. Pre-cut DBS (PCDBS) oder auch Perforated DBS [19, 32]. Im Falle der Pre-cut DBS werden Filterpapierkreise vor dem Auftragen der Probe ausgestanzt, eine volumetrisch abgemessene Blutprobe aufgetragen und anschließend der gesamte Spot extrahiert [48]. In der Anwendung der Perforated DBS wird das definierte Volumen an Blut auf einen am Rand perforierten Spot getropft [49]. Diese Perforation kann dann sehr leicht mit Hilfe einer Einmalpipette durchbrochen werden und der Spot ist, ohne dass er mit einer Stanze in Berührung kommt, bereit zur Extraktion [49]. So kann ein Carry-over aufgrund der Stanze umgangen werden und dadurch, dass ein definiertes Volumen extrahiert wird, ist der Effekt des Hct und der chromatografische Effekt ebenso wie der Volumeneffekt des Blutes hinfällig [49]. Das volumetrische Sammeln der Probe kann umgangen werden, indem z. B. nicht-volumetrisch gesammelte Proben mit Hilfe verschiedener Hilfsmittel volumetrisch aufgetragen werden [45]. Ein solches Vorgehen ist das „volumetric absorptive microsampling“ (VAMS), bei dem ein konstantes Volumen an Blut, unabhängig vom Hämatokrit, in einen Probensammler aufgesogen und somit ein immer gleichbleibendes Volumen erhalten wird [50]. Eine der neuesten Entwicklungen stellt der hemaPEN™ dar, der aussieht wie ein Stift, aber eine einfache und volumetrische Kapillarblutabnahme und eine sichere Aufbewahrung von bis zu vier DBS Proben verspricht [33, 51].

## **2.4 Probenextraktion**

Die Extraktion aus dem Spot erfolgt meist über eine Fest-Flüssig Extraktion [19, 22]. Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel ist dabei sehr stark. So führt die Extraktion mit reinem Wasser zu sehr dunklen, verunreinigten Extrakten, die sehr viel Häm aus dem Hämoglobin enthalten. Wird der Spot dagegen z. B. mit Acetonitril extrahiert, tritt dies nicht auf [19]. Bekannt ist aber auch, dass ein wenig Wasser notwendig ist, um die Extraktionseffizienz zu verbessern [19]. Es muss also ein Kompromiss zwischen Hydrophilie und Lipophilie des Extraktionsmittels passend für den jeweiligen Analyten gefunden werden. Die Dauer der Extraktion sowie das Volumen an Extraktionsmittel, die Temperatur und der Einsatz von Ultraschall beeinflussen die Extraktion ebenfalls [19, 22].

Der interne Standard kann während der Extraktion auf verschiedene Arten zugegeben werden und hat somit einen zusätzlichen Einfluss auf die Quantifizierung der Analyten [19, 26]. Idealerweise sollte der interne Standard alle Faktoren korrigieren, welche die Quantifizierung der Analyten vom Moment der Blutsammlung an, bis hin zur Detektion beeinflussen [52]. Bei flüssigen Proben wird er in die Probe gegeben, sodass er alle Extraktionsschritte durchläuft und die Probenaufarbeitung und Matrixeffekte kompensiert. Dies aber funktioniert bei getrockneten Proben nicht [19, 52]. Im Bereich der DBS Analytik ist es nicht ungewöhnlich, den internen Standard erst mit dem Extraktionsmittel zuzugeben [32, 33, 52]. In diesem Fall kann er aber die Variationen, die bei der Extraktion aus der getrockneten Matrix auftreten, nicht ausgleichen [19, 25, 37, 44]. Wird er schon vor dem Auftragen der Probe auf den Träger gegeben [32], führt dies auch oft zu Problemen, da der interne Standard beim Auftragen der Probe gelöst wird und durch den chromatografischen Effekt dann nicht homogen in der Probe verteilt ist [19, 52]. Zudem muss sichergestellt sein, dass er in getrockneter Form stabil ist [52]. Das Auftragen des internen Standards vor der Probensammlung wurde von Mommers et al. auf zwei verschiedene Arten für Morphin-d3 als Modellschubstanz untersucht [52]. Es wurde zum einen die komplette DBS Karte mit einer Lösung des internen Standards imprägniert, zum anderen wurde nur ein kleines Volumen mit der Pipette aufgetragen und diese Prozeduren hinsichtlich der Peakfläche untersucht [52]. Nachdem dabei vergleichbare relative Standardabweichungen erhalten wurden, wurde die Technik des Imprägnierens der Karte weiter verfolgt, z. B. hinsichtlich des Auftragens der Blutprobe [52]. Es hat sich gezeigt, dass das Vorimprägnieren der Karte richtige Ergebnisse liefert, wenn das Blut absolut frei auf die Karte aufgetragen wird und die Imprägnierung nicht von einer Mikrokapillare berührt wird [52]. Alternativ kann der interne Standard auf den DBS aufgetragen werden [32], aber auch da besteht das Problem der inhomogenen Verteilung, wenn nicht der komplette Spot extrahiert wird [19]. Es gibt aber auch die Möglichkeit, ihn gleichmäßig auf die Karte aufzusprühen, sodass eine homogene Verteilung auf dem DBS gewährleistet ist [32]. Eine beschriebene Technik ist, den internen Standard und die Probe getrennt zu spotten, aber gemeinsam zu extrahieren [19]. In verschiedenen Studien, welche die unterschiedlichen Techniken verglichen, hat sich gezeigt, dass das Spotten des internen Standards auf die Probe die besten Ergebnisse liefert [19]. Diese Methode kann auch ohne Probleme angewandt werden, wenn der Patient sich das Blut zu Hause selbst abnimmt [32].

## **2.5 Methodvalidierung**

Die Analyse aus Trockenblut ist im Vergleich zu der aus Plasma eine relativ neue Art der Analytik, weshalb es bezüglich der Methodvalidierung nur wenige Informationen gibt

[32]. Erst nach der Validierung gilt eine Methode als zuverlässig und reproduzierbar und kann zur Quantifizierung der Analyten aus biologischen Matrizes eingesetzt werden [53, 54]. Für neu entwickelte und auch für bestehende Methoden, in die ein weiterer Analyt eingeschlossen wird, ist es wichtig, eine Vollvalidierung durchzuführen [54]. Werden nur Kleinigkeiten geändert, z. B. Veränderungen des Konzentrationsbereichs oder werden sie in anderen Laboratorien angewandt, reicht es aus, eine Partialvalidierung durchzuführen, um die geänderten Parameter zu überprüfen [54].

Li und Ploch kritisierten 2012 das Fehlen einer regulatorischen Richtlinie für die Validierung bioanalytischer Methoden aus Trockenblutproben. Im Jahr zuvor jedoch wurde vom European Bioanalysis Forum (EBF) eine Empfehlung dazu publiziert, 2013 wurde diese aktualisiert [37, 44, 55]. Im Wesentlichen wurde darin vorgeschlagen, die Validierung für Methoden aus flüssigen, biologischen Proben um einige Parameter zu erweitern. Zu diesen zählen u. a. der Einfluss des Hämatokrits auf die Blutmenge im Punch, der Einfluss der Hämolyse, Antikoagulanzen, Homogenität der Probe und Spot-to-Spot Carry-over [44]. Die Stabilitätsuntersuchungen sollten gegenüber der Analytik aus flüssigen Proben ausgedehnt werden [33]. Auch 2016 gibt es noch keine offizielle Richtlinie für die Validierung einer DBS Methode [33].

Die Validierung für bioanalytische Methoden wiederum wird in der Richtlinien der FDA und der EMA beschrieben [53, 54]. Zudem gibt es aber noch weitere Publikationen, die sich mit der Validierung von Methoden zur Analytquantifizierung aus flüssigen, biologischen Matrizes beschäftigen [56, 57]. Die zu untersuchenden Parameter für eine Vollvalidierung sind die Selektivität, die Kalibrierfunktion (Linearität), das niedrigste Quantifizierungslimit (Lower Limit of Quantification (LLOQ)), die Richtigkeit (Accuracy) und Präzision, die Wiederfindung und Extraktionseffizienz, das Verschleppen von Analyt in die nachfolgende Analyse (Carry-over), die Robustheit, die Matrixeffekte und die Stabilität.

### **2.5.1 Selektivität**

Die Selektivität ist die Fähigkeit der Methode, die Analyten in Gegenwart anderer Verbindungen in der Probe zu identifizieren und zu quantifizieren [54]. Hierbei muss die Methode differenzieren können zwischen den Analyten, dem internen Standard und endogenen Komponenten der Matrix bzw. Komponenten, die sich in dieser Matrix befinden [53]. Zusammengefasst bedeutet das, dass die Analyten und der interne Standard ohne gegenseitige Störung, aber auch ohne Störung durch andere in der Matrix vorkommenden Substanzen nebeneinander erfasst werden können müssen.

### 2.5.2 Kalibrierfunktion

Das Signal des Detektors bezüglich der Analytkonzentration wird über einen festgelegten Konzentrationsbereich validiert [53, 54]. Dabei soll für die Kalibrierstandards dieselbe Matrix verwendet werden, wie sie in den Proben zu finden sein wird [53, 54]. Um den Zusammenhang des Detektorsignals mit der Analytkonzentration zu beschreiben, soll das einfachste Modell genutzt werden [54]. Ist die Beziehung linear, soll die Steigung sowie der Achsenabschnitt angegeben werden [53]. Mindestens 75 % der Kalibrierstandards mit einem Minimum von sechs Kalibrierpunkten müssen, wenn die Konzentration der Standards rückgerechnet wird, die erforderlichen Kriterien (Richtigkeit  $\pm 15$  %; für den LLOQ  $\pm 20$  %) erfüllen [53].

### 2.5.3 Lower Limit of Quantification

Als niedrigster Kalibrierstandard (LLOQ) wird der niedrigste Punkt der Kalibriergerade bezeichnet, der noch quantifiziert werden kann. Für ihn gilt, dass sein Signal fünfmal höher sein soll, als das einer Blank-Probe sowie dass er mit einer Präzision von  $\leq 20$  % und einer Richtigkeit von 80 - 120 % reproduzierbar bestimmt werden können muss [54].

### 2.5.4 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit (Accuracy) beschreibt die Nähe des durch die Methode bestimmten Wertes zur Nominalkonzentration des Analyten [53].

Die Präzision beschreibt die Genauigkeit der individuellen Messungen, wenn die gesamte Probenaufarbeitung wiederholt für mehrere Aliquote eines einzigen homogenen Matrixvolumens durchgeführt wird [54]. Sie beschreibt also die Nähe der individuellen Messungen zueinander [53].

### 2.5.5 Wiederfindung, Extraktionseffizienz und Carry-over

Die Wiederfindung (Recovery, RE) beschreibt, wie viel Analyt durch die Probenaufarbeitung verloren geht bzw. wie viel Analyt nach der Probenaufarbeitung aus der Matrix detektiert wird. Der Einfluss der Matrix spielt hierbei keine Rolle, da der zu vergleichenden „100 % - Wert“ ebenfalls in der Matrix vermessen wird. Im Vergleich dazu beschreibt die Extraktionseffizienz (EE), wie viel Analyt aus der Matrix extrahiert wird. Zusätzlich fließt hierbei noch der Einfluss der Matrix mit ein, da der „100 % - Wert“ aus reinem Lösungsmittel gemessen wird [58]. Die Ergebnisse sollen hierbei möglichst gleichbleibend, präzise und reproduzierbar sein [54].

Carry-over beschreibt das Verschleppen von Analyt in die nachfolgende Injektion [53].

### 2.5.6 Robustheit

Eine Methode gilt als robust, wenn durch Änderungen verschiedener Bedingungen der Analytik das Endergebnis nicht verfälscht wird. Zum Testen der Robustheit sollen Parameter ausgewählt werden, die beim Vorgang der Probenentnahme bis hin zum Vermessen immer wieder verändert auftreten können und somit „alltägliche Fehlerquellen“ darstellen, z. B. die unterschiedlich lange Trocknungsdauer eines Spots [56].

### 2.5.7 Matrixeffekte

Als Matrixeffekt (ME) wird die direkte oder indirekte Beeinflussung des Signals aufgrund von anderen, in der Probe vorhandenen Stoffen, meist Matrixbestandteilen, bezeichnet [54]. Sie sollen untersucht werden, wenn zur Analyse eine massenspektrometrische Methode eingesetzt wird [53]. Substanzen, die ME erzeugen, können dabei endogene, aber auch exogene Faktoren sein [59, 60]. Endogene Faktoren sind hierbei zum Beispiel Phospholipide oder endogene Metabolite, wie Bilirubin, exogene dagegen Additive der mobilen Phase, z. B. Trifluoressigsäure, Reste der Formulierung einer Tablette oder auch Polymere, die bei der Probenaufarbeitung aus Plastikgefäßen, in denen die Extraktion stattfand, extrahiert wurden [59]. Im Falle der DBS sind hier ebenfalls Bestandteile aus der Trägermatrix zu nennen [33]. Diese undetektierten, coeluiierenden Substanzen können die Ionenintensität verstärken oder unterdrücken und somit die Reproduzierbarkeit und die Richtigkeit beeinflussen [58, 59]. Die Veränderung der Ionenintensität kann dabei aber für den Analyt und den internen Standard unterschiedlich in verschiedenen Chargen derselben biologischen Matrix, z. B. Plasma, Vollblut oder Urin, die von unterschiedlichen Spendern erhalten wurden, sein [58, 59]. Der Mechanismus und auch der Ursprung der Effekte ist nicht vollständig geklärt, sie müssen aber im Interface zwischen dem LC-System und dem MS-System, also der Ionenquelle, entstehen [58, 59]. Eine mögliche Erklärung könnte der Wettbewerb zwischen den Analyten und coeluiierenden Substanzen sein, die mit primären Ionen, die im LC-MS/MS Interface gebildet werden, reagieren. Dieser Konkurrenzkampf kann die Bildung der gewünschten Analytionen beeinflussen [58]. Um Substanzen zu quantifizieren, müssen diese in der Ionenquelle von ungeladenen Teilchen in geladene Ionen übergehen [58, 59]. Dies geschieht, indem primäre Ionen mit den Analyten in einer komplexen Kettenreaktion von Ladungs- und Ionentransferreaktionen miteinander reagieren. Diese Reaktionen sind abhängig von der relativen Ionisationsenergie, der Protonenaffinität oder auch, ob beide Moleküle zur selben Zeit im „Reaktor“, also der Ionenquelle, vorhanden sind. Somit ist eine Abhängigkeit von der Matrix gegeben [58]. Zudem wurde auch eine Abhängigkeit vom MS/MS-Interface, also ob eine Elektrospray Ionisation (ESI) (Einleitung, A2.1) oder

Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) vorliegt, beschrieben [58, 60]. Die ESI-Quelle scheint dabei empfindlicher für Matrixeffekte zu sein als die APCI-Quelle [59, 60]. Die Effekte sind auch vom Analyten abhängig. Polare Analyten sind häufiger und stärker betroffen als unpolare Analyten, was daran liegen könnte, dass polare Analyten mit polaren Matrixbestandteilen coeluieren, die diese Effekte verursachen [59].

Matrixeffekte sind also die Konsequenz aus allen in der Probe enthaltenen Komponenten [59, 60]. Sie können dazu führen, dass quantitative Ergebnisse und die daraus resultierenden pharmakokinetischen Daten nicht absolut sind, da diese aufgrund von Ionensuppression, Interferenzen von Metaboliten oder „Cross-Talk“-Effekten beeinflusst werden [58]. Cross-Talk ist dabei ein weiteres Phänomen, das auftritt, wenn Substanzen Fragmente mit ähnlichen Massen erzeugen. Es können dann in der Kollisionszelle noch die Fragmente eines Übergangs vorhanden sein, wenn eigentlich schon der nächste Übergang betrachtet wird und diese somit fälschlicherweise einer anderen Substanz zugeordnet werden und falsch positive bzw. falsch hohe Ergebnisse erzeugen [59]. Das Ziel, Matrixeffekte zu verhindern, kann durch Entfernen der Matrixbestandteile während der Probenaufarbeitung und –reinigung erfüllt werden [59]. Eine weitere Option, um zu verhindern, dass Matrixeffekte die Quantifizierung verfälschen, ist der Einsatz von stabilen isotope-markierten internen Standards [59]. Diese sollen jedoch möglichst schwer markiert sein, mindestens um drei Dalton schwerer, um einen Cross-Talk auszuschließen [59]. Wenn endogene Matrixbestandteile die Effekte erzeugen, ist es auch möglich, die LC-Methode so anzupassen, dass diese getrennt vom Analyten die Säule verlassen und somit die Analytik nicht stören [59]. Für jeden Analyten und den internen Standard soll ein Matrixfaktor (MF) für individuelle Matrizes bestimmt werden, indem das Verhältnis der Peakfläche der Analyten in Präsenz von Matrix zu der Peakfläche der Analyten in Abwesenheit von Matrix kalkuliert wird. Der auf den internen Standard normalisierte Matrixfaktor (MFIS) wird berechnet, indem der MF des Analyten durch den des internen Standards geteilt wird [54].

### **2.5.8 Stabilität**

Die Stabilität muss untersucht werden, um sicher zu sein, dass die Analytenkonzentration durch Probenvorbereitung, die Analyse und auch die Lagerung nicht beeinflusst wird [53]. Hierzu soll die Stabilität der Stammlösungen untersucht werden, wie auch die der Analyten in der Matrix und die postpräparative Stabilität der Probe (z. B. im Autosampler) [53, 54].

## 3 Therapeutisches Drug Monitoring

### 3.1 Die „Steady-state“ Konzentration und der therapeutische Bereich eines Arzneistoffes

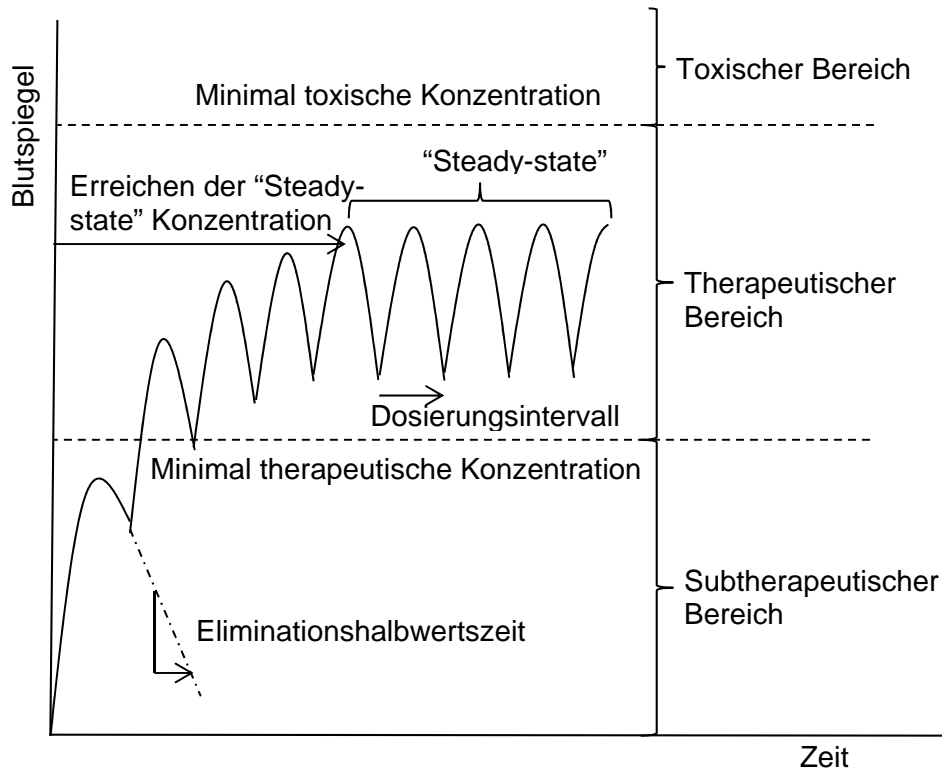
Arzneistoffe, die als Dauertherapie zur Behandlung chronischer Erkrankungen angewandt werden, erreichen bei regelmäßiger Einnahme ein Fließgleichgewicht, die „Steady-state“ Konzentration [12]. Zum Zeitpunkt der zweiten Arzneistoffgabe ist die erste Dosis noch nicht vollständig ausgeschieden, wodurch es zu einer Anreicherung der Arzneistoffe im Körper kommt [12]. Dieser Vorgang findet so lange statt, bis die zugeführte Menge genau der eliminierten Menge entspricht [4, 12]. Bis zum Erreichen dieses Fließgleichgewichts dauert es in der Regel vier bis fünf Halbwertszeiten des Stoffes [4, 12, 61], aber auch in diesem Gleichgewicht liegen keine absolut konstanten, sondern fluktuierende Arzneistoffspiegel vor [61]. Wie stark diese zwischen Maximal- und Minimalwerten schwanken ist abhängig von der Halbwertszeit und dem Verteilungsvolumen des Arzneistoffes, aber auch von der Dosis und dem Dosierungsintervall [4, 61]. Die „Steady-state“ Konzentration kann bei Kenntnis verschiedener pharmakokinetischer Daten des Arzneistoffes nach folgender Formel (1) berechnet werden.

$$C_{SS} = \frac{F \cdot D}{\tau} \cdot \frac{1}{Cl} \quad (1)$$

$c_{ss}$  = Konzentration im Fließgleichgewicht; F = Bioverfügbarkeit; D = Dosis; Cl = Clearance;  
 $\tau$  = Dosierungsintervall

Die Konzentration sollte im therapeutischen Bereich des Arzneistoffes liegen. Dieser wird dargestellt durch das Konzentrationsfenster, welches nach oben durch die minimal effektive Konzentrationen für toxische Effekte und nach unten durch die minimal effektive Konzentrationen für therapeutische Effekte eingegrenzt wird [61]. In diesem Bereich treten also weder unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, die auf zu hohe Blutspiegel zurückzuführen sind, noch sind aufgrund von subtherapeutischen Spiegeln keine Effekte zu beobachten (Abbildung 6).





**Abbildung 6: Zusammenhang des Blutspiegels eines Arzneimittels bei mehrmaliger Gabe mit der Zeit.** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Blutkonzentration nach mehrmaliger Gabe eines Arzneimittels mit den zugehörigen Kenngrößen. Die Abbildung wurde modifiziert nach [61].

Der therapeutische Bereich ist in der Charakterisierung eines Arzneimittels ein wichtiger Parameter. Arzneistoffe mit einer sehr geringen therapeutischen Breite, welche ein Maß für die Sicherheit des Arzneimittels zwischen toxischer und therapeutischer Wirkung darstellt [4], wie zum Beispiel Digoxin [62], Lithium [63], Carbamazepin [64] oder auch diverse Immunsuppressiva [65], müssen während der Therapie genau kontrolliert werden. Diese Kontrolle der Blutspiegel wird als Therapeutisches Drug Monitoring bezeichnet.

### 3.2 Anwendung der DBS zum Therapeutischen Drug Monitoring

Die hauptsächliche Anwendung der Trockenblutanalytik liegt bis heute im Bereich des Neugeborenen Screenings auf z. B. Phenylketonurie, Cystische Fibrose oder auch Sichelzellanämie [23, 24]. Sie kann aber auch zum Therapeutischen Drug Monitoring (TDM) genutzt werden [20, 44]. Die Anwendung der DBS Analytik in diesem und im Bereich der klinischen Studien nimmt im Moment stark für ein breites Spektrum an Analyten zu, ist aber noch nicht üblich [21, 22, 32]. Einer der Hauptgründe für die Zunahme der Anwendungen ist wohl die Tatsache, dass die Proben vom Patienten selber abgenommen werden können und somit ein Arztbesuch zur Blutabnahme überflüssig wird.

[21, 22]. Die Ergebnisse der Blutuntersuchung könnten dann schon vorliegen, wenn der Patient den Arzttermin wahrnimmt [21]. Vor allem für Patienten in abgelegenen Orten ist dies von Vorteil [22]. Auf der anderen Seite kann so aber nicht mehr kontrolliert werden, ob wirklich der Patient Blut abgegeben hat und auch zu welcher Zeit die Blutabnahme durchgeführt wurde. Für verschiedene Arzneistoffe sind schon Methoden zum Therapeutischen Drug Monitoring mittels DBS Analytik publiziert, u. a. gehören dazu Antiepileptika, Antibiotika oder auch antiretrovirale Wirkstoffe [21]. Vor allem für Arzneistoffe, die eine höhere Affinität zu den Blutzellen als zum Plasma zeigen, ist die Trockenblutanalytik eine gute Möglichkeit, die Therapie zu kontrollieren [36]. Die Anwendung der DBS Analytik zum TDM wäre für Entwicklungsländer, in denen die finanziellen Mittel für die Handhabung und den Umgang mit Plasmaproben fehlen, eine Möglichkeit, um den Patienten kostensparend die bestmögliche Therapie bieten zu können [36]. Oft aber fehlt in den Veröffentlichungen der Methoden die klinische Validierung, also die Anwendung an „echten“ Patientenproben [21]. Um die aus den DBS Proben enthaltenen Spiegel mit routinemäßig gemessenen Plasmaspiegeln vergleichen zu können, muss dieser Zusammenhang zuerst evaluiert werden [21, 22, 30-32, 66], da durch die Zusammensetzung des Kapillarblutes, das im Gegensatz zu venös abgenommenen Blut auch arterielle Bestandteile enthält, die Konzentrationen der Analyten unterschiedlich sein können [43].

### **3.3 Der Einfluss der Nierenfunktion auf die Arzneimittelkonzentration im Blut**

#### **3.3.1 Die renale Eliminierung**

Die Nieren sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers beteiligt [4]. Sie übernehmen dabei die Aufgaben der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten wie Harnstoff, Harnsäure oder Kreatinin, aber auch Xenobiotika [4]. Weitere Aufgaben sind die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts, der Abbau von Plasmaproteinen (z. B. Albumin) und Peptidhormonen (z. B. Insulin) sowie die Blutdruckregulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System [4]. Zudem werden in den Nieren wichtige Hormone, wie z. B. Calcitriol oder Erythropoetin synthetisiert und sie sind an der Glukoneogenese beteiligt [4].

Eine gute Nierenfunktion ist zur Ausscheidung überwiegend renal eliminerter Stoffe essentiell. Harnpflichtige Substanzen kommen mit dem Blut in der Niere an, welche mit 1,2 L/min das am stärksten durchblutete Organ ist [4]. Die hohe Durchblutung ist notwendig, um den Körper effektiv von den zu eliminierenden Substanzen zu befreien.

Über die Vas afferens gelangt das Blut und die darin gelösten Stoffe in den Glomerulus, in dem der Primärharn abgepresst wird [4]. Hier werden Moleküle größer als vier Nanometer durch die Schlitzmembran zurückgehalten. Zudem ist der Durchtritt in den Bowmanschen Kapselraum für anionische Moleküle sowie selbst die kleinsten Plasmaeiweißkörper, die Albumine, verhindert [4]. Nur Stoffe mit Molekülmassen bis ca. 5 kDa sind uneingeschränkt, bis zu ca. 50 kDa eingeschränkt filtrierbar. Darüber hinaus können sie die intakten Nierenfilter praktisch nicht passieren [4]. Die glomeruläre Filtration ist zudem abhängig vom effektiven Filtrationsdruck, der sich zusammensetzt aus dem Blutdruck der Kapillaren abzüglich des kolloid-osmotischen Druckes des Plasmas und dem Gewebedruck der Bowman-Kapsel [4]. Da am Anfang der Glomeruluskapillaren ein effektiver Filtrationsdruck von 11 mm Hg vorherrscht (Blutdruck: 48 mm Hg, kolloidosmotischer Druck: 25 mm Hg, Gewebedruck: 12 mm Hg) und der kolloid-osmotische Druck durch das Abpressen des Ultrafiltrats erheblich steigt, ist bereits vor dem Ende der Kapillaren der effektive Filtrationsdruck auf null gesunken [4]. Pro Zeiteinheit wird in allen Glomeruli ein Filtratvolumen abgepresst, was als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet wird [4]. Die Bestimmung der GFR kann mit Hilfe von exogen zugeführten oder auch endogenen Stoffen durchgeführt werden, die im Glomerulus ungehindert filtriert und im Tubulusapparat nicht rückresorbiert oder sezerniert werden [4]. Der Primärharn passiert im weiteren Verlauf den Tubulus- und Sammelrohrapparat, in denen er durch Resorptions- und Sekretionsprozesse in den Endharn umgewandelt wird [4]. Während der tubulären Resorption wird der größte Teil der gelösten Stoffe sowie 99 % des Wassers durch passive, aber auch aktive Prozesse rückresorbiert [4]. Die tubuläre Sekretion beschreibt die Sekretion von organischen Säuren und Basen wie z. B. Penicillinen über Transportproteine (aktiver Transport) [4].

Da die renale Eliminierung abhängig ist von der Zahl der funktionstüchtigen Glomeruli [4], ist es nicht verwunderlich, dass mit dem Alter die Nierenfunktion abnimmt, da die Niere an Gewicht, Volumen und Anzahl an Glomeruli verliert [67]. Bedingt durch das verminderte Herzzeitvolumen sinkt zudem die Durchblutung der Niere [12]. Besonders bei älteren Menschen ist somit auf die Nierenfunktion zu achten, wenn diese renal eliminierte Arzneistoffe einnehmen. Neben dem Alter gibt es aber auch weitere Parameter, die sie einschränken können. Es wurden Arzneistoffkombinationen (NSAIDs, ACE-Hemmer, Diuretika) identifiziert, die mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion korrelieren (Allg. Teil, B3.4) [68]. Zudem gibt es verschiedene Arzneistoffe und Arzneistoffklassen, die bekannt sind für ihre Nephrotoxizität. Darunter fallen u. a. Aminoglykoside, Vancomycin, Ciprofloxacin, Aciclovir, Amphotericin B, Methotrexat, Bisphosphonate, aber auch HMG-CoA Reduktase Inhibitoren oder Lithium [69].

Eine Möglichkeit, die Dosierung renal eliminiertes Arzneistoffes an die Funktionseinschränkung der Nieren anzupassen, ist das sogenannte  $Q_0$ -Konzept. Dabei beschreibt  $Q_0$  den Anteil der bioverfügbaren Dosis eines Arzneistoffes, der extrarenal eliminiert wird. Der renal eliminierte Anteil wird somit definiert als  $Q = 1 - Q_0$  [70, 71]. Liegt der Wert für  $Q_0$  unter 0,5, bzw. 0,7, werden also mehr als 50 %, bzw. 30 % des bioverfügbaren Arzneistoffs renal eliminiert, so soll eine Dosisanpassung erfolgen [71, 72]. Dabei spielt die für den Patienten individuelle Ausscheidungskapazität  $Q_{ind}$  eine große Rolle.  $Q_{ind}$  wird berechnet nach folgender Formel (2) [71].

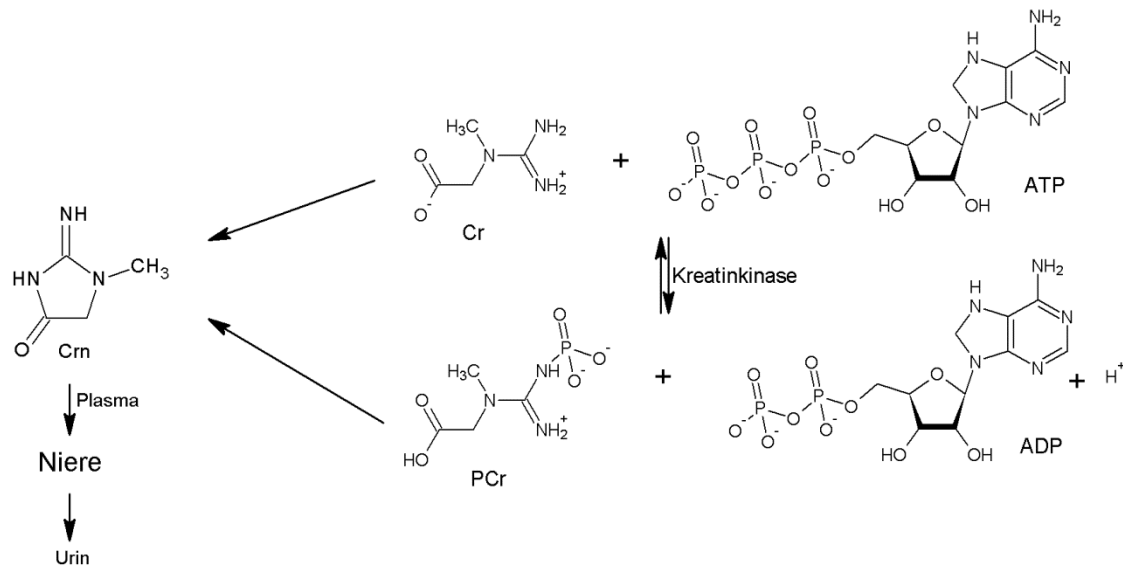
$$Q_{ind} = (1 - Q_0) \cdot \frac{CrCl \left[ \frac{mL}{min} \right]}{100} + Q_0 \quad (2)$$

$Q_{ind}$  = individuelle Eliminationskapazität;  $Q_0$  = extrarenal eliminiertes Anteil der bioverfügbaren Dosis des Arzneistoffs; CrCl = berechnete Kreatininclearance

Die Anpassung der Dosierung erfolgt über  $Q_{ind}$  über eine Anpassung der Dosis des Arzneistoffes ( $Standarddosis \cdot Q_{ind}$ ), des Dosierungsintervalls ( $Standarddosisintervall / Q_{ind}$ ) oder auch einer Kombination aus beiden [70].

### 3.3.2 Kreatinin im Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Kreatinin ist der Abbaustoff des Kreatins [73-75], welches zu ca. 95 % in den Skelettmuskeln gespeichert wird [73, 74, 76-78]. Kreatin wird zum einen endogen aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Methionin synthetisiert, zum anderen kann es aber auch über die Nahrung aufgenommen werden [76]. In den Muskeln wird es durch enzymatische Phosphorylierung mit Hilfe der Kreatinkinase unter Verbrauch von ATP zu Kreatinphosphat umgewandelt. Diese Reaktion ist reversibel und kann im Muskel bei kurzen Perioden sehr intensiver Arbeit in Sekundenschnelle ATP freisetzen [74, 79]. Sie dient somit als Energielieferant [75, 76, 78, 79]. Kreatin und auch Kreatinphosphat werden nicht-enzymatisch in einer nahezu konstanten Rate (ca. 2 % des Gesamtkreatins pro Tag) zu Kreatinin abgebaut [74]. Kreatinin ist somit das Produkt des Metabolismus des Muskels [80]. Das gebildete Kreatinin gelangt über das Blut zur Niere und wird über den Urin ausgeschieden (Abbildung 7) [74, 79].



**Abbildung 7: Darstellung des Kreatininmetabolismus.** Die Kreatinkinase-reaktion findet in den Skelettmuskeln statt. Kreatin (Cr) bzw. Kreatinphosphat (PCr) wird nichtenzymatisch zu Kreatinin (Crn) abgebaut, das über die Blutbahn in die Niere gelangt und anschließend renal eliminiert wird.

Die renale Ausscheidung erfolgt in einer konstanten Rate über glomeruläre Filtration [79, 81, 82] mit einer nur sehr geringen tagesabhängigen Variation [83], sodass Kreatinin als endogener Indikator für die glomeruläre Filtrationsrate verwendet werden kann, auch wenn es in geringem Maße zusätzlich tubulär sezerniert wird [4, 83]. Zur Messung der GFR aus Urin muss dieser über 24 Stunden gesammelt werden, was sehr aufwändig ist, sodass heute hauptsächlich die Serumkreatininkonzentration bestimmt wird und darüber die GFR bzw. die Kreatininclearance berechnet wird [80, 84]. Auch die National Kidney Foundation empfiehlt Serumkreatinin-basierte Gleichungen zur Berechnung der GFR zum Abschätzen der Nierenfunktion zu verwenden und nicht die Serumkonzentration direkt zu nutzen [80]. Dies liegt vor allem auch daran, da, selbst wenn die Serumkonzentration noch nicht gestiegen ist, die Nierenfunktion schon schwer beeinträchtigt sein kann [83, 85]. Normwerte für die Serumkonzentrationen des Kreatinins liegen bei 44 – 106  $\mu\text{mol/L}$  (5 – 12  $\mu\text{g/mL}$ ) abhängig von Alter und Geschlecht [75]. Die Konzentrationen im Serum und Plasma unterscheiden sich nicht, sodass diese ausgetauscht verwendet werden können [86].

Die Kreatininbildung ist abhängig von der Muskelmasse [78, 79, 86, 87] bzw. vom Kreatin, welches in einer konstanten Menge pro Muskelmasse gespeichert wird [77]. Die Menge an gespeichertem Kreatin und als Konsequenz daraus die Menge an gebildetem Kreatinin ist sehr leicht durch die Nahrung, das Alter, das Geschlecht und auch Unterschiede im Körperbau zu beeinflussen [75, 80, 86-88]. Die Serumkonzentration zweier Personen mit

gleich guter Nierenfunktion ist folglich vollkommen unterschiedlich, wenn die eine Person eine hohe Muskelmasse und die zweite Person eine sehr geringe Muskelmasse besitzt.

Das Alter hat einen wesentlichen Einfluss auf die Kreatinspeicherung. Bei älteren Menschen liegt oft eine Mangelernährung vor, zusätzlich nimmt auch die Muskelmasse im Alter ab [80]. Diese zwei Faktoren führen zu einem erniedrigten Kreatininspiegel. Liegt zusätzlich noch eine Nierenfunktionsstörung vor, wie sie im Alter oft durch Abnahme des Volumens und des Gewichts der Niere auftritt [67], so wird der eigentlich zu niedrige Kreatininspiegel durch ungenügende Eliminierung erhöht, sodass er wieder in den Normbereich rückt. Beachtet man somit ausschließlich den Serumspiegel zum Abschätzen der Nierenfunktion, würde man bei diesem Patienten die Nierenfunktionsstörung nicht bemerken. Generell lässt sich sagen, dass sich die Serumkonzentration des Kreatinins im Alter nur wenig ändert [67], obwohl die Nierenfunktion abnimmt. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Kreatininclearance oder die GFR zu berechnen und über diese die Nierenfunktion abzuschätzen. Für Sportler mit einer hohen Muskelmasse gilt der umgekehrte Fall. Hier kann aufgrund eines hohen Kreatininspiegels fälschlicherweise auf eine Nierenfunktionsstörung geschlossen werden, wenn nicht die Clearance bzw. die GFR berechnet wird.

Kreatinin ist der zum Abschätzen der Nierenfunktion am häufigsten verwendete Marker, da es ein endogen vorkommender Stoff ist, dessen Messung einfach, reproduzierbar und zuverlässig ist [84, 87]. Er wird in der Routine in der Regel entweder mittels Modifikationen der Jaffé-Methode oder enzymatisch quantifiziert [75, 78]. Das Prinzip der Jaffé-Methode, die 1886 zum ersten Mal publiziert wurde [75] und bis heute die wohl berühmteste Bestimmungsmethode für Kreatinin ist [89], ist die Bildung eines orange-roten Komplexes aus Kreatinin und Pikrinsäure in alkalischem Medium [78]. Für die Reaktion existieren sehr viele Modifikationen, da sie sehr störanfällig ist [78, 89]. Nichtkreatininchromogene, wie z. B. Acetessigsäure oder Glukose reagieren ebenfalls mit alkalischem Pikrat zu ähnlichen Reaktionsprodukten und verfälschen somit den Kreatininwert [75, 78]. Aus Urin-, Serum- oder Plasmaproben wird meist eine kinetische Messung durchgeführt, in welcher auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion geachtet wird, um somit Nichtkreatininchromogene, die zum einen schneller (nach ca. 30 sek), aber auch langsamer (nach mehr als 2 min) als das Kreatinin (Reaktion nach ca. 2 min) mit dem Pikrat reagieren, vom Kreatinin zu unterscheiden [78]. Es wird für diese Reaktion eine Absorptionsänderung bei 509 nm gemessen, die proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe ist [78]. Die enzymatische Bestimmung des Kreatinins ist deutlich weniger störanfällig [75, 78, 89], dafür aber wesentlich teurer [75]. Es kommen hierfür zum einen der PAP (Phenol-Aminophenazon)-Farbtest oder ein UV-Test in Frage

[78]. Wesentlich genauer und mit weniger Interferenzen behaftet sind HPLC-Methoden mit UV- und MS/MS-Detektion [75, 81, 90-95]. Diese Anwendungen finden in der Routineanalytik aber noch keinen Einzug.

Die schon erwähnten Serumkreatinin-basierten Gleichungen umfassen u. a. die Gleichung nach Cockcroft-Gault (CG) (Formel (3)), die die Kreatininclearance berechnet, die MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) Gleichung (Formel (4)) über die die GFR berechnet wird sowie die CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) Gleichung (Formel (5)), die ebenfalls die GFR berechnet [80]. In diese Gleichungen fließen neben der Serumkreatininkonzentration das Alter, das Geschlecht, das Gewicht (CG), die ethnische Herkunft (MDRD, CKD-EPI) und verschiedene Faktoren mit ein, um die bestmögliche Annäherung an den wahren Wert zu erhalten [80].

$$CrCl \left[ \frac{mL}{min} \right] = \frac{Gewicht[kg] \cdot (140 - Alter [y])}{Faktor(72) \cdot Serumkreatinin \left[ \frac{mg}{dL} \right]} (\cdot 0,85 \text{ für Frauen}) \quad (3)$$

$$GFR \left[ \frac{mL}{1,73m^3} \right] = 186 \cdot Serumkreatinin \left[ \frac{mg}{dL} \right]^{-1,154} \cdot Alter[y]^{-0,203} \cdot 1,212 \text{ (wenn schwarz)} \cdot 0,742 \text{ (wenn weiblich)} \quad (4)$$

$$GFR \left[ \frac{mL}{min} \right] = 141 \cdot \min \left( \frac{Serumkreatinin}{k}, 1 \right)^a \cdot \max \left( \frac{Serumkreatinin}{k}, 1 \right)^{-1,209} \cdot 0,993^{Alter} \cdot 1,018 \text{ (wenn weiblich)} \cdot 1,159 \text{ (wenn schwarz)} \quad (5)$$

Für Frauen: k = 0,7, a = -0,329; Für Männer: k = 0,9, a = -0,411  
*min* entspricht dem Minimum von Serumkreatinin/k oder 1; *max* entspricht dem Maximum von Serumkreatinin/k oder 1

### 3.3.3 Abschätzung der Nierenfunktion nach Cockcroft und Gault

Die Formel nach Cockcroft und Gault wurde 1976 veröffentlicht [96] und wird bis heute verwendet. Sie gilt somit als die beständigste und meist genutzte Formel zu Berechnung der Nierenfunktion [86, 87, 97]. Mit ihrer Hilfe wird nicht die GFR, sondern die Kreatininclearance (CrCl) berechnet, die aber synonym verwendet werden kann.

Um die Anwendung der Formel nach Cockcroft und Gault auf verschiedene Personengruppen zu verifizieren, wurde diese u. a. bei Diabetespatienten, bei schwangeren Frauen, die an einer Nierenerkrankung leiden oder auch bei übergewichtigen oder älteren Menschen getestet [87]. Die Ergebnisse zeigten, dass die Formel wesentlich genauere und reproduzierbarere Ergebnisse liefert als die Abschätzung der GFR über den 24 h Sammelurin [87].

Sowohl die Formel nach Cockcroft-Gault als auch die MDRD zeigen allerdings Nachteile. So liefern sie beide im höheren GFR Bereich ungenaue Ergebnisse [86], zudem zeigte sich aber auch, dass die Berechnung nach CG in manchen Studien die GFR überschätzt, in anderen unterschätzt [86]. Zusammenfassend bedeutet dies, dass es widersprüchliche Daten über die Genauigkeit der Formel gibt. Für die Berechnung der Nierenfunktion bei Diabetes-Patienten gilt, dass die Formel nach CG genauere Werte berechnet als die MDRD Formel [86, 97]. Drenth-van Maanen et al. stellten 2013 eine Studie vor, bei der die Anwendung verschiedener Formeln bei geriatrischen Patienten untersucht wurde [98]. Die vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass die CG Formel im Vergleich zur MDRD und CKD-EPI die präzisesten Ergebnisse lieferte, allerdings nur, wenn das ideale Körpergewicht (IKG) (Formeln (6) und (7)) anstelle des aktuellen Körpergewichts verwendet wurde [98]. Auch in anderer Literatur wurde die Anwendung der Formel nach CG bei älteren Patienten empfohlen [97].

$$IKG \text{ für Männer [kg]} = 50 + 0,9 \cdot (\text{Größe[cm]} - 152) \quad (6)$$

$$IKG \text{ für Frauen [kg]} = 45,5 + 0,9 \cdot (\text{Größe [cm]} - 152) \quad (7)$$

Die Nierenfunktion wird nach der National Kidney Foundation in fünf Schweregrade eingeteilt (Tabelle 1), wobei erst ab Stadium drei bemerkbare Symptome der Krankheit auftreten [80, 98].

**Tabelle 1: Einteilung der Nierenfunktion, die durch die National Kidney Foundation (NKF) erfasst wurde.**

Nierenfunktion	GFR [mL/min]
Normal	> 90
Chronic Kidney Disease (CKD) 1	>90 (mit Mikroalbuminurie)
CKD 2	60-89
CKD 3	30-59
CKD 4	15-29
CKD 5	<15



## 4 Pharmakokinetischer Hintergrund

### 4.1 Pharmakologie des Metformins

#### 4.1.1 Pharmakologische Eigenschaften und pharmakokinetische Parameter des Metformins

##### *Wirkmechanismus*

Metformin (Abbildung 8) ist ein sehr häufig eingesetzter Arzneistoff (Allg. Teil, B1.1.1), der den Blutzuckerspiegel beim Diabetiker dosisabhängig senkt [99]. Durch die Hemmung der Glukoneogenese und der Glykogenolyse kommt es zu einer verringerten Glukoseproduktion in der Leber [4, 99, 100]. Zusätzlich wird aufgrund der Erhöhung der Insulinempfindlichkeit in der Muskulatur die Glukoseverwertung im peripheren Gewebe verbessert [4, 100].

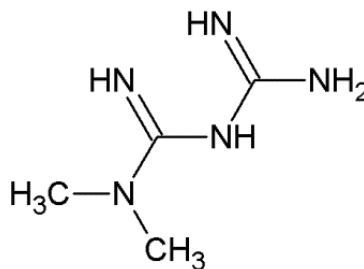


Abbildung 8: Struktur des Metformins.

Metformin hemmt auch die intestinale Glukoseabsorption [99], was aber wahrscheinlich nur sehr wenig zur Wirkung beiträgt [100]. Der HbA<sub>1c</sub>-Wert wird zudem um etwa 1 bis 2 % gesenkt [4]. In neuen Studien untersuchten Buse et al. die Hypothese, dass Metformin hauptsächlich in den tieferen Darmabschnitten wirken soll und die systemische Aufnahme des Arzneistoffs nur eine untergeordnete Rolle spielt [13]. Die Studienergebnisse belegten sehr deutlich, dass durch die den Patienten verabreichte „delayed-release“-Formulierung eine niedrigere systemische Konzentration zu finden war, der Glukose-senkende Effekt aber derselbe war wie in der Vergleichsmedikation, die aus Standard-Formulierungen bestand [13]. Dies deutet sehr stark auf einen Mechanismus hin, bei dem der Darm der Hauptwirkort ist und der Arzneistoff, der im Plasma ankommt, weniger wichtig für die Wirkung ist [13]. Die Diskussionen um den Wirkmechanismus des Metformins halten schon Jahre an und mit diesen neuen Ergebnissen werden diese wieder neu entfacht. Die Arzneimittelwirkungen treten beim Stoffwechselgesunden nicht auf [4]. Mittlerweile werden Metformin aber auch vorsichtig positive Effekte beim Gesunden, z. B. kardio-

protektive Effekte oder auch Anti-Tumor Eigenschaften nachgesagt [101]. In einer von Bannister et al. veröffentlichten Studie aus dem Jahre 2014 war die Überlebensrate von Diabetespatienten unter Metformintherapie signifikant höher als die von nicht-diabetischen Personen ohne Metformineinnahme, was die Autoren zu dem Schluss kommen ließ, dass Metformin in der prophylaktischen Anwendung einen positiven Effekt bei Personen ohne Diabetes haben könnte [101].

### *Pharmakokinetik*

Bei oraler Gabe wird Metformin gut resorbiert und ist zu etwa 50 - 60 % bioverfügbar [4, 99, 100, 102]. Es liegt keine Eiweißbindung vor [4, 99, 100] und der Arzneistoff wird unverändert renal eliminiert [4, 99, 100, 102]. Die Dosis von Metformin wurde empirisch ermittelt [103] und liegt zwischen 0,5 g und 3 g pro Tag [99]. Graham et al. publizierten 2011 eine Studie, aufgrund der sie eine Individualisierung der Dosierung empfahlen [102]. Parameter, die in der Dosisfindung eine Rolle spielen sollten, da sie die Pharmakokinetik maßgeblich beeinflussen, sind das Alter [103], das mit einer Abnahme der Filtrationsleistung der Niere einhergeht [67] sowie das Körpergewicht bzw. die fettfreie Masse [103]. Die Nierenfunktion ist der wohl wichtigste Parameter, der die Pharmakokinetik des Arzneistoffs beeinflusst, da Metformin renal eliminiert wird ( $Q_o < 0,1$ ) [72, 99, 102, 104-106]. Eine Kontraindikation des Metformins war nicht zuletzt deshalb auch eine eingeschränkte Nierenfunktion ab einer Kreatininclearance von kleiner als 60 mL/min [99, 100, 104]. Dieser Grenzwert ist aber im Wandel. So darf Metformin seit 2015 auch bei mäßiger Nierenfunktion (45 – 59 mL/min) mit einer Maximaldosis von 1000 mg am Tag angewandt werden, wenn kein anderer Risikofaktor für eine Laktatazidose (Einleitung, A4.1.2) vorliegt [17, 107, 108]. Die europäische Arzneimittelbehörde (EMA) möchte den Arzneistoff auch für eine glomeruläre Filtrationsrate ab 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> zulassen [108]. Die Nierenfunktion soll aber vor und während der Therapie in regelmäßigen Abständen überprüft werden, um eine Akkumulation des Arzneistoffs zu verhindern [99]. Sambol et al. postulierten 1995, dass das Alter den Metforminspiegel im Plasma auch unabhängig von der Nierenfunktion beeinflusst [105]. Neben diesen bekannten, die Metforminkonzentration im Plasma beeinflussenden Parametern, ist bewiesen, dass Metformin in die Erythrozyten übergeht und in diesem tiefen Kompartiment akkumuliert [106, 109]. Publierte therapeutische Plasmaspiegel sind im Nüchternzustand 0,5 – 1,0 µg/mL bzw. postprandial 1 – 2 µg/mL [110]. Lalau und Lacroix publizierten 2003 therapeutische Bereiche, die sie in Patienten bestimmt hatten, die schon lange Metformin einnahmen und bei denen die Therapie gut eingestellt war und gut vertragen wurde [109]. Die dabei erfassten therapeutischen Spiegel im nüchternen Zustand waren im Plasma  $0,5 \pm 0,4$  µg/mL und in den Erythrozyten  $0,8 \pm 0,4$  µg/mL [109]. Lalau et al. publizierten 2011 erneut Daten zu Plasma- und Erythrozytenspiegel von Metformin [111]. Die Werte

dazu lieferten Patientenproben aus dem klinischen Alltag des Universitätsklinikums in Amiens, Frankreich [111]. Gefunden wurden im Plasma  $2,7 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$  und in den Erythrozyten  $2,0 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$  [111], was eine deutliche Differenz zu den therapeutischen Werten aufzeigte. Allerdings ist zu beachten, dass hier nur Patientenproben ausgewertet wurden, deren Blut eingesandt wurde, um die Dosis aufgrund der Nierenfunktion anzupassen oder um eine Akkumulation, eine Überdosis oder eine Laktatazidose festzustellen [111]. Graham et al postulierten 2011, dass die mittlere Plasmakonzentration des Metformins  $2,5 \mu\text{g/mL}$  über ein Dosierungsintervall nicht überschreiten solle, um unerwünschte Nebenwirkungen zu verhindern [102]. Es sind keine therapeutischen Bereiche bzw. sogenannte „real-life“-Daten von Metforminspiegel im Kapillarblut bekannt. „Real-life“-Daten stellen Daten aus dem ambulanten Bereich von Patienten mit unterschiedlichem Gewicht, Alter oder auch Comedikationen und Comorbiditäten dar. Die Bestimmung der Vollblutspiegel wäre hinsichtlich der Erythrozyten als tiefem Kompartiment für das Metformin sehr sinnvoll, da sich in diesem Kompartiment Arzneistoff ansammeln kann, der dann ebenfalls zu unerwünschten Arzneistoffwirkungen beitragen könnte.

#### 4.1.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Metformins

Als die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Metformins gelten gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen oder Durchfall [99, 100, 104]. Eher selten treten dagegen Kopfschmerzen, Müdigkeit oder Schwindel auf [99]. Die schwerwiegendste Komplikation allerdings in der Therapie mit Metformin ist die Laktatazidose, die durch eine Akkumulation des Arzneistoffs verursacht werden kann [99]. Sie tritt in der Regel nur dann auf, wenn Kontraindikationen vernachlässigt werden [100]. Die Laktatazidose ist eine metabolische Komplikation, die durch eine azidotische Dyspnoe mit Abdominalbeschwerden und Hyperthermie, gefolgt von Koma gekennzeichnet ist [99]. Ihre Charakterisierung erfolgt durch eine metabolische Azidose ( $\text{pH} < 7,25$ ) und erhöhte Laktatspiegel ( $> 5,0 \text{ mmol/L}$ ) [100, 112]. Sie ist häufig unerkannt und tritt nur sehr selten auf (weniger als 10 Fälle pro 100 000 Anwenderjahre), aber die Mortalitätsraten liegen, vor allem ohne schnelle Behandlung [99], sehr hoch (30 – 50 %) [104, 113]. Metformin erhöht, im Gegensatz zu Phenformin, einem Arzneistoff aus derselben Arzneistoffklasse, der aber aufgrund des hohen Risikos der Laktatazidose vom Markt genommen wurde [100, 104, 113], in therapeutischen Dosen die Blut-Laktat-Spiegel nur sehr gering bis gar nicht [100, 104, 113]. Wang et al. zeigten, dass der Organische Kationen Transporter 1 (OCT 1), der verantwortlich für die Aufnahme des Metformins in die Leber ist, eine Rolle in der Entstehung der Metformin- bzw. Biguanid-induzierten Laktatazidose spielen könnte [114]. In Mäuseversuchen zeigten Wildtyp

Mäuse einen signifikant erhöhten Blutlaktatspiegel verglichen mit OCT 1 (-/-) Mäusen, bei vergleichbarem Plasmaspiegel an Metformin [114]. Weiter spräche für diese Theorie, dass Buformin und Phenformin Substrate mit höherer Aktivität am OCT 1 darstellen [114]. Allerdings ist nicht publiziert, ob dieser Ansatz weiter untersucht wurde, sodass sich diese Ergebnisse bisher auf Daten aus Mäuseversuchen beschränken. Veröffentlicht wurde, dass eine von Metformin verursachte Laktatazidose mit sehr hohen Metforminkonzentrationen (im Plasma > 5 µg/mL) korreliert [104, 105]. Solch hohe Konzentrationen sind in der Regel nur bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion zu finden [104, 105]. Allerdings findet man keine Daten zur Erythrozytenkonzentrationen in Patienten mit einer Laktatazidose unter Metformintherapie. Ob der Arzneistoff sich in den Erythrozyten unter Umständen noch mehr anreichert und folglich nicht die Konzentration im Plasma, sondern im Vollblut ausschlaggebend für das Auftreten einer Laktatazidose ist, ist bisher nicht bekannt. Die Behandlung der Metformin-induzierten Laktatazidose beläuft sich auf eine Dialyse, um Metformin und Laktat aus dem Körper zu eliminieren [104, 113]. Eine regelmäßige Kontrolle der Nierenfunktion sollte durchgeführt werden, um eine Akkumulation von Metformin und damit das Auftreten einer Laktatazidose zu verhindern [99]. Wird dies getan und die Dosis dahingehend angepasst, so kann die Therapie auf unbestimmt lange Zeit fortgesetzt werden [113]. Die Kontraindikation einer eingeschränkten Nierenfunktion für Metformin ist umstritten, da sich trotz Nichtbeachtung der Kontraindikation in Untersuchungen kein erhöhtes Laktatazidoserisiko gezeigt hat [112]. Zudem wird kritisiert, dass es keinen Beweis dafür gibt, dass Metformin der Grund für die Laktatazidose in Patienten ist oder ob diese nicht auch ohne Metformin aufgetreten wäre [112]. Die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft unterstützt diese Argumentation nicht und rät dazu, die Kontraindikationen beizubehalten und die Nierenfunktion regelmäßig zu überprüfen [115].

## **4.2 Pharmakologie des Sitagliptins**

### **4.2.1 Pharmakologische Eigenschaften und pharmakokinetische Parameter des Sitagliptins**

#### *Wirkmechanismus*

Sitagliptin (Abbildung 9) ist ein immer häufiger eingesetzter Arzneistoff (Allg. Teil, B1.1.1), der über eine kompetitive Hemmung der Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV) wirkt [116-118]. Die DPP-IV ist ein Glykoprotein, das ubiquitär im Körper vorkommt [118] und verantwortlich für den Abbau der Inkretinhormone (GLP-1 (Glucagon-like-Peptide 1) und GIP (Glucose-dependent-insulinotropic Polypeptide)) ist [116, 117].

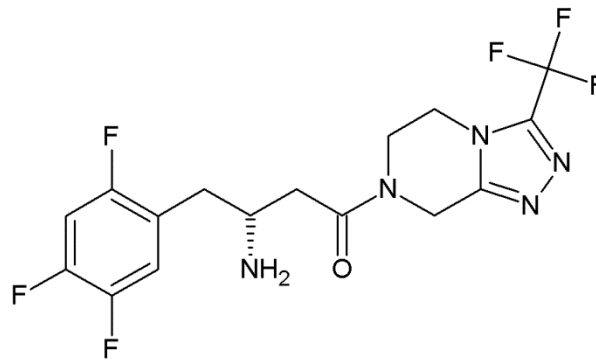


Abbildung 9: Struktur des Sitagliptins.

Ihre Aktivität wird bei einer Inhibition um 70 - 90 % vermindert [118]. GLP-1 und GIP werden in verschiedenen Intestinalzellen synthetisiert und von diesen in die Blutbahn abgegeben [117-120]. Sie verursachen den Inkretineffekt. Er beschreibt das Phänomen, dass oral zugeführte Glukose eine höhere Insulinsekretion bewirkt als intravenös zugeführte Glukose [119, 120]. Die Sekretion dieser zwei Hormone erfolgt dabei als Reaktion auf die Nahrungsaufnahme [116-118, 121] bzw. auf die Aufnahme von Kohlenhydraten [120]. Ihre Wirkungen im Pankreas sind zum einen eine Stimulation der Insulinbiosynthese und -sekretion, zum anderen fördern sie die  $\beta$ -Zell Proliferation und reduzieren die  $\beta$ -Zell Apoptose [120, 122]. Die insulinotropen Effekte der beiden Hormone werden als ähnlich und additiv bezeichnet [120], die Effekte auf die Glukagonsekretion allerdings sind antagonistisch [120]. So ist GIP glukagonotrop [120] bzw. zeigt keinen Effekt auf die Glukagonfreisetzung [118], GLP-1 hingegen unterdrückt die Freisetzung von Glukagon [120, 121]. Zusammengefasst kann man sagen, dass die Inkretine im Pankreas die Insulinsekretion stimulieren und die Glukagonfreisetzung unterdrücken, beides in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel [118]. Sie sind für nahezu 50 % der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich [118]. Der Abbau von GLP-1 und GIP erfolgt sehr schnell, da die DPP-IV die zwei N-terminalen Aminosäuren abspaltet [120]. Die Halbwertszeiten der Inkretinhormone betragen für GIP 5 min, für GLP-1 2 min [120].

In Patienten des Diabetes mellitus Typ 2 ist die insulinotrope Wirkung des GIP beeinträchtigt, wohingegen die Wirkungen des GLP-1 gut erhalten sind [119, 120]. Die Patienten zeigen signifikant niedrigere Blutspiegel des GIP [118]. Als Folge davon wird die postprandiale Hyperglykämie in diesen Patienten verstärkt [116].

Mit der Einnahme von DPP-IV Inhibitoren wird der Inkretineffekt erhöht und somit die postprandiale Insulinwirkung verlängert [118]. Die hauptsächlichen Effekte sind hierbei aber auf eine Erhöhung des GLP-1 Spiegels zurückzuführen [118, 121]. Im Gegensatz zu anderen oralen Antidiabetika zeigen die Gliptine den Vorteil, dass sie keinen Einfluss auf

das Körpergewicht haben und das Risiko einer Hypoglykämie sehr niedrig ist [8, 116, 118, 121]. Sitagliptin hat noch zusätzliche Vorteile. So vermindert es den Anteil an freien Fettsäuren und verspricht Insulin-sensibilisierende Eigenschaften [118].

#### *Pharmakokinetik*

Sitagliptin zeigt unabhängig von der Nahrung [116, 123] eine sehr gute orale Verfügbarkeit von ca. 87 % [117, 123]. Nur ein kleiner Teil (38 %) wird reversibel an Plasmaproteine gebunden [116, 117] und die Elimination erfolgt hauptsächlich unverändert (79 %) renal mit dem Urin ( $Q_0 = 0,15$ ) [72, 117, 124]. Ca. 10 % werden unverändert mit der Fäzes ausgeschieden [116, 124], was allerdings auf eventuell nicht-resorbiertes Sitagliptin zurückzuführen ist [124]. Nur 16 % des Sitagliptins unterliegen einem Stoffwechsel, es zeigt also keinen ausgeprägten Metabolismus [116]. Die Studie von Vincent et al. zum Metabolismus des Sitagliptins wurde an gesunden Männern durchgeführt [124]. Die sechs inaktiven Metabolite, die identifiziert wurden [116], konnten nur in Spuren nachgewiesen werden [124]. Die nachgewiesenen Metabolite des Sitagliptins waren Resultate einer *N*-Sulfatierung, einer *N*-Carbamoyl-Glucuronidierung, einer Hydroxylierung gefolgt von einer Ether-Glucuronidierung sowie einer oxidativen Entsättigung gefolgt von einer Cyclisierung in *cis*- und *trans*-Form (Abbildung 10) [124].

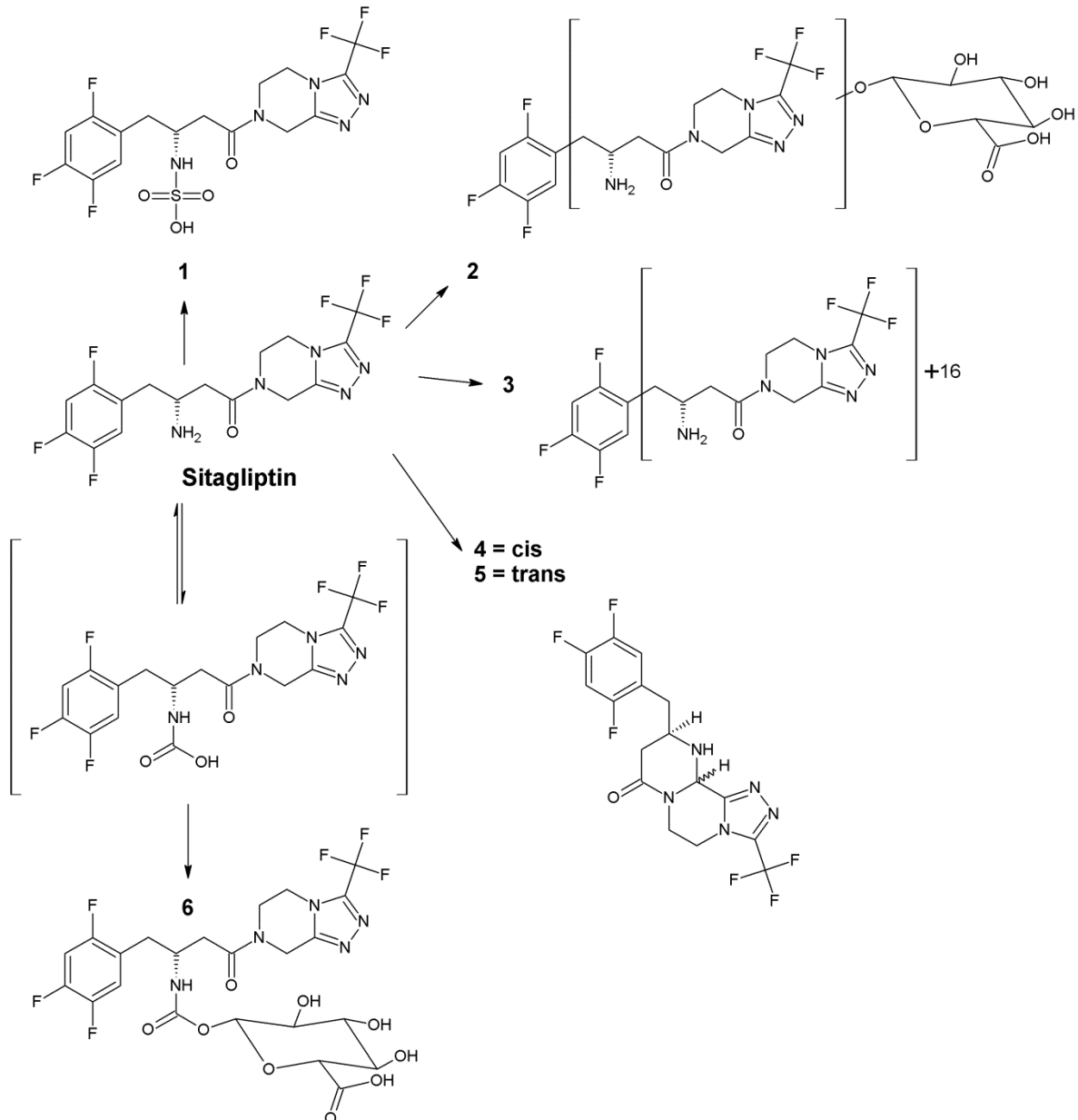


Abbildung 10: Die nachgewiesenen Metabolite des Sitagliptins sind Resultate einer N-Sulfatierung (1), einer Hydroxylierung (2) gefolgt von Ether-Glucuronidierung, einer Hydroxylierung (3), einer oxidativen Entsättigung gefolgt von Cyclisierung in *cis*- und *trans*-Form (4, 5) und einer N-Carbamoyl-Glucuronidierung (6).

Die Dosierung beträgt in der Regel 100 mg am Tag, allerdings soll diese aufgrund der renalen Elimination bei einer Nierenfunktionsstörung ab einer Kreatininclearance von  $\leq 50$  mL/min angepasst werden [117]. Aus diesem Grund wird auch empfohlen, in regelmäßigen Abständen die Nierenfunktion zu überprüfen [117]. Das Geschlecht und das Körpergewicht erfordern keine Dosisanpassung [116].

Therapeutische Bereiche wurden bisher nicht publiziert. Bergman et al. veröffentlichten 2006, noch vor der Markteinführung des Stoffes eine Studie, in der die Pharmakokinetik

und Pharmakodynamik an männlichen, gesunden Probanden untersucht wurde [121]. Hierbei wurde ein Erreichen der „Steady-state“ Konzentration nach 3 Tagen postuliert, ebenso wie eine Maximalkonzentration im „Steady-state“ bei einer Tagesdosis von 100 mg von 941 nM (383 ng/mL) [121]. Alle Probanden zeigten eine gute Verträglichkeit der Medikation [121]. Da diese Studie ausschließlich an gesunden Männern zwischen 18 und 45 Jahren durchgeführt wurde, welche nicht die zukünftige Patientengruppe widerspiegeln, ist fraglich, ob diese Ergebnisse auf Diabetes Typ 2 Patienten übertragen werden können [121]. Im selben Jahr wurde eine weitere Studie zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Stoffes an übergewichtigen (BMI 30 – 40 kg/m<sup>2</sup>) Frauen und Männern mittleren Alters (45 – 63 Jahre) publiziert [125]. Sitagliptin wurde auch von übergewichtigen Menschen gut vertragen. Es wurden ca. 90 % der Plasma-DPP-IV gehemmt, trotz hoher Dosierung (400 mg/Tag) trat bei keinem Probanden eine Hypoglykämie auf [125]. Zusätzlich ist mittlerweile bekannt, dass trotz hoher Sitagliptinspiegel die Hemmung der DPP-IV ein Plateau erreicht, weshalb das Risiko eines plötzlichen Glukoseabfalls im Blut sehr geschmälert ist [126]. Chan et al. publizierten 2008 eine Studie zur Therapiesicherheit und Therapieeffizienz von Sitagliptin in Diabetes Typ 2 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [127]. In dieser Studie wurden die Patienten gemäß den Empfehlungen der Fachinformation bei eingeschränkter Nierenfunktion therapiert. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte die mit Sitagliptin therapierte Gruppe kein erhöhtes Auftreten an unerwünschten Nebenwirkungen, sodass geschlossen wurde, dass Sitagliptin in den an die Nierenfunktion angepassten Dosierungen auch von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion gut vertragen wird [127]. Zwei weitere Studien wurden von Ferreira et al. vorgestellt, die ebenfalls an Diabetespatienten zum einen mit eingeschränkter Nierenfunktion und zum anderen an dialysepflichtigen Patienten die Sicherheit des Sitagliptins im Vergleich zur Therapie mit Glipiziden untersuchten [128, 129]. Sitagliptin wurde in beiden Studien sehr gut von den Patienten vertragen, zeigte eine gute Wirkung und hatte gegenüber den Glipiziden den Vorteil, dass das Risiko zur Entwicklung einer Hypoglykämie geringer war [128, 129].

Da Sitagliptin in Kombination mit Metformin eingesetzt wird, wurde von Herman et al. untersucht, ob sich diese Arzneistoffe gegenseitig hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik und Wirkung beeinflussen [130]. Die Autoren zeigten, dass dies nicht der Fall ist und obwohl beide Stoffe renal eliminiert werden, keine Änderung in ihrer Pharmakokinetik auftritt [130]. Die Arzneimittelkombination hat den Vorteil, dass die Stoffe über unterschiedliche Wirkmechanismen die Blutglukose regulieren und somit synergistisch wirken [130, 131]. Aufgrund des geringen Hypoglykämierisikos und ihrer Gewichtsneutralität werden die DPP-IV in manchen Empfehlungen schon den Sulfonylharnstoffen vorgezogen [8, 116, 132]. Daten dazu, ob Sitagliptin in die Blutzellen übergeht und ob diese, wie es für



Metformin der Fall ist, ein tiefes Kompartiment darstellen, sind bisher nicht veröffentlicht. Als Folge davon gibt es auch keine Daten dazu, welche Konzentrationen in den Blutzellen bzw. im Vollblut vorliegen. Auch „real-life“ Daten bzw. Daten zu Plasmakonzentrationen von Patienten aus dem Alltag sind bisher nicht publiziert.

#### 4.2.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Sitagliptins

Schwerwiegende Nebenwirkungen der Anwendung mit Sitagliptin stellen vor allem Überempfindlichkeitsreaktionen dar [117]. Nach der Markteinführung 2007 gab es Spontanberichte von Fällen akuter Pankreatitis als Nebenwirkung des Sitagliptins [117]. In der TECOS-Studie (Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin) wurde daraufhin ebenfalls die Langzeitwirkung von Sitagliptin bezüglich der Entwicklung einer solchen akuten Pankreatitis und auch bezüglich der Entwicklung von Bauchspeicheldrüsenkrebs untersucht. Es konnte aber kein Unterschied in der Verum- gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden [133]. Zu den auftretenden seltenen, aber schweren Überempfindlichkeitsreaktionen zählen u. a. die Anaphylaxie, Angioödem und exfoliative Hauterscheinungen, einschließlich des Steven-Johnsons-Syndrom [117]. Häufige Nebenwirkungen sind weiterhin Infektionen der oberen Atemwege und Hypoglykämien, vor allem in Kombination mit Sulfonylharnstoffen. Zudem können Schmerzen in den Extremitäten oder Osteoarthritis auftreten [117].

Kardiovaskuläre Komplikationen sind in Diabetes mellitus Typ 2 Patienten nicht ungewöhnlich und eine der häufigsten Todesursachen [118]. Die FDA hatte empfohlen, dass für neuere Wirkstoffe gezeigt werden sollte, dass das kardiovaskuläre Risiko nicht gesteigert wird [134]. Aufgrund verschiedener Daten aus *in-vitro* und vorklinischen Studien verschiedener DPP-IV Inhibitoren wurde erwartet, dass diese protektiv auf das kardiovaskuläre System wirken, allerdings zeigten sämtliche klinischen Studien, dass dies nicht der Fall war [118]. Teilweise konnte kein positiver Nutzen gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden, in einer Studie mit Saxagliptin (SAVOR-TIMI 53) wurde sogar eine höhere Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzproblemen in der Saxagliptin-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen [118]. Aus diesem Grund wurden auch die kardiovaskulären Langzeitwirkungen des Sitagliptins kontrovers diskutiert [118]. Die Veröffentlichung der ersten Ergebnisse der TECOS-Studie mit rund 14700 Teilnehmern im Jahre 2015 zeigte allerdings, dass mit der Einnahme von Sitagliptin kein erhöhtes Risiko besteht, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln [133].

### **4.3 Populationspharmakokinetik**

Die Populationspharmakokinetik befasst sich mit der Bestimmung pharmakokinetischer Parameter, der Bestimmung ihrer Variabilität, der Identifizierung möglichst vieler Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik eines Arzneistoffs sowie der Erarbeitung von Dosisempfehlungen, für welche die Kovariate mitberücksichtigt werden [12, 71, 135]. Diese werden mit sogenannten „Einstufenverfahren“ bestimmt, für die pro Individuum nur wenige Proben notwendig sind. Mit deren Hilfe können für Individuen, für die in der Therapiekontrolle, z. B. beim Therapeutischen Drug Monitoring, nur einzelne Proben genommen werden können, die pharmakokinetischen Parameter berechnet werden [12]. Für die Einstufenverfahren werden alle erhaltenen Proben mit in die Berechnung einbezogen. Es müssen also nicht zwangsläufig von jedem Patienten zu derselben Zeit gleich viele Proben genommen werden, es reicht eine Probe pro Patient zu jedem beliebigen Zeitpunkt aus [4, 12, 135]. Für die Populationsanalysen eignen sich dementsprechend Daten aus dem klinischen oder auch ambulanten Routinebetrieb, wobei Daten einer breiten Population zur Verfügung stehen müssen [135]. Durch dieses Vorgehen kann auch der Einfluss der Polymedikation auf die Prüfsubstanz untersucht und spezifiziert werden, zum Beispiel könnten einzelne Arzneimittel identifiziert werden, die Einfluss auf den Blutspiegel der zu prüfenden Substanz haben.

## **5 Ziele der Arbeit**

Um eine vereinfachte Kontrolle der Therapie mit Metformin und/oder Sitagliptin zu erreichen, sollte in dieser Arbeit eine Dried-Blood-Spot Methode zur Bestimmung von Metformin, Sitagliptin und Kreatinin entwickelt werden. Die Bestimmung von Kreatinin zusätzlich zu den zwei renal eliminierten Antidiabetika Metformin und Sitagliptin eröffnete die Möglichkeit, bei gleichzeitiger Blutspiegelkontrolle der Medikamente die Nierenfunktion des Patienten zu überprüfen, was in der Therapie mit diesen Medikamenten regelmäßig erfolgen sollte [107, 117]. Da die Nierenfunktion eines Patienten aber ausgehend vom Plasmaspiegel des Kreatinins abgeschätzt wird (Einleitung, A3.3.3), war es notwendig, die aus den Kapillarblutproben enthaltenen Vollblutspiegel in entsprechende Plasmaspiegel umzurechnen, da bisher keine Referenzwerte dafür existierten. In einer Basisstudie sollten DBS Proben von Diabetes Typ 2 Patienten mit der neu entwickelten Methode quantifiziert werden und durch Vergleich der Ergebnisse mit Kreatininwerten, die mittels konventioneller klinisch-chemischer Methodik bestimmt wurden, ein Faktor zur Umrechnung der Kreatininkonzentration ermittelt und verifiziert werden. Ein weiteres Ziel war es, aus diesen und weiteren Patientenproben einer Feldstudie erstmals

repräsentative Konzentrationsbereiche für die Kapillarblutspiegel der beiden Medikamente unter Alltagsbedingungen zu ermitteln. Aus den „real-life“-Daten der Studien, sollten Parameter identifiziert werden, die maßgeblichen Einfluss auf die Vollblutspiegel des jeweiligen Arzneimittels haben, um so die Blutspiegel besser vorhersagen zu können und die Therapie zu verbessern.

Mit dieser Arbeit sollte die Grundlage geschaffen werden, aus einem getrockneten Blutstropfen die Konzentrationen von Metformin und Sitagliptin im Zusammenhang mit der Nierenfunktion zu betrachten. In Zukunft könnte diese Methode zum Therapeutischen Drug Monitoring für Sitagliptin und Metformin angewendet werden, um dieses so erheblich zu vereinfachen.



# *B* Allgemeiner Teil



# 1 Methode zur Quantifizierung von Kreatinin, Metformin und Sitagliptin aus Trockenblut

## 1.1 Hintergrund

### 1.1.1 Auswahl der Arzneistoffe

Betrachtet man die Verordnungszahlen der vergangenen Jahre, so zählten die Antidiabetika mit 29,5 Mio. Verordnungen zu den zehn verordnungstärksten Medikamenten (definierte Tagesdosis (DDD) 2008: 1955,4 Millionen; DDD 2014: 2145,2 Millionen) [14, 16]. Innerhalb der Gruppe der oralen Antidiabetika weist Metformin (Einleitung, A4.1.1, Abbildung 8) als einziges, sich noch auf dem Markt befindendes Biguanid die höchsten Verordnungszahlen auf (DDD (2014): 595,2 Millionen) [14, 16]. Von 1998 bis 2008 haben sich die Verordnungen für Metformin mehr als verdreifacht, zwischen 2005 und 2014 sind sie um 56 % gestiegen [14, 16]. Darin spiegelt sich wider, dass es das Mittel der ersten Wahl zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 ist (Einleitung, A1.2.2) [5]. Sitagliptin (Einleitung, A4.2.1, Abbildung 9) ist ein 2007 neu zugelassener Dipeptidylpeptidase–IV-Inhibitor (DPP-IV-Inhibitor), der auch in Kombination mit Metformin empfohlen wird, falls die Therapie mit Metformin nicht ausreicht, um den HbA<sub>1c</sub>-Zielwert zu erreichen oder als Monotherapie, wenn eine Metformin-Unverträglichkeit besteht (Einleitung, A1.2.2) [5]. Für die DPP-IV-Inhibitoren wurde 2010 (DDD: 111 Millionen) ein starker Anstieg der Verordnungszahlen erwartet [16, 116]. Schon 2014 wurden 296 Millionen definierte Tagesdosen verordnet, davon fielen 228,5 Millionen DDD alleine auf Sitagliptin, was gegenüber dem Vorjahr ein Plus von 28,3 % bedeutete [16]. In 2014 wurden genauso viele DDD DPP-IV-Inhibitoren verordnet wie Sulfonylharnstoffe, welche seit der Zulassung ersterer, einen Rückgang in den Verordnungszahlen erleben [16]. Sowohl für Metformin, als auch für Sitagliptin wird aufgrund der überwiegend renalen Eliminierung eine Kontrolle der Nierenfunktion während der Therapie empfohlen [99, 117]. Die Nierenfunktion wird über die Kreatininkonzentration im Plasma abgeschätzt (Einleitung, A3.3.3) [75].

In der Literatur wird über eine Methode für die Quantifizierung von Metformin aus humanen Dried-Blood-Spots (DBS) berichtet [136]. Eine simultane Quantifizierung von Metformin und Sitagliptin aus murinen und menschlichen Dried-Blood-Spots wurde ebenfalls beschrieben [137]. Dabei wurde aber nur menschliches Kontrollblut verwendet und es wurden keine Patientenproben untersucht [137]. Weitere Methoden zur Bestimmung dieser Arzneistoffe aus Dried-Blood-Spots sind bisher nicht publiziert. Methoden zur Bestimmung von Kreatinin aus DBS Proben wurden 2013 und 2015

veröffentlicht, allerdings wurde zum einen eine sehr geringe Probenzahl ( $n = 9$ ) vermessen [92], zum anderen wurde venöses Blut für die Dried-Blood-Spot Proben eingesetzt [93]. Die Kreatininkonzentration ist im Kapillarblut unter Umständen verschieden von der im venösen Blut, aufgrund der zwischen den Matrices bestehenden Unterschiede, wie z. B. dem unterschiedlichen Hämatokrit [138, 139].

### 1.1.2 Auswahl der Messmethoden

Um eine breite Anwendung des Therapeutischen Drug Monitorings und eine Messung in Routinelaboratorien zu ermöglichen, sollten einfache Messmethoden gewählt werden.

Für Metformin gibt es publizierte Angaben zu den therapeutischen Bereichen bzw. Konzentrationen, die unter einer gut eingestellten Therapie mit Metformin bei Patienten in Plasma und Erythrozyten erreicht werden. Es existieren zudem Daten über die tatsächlich gefundene Konzentrationen von Metformin im Plasma und den Erythrozyten von Patienten, deren Therapie überprüft wurde (Tabelle 2) [109, 111].

**Tabelle 2: Konzentrationsbereiche für Metformin in Erythrozyten und Plasma.** Die Daten stammen von Patienten, deren Therapie mit Metformin gut eingestellt und stabil war (**A**) und von Patienten, deren Plasma- und Erythrozytenkonzentration von Metformin aufgrund einer Therapieoptimierung bestimmt wurde (**B**).

	Tagesdosierung Metformin [mg]	Anzahl Patienten	Konzentration Metformin (MW $\pm$ SD) [mg/L]	
			Plasma	Erythrozyten
A	1700 - 2550	58	0,5 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4
B	k.A.	467 Patienten/ 798 Bestimmungen	2,7 $\pm$ 7,1	2,0 $\pm$ 4,4

Aufgrund der hohen Metforminkonzentration im Vollblut (Plasma + Erythrozyten) sollte es möglich sein, die Metforminspiegel selbst unter Verwendung von nur wenig Matrix für die Dried-Blood-Spots, mittels HPLC-UV, wie sie in jedem Routinelabor zur Verfügung stehen sollten, zu detektieren.

Die Normwerte der Kreatininspiegel im Plasma liegen je nach Messmethode für Frauen bei 0,47 – 1,17 mg/dL, für Männer bei 0,55 – 1,44 mg/dL [78]. Mit Hinblick darauf, dass es Hinweise gibt, dass sich Kreatinin in den Erythrozyten anreichern kann [140], wurde erwartet, dass die Konzentration, die aus Vollblut gemessen wird, tendenziell noch höher sein wird, sodass auch für Kreatinin eine HPLC-UV Analytik in Frage kam.

Die Maximalspiegel für Sitagliptin, die publiziert sind, liegen bei 950 nM [117] (387 ng/mL), die „Steady-state“ Konzentration bei einer Gabe von 100 mg am Tag bei 941 nM (383 ng/mL) [121]. Diese Konzentrationen sind zu niedrig, um sie mittels einer HPLC-UV Methode zu erfassen, vor allem wenn man in Betracht zieht, dass nur ein sehr kleines



Probenvolumen (40 µL) zur Verfügung stehen würde. Aus diesem Grund wurde entschieden, Sitagliptin zwar aus demselben Spot und mit derselben Aufarbeitung, allerdings mit einer empfindlichen LC-MS/MS Methode zu vermessen.

## 1.2 Methodenentwicklung

### 1.2.1 Entwicklung der HPLC-UV-Methode

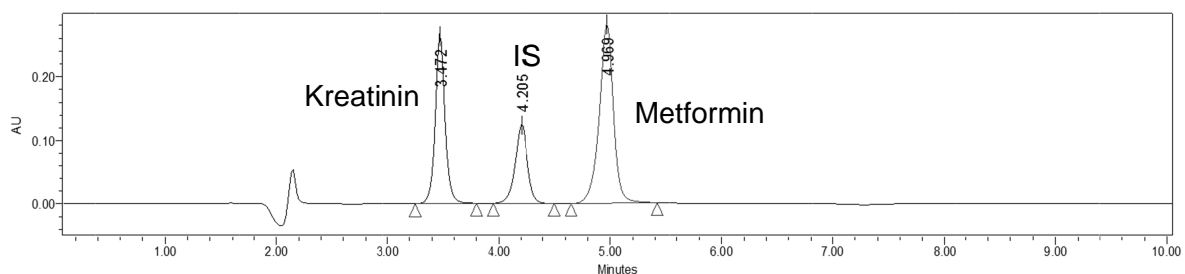
#### 1.2.1.1 Entwicklung der HPLC-UV-Methode für Metformin und Kreatinin aus Reinsubstanzen

Metformin ist ein sehr hydrophiler, basischer Arzneistoff, der bei physiologischem pH zu über 99,9 % als Kation vorliegt (Einleitung, A4.1, Abbildung 8) [102]. Für ihn existieren diverse Methoden zur Quantifizierung, zumeist per HPLC mit UV- oder MS-Detektion [136, 141-147]. Oft wird dabei eine Umkehrphasenchromatographie mithilfe verschiedener C18 Säulen durchgeführt [145-147], allerdings zeigt Metformin hierbei aufgrund der hohen Polarität [141] eine nur sehr schwache Retention [136, 146]. Publiziert sind ebenfalls Methoden mithilfe einer Ionenpaar- [136, 144] oder Normalphasenchromatographie [148, 149], aber auch diverse Methoden, bei denen die Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie (HILIC) verwendet wurde [141-143]. Auch für Kreatinin sind HPLC-Methoden mit UV- und MS/MS-Detektion publiziert [75, 81, 90-95]. Die HILIC wurde 1990 von Alpert [150] zum ersten Mal erwähnt und die Anzahl der Publikationen steigt seither zunehmend an [151]. Für diese Art der Chromatographie werden polare stationäre Phasen verwendet, wohingegen die mobile Phase der der RP-Chromatographie gleicht. Mit Hilfe der HILIC Methoden können auch geladene Moleküle analysiert werden, weshalb sie als Schnittstelle zwischen RP-, NP- und Ionenpaarchromatographie gilt [151]. Die Vorteile gegenüber Normalphasen- oder Umkehrphasenchromatographie liegen zum einen darin, dass polare Analyten immer eine gute Löslichkeit in der wässrigen mobilen Phase (im Vergleich zur unpolaren mobilen Phasen in der NP-Chromatographie) zeigen, zum anderen können auch Analyten aus komplexen Matrices, die nahe dem Totvolumen bei einer RP-Chromatographie eluieren retiniert werden [152]. Im Gegensatz zur RP-Chromatographie wird bei der HILIC der Fließmittelgradient mit einem niedrigen Anteil an polarem Fließmittel begonnen und die polaren Analyten eluieren mit steigendem polarem Anteil des Fließmittels [151]. Typische stationäre Phasen sind Kieselgele modifiziert mit polaren funktionellen Gruppen wie Diolen, Amininen, Cyanogruppen oder auch Amidinen [151]. Als mobile Phase wird ein mit Wasser mischbares organisches Lösungsmittel mit einem geringen Anteil an Wasser verwendet [151]. Es wird eine mit Wasser angereicherte Schicht auf der Oberfläche der polaren stationären Phase ausgebildet, oberhalb der die

wasserarme mobile Phase durch die Säule fließt. Durch Verteilung des Analyten in diese zwei Schichten findet die Trennung statt, wobei der exakte Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist [151]. Anwendung findet die HILIC zur Trennung kleiner polarer und/oder ionisierbarer Moleküle, wie z. B. Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, Sacchariden, Alkaloiden oder auch Arzneistoffen [141, 143, 151].

Das Ziel der Methodenentwicklung aus den Reinsubstanzen war es, eine Methode für Metformin und Kreatinin zu entwickeln, bei der eine vollständige Trennung der Analyten und des internen Standards in möglichst kurzer Zeit erreicht wurde. Durch das Verwenden einer HILIC Säule (Phenomenex Luna<sup>®</sup> HILIC) konnte dies erfüllt werden. Diese Säule basiert auf einer vernetzten Diolstruktur [152], welche eine gute Retention von Analyten auf der mit Wasser angereicherten Schicht auf der Kieselgeloberfläche verspricht [152].

Um die Methode möglichst kompatibel für ein LC-MS/MS System zu machen, wurde darauf geachtet, eine möglichst geringe Pufferstärke sowie flüchtige Fließmittelbestandteile, z. B. Ammoniumformiatpuffer und Ameisensäure zu verwenden. Für die Methode, die alle oben genannten Ziele am besten erfüllte, wurde als wässriges Fließmittel 5 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3,2 eingesetzt, als organisches Acetonitril. Die Analyten wurden bei isokratischem Fluss (70 % organischer Anteil, 30 % wässriger Anteil; 1 mL/min) über 6 min getrennt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Chromatogramm der Reinsubstanzen Metformin und Kreatinin und des internen Standards (IS).** Mit einer isokratischen Elutionsmethode (70 % Acetonitril; 30 % 5 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3,2) wurden die Substanzen innerhalb von 6 Minuten getrennt.

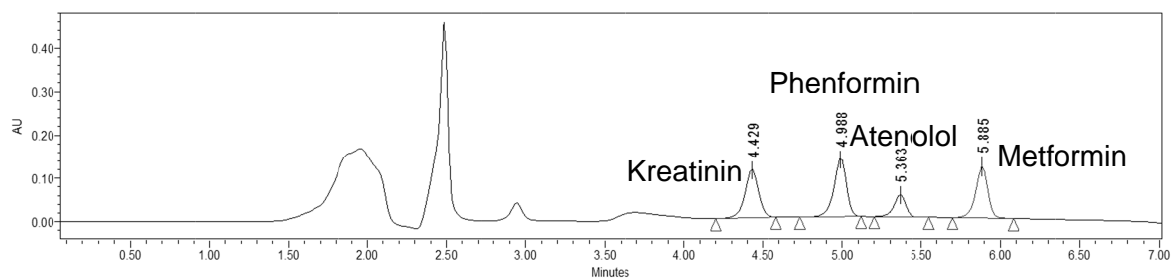
#### 1.2.1.2 Entwicklung der HPLC-UV Methode für Metformin und Kreatinin aus Trockenblut

Um zu testen, ob die chromatografische Auftrennung, die für die Analyten als Reinsubstanzen in Lösungsmittel entwickelt wurde, auch für Matrixproben aus Trockenblut Bestand hatte, wurde Vollblut mit den Analyten versetzt, extrahiert und vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, das Volumen an Spikelösung möglichst gering zu halten (2,5 %), damit die Matrix möglichst wenig durch Zugabe eines „Fremdstoffes“ verfälscht wurde. Ebenso war es wichtig, dass die Proben vollständig getrocknet waren, da Feuchtigkeit das Extraktionsverhalten verändern kann und das Bakterienwachstum

fördert [21]. Die Proben wurden extrahiert, vorbereitet (Exp. Teil, C2.2.2) und mit der isokratischen Methode (Allg. Teil, B1.2.1.1) vermessen, jedoch ließ sich erst nach Wechsel auf einen Fließmittelgradienten (Exp. Teil, C2.2.2, Tabelle 31 E) eine zufriedenstellende Trennung der Analyten erreicht werden.

Der initial verwendete interne Standard war Atenolol. Dieser Betablocker wird eingesetzt zur Therapie der Hypertonie, eine der häufigsten Begleiterkrankungen des Diabetes mellitus Typ 2 [14, 153]. Da die Wahrscheinlichkeit gegeben war, dass eine Patientenprobe neben Metformin auch Atenolol enthielt, wurde Atenolol durch Phenformin ersetzt, ebenfalls ein Antidiabetikum aus der Klasse der Biguanide. Dieses ist aber in Deutschland nicht mehr als Arzneistoff im Handel, da es sehr häufig unerwünschte Nebenwirkungen ausgelöst hatte [100], und damit in den Patientenproben nicht enthalten sein konnte.

Aufgrund des Wechsels des internen Standards wurde die Messmethode auf Phenformin angepasst. Mit einer Gradientenelution über 5 min (Exp. Teil, C2.2.2, Tabelle 32 D) konnte eine Trennung der Analyten erreicht werden, in der Kreatinin eine Retentionszeit von 4,4 min, Phenformin von 5,0 min und Metformin von 5,9 min aufwies (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Chromatogramm der Analyten Metformin und Kreatinin, des internen Standards Phenformin und des Atenolols aus Trockenblutproben.** Mit einer Gradientenelution über 5 Minuten wurden die Analyten innerhalb von 6 Minuten getrennt.

## 1.2.2 Entwicklung der Extraktionsmethode

### 1.2.2.1 Auswahl des Blutvolumens

Der erste Schritt zur Extraktionsmethode war die Festlegung eines geeigneten Probenvolumens. Die Limitierung dabei war die Menge an Blut, welche durch Punktion der Fingerbeere gewonnen werden konnte. Für die Entwicklung der Extraktion wurden 50  $\mu$ L Blut verwendet. Das für die Messungen verwendete Volumen betrug 40  $\mu$ L. Zur Gewinnung des Blutes konnten geeichte Kapillaren eingesetzt werden. Mit diesen wurde das Volumen exakt abgemessen und auf den Träger aufgetragen (Exp. Teil, C2.3.1). Für

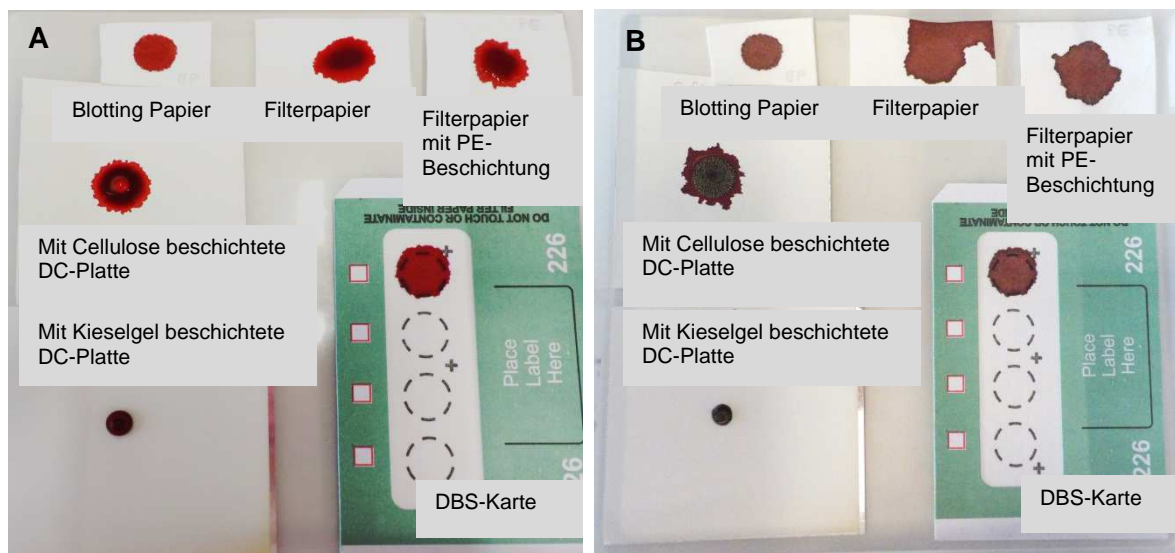
die Extraktion und die Quantifizierung der Analyten wurde der komplette Spot verwendet (Einleitung, A2.3).

### 1.2.2.2 Auswahl des Dried-Blood-Spot Trägers

In der Literatur zur Dried-Blood-Spot (DBS) Analytik ist in den meisten Fällen die Verwendung von sogenannten Dried-Blood-Spot Karten beschrieben [22, 32]. Diese gibt es mittlerweile in sehr vielen verschiedenen Ausführungen (Einleitung, A2.2). Da sie jedoch sehr kostenintensiv sind, wurde eine ebenso gute wie auch günstige Alternative dazu gesucht.

Um verschiedene Trägermaterialien für das Blut miteinander zu vergleichen, wurde Blut auf kommerziell erhältliche DBS Karten aufgetragen (Perkin Elmer; Exp. Teil, C2.1.4), aber auch auf z. B. Blotting Papier, Dünnschichtchromatographie Platten oder auch Filterpapier und die Handhabung sowie Eigenschaften, wie Trocknungsverhalten oder auch die Größe des entstehenden Spots miteinander verglichen (Abbildung 13).

Die Verwendung der Perkin Elmer DBS-Karten führte zu einer Verteilung des Blutes in einen gleichmäßigen, runden Spot, der sich auf einen relativ kleinen Radius beschränkte. Es blieb kein Blut auf dem Träger stehen, sondern es zog vollständig in die Karte ein, ohne aber, dass das Blut durch den Träger hindurch sickerte und auf der Unterseite wieder austrat (Abbildung 13 A).



**Abbildung 13: Vergleich der verschiedenen Trägermaterialien direkt nach dem Auftragen von 50 µL Vollblut (A) und nach einer Trocknungsdauer von 3 Stunden (B).**

Im Gegensatz dazu hatte das Blut bei Verwendung des einfachen Filterpapiers eine sehr unregelmäßige Form und zog nicht vollständig ein (Abbildung 13 A). Das Papier war

punktuell vollständig gesättigt und auf der Unterseite trat das Blut wieder aus, wodurch es zu einer Kontamination der Unterlage kam. Erst zeitverzögert verschwand der Überstand, nachdem sich das Blut im Filterpapier weiter verteilt hatte (Abbildung 13 B). Da Blut auf der Unterseite des Trägers austrat, konnte das Volumen der Probe nicht exakt festgestellt werden, weshalb das Filterpapier als DBS Träger nicht genutzt werden konnte. Auf das PE beschichteten Filterpapier war auf der Unterseite eine Polyethylenbeschichtung aufgetragen, die das Blut am Durchtritt hinderte. Das gesamte Blut verblieb somit im Träger, es bildete sich allerdings ein sehr unregelmäßiger Spot, der aufgrund seiner Größe und Form aber negativ auffiel (Abbildung 13 A/B). Das Blotting Papier dagegen zeigte sehr positive Eigenschaften. Das Blut zog vollständig und schnell in den Träger ein (Abbildung 13 A/B), ohne dass es zu einer Kontamination der Unterlage kam. Blotting Papier stellte also eine geeignete Alternative zu den vorgefertigten Karten dar. Es wurden als Trägermaterialien auch zwei DC-Platten getestet. Die Idee bestand darin, diese als Träger zu nutzen, um die Analyten durch eine Dünnschichtchromatographie von den übrigen Bestandteilen der Probe zu trennen, um nur die Analytbanden zu extrahieren. Bei der mit Kieselgel beschichteten DC-Platte blieb das Blut als Tropfen auf der Platte stehen und verteilte sich nicht weiter. Der Tropfen trocknete langsam, ohne Spreitung auf der Platte fest (Abbildung 13 A/B). Im Gegensatz dazu zog bei der mit Cellulose beschichteten DC-Platte das Blut beim Auftragen langsam in die Plattenbeschichtung ein. Diese bot aber zu wenig Material, sodass ein Überstand stehen blieb und dieser dann festtrocknete (Abbildung 13 A/B).

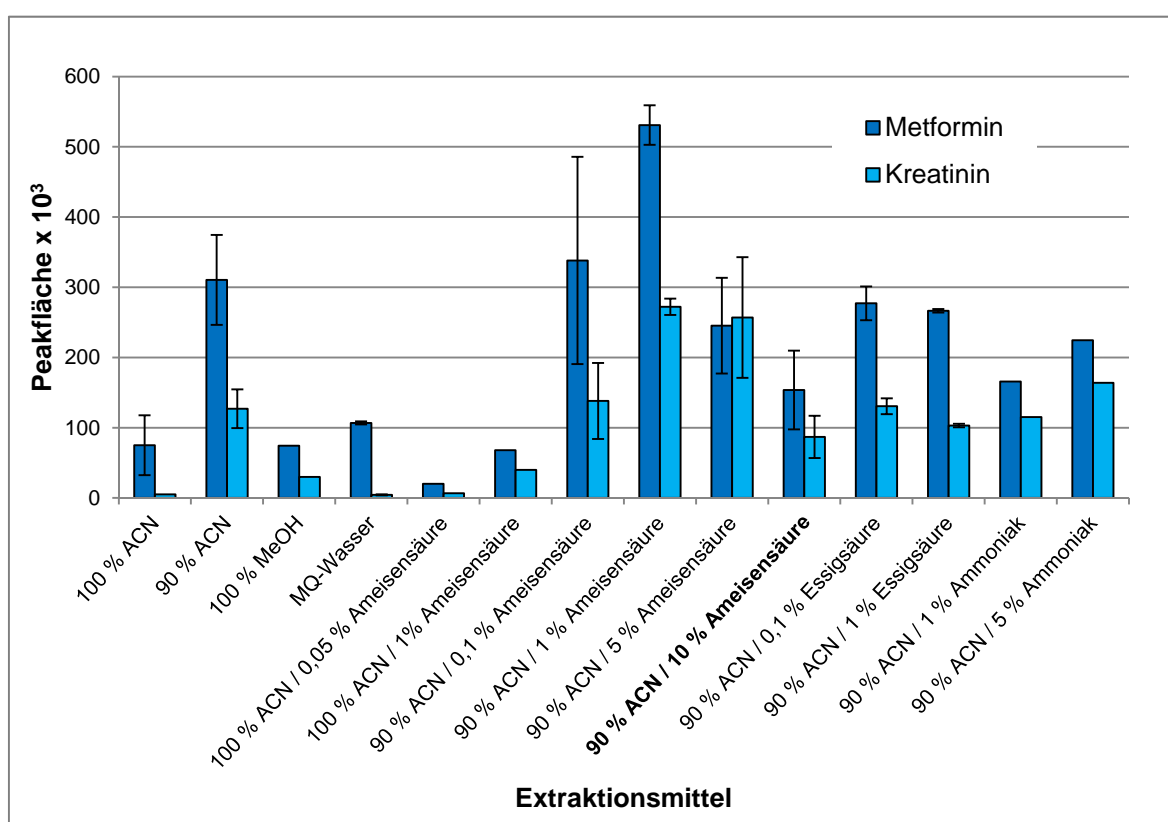
Die besten, mit DBS-Karten vergleichbaren Eigenschaften, zeigte das Blotting Papier, sodass dieses für den weiteren Verlauf verwendet wurde. Aus diesem wurden Kreise ausgestanzt, welche mittels eines doppelseitigen Klebestreifens auf einem Karton befestigt wurden (Exp. Teil, C1.3). Darauf wurde das Blut getropft. So konnte der gesamte „Pre-cut“ Spot extrahiert werden, ohne dass eine Kontaminationsgefahr durch Schneiden des probenbeschickten Blotting Papiers gegeben war. Dieses Vorgehen erfolgte in Anlehnung an Youhnovski et al. (Einleitung, A2.3) [48].

#### 1.2.2.3 Auswahl des Extraktionsmittels

Für eine effektive Extraktion musste ein Extraktionsmittel gefunden werden, das die Analyten in einer großen Menge reproduzierbar aus dem Spot extrahiert. Da sowohl Metformin als auch Kreatinin sehr hydrophile Stoffe sind, sollten diese von polaren Extraktionsmitteln, wie Methanol oder Wasser sehr gut extrahiert werden, allerdings würde dies auch auf die im Blut enthaltenen Proteine zutreffen. Ziel war es deshalb, ein Extraktionsmittel zu finden, das die Analyten möglichst vollständig, aber ohne viele Begleitsubstanzen extrahiert.

Dazu wurden in einer Standardprozedur (Exp. Teil, C2.3.3) verschiedene Lösungsmittel zur Extraktion verwendet (Exp. Teil, C2.3.3) und die Peakflächen der zugegebenen Analyten verglichen.

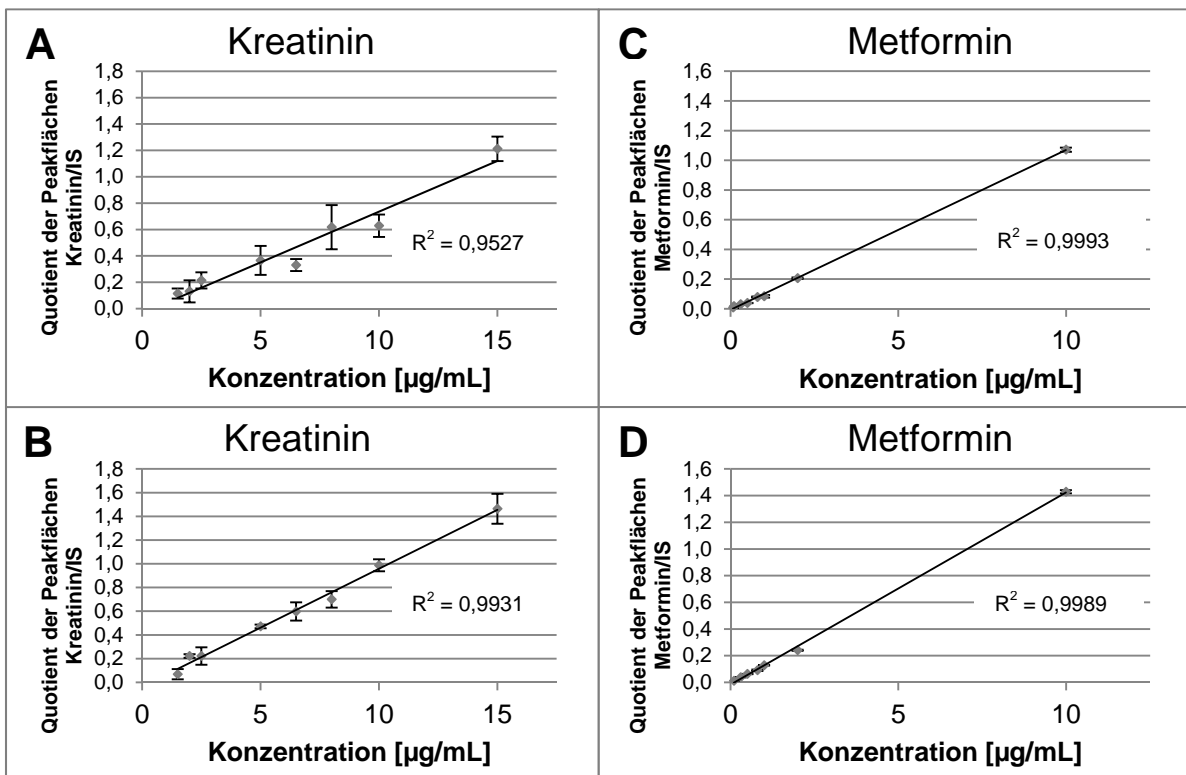
Mit 80 % sowie 60 % Acetonitril, 90 %, 80 % und 60 % Methanol, 2-Ethoxyethylacetat, und Kombinationen aus 100 % Acetonitril mit 0,05 % bzw. 5 % Ameisensäure und 90 % Acetonitril in Wasser mit 20 % Ameisensäure als Extraktionsmittel konnten die Analyten nicht extrahiert und in den zugehörigen Chromatogramme dementsprechend keine Analyten detektiert werden. Die reinen Lösungsmittel, wie Methanol, Acetonitril oder auch Millipore®-Wasser führten zu einer sehr schlechten Analytextraktion mit sehr kleinen Peakflächen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Einfluss des Extraktionsmittels auf die Extraktionseffizienz.** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Mittelabweichung) der Peakflächen der Analyten ( $n = 1-3$ ), wenn diese mit verschiedenen Extraktionsmittel, wie Acetonitril (ACN), Methanol (MeOH), Millipore®-Wasser (MQ-Wasser) oder Acetonitril (100 % bzw. 90 %), versetzt mit Ameisen- oder Essigsäure oder Ammoniak extrahiert wurden. Die hervorgehobene Variante (90 % ACN / 10 % Ameisensäure) stellt das endgültig gewählte Extraktionsmittel dar.

Die Verwendung von reinem Wasser ergab einen durch das Hämoglobin rot gefärbten Extrakt, der zusätzlich kleine Feststoffteilchen enthielt. Dieses Phänomen trat bei steigendem Wasseranteil des Extraktionsmittels auf (Einleitung, A2.4). Erst durch die Zugabe von Ameisensäure bzw. Essigsäure zu 90 % Acetonitril konnte eine deutliche

Verbesserung der Extraktion der Analyten erreicht werden. Die Säuren- bzw. Basenzugabe wurde nur für 90 % Acetonitril durchgeführt, da dies als Extraktionsmittel allein schon einen hohen Analytanteil extrahiert hatte (Abbildung 14). Die mit Abstand effizienteste Extraktion wurde mit 90 % Acetonitril und Zusatz von 1 % Ameisensäure erreicht. Allerdings wurde beim Erstellen von Kalibriergeraden festgestellt, dass Kreatinin mit diesem Extraktionsmittel nicht linear mit der Konzentration und auch nicht reproduzierbar extrahiert wurde, was deutlich an dem Bestimmtheitsmaß von 0,9527 und den relativen Standardabweichungen von 7,69 % bis 63,73 % zu sehen war (Abbildung 15 A). Aus diesem Grund wurde letztendlich als Extraktionsmittel 90 % Acetonitril mit 10 % Ameisensäure gewählt. Hierbei wurde zwar weniger Analyt extrahiert, aber dafür erfolgte die Extraktion über den Konzentrationsbereich linear (Abbildung 15 B). Für Metformin war für beide Extraktionsmittel Linearität gegeben (Abbildung 15 C und D).



**Abbildung 15: Kalibriergeraden für Kreatinin (A und B) und Metformin (C und D) mit 90 % Acetonitril mit 1 % Ameisensäure (A und C) und 90 % Acetonitril mit 10 % Ameisensäure (B und D) als Extraktionsmittel.** Die Kalibriergeraden zeigen jeweils den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) aus drei Einzelbestimmungen, wobei der Quotient der Peakflächen Analyt/Peakflächen IS gegen die Konzentration im Blut aufgetragen wurde. Für Kreatinin konnte mit 90 % Acetonitril mit 1 % Ameisensäure als Extraktionsmittel keine Linearität erreicht werden.

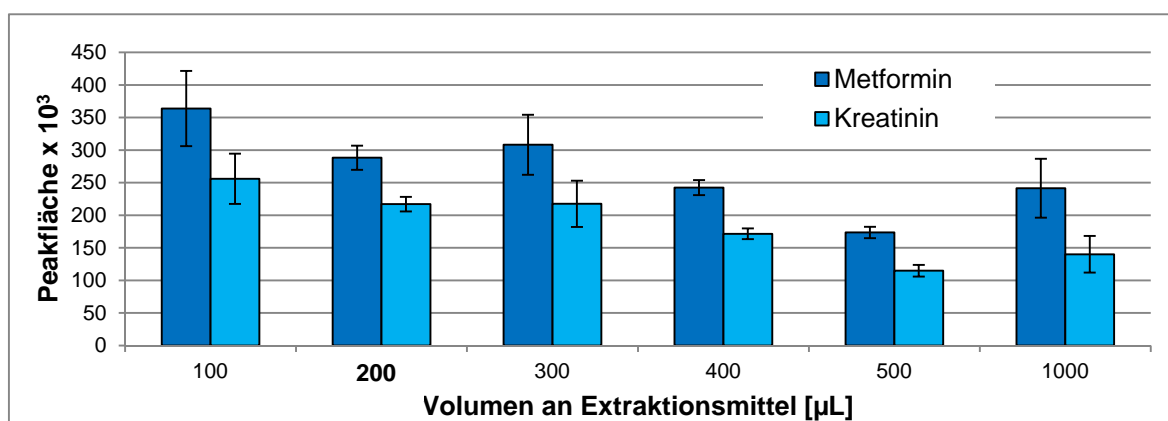
#### 1.2.2.4 Auswahl des Extraktionsmittelvolumens

Das Volumen an Extraktionsmittel spielt eine wichtige Rolle in der Extraktion von Trockenblutproben, deshalb wurde im Zuge der Entwicklung der Extraktionsmethode

untersucht, wie sich die Extraktionseffizienz durch Variationen im Volumen des Extraktionsmittels veränderte [154].

Für die Auswertung wurde hauptsächlich Metformin betrachtet. Da alle Versuche mit Blut eines Einzelspenders durchgeführt wurden, wurde der Blankwert des Kreatinins, welches sich ursprünglich in dem Blut befand, nicht von der zugegebenen Menge abgezogen.

Schon kleine Volumenänderungen, riefen große Veränderungen der Extraktionseffizienz hervor (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Einfluss des Extraktionsmittelvolumens auf die Extraktionseffizienz.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  Mittelabweichung) der Peakflächen der Analyten ( $n = 2 - 4$ ), wenn diese mit verschiedenen Volumina an Extraktionsmittel extrahiert wurden. Das hervorgehobene Volumen (200 µL) stellte das endgültig gewählte Volumen dar.

Die Extraktionen, die mit 100, 200 und 300 µL Extraktionsmittel durchgeführt wurden, zeigten eine sehr gute Extraktionseffizienz, die kleinste Mittelabweichung der Peakflächen (Metformin: 18506; Kreatinin: 11086) wurde bei einer Extraktion mit einem Volumen von 200 µL erhalten (Abbildung 16).

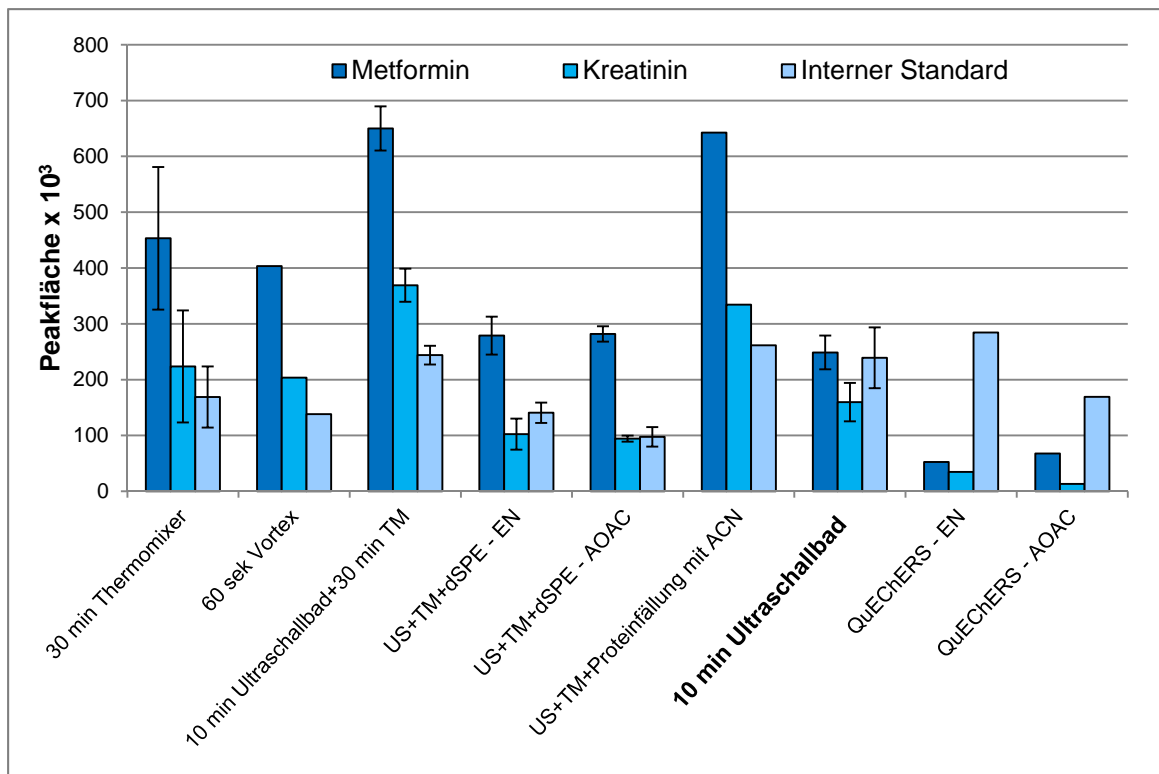
#### 1.2.2.5 Entwicklung und Optimierung des Extraktionsverfahrens

##### *Entwicklung des Extraktionsverfahrens*

Bisher wurden die Proben mit demselben Standardverfahren extrahiert (Exp. Teil, C2.3.3). Dieses Verfahren mit 90 % Acetonitril und Zusatz von 1 % Ameisensäure als Extraktionsmittel wurde auf verschiedene Arten (Exp. Teil, C2.3.5.1; Abbildung 70) variiert.

Die Extraktionsvariation, bei der die Probe 30 min im Thermomixer gerüttelt wurde, zeigte eine gute Extraktion, aber eine große Standardabweichung für alle Analyten. Der Austausch dieses Schrittes gegen 60 Sekunden Schütteln auf dem Vortex, führte zu einer deutlich ineffizienteren Extraktion (Abbildung 17).





**Abbildung 17: Extraktionseffizienz verschiedener Variationen des Extraktionsverfahrens.** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) der Peakflächen der Analyten ( $n=1-7$ ), die aus Extraktionsverfahren, die mithilfe des Thermomixers (TM), des Ultraschallbades (US), des Vortex oder über dispersive SPE (dSPE) durchgeführt wurden (Exp. Teil, C2.3.5), resultierten. Die hervorgehobene Methode (10 min Ultraschallbad) stellt die endgültig gewählte Methode dar. (Acetonitril = ACN)

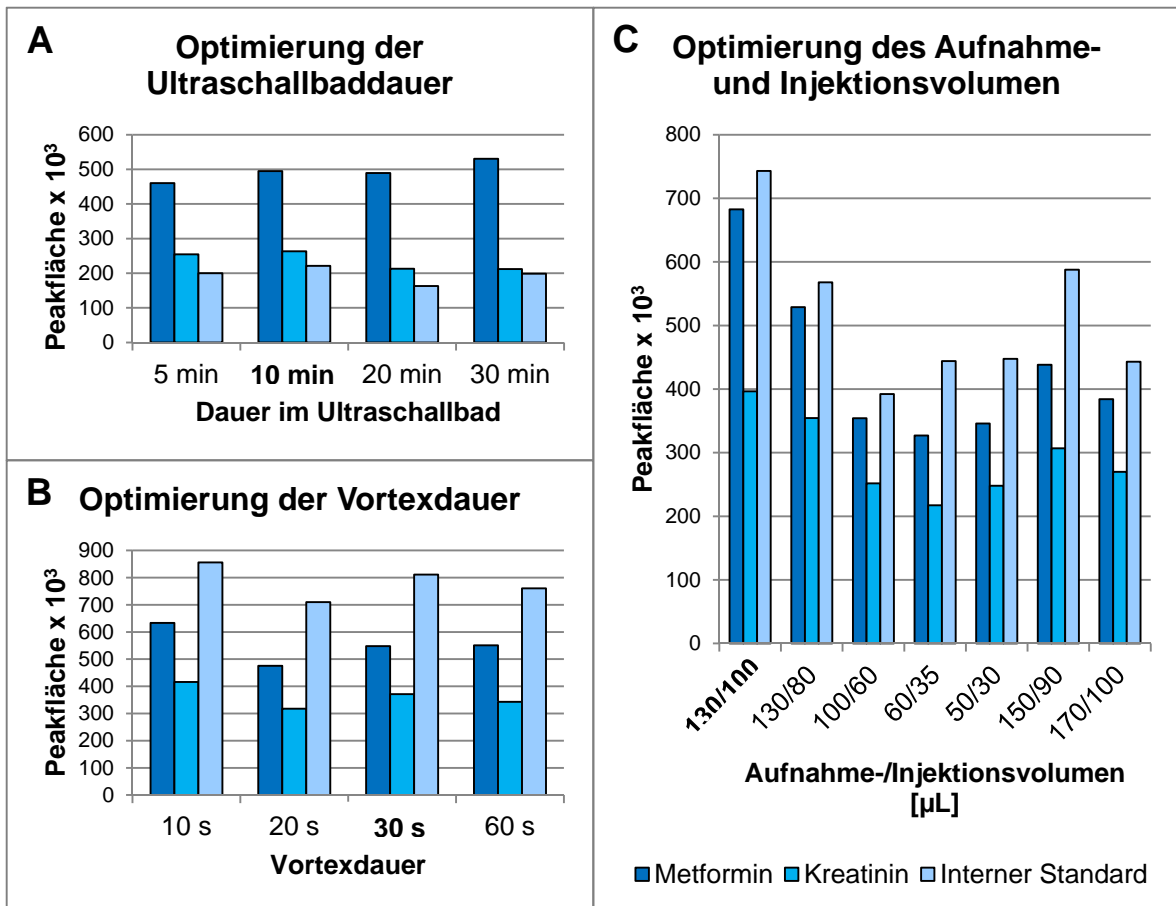
Um sicherzugehen, dass während der Extraktion alle Blutzellen vollständig aufgeschlossen werden, wurde die Probe vor der Extraktion im Thermomixer für 10 min in ein Ultraschallbad gegeben. Durch den Ultraschall sollten die restlichen, trotz Trocknung möglicherweise noch intakten Blutzellen aufgebrochen werden, sodass der gesamte, im Vollblut enthaltene Analyt erfasst werden konnte. Hierdurch wurde eine sehr viel effizientere Extraktion mit einer kleinen Standardabweichung für alle Analyten erreicht (Abbildung 17). Um den erhaltenen Extrakt noch weiter zu reinigen, wurden zwei Arten einer dispersiven Festphasenextraktion (dSPE = dispersive solid phase extraction) angeschlossen (Exp. Teil, C2.3.5.1). Beide Variationen zeigten allerdings dasselbe Resultat bezüglich der Extraktionseffizienz, d.h. sie verschlechterte sich. Im Vergleich zu derselben Extraktion ohne Aufreinigung trat eine deutliche Verminderung der Peakflächen der Analyten auf (Abbildung 17). Eine weitere Option der Aufreinigung war eine Proteinfällung. Hierbei wurde der Extrakt mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Acetonitril versetzt, um die enthaltenen Proteine zu präzipitieren. Jedoch wurden selbst nach Zentrifugation keine Proteine gefällt, sodass man davon ausgehen konnte, dass in dem Extrakt keine enthalten waren. Im Vergleich zu der Extraktion ohne die Proteinfällung ist anhand der Peakflächen kein wesentlicher Unterschied zu sehen, sodass diese Art der Extraktion

einen Mehraufwand ohne erkennbaren Nutzen bedeutete (Abbildung 17). Die QuEChERS-Methode (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) ist ursprünglich eine Methode, um Pestizidrückstände in Obst und Gemüse zu analysieren [155]. Im Laufe der Zeit wurde diese Methode weiterentwickelt, sodass neben dem Original zwei modifizierte Protokolle (AOAC 2007.1 und EN 15662) häufig genutzt werden [156] (Exp. Teil, C2.3.5.1). In unserem Arbeitskreis konnte zuvor gezeigt werden, dass die Methoden auch für komplexe biologische Matrizes wie Blutzellen verwendet werden können [157]. Für die Trockenblutproben allerdings eigneten sich diese Verfahren nicht, da damit nur eine sehr schlechte Extraktionseffizienz erreicht wurde (Abbildung 17). Als letzte Variation des Extraktionsverfahrens wurde ein Verweilen der Probe für 10 min im Ultraschallbad gewählt. Hieraus resultierte eine schlechtere Extraktionseffizienz verglichen mit der Extraktion, bei der die Probe zusätzlich noch im Thermomixer gerüttelt wurde (Abbildung 17). Allerdings wurde die Dauer der Extraktion durch Eliminierung dieses Schrittes um 30 min reduziert. Wie schon beschrieben wurde (Allg. Teil, B1.2.2.3), war für die ersten Versuche zum Erstellen einer Kalibriergerade für Kreatinin keine Reproduzierbarkeit und Linearität gegeben. Erst nach der Änderung des Extraktionsmittels konnte ein hinreichend gutes Ergebnis erreicht werden. Für das Extraktionsverfahren musste also der Kompromiss eingegangen werden, dass die Analyten zwar weniger effektiv, dafür aber über den Konzentrationsbereich linear extrahiert wurden.

Das Extraktionsverfahren, das weiter optimiert wurde, war Variation 7 (Exp. Teil, C2.3.5.1, Abbildung 70). Nach Aufnahme des Rückstandes in Acetonitril wurde die Probe nach Zentrifugation mittels HPLC-UV analysiert.

### *Optimieren des Extraktionsverfahrens*

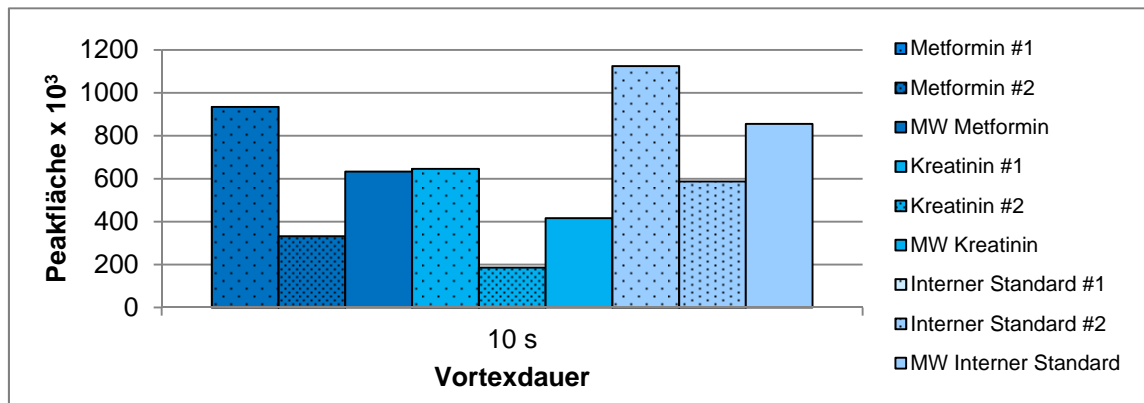
Um die Methode vollständig auszuschöpfen und die bestmögliche Extraktionseffizienz zu erreichen, wurde oben gewählte Extraktionsmethode bezüglich verschiedener Parameter optimiert. Hierzu zählte die Zeit, die die Probe im Ultraschallbad war, die, welche sie nach Wiederaufnahme in Acetonitril geschüttelt wurde sowie das Aufnahme- und Injektionsvolumen (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Optimierung des Extraktionsverfahrens.** Optimiert wurde dabei die Dauer im Ultraschallbad (A), die Dauer des Vortexens (B) sowie das Aufnahme- und Injektionsvolumen (C). Dargestellt sind jeweils die Peakflächen (Mittelwert; n = 2) der Analyten der Proben, die mit dem jeweiligen Verfahren aufgearbeitet wurden.

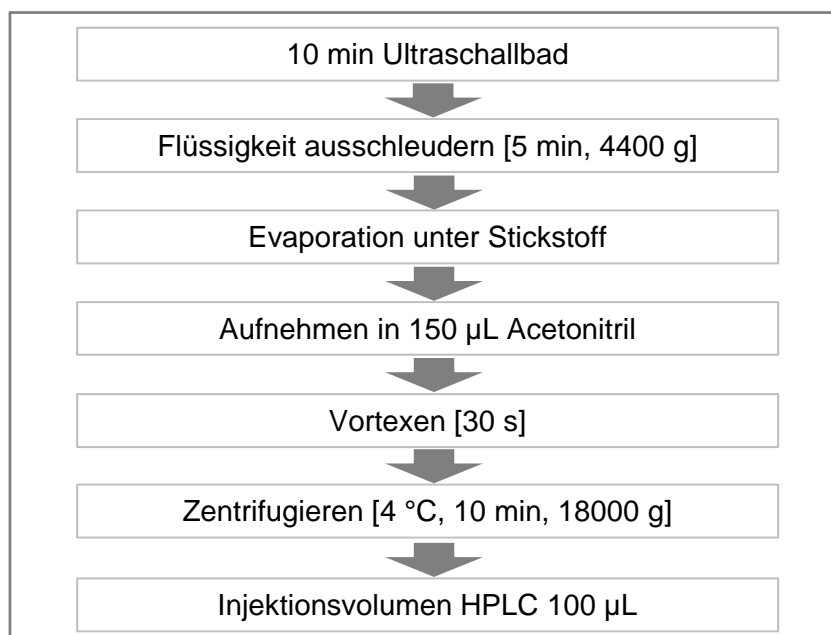
Bezüglich der Zeit, welche die Proben im Ultraschallbad verweilen, war eine minimale Steigerung der Peakfläche für 10 min Ultraschalleinfluss im Vergleich zu 5 min zu erkennen. Für eine Dauer von 30 min gab es eine weitere Steigerung der Peakflächen, jedoch waren 30 min verhältnismäßig lange, sodass 10 min als beste Variation gewertet wurde (Abbildung 18 A).

Für die Dauer der Vortexzeit zur Wiederaufnahme des Rückstandes in Acetonitril sah es aufgrund des Vergleichs der Mittelwerte so aus, als wären 10 Sekunden ausreichend, um die effizienteste Wiederaufnahme zu erreichen (Abbildung 18 B). Allerdings wurde bei Betrachten der Einzelwerte klar, dass 10 Sekunden zu kurz waren, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Abbildung 19). Die Einzelwerte schwankten sehr stark, sodass erst nach 20 Sekunden eine Reproduzierbarkeit gegeben war. Die höchsten, gut reproduzierbaren Peakflächen waren nach 30 Sekunden erreicht, sodass diese Alternative beibehalten wurde.



**Abbildung 19: Optimierung der Vortextdauer zur Wiederaufnahme des Rückstandes in Acetonitril nach Evaporation der Proben.** Dargestellt sind die Peakflächen für die Analyten des Versuches mit 10 s Vortextdauer und die Mittelwerte (MW) der Peakflächen der Substanzen. Aufgrund der hohen Schwankung der Einzelwerte (#1 vs. #2) war keine Reproduzierbarkeit gegeben.

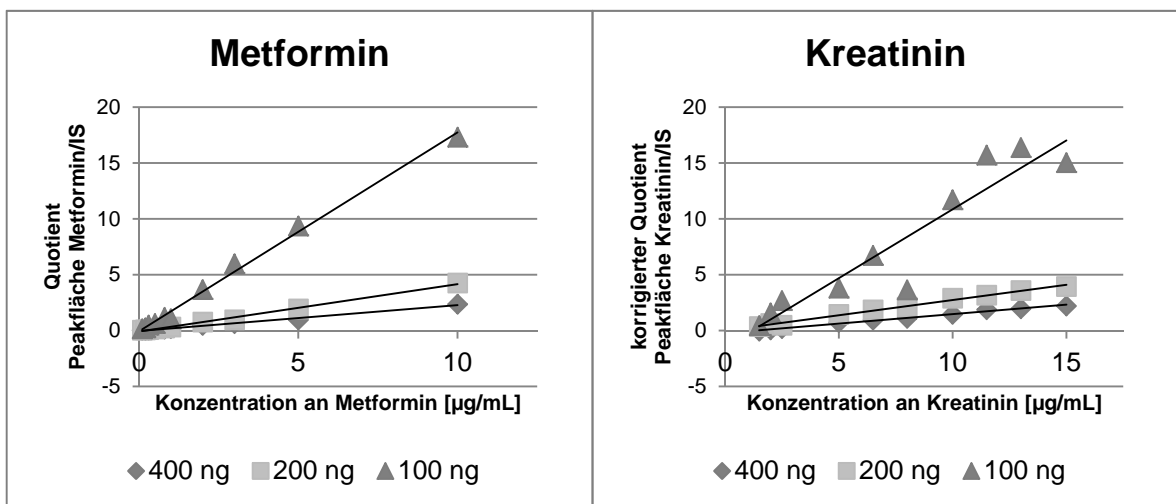
Als dritter Punkt wurde das Rekonstitutions- bzw. Injektionsvolumen optimiert. Hier war deutlich zu sehen, dass 130 µL als Aufnahme- und 100 µL als Injektionsvolumen die größten Peakflächen erzeugten und somit die effizienteste Methode darstellte (Abbildung 18 C). Allerdings wurde das Aufnahmevolumen später aufgrund der Hinzunahme von Sitagliptin als Analyt in die Methode (Allg. Teil, B1.2.2.7) zu 150 µL abgeändert. Das Injektionsvolumen von 100 µL wurde aber beibehalten. Die endgültige Extraktionsmethode ist in nachfolgender Abbildung (Abbildung 20) zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 20: Fließdiagramm der endgültigen Extraktionsmethode für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin aus Trockenblut.**

## 1.2.2.6 Anpassen der Konzentration des internen Standards

Um die Konzentration des internen Standards (IS) anzupassen, wurden verschiedene Kalibriergeraden vermessen. Für Kreatinin wurde der im Blank erhaltene Quotient Peakfläche Kreatinin/Peakfläche IS (endogenes Kreatinin) von den, bei den Konzentrationen 1 bis 10 erhaltenen Quotienten abgezogen, um nur die zugegebene Konzentration an Kreatinin zu kalibrieren (Exp. Teil, C2.7.1). Für Kreatinin war, wenn 100 ng Phenformin als interner Standard verwendet wurde, keine Linearität der Kalibriergeraden gegeben ( $R = 0,8827$ ) (Abbildung 21). Wurden dagegen 200 ng IS verwendet, konnte sowohl für Metformin ( $R = 0,997$ ), als auch für Kreatinin ( $R = 0,996$ ) eine Linearität der Peakflächen mit steigender Konzentration der Analyten erreicht werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Kalibriergeraden für Metformin und Kreatinin, die unter Verwendung verschiedener Mengen (400 ng, 200 ng und 100 ng) internem Standard (Phenformin) extrahiert wurden. Dargestellt ist jeweils die Kalibriergerade einer Einzelbestimmung. Für Kreatinin konnte unter Verwendung von 100 ng Phenformin keine Linearität der Kalibriergerade beobachtet werden.

Um eine möglichst kleine Menge und somit einen möglichst nahe im mittleren Bereich der Kalibriergerade liegende Menge internen Standard zu verwenden, wurden im weiteren Verlauf 8  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Phenformin mit einer Konzentration von  $c = 25 \mu\text{g/mL}$  als interner Standard für Metformin und Kreatinin eingesetzt.

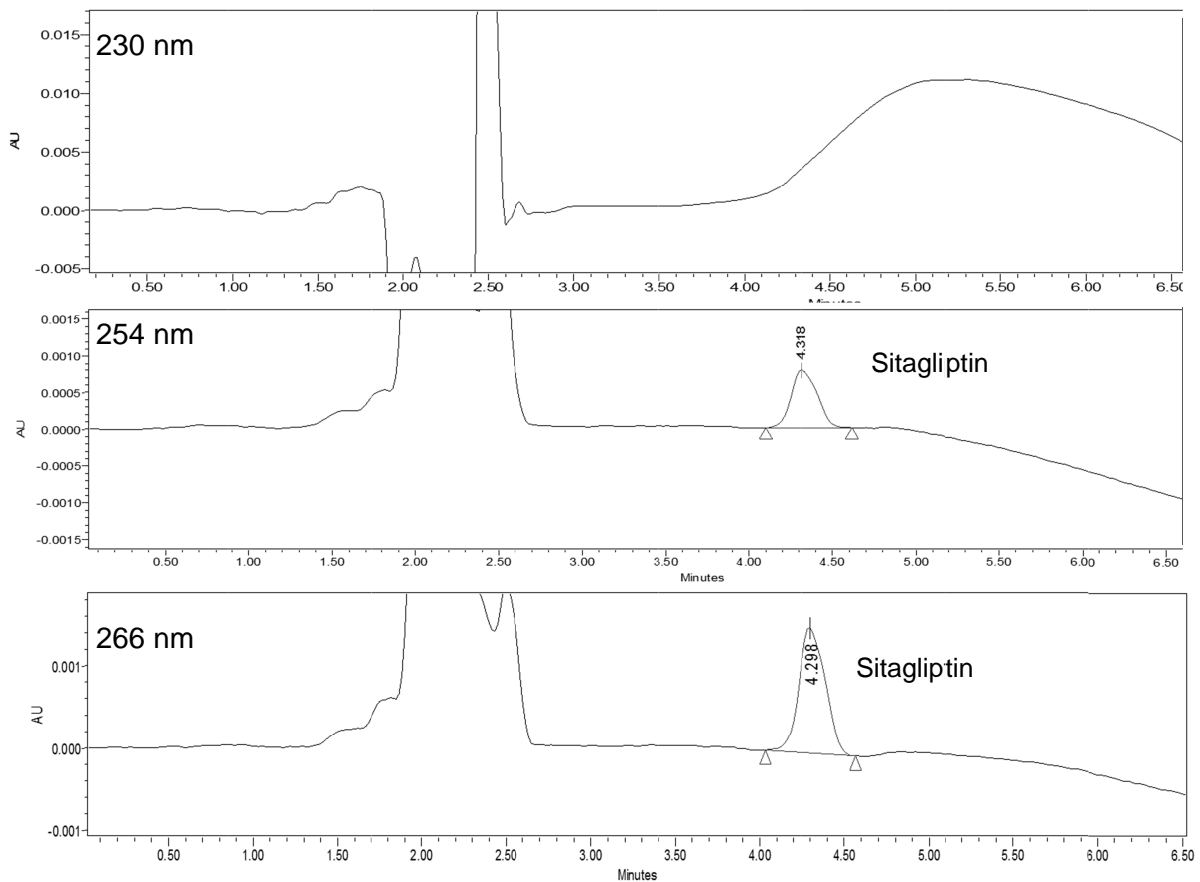
## 1.2.2.7 Übertragen der Extraktionsmethode auf Sitagliptin

Sitagliptin sollte als weiterer Analyt mit demselben Extraktionsvorgehen quantifiziert werden. Dieses war auf Metformin und Kreatinin optimiert worden, da diese zwei mithilfe der weniger empfindlichen HPLC-UV Analytik quantifiziert wurden. Die Empfindlichkeit war durch die schwachen Chromophore der Analyten zusätzlich beeinträchtigt. Sitagliptin sollte über eine LC-MS/MS Methode bestimmt werden, welche eine sehr viel größere

Empfindlichkeit aufweist, sodass die Extraktion für Sitagliptin nicht der entscheidende Schritt war. Eine Veränderung der Methode musste allerdings vollzogen werden, nämlich wurde der Rückstand nach der Evaporation unter Stickstoff in 150  $\mu\text{L}$  Acetonitril aufgenommen, anstatt in 130  $\mu\text{L}$ .

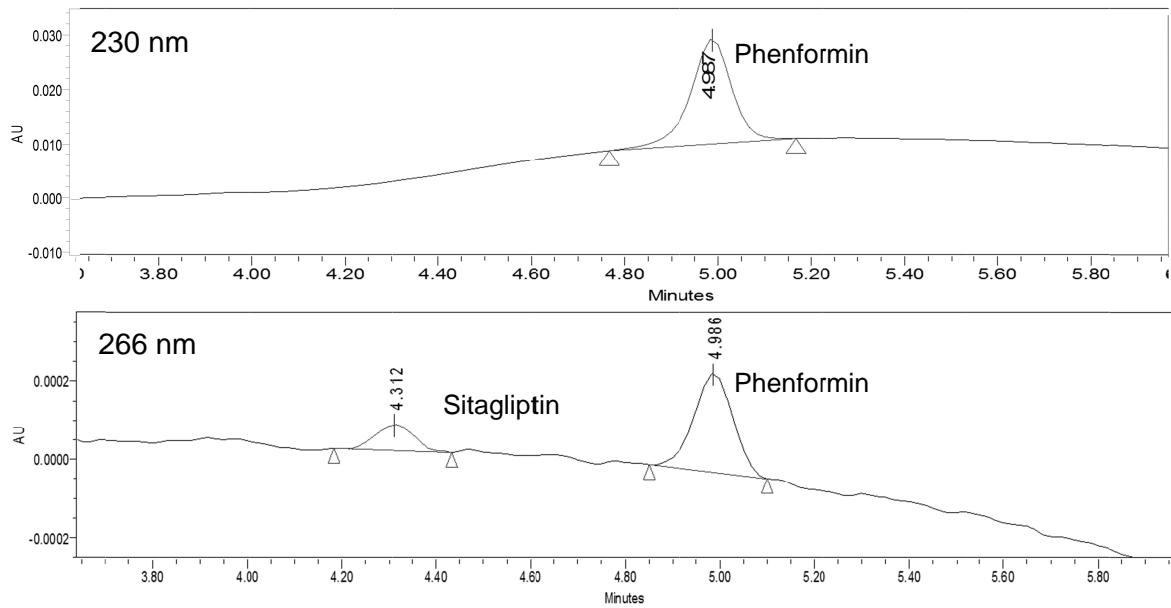
### **1.2.3 Einfluss des Sitagliptins auf die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin**

Um die Konzentrationsbestimmung von Sitagliptin aus demselben Spot, aus dem auch Metformin und Kreatinin extrahiert wurden, mit in die Methode einzuschließen, mussten einige Überlegungen angestellt werden. Da Sitagliptin sein Absorptionsmaximum bei 266 bzw. 267 nm hat [158-160] sollte es bei einer Messwellenlänge von 230 nm nicht bzw. nur sehr schlecht detektierbar sein. Zudem wird für den Analyt als Maximalkonzentration im Plasma  $c = 950 \text{ nM}$  angegeben [117], was einer Konzentration von  $c = 387 \text{ ng/mL}$  entspricht (Einleitung, A4.2.1). Da diese Konzentration sehr niedrig ist, ist eine UV-Detektion unwahrscheinlich. Da aber alle Analyten aus demselben Spot extrahiert wurden und somit nebeneinander in dem Extrakt vorlagen und aus demselben Extrakt vermessen wurden, musste sichergestellt sein, dass Sitagliptin die UV-Detektion nicht beeinflusste. Es wurde eine methanolische Verdünnung von Sitagliptin mit gegebener Methode bei drei Wellenlängen vermessen (Exp. Teil, C2.4). Bei 230 nm war kein Signal zu erkennen. Mit zunehmender Wellenlänge wurde der resultierende Peak immer deutlicher. Sitagliptin hatte als Reinsubstanz in Methanol eine Retentionszeit von  $R_t = 4,3 \text{ min}$  (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Chromatogramme einer methanolischen Verdünnung von Sitagliptin ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ), die bei verschiedenen Wellenlängen (230 nm, 254 nm und 260 nm) aufgenommen wurden, um die Detektionswellenlänge und Retentionszeit des Sitagliptins zu ermitteln. Sitagliptin eluierte nach 4,3 min und konnte mit höherer Wellenlänge (254 nm und 266 nm) umso besser detektiert werden. Mit einer Wellenlänge von 230 nm, wie sie für die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin verwendet wurde, war kein Peak zu sehen.**

Um den Einfluss des Extraktionsverfahrens auf die Retentionszeit des Sitagliptins zu untersuchen, wurde der Analyt in einem Extrakt aus einem Trockenmatrixspot mit PBS-Puffer als Matrix detektiert. Bei einer Messwellenlänge von 230 nm zeigte nur der interne Standard mit einer Retentionszeit von  $R_t = 4,99 \text{ min}$  ein Signal, das auch bei 266 nm detektierbar war. Für Sitagliptin war bei 230 nm kein Signal zu erkennen, bei 266 nm wurde es bei einer Retentionszeit von  $R_t = 4,3 \text{ min}$  detektiert. Sitagliptin eluierte also zeitgleich mit Kreatinin ( $R_t = 4,3 \text{ min}$ ), sodass bewiesen werden musste, dass die Bestimmung des Kreatinins nicht durch Sitagliptin beeinflusst wurde (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Chromatogramme eines Extraktes von Sitagliptin aus einem Trockenmatrixspot mit PBS-Puffer als Matrix ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ), die bei verschiedenen Wellenlängen (230 nm und 266 nm) aufgenommen wurden. Sitagliptin eluierte nach 4,3 min und konnte nur bei einer Wellenlänge von 266 nm detektiert werden. Der interne Standard Phenformin erzeugte bei beiden Wellenlängen ein Signal mit einer Retentionszeit von 4,99 min.**

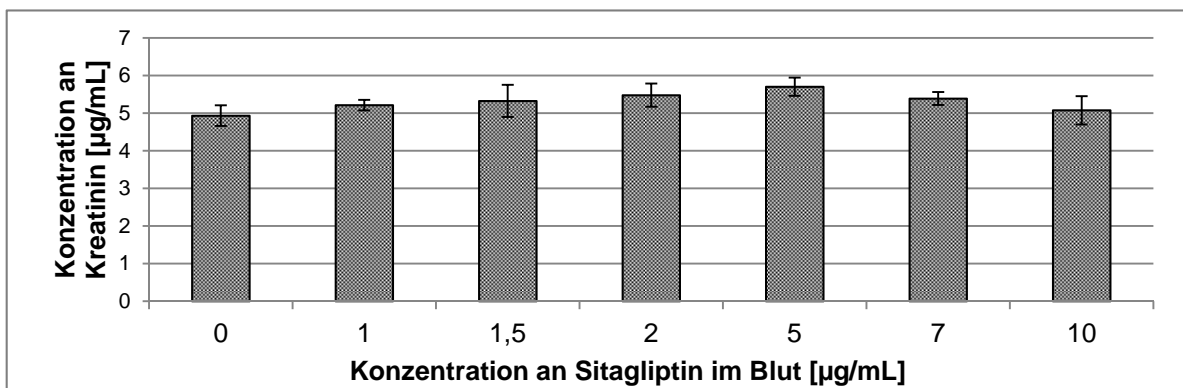
Um die Beeinflussung der Quantifizierung von Metformin und Kreatinin durch Sitagliptin auszuschließen, wurde auf der einen Seite Blut mit allen Analyten (Kreatinin, Metformin, Sitagliptin) versetzt, auf der anderen Seite nur mit Kreatinin und Metformin. In Dreifachbestimmungen wurde gemessen, ob die, über eine Kalibriergerade ( $y = 0,0831x - 0,0156$ ) berechnete Konzentration an Kreatinin in beiden Probenreihen dieselbe war. Für diese Bestimmungen wurde Blut eines Einzelspenders verwendet, sodass es dieselbe endogene Kreatininkonzentration enthielt. Deshalb wurde darauf verzichtet, den endogenen Gehalt von der zugegebenen Menge an Kreatinin abzuziehen. Der Mittelwert für die Probenreihe, in der alle Analyten dem Blut zugegeben wurden, lag bei  $27,28 \pm 2,23 \mu\text{g/mL}$ , der für die, in der nur Metformin und Kreatinin zugegeben wurde, bei  $26,90 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$  (Tabelle 3).



**Tabelle 3: Kreatininkonzentration in den Proben, denen Sitagliptin zugesetzt wurde gegenüber den Proben ohne eine Zugabe von Sitagliptin.** Es wurde die in den Proben enthaltene Konzentration an Kreatinin über eine Kalibriergerade ( $y = 0,0831x - 0,0156$ ) berechnet und anschließend die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und relative Standardabweichungen (RSD) bestimmt.

	Gehalt an Kreatinin [ $\mu\text{g/mL}$ ]	
	alle Analyten zugegeben	nur Metformin und Kreatinin zugegeben
Probe 1	24,13	25,71
Probe 2	28,72	27,14
Probe 3	29,00	27,86
MW	27,28	26,90
SD	2,23	0,89
RSD	8,18 %	3,31 %

Die Mittelwerte zeigten eine Präzision von 101,4 %, was nahelegte, dass bei einer Konzentration von  $c = 1 \mu\text{g/mL}$  Sitagliptin im Blut keine Beeinflussung der Bestimmung der Kreatininkonzentration stattfand. Um alle Zweifel auszuräumen, wurde untersucht, ab welcher Sitagliptinkonzentration die Kreatininbestimmung beeinflusst wurde. Dazu wurde das Blut eines Spenders mit verschiedenen Konzentrationen an Sitagliptin versetzt ( $c = 0 - 10 \mu\text{g/mL}$ ; je  $n = 3$ ) und der endogene Kreatiningehalt bestimmt (Kalibriergerade:  $y = 0,1238x - 0,0998$ ) (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Sitagliptin auf die Konzentrationsbestimmung von Kreatinin mittels HPLC-UV Analytik.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Konzentrationen ( $\pm$  Standardabweichung) an Kreatinin ( $n = 3$ ), die bestimmt wurden, wenn zusätzlich verschiedene Konzentrationen an Sitagliptin ( $c = 0 - 10 \mu\text{g/mL}$ ) in der Probe enthalten waren.

Für alle Bestimmungen wurde eine mittlere Kreatininkonzentration von  $c = 5,3 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$  gemessen. Die relative Standardabweichung betrug 7,12 %. Die Mittelwerte unterschieden sich nicht statistisch signifikant (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

Daraus konnte geschlossen werden, dass selbst bei einer Sitagliptinkonzentration von  $c = 10 \mu\text{g/mL}$  im Blut, eine Konzentration, die therapeutisch nicht erreicht wird, keine Beeinflussung der Kreatininquantifizierung stattfand. Die entwickelte Methode konnte aus diesem Grund beibehalten werden, auch wenn Sitagliptin im Blut vorhanden war.

## 1.2.4 Entwicklung der LC-MS/MS-Methode

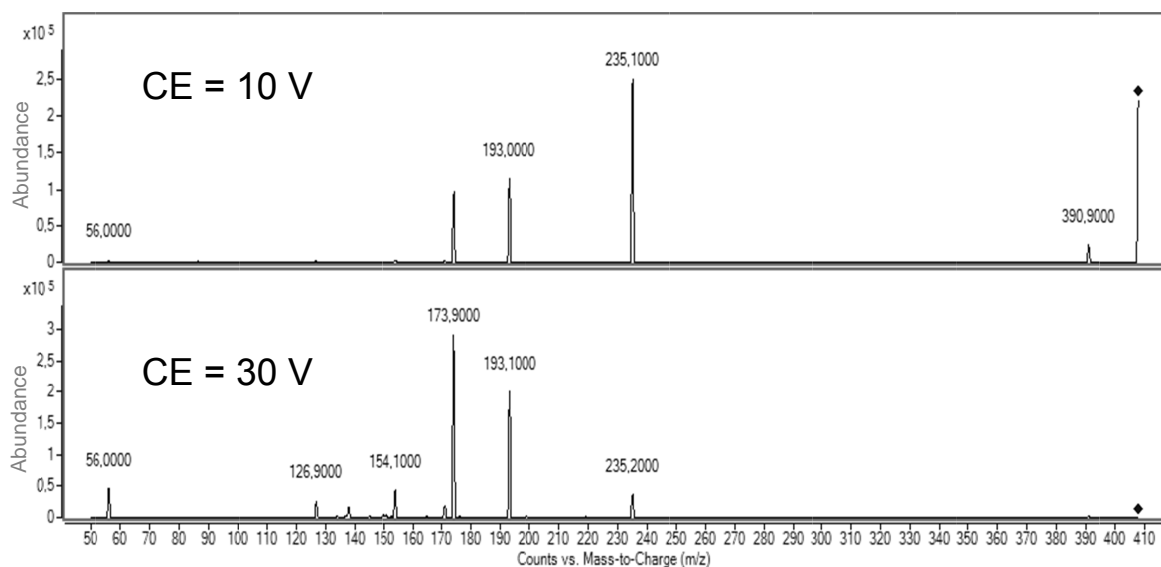
### 1.2.4.1 Entwicklung der MRM-Methoden aus Reinsubstanzen

Um Sitagliptin mittels einer LC-MS/MS Methode zu quantifizieren, wurden im ersten Schritt die Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Methoden für Sitagliptin und den internen Standard Sitagliptin-d4 entwickelt (Exp. Teil, C2.5.1.1).

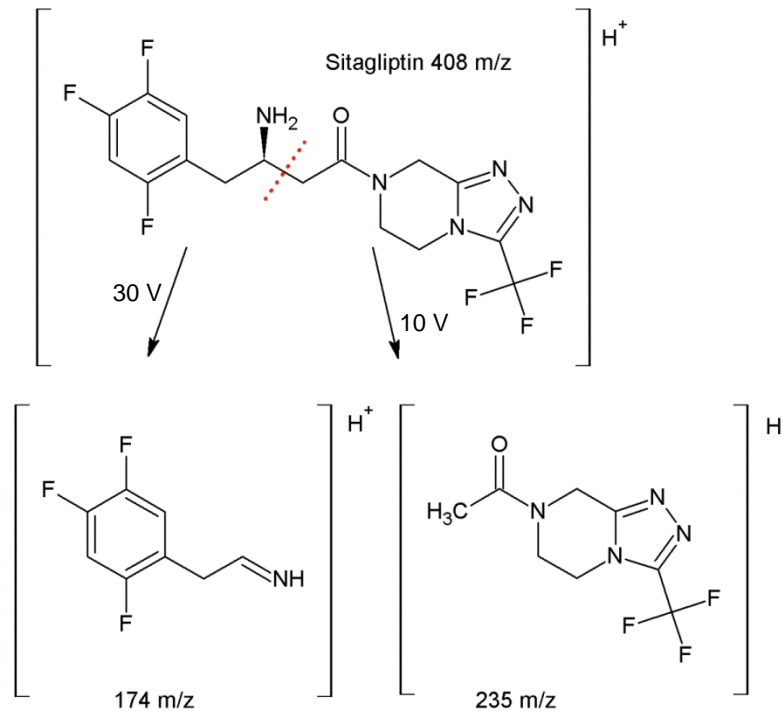
Das intensivste Mutterion wurde im Elektrospray-Ionisation (ESI) positiven Modus mit einer Masse von  $408,000 \text{ m/z}$  bei einer Fragmentorspannung von  $FV = 150 \text{ V}$  gefunden.

Die zwei intensivsten Tochterionen waren für eine Kollisionsenergie (CE) von  $10 \text{ V}$  das Ion mit dem Masse-Ladungsverhältnis von  $235 \text{ m/z}$  und für eine CE von  $30 \text{ V}$  das Ion mit  $174 \text{ m/z}$  (Abbildung 25).

Die Strukturen der entstandenen Fragmente sind in Abbildung 26 dargestellt [137, 161].



**Abbildung 25: Produktions Scan von Sitagliptin in Methanol im ESI positiven Modus bei verschiedenen Kollisionsenergien (CE).** Die entstehenden intensivsten Tochterionen hatten Massen-Ladungsverhältnisse von  $235,1 \text{ m/z}$  bei einer Kollisionsenergie von  $10 \text{ V}$  und  $173,9 \text{ m/z}$  bei  $30 \text{ V}$ .



**Abbildung 26:** Die intensivsten Tochterionen des Sitagliptins im ESI positiven Modus, die aus dem Mutterion 408 m/z entstehen, wenn eine CE von 10 V (235 m/z) bzw. 30 V (174 m/z) eingesetzt wurde.

Mit Kenntnis der zwei intensivsten Übergänge,  $408 \rightarrow 235$  m/z bzw.  $408 \rightarrow 174$  m/z wurde im Anschluss die Multiple-Reaction-Monitoring Methode aufgesetzt. Nach einer weiteren Optimierung der Kollisionsenergie wurden die intensivsten Signale für den Übergang  $408 \rightarrow 235$  m/z bei einer CE von 13 V und für  $408 \rightarrow 174$  m/z bei 27 V erhalten. Für die cell accelerator voltage (CAV) war das Signal beider Übergänge bei einer Spannung von 4 V am intensivsten.

Die MRM-Methode wurde auf eine methanolische Lösung, die Sitagliptin sowie Sitagliptin-d4 in einer Konzentration von jeweils 1 µg/mL enthielt, angewandt.

Aufgrund der vier eingeführten Deuterium-Atome hatte Sitagliptin-d4 im ESI positiven Modus eine Masse von 412 m/z (Abbildung 27). Die Übergänge für Sitagliptin-d4 waren deshalb  $412 \rightarrow 239$  m/z und  $412 \rightarrow 174$  m/z.

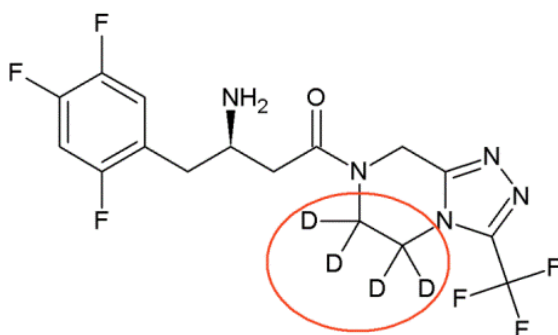


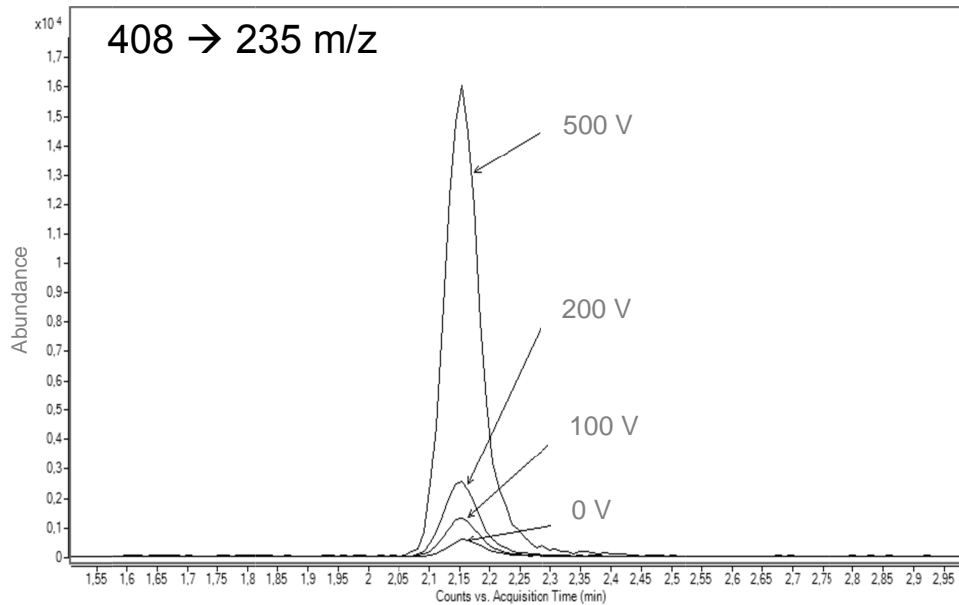
Abbildung 27: Struktur des internen Standards Sitagliptin-d4.

#### 1.2.4.2 Entwicklung der HPLC-Methode und der Quellenparameter für den Tripelquadrupol aus Matrixproben

Die extrahierten Proben wurden mit verschiedenen Fließmittelgradienten (Exp. Teil, C2.5.2; Tabelle 39) und den entwickelten MRM-Methoden (Allg. Teil, B1.2.4.1) vermessen, die beste Empfindlichkeit konnte mit dem in Tabelle 39 mit D (Exp. Teil, C2.5.2) bezeichnetem Gradienten erhalten werden.

Da die Messmethode maximal empfindlich sein musste, wurden zuerst die Optionen der MRM-Methode optimiert. Dazu zählte die Auflösung, die Dwell time und das  $\Delta$ EMV (electron multiplier voltage). Das  $\Delta$ EMV ist die Spannung, die zusätzlich auf den Elektronmultiplier gegeben wird, um das Signal zu verstärken. Die Auflösung wird definiert durch die MS1 (Quadrupol 1 = Q1) und MS2 (Quadrupol 3 = Q3) Resolution. Diese können jeweils die Werte „unit“, „wide“ und „widest“ annehmen und sagen etwas darüber aus, wie viele Ionen durch die Quadrupole hindurch gelassen werden. Die Dwell time bezeichnet die Zeit, die der Tripelquadrupol zur Verfügung hat, um sich auf einen Übergang zu fokussieren. Dies ist vor allem ein wichtiger Parameter bei konkurrierenden Übergängen, also Übergängen, die zeitgleich gemessen werden müssen. Optimal ist es, wenn pro Übergang 20 Datenpunkte aufgezeichnet werden. Ist die Dwell time zu lange, werden zu wenige, ist sie zu kurz, werden zu viele Datenpunkte aufgezeichnet. Werden zu viele Datenpunkte aufgezeichnet, verschlechtert sich dadurch die Empfindlichkeit, werden aber zu wenige aufgezeichnet, ist keine Reproduzierbarkeit mehr gegeben.

Der Einfluss des  $\Delta$ EMV auf die Signalintensität war beträchtlich. Mit höherem  $\Delta$ EMV kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Signals (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Einfluss des  $\Delta\text{EMV}$  auf die Empfindlichkeit.** Mit steigendem  $\Delta\text{EMV}$  kam es zu einem intensiveren Signal, was exemplarisch für den Übergang  $408 \rightarrow 235 \text{ m/z}$  dargestellt ist.

Das Signal für den Übergang  $408 \rightarrow 235 \text{ m/z}$  wurde um den Faktor 29 erhöht, wenn  $\Delta\text{EMV}$  von 0 V auf 500 V erhöht wurde. Neben dem Signal für die Analyten wurde bei Erhöhung von  $\Delta\text{EMV}$  aber auch das Signal für den Hintergrund erhöht, sodass auch das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) betrachtet werden musste, um festzustellen, welches die beste Variation war. Für ein  $\Delta\text{EMV}$  von 500 V war das Signal am intensivsten sowie auch das SNR des Übergangs  $408 \rightarrow 235 \text{ m/z}$  am höchsten, sodass dies die optimale Variante darstellte. Für ein  $\Delta\text{EMV}$  von 100 V war eine deutliche Verschlechterung des SNR eingetreten, woraus geschlossen werden konnte, dass durch eine Erhöhung des  $\Delta\text{EMV}$  nicht unbedingt auch eine bessere Empfindlichkeit gegeben war (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Einfluss des  $\Delta\text{EMV}$  (electron multiplier voltage) auf die Höhe sowie das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) des Signals.** Das  $\Delta\text{EMV}$  stellt dabei die Spannung dar, die zusätzlich auf den Elektronmultiplier gegeben wird, um das Signal zu intensivieren. Die optimale Variante ist durch die graue Unterlegung gekennzeichnet.

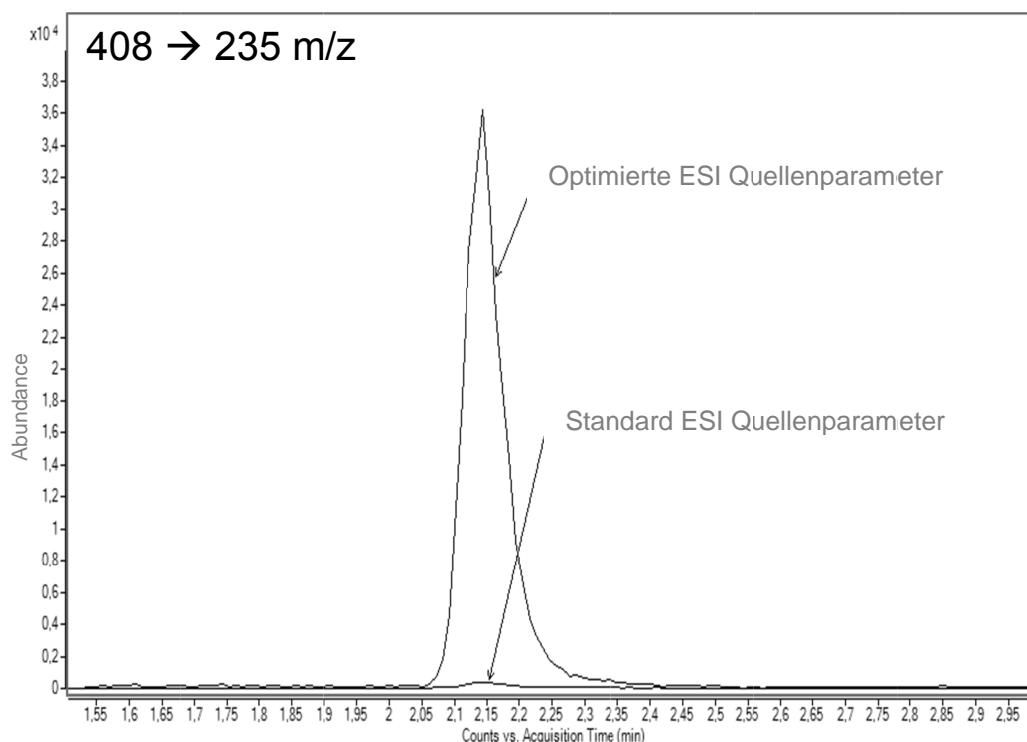
$\Delta\text{EMV}$ [V]	Höhe des Signals	SNR
0	580	268,5
100	1258	199,6
200	2492	203,9
500	16002	324,6

Für eine Dwell-time von 150 ms wurden zwischen 17 – 20 Datenpunkte pro Übergang gezählt, was einen idealen Wert darstellt.

Beim Vergleich der verschiedenen MS1- bzw. MS2-Resolution Kombinationen war die Kombination Wide-Widest diejenige, die trotz eines hohen Hintergrundsignals eine hohe SNR zeigte und somit zum besten Ergebnis führte.

Die Optimierung der Quellenparameter wurde, wie in Exp. Teil, C2.5.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Analyten konnten am empfindlichsten erfasst werden, wenn die Kapillarspannung 4000 V und die Nozzle Voltage 500 V betrug. Die Nebulizer-Einstellung lag bei 35 psi, die Drying Gas Temperatur bzw. der Fluss bei 250 °C bzw. 7 L/min. Die Sheath Gas Temperatur lag bei 350 °C, der Sheath Gas Fluss bei 10 L/min.

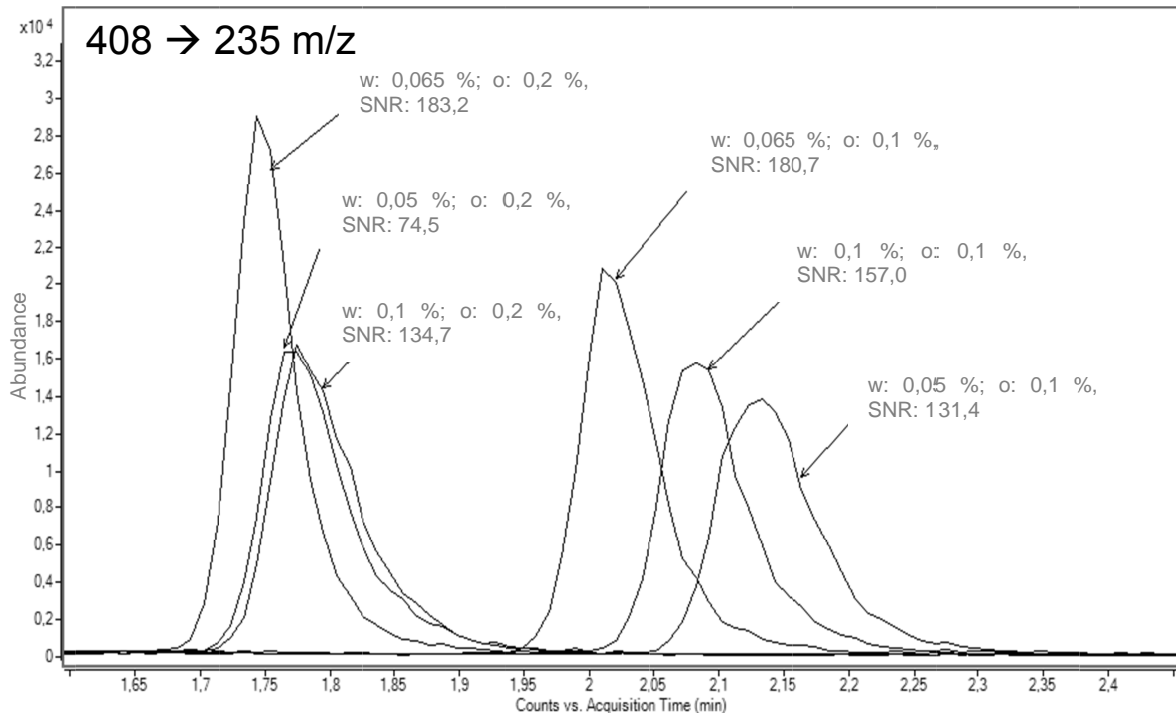
Verglich man das Signal, das mit der Standardmethode für die ESI Quellenparameter (Exp. Teil, C2.5.2.2, Tabelle 40) gegenüber den optimierten Einstellungen für Sitagliptin (408 → 235 m/z) erreicht wurde, so ist eine Signalintensivierung um den Faktor 43 erreicht worden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Vergleich der Intensität des Signals (408 → 235 m/z) für Sitagliptin, wenn der Analyt mit den optimierten und den Standard ESI Quellenparametern vermessen wurde.**

Des Weiteren wurde die Fließmittelzusammensetzung, die einen Einfluss auf die Ionisierbarkeit der Analyten hat, optimiert. Alle bisherigen Versuche wurden mit 5 mM Ammoniumformiatpuffer mit 0,065 % Ameisensäure als wässriger und Acetonitril als organischer mobiler Phase durchgeführt. Als optimal für Sitagliptin erwiesen sich

5 mM Ammoniumformiatpuffer, dem 0,065 % Ameisensäure zugesetzt waren, als wässrigem Fließmittel sowie mit Acetonitril mit dem Zusatz von 0,2 % Ameisensäure als organischem Fließmittel. Mit dieser Fließmittelzusammensetzung erhielt man die größte Empfindlichkeit des Signals sowie auch das beste Signal-Rausch-Verhältnis (Abbildung 30).

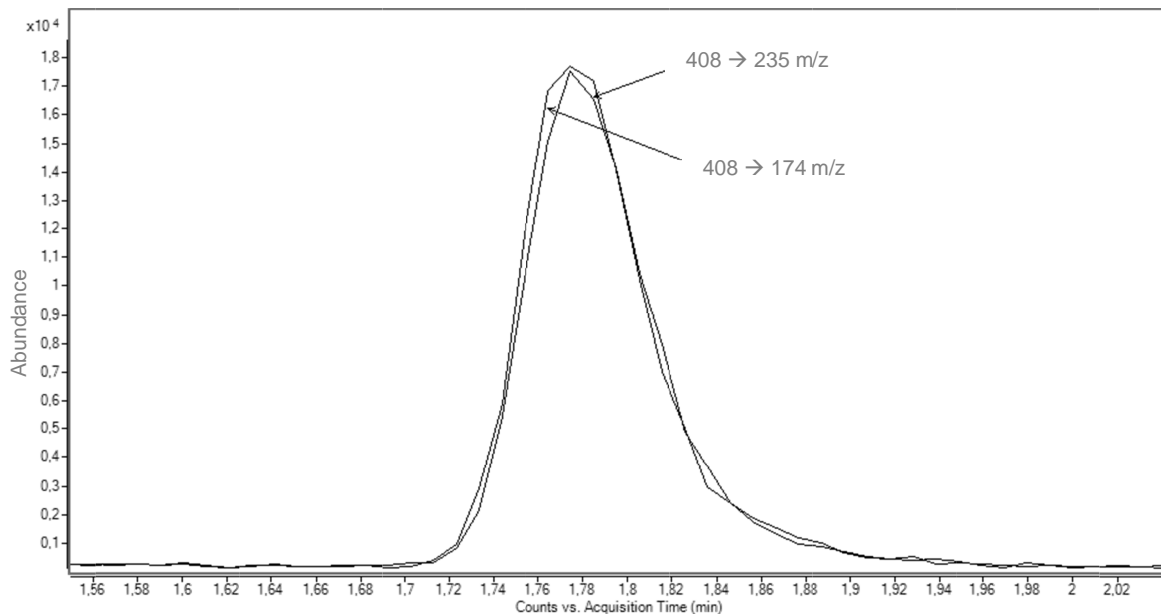


**Abbildung 30: Einfluss des Fließmittels auf die Empfindlichkeit der Methode.** Die wässrige Phase (w) war ein 5 mM Ammoniumformiatpuffer mit Ameisensäure in der in % angegebenen Konzentration, die organische Phase (o) Acetonitril mit Ameisensäure in der in % angegebenen Konzentration. SNR stellte das Signal-Rausch-Verhältnis dar.

Da aus einem Dried-Blood-Spot drei Analyten mit zwei unterschiedlichen analytischen Methoden quantifiziert wurden, gab es erhebliche Einschränkungen für die Injektionsvolumina. Die HPLC-UV Analytik benötigte zum Erreichen eines ausreichenden LLOQs ein Injektionsvolumen von 100  $\mu$ L (Allg. Teil, B1.2.2.5). Für die LC-MS/MS Analytik sollte somit ein minimales Injektionsvolumen mit hinreichender Nachweisgrenze ermittelt werden, da für diese Analytikmethode nur 10  $\mu$ L Extrakt zur Verfügung standen. Die Empfindlichkeit des Signals war für ein Injektionsvolumen von 3  $\mu$ L aber nur unwesentlich verringert im Vergleich zu 5  $\mu$ L, sodass 3  $\mu$ L gewählt wurden, um die Möglichkeit zu haben, Proben doppelt zu vermessen.

Für die Quantifizierung des Analyten sollte festgelegt werden, welcher Übergang als Quantifier und welcher als Qualifier verwendet wurde. Bei der Vermessung der Proben war kein wesentlicher Unterschied in der Empfindlichkeit zu sehen (Abbildung 31), sodass

der Übergang  $408 \rightarrow 174$  m/z als Quantifier und  $408 \rightarrow 235$  m/z als Qualifier genutzt wurde.



**Abbildung 31: Empfindlichkeit der beiden Übergänge ( $408 \rightarrow 174$  m/z und  $408 \rightarrow 235$  m/z) des Sitagliptins.**

Der interne Standard sollte an die Konzentration des Analyten angepasst werden, um ein möglichst ähnliches Verhalten zu gewährleisten. Für die Quantifizierung mittels eines Tripelquadrupols ist für den jeweiligen Stoff ein stabiler, isotopenmarkierter interner Standard zu empfehlen, da dieser die identischen Eigenschaften zeigt [34, 53, 162, 163]. Für Sitagliptin wurde aus diesem Grund Sitagliptin-d4 verwendet. Beim Vergleich der vermessenen Verdünnungsreihen (Exp. Teil, C2.5.2.6) war zwischen den verschiedenen Konzentrationen des internen Standards hinsichtlich der jeweiligen Linearität der Probenreihe kein Unterschied sichtbar, sodass  $V_{3S}$  mit  $c = 100$  ng/mL (0,8 ng/Spot) Sitagliptin-d4 als internem Standard beibehalten wurde.

### 1.2.5 Diskussion

Für Metformin und Kreatinin sind in der Literatur HPLC Methoden beschrieben, bei denen die Analyse der einzelnen Substanzen auf RP-Säulen durchgeführt wurde [81, 82, 90, 136, 146, 147, 164]. Die Retentionszeiten waren in allen Anwendungen eher kurz (0,59 – 5,5 min), was durch die hohe Hydrophilie der Analyten zu erklären ist. Aufgrund dessen konnte eine Trennung der Substanzen auf C18 Säulen nicht erreicht werden und es sind auch keine Methoden publiziert, die Kreatinin und Metformin auf Umkehrphasen voneinander trennen. Aus diesem Grund wurde die Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie (Allg. Teil, B1.2.1.1) gewählt. Für dieses Trennprinzip sind sowohl für



Metformin [141, 142, 165], als auch für Kreatinin [166, 167] Methoden zur Quantifizierung beschrieben. Mit der genutzten Phenomenex Luna<sup>®</sup> HILIC konnte sehr schnell eine gute Trennung der Substanzen, mit Retentionszeiten für Kreatinin, Metformin und dem internen Standard Phenformin von  $R_t = 4,4$  min, 5,9 min bzw. 5,0 min, erreicht werden. Der Vorteil, polare Analyten unter Verwendung von Wasser mit Acetonitril als Fließmittel zu trennen, wurde in der entwickelten Methode somit ausgenutzt [142]. Auch Sitagliptin als polarer Arzneistoff war geeignet für dieses Trennprinzip ( $R_t = 1,7$  min) und konnte quantifiziert werden.

Zur Quantifizierung der drei Analyten aus Plasmaproben sind verschiedene Methoden publiziert. Als Detektoren werden hierbei sowohl MS/MS-Detektoren [141, 143, 147, 161, 168-170], als auch für Metformin und Kreatinin UV-Detektoren eingesetzt [94, 95, 144, 171]. In dieser Arbeit wurden die Arzneistoffe sowie Kreatinin im Vollblut (Kapillarblut) quantifiziert. Plasma ist aus analytischer Sicht einfacher zu handhaben als Kapillarblut, da meist ein größeres Volumen (100  $\mu$ L – 1 mL) zur Verfügung steht und im Vergleich weniger störende Matrixbestandteile, wie z. B. Hämoglobin vorhanden sind, für die eine sehr gründliche Aufreinigung notwendig ist [19, 94, 143, 144, 168, 172]. Da für Kapillarblutproben das Probenvolumen im Bereich weniger Mikroliter liegt, werden zur Analyse sehr empfindliche Methoden benötigt [23, 27, 50]. Reddy et al. haben 2014 Metformin und Sitagliptin simultan aus Plasma mit Hilfe einer LC-MS/MS-Methode bestimmt [168]. Für die gleichzeitige Bestimmung beider Analyte wurde 2011 auch eine Methode aus humanen Dried-Blood-Spots publiziert [137]. Hierbei wurde eine LDTD (Laser Diode Thermal Desorption) tandem MS Analytik verwendet. Der LLOQ – Wert in humanen Proben lag für Metformin und Sitagliptin jeweils bei 5 ng/mL [137]. Die Methode war für Metformin also deutlich empfindlicher als in der vorliegenden Arbeit (0,2  $\mu$ g/mL; Allg. Teil, B1.4), was auf die wesentlich unempfindlichere HPLC-UV Analytik zurückzuführen ist. Dieser LLOQ war aber ausreichend, um Patientenproben zu quantifizieren, da der therapeutische Bereich des Metformins im Vollblut bei  $1,3 \pm 0,8$  mg/L [109] und somit weit über dem LLOQ unserer Methode liegt. Der LLOQ - Wert für Sitagliptin der entwickelten Methode lag bei 3 ng/mL (Allg. Teil, B1.4) und war somit etwas empfindlicher als in der von Swales et al. publizierten Methode [137]. Für Metformin wurde zudem schon 2006 von AbuRuz et al. eine Dried-Blood-Spot Methode publiziert, in welcher eine RP-HPLC mit UV-Detektor genutzt wurde [136]. Der LLOQ – Wert lag bei 0,15  $\mu$ g/mL, was vergleichbar mit dem in der vorliegenden Arbeit ermitteltem LLOQ ist [136].

Keevil et al. publizierten 2002 eine Methode zur Bestimmung von Kreatinin aus Kapillarblut mit Hilfe einer LC-MS/MS Analytik, allerdings ohne das Blut vorher zu

trocknen [173]. Kreatinin wurde hier durch das Messen des Verhältnisses zwischen Kreatinin und dem internen Standard d3-Kreatinin quantifiziert, mit einem LLOQ von 2,3 µg/mL (20 µmol/L) [173]. Trotz massenspektrometrischer Detektion erreichten Keevil et al. keine empfindlichere Methode, als die in vorliegender Arbeit vorgestellte UV-Detektion. Methoden für Dried-Blood-Spot Analytik für Kreatinin sowohl aus Kapillar- als auch aus venösem Vollblut wurden ebenfalls publiziert [46, 92, 93]. Koop et al. erreichten einen LLOQ – Wert von 0,01 mg/dL (0,1 µg/mL) [92], Koster et al. von 1,0 µmol/L (0,11 µg/mL) mit Tritium-markiertem Kreatinin [93]. In beiden Veröffentlichungen wurde eine LC-MS/MS-Methode verwendet, sodass die hohe Empfindlichkeit gegenüber vorliegender Methode, die mittels HPLC-UV einen LLOQ – Wert von 1,5 µg/mL (Allg. Teil, B1.4) erreichte, erklärt werden konnte. Da die Normwerte der Kreatininspiegel im Plasma je nach Messmethode für Frauen bei 0,47 – 1,17 mg/dL (4,7 – 11,7 µg/mL), für Männer bei 0,55 – 1,44 mg/dL (5,5 – 14,4 µg/mL) liegen [78], was deutlich höher als der LLOQ der eigenen Methode ist, war die kleinste zu quantifizierende Konzentration von 1,5 µg/mL vollkommen ausreichend. Analytische Methoden, die Metformin, Kreatinin und Sitagliptin gemeinsam aus einer biologischen Matrix quantifizieren, sind nicht publiziert. Mit der hier entwickelten Methode konnten somit zum ersten Mal Metformin und Sitagliptin als orale Antidiabetika gleichzeitig mit Kreatinin, einem Marker für die Nierenfunktion, aus Kapillarblut quantifiziert werden.

### **1.3 Vergleich der Dried Blood Spot-Karten und Blotting Papier als Träger des Trockenblutes**

#### **1.3.1 Ergebnisse**

Um festzustellen, ob die Analyten auf dem Blotting Papier, das in dieser Arbeit als Träger verwendet wurde, dieselben Eigenschaften aufzeigten, wie auf den für die DBS-Analyse eigens dafür hergestellten, sogenannten Dried-Blood-Spot-Karten (Exp. Teil, C2.1.4), wurde jeweils eine Kalibriergerade vermessen und diese für Metformin, Sitagliptin und Kreatinin miteinander verglichen. Aufgrund von Matrixknappheit wurden die Versuche nur einmal durchgeführt.

Der Vergleich der Steigungen der Kalibriergeraden zeigte, dass diese für Metformin zwischen Blotting Papier und den Karten nur zu 69,05 % übereinstimmten, für Kreatinin sogar nur zu 58,88 %, wobei jeweils die Kalibriergerade auf Blotting Papier die steilere Steigung aufwies (Abbildung 32). Obwohl bei der Handhabung keine Unterschiede zwischen Blotting Papier und den DBS-Karten auffällig waren, bewies dies, dass sich Metformin und Kreatinin darauf unterschiedlich verhielten, sodass die Trägermaterialien hierfür nicht austauschbar waren. Vergleich man die Steigungen der Kalibriergeraden des

Sitagliptins bezüglich des Trägermaterials miteinander, so war zu erkennen, dass diese zu 101,11 % übereinstimmten. Sitagliptin zeigte somit auf beiden Trägermaterialien identisches Verhalten (Abbildung 32). Daher wurden für alle weiteren Versuche das Blotting Papier als Träger für die Trockenblutspots eingesetzt.

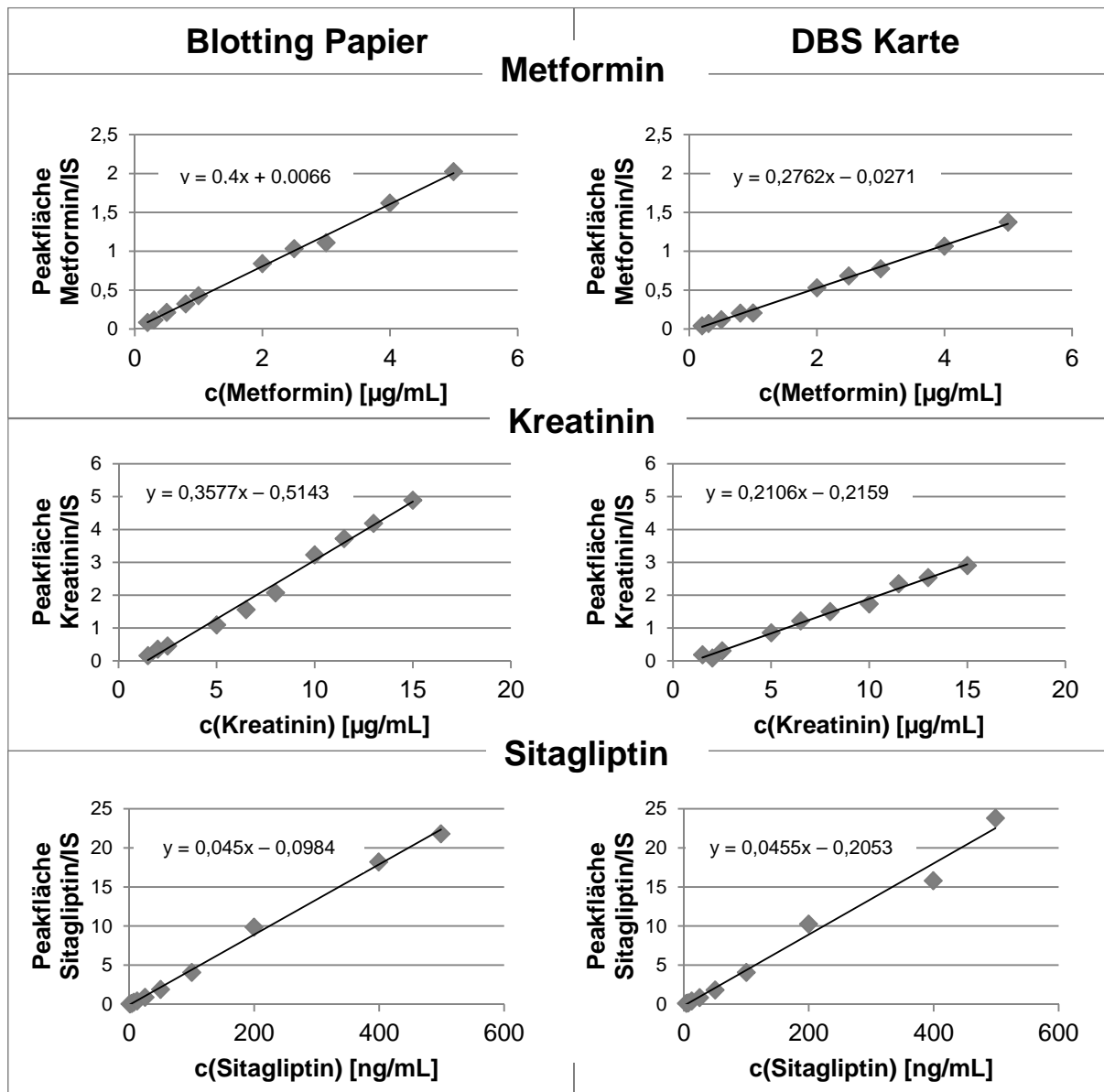


Abbildung 32: Vergleich der Kalibriergeraden von Metformin, Kreatinin und Sitagliptin jeweils auf Blotting Papier und DBS-Karten der Firma Perkin-Elmer als Träger der Trockenblutspots.

### 1.3.2 Diskussion

Es gibt eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Trockenblutträgern, welche Unterschiede hinsichtlich ihres Materials und ihrer Eigenschaften, wie z. B. der Spreitbarkeit oder Porengröße aufzeigen (Einleitung, A2.2). Auch Träger aus demselben Material können sich deshalb unterschiedlich verhalten. Mei et al. publizierten 2001, dass

die Dried-Blood-Spot Träger dieselben Anforderungen an Präzision und Reproduzierbarkeit erfüllen müssen, wie man es auch von Tubes und Kapillarpipetten kennt, die für Standardmethoden der Blutabnahme verwendet werden [28]. Nur zwei kommerziell erhältliche Cellulose-Träger, Whatman 903 und Ahlstrom 226, sind bisher von der FDA als Klasse-II Medizinprodukt registriert [32]. Luckwell et al. untersuchten 2013 vier verschiedene Cellulose-basierte Kartentypen mit sechs verschiedenen Analyten hinsichtlich der Spotgröße und den analytischen Daten [32, 174]. Im Gegensatz zu den in Allg. Teil, B1.3.1 vorgestellten Ergebnissen, dass abhängig vom Analyt die Träger nicht ausgetauscht werden können, wurden in oben genanntem Versuch keine Unterschiede festgestellt [174]. Wichtig für die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von Analyten aus Dried-Blood-Spots ist somit die Untersuchung des Trägermaterials. Es muss ein auf den/die Analyten angepasstes Trägermaterial gefunden werden, das eine präzise und reproduzierbare Analytik ermöglicht.

## **1.4 Methodvalidierung**

Angelehnt an die Richtlinien der FDA und der EMA für bioanalytische Methodvalidierung [53, 54] wurde die Messmethode validiert (Einleitung, A2.5).

### **1.4.1 Ergebnisse**

#### **1.4.1.1 Unterschiede beim Auftragen des Blutes mit einer Pipette gegenüber einer Kapillare**

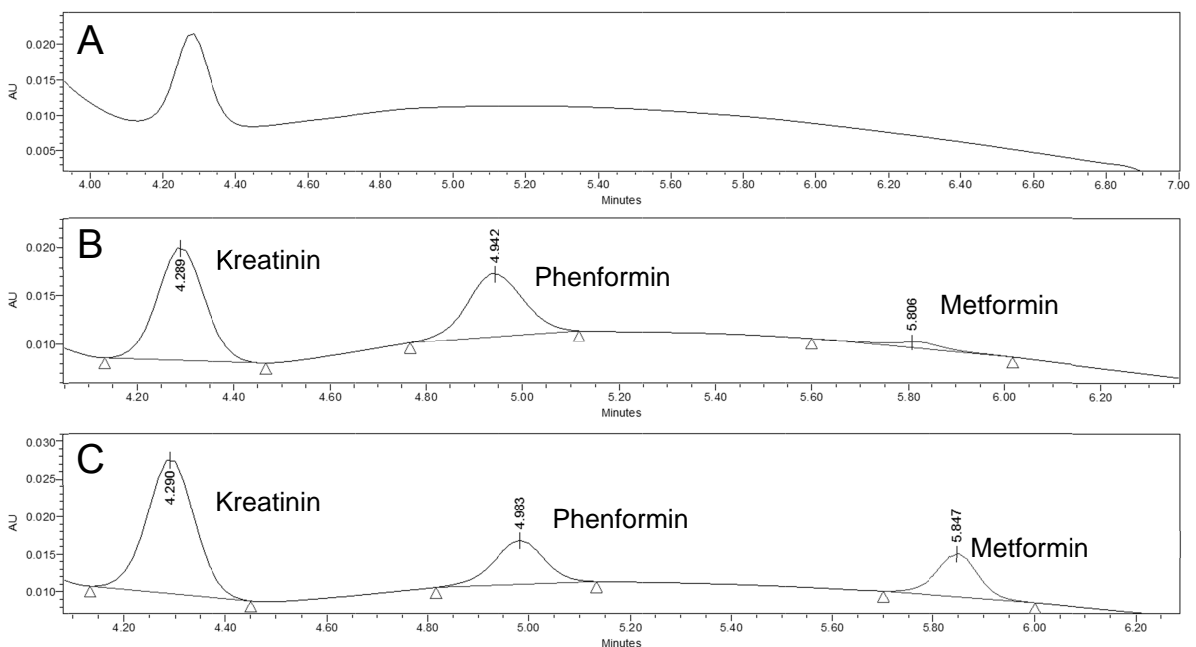
In den Quotienten Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard, die bestimmt wurden, wenn das Blut mit Delbrück-Kapillaren (Exp. Teil, C2.7.2) und Eppendorfpipetten aufgetragen wurden, war weder für die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen für Kreatinin, noch für Metformin oder Sitagliptin für eine der gemessenen Konzentrationen ein Unterschied zu erkennen. Die Übereinstimmungen der gemessenen Werte reichten von 91,96 % für die niedrige Konzentration des Sitagliptins bis hin zu 107,24 % für die hohe Konzentration des Kreatinins (Tabelle 5). Aus diesem Grund konnte das Blut für die Validierung, wie auch für die Kalibriergeraden zur Quantifizierung mit Eppendorfpipetten gespottet werden.

**Tabelle 5: Ergebnisse des Vergleichs Auftragen des Blutes mit einer Delbrück-Kapillare im Gegensatz zum Auftragen mit einer Eppendorfpipette für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin.** Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte (MW) ( $\pm$  Standardabweichung (SD)) ( $n = 3$ ) der Quotienten Fläche Analyt/Fläche IS.

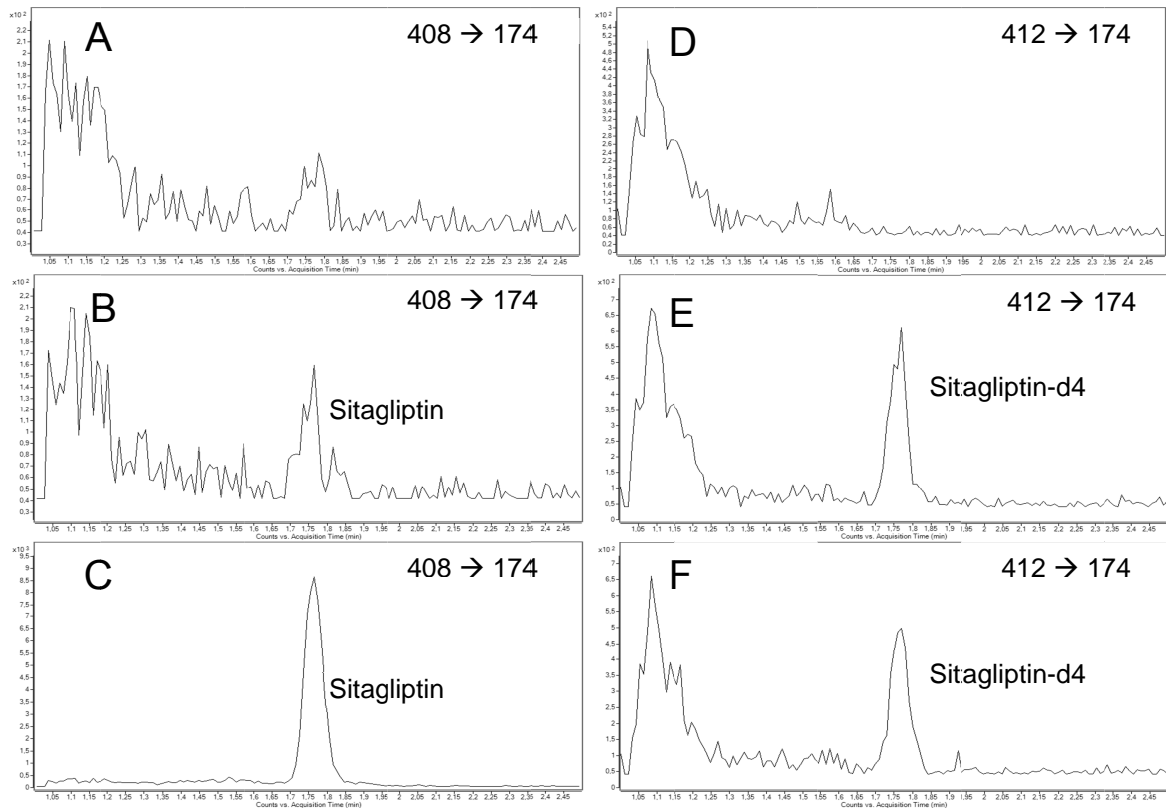
	Blutkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Quotient Peakfläche (Analyt/interner Standard) (MW $\pm$ SD)	
		Eppendorfpipette	Delbrück-Kapillare
		Metformin	0,2
	5,0	2,315 $\pm$ 0,136	2,241 $\pm$ 0,064
Kreatinin	1,5	0,883 $\pm$ 0,010	0,835 $\pm$ 0,052
	11,5	3,680 $\pm$ 0,175	3,947 $\pm$ 0,243
Sitagliptin	0,003	0,347 $\pm$ 0,010	0,319 $\pm$ 0,030
	0,400	28,142 $\pm$ 0,790	27,518 $\pm$ 0,516

#### 1.4.1.2 Selektivität

Bei keinem der sechs getesteten Einzelspender zeigte sich eine Überlagerung der Signale der Analyten und auch keine Überlagerung der Analytsignale mit Signalen aus der Matrix. Beispielhaft sind nachfolgend für einen Einzelspender anhand einer Blank-, einer Lower Limit of Quantification (LLOQ)- (Exp. Teil, C2.7.5) und einer High Quality Control (QC)-Probe Chromatogramme, sowohl für die HPLC-UV, als auch die LC-MS/MS Methode dargestellt (Abbildung 33; Abbildung 34).



**Abbildung 33: Selektivität für Metformin und Kreatinin.** Dargestellt ist für einen Einzelspender eine Blank Probe (A), eine LLOQ-Probe (B) und eine High QC-Probe (C). Die Signale der Analyten Kreatinin und Metformin und des internen Standards Phenformin zeigten dabei keine Überlagerung mit den jeweilig anderen Signalen bzw. mit Signalen aus der Matrix. Die Proben wurden mittels HPLC-UV Analytik bestimmt.



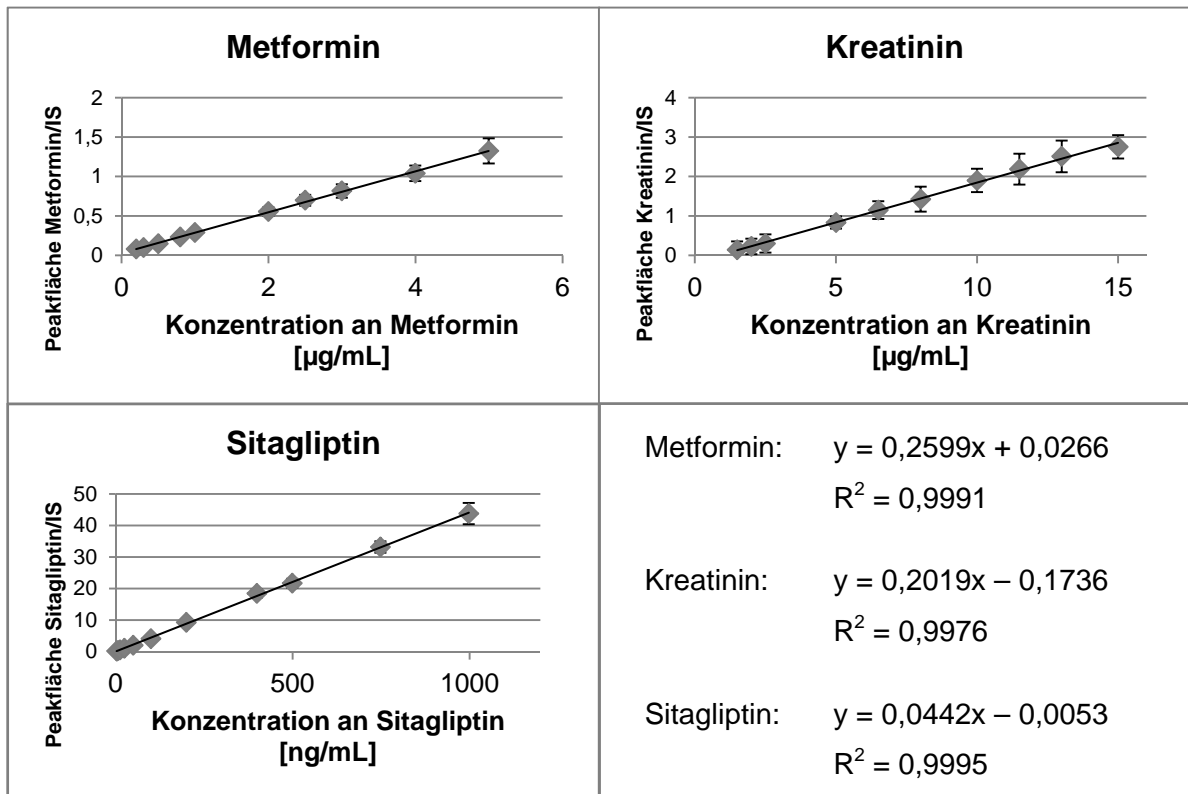
**Abbildung 34: Selektivität für Sitagliptin.** Dargestellt ist für einen Einzelspender eine Blank Probe (A/D), eine LLOQ-Probe (B/E) und eine High QC-Probe (C/F) für Sitagliptin (A/B/C) und Sitagliptin-d4 (D/E/F). Die Signale des Sitagliptins und des internen Standards zeigten keine Überlagerung mit Matrixbestandteilen und die Methode gilt somit als selektiv. Die Proben wurden mittels LC-MS/MS Analytik bestimmt.

### 1.4.1.3 Kalibrierfunktion

#### *Linearität*

Die Metforminkonzentration war über den Bereich von 0,2 µg/mL bis 5 µg/mL, Kreatinin von 1,5 µg/mL bis 15 µg/mL und Sitagliptin von 3 ng/mL bis 1000 ng/mL linear (Abbildung 35).

Der Mittelwert ( $\pm$  SD; n = 5) der Steigung für Metformin lag bei  $0,260 \pm 0,03$ , für Kreatinin bei  $0,202 \pm 0,03$  und für Sitagliptin bei  $0,044 \pm 0,003$ . Der Korrelationskoeffizient ( $\pm$  Standardabweichung; n = 5) für Metformin, Kreatinin bzw. Sitagliptin war  $0,998 \pm 0,002$ ,  $0,996 \pm 0,001$  bzw.  $0,999 \pm 0,0004$ .



**Abbildung 35: Kalibriergeraden für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin.** Die Punkte sind die berechneten Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus den Einzelbestimmungen ( $n = 5$ ).

#### Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Die niedrigsten Konzentrationen der Analyten, die die Kriterien für den LLOQ (Einleitung, A2.5.3) erfüllten, waren für Metformin 0,2 µg/mL, für Kreatinin 1,5 µg/mL und für Sitagliptin 3 ng/mL (Tab. Anhang, D1.2.1).

#### 1.4.1.4 Richtigkeit

Für Metformin resultierte eine intraday Richtigkeit von 85,36 - 114,97 %, für Kreatinin von 84,4 - 114,92 %. Die interday Richtigkeit dagegen variierte für Metformin von 97,09 - 102,03 % und für Kreatinin von 98,95 - 102,5 %. Für Sitagliptin lag die intraday Richtigkeit zwischen 87,48 - 113,73 % und die interday Richtigkeit zwischen 93,89 - 109,50 % (Tab. Anhang, D1.2.2, D1.2.3, D1.2.4).

#### 1.4.1.5 Präzision

Für die intraday Präzision, die als relative Standardabweichung (RSD) ausgedrückt wird, wurden für Metformin bzw. für Kreatinin Werte von 3,9 - 9,7 % bzw. 4,02 - 9,58 % bestimmt. Die interday Präzision reichte von 1,25 - 4,39 % bzw. von 2,04 - 4,47 %. Für Sitagliptin lag die intraday Präzision zwischen 1,2 - 8,85 %, die interday Präzision zwischen 1,48 - 8,31 % (Tab. Anhang, D1.2.2, D1.2.3, D1.2.4).

#### 1.4.1.6 Wiederfindung, Extraktionseffizienz und Carry-over

Die mittlere Wiederfindung für Metformin, Kreatinin bzw. Phenformin lag bei  $10,56 \pm 0,59$  %,  $12,13 \pm 0,93$  % und  $10,35 \pm 1,24$  % ( $n = 15$ ;  $n = 5$  für Phenformin). Die Extraktionseffizienz wurde berechnet zu  $10,93 \pm 0,59$  %,  $11,81 \pm 0,17$  % und  $10,89 \pm 1,01$  % ( $n = 15$ ;  $n = 5$  für Phenformin). Für Sitagliptin war die mittlere Wiederfindung  $6,25 \pm 0,93$  %, für Sitagliptin-d4  $6,83 \pm 0,83$  % ( $n = 20$ ;  $n = 5$  für Sitagliptin-d4). Die Extraktionseffizienz lag für die beiden Stoffe bei  $4,59 \pm 0,49$  % bzw.  $2,77 \pm 0,39$  % ( $n = 20$ ;  $n = 5$  für Sitagliptin-d4). Die Werte waren zwar sehr niedrig, erfüllten aufgrund ihrer Präzision und Reproduzierbarkeit aber alle gegebenen Kriterien (Einleitung, A2.5.5, Tab. Anhang, D1.2.5).

Weder für einen der Analyten, noch für deren internen Standards war ein Verschleppen der Probe in die nachfolgende Injektion zu beobachten, sodass kein Carry-over vorlag.

#### 1.4.1.7 Robustheit

Die Robustheit wurde in vorliegender Messmethode hinsichtlich des Verpackens der Spots in nassem Zustand getestet. Die Richtigkeit lag für alle Analyten in einem Bereich zwischen 85 – 115 %, die Präzision bei  $\leq 10$  %, womit die Methode gegenüber dem getesteten Einfluss als robust galt (Tabelle 6) (Tab. Anhang, D1.2.6).

**Tabelle 6: Robustheit von Metformin, Kreatinin und Sitagliptin.** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n = 5$ ) der Richtigkeit und Präzision der nicht vollständig getrockneten Qualitätskontrollproben.

Stoff	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Metformin	104,75	2,79
Kreatinin	97,61	7,31
Sitagliptin	97,71	9,28

#### 1.4.1.8 Matrixeffekte

Die Matrixeffekte (ME) (Einleitung, A2.5.7) wurden bestimmt, indem für Sitagliptin und den internen Standard für 6 Einzelmatrixes und auch für gepooltes Blut (aus 10 Einzelmatrixes) der Matrixfaktor (MF) und der auf den internen Standard normalisierte Matrixfaktor (MFIS) bestimmt wurden.

Für die 6 individuellen Blutmatrixes wurden ein MFIS von 87,45 – 133,31 % gefunden. Die RSD des MFIS der Einzelmatrixes betrug dabei 6,64 % und entsprach somit den Akzeptanzkriterien (Exp. Teil, C2.7.11). Für gepooltes Blut fand sich ein Mittelwert des MFIS von 98,67 % (Tabelle 7).



**Tabelle 7: Matrixeffekte für Sitagliptin im Blut von sechs verschiedenen Einzelspendern in zwei Konzentrationen (n = 3) und im gepooltem Blut aus zehn Einzelmatrizes (n = 5).** Die Division des Matrixfaktors (MF) des Sitagliptins durch den des internen Standards, ergab den auf den internen Standard normalisierten Matrixfaktor (MFIS).

Einzelspender	Konzentration [ng/mL]	MF (Sitagliptin) [%]	MF (IS) [%]	MFIS [%]
#1	0,80	95,52	92,65	103,10
#2	0,80	90,30	83,24	108,48
#3	0,80	89,38	85,47	104,57
#4	0,80	88,88	90,49	98,22
#5	0,80	70,59	64,84	108,87
#6	0,80	87,14	81,98	106,30
#1	106,67	82,88	90,11	91,98
#2	106,67	79,90	86,63	92,24
#3	106,67	84,16	88,34	95,27
#4	106,67	84,52	90,30	93,60
#5	106,67	43,77	47,81	91,55
#6	106,67	58,36	62,69	93,10
<b>gepooltes Blut</b>				
	0,80	112,79	114,09	98,86
	106,67	102,77	104,35	98,49

#### 1.4.1.9 Stabilität

##### *Stammlösungsstabilität*

Die Stammlösungsstabilität wurde für eine bzw. mehrere Konzentrationen der Analyten unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Ein Probenet wurde direkt nach der Herstellung, ein weiteres nach 24 h Lagerung bei Raumtemperatur und ein drittes nach einem Gefrier-Tau-Zyklus (-25 °C) vermessen. Die Stammlösungen von Metformin, Kreatinin und Phenformin waren in allen Konzentrationen unter allen Bedingungen stabil (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Stammlösungsstabilität von Metformin, Kreatinin und Phenformin bei verschiedenen Konzentrationen (n = 5).** Die Stabilität wurde bei Raumtemperatur (RT) für 24 h sowie nach einem Gefrier-Tau-Zyklus (-25 °C) getestet.

	c(Stammlösung) [µg/mL]	Area (24 h, RT)/Area (frisch hergestellt) MW ± SD (n = 5)	Area (Gefrier-Tau-Zyklus)/Area (frisch hergestellt) MW ± SD (n = 5)
Metformin	1000	1,01 ± 0,01	1,02 ± 0,01
	100	1,03 ± 0,01	1,01 ± 0,01
Kreatinin	1000	1,02 ± 0,02	1,02 ± 0,01
Phenformin	1000	1,01 ± 0,01	1,01 ± 0,01
	100	1,01 ± 0,03	1,03 ± 0,04

Die Stammlösungen von Sitagliptin-d4 waren in allen Konzentrationen unter allen Bedingungen (direkte Messung, RT für 24 h, Gefrier-Tau-Zyklus) stabil. Die von Sitagliptin mit der Konzentration von 1 mg/mL war bei Lagerung über 24 h bei Raumtemperatur nicht stabil, für alle anderen Bedingungen dagegen schon (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Stammlösungsstabilität von Sitagliptin und Sitagliptin-d4 bei verschiedenen Konzentrationen (n = 5).** Die Stabilität wurde bei Raumtemperatur (RT) für 24 h sowie nach einem Gefrier-Tau-Zyklus (-25 °C) getestet.

	<b>c(Stammlösung) [µg/mL]</b>	<b>Area (24 h, RT)/Area (frisch hergestellt) MW ± SD (n = 5)</b>	<b>Area (Gefrier-Tau-Zyklus )/Area (frisch hergestellt) MW ± SD (n = 5)</b>
Sitagliptin	1000	0,66 ± 0,02	0,98 ± 0,03
	100	1,00 ± 0,04	0,96 ± 0,03
	10	0,96 ± 0,03	1,00 ± 0,01
	1	0,92 ± 0,09	1,11 ± 0,06
Sitagliptin-d4	1000	1,11 ± 0,05	1,13 ± 0,05
	1	0,97 ± 0,06	1,08 ± 0,10

#### *Kurzzeitstabilität*

Die Proben wurden für die Trocknungsdauer (drei Stunden) bei Raumtemperatur offen gelagert. Nach den drei Stunden wurden sie in Plastiktüten verpackt, die Silica Gel Trockenmittelbeutel enthielten, um für die Zeitdauer bis zur Vermessung aufbewahrt zu werden. Da wahrscheinlich nicht für jede Probe die Zeit genau eingehalten werden würde, sollte getestet werden, ob die Proben stabil blieben, wenn sie über 24 Stunden bei Raumtemperatur und ohne Trockenmittel gelagert wurden. Es wurden die berechneten Konzentrationen der Proben, die nach drei Stunden extrahiert wurden verglichen mit denen, die 24 Stunden offen gelagert wurden und mit denen, die nach den drei Stunden mit Trockenmittel verpackt wurden. So war zu erkennen, ob die Zeiten aufgrund von Stabilitätsproblemen exakt eingehalten werden mussten oder ob geringfügige Schwankungen toleriert werden konnten.

Sowohl für Metformin, als auch für Kreatinin unterschieden sich die drei getesteten Variationen nicht. Die Richtigkeit bewegte sich in einem Rahmen von 91,43 – 111,37 %, die Präzision von 1,58 – 8,57 % (Tab. Anhang, D1.2.7, D1.2.8), womit alle Werte in den angegebenen Grenzen lagen und die Proben somit als stabil angesehen werden konnten. Auch für Sitagliptin war zwischen den getesteten Varianten kein Unterschied ersichtlich. Die Richtigkeit reichte von 89,33 - 112,81 %, die Präzision von 0,94 - 8,50 % (Tab. Anhang, D1.2.9). Für die Quantifizierung der Analyten bedeutete dies, dass die Proben über eine Dauer von 24 Stunden sowohl mit Trockenmittel als auch bei

Raumtemperatur an der Luft gelagert werden konnten, ohne dass ein Unterschied in den berechneten Konzentrationen auftrat.

#### *Autosamplerstabilität*

Nach der Extraktion standen die Proben bis zur Vermessung bis zu 12 Stunden im Autosampler. Über diesen Zeitraum hinweg mussten die Analyten darin stabil bleiben. Aus diesem Grund wurde eine Probenreihe direkt nach der Extraktion vermessen und eine zweite erst nach 24 Stunden Lagerung im Autosampler. Die Richtigkeit und Präzision für Kreatinin und Metformin, die bei 10 °C im Autosampler verblieben, reichten von 95,38 – 111,82 % bzw. von 0,47 – 9,83 %. Auch nach 24 Stunden im Autosampler waren die Analyten noch in derselben Konzentration vorhanden. Aus diesem Grund stellte es kein Problem dar, die Proben bis zu 24 Stunden im Autosampler zu lagern (Tab. Anhang, D1.2.7, D1.2.8). Sitagliptin, das bei Raumtemperatur im Autosampler gelagert wurde, erreichte eine Richtigkeit und Präzision von 92,94 – 107,46 % bzw. von 2,42 – 9,84 %. Auch hier war der Analyt nach 24 Stunden Verbleib im Autosampler noch in derselben Konzentration vorhanden wie direkt nach der Extraktion, weshalb es auch hier nicht mit Qualitätseinbußen zu rechnen war, wenn die Proben bis zu 24 Stunden im Autosampler aufbewahrt wurden (Tab. Anhang, D1.2.9).

#### *Langzeitstabilität*

Um zu gewährleisten, dass die Proben von der Abnahme des Blutes am Patienten bis zur Analyse stabil blieben, wurde die Stabilität unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von vier Wochen getestet. Die Richtigkeit von Metformin, Kreatinin und Sitagliptin lag zwischen 85 – 115 %, die Präzision  $\leq$  15 % (Tab. Anhang, D1.2.10). Basierend auf diesen Daten konnten die Proben bis zur Analyse bis zu vier Wochen sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei 4 °C gelagert werden, ohne dass das Messergebnis verfälscht wurde.

Für Sitagliptin wurde aufgrund dessen, dass als Messmethode eine zur Routineanalytik weniger zugängliche LC-MS/MS Methode verwendet wurde, auch die Stabilität bei einer Lagerung der Spots für 3 Monate bei -80 °C getestet. Die Richtigkeit lag zwischen 92,77 – 111,92 %, die Präzision war  $\leq$  15 % (Tab. Anhang, D1.2.11). Die Proben für Sitagliptin konnten dementsprechend über einen Zeitraum von 3 Monaten bei -80 °C gelagert werden, ohne dass es zu einem Abbau der Substanz kam.

### **1.4.2 Diskussion**

Für die Validierung von analytischen Methoden aus Trockenblutproben wird empfohlen, die für Methoden aus flüssigen, biologischen Proben um einige Parameter zu erweitern

(Einleitung, A2.5) [44]. Vieles erübrigte sich für die hier entwickelte Methode aufgrund der Verwendung des gesamten Spots. Somit waren Versuche zur Spothomogenität, zum Hämatokrit bzw. dem Blutvolumen im Punch und dem Spot-to-Spot Carry-over überflüssig. Der Einfluss der Hämolyse wurde ebenfalls nicht untersucht, da durch das Aufbrechen der Zellen im Ultraschallbad davon ausgegangen wurde, dass der gesamte Arzneistoff, der sich inner- und außerhalb der Zellen befand, freigesetzt wurde. In diesem Fall machte es keinen Unterschied, ob das Blut schon vor dem Auftragen hämolysiert war.

Die entwickelte Methode wurde in Anlehnung an die Richtlinien der European Medicines Agency (EMA) und der Food and Drug Administration (FDA) für bioanalytische Methodvalidierung vollständig validiert [53, 54]. Zusätzlich wird auch eine klinische Validierung empfohlen. Hierbei sollten die in den DBS-Proben gefundenen Konzentrationen mit denen aus venösen Proben verglichen werden [21, 32]. Für Kreatinin wurde dies durchgeführt (Allg. Teil, B3.2.2), für Metformin und Sitagliptin war dies aufgrund der Fragestellung der vorliegenden Arbeit (Einleitung, A5) nicht notwendig.

Kritisch ist die Extraktionseffizienz aus Dried-Blood-Spot Proben. Laut FDA muss diese nicht bei 100 % liegen, sie muss nur präzise und reproduzierbar sein [54]. Bei Trockenblutproben besteht die Gefahr, dass die Analyten im Träger zurückbleiben [44]. Auch in unserer Methode ist die Extraktionseffizienz und Wiederfindung sehr niedrig (Allg. Teil, B1.4.1.6), aber bezüglich der Präzision und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind alle Kriterien nach der Richtlinie der FDA erfüllt (Einleitung, A2.5.5). AbuRuz et al. erreichten für Metformin eine Wiederfindung von 84,0 % bis 86,5 %, allerdings wurde hier als Extraktionsmittel 60 % Methanol verwendet, was sich in der eigenen Untersuchung aber als ungeeignetes Extraktionsmittel darstellte [136]. Die niedrige Wiederfindung in unserer Methode kann begründet sein in der Verwendung von Acetonitril mit Ameisensäure als Extraktionsmittel. Acetonitril war zu unpolar, um die Analyten besser zu extrahieren. Die Versuche haben aber gezeigt, dass unter Verwendung von hydrophileren Extraktionsmitteln der Extrakt stark mit Hämoglobin verunreinigt war (Allg. Teil, B1.2.2.3).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Analytik von Dried-Blood-Spot Proben ist das Auftragen bzw. Zugeben des internen Standards [26]. In der Regel wird dieser mit dem Extraktionsmittel zugegeben [32, 44, 52]. Allerdings muss man bedenken, dass bei diesem Vorgehen der interne Standard nicht alle gewünschten Funktionen erfüllt, er kompensiert nicht die Variation der Extraktion aus dem Filterpapier [44]. Mittlerweile gibt es mehrere Ansätze zum Aufbringen des internen Standards (Einleitung, A2.4). In dem in dieser Arbeit gewähltem Ansatz, den internen Standard auf den DBS mit Hilfe einer Pipette aufzutragen und trocknen zu lassen, bevor Extraktionsmittel zugegeben wird, wurde bei der Extraktion somit die Variation, die der Analyt beim Wiederauflösen aus der

Matrix und dem Träger zeigte, korrigiert. Dieses Vorgehen war nur praktikabel, da der gesamte Spot extrahiert wurde.

Die Quantifizierung von Kreatinin stellte eine weitere Herausforderung dar, da Kreatinin eine endogen im Blut vorkommende Substanz ist [75] und es somit praktisch unmöglich war, Kreatinin-freies Blut zu erhalten. Laut der EMA gibt es die Möglichkeit, das Erstellen der Kalibriergeraden aus sogenannten Hilfsmatrizes, wie zum Beispiel Proteinpuffer oder dialysiertem Serum durchzuführen [53]. In diesem Fall wurde darauf verzichtet, da neben Kreatinin mit Metformin und Sitagliptin zwei weitere nicht-endogene Analyte quantifiziert werden sollten. Um für Metformin und Sitagliptin präzise Ergebnisse zu bekommen, wurde Vollblut einer Hilfsmatrix vorgezogen. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Peakfläche des endogenen Kreatinins von der gesamt detektierten Fläche des Kreatinins abzuziehen, um nur die des zugegebenen Kreatinins zu erhalten. Eine ähnliche Strategie wurde auch 2015 von Koster et al. angewandt [93]. Mit diesem Vorgehen wurde auch das Problem der unterschiedlichen Matrixeffekte (Puffer vs. Vollblut), die in der LC-MS/MS Analytik eine große Rolle spielen (Einleitung, A2.5.7), sehr stark vermindert.

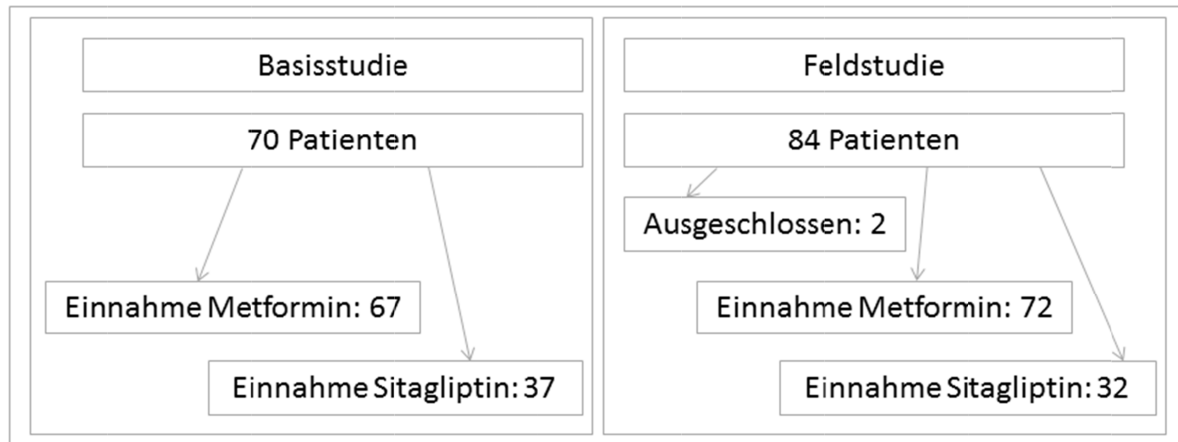
Die Methode wurde somit erfolgreich mit dem Ziel, die größtmögliche Empfindlichkeit zu erreichen, entwickelt. Anschließend wurde sie nach aktuellen Leitlinien voll validiert, Abweichungen der vorgegebenen Empfehlungen (z. B. Verwenden einer Surrogatmatrix) wurden wissenschaftlich begründet.

## 2 Klinische Studien

### 2.1 Basisstudie

Die klinische Basisstudie zur „Erhebung von Populationsdaten zu Kapillarblutkonzentrationen von Kreatinin und renal eliminierten Antidiabetika“ wurde in Zusammenarbeit mit der Praxis Dr. med. Stephan Zieher und Dr. med. Edwin Albert, Ärzte der Allgemeinmedizin und Diabetologie in Marktheidenfeld durchgeführt. Dort wurden 70 Patientenproben gewonnen (Exp. Teil, C3.1), von denen 34 Proben von weiblichen, und 36 Proben von männlichen Patienten stammten. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $64,63 \pm 12,01$  Jahren (32 – 86 Jahre), der Body-Mass-Index (BMI) lag im Schnitt bei  $29,95 \pm 6,00$  kg/m<sup>2</sup> (19,84 – 54,69 kg/m<sup>2</sup>) und der mittlere Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme vor der Blutabnahme lag bei 524 Minuten (30 – 1380 min). Neben den genannten Parametern wurden für jeden Patienten auch Daten zu den neben Metformin und/oder Sitagliptin eingenommenen Arzneimitteln, der Kreatininkonzentration im Plasma, dem Hämatokrit, dem Glukosespiegel und dem HbA<sub>1c</sub>-Wert

erhoben. In dieser Studie nahmen 67 Patienten Metformin ein, Sitagliptin wurde von 37 Patienten eingenommen (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Schema der Medikamenteneinnahme der Patienten der klinischen Studien.** In der Basisstudie wurde Metformin von 67 und Sitagliptin von 37 Patienten eingenommen, in der Feldstudie (Allg. Teil, B2.2) wurden 2 Patienten aufgrund eines zu geringen Probenvolumens von der Studie ausgeschlossen. Von den übrigen 82 Patienten nahmen 72 Metformin und 32 Sitagliptin ein.

## 2.2 Feldstudie

In Zusammenarbeit mit 14 verschiedenen öffentlichen Apotheken wurde die „Klinische Studie zur Erhebung von Populationsdaten zu Kapillarblutkonzentrationen der renal eliminierten, oralen Antidiabetika Metformin und Sitagliptin und Bestimmung der Nierenfunktion mittels Dried-Blood-Spot Analytik“ durchgeführt. Es wurden 84 Patientenproben gewonnen (Exp. Teil, C3.2). Aufgrund eines zu geringen Probenvolumens mussten zwei der Proben von der Studie ausgeschlossen werden, sodass 82 Patienten mit in die Auswertung eingingen, von denen 38 Proben von weiblichen, und 44 Proben von männlichen Patienten stammten. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $69,02 \pm 11,20$  Jahren (35 – 88 Jahre), der Body-Mass-Index lag im Schnitt bei  $30,43 \pm 5,06 \text{ kg/m}^2$  ( $20,07 - 42,22 \text{ kg/m}^2$ ) und der mittlere Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme vor der Blutabnahme lag bei 366 Minuten (35 – 1545 min). Neben den genannten Parametern wurde der Medikationsplan jedes Patienten ausgewertet. Metformin wurde von 72 und Sitagliptin von 32 Patienten eingenommen (Abbildung 36).

### 2.2.1 Diskussion

Unseres Wissens wurden bisher keine Studien, die Trockenblutproben aus dem ambulanten Bereich analysieren, initiiert und durchgeführt. Die von uns durchgeführte

Studie war somit die erste Studie dieser Art. In Feldstudien, die zum Ziel haben Daten einer möglichst breit gefächerten Population zu erhalten, ist es sinnvoll Apotheken miteinzubeziehen, da sie einen der wichtigsten Anlaufpunkte für die Patienten darstellen. In Apotheken können leichter Daten unter Alltagsbedingungen erhalten werden als in Arztpraxen, da sich hier sowohl Patienten, die ihre Medikamente regelmäßig einnehmen, als auch Patienten, die sie nur unregelmäßig einnehmen und zudem Patienten mit unterschiedlichen Komorbiditäten treffen. Vielen Patienten fällt zudem der Gang in die Apotheke leichter als zum Arzt, sodass auch Personen, die einen Arztbesuch scheuen, erreicht werden können. Neben den wissenschaftlichen Vorteilen birgt die Teilnahme der Apotheken an groß angelegten Feldstudien noch einen weiteren Vorteil. Die Rolle des Apothekers kann weiter gestärkt werden, indem den Patienten signalisiert wird, dass das Interesse an einer guten Therapie sehr groß ist und dass stetig etwas dafür getan wird, diese weiter zu verbessern.

### 3 Abschätzung der Nierenfunktion mit Hilfe der Kreatininkonzentration aus Dried Blood Spots

#### 3.1 Bestimmung der Kreatininkonzentration in Patientenproben der klinischen Studien

##### 3.1.1 Basisstudie

In allen 70 Studienproben konnte die Kreatininkonzentration bestimmt werden. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten dabei zwischen 4,12 µg/mL und 15,58 µg/mL (MW ± SD 8,35 ± 2,31 µg/mL, Median 7,77 µg/mL) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Kreatininkonzentration im Kapillarblut der 70 Studienproben der Basisstudie.

$C_{\text{Kapillarblut}}(\text{Kreatinin})$ [µg/mL]		$C_{\text{Kapillarblut}}(\text{Kreatinin})$ [µg/mL]		$C_{\text{Kapillarblut}}(\text{Kreatinin})$ [µg/mL]	
1	6,98	25	5,42	49	10,81
2	6,98	26	7,75	50	9,55
3	10,25	27	7,13	51	7,05
4	6,47	28	6,77	52	7,28
5	11,07	29	7,80	53	8,66
6	9,29	30	9,16	54	6,97
7	7,39	31	7,27	55	13,48
8	6,27	32	9,72	56	6,32
9	9,53	33	9,54	57	6,51
10	6,77	34	7,39	58	7,54
11	9,99	35	5,79	59	9,62
12	7,20	36	9,51	60	7,19
13	11,72	37	5,91	61	6,01
14	10,92	38	8,40	62	9,39
15	12,85	39	4,12	63	10,32
16	12,81	40	9,83	64	8,29
17	8,20	41	9,34	65	15,58
18	4,33	42	6,81	66	6,83
19	7,01	43	6,04	67	7,37
20	5,59	44	6,40	68	9,41
21	7,83	45	9,48	69	9,36
22	9,31	46	6,44	70	15,44
23	6,55	47	10,47		
24	8,48	48	5,49		



### 3.1.2 Feldstudie

In 78 Studienproben konnte die Kreatininkonzentration bestimmt werden. In den vier nicht quantifizierten Proben konnte Kreatinin aufgrund einer fehlerhaften Chromatographie nicht ermittelt werden. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten zwischen 5,26 µg/mL und 32,91 µg/mL (MW ± SD 11,47 ± 3,94 µg/mL, Median 11,04 µg/mL) (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Kreatininkonzentration im Kapillarblut der 78 Studienproben der Feldstudie.**

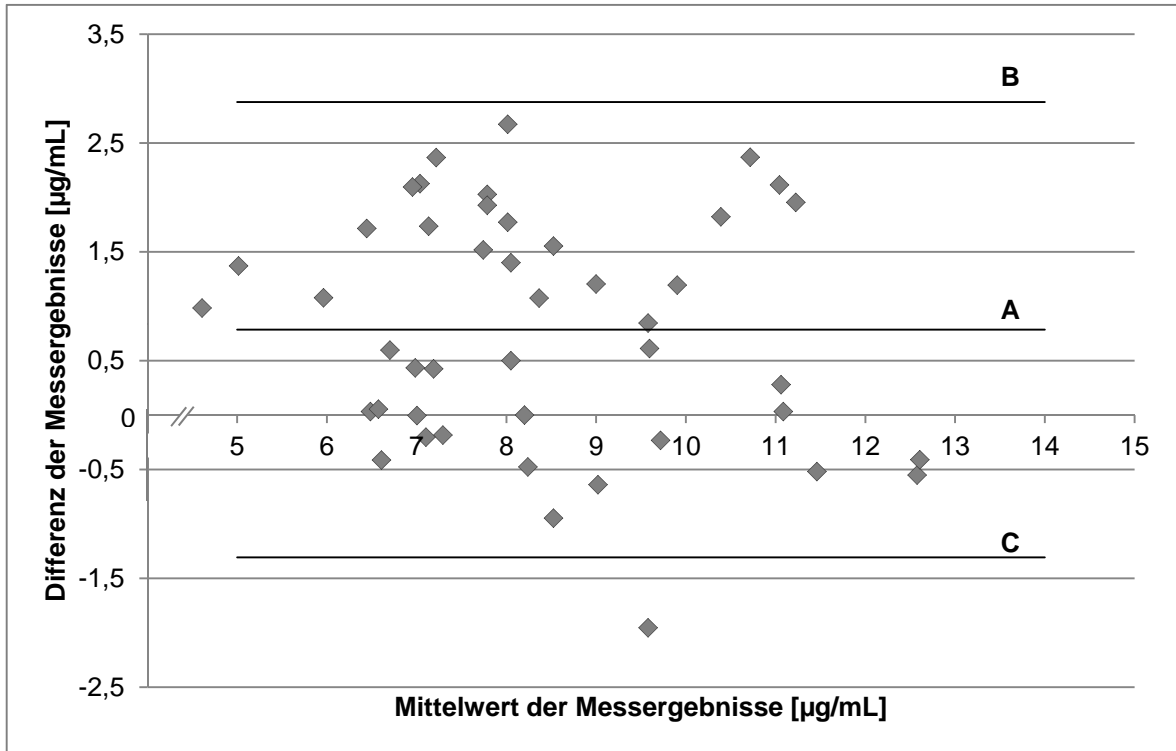
<b>c<sub>Kapillarblut</sub>(Kreatinin)</b> <b>[µg/mL]</b>		<b>c<sub>Kapillarblut</sub>(Kreatinin)</b> <b>[µg/mL]</b>		<b>c<sub>Kapillarblut</sub>(Kreatinin)</b> <b>[µg/mL]</b>	
<b>1</b>	5,74	<b>29</b>	10,49	<b>58</b>	8,73
<b>2</b>	10,92	<b>30</b>	10,22	<b>59</b>	6,77
<b>3</b>	10,21	<b>31</b>	12,05	<b>60</b>	10,78
<b>4</b>	9,64	<b>32</b>	6,07	<b>62</b>	14,10
<b>6</b>	13,37	<b>33</b>	11,92	<b>63</b>	6,80
<b>7</b>	7,28	<b>34</b>	5,26	<b>64</b>	8,37
<b>8</b>	9,49	<b>35</b>	19,85	<b>65</b>	10,23
<b>9</b>	7,36	<b>36</b>	14,00	<b>66</b>	7,65
<b>10</b>	9,13	<b>37</b>	9,70	<b>67</b>	6,53
<b>11</b>	13,44	<b>38</b>	9,20	<b>68</b>	7,45
<b>12</b>	13,19	<b>40</b>	12,79	<b>69</b>	14,38
<b>14</b>	11,33	<b>41</b>	10,23	<b>70</b>	9,65
<b>15</b>	10,84	<b>42</b>	17,05	<b>71</b>	32,91
<b>16</b>	14,91	<b>43</b>	18,64	<b>72</b>	7,73
<b>17</b>	13,57	<b>44</b>	14,75	<b>73</b>	11,91
<b>18</b>	13,28	<b>45</b>	10,00	<b>74</b>	13,45
<b>19</b>	12,07	<b>46</b>	16,47	<b>75</b>	6,37
<b>20</b>	14,85	<b>48</b>	12,22	<b>76</b>	8,60
<b>21</b>	13,57	<b>49</b>	11,10	<b>77</b>	11,67
<b>22</b>	12,43	<b>50</b>	12,36	<b>78</b>	13,18
<b>23</b>	8,05	<b>51</b>	10,98	<b>79</b>	13,09
<b>24</b>	13,90	<b>52</b>	5,60	<b>80</b>	14,60
<b>25</b>	14,96	<b>53</b>	10,50	<b>81</b>	10,80
<b>26</b>	14,06	<b>54</b>	7,03	<b>82</b>	9,42
<b>27</b>	14,74	<b>55</b>	7,97	<b>83</b>	12,28
<b>28</b>	13,66	<b>57</b>	10,30	<b>84</b>	14,64

## 3.2 Ermittlung eines Korrelationsfaktors für Kreatinin zur Berechnung der Nierenfunktion

### 3.2.1 Hintergrund

In dieser Arbeit sollte aus Trockenblutproben die Nierenfunktion abgeschätzt werden, welche über die Formel nach Cockcroft und Gault berechnet werden soll (Einleitung, A5).

Die darüber berechnete Kreatininclearance ist allerdings nur valide, wenn die Serumkonzentration des Kreatinins zur Berechnung verwendet wird [96]. Aus den Trockenblutspots wird aber die Kreatininkonzentration im Kapillarblut bestimmt. Ob diese mit der Konzentration im Plasma übereinstimmt, lässt sich mithilfe eines Bland-Altman Plots darstellen. In diesem Plot, bei dem die Differenz der durch zwei unterschiedliche Verfahren gemessenen Parameter für jede Probe ermittelt und gegen den Mittelwert desselben aufgetragen wurde, konnten systematische Abweichungen und Ausreißer beurteilt werden. Dies wird vor allem zum Vergleich der Übereinstimmung zweier Messmethoden verwendet [175]. Der aus den ersten 45 Patientenproben erstellte Plot, zeigte eine Differenz der Messergebnisse beim Vergleich der Plasma- gegenüber der Kapillarblutkonzentration des Kreatinins im Mittel von 0,79  $\mu\text{g/mL}$  (Abbildung 37, Linie A). Dieser Wert war deutlich von Null verschieden, was zeigte, dass die Ergebnisse beider Verfahren nicht austauschbar waren. Somit ist es nicht möglich, aus den Kapillarblutkonzentrationen des Kreatinins ohne Korrektur die Nierenfunktion abzuschätzen. Es sollte daher ein Korrelationsfaktor bestimmt werden, um die aus den Dried Blood Spots erhaltenen Kapillarblutkonzentrationen in Plasmakonzentrationen umrechnen zu können und die Nierenfunktion korrekt abschätzen zu können.

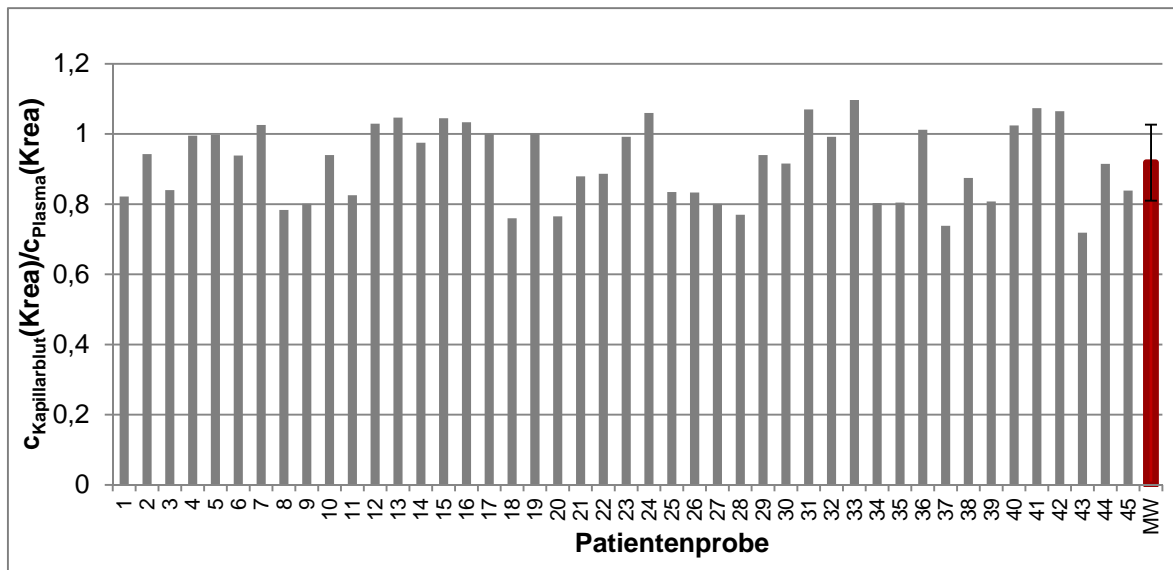


**Abbildung 37: Bland-Altman Plot zum Vergleich der im Plasma und Kapillarblut gemessenen Konzentrationen an Kreatinin in 45 Patientenproben.** Die mit A bezeichnete Linie stellt den Mittelwert der Differenzen der Messergebnisse dar, die mit B und C bezeichneten Linien stellen jeweils den Mittelwert  $\pm 1,96 \cdot$  Standardabweichung der Differenzen dar. Somit liegen 95 % aller Differenzen der Plasmakreatininkonzentration und Kapillarblutkreatininkonzentration innerhalb dieser Grenzen (B und C). Durch die Abweichung des Mittelwerts der Differenzen (Linie A) von Null ist zu sehen, dass die Konzentrationen nicht übereinstimmen, die Messmethoden also nicht ausgetauscht werden können.

### 3.2.2 Korrelation zwischen der Kapillarblut- und Plasmakonzentration des Kreatinins

#### 3.2.2.1 Ermittlung eines Korrelationskoeffizienten

Zur Aufstellung des Korrelationsfaktors  $F_{\text{entw}}$  zur Umrechnung der Kapillarblutkonzentration in die Plasmakonzentration des Kreatinins wurden 45 Patientenproben herangezogen („Entwicklungsset“), deren Kapillarblutkonzentrationen an Kreatinin in einem DBS bestimmt wurden. Diese wurden in Relation gesetzt zu der jeweiligen Serum-/Plasmakonzentration, die von der Arztpraxis, von deren Patienten die Proben stammten, übermittelt wurden. Der anschließende Vergleich der individuellen Faktoren  $C_{\text{Kapillarblut}}(\text{Krea})/C_{\text{Plasma}}(\text{Krea})$  verdeutlichte, dass die Werte zwar variierten, aber die Schwankung mit einer relativen Standardabweichung von 11,80 % gering war, sodass man von einem konstanten Verhältnis ausgehen konnte und somit die Möglichkeit gegeben war, die Kapillarblutkonzentrationen über einen Faktor in die Serum-/Plasmakonzentration umzurechnen (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Verhältnisse der Kreatininkonzentration im Kapillarblut zu der im Plasma für die 45 Patienten, die zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten zur Umrechnung der Kapillarblut- in die Plasmakonzentration des Kreatinins herangezogen wurden. Für den Mittelwert (MW) ( $n = 45$ ) wurde die Standardabweichung angegeben.**

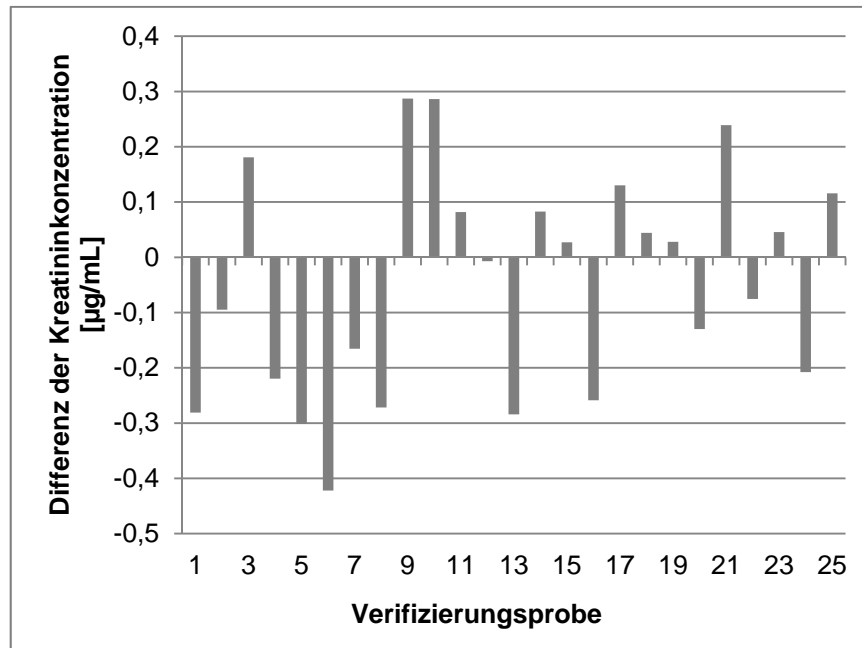
Der aus den 45 Proben ermittelte Faktor  $c_{\text{Kapillarblut}}(\text{Krea})/c_{\text{Plasma}}(\text{Krea})$  betrug  $0,918 \pm 0,108$  (MW  $\pm$  SD). Durch diesen Wert musste die gemessene Kapillarblutkonzentration von Kreatinin dividiert werden, um die entsprechende Plasma-/Serumkonzentration zu erhalten. Um sicherzugehen, dass die über diesen Faktor in die Serum-/Plasmakonzentrationen umgerechneten Kapillarblutkonzentrationen des Kreatinins mit den gemessenen Serum-/Plasmakonzentrationen übereinstimmten, sollte der Faktor verifiziert werden.

### 3.2.2.2 Verifizierung des Korrelationskoeffizienten

Für die Bestätigung des Faktors wurden 25 Patientenproben verwendet („Verifizierungsset“), deren Kapillarblutkonzentrationen bestimmt und anschließend mithilfe des Faktors  $F_{\text{entw}} = c_{\text{Kapillarblut}}(\text{Krea})/c_{\text{Plasma}}(\text{Krea}) = 0,918$  in die Plasmakonzentrationen umgerechnet wurden.

Mittels eines verbundenen t-Testes wurde geprüft, ob die Mittelwerte der jeweiligen durch die verschiedenen Methoden erhaltenen Serum-/Plasmakonzentrationen (gemessen gegenüber berechnet) übereinstimmten. Trotz interindividueller Schwankungen sollten die Mittelwerte nicht signifikant verschieden sein, wenn die Berechnung der Kreatininkonzentration im Plasma/Serum über den Faktor beständig ist. Tatsächlich waren mit  $p < 0,01$  die Mittelwerte der zwei Messmethoden nicht signifikant unterschiedlich.

Nach Berechnung der Differenz zwischen der jeweilig berechneten und gemessenen Kreatininkonzentration im Serum/Plasma, zeigte sich, dass die maximale Abweichung im gesamten Verifizierungsset bei 0,42 µg/mL, die minimale bei -0,007 µg/mL lag (Abbildung 39). Dies entsprach einer prozentualen Abweichung vom jeweiligen gemessenen Serum-/Plasmawert von maximal 5,21 %. Der Median der Differenzen lag bei -0,007 µg/mL und der Mittelwert bei -0,047 µg/mL.



**Abbildung 39: Darstellung der absoluten Differenzen der Proben im Verifizierungsset zwischen den berechneten und gemessenen Plasmakonzentrationen des Kreatinins.** Die Plasmakonzentrationen wurden über den Faktor  $F_{entw} = c_{Kapillarblut}(Krea)/c_{Plasma}(Krea) = 0,918$  aus der Kapillarblutkonzentration berechnet.

Die sehr geringe Abweichung vom Wert Null sowie die prozentual sehr geringen Abweichungen von den gemessenen Serum-/Plasmakonzentrationen zeigten, dass aus der Umrechnung der Kapillarblutkonzentration mithilfe des Faktors richtige Serum-/Plasmakonzentrationen resultierten, die eine sehr kleine Streuung aufwiesen.

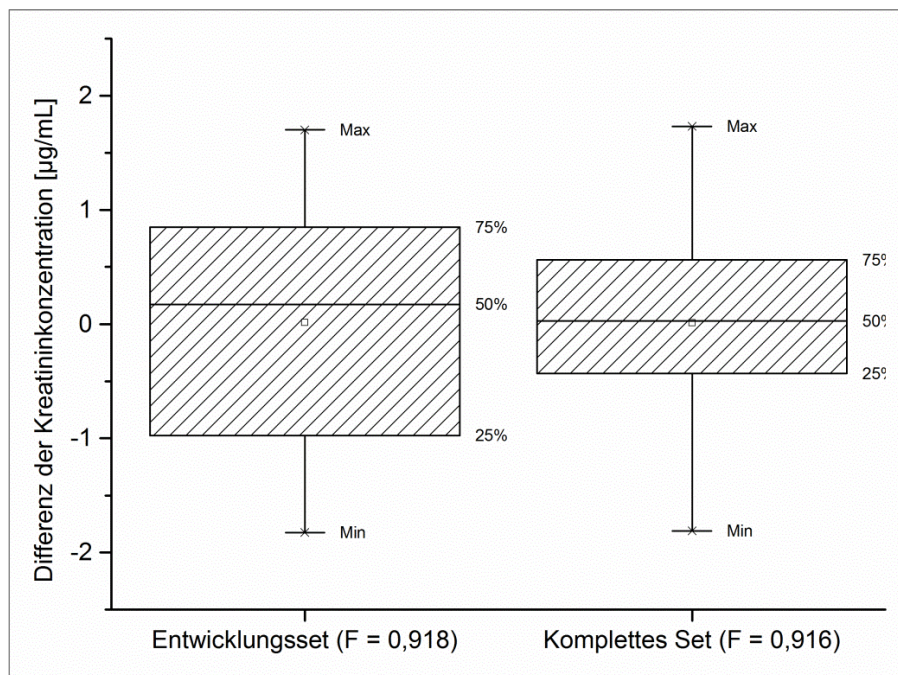
Im weiteren Schritt sollte der entwickelte und verifizierte Faktor  $F_{entw}$  nun auf Grundlage des gesamten Probensets (Entwicklungsset + Verifizierungsset) erweitert werden, um ihn zu optimieren.

### 3.2.2.3 Präzisierung des Korrelationskoeffizienten

Um den verifizierten Faktor zu optimieren wurden aus allen 70 Patientenproben des Entwicklungs- und Verifizierungsset der Gesamtfaktor  $F = 0,916 \pm 0,088$  berechnet.

Verglich man den Faktor aus dem Entwicklungsset ( $F_{\text{entw}}$ ) mit dem aktualisierten Faktor ( $F$ ), so zeigte sich, dass letzterer mit einer Standardabweichung von  $0,088 \mu\text{g/mL}$  gegenüber  $0,108 \mu\text{g/mL}$  und einer relativen Standardabweichung von  $9,58 \%$  gegenüber  $11,80 \%$  erwartungsgemäß einen kleineren Fehler aufwies.

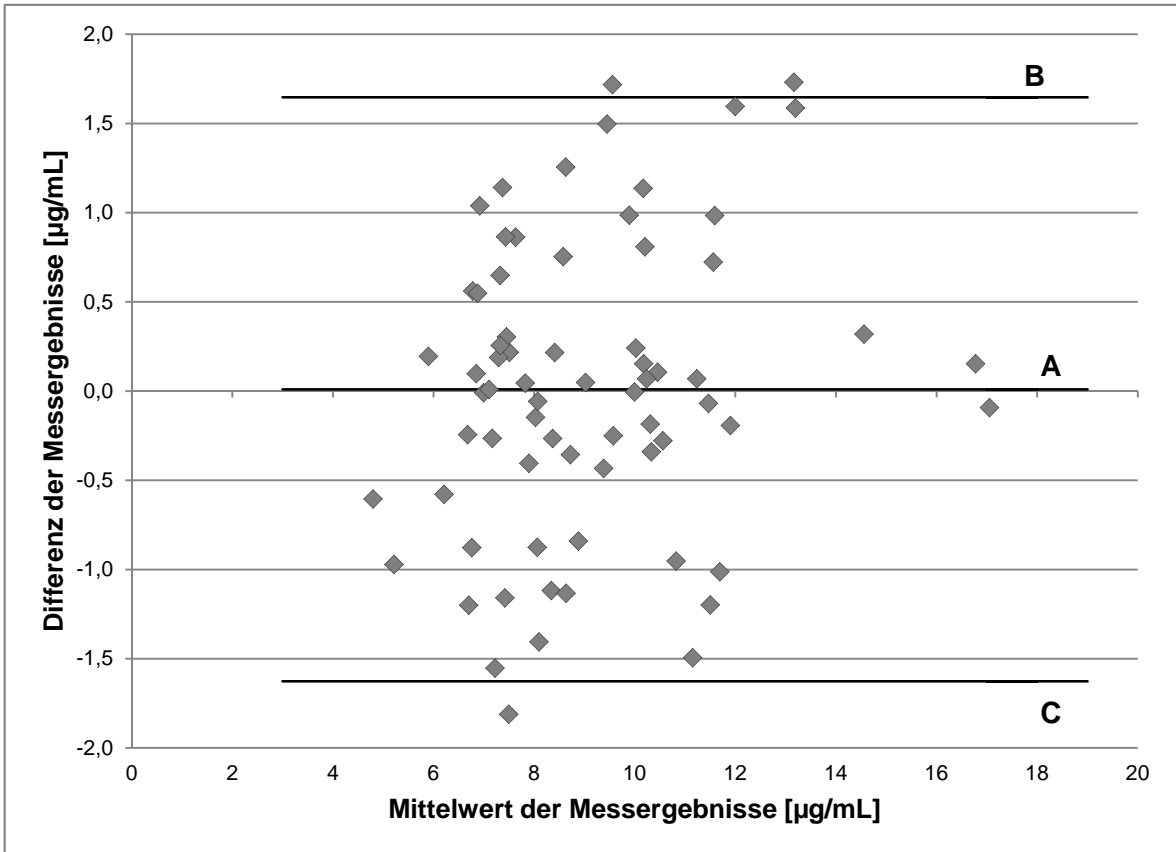
Der Vergleich der Differenzen der berechneten zu den gemessenen Serum-/Plasma-kreatininkonzentrationen beider Datensets zeigte eine deutliche Verengung des Interquartilsabstandes unter Nutzung des aktualisierten Faktors. Dies bedeutete, dass  $50 \%$  der Werte, die aus der Umrechnung mit  $F$  resultierten, in einem deutlich engeren Bereich ( $-0,47 \mu\text{g/mL}$  bis  $0,56 \mu\text{g/mL}$ ) lagen, als die Daten des Entwicklungssets, die durch die Umrechnung mit  $F_{\text{entw}}$  ( $-0,98 \mu\text{g/mL}$  bis  $0,85 \mu\text{g/mL}$ ) zustande gekommen waren. Zudem lagen im kompletten Set auch der Median und der Mittelwert sehr nahe beieinander (Median =  $0,026 \mu\text{g/mL}$ ; Mittelwert =  $0,01 \mu\text{g/mL}$ ). Die durch den Faktor  $F$  des kompletten Datensets erreichte Streuung der Differenz war damit deutlich kleiner und symmetrischer, als die des Entwicklungssets (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Box-Plot der absoluten Differenzen der berechneten und gemessenen Kreatininkonzentrationen im Plasma des Entwicklungssets (45 Proben) und des kompletten Datensets (70 Proben).** Für das Entwicklungsset wurde der Faktor  $F_{\text{entw}} = 0,918$  und für das komplette Datenset der präzisierte Faktor  $F = 0,916$  zur Umrechnung der Kapillarblutkonzentrationen des Kreatinins verwendet.

Im Bland-Altman-Plot stellte die mit A bezeichnete Linie den Mittelwert der Differenzen aller Messergebnisse dar, welche nun einen Wert von  $0,01 \mu\text{g/mL}$  aufwies. Die mit B und C beschrifteten Linien stellten jeweils den Mittelwert  $\pm 1,96 \cdot$  Standardabweichung der

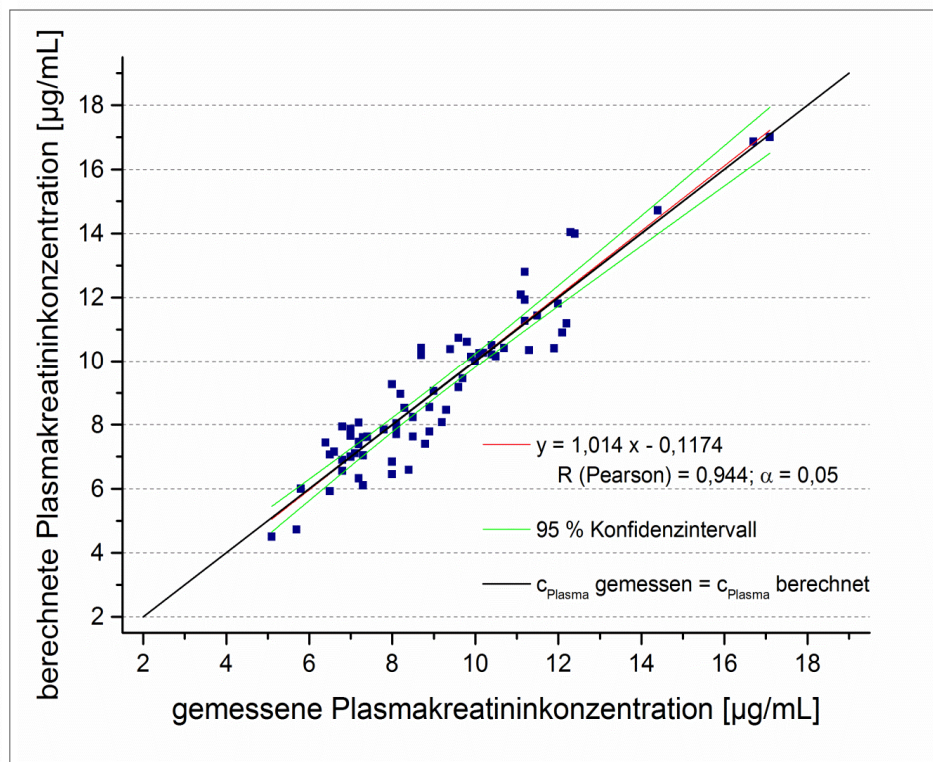
Differenzen dar. Somit lagen 95 % aller Differenzen der durch Messung und Berechnung erhaltenen Werte innerhalb dieser Grenzen (1,65 µg/mL bis -1,63 µg/mL). Die Differenzen der Messergebnisse lagen dementsprechend zwischen 1,65 µg/mL und -1,63 µg/mL. Da der Mittelwert der Differenzen nunmehr sehr nahe dem Wert Null lag konnte man schließen, dass die zwei Messarten sehr gut übereinstimmten (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Bland-Altman Plot zum Vergleich der Plasmakonzentration des Kreatinins, die zum einen durch Messung und zum anderen durch Berechnung über den Faktor F erhalten wurde.** Die mit A bezeichnete Linie stellte den Mittelwert der Differenzen der Messergebnisse dar, die mit B und C bezeichneten Linien stellen jeweils den Mittelwert  $\pm 1,96 \cdot$  Standardabweichung der Differenzen dar. Somit lagen 95 % aller Differenzen der gemessenen und berechneten Kreatininkonzentration im Plasma innerhalb dieser Grenzen (B und C). Durch die Übereinstimmung des Mittelwerts der Differenzen (Linie A) mit Null ist zu sehen, dass die Konzentrationen übereinstimmten, die Messmethoden also ausgetauscht werden konnten.

Der Vergleich der berechneten und gemessenen Serum-/Plasmakonzentration des Kreatinins im gesamten Datenset zeigte eine signifikante Korrelation nach Pearson ( $R = 0,944$ ). Die Ausgleichsgerade des Datensets ( $y = 1,014x - 0,1174$ ) lag nahezu auf der Gerade, die ausdrückte, dass die gemessene  $C_{\text{Plasma}}$  dieselben Werte hatte wie die berechnete  $C_{\text{Plasma}}$  (Abbildung 42). Die Bestimmung der Kreatininkonzentration unter Verwendung des Umrechnungsfaktors war mit einem proportional systematischen Fehler von 1,4 % (Steigung) und einem konstanten systematischen Fehler von 0,117 µg/mL (y-Achsenabschnitt) behaftet. Damit konnte der Faktor verwendet werden, um die

Kapillarblutkonzentrationen verlässlich in die entsprechenden Plasmakonzentrationen umzurechnen (Abbildung 42).



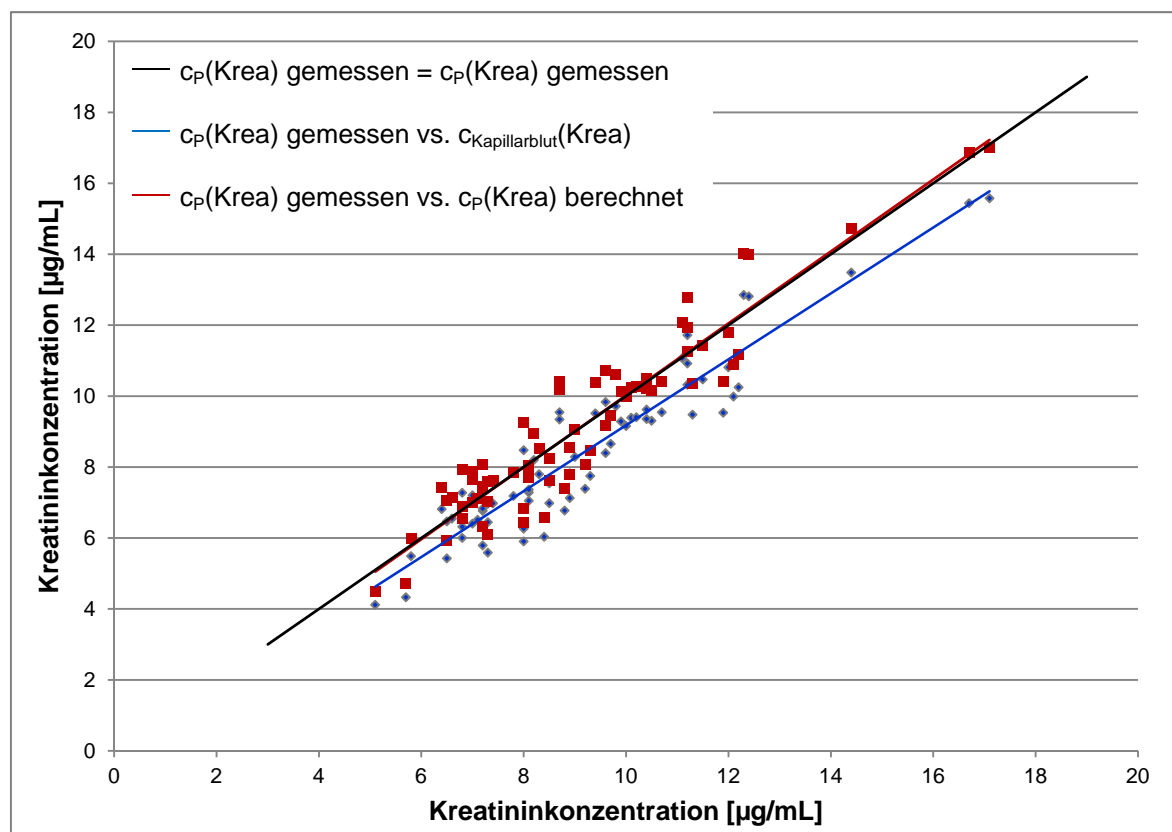
**Abbildung 42: Darstellung der gemessenen in Relation zur berechneten Kreatininkonzentration im Serum/Plasma des gesamten Datensets. Zur Berechnung wurde der Faktor  $F = 0,916$  verwendet.**

### 3.2.3 Diskussion

Kreatinin wird als endogener Marker zum Abschätzen der Nierenfunktion eingesetzt (Einleitung, A3.3.2 und A3.3.3) [4]. Zur vereinfachten Therapiekontrolle sollte Kreatinin deshalb aus Trockenblutproben bestimmt werden (Einleitung, A5). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde der Analyt schon aus Vollblut, zum einen aus DBS, sowohl mit venösem Blut, als auch mit Kapillarblut, zum anderen aber auch aus flüssigen Kapillarblutproben bestimmt [46, 92, 93, 173]. Die dabei erhaltenen Unterschiede der Kreatininkonzentration im Vollblut zu der im Plasma fielen sehr unterschiedlich aus. Koop et al. postulierten keinen Konzentrationsunterschied zwischen Kapillarblut-DBS und Plasmaproben, obwohl sie im Mittel eine Differenz von ca.  $2 \mu\text{g/mL}$  beschrieben [92]. Keevil et al. dagegen berichteten von einer guten Übereinstimmung, wobei in den flüssigen Kapillarblutproben eine niedrigere Konzentration gemessen wurde als in den Plasmaproben (konstanter negativer Fehler:  $42,607 \mu\text{mol/L}$  ( $4,82 \mu\text{g/mL}$ )). Trotzdem diskutierten sie, dass die Messmethoden ausgetauscht werden könnten [173]. Koster et



al. fanden 16 % niedrigere Konzentrationen in den Trockenblutproben aus venösem Blut gegenüber den Plasmaproben, allerdings wurde keine klinische Validierung der Ergebnisse mit Kapillarblut-DBS durchgeführt [93]. In der durchgeführten Basisstudie (Allg. Teil, B2.1 und Exp. Teil, C3.1) wurde eine deutliche Abweichung der Kreatininkonzentrationen in den DBS und im Plasma bestimmt (Allg. Teil, B3.2.1, Abbildung 37). Die im Plasma gemessene Kreatininkonzentration war im Mittel um 0,79 µg/mL größer, als die im Kapillarblut bestimmte Konzentration. Die Richtung des Fehlers deckte sich also mit den Ergebnissen von Keevil und Koster [93, 173]. Koop et al. postulierten dagegen eine größere Konzentration in den DBS [92]. Auch den Burger et al. postulierten eine höhere Kreatininkonzentration in den DBS als im Plasma. Die Differenz lag im Mittel bei einem Wert von 0,74 µg/mL [46]. Sie entdeckten außerdem, dass die Kreatininkonzentration in DBS vom Hämatokrit des Blutes beeinflusst wird und sie entwickelten eine Methode, um diesen Einfluss mithilfe der Kaliumkonzentration im Blut zu korrigieren [46]. Sie verwendeten allerdings nur einen Teil des Spots zur Analyse, weshalb der Hct hier eine große Rolle spielt (Einleitung, A2.3) [46]. Da in der vorliegenden Arbeit das Blut volumetrisch aufgetragen und der gesamte Spot zur Analyse verwendet wurde, war eine Korrektur der Kreatininwerte über den Hämatokrit nicht erforderlich. In ihrer Ergebnisinterpretation beriefen den Burger et al. sich auf die Ergebnisse von Koop et al. und begründeten somit, dass die Differenz in einem tolerierbaren Bereich läge [46]. Auf die Spanne der Normwerte (5 µg/mL – 12 µg/mL; Einleitung, A3.3.2) bezogen stellte die in unserer Studie gefundene mittlere Differenz (0,79 µg/mL) eine prozentuale Abweichung von 11,29 % dar, welche zu groß war, um die Methoden bzw. die Konzentrationen als austauschbar zu akzeptieren. Es wurde deshalb ein Korrelationsfaktor ermittelt, um die Kapillarblutkonzentration in die Plasmakonzentration umzurechnen (Allg. Teil, B3.2). Das Vorgehen zur Faktorentwicklung wurde in Anlehnung an die Entwicklung der MDRD-Formel durchgeführt [176]. Es wurden getrennte Datensets zur Entwicklung und Verifizierung des Faktors verwendet, zudem wurden ca. 65 % der Proben für die Entwicklung und 35 % für die Verifizierung verwendet. Nach erfolgreicher Verifizierung wurde der Faktor, um die Genauigkeit zu verbessern auf das komplette Datenset aktualisiert. Der Vergleich der gemessenen mit den berechneten Plasmakonzentrationen des Kreatinins zeigte deutlich, dass die Umrechnung mithilfe des Faktors zu einer Übereinstimmung der Konzentrationen führte, während die im Kapillarblut gemessenen Konzentrationen deutlich differierten (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Vergleich der gemessenen Kreatininkonzentration im Plasma mit der berechneten Plasmakreatininkonzentration (rot) und den Kapillarblutkonzentrationen (blau).** Die Werte im Kapillarblut wichen dabei deutlich von denen im Plasma ab, was an der Verschiebung der Ausgleichsgerade (blau) gegenüber der Ursprungsgerade (schwarz) zu sehen ist. Im Gegensatz dazu stimmten die über den Faktor berechneten Werte des Kreatinins im Plasma (rote Ausgleichsgerade) mit den gemessenen Werten überein.

### 3.3 Abschätzen der Nierenfunktion mit Hilfe der Cockcroft und Gault Formel

#### 3.3.1 Basisstudie: Vergleich der Nierenfunktion

Mithilfe des optimierten Faktors  $F = 0,916 \pm 0,088$  wurden für die 70 Patienten die Plasmakreatininkonzentrationen berechnet (Tab. Anhang, D3.2.1) und über die Formel nach Cockcroft und Gault (Einleitung, A3.3.2 und A3.3.3) die jeweilige Nierenfunktion abgeschätzt. Sie wurde verglichen mit den Stadien der Nierenfunktion (Einleitung, A3.3.3, Tabelle 1), die mithilfe der direkt gemessenen Plasmakonzentration des Kreatinins abgeschätzt wurden (Tabelle 12; Tab. Anhang, D3.2.2). Für 14 der 70 Patientenproben wurden unterschiedliche Stadien der Niereninsuffizienz (Einleitung, A3.3.3, Tabelle 1) ermittelt (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Stadien der chronischen Nierenerkrankung (CKD) der 70 Patienten der Basisstudie.** Neben den von der Arztpraxis übermittelten Plasmakreatininspiegeln wurden auch die über den Korrelationsfaktor (Allg. Teil, B3.2.2) berechneten Werte verwendet, um die Kreatininclearance über die Formel nach Cockcroft und Gault zu berechnen. Die resultierende Clearance wurde nach den Kriterien der National Kidney Foundation (NKF) in die verschiedenen Stadien (Einleitung, A3.3.3, Tabelle 1) eingeteilt und diese wurden für jeden Patienten miteinander verglichen. Zwischen einer normalen Nierenfunktion und Stadium 1 der Nierenfunktionsstörung konnte hierbei nicht unterschieden werden, da keine Daten bekannt waren, die auf eine eventuell bestehende Mikroalbuminurie hingewiesen hätten (normal/1). Für 14 der 70 Studienteilnehmer resultierten unterschiedliche Stadien (grau hinterlegt).

Nierenfunktion (NKF) Chronical Kidney Disease (CKD) State			Nierenfunktion (NKF) Chronical Kidney Disease (CKD) State		
	C <sub>P</sub> gemessen	C <sub>P</sub> berechnet		C <sub>P</sub> gemessen	C <sub>P</sub> berechnet
<b>1</b>	2	normal/1	<b>36</b>	3	3
<b>2</b>	2	2	<b>37</b>	normal/1	normal/1
<b>3</b>	3	3	<b>38</b>	2	2
<b>4</b>	2	2	<b>39</b>	normal/1	normal/1
<b>5</b>	2	3	<b>40</b>	normal/1	2
<b>6</b>	normal/1	normal/1	<b>41</b>	2	3
<b>7</b>	2	2	<b>42</b>	2	3
<b>8</b>	normal/1	normal/1	<b>43</b>	2	2
<b>9</b>	2	2	<b>44</b>	normal/1	normal/1
<b>10</b>	normal/1	normal/1	<b>45</b>	2	2
<b>11</b>	3	3	<b>46</b>	2	2
<b>12</b>	normal/1	2	<b>47</b>	3	3
<b>13</b>	3	3	<b>48</b>	normal/1	normal/1
<b>14</b>	2	3	<b>49</b>	2	2
<b>15</b>	3	4	<b>50</b>	2	2
<b>16</b>	3	3	<b>51</b>	3	3
<b>17</b>	2	2	<b>52</b>	2	2
<b>18</b>	2	2	<b>53</b>	2	2
<b>19</b>	3	3	<b>54</b>	3	3
<b>20</b>	3	3	<b>55</b>	3	3
<b>21</b>	normal/1	normal/1	<b>56</b>	2	2
<b>22</b>	3	3	<b>57</b>	2	3
<b>23</b>	normal/1	2	<b>58</b>	3	3
<b>24</b>	normal/1	2	<b>59</b>	normal/1	normal/1
<b>25</b>	normal/1	normal/1	<b>60</b>	3	3
<b>26</b>	2	normal/1	<b>61</b>	normal/1	normal/1
<b>27</b>	2	normal/1	<b>62</b>	3	2
<b>28</b>	2	2	<b>63</b>	2	2
<b>29</b>	normal/1	normal/1	<b>64</b>	3	3
<b>30</b>	3	3	<b>65</b>	3	3
<b>31</b>	normal/1	normal/1	<b>66</b>	3	3
<b>32</b>	3	3	<b>67</b>	3	3
<b>33</b>	3	3	<b>68</b>	3	3
<b>34</b>	2	2	<b>69</b>	3	3
<b>35</b>	normal/1	normal/1	<b>70</b>	2	2

### 3.3.2 Feldstudie

Die Plasmakreatininkonzentrationen der Studienteilnehmer wurden wie für die Basisstudie berechnet (Tab. Anhang, D3.2.3) und die Nierenfunktion wurde abgeschätzt (Tabelle 13; Tab. Anhang D3.2.3).

**Tabelle 13: Stadien der chronischen Nierenerkrankung (CKD) der Patienten der Feldstudie.** Die Plasmakreatininkonzentrationen wurden über den Korrelationsfaktor (Allg. Teil, B3.2.2) berechnet und die Kreatininclearance über die Formel nach Cockcroft und Gault bestimmt. Die resultierende Clearance wurde nach den Kriterien der National Kidney Foundation (NKF) in die verschiedenen Stadien (Einleitung, A3.3.3, Tabelle 1) eingeteilt.

Nierenfunktion (NKF) CKD State		Nierenfunktion (NKF) CKD State		Nierenfunktion (NKF) CKD State	
1	normal	30	2	59	2
2	2	31	normal	60	2
3	3	32	normal	62	3
4	2	33	2	63	normal
6	3	34	normal	64	2
7	2	35	3	65	3
8	3	36	3	66	normal
9	2	37	2	67	normal
10	3	38	normal	68	2
11	3	40	3	69	2
12	3	41	3	70	3
14	normal	42	3	71	4
16	3	43	3	72	2
17	2	44	3	73	3
18	2	45	3	74	2
19	3	46	4	75	2
20	normal	48	normal	76	2
21	3	49	1	77	2
22	2	50	3	78	2
23	2	51	3	79	3
24	3	52	normal	80	3
25	2	53	2	81	3
26	2	54	normal	82	2
27	3	55	normal	83	3
28	4	57	2	84	3
29	2	58	2		

### 3.3.3 Diskussion

Beim Vergleich der Nierenfunktionen, die mithilfe der berechneten und der von der diabetologischen Praxis übermittelten Plasmakreatininkonzentration abgeschätzt wurden, traten für die Patienten der Basisstudie Abweichungen in der Klassifizierung der Nierenfunktionseinschränkung nur dann auf, wenn die Werte der Kreatininclearance für

den jeweiligen Patienten sehr nahe an der Grenze zwischen zwei Stadien lagen. Die maximale Abweichung der an der Grenze liegenden und in zwei Stadien resultierenden Werte der Kreatininclearance lag für Patient 24 bei 12,86 mL/min (13,56 %) (Allg. Teil, B3.3.1, Tabelle 12). Damit konnte bestätigt werden, dass die über den Faktor berechnete Plasmakonzentration des Kreatinins verwendet werden kann, um mithilfe der Formel nach Cockcroft und Gault die Kreatininclearance zu berechnen und Nierenfunktion abzuschätzen.

Die Kreatininclearance sinkt mit steigendem Alter ab [177, 178]. Aus den Daten der durchgeführten klinischen Studien konnte ebenfalls erfolgreich eine signifikante Korrelation der nachlassenden Kreatininclearance (nachlassende Nierenfunktion) mit steigendem Alter nachgewiesen werden (Pearson Korrelation;  $R = -0,5573$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = -1,2616x + 155,54$ ). Mit jedem Lebensjahr sank die Kreatininclearance um 1,26 mL/min ab. Cohen et al. untersuchten das jährliche Absinken der Kreatininclearance in einer Studienpopulation bestehend aus gesunden Probanden, aber auch Personen mit Komorbiditäten wie Diabetes mellitus und Bluthochdruck [178]. Sie zeigten in der gesamten Studienpopulation ein jährliches Absinken der Kreatininclearance um 0,97 mL/min, wurden nur gesunde Probanden über 40 Jahre betrachtet, so sank die Clearance jährlich um 1,07 mL/min, bzw. für über 50 jährige Probanden um 1,15 mL/min ab [178]. Die Werte liegen also im Bereich der von uns gefundenen Werte. Für die Korrelation in der vorliegenden Arbeit wurden die über den Faktor berechneten Werte der Plasmakreatininkonzentration verwendet, um die Kreatininclearance zu berechnen, sodass auch diese Ergebnisse erfolgreich darlegten, dass es zum ersten Mal möglich ist, aus der Kapillarblutkonzentration die Nierenfunktion abzuschätzen.

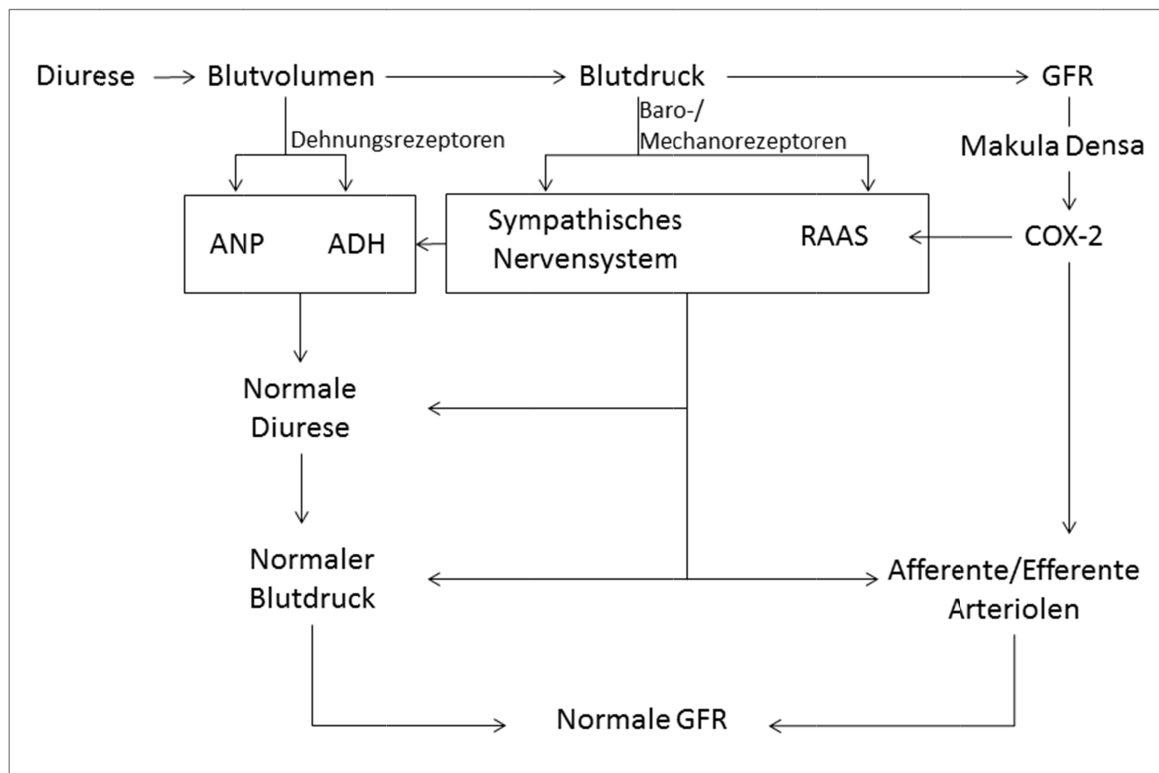
### **3.4 Der „triple whammy“ Effekt**

#### **3.4.1 Hintergrund**

Verschiedene Arzneimittel haben einen negativen Einfluss auf die Nierenfunktion [69]. Zum ersten Mal wurde 2000 der Begriff „triple whammy“ von Merlin C. Thomas verwendet, um die potentielle Nephrotoxizität der kombinierten Anwendung von Diuretika, ACE-Inhibitoren und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAIDs) zu beschreiben [179, 180]. Von Loboz und Shenfield konnte 2005 gezeigt werden, dass die gleichzeitige Einnahme von Diuretika, NSAIDs, ACE-Inhibitoren und/oder Angiotensinrezeptorantagonisten einen eindeutigen ungünstigen Einfluss auf die Nierenfunktion hat [68]. Zudem diskutierten sie einen Zusammenhang zwischen der Dosis der eingenommenen Diuretika und der

Nierenfunktion [68]. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten einen eindeutigen Zusammenhang auf [181-183].

Die Nierenfunktion wird über die GFR bzw. die Kreatininclearance bestimmt (Einleitung, A3.3) [80]. Die GFR wiederum ist ein Parameter, der im Körper einer Autoregulation unterliegt [184]. Das Gleichgewicht zwischen Blutvolumen, Blutdruck und der glomerulären Filtrationsrate wird im Normalfall durch verschiedene Faktoren reguliert (Abbildung 44).



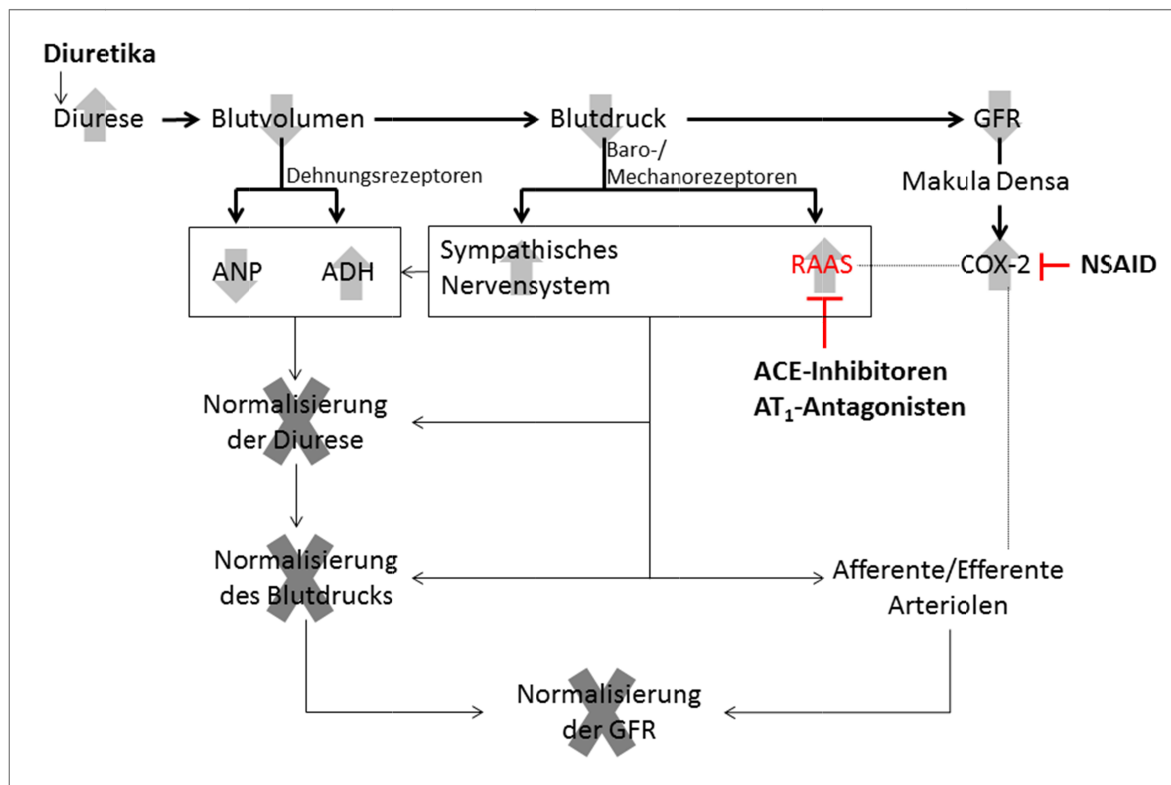
**Abbildung 44: Schematische Darstellung der Regulation von Blutvolumen, Blutdruck und der GFR.** Über diverse Rezeptoren werden im Körper Veränderungen im Blutvolumen, Blutdruck oder der GFR registriert und verschiedene Stoffwechselprozesse in Gang gesetzt, um den Körper wieder ins Gleichgewicht zu bringen. Es werden dabei über Dehnungs-/Volumenrezeptoren Atriopeptin (ANP) oder Adiuretin (ADH) ausgeschüttet, über Baro- und Mechanorezeptoren wird das sympathische Nervensystem beeinflusst und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert oder inhibiert. Die Makula densa aktiviert gegebenenfalls die Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche Einfluss nimmt auf das RAAS sowie auf afferente und efferente Arteriolen.  
Die Abbildung wurde modifiziert nach [184].

Über Volumensensoren (Dehnungsrezeptoren) in den Vorhöfen des Herzens wird das Blutvolumen kontrolliert und bei Bedarf entweder Adiuretin (Antidiuretisches Hormon; ADH) oder Atriopeptin (Atriales natriuretisches Peptid; ANP) ausgeschüttet [4]. ADH bewirkt dabei eine verstärkte Wasserrückresorption, ANP zeigt eine natriuretische Wirkung [4]. Der Blutdruck wird über Barorezeptoren im arteriellen Gefäßsystem überwacht [4]. Wird hier ein zu niedriger Blutdruck registriert, wird der Sympathikustonus

erhöht, was mit einer Erhöhung des Herzzeitvolumens und des peripheren Widerstands einhergeht, zudem wird durch Aktivierung des Sympathischen Nervensystems ADH freigesetzt [4, 184]. Wird ein zu hoher Blutdruck registriert, wird eine Erniedrigung desselben induziert. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das zu einer Rückresorption von Wasser und somit einer Erhöhung des Blutdrucks führt, wird ebenfalls durch einen Abfall des arteriellen Blutdrucks aktiviert [4]. An der Kontaktstelle zwischen distalem Tubulus und der Vas afferens im Tubulusbereich der Nieren findet sich die Makula densa (Bereich mit hohen, schmalen Zellen), die bei einer erniedrigten Konzentration an Natriumionen im Plasma einen mehrstufigen Prozess induziert und unter anderem über die Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) die Reninbildung und -freisetzung vorantreibt und somit das RAAS aktiviert [4, 184]. Die Makula densa ist des Weiteren am tubuloglomerulären Feedback beteiligt [184]. Werden durch erhöhten Blutdruck dementsprechend erhöhte Natriumkonzentrationen erkannt, so werden die afferenten Arteriolen kontrahiert und die Efferenten dilatiert, wodurch die Blutzufuhr in den Glomeruluskapillaren reduziert wird, um so den Blutdruck zu senken [4, 184]. Entsprechend gegenteilig erfolgt dies bei zu niedrigem Blutdruck (Abbildung 44). Dieser Regulationsmechanismus wird durch die oben genannten Arzneistoffklassen gestört bzw. verändert, wodurch sich die Beeinflussung der Nierenfunktion durch ebendiese Arzneistoffe erklären lässt.

Die alleinige Gabe von Diuretika aktiviert durch die induzierte Diurese alle Systeme, die den Blutdruck erhöhen und Wasser rückresorbieren, sodass der Blutdruck, das Blutvolumen und die GFR wieder normalisiert werden [184]. Werden ACE-Inhibitoren bzw. Angiotensinrezeptorantagonisten als Monotherapie gegeben, so wird das RAAS ausgehebelt und bei Änderungen im Blutdruck oder der GFR kann es nicht mehr regulierend eingreifen [184]. Die Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika inhibiert die COX-2, welche zum einen mitverantwortlich sind für das RAAS und zum anderen am tubuloglomerulären Feedback beteiligt sind, sodass auch hier der Regulationsmechanismus beeinträchtigt ist [184]. Für die Zweifachtherapien von Diuretika mit ACE-Inhibitor bzw. Angiotensinrezeptorantagonist gilt, dass eine Aktivierung der antidiuretischen Systeme als Folge der Diuretikagabe erfolgt, diese aber teilweise durch die Hemmung des RAAS verhindert werden, sodass die Regulation der Diurese und des Blutdrucks nicht erfolgen kann, die GFR kann aber über die Makula densa über den COX-2 Weg reguliert werden [184]. Werden zu den Diuretika aber NSAIDs gegeben, wird auch diese Regulation blockiert, stattdessen kann das RAAS aber über die Baro- und Mechanorezeptoren aktiviert werden [184]. Eine Zweifachkombination von NSAIDs mit einem ACE-Inhibitor bzw. Angiotensinrezeptorantagonisten hat zur Folge, dass kein Regulationsmechanismus, in welchen die beiden Arzneistoffklassen eingreifen, wirken

kann, allerdings kommt es in dieser Kombination per se zu keiner Aktivierung der antidiuretischen Systeme [184]. Generell kann man sagen, dass es im Falle der Mono- oder Zweifachtherapie immer, wenn auch erschwert, über einen Weg zur Normalisierung der GFR kommen kann, im Gegensatz dazu ist dies unter Dreifachtherapie verhindert (Abbildung 45) [184].



**Abbildung 45: Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen zwischen Blutvolumen, Blutdruck und GFR unter Dreifachtherapie mit Diuretika, ACE-Inhibitoren bzw. Angiotensinrezeptorantagonisten und NSAIDs.**

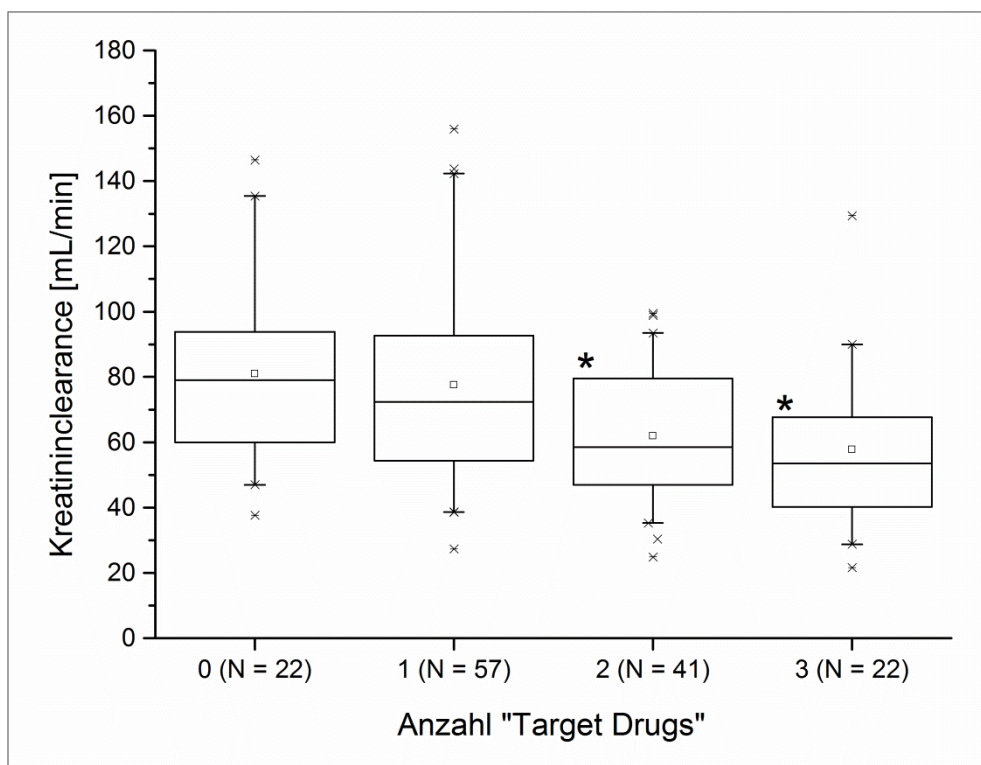
Die Abbildung wurde modifiziert nach [184].

Kann die glomeruläre Filtrationsrate nicht normalisiert werden, wird dies auch als „pre-renales akutes Nierenversagen“ bezeichnet, woraus sich ein akutes Nierenversagen entwickeln kann [184]. Lapi et al. publizierten 2013 eine Studie, in welcher sie darlegten, dass das Risiko zur Entwicklung eines akuten Nierenversagens unter Dreifachtherapie gegenüber der Zweifachtherapie mit NSAIDs, die zusammen mit Diuretika, ACE-Inhibitoren oder Angiotensinrezeptorantagonisten gegeben wurden, um 31 % ansteigt [185]. Die meisten Fälle traten dabei in den ersten 30 Tagen der Therapie auf [185]. Faktoren, die ein akutes Nierenversagen unter einer Dreifachtherapie begünstigen, könnten unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen, andere Xenobiotika, Polymorphismen oder auch eine CKD oder Arteriosklerose sein, allerdings ist dies individuell von Patient zu Patient unterschiedlich [184].



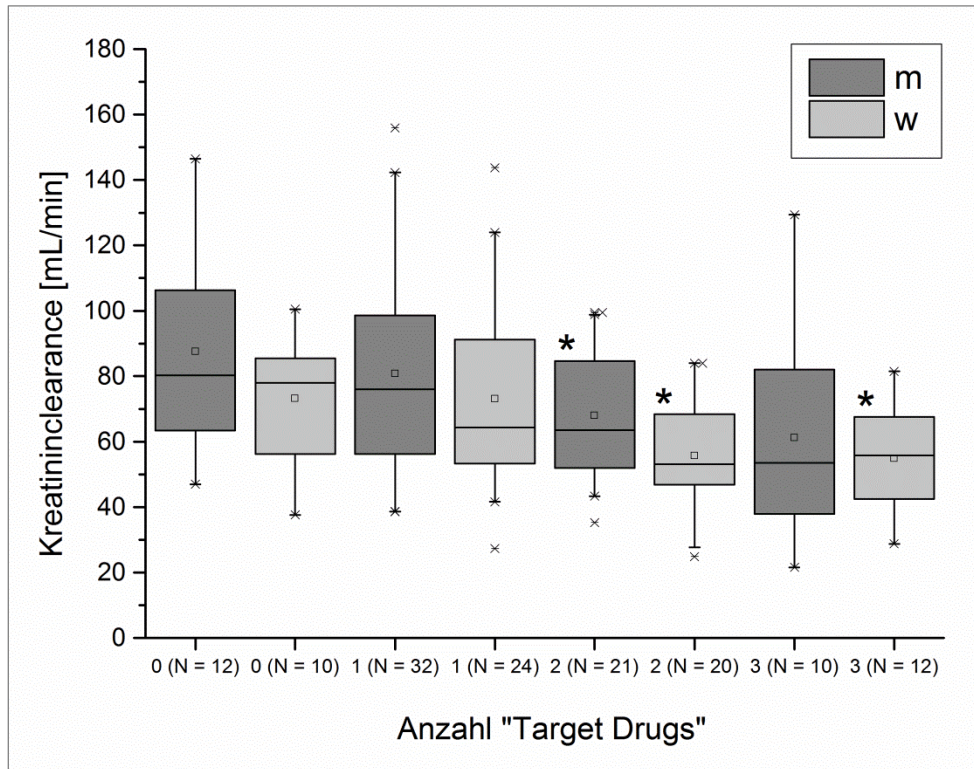
### 3.4.2 Ergebnisse

Die Proben der klinischen Studien (Allg. Teil, B2.1 und B2.2) wurden hinsichtlich dieses Effektes ausgewertet. Es wurde dazu die aus den DBS bestimmte Kreatininclearance verwendet. Nahmen die Patienten zwei oder drei der „Target Drugs“ (Diuretika, NSAIDs, ACE-Inhibitoren und/oder Angiotensinrezeptorantagonisten) ein, so korrelierte dies mit einer signifikant erniedrigten Kreatininclearance im Vergleich zu Patienten, die keines dieser Arzneimittel einnahmen (t-Test,  $p < 0,05$ ). Unter Therapie mit nur einem dieser Arzneimittel konnte kein signifikanter Unterschied der Clearance verglichen mit der Einnahme von keinem der Arzneimittel beobachtet werden (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Korrelation der Einnahme von Diuretika, nichtsteroidalen Antirheumatika, ACE-Inhibitoren und/oder Angiotensinrezeptorantagonisten auf die Kreatininclearance. Die Stichprobengröße (N) schwankte von 22 bis 57 Patienten. Für die Einnahme von zwei oder drei Arzneimitteln konnte eine signifikante Veränderung (\*) in der Kreatininclearance gegenüber des Patientenkollektivs, das keines der „Target Drugs“ einnahm, gezeigt werden. Die Box stellt das obere, bzw. untere Quartil dar, die Whisker stellen den 5 %, bzw. 95 % Wert dar.

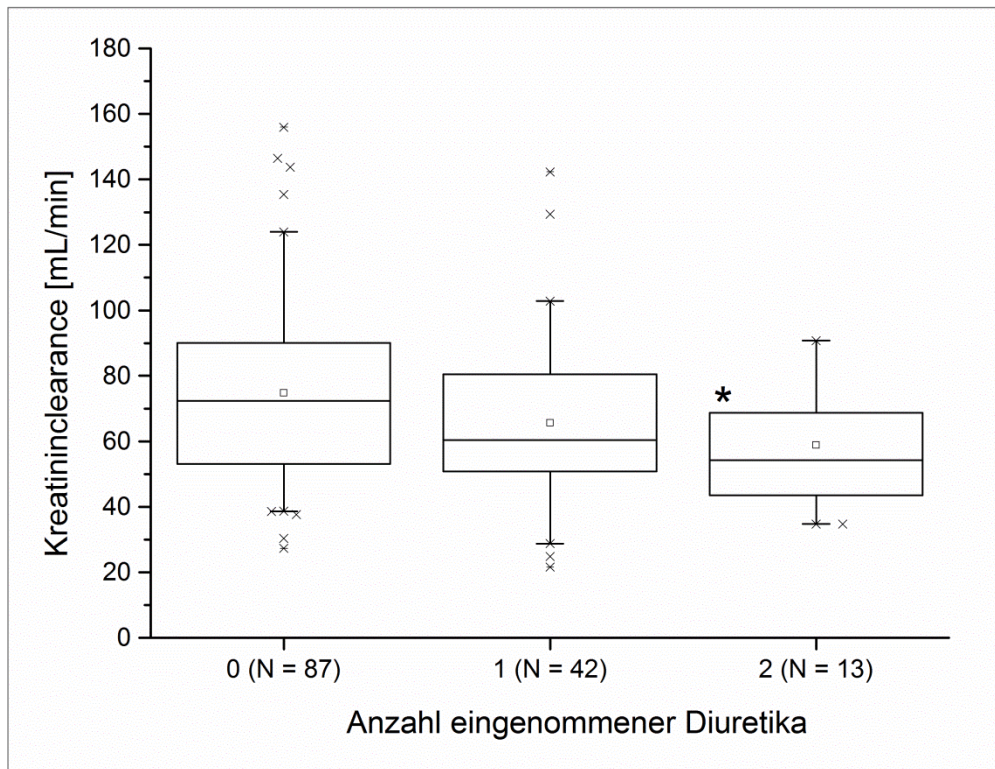
Die Daten wurden zusätzlich geschlechterspezifisch ausgewertet. Weibliche Patienten, die zwei oder drei „Target Drugs“ einnahmen, hatten eine signifikant erniedrigte Kreatininclearance verglichen zur Nichteinnahme (t-Test,  $p < 0,05$ ). Für die männlichen Patienten dagegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur für die Einnahme von zwei der „Target Drugs“ (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Geschlechterspezifische Auswertung der Korrelation der Einnahme von Diuretika, nichtsteroidalen Antirheumatika, ACE-Inhibitoren und/oder Angiotensinrezeptorantagonisten mit der Kreatinin-clearance. Die Stichprobengröße (N) schwankte von 10 bis 24 Patienten. Für weibliche Patienten (w) korrelierte die Einnahme von zwei oder drei Arzneimitteln mit einer signifikanten Veränderung der Kreatinin-clearance (\*) gegenüber dem Kollektiv ohne Einnahme einer „Target Drug“. Für männliche Patienten (m) konnte eine Signifikanz (\*) für die Einnahme von zwei „Target Drugs“ nachgewiesen werden. Die Box stellt das obere, bzw. untere Quartil dar, die Whisker stellen den 5 %, bzw. 95 % Wert dar.**

Der Unterschied zwischen der Kreatinin-clearance der männlichen und weiblichen Patienten mit derselben Anzahl eingenommener „Target Drugs“ war nur für die Einnahme von zwei Arzneimitteln signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die Anzahl der eingenommenen Diuretika korrelierte mit einer schlechteren Kreatinin-clearance. Die Einnahme von zwei Diuretika war trotz der relativ kleinen Stichprobenanzahl (Anzahl eingenommener Diuretika/Anzahl Patienten: 0/87, 2/13) von einer signifikant geringeren Kreatinin-clearance begleitet (t-Test,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu jener der Patienten, die kein Diuretikum einnahmen (Abbildung 48). Die Einnahme von nur einem Diuretikum korrelierte nicht mit einer statistisch signifikant geringeren Kreatinin-clearance.



**Abbildung 48: Korrelation der Anzahl der eingenommenen Diuretika auf die Nierenfunktion der Patienten der klinischen Studien. Für die Einnahme von zwei Diuretika konnte eine signifikante (\*) Veränderung der Kreatinin-clearance gegenüber der Einnahme von keinem Diuretikum nachgewiesen werden. Die Stichprobengröße (N) schwankte von 13 bis 87 Patienten. Die Box stellt das obere, bzw. untere Quartil dar, die Whisker stellen den 5 %, bzw. 95 % Wert dar.**

### 3.4.3 Diskussion

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von zwei oder drei der „Target Drugs“ signifikant mit einer Abnahme der Kreatinin-clearance korrelierte (Allg. Teil, B3.4.2). Die Einnahme eines der Arzneimittel war nicht von einer signifikant niedrigeren Kreatinin-clearance begleitet, ein Trend dazu war aber aufgrund der erniedrigten Werte (MW  $\pm$  SD;  $77,64 \pm 28,50$  mL/min) gegenüber den Patienten, die keines dieser Arzneimittel einnahmen zu erkennen ( $81,03 \pm 26,58$  mL/min) (Allg. Teil, B3.4.2). Loboz und Shenfield berichteten von einer signifikanten Erniedrigung der Kreatinin-clearance unter Therapie mit einem oder mehreren der „Target Drugs“, allerdings war die Stichprobenanzahl in ihrer Studie wesentlich höher (Gruppe/Stichprobe; 0/135, 1/87, 2/60, 3/19) als in den von uns durchgeführten Studien (0/22, 1/57, 2/41, 3/22) [68]. In ihrer Arbeit wurde zudem von einem signifikanten Unterschied der Kreatinin-clearance zwischen männlichen und weiblichen Patienten, die dieselbe Anzahl an „Target Drugs“ einnahmen, berichtet (Stichprobenanzahl 8 bis 62 Patienten) [68]. In unseren Studien konnte ein signifikanter Unterschied nur für die Einnahme von zwei dieser Arzneistoffe nachgewiesen werden, allerdings war auch hierfür eine wesentlich kleinere Stichprobengröße vorhanden

(10 bis 32 Patienten). Prieto-Garcia et al. postulierten 2016, dass die Einnahme von Diuretika eine Schlüsselrolle in der Entstehung des pre-renalen akuten Nierenversagens spielt [184]. In der vorgestellten Arbeit konnte diese Theorie bestärkt werden, da eine signifikant niedrigere Kreatininclearance in Patienten die zwei Diuretika einnahmen, gegenüber Patienten, die kein Diuretikum einnahmen (Allg. Teil, B3.4.2) beobachtet wurde. Ebenso wurde eine Tendenz, dass auch die Einnahme von nur einem Diuretikum die Kreatininclearance beeinflusst (kein Diuretikum gegenüber einem Diuretikum (MW  $\pm$  SD):  $74,76 \pm 27,32$  mL/min gegenüber  $65,52 \pm 25,21$  mL/min) gefunden.

## **4 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Metformin**

### **4.1 Hintergrund**

Für nahezu 25 % der Patienten, die Metformin als orales Antidiabetikum einnehmen ist dies kontraindiziert [104] und trotzdem nehmen die Verordnungen für diesen Arzneistoff vor allem bei älteren Patienten zu [115]. Gleichzeitig mit der Zunahme der Verordnungen trat auch eine Zunahme der Spontanberichte über Laktatazidose auf [115]. Für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 mit Metformin wird empfohlen, die Nierenfunktion mindestens einmal jährlich zu überprüfen, da dieser renal eliminierte Arzneistoff durch Akkumulation aufgrund einer schlechten Nierenfunktion zu einer Laktatazidose führen kann (Einleitung, A4.1) [99, 115]. Für die Dosierung wird deshalb empfohlen, diese für Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion dementsprechend anzupassen bzw. zu reduzieren [102].

Die Erythrozyten sind als tiefes Kompartiment des Metformins beschrieben [106, 109, 111]. Aus diesem wird der Arzneistoff langsamer eliminiert als aus Plasma [106]. Therapeutische Bereiche für Metformin liegen sowohl für die Plasma-, als auch für die Erythrozytenkonzentration vor [109, 111], allerdings gibt es keine Daten über die Konzentrationen im Kapillarblut (Einleitung, A4.1). Aufgrund der Kumulation in den Erythrozyten, ist es sinnvoll, die Vollblutkonzentration zu erfassen. Als sehr einfache, für den Patienten auch wenig aufwändige Möglichkeit, würde sich hierzu die entwickelte Dried-Blood-Spot Methode eignen. Bevor sie angewandt werden kann, war das erste Ziel, typische Kapillarblutspiegel des Metformins zu ermitteln. Zudem könnten auch weitere mögliche demografische Einflussfaktoren auf den Blutspiegel ermittelt werden.

## 4.2 Bestimmung der Metforminkonzentration aus Dried Blood Spots

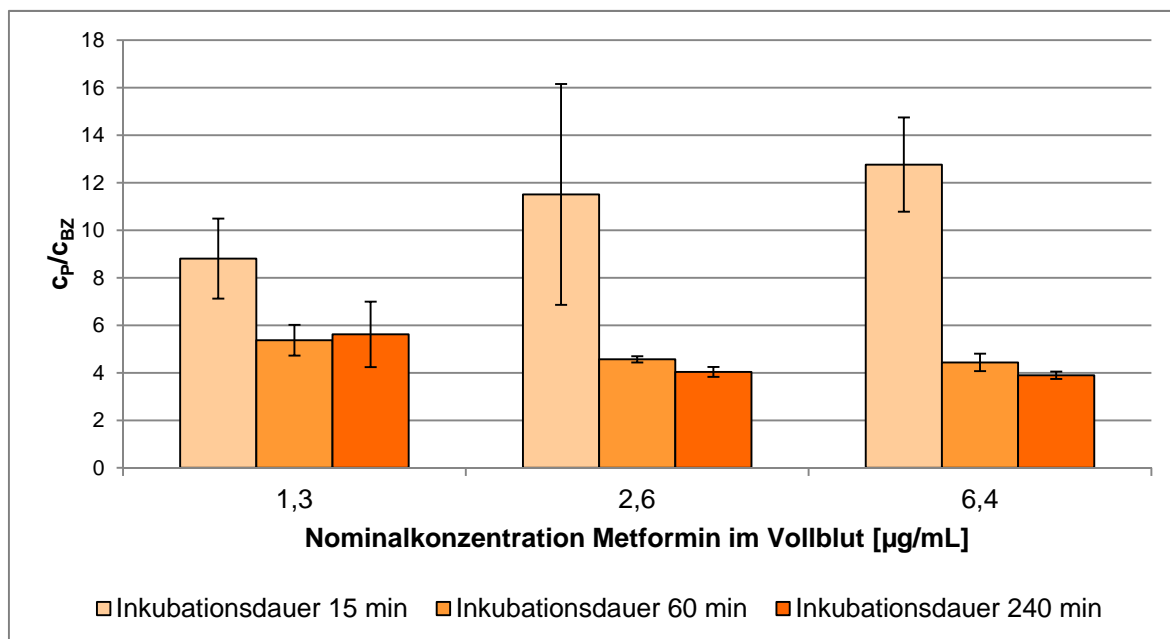
### 4.2.1 Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen *in-vitro*

#### 4.2.1.1 Hintergrund

Die *in-vitro*-Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und den Blutzellen wurde bestimmt, um zu ermitteln, wie der Kapillarblutspiegel des Metformins im Vergleich zum Plasmaspiegel zu bewerten ist. Es wurden in der Literatur schon Faktoren für die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und den Blutzellen publiziert [106, 109, 111], die allerdings zwischen 0,63 und 5,7 schwankten (Allg. Teil, B4.2.1.3, Tabelle 14).

#### 4.2.1.2 Ergebnisse

Zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten der Konzentration des Metformins im Plasma ( $c_P$ ) gegenüber der in den Blutzellen ( $c_{BZ}$ )  $c_P/c_{BZ}$ , wurden die Vollblutproben sowie Blutzellproben mittels der validierten Methode (Exp. Teil, C5.2.1) quantifiziert (Exp. Teil, C5.2.2.4). Für jede Probe wurde anschließend durch Division der Plasma- durch die Blutzellkonzentration ein Verteilungskoeffizient  $c_P/c_{BZ}$  berechnet, der eine Aussage darüber macht, ob die Blutzellen ein bedeutendes Kompartiment für den Arzneistoff darstellen. Der Verteilungskoeffizient nach 15 min wich mit einem Wert von  $10,97 \pm 3,03$  (MW  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert (MDM)) sehr stark von dem nach 60 min bzw. 240 min ab, die mit Werten von  $4,79 \pm 0,46$  bzw.  $4,52 \pm 0,95$  sehr nahe beieinander lagen. Beim Vergleich der Verteilungskoeffizienten nach 60 min mit denen nach 240 min ergab sich kein signifikanter Unterschied (t-Test;  $p < 0,05$ ). Für jeden Zeitpunkt wurden drei Konzentrationen getestet. Die Verteilungskoeffizienten waren hierbei weder für 60 min, noch für 240 min für die jeweiligen Konzentrationen (1,3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,4  $\mu\text{g/mL}$  und 6,4  $\mu\text{g/mL}$ ) signifikant unterschiedlich (ANOVA;  $p < 0,05$ ), womit gezeigt wurde, dass der Verteilungskoeffizient unabhängig von der Konzentration war (Abbildung 49). Der Verteilungskoeffizient, bestimmt als Mittelwert  $\pm$  der mittleren Abweichung vom Mittelwert nach 60 min und 240 min für Metformin betrug  $4,65 \pm 0,73$ .



**Abbildung 49: Verteilung verschiedener Konzentrationen von Metformin zwischen Plasma ( $c_p$ ) und Blutzellen ( $c_{BZ}$ ) nach 15 min, 60 min und 240 min.** Die Säulen stellen den Mittelwert (MW) und die mittlere Abweichung vom MW aus  $n = 3$  bzw.  $n = 2$  (Inkubation von 2,6  $\mu\text{g/mL}$  für 15 min) Proben dar.

#### 4.2.1.3 Diskussion

Zu Beginn der Versuche lag Metformin hauptsächlich im Plasma vor (hoher Verteilungskoeffizient nach 15 min), ging dann aber langsam in die Blutzellen über, wobei die Verteilung nach 60 Minuten abgeschlossen war, da sich nach 240 min keine Veränderung im Koeffizienten mehr zeigte. Der Verteilungskoeffizient  $4,65 \pm 0,73$  zeigte, dass die Konzentration im Plasma mehr als viermal höher im Vergleich zu der in den Blutzellen war.

Lalau und Lacroix haben 2003 durch die Bestimmung der Konzentration von Metformin in Plasma und den Erythrozyten bewiesen, dass Metformin in den Erythrozyten akkumuliert [109]. Dazu wurde bei 58 Patienten mit einem stabilen Diabetes mellitus Typ 2, die schon lange erfolgreich mit Metformin in einer Dosis von 1700 – 2550 mg/Tag therapiert wurden, Blut abgenommen und daraus die Plasma- und Erythrozytenkonzentration bestimmt, um somit den therapeutischen Bereich einer erfolgreichen Behandlung zu etablieren. Zum anderen wurde Metformin in Plasma und Erythrozyten von 93 Patienten, deren Blut untersucht wurde, um eine eventuelle Akkumulation aufzudecken, quantifiziert. Die ermittelten *in-vivo*-Verteilungskoeffizienten  $c_p/c_E$  lagen im therapeutischen Bereich bei 0,63 (Bereich: 0,08 – 2,25), für die Proben, die zur besseren Therapieeinstellung eingesandt wurden bei 1,56 [109]. Daten von 467 Patienten, deren Blut untersucht werden sollte, um die Therapie mit Metformin zu überprüfen bzw. anzupassen, wurden 2011 publiziert. Aus allen Daten wurde ein Verteilungskoeffizient von 1,35 berechnet, der

deutlich niedriger als der von uns gefunden Koeffizient ist [111]. Robert et al. haben 2003 die Kinetik des Metformins in Plasma und Erythrozyten näher untersucht. Dazu wurde gesunden Probanden eine Einmaldosis von 850 mg Metformin HCl (663 mg Metformin als Base) verabreicht und anschließend die Pharmakokinetik im Plasma und den Erythrozyten verglichen. Zum Zeitpunkt des  $t_{max}$  für Plasma und Erythrozyten, der sich nicht signifikant voneinander unterschied, lag ein  $c_p/c_E$  von 5,7 (Bereich: 5,3 – 6) vor, allerdings war die Eliminationshalbwertszeit aus den Erythrozyten um ein Vielfaches höher als aus Plasma [106]. Die Bestimmung der Metforminkonzentration in den Erythrozyten wäre somit ein besserer Marker für die Akkumulation des Arzneistoffes als die Plasmakonzentration [109, 111].

Die Verteilung des Metformins *in-vivo* ist ein dynamischer Prozess, der auch durch die Elimination beeinflusst wird, wohingegen der von uns gewählte *in-vitro*-Versuchsaufbau statisch war. Trotzdem lag der berechnete Verteilungskoeffizient  $c_p/c_{BZ}$  von  $4,65 \pm 0,73$  in dem Bereich, der schon von Robert et al. publizierten Werte (Tabelle 14), sodass der Versuchsaufbau zur Bestimmung der Verteilung geeignet schien.

**Tabelle 14: Vergleich der publizierten Verteilungskoeffizienten ( $c_p/c_E$  bzw.  $c_p/c_{BZ}$ ) für die Verteilung von Metformin in Plasma und Erythrozyten bzw. Blutzellen.** Angegeben ist der Mittelwert und die mittlere Abweichung vom Mittelwert (MDM), sowie die Stichprobenanzahl (N).

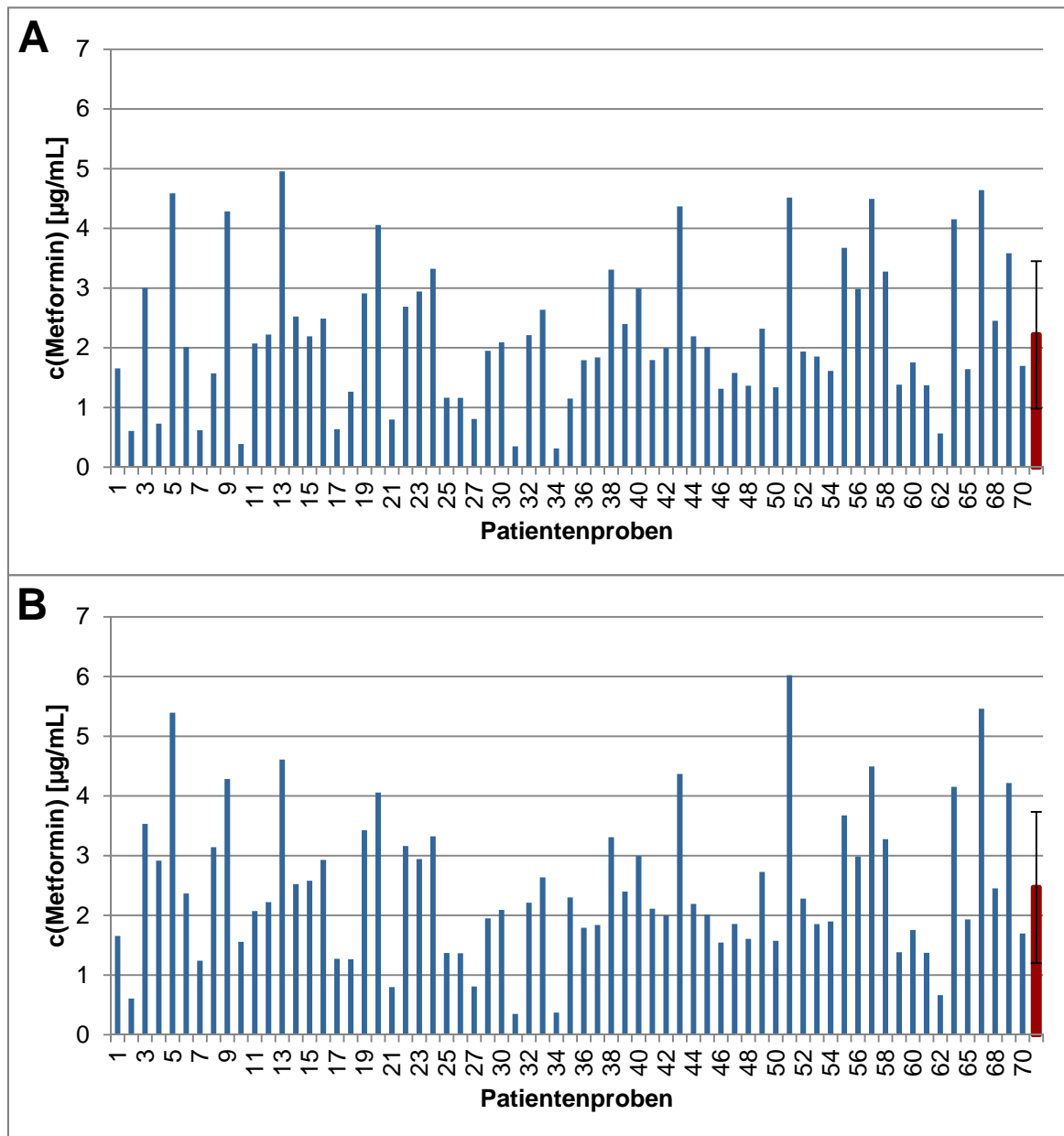
	$c_p/c_E$ bzw. $c_p/c_{BZ}$	MDM	N
Eigene Ergebnisse	4,65	0,73	18
Lalau et al. 2003 "therapeutisch"	0,63	k.A.	58
Lalau et al. 2003	1,56	k.A.	93
Lalau et al. 2011	1,35	k.A.	467
Robert et al. 2003	5,7	k.A.	6

#### 4.2.2 Bestimmung der Metforminkonzentrationen in Patientenproben der klinischen Studien

##### 4.2.2.1 Basisstudie

In allen 67 Proben (Allg. Teil, B2.1, Abbildung 36) konnte die Metforminkonzentration bestimmt werden. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten dabei von 0,32  $\mu\text{g/mL}$  bis 4,96  $\mu\text{g/mL}$ . Allerdings variierte auch die täglich eingenommene Dosis des Arzneistoffs zwischen 500 mg und 2150 mg. Wurden die Kapillarblutkonzentrationen auf eine Tagesdosis von 2000 mg normiert, so ergab sich daraus ein Bereich von 0,35  $\mu\text{g/mL}$  bis 6,02  $\mu\text{g/mL}$  (Abbildung 50).



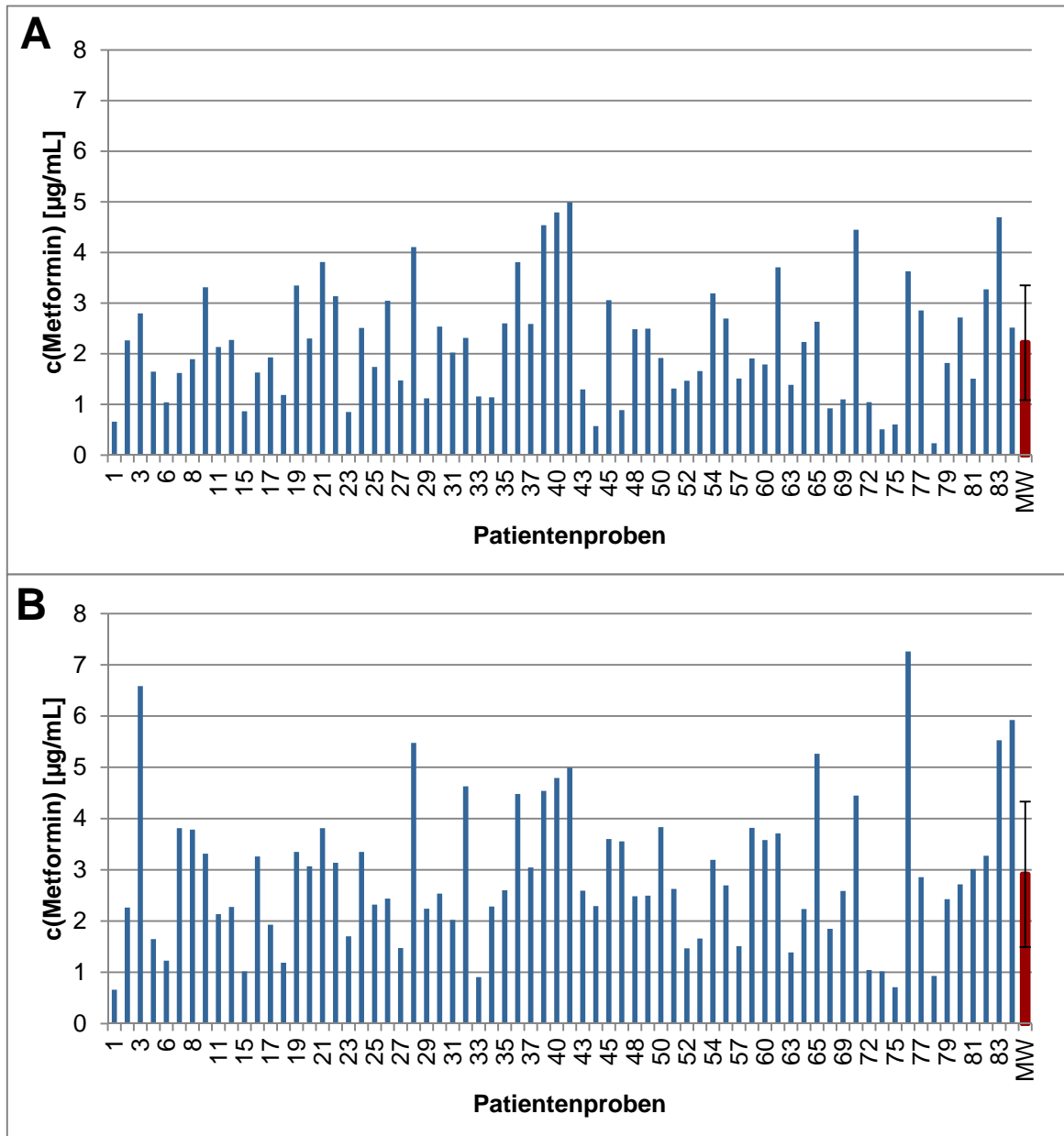


**Abbildung 50: Metforminkonzentrationen im Kapillarblut der Studienproben der Basisstudie (n = 67).** Dargestellt sind die Einzelwerte und der daraus resultierende MW  $\pm$  SD (rote Säule) der gemessenen Blutspiegel (A) und der auf 2000 mg pro Tag normalisierten Blutspiegel (B).

#### 4.2.2.2 Feldstudie

In 70 Studienproben konnte die Metforminkonzentration bestimmt werden (Allg. Teil, B2.1, Abbildung 36), in zweien schlug die Quantifizierung aufgrund von Problemen in der Chromatographie fehl. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten zwischen 0,23 µg/mL und 4,99 µg/mL. Die täglich eingenommen Dosis des Arzneistoffs lag zwischen 500 mg und 2550 mg. Wurden die Kapillarblutkonzentrationen auf eine Tagesdosis von 2000 mg normiert, so reichte der Bereich der Metforminkonzentration von 0,66 µg/mL bis 7,26 µg/mL (Abbildung 51).





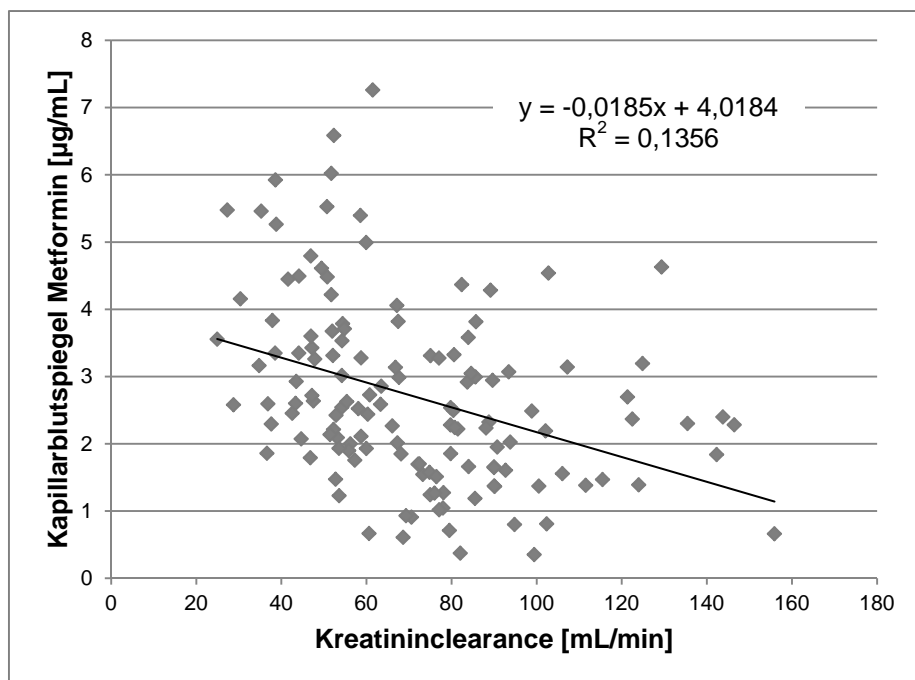
**Abbildung 51: Metforminkonzentrationen im Kapillarblut der Studienproben der Feldstudie (n = 70).** Dargestellt sind die Einzelwerte und der daraus resultierende Mittelwert (MW)  $\pm$  SD (rote Säule) der gemessenen Blutspiegel (A) und der auf 2000 mg pro Tag normalisierten Blutspiegel (B).

## 4.3 Populationspharmakokinetische Betrachtung

### 4.3.1 Ergebnisse

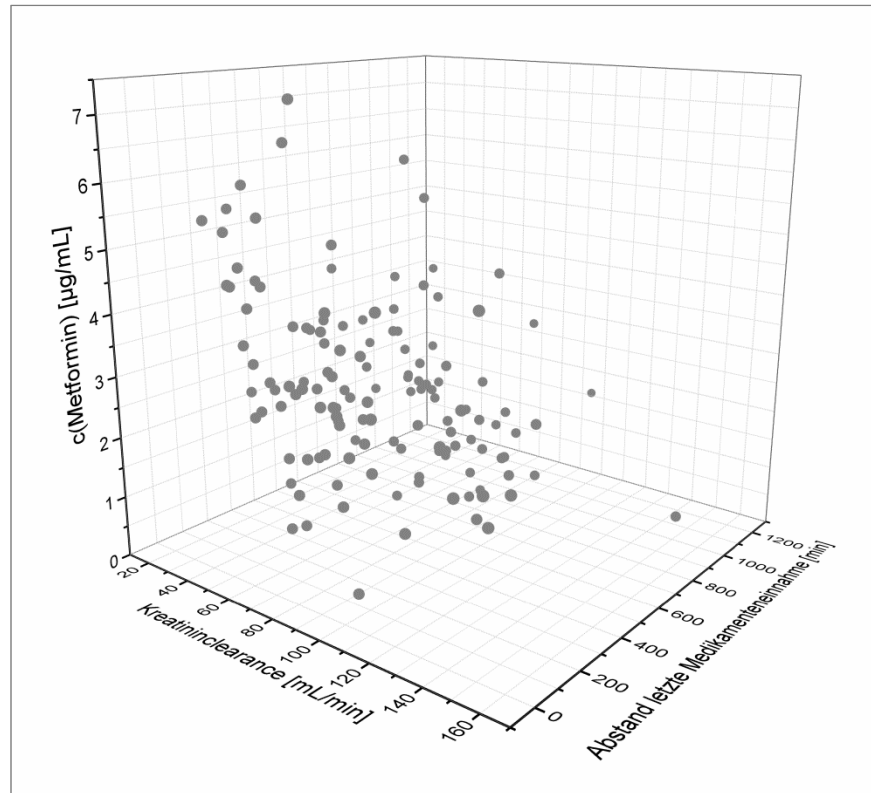
Aus den Daten beider Studien (Allg. Teil, B4.2.2.1 und B4.2.2.2) wurden die unter der Therapie typischen Kapillarblutspiegel für Metformin ermittelt. In 137 Patientenproben wurde eine mittlere Konzentration von  $2,22 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$  (MW  $\pm$  SD) und ein Median von  $2,01 \mu\text{g/mL}$  bestimmt. Die Schwankung der Werte reichte dabei von  $0,23 \mu\text{g/mL}$  bis  $4,99 \mu\text{g/mL}$  für einen Dosisbereich von 500 mg bis 2550 mg.

Eine hohe Metforminkonzentration im Kapillarblut korrelierte dabei schwach aber statistisch signifikant mit einer sinkenden Kreatininclearance (Pearson Korrelation;  $R^2 = 0,1356$ ;  $p < 0,05$ ), das heißt einer abnehmenden Leistung der Niere (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Konzentration des Metformins im Kapillarblut im Zusammenhang mit der Kreatininclearance der jeweiligen Patienten.** Es wurde für die Kapillarblutkonzentration ein signifikanter Zusammenhang mit abnehmender Nierenfunktion gefunden (Pearson Korrelation,  $p < 0,05$ ). Die dargestellten Konzentrationen sind die auf eine Tagesdosis von 2000 mg normierten Werte.

Für die Auswertung konnten nur 135 der 137 Patientenproben, aus denen Metformin quantifiziert wurde, herangezogen werden, da für zwei Patienten die Kreatininkonzentration nicht bestimmt und somit keine Kreatininclearance berechnet werden konnte. Um eine fehlerhafte Interpretation zu vermeiden, wurden die auf eine Tagesdosis von 2000 mg normierten Kapillarblutspiegel verwendet. Auch zum Intervall zur letzten Metformineinnahme konnte ein signifikanter Zusammenhang gefunden werden (Pearson Korrelation;  $p < 0,05$ ;  $R = -0,319$ ). So sank die Arzneistoffkonzentration erwartungsgemäß mit steigendem Abstand zur letzten Einnahme ab ( $y = -0,0013x + 3,2721$ ). Bei schlechter Nierenfunktion wiesen Patienten trotz lange zurück liegender Tabletteneinnahme hohe Metforminspiegel auf (Abbildung 53). Umgekehrt konnten auch bei guter Nierenfunktion für einen kurzen Abstand geringe Konzentrationen nachgewiesen werden (Abbildung 53).



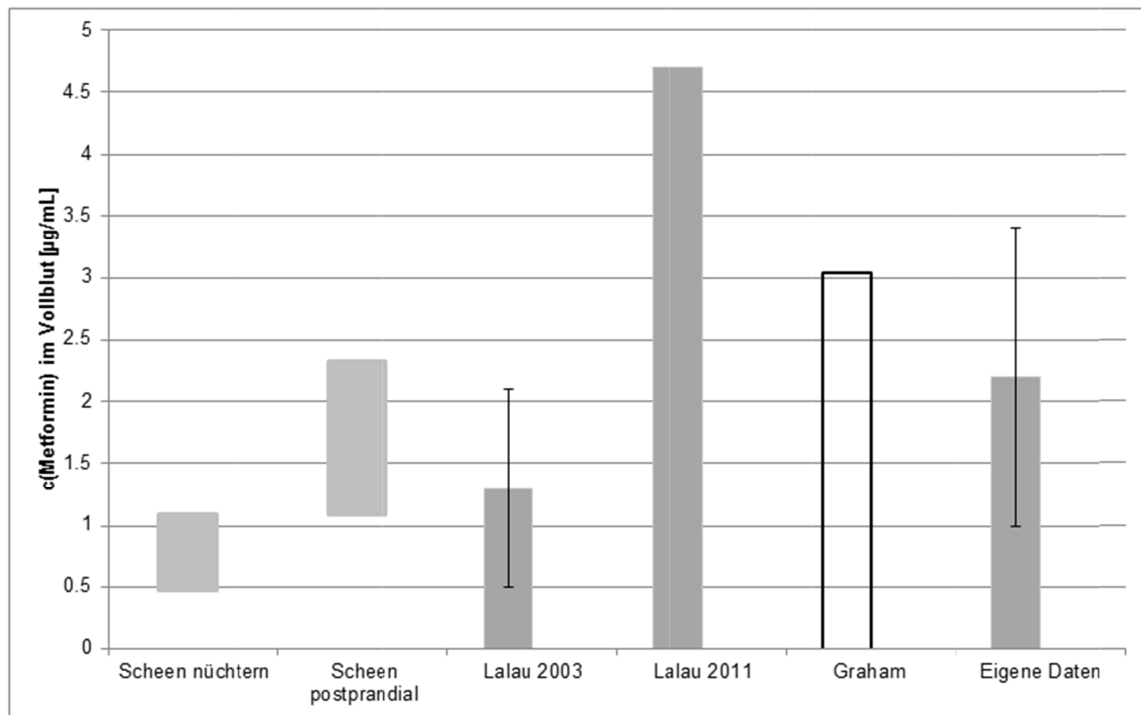
**Abbildung 53: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Metforminkonzentration im Kapillarblut, der Kreatininclearance und dem Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme.** Es wurde die auf eine Tagesdosis von 2000 mg normierten Kapillarblutspiegel verwendet, um den Einfluss der patientenindividuellen Dosierung aus dem Modell auszuschließen.

Ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang wurde für steigende Metforminspiegel mit zunehmendem Alter der Patienten gefunden (Pearson Korrelation;  $p < 0,05$ ;  $R = 0,2585$ ;  $y = 0,0295x + 0,7165$ ). Der BMI dagegen zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Arzneistoffspiegel. Auch für den Hämatokrit, den  $HbA_{1c}$ -Wert und den Glucose-Spiegel (Basisstudie) konnte keine signifikante Korrelation mit dem Metforminspiegel gefunden werden.

#### 4.3.2 Diskussion

Therapeutische Bereiche für Metformin im Plasma und den Erythrozyten wurden schon veröffentlicht (Einleitung, A4.1.1). Über den Faktor für die Verteilung des Metformins zwischen Plasma und den Blutzellen (Allg. Teil, B4.2.1.2) wurden die von Scheen und Graham publizierten Konzentrationen in die entsprechenden Vollblutkonzentrationen umgerechnet und die von Lalau ermittelten Plasma- und Erythrozytenkonzentrationen wurden zu Vollblutkonzentrationen addiert [102, 109-111]. Die resultierenden Werte

wurden mit den in den eigenen Studien ermittelten typischen Kapillarblutspiegel für Metformin verglichen ( $2,22 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ ; Allg. Teil, B4.3.1) (Abbildung 54).



**Abbildung 54. Vergleich der publizierten therapeutischen Bereiche für Metformin mit dem ermittelten Wert aus den klinischen Studien.** Die von Scheen und Graham veröffentlichten therapeutischen Bereiche (hellgrau) bzw. maximalen Plasmaspiegel (schwarz) wurden über den Verteilungsfaktor  $c_P/c_{BZ} = 4,65$  (Allg. Teil, B4.2.1.2) in die Vollblutspiegel umgerechnet, um sie mit den ermittelten Kapillarblutspiegel vergleichen zu können. Die Metforminkonzentrationen im Plasma bzw. den Erythrozyten, die 2003 und 2011 von Lalau veröffentlicht wurden, wurden addiert und die resultierende Vollblutkonzentration ( $\pm$  Standardabweichung) aufgetragen [102, 109-111].

Die im Kapillarblut gemessenen Metforminkonzentrationen (Allg. Teil, B4.3.1), für deren Ermittlung nicht darauf geachtet wurde, ob die Blutabnahme nüchtern oder postprandial stattfand, lag im Bereich der berechneten Vollblutkonzentration, die Scheen als therapeutische Konzentration postprandial angegeben hatte (Plasma:  $1,0 \mu\text{g/mL} - 2,0 \mu\text{g/mL}$ ; Vollblut:  $1,22 \mu\text{g/mL} - 2,43 \mu\text{g/mL}$ ) [110]. Metformin soll, obwohl der Einnahmezeitpunkt für die Wirkung keine Rolle spielt [186], aufgrund der besseren gastrointestinalen Verträglichkeit zu oder nach den Mahlzeiten eingenommen werden [107, 187]. Die von uns ermittelte Konzentration lag außerdem unterhalb der Konzentration, die von Graham als maximale Konzentration, bei der keine Laktatazidose als unerwünschte Arzneimittelwirkung auftritt (Plasma:  $2,5 \mu\text{g/mL}$ ; Vollblut:  $3,04 \mu\text{g/mL}$ ) bezeichnet wurde [102]. Lalau und Lacroix publizierten 2003 Daten von Patienten, bei denen die Therapie mit Metformin schon über einen langen Zeitraum gut eingestellt war und 2011 von solchen, deren Metforminkonzentration im Blut bestimmt wurde, da der Verdacht einer Akkumulation bestand [109, 111]. Mit diesen Daten deckten sie somit den optimalen Fall

sowie den suboptimalen Fall einer Metformintherapie ab, ohne eine Überschneidung der Studienpopulationen zu beinhalten. In unserem Fall wurden „real-life“-Daten gesammelt, deshalb lagen in unseren Studien Proben von Patienten mit gut eingestellter Therapie, aber vermutlich auch von Patienten, die ihre Medikamente nicht regelmäßig einnahmen oder bei denen die Therapie nicht gut eingestellt war, vor. Die ermittelten typischen Konzentrationsbereiche für Metformin, die in der Therapie im Kapillarblut auftraten, stimmten mit denen überein, die aus den veröffentlichten Konzentrationen berechnet wurden. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die eigene Methode sehr gut eignete, um die Blutspiegel auf eine wesentlich einfachere Art zu bestimmen als es in der Routine üblich ist.

Für Metformin war ein Zusammenhang der steigenden Arzneistoffkonzentration im Plasma mit abnehmender Leistung der Niere bekannt [103]. Auch für die Kapillarblutkonzentration konnte dies in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden. Sowohl die Kreatininclearance, als auch der Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme wiesen einen signifikanten Zusammenhang mit der auf eine Tagesdosis von 2000 mg normierten Konzentration im Kapillarblut auf (Allg. Teil, B4.3.1). Dabei konnte wie erwartet für eine kurze Dauer zwischen der Einnahme von Metformin (kürzester Abstand: 30 min) und der Blutabnahme sowie für eine schlechte Nierenfunktion (geringe Kreatininclearance) die höchsten Metforminspiegel gemessen werden.

Durch Auftragen der normierten Metforminkonzentrationen in Abhängigkeit der letzten Einnahme konnte die Eliminationshalbwertszeit sowie die Eliminationskonstanten  $k_e$  für Metformin aus Kapillarblut bestimmt werden (siehe Allg. Teil, B5.4.4, Formel (9)). Die Korrelation der Metforminkonzentration mit dem Abstand zur letzten Einnahme des Arzneimittels war für das Patientenkollektiv mit einer Kreatininclearance größer als 60 mL/min ( $n = 78$ ) signifikant ( $y = -0,0014x + 2,7697$ ; Pearson Korrelation,  $R = -0,3888$ ,  $p < 0,05$ ). Für dieses Kollektiv betrug die Eliminationshalbwertszeit 714 min (11,9 h) und die Eliminationskonstante  $k_e$  betrug  $9,7 \cdot 10^{-4}$ . Für Patienten mit einer Kreatininclearance kleiner als 60 mL/min ( $n = 57$ ) wurde eine Eliminationshalbwertszeit von 1111 min (18,5 h) und ein  $k_e$  von  $6,2 \cdot 10^{-4}$  berechnet. Auch für dieses Patientenkollektiv war die Korrelation zwischen dem Abstand zur Einnahme und der Metforminkonzentration signifikant ( $y = -0,0018x + 4,2342$ ; Pearson Korrelation,  $R = -0,4394$ ,  $p < 0,05$ ). Für Metformin sind Plasma-Eliminationshalbwertszeiten in Personen mit guter Nierenfunktion zwischen 2,7 h und 8,7 h bekannt [99, 102, 106, 110]. Weisen die Patienten eine eingeschränkte Nierenfunktion auf, so verlängert sich die Elimination [99, 110]. In Diabetes mellitus Typ 2 Patienten wurde eine Eliminationshalbwertszeit aus Plasma von 5,7 h bestimmt [188]. Werden die Halbwertszeiten der Diabetes mellitus Typ 2 Patienten mit denen von

Personen ohne diese Erkrankung verglichen, kann kein Unterschied beobachtet werden [189]. In Patienten mit einer Kreatininclearance von über 60 mL/min war die von uns berechnete Eliminationshalbwertszeit zwar höher im Vergleich zu den schon publizierten Werten, allerdings wurde sie im Kapillarblut bestimmt. In dieser Matrix hatten auch die Erythrozyten, aus welchen Metformin eine deutlich längere Halbwertszeit aufweist ( $23,4 \pm 1,9$  h) [106], einen Einfluss auf die Gesamtelimination. So konnten die Daten der vorliegenden Studie die Erwartungen einer längeren Halbwertszeit aus Kapillarblut im Vergleich zum Plasma bestätigen. Für Patienten mit einer Kreatininclearance kleiner als 60 mL/min war die Eliminationshalbwertszeit erwartungsgemäß verlängert (18,5 h vs. 11,9 h). Eine neue Studie (2016) zeigte, dass die mittlere Eliminationshalbwertszeit von akkumuliertem Metformin in Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion aus Plasma noch höher lag (51,9 h) [190]. Da hier jedoch nur Patienten mit Metforminkonzentrationen im Plasma von über 5 µg/mL in die Studie eingeschlossen wurden, sind die Werte nicht mit unseren vergleichbar [190]. Aus unseren Daten konnten zum ersten Mal Eliminationshalbwertszeiten für Metformin aus Kapillarblut bestimmt werden und es konnte bestätigt werden, dass die Elimination in Patienten mit schlechter Nierenfunktion länger dauerte, als in Patienten mit besserer Nierenfunktion.

## **5 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Sitagliptin**

### **5.1 Hintergrund**

Die Zunahme der kombinierten Verordnung der Arzneistoffe Metformin und Sitagliptin erfordert für die routinemäßigen Therapiekontrolle eine Methode, in der auch Sitagliptin erfasst werden kann, um die Konzentration des Arzneistoffs im Kapillarblut im Zusammenhang mit der Nierenfunktion betrachten zu können. Mit der entwickelten DBS-Methode ist eine einfache Therapiekontrolle möglich. Das erste Ziel vor der Anwendung war es, typische Kapillarblutspiegel des Sitagliptins zu ermitteln.

## 5.2 Bestimmung der Sitagliptinkonzentration aus Dried Blood Spots

### 5.2.1 Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen *in-vitro*

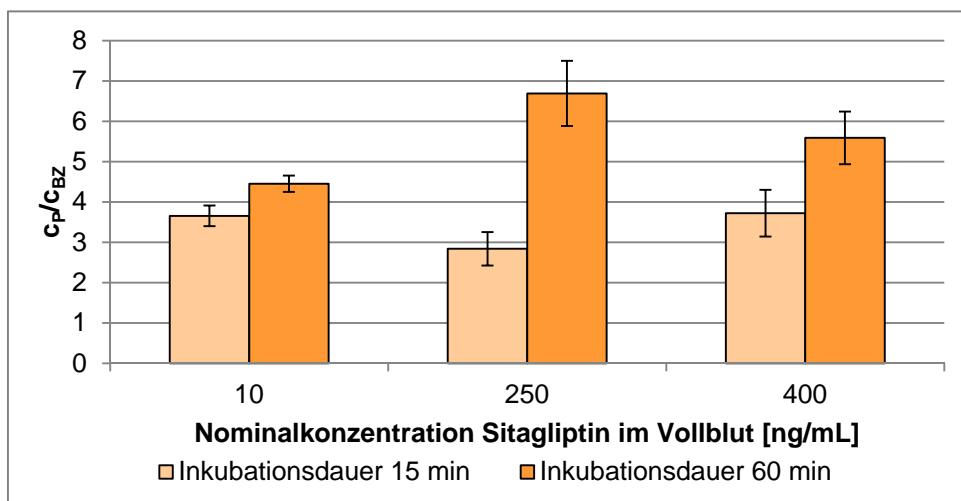
#### 5.2.1.1 Hintergrund

Für das renal eliminierte Sitagliptin ( $Q_0 = 0,15$ ) wird empfohlen, vor der erstmaligen Einnahme die Nierenfunktion zu überprüfen, da im Falle einer mäßigen Nierenfunktionsstörung ( $\text{CrCl} \geq 30 \text{ mL/min}$  bis  $< 50 \text{ mL/min}$ ) schon eine Dosisanpassung notwendig ist [117]. Auch im Laufe der Therapie soll in regelmäßigen Abständen die Nierenfunktion überprüft werden [117].

Die Konzentration des Arzneistoffs wurde in der vorliegenden Arbeit aus Dried-Blood-Spots, also aus Kapillarblut bestimmt (Allg. Teil, B1). Um die Therapie durch einfache Blutspiegel- und Nierenfunktionskontrolle verbessern zu können, sollte zunächst die Verteilung des Sitagliptins zwischen Blutzellen und Plasma geklärt werden, um anschließend abschätzen zu können, ob die Blutzellen auch für Sitagliptin ein tiefes Kompartiment darstellen und wenn ja, welcher Arzneistoffanteil im Plasma vorliegt. Würden die Blutzellen ein tiefes Kompartiment darstellen, dann wäre die Elimination hieraus langsamer als aus Plasma, was für die Pharmakokinetik bei bestehender Nierenfunktionsstörung ein wichtiger Punkt wäre.

#### 5.2.1.2 Ergebnisse

Parallel zur Bestimmung der Verteilung von Metformin in Plasma und Blutzellen (Allg. Teil, B4.2.1.2) wurde dies auch für Sitagliptin durchgeführt. Für alle Konzentrationen (10 ng/mL, 250 ng/mL und 400 ng/mL) wurden für jede Inkubationsdauer (15 min, 60 min) sowohl die Vollblut-, als auch die Plasma und Blutzellproben mit den validierten Methoden (Exp. Teil, C6.2.1) quantifiziert ( $n = 3$ ). Der Verteilungskoeffizient  $c_P/c_{BZ}$  wurde ermittelt, indem die Konzentration des Sitagliptins im Plasma ( $c_P$ ) durch die in den Blutzellen ( $c_{BZ}$ ) dividiert wurde. Nach 15 min wurde eine *in-vitro*-Verteilung von  $c_P/c_{BZ} = 3,41 \pm 0,43$  (MW  $\pm$  MDM) gefunden, nach 60 min war der Verteilungskoeffizient  $c_P/c_{BZ} = 5,58 \pm 0,98$  (MW  $\pm$  MDM). Nach dieser Zeit sollte die Verteilung abgeschlossen sein, wie es für Metformin auch der Fall war, da sich die Verteilung zwischen 60 min und 4 h nicht mehr verändert hatte (Allg. Teil, B4.2.1.2). Im Equilibrium, d.h. nach 60 min Inkubation, war die Verteilung von Sitagliptin für die verschiedenen Konzentrationen nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA;  $p < 0,05$ ), woraus geschlossen werden konnte, dass die Verteilung unabhängig von der Konzentration erfolgte (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Verteilung verschiedener Konzentrationen von Sitagliptin zwischen Plasma ( $c_P$ ) und Blutzellen ( $c_{BZ}$ ) nach 15 min und 60 min.** Die Säulen stellen den Mittelwert und die mittlere Abweichung aus  $n = 3$  Proben dar.

### 5.2.1.3 Diskussion

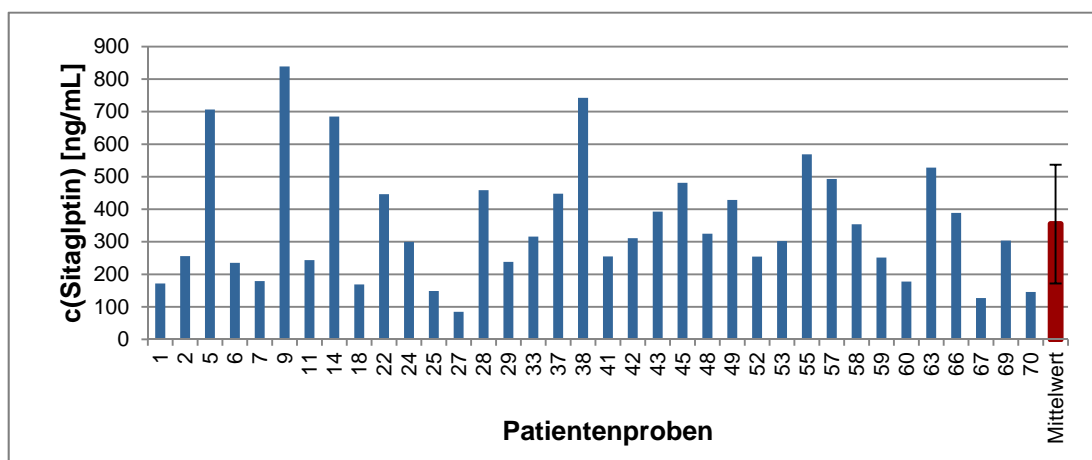
Für Sitagliptin wird in der Therapie die Plasmakonzentration bestimmt [168-170]. Man findet lediglich eine Publikation zur Quantifizierung von Sitagliptin aus humanen und murinen Dried-Blood-Spots [137]. Diese Methode fand nur Anwendung in einer Pharmakokinetik-Studie an Mäusen, in der Vollblutkonzentrationen bestimmt und nicht untersucht wurde, ob Sitagliptin auch in die Blutzellen übergeht [137]. Auch in Studien, in denen die Bioverfügbarkeit oder die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Sitagliptins untersucht wurden [121, 123], wurde nur die Plasmakonzentration bestimmt. Mit unseren Ergebnissen konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Blutzellen *in-vitro* ein Kompartiment für die Verteilung des Sitagliptins darstellen. Der Verteilungskoeffizient nach 15 min ( $c_P/c_{BZ} = 3,41 \pm 0,43$ ) zeigte, dass initial eine hohe Aufnahme von Arzneistoff in die Blutzellen stattfand. Diese Verteilung änderte sich nachfolgend und nach 60 min lag über fünfmal mehr Arzneistoff im Plasma als in den Zellen vor, was anhand des Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  von  $5,58 \pm 0,98$  (MW  $\pm$  MDM) ersichtlich war. Damit war die Aufnahme in die Blutzellen annähernd so hoch wie für Metformin (Allg. Teil, B4.2.1), für das schon bekannt war, dass es sich in die Erythrozyten verteilt.



## 5.2.2 Bestimmung der Sitagliptinkonzentration in Patientenproben der klinischen Studien

### 5.2.2.1 Basisstudie

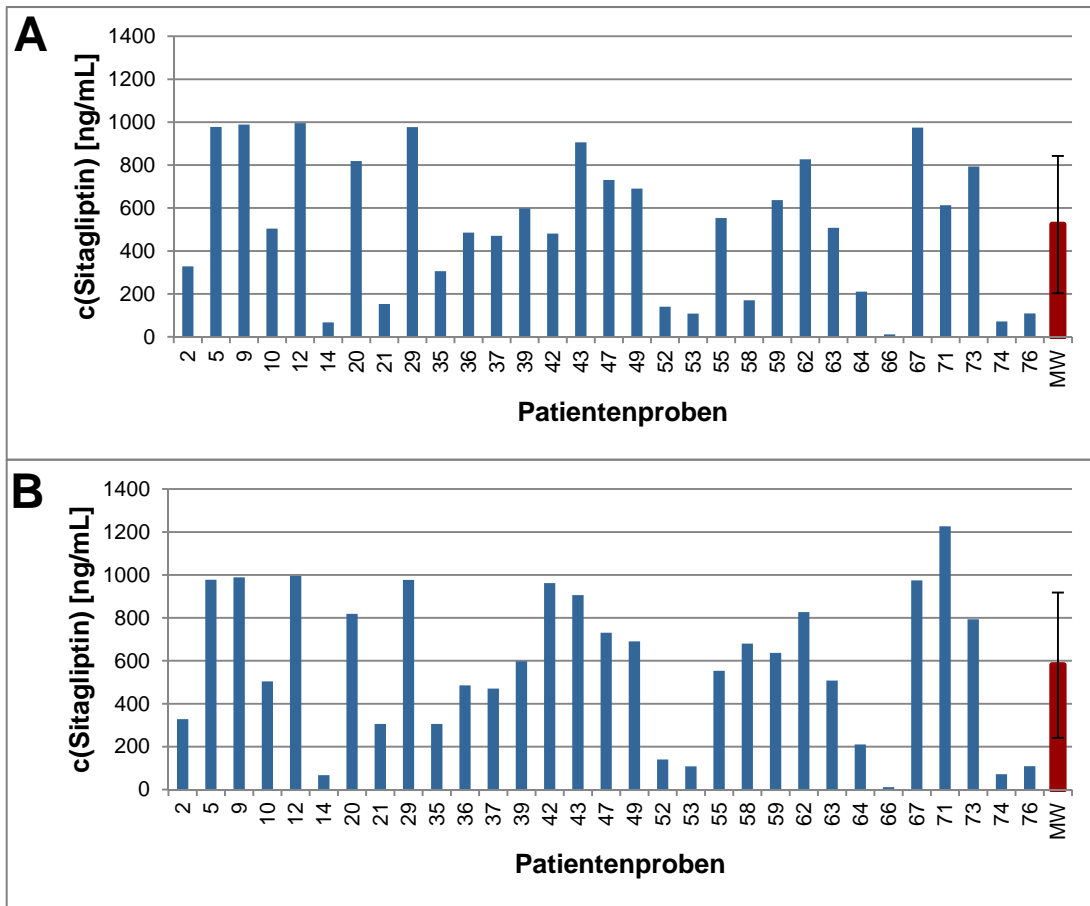
In 36 Studienproben konnte die Sitagliptinkonzentration bestimmt werden (Allg. Teil, B2.1, Abbildung 36). In einer Probe lag die Konzentration unterhalb des LLOQ von 3 ng/mL und konnte deshalb nicht quantifiziert werden. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten dabei von 84,7 ng/mL bis 838,9 ng/mL (Abbildung 56). Alle Patienten nahmen eine Tagesdosis von 100 mg Sitagliptin ein.



**Abbildung 56: Sitagliptinkonzentration im Kapillarblut der einzelnen Studienproben und des Mittelwertes der Basisstudie (n = 36).** Dargestellt sind die Einzelwerte und der daraus resultierende MW ± SD (rote Säule) der gemessenen Blutspiegel.

### 5.2.2.2 Feldstudie

Insgesamt 32 der Studienpatienten nahmen Sitagliptin ein (Allg. Teil, B2.1, Abbildung 36). In 31 Studienproben konnte Sitagliptin quantifiziert werden. In einer Probe lag die Konzentration oberhalb des ULOQ von 1000 ng/mL und konnte deshalb nicht bestimmt werden. Die Werte der einzelnen Patienten schwankten dabei von 11,1 ng/mL bis 995,6 ng/mL (Abbildung 57 A). Allerdings variierte auch die täglich eingenommene Dosis des Arzneistoffs zwischen 25 mg und 100 mg. Wurden die Kapillarblutkonzentrationen auf eine Tagesdosis von 100 mg normiert, so ergab sich daraus ein Bereich von 11,1 ng/mL bis 1226,2 ng/mL (Abbildung 57 B).



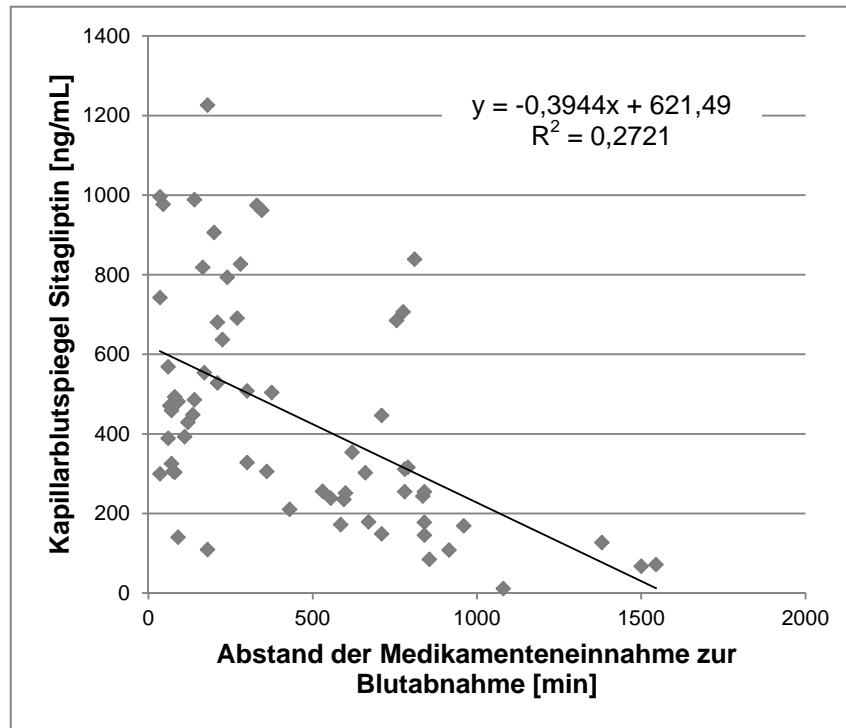
**Abbildung 57: Sitagliptinkonzentration im Kapillarblut der einzelnen Studienproben und des Mittelwertes (MW) der Feldstudie (n = 31).** Dargestellt sind die Einzelwerte und der daraus resultierende MW  $\pm$  SD (rote Säule) der gemessenen Blutspiegel (A) und der auf 100 mg pro Tag normalisierten Blutspiegel (B). Die Patientenprobe 66 wies eine Konzentration von 11,12 ng/mL auf.

## 5.3 Populationspharmakokinetische Betrachtung

### 5.3.1 Ergebnisse

Aus den Daten beider Studien (Allg. Teil, B5.2.2.1 und B5.2.2.2) wurden die unter der Therapie typischen Kapillarblutspiegel für Sitagliptin ermittelt. In 67 Patientenproben konnte eine mittlere Konzentration von  $432,2 \pm 268,8$  ng/mL (MW  $\pm$  SD) und ein Median von 388,9 ng/mL bestimmt werden. Die Schwankung der Werte reichte dabei von 11,1 ng/mL bis 995,6 ng/mL für einen Dosisbereich von 25 mg bis 100 mg.

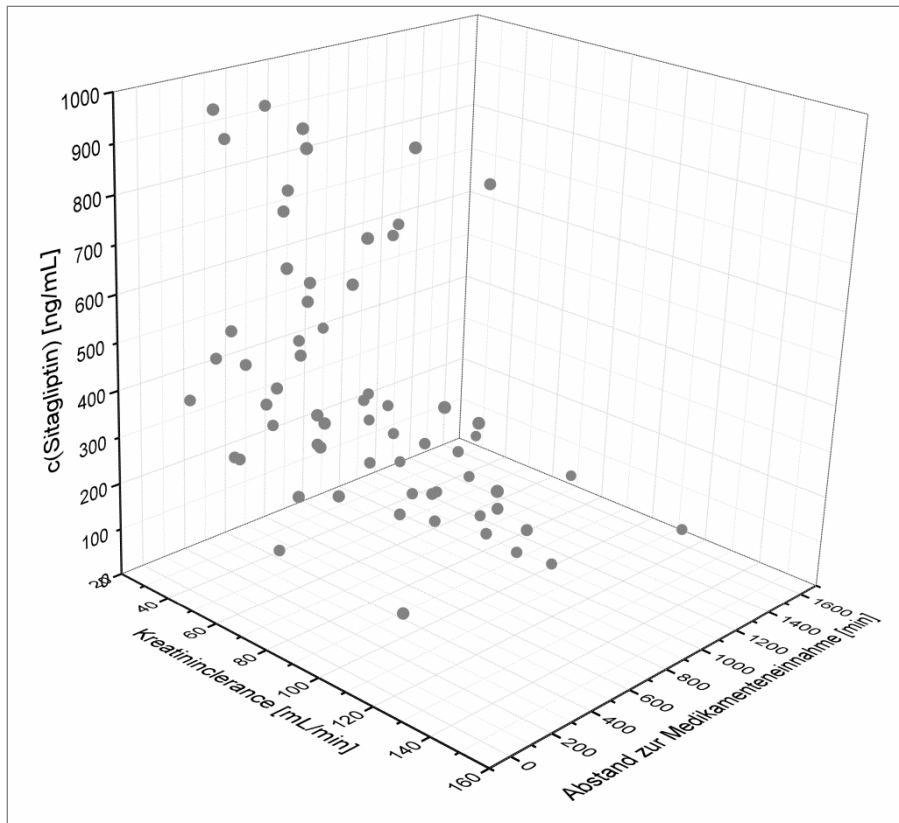
Erwartungsgemäß konnte mit steigendem Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme eine sinkende Arzneistoffkonzentration im Kapillarblut beobachtet werden (Abbildung 58).



**Abbildung 58: Konzentration des Sitagliptins im Kapillarblut im Zusammenhang mit dem Abstand der Blutabnahme zur letzten Medikamenteneinnahme.** Es wurde die auf eine Tagesdosis von 100 mg Sitagliptin normierte Konzentration aufgetragen.

Nur 64 der 67 Patientenproben, aus denen Sitagliptin quantifiziert wurde, wurden in die Auswertung einbezogen, da für drei Patienten die Kreatininkonzentration nicht bestimmt und somit keine Kreatininclearance berechnet werden konnte. Es wurden die auf eine Tagesdosis von 100 mg normierten Kapillarblutspiegel verwendet. Die negative Korrelation war dabei moderat, aber signifikant (Pearson Korrelation;  $R = -0,522$ ,  $p < 0,05$ ). Für die steigende Arzneistoffkonzentration im Kapillarblut konnte zudem eine schwache signifikante Korrelation mit einer sinkenden Kreatininclearance gefunden werden ( $y = -3,340x + 688,24$ ; Pearson Korrelation;  $R = -0,294$ ;  $p < 0,05$ ).

Wurde einem Patienten lange nach der Tabletteneinnahme Blut abgenommen, so zeigte er bei schlechter Nierenfunktion trotzdem hohe Sitagliptinspiegel auf. Umgekehrt waren auch bei guter Nierenfunktion für eine kurz zurückliegende Tabletteneinnahme geringe Konzentrationen zu finden (Abbildung 59).



**Abbildung 59: Darstellung des Einflusses der Sitagliptinkonzentration im Kapillarblut, der Kreatininclearance und dem Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme aufeinander.** Es wurde die auf eine Tagesdosis von 100 mg normierten Kapillarblutspiegel verwendet, um den Einfluss der patientenindividuellen Dosierung aus dem Modell auszuschließen.

Weder das Alter, der BMI, der  $HbA_{1c}$ -Wert noch der Glucose-Spiegel der Patienten zeigten eine signifikante Korrelation mit dem Sitagliptinspiegel. Der Hämatokrit hingegen wies eine signifikante Korrelation mit dem Arzneistoffspiegel auf (Pearson  $R = 0,396$ ;  $p < 0,05$ ) (Allg. Teil, B5.4).

### 5.3.2 Diskussion

Für Sitagliptin wurden unseres Wissens keine therapeutischen Bereiche publiziert (Einleitung, A4.2.1). Die veröffentlichte Maximalkonzentration im „Steady state“ wurde an gesunden männlichen Probanden aus Plasma ermittelt [121]. Sie lag für eine Tagesdosis von 100 mg bei 941 nM (383 ng/mL) [121]. Wurde sie über den abgeschätzten mittleren Verteilungsfaktor  $c_P/c_{BZ} = 2,60$  (Mittelwert der in Tabelle 18 dargestellten Einzelwerte) in die Vollblutkonzentration umgerechnet, so resultierte daraus eine „Steady-state“ Konzentration von 530,3 ng/mL. Die in den klinischen Studien ermittelte mittlere Konzentration im Kapillarblut (MW  $\pm$  SD;  $432,2 \pm 268,8$  ng/mL) lag etwas niedriger, zeigte

allerdings eine hohe Variabilität. Die gemessenen Konzentrationen variierten zwischen 11,1 ng/mL und 995,6 ng/mL.

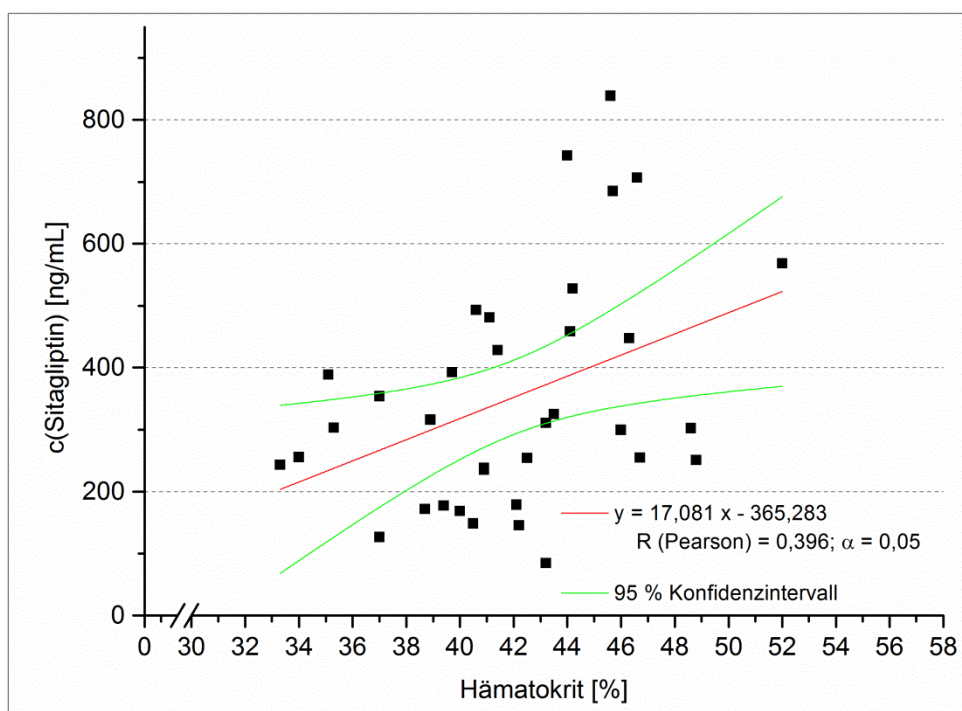
Der Abstand zur letzten Medikamenteneinnahme, sowie die abnehmende Leistung der Nierenfunktion zeigten einen signifikanten Einfluss auf die auf eine Tagesdosis von 100 mg normierten Konzentrationen im Kapillarblut (Allg. Teil, B5.3.1). So konnten für eine kurze Dauer zwischen der Einnahme von Sitagliptin (kürzester Abstand: 35 min) und der Blutabnahme sowie bei einer schlechten Nierenfunktion (geringe Kreatininclearance) die höchsten Sitagliptinspiegel gemessen werden.

Durch Auftragen der Konzentrationen von Sitagliptin in Abhängigkeit der letzten Einnahme konnte, wie für Metformin beschrieben (Allg. Teil, B4.3.2), die Eliminationshalbwertszeit sowie die Eliminationskonstante  $k_e$  bestimmt werden. War die Kreatininclearance größer als 60 mL/min ( $n = 40$ ), so war die Korrelation zwischen dem Abstand zur letzten Einnahme und dem Sitagliptinspiegel moderat und signifikant ( $y = -0,396x + 571,72$ ; Pearson Korrelation,  $R = -0,570$ ,  $p < 0,05$ ). Die Eliminationshalbwertszeit aus Kapillarblut betrug 505 min (8,4 h) und die Eliminationskonstante  $k_e$   $1,4 \cdot 10^{-3}$ . Für Patienten mit einer Kreatininclearance kleiner als 60 mL/min ( $n = 24$ ) wurde eine schwächere, jedoch signifikante Korrelation zwischen dem Abstand zur letzten Einnahme und der Arzneistoffkonzentration beobachtet ( $y = -0,390x + 703,52$ ; Pearson Korrelation,  $R = -0,479$ ,  $p < 0,05$ ). Für dieses Patientenkollektiv betrug die Eliminationshalbwertszeit 779 min (13,0 h) und  $k_e$   $8,9 \cdot 10^{-4}$ . Die Plasma-Eliminationshalbwertszeit für Sitagliptin wurde in gesunden Probanden auf 8 h bis 14 h berechnet [116, 117, 121, 123]. In einer Studie an übergewichtigen Personen ohne Diabetes mellitus Typ 2 wurde ebenfalls die Pharmakokinetik von Sitagliptin untersucht. Die Eliminationshalbwertszeit aus Plasma von 11,3 h, war vergleichbar mit der in normalgewichtigen Menschen [125]. In Diabetes mellitus Typ 2 Patienten wurde eine Eliminationshalbwertszeit aus Plasma von 11,0 h bis 13,1 h bestimmt [116]. Der Einfluss der Erkrankung scheint die Elimination nicht zu beeinflussen. Die von uns ermittelten Eliminationshalbwertszeiten aus Kapillarblut für Diabetes mellitus Typ 2 Patienten lagen sowohl mit einer Kreatininclearance größer, aber auch kleiner als 60 mL/min in dem schon publizierten Bereich. Die Akkumulation in den Erythrozyten hatte für Sitagliptin offenbar keinen so großen Einfluss wie für Metformin (Allg. Teil, B4.3.2). Der Vergleich der Halbwertszeiten zwischen den Patientenkollektiven mit besserer und schlechterer Nierenfunktion (8,4 h vs. 13,0 h) zeigte erwartungsgemäß die deutlich langsamere Elimination des Sitagliptins mit sinkender Kreatininclearance. Unseres Wissens sind dies die ersten klinischen Daten, die diesen Zusammenhang nachweisen und auch die ersten Daten, die die Eliminationshalbwertszeiten für Sitagliptin aus Kapillarblut beschreiben.

## 5.4 Hämatokritabhängigkeit und inter-individuelle Unterschiede der Sitagliptinkonzentration im Blut *in-vitro*

### 5.4.1 Hintergrund

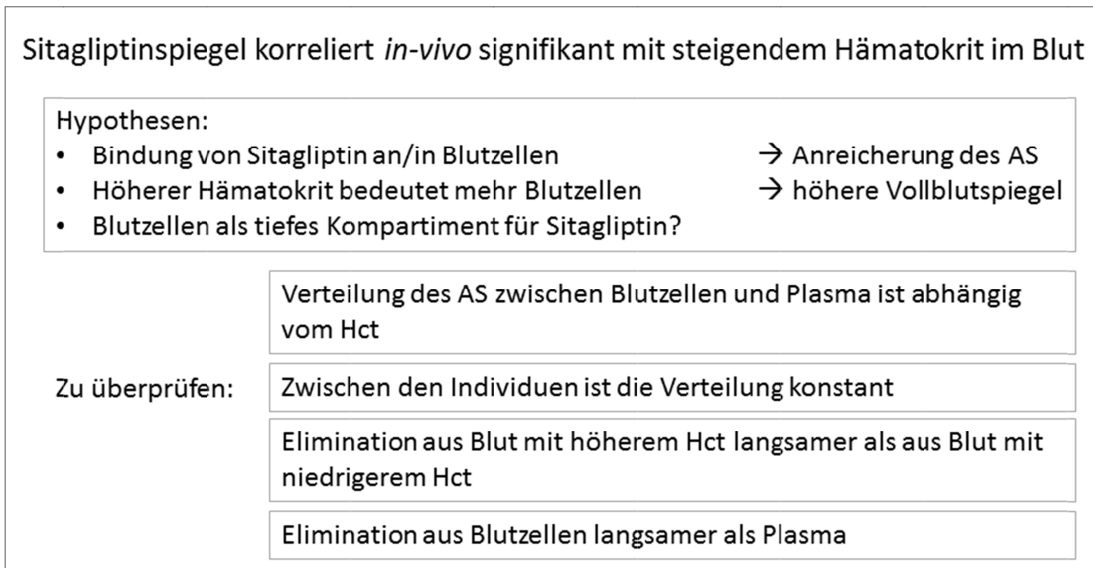
Nach Auswertung der 37 Patientenproben der Basisstudie, für die auch der Hämatokrit (Hct) von der diabetologischen Praxis übermittelt wurde, zeigte sich, dass der Hct einen signifikanten Einfluss auf den Blutspiegel des Sitagliptins hatte (Pearson  $R = 0,396$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 60).



**Abbildung 60:** Der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Sitagliptin im Kapillarblut der Patientenproben und dem zugehörigen Hämatokrit war nach Pearson auf einem Niveau von  $p < 0,05$  signifikant. Dargestellt sind die Daten der Basisstudie ( $n = 37$ ).

Es wurden steigende Konzentrationen des Arzneistoffs im Blut mit steigendem Hct beobachtet. Der Grund hierfür könnte die Verteilung von Sitagliptin in die Blutzellen sein (Allg Teil, B5.2.1), falls es daraus langsamer eliminiert wurde als aus Plasma. Da bei einem hohen Hämatokrit mehr Blutzellen vorhanden sind, in denen sich der Arzneistoff ansammeln könnte, wäre somit bei den folgenden Arzneistoffgaben mehr „Restsitagliptin“ im Blut vorhanden. Der Arzneistoff würde auftitriert und zu einer höheren „Steady-state“ Konzentration führen verglichen mit Blut mit einem niedrigeren Hct. Diese Hypothese sollte näher untersucht werden.

Mithilfe von *in-vitro*-Versuchen, bei denen Blut eines Spenders, das auf verschiedene Hct-Werte eingestellt und mit Arzneistoff inkubiert wurde, sollte gezeigt werden, dass in Blut mit höherem Hct Sitagliptin zu einem größeren Anteil in den Blutzellen vorliegt, als in Blut mit niedrigerem Hct (Exp. Teil, C6.2.4). Diese Verteilung des DPP-IV Inhibitors sollte sich der Theorie nach linear mit dem Hct verändern. Für Sitagliptin wurden in der vorliegenden Arbeit schon *in-vitro* Verteilungsversuche durchgeführt (Allg. Teil, B5.2.1), für die der Hct des verwendeten Blutes jedoch nicht berücksichtigt wurde. Im zweiten Schritt sollte anschließend überprüft werden, ob die Verteilung des Sitagliptins nur vom Hct abhängig war oder darüber hinaus auch inter-individuelle Unterschiede zeigte. Dies sollte mit Blut verschiedener Einzelspender getestet werden. Im letzten Schritt, um die Elimination des Sitagliptins zu untersuchen, waren Dialyseversuche notwendig. Robert et al. veröffentlichten 2003 für Metformin eine Studie, um die Kinetik des Metformins im Plasma und den Erythrozyten zu erforschen [106]. Es wurde gesunden Probanden oral Metformin verabreicht und nach bestimmten Zeitpunkten Blutproben entnommen und die Menge des Arzneistoffs im Plasma und den Blutzellen bestimmt [106]. Aus diesen Daten konnten anschließend Eliminationskurven aufgestellt und Eliminationszeiten berechnet werden [106]. Analog dieses *in-vivo*-Versuchsaufbaus, sollten für Sitagliptin *in-vitro*-Versuche durchgeführt werden, um ebenfalls Eliminationskurven und –halbwertszeiten bestimmen zu können. Könnte man nachweisen, dass für Sitagliptin die Eliminationshalbwertszeit in Blut mit höherem Hct höher ist als mit niedrigerem Hct, dann würde sich hierdurch die höhere „Steady-state“ Konzentration erklären lassen. Wäre die Eliminationshalbwertszeit aus den Blutzellen zudem noch länger als die aus Plasma, so wäre dies der Beweis, dass die Blutzellen ein tiefes Kompartiment für Sitagliptin darstellen (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Schematische Vorgehensweise der Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Sitagliptins.** *In-vivo* wurde eine signifikante Korrelation des Sitagliptinspiegels mit steigendem Hämatokrit (Hct) gefunden (Allg. Teil, B5.4.1). Mithilfe verschiedener Versuche sollte die Verteilung des Arzneistoffs (AS) in Abhängigkeit des Hcts, die inter-individuelle Verteilung und die Elimination untersucht werden.

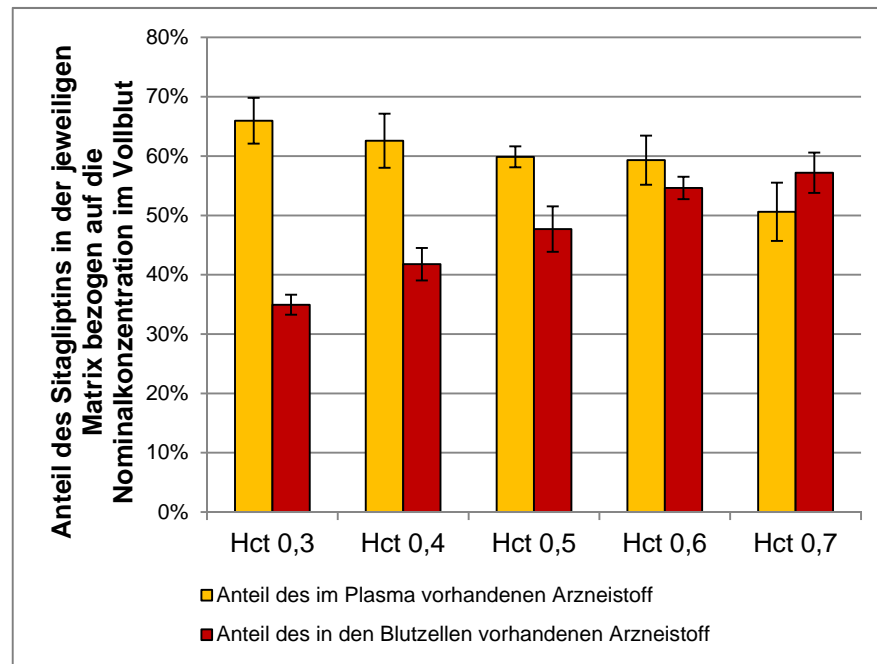
#### 5.4.2 Inkubationsversuche mit Blut mit unterschiedlichem Hämatokrit

Um die Abhängigkeit der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und den Blutzellen zu zeigen, wurden Inkubationsversuche in Blut mit verschiedenem Hämatokrit durchgeführt.

##### 5.4.2.1 Ergebnisse

Durch die Bestimmung des Anteils an Sitagliptin, der nach der Inkubation im Plasma bzw. den Blutzellen im Vergleich zur Nominalkonzentration im Vollblut zu finden war, konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Hämatokrit, also mit einem höheren Anteil an Erythrozyten im Blut, der Anteil an Sitagliptin in den Blutzellen stieg, der im Plasma proportional dazu abfiel (Abbildung 62). Die Ergebnisse waren auch zwischen den Konzentrationen mit 3,0 – 9,7 % so präzise, dass diese Beobachtung als unabhängig von der Konzentration gelten könnte.





**Abbildung 62: Anteil des im Plasma und in den Blutzellen vorhandenen Sitagliptins nach einer Inkubation von 60 min.** Für jeden Hämatokrit wurde dabei der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 9$ ) aufgetragen, da das Verhältnis unabhängig von der Konzentration des Arzneistoffes war.

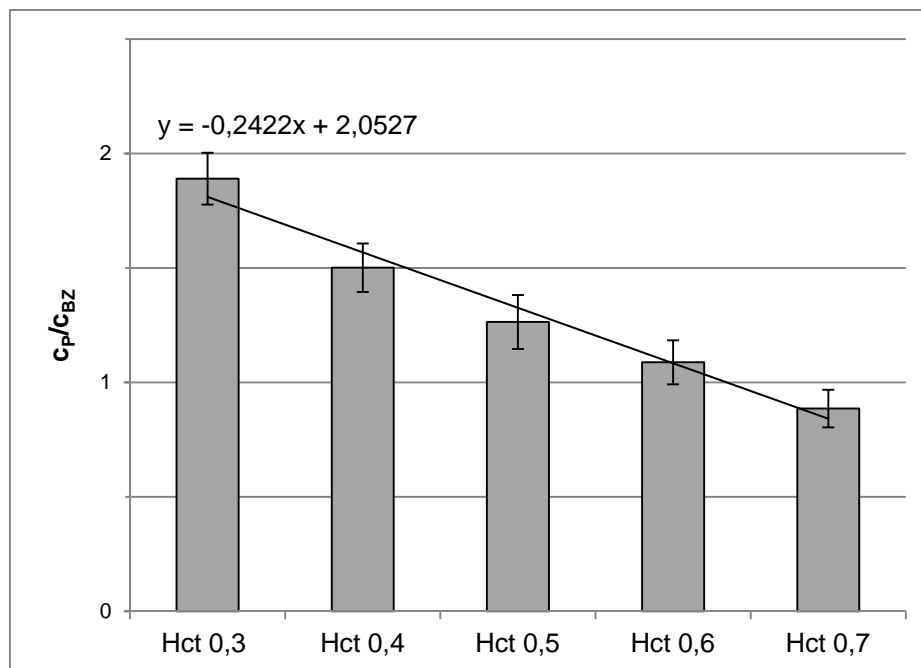
Ein t-Test (verbundene Stichprobe;  $p < 0,05$ ) zeigte, dass für jeden Hämatokrit bei jeder Konzentration die Summe der Menge an Sitagliptin im Plasma und den Blutzellen nicht signifikant unterschiedlich von der im Vollblut war. Alle Probensets waren dabei auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test).

Der Verteilungsfaktor  $c_P/c_{BZ}$  beschrieb die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und Blutzellen. Er war von der Konzentration unabhängig, was anhand der Präzision kleiner 10 % (6,0 % - 9,3 %) ersichtlich war. Für jeden Hämatokrit wurde  $c_P/c_{BZ}$  berechnet und reichte von  $1,89 \pm 0,11$  für einen Hämatokrit von 0,3 bis  $0,89 \pm 0,08$  für einen Hämatokrit von 0,7 (Tabelle 15), wodurch gezeigt werden konnte, dass für höhere Hämatokritwerte mehr Arzneistoff in den Blutzellen zu finden war, als in Blut mit einem niedrigeren Hämatokrit. Für jeden Hct waren die Verteilungskoeffizienten signifikant unterschiedlich von allen anderen (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

**Tabelle 15: Verteilungsfaktoren  $c_P/c_{BZ}$  für den jeweiligen Hämatokrit nach einer Inkubation von 60 min.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 9$ ) sowie die relative Standardabweichungen (RSD) der Werte. Die Verteilungen waren signifikant verschieden voneinander (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
$c_P/c_{BZ}$	$1,89 \pm 0,11$	$1,50 \pm 0,11$	$1,26 \pm 0,12$	$1,09 \pm 0,10$	$0,89 \pm 0,08$
RSD	5,98 %	7,06 %	9,31 %	8,82 %	9,30 %

Der Zusammenhang zwischen den Verteilungskoeffizienten und dem Hämatokrit war dabei linear, der Korrelationskoeffizient R betrug 0,99 (Abbildung 63).



**Abbildung 63: Verteilungskoeffizient  $C_p/C_{BZ}$  des Sitagliptins in Abhängigkeit des Hämatokrits nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 9$ ), da das Ergebnis unabhängig der vermessenen Konzentration war.

Für die Arzneistoffkonzentration im Vollblut wurde für die Proben (pro Hct, pro Konzentration  $n = 3$ ) eine Richtigkeit von 91,1 – 113,6 % sowie eine Präzision von 0,7 – 7,9 % nachgewiesen, sodass man davon ausgehen konnte, dass der Arzneistoff über die Inkubation stabil blieb und noch in der zugegebenen Konzentration im Blut vorlag (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Konzentration an Sitagliptin im Vollblut nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C zur Bestimmung des Einflusses des Hämatokrits auf die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und Blutzellen.** Dargestellt ist für jede Konzentration der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, die Richtigkeit und die Präzision aus  $n = 3$  Bestimmungen.

Nominalkonzentration im Vollblut [ng/mL]	MW c(Sitagliptin) im Vollblut [ng/mL]				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	10,37 $\pm$ 0,60	10,53 $\pm$ 0,83	10,14 $\pm$ 0,80	10,54 $\pm$ 0,53	10,05 $\pm$ 0,50
250	243,84 $\pm$ 1,75	256,43 $\pm$ 2,64	263,02 $\pm$ 9,85	269,83 $\pm$ 11,34	253,87 $\pm$ 2,49
400	405,29 $\pm$ 8,38	413,12 $\pm$ 2,98	415,23 $\pm$ 2,86	447,23 $\pm$ 5,36	444,04 $\pm$ 10,42
	Richtigkeit [%]				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	103,98 $\pm$ 6,02	105,53 $\pm$ 8,36	101,62 $\pm$ 8,05	105,65 $\pm$ 5,28	100,73 $\pm$ 5,02
250	97,76 $\pm$ 0,70	102,81 $\pm$ 1,06	105,45 $\pm$ 3,95	108,18 $\pm$ 4,55	101,78 $\pm$ 1,00
400	101,56 $\pm$ 2,10	103,52 $\pm$ 0,75	104,15 $\pm$ 0,72	112,06 $\pm$ 1,34	111,27 $\pm$ 2,61
	Präzision [%]				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	5,79	7,92	7,92	5,00	4,99
250	0,72	1,03	3,75	4,20	0,98
400	2,07	0,72	0,69	1,20	2,35

#### 5.4.2.2 Diskussion

Beim Betrachten der Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  (Tabelle 15) war eine starke Abweichung zu dem Koeffizient aus den ersten Verteilungsversuchen zu sehen (Allg. Teil, B5.2.1). In den ersten Versuchen zur Bestimmung der Verteilung wurde gepooltes Blut von zehn Einzelspendern verwendet, woraus ein Verteilungskoeffizient von 5,58 resultierte (Allg. Teil, B5.2.1). Für das Blut wurde kein Hct bestimmt. In den neu durchgeführten Inkubationsversuchen (Allg. Teil, B5.4.2) wurde das Blut eines Einzelspenders verwendet, woraus nunmehr Verteilungskoeffizienten zwischen 0,89 und 1,89 resultierten. Es sollte deshalb geklärt werden, ob dieser erhebliche Unterschied der Koeffizienten aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Blutchargen, das heißt verschiedener Spender zustande kam und somit erhebliche inter-individuelle Schwankungen der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen erwarten ließ.

#### 5.4.3 Inter-individuelle Unterschiede der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen

Die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und Blutzellen in Proben von vier Einzelspendern wurde bestimmt. Durch diesen Versuchsaufbau (Exp. Teil, C6.2.4.2) konnten zum einen die inter-individuellen Unterschiede der Sitagliptinverteilung zwischen Plasma und Blutzellen untersucht werden, zum anderen konnte die schon vorher gezeigte

Abhängigkeit der Verteilung vom Hämatokrit (Allg. Teil, B5.4.2) zusätzlich in verschiedenen Einzelmatrizes überprüft werden.

#### 5.4.3.1 Ergebnisse

Der Vergleich der für jeden Einzelspender und Hämatokrit bestimmten Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  zeigte, dass diese sehr stark zwischen den Einzelspendern variierten. Für einen Hämatokrit von 0,4 reichten die Schwankungen des  $c_P/c_{BZ}$  von 1,83 bis 4,28, für einen Hct von 0,6 von 1,37 bis 2,89. Für die Einzelspender zeigte sich zwischen den beiden betrachteten Hämatokritwerten ein sehr deutlicher Unterschied. Für einen Hct von 0,4 fanden sich jeweils höhere Werte des Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  als für einen Hct von 0,6 (Tab. Anhang, D5.4.3).

Der Vergleich der Verhältnisse der Verteilungskoeffizienten für einen Hct von 0,4 und 0,6  $[(c_P/c_{BZ}(0,4))/(c_P/c_{BZ}(0,6))]$  der Einzelspender (Allg. Teil, B5.4.3) und der Ergebnisse aus den Versuchen zur Hämatokritabhängigkeit (Allg. Teil, B5.4.2) zeigten, dass die Verhältnisse aus beiden Versuchen mit einer Präzision von 7,84 % dieselben waren (Tabelle 17).

**Tabelle 17: : Verhältnisse der Verteilungskoeffizienten von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen für einen Hämatokrit (Hct) von 0,4 und 0,6.** Die mit 1-4 bezeichneten Blutchargen stellten die jeweiligen Einzelspender aus den Versuchen der inter-individuellen Unterschiede dar und die mit 5 bezeichnete Charge die Ergebnisse der Versuche zur Hämatokritabhängigkeit. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus  $n = 3$  Messungen.

Blutcharge	$c_P/c_{BZ}$ (Hct 0,4/Hct 0,6)
1	1,38
2	1,44
3	1,14
4	1,29
5	1,38
MW ± SD	1,33 ± 0,10
Präzision [%]	7,84

Die Richtigkeit der im Vollblut vorliegenden Konzentrationen lag für alle Proben im Bereich zwischen 100,5 % und 114,2 %. Die Präzision der gemessenen Werte im Vollblut, im Plasma und in den Blutzellen für die jeweiligen Einzelspender und Hct-Werte lag zwischen 0,1 % und 10,1 % (Tabelle 18). Die Übereinstimmung zwischen der Konzentration im Vollblut und der Summe aus Plasma und Blutzellen für die einzelnen Proben reichte von 89,2 – 111,9 %.

**Tabelle 18: Die im Vollblut, im Plasma und in den Blutzellen gemessenen Konzentrationen an Sitagliptin nach 60 min Inkubation bei 37 °C im Blut verschiedener Einzelspender (ES) mit unterschiedlichem Hämatokrit (Hct). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3) sowie die Präzision der gemessenen Konzentration.**

ES	Hct	Vollblut		Plasma		Blutzellen	
		c(Sitagliptin) [ng/mL]	Präzision [%]	c(Sitagliptin) [ng/mL]	Präzision [%]	c(Sitagliptin) [ng/mL]	Präzision [%]
1	0,4	273,0 $\pm$ 8,7	3,2	219,5 $\pm$ 4,8	2,2	64,5 $\pm$ 6,2	9,6
	0,6	267,2 $\pm$ 12,6	4,7	186,5 $\pm$ 2,5	1,3	74,9 $\pm$ 3,8	5,0
2	0,4	276,8 $\pm$ 6,7	2,4	204,8 $\pm$ 1,6	0,8	51,0 $\pm$ 3,2	6,3
	0,6	273,4 $\pm$ 0,2	0,1	213,3 $\pm$ 3,1	1,4	76,3 $\pm$ 2,9	3,8
3	0,4	264,5 $\pm$ 9,3	3,5	204,4 $\pm$ 10,1	4,9	84,1 $\pm$ 2,4	2,8
	0,6	265,6 $\pm$ 1,9	0,7	179,3 $\pm$ 4,8	2,7	84,6 $\pm$ 6,3	7,5
4	0,4	259,0 $\pm$ 1,4	0,5	182,8 $\pm$ 11,3	6,2	94,9 $\pm$ 3,3	3,5
	0,6	264,9 $\pm$ 2,6	2,6	150,3 $\pm$ 15,2	10,1	100,6 $\pm$ 2,2	2,2

#### 5.4.3.2 Diskussion

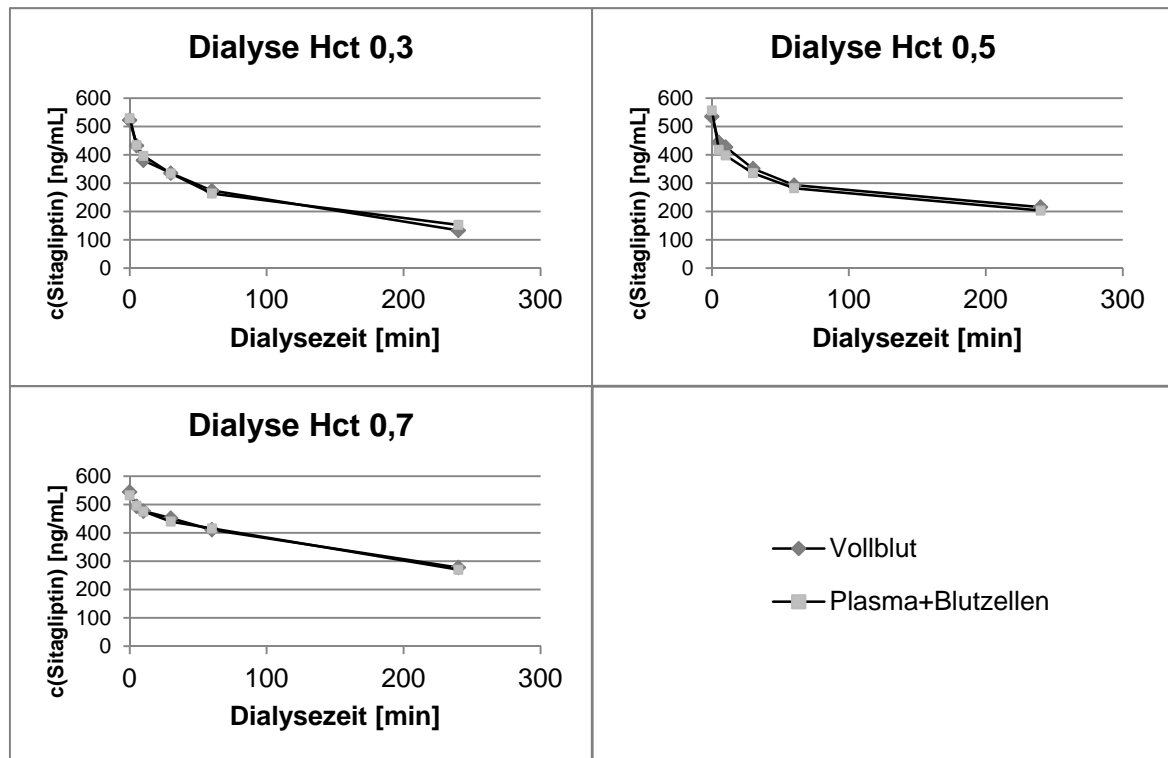
Mit den durchgeführten Versuchen konnte die Hämatokritabhängigkeit der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen (Allg. Teil, B5.4.2) bestätigt werden. Zudem konnte belegt werden, dass eine sehr hohe inter-individuelle Schwankung der Verteilung von Sitagliptin in die Blutzellen vorlag, diese aber ausgehend von den individuellen Werten für die Einzelspender über verschiedene Hämatokritwerte dieselbe Abhängigkeit zeigte.

#### 5.4.4 Dialyseversuche

Um die Elimination des Sitagliptins aus Blut mit verschiedenen Hämatokritwerten und aus Plasma und Blutzellen zu bestimmen, um so die Blutzellen als tiefes Kompartiment des Sitagliptins zu bestätigen, wurden *in-vitro* Dialyseversuche durchgeführt.

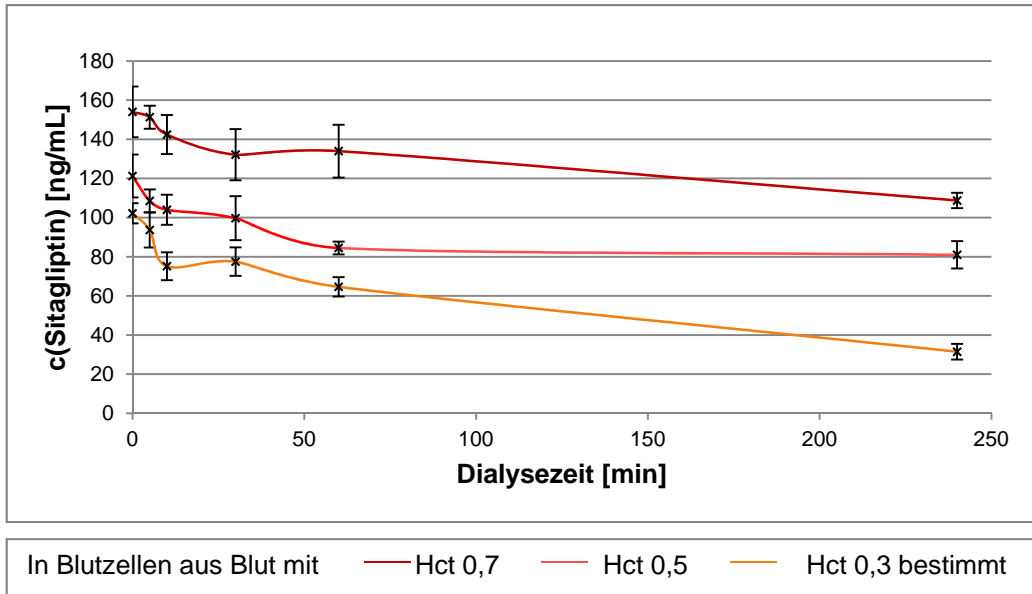
##### 5.4.4.1 Ergebnisse

Die *in-vitro*-Eliminationskurven von Sitagliptin aus Vollblut, Plasma und den Blutzellen nahmen den erwarteten exponentiellen Verlauf, zudem stimmten die Werte der Kurve aus Vollblut für jeden Hämatokrit mit der berechneten Kurve aus der Summe der Plasma- und Blutzellkonzentrationen überein (Abbildung 64).



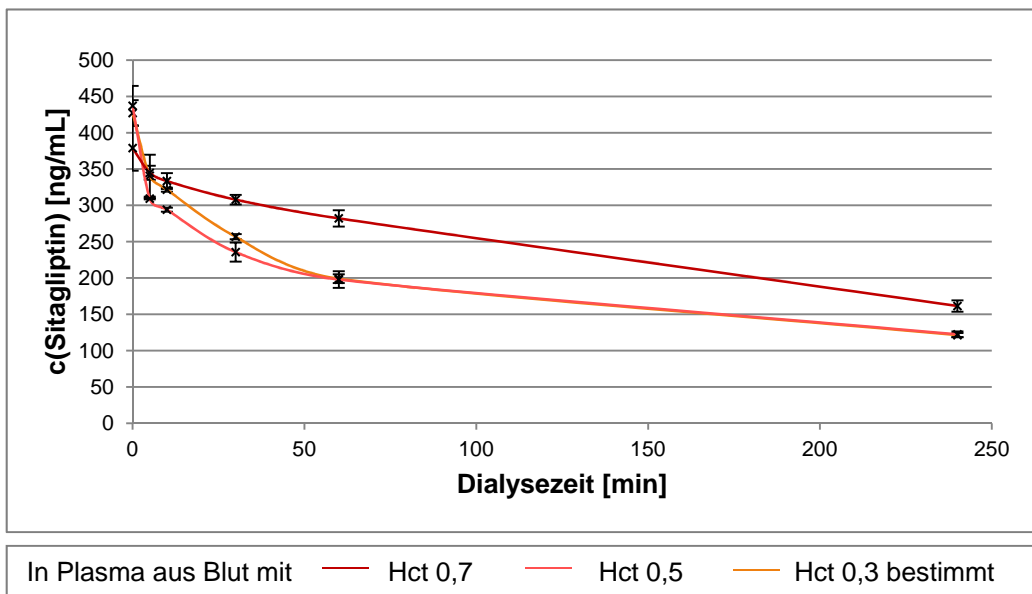
**Abbildung 64:** Vergleich der *in-vitro*-Eliminationskurven aus Vollblut gegenüber der Kurve der Summe aus Plasma und Blutzellen. Für die summierte Kurve wurden die Mittelwerte ( $n = 3$  bzw.  $n = 15$  für  $t = 0$  min) der jeweiligen Zeitpunkte addiert und aufgetragen. Für die Vollblutkurve wurden die Mittelwerte ( $n = 3$  bzw.  $n = 15$  für  $t = 0$ ) der jeweiligen Zeitpunkte aufgetragen.

Die *in-vitro*-Elimination aus Vollblut sowie aus den Blutzellen zeigte den Trend, dass mit steigendem Hämatokrit die Eliminationszeit verlängert war, was in den jeweiligen Konzentrations-Zeit-Kurven durch einen flacheren Kurvenverlauf bzw. einer höheren Konzentration nach vier Stunden Dialyse der Eliminationskurve zu erkennen war (Vollblut: Abbildung 64, Blutzellen: Abbildung 65).



**Abbildung 65:** *In-vitro*-Eliminationskurven von Sitagliptin aus den Blutzellen nach Inkubation von Vollblut mit  $c = 500 \text{ ng/mL}$  Sitagliptin. Mit steigendem Hämatokrit verlängerte sich die Eliminationszeit, was in den jeweiligen Konzentrations-Zeit-Kurven aufgrund einer höheren Konzentration nach vier Stunden Dialyse zu erkennen war. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus den jeweiligen ( $n = 3$  bzw.  $n = 15$  für  $t = 0 \text{ min}$ ) Bestimmungen.

Für die Elimination aus Plasma war aus den *in-vitro*-Kurven kein Unterschied zwischen Hct 0,5 und 0,3 ersichtlich (Abbildung 66).



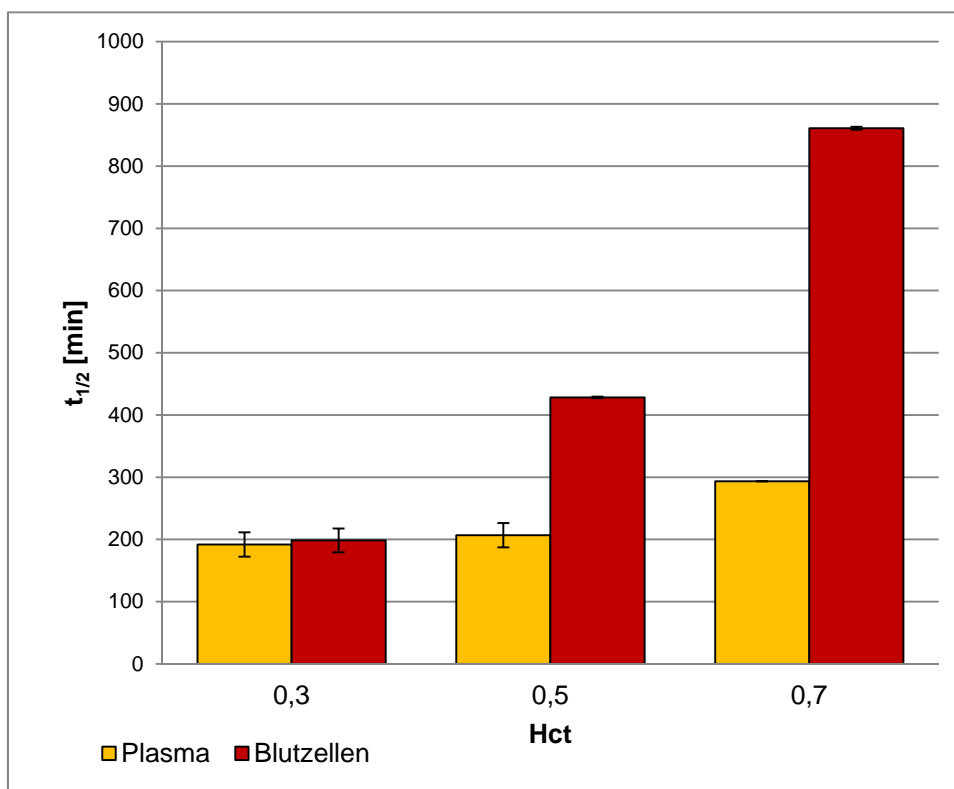
**Abbildung 66:** *In-vitro*-Eliminationskurven von Sitagliptin aus Plasma nach Inkubation von Vollblut mit  $c = 500 \text{ ng/mL}$  Sitagliptin. Für einen Hämatokrit von 0,7 resultierte eine längere Eliminationszeit als für einen Hct von 0,5 und 0,3, was in der Konzentrations-Zeit-Kurve aufgrund einer höheren Konzentration nach vier Stunden Dialyse zu erkennen war. Aus den Kurven war kein Unterschied zwischen Hct 0,5 und 0,3 zu erkennen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus den jeweiligen ( $n = 3$  bzw.  $n = 15$  für  $t = 0 \text{ min}$ ) Bestimmungen.

Die Berechnung der Eliminationshalbwertszeit erfolgte über die Formel zur Elimination erster Ordnung (Formel (8)), welche für die jeweiligen Matrizes und Hct-Werten durch die dazugehörigen Konzentrations-Zeit-Kurven gegeben waren sowie anschließender Umrechnung des  $k_e$ -Wertes in die Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  (Formel (9)).

$$c_t = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (8)$$

$$k = \ln 2 / t_{1/2} \quad (9)$$

Die Berechnung der Eliminationshalbwertszeit für Sitagliptin aus Plasma zeigte, dass diese im Blut mit einem Hämatokrit von 0,5 mit  $207 \pm 16$  min ungefähr gleich war wie aus Blut mit einem Hct von 0,3. Hier betrug diese  $192 \pm 20$  min (Abbildung 67). Die  $t_{1/2}$  aus den Blutzellen zeigten dagegen deutliche Unterschiede (Abbildung 67).

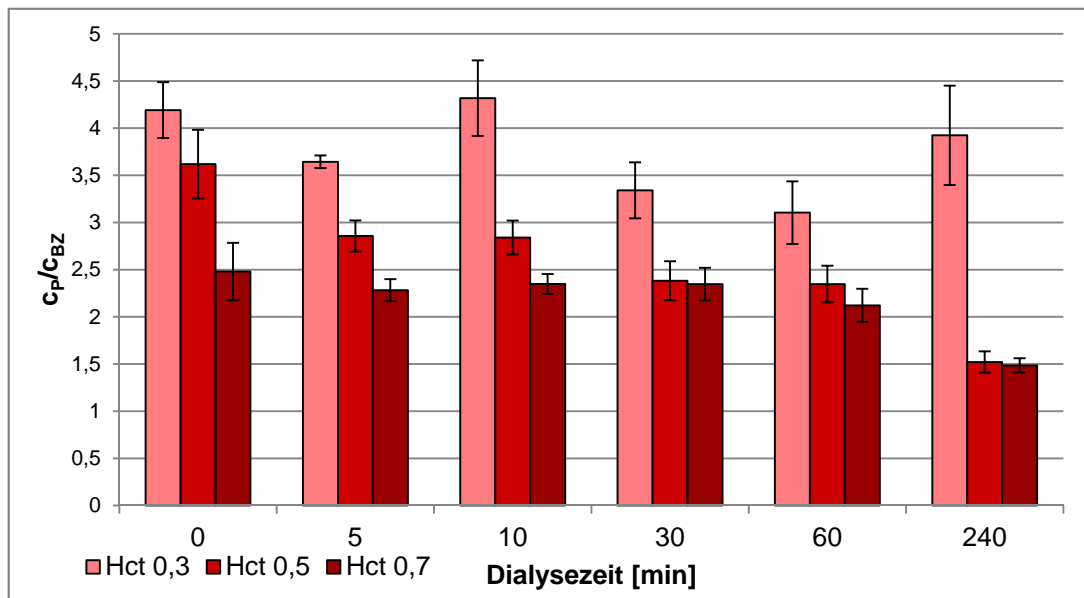


**Abbildung 67: In-vitro-Eliminationshalbwertszeiten ( $\pm$  MDM) von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen in Blut mit verschiedenem Hämatokrit.** Die Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) wurden bestimmt durch Berechnung über  $k_e$  aus den jeweiligen Konzentrations-Zeit-Kurven der Dialyse (je  $n = 3$ ). Aus diesen Kurven wurde die Exponentialfunktion und darüber  $k_e$  bestimmt.

Die Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  wurden für jeden Zeitpunkt der Dialyse bestimmt. Zum Start der Dialyse nach Inkubation des Arzneistoffs im Blut lagen diese für Hct 0,3 bei



4,19 ± 0,30, für Hct 0,5 bei 3,62 ± 0,36 und für Hct 0,7 bei 2,48 ± 0,31 (MW ± SD; n = 15). Im Laufe der Dialyse sanken die Verteilungskoeffizienten, vor allem für Blut mit einem Hämatokrit von 0,5 und 0,7 ab. Für einen Hct von 50 % sank  $c_p/c_{BZ}$  auf 1,52 ± 0,11 ab, für 70 % auf 1,49 ± 0,08 (Abbildung 68).



**Abbildung 68: Veränderung des Verteilungskoeffizienten  $c_p/c_{BZ}$  für Sitagliptin während der Dialyse.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3 bzw. n = 15 für t = 0 min) der berechneten Verteilungskoeffizienten.

#### 5.4.4.2 Diskussion

Wie in den vorherigen Versuchen wurde auch in den Dialyseversuchen die Zunahme der Verteilung in die Blutzellen mit steigendem Hämatokrit nachgewiesen.

Die verlangsamte Elimination des Sitagliptins aus Blut mit höherem Hct *in-vitro* bestätigte die *in-vivo* gefundene höhere „Steady-state“ Konzentration in Blut mit höherem Hct verglichen mit niedrigerem Hct (Allg. Teil, B5.4.1).

Durch die Bestimmung der Eliminationshalbwertszeiten  $t_{1/2}$  basierend auf den Dialyseversuchen konnte gezeigt werden, dass Sitagliptin *in-vitro* aus den Blutzellen deutlich langsamer eliminiert wurde als aus Plasma. Aus dieser verlangsamten Elimination konnte zum ersten Mal abgeleitet werden, dass die Blutzellen ein tiefes Kompartiment des Arzneistoffs darstellten. Diese Theorie konnte durch die Berechnung der Verteilungskoeffizienten bestätigt werden. Im Laufe der Dialyse erfuhren sie eine Abnahme (Abbildung 68), Sitagliptin wurde dementsprechend aus Plasma schneller eliminiert als es aus den Blutzellen ins Plasma abgegeben wurde.

#### **5.4.5 Schlussfolgerung**

Mithilfe verschiedener Versuche (Allg. Teil, B5.4.2, B5.4.3 und B5.4.4) konnte erfolgreich die in der Studie beobachtete Korrelation zwischen der Konzentration des Sitagliptins und dem Hämatokrit (Abbildung 60) aufgeklärt werden. Es wurden Verteilungskoeffizienten für die Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und den Blutzellen von 0,89 bis 1,89 bestimmt. Diese Spanne konnte durch die hämatokritabhängige Aufnahme des Arzneistoffs in die Blutzellen erklärt werden. Für Sitagliptin wäre die Spiegelkontrolle aus Vollblut deshalb der bessere Marker als die Kontrolle der Serumkonzentrationen, da Sitagliptin in den Blutzellen als tiefem Kompartiment gespeichert wird.

**C**

**Experimenteller Teil**



# 1 Häufig genutzte Reagenzien, Materialien und Geräte

## 1.1 Häufig genutzte Chemikalien

Metformin Hydrochlorid, Kreatinin,  $\geq 98\%$  (anhydrous), Phenformin Hydrochlorid, Acetonitril (HPLC-Grade), Methanol (HPLC Grade), Ammoniumformiat (Ammonium formate for mass spectrometry  $\geq 99.0\%$ ) sowie Ameisensäure (Formic Acid Solution, puriss. p.a. for HPLC, 50 % in water) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen. Acetonitril (HPLC-Grade), Methanol (HPLC Grade und Analyzed LC-MS-Reagent) und Wasser (Analyzed Ultra LC-MS) stammten von VWR International GmbH (Ismaning, Deutschland). Das für die HPLC-UV verwendete Wasser wurde aus der hauseigenen Milli-Q<sup>®</sup>-Anlage (Merck, Darmstadt) entnommen. Sitagliptin Phosphat wurde von Molekula GmbH (München), Sitagliptin-d4 Phosphat von Biozol Diagnostica (Eching) bezogen.

## 1.2 Humanes Vollblut

Humanes Vollblut wurde vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuz von gesunden Spendern, jünger als 35 Jahren, bezogen. Das nach den Untersuchungen freigegebene Vollblut wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 4 Wochen verwendet, um zu gewährleisten, dass die Blutzellen sich noch in vitalem Zustand befanden [191].

## 1.3 Dried-Blood-Spot Träger und Kapillaren

Blotting Papier (GB 004) mit 1 mm Dicke, das von Whatman, Buckinghamshire, UK bezogen wurde, wurde als Trockenblutträger verwendet. Aus diesem wurden Kreise mit 1 cm Durchmesser ausgestanzt und mit Hilfe eines doppelseitigen Klebebandes auf einer Kartonkarte fixiert.

Das Blut der Patientenproben wurde mit 40  $\mu\text{L}$  Mikrokapillaren nach Delbrück aufgetragen. Diese wurden von VWR International GmbH (Ismaning, Deutschland) bezogen.

## 1.4 HPLC-UV-Anlage

Verwendet wurde eine Waters HPLC Anlage (Milford, MA, USA) mit einer 1525 binären Pumpe, einem 717 plus Autosampler, einem 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector und einem Agilent 1260 Infinity Degasser (Santa Clara, CA, USA). Die Software, die zur

Datensammlung und –auswertung verwendet wurde, war Breeze™ Software Version 3.30.

Als Trennsäule wurde eine Phenomenex Luna® HILIC, 150 x 4,6 mm, 5 µm Partikel (Seriennummer: 646801-14) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) genutzt.

## 1.5 LC-MS/MS-Anlage

Für die LC-MS/MS Analytik wurde ein Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit folgenden Komponenten (Tabelle 19) verwendet.

**Tabelle 19: Komponenten der verwendeten LC-MS/MS-Anlage.**

Degasser	G1379B
Binäre Pumpe	G1312B
Autosampler	G1367D
Säulenofen	G1316B
DAD Detektor	G1315C
QQQ	G6460A

Die Software, die zur Datensammlung und –auswertung angewandt wurde, war die Agilent Software MassHunter Version B.05.00.

Als Trennsäule wurde eine Phenomenex Luna® HILIC, 100 x 2 mm, 3 µm Partikel (Seriennummer: 715667-3) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) genutzt.

## 1.6 Häufig genutzte Reagenzien

### 1.6.1 Stammlösungen für die Herstellung von Fließmittel

Es wurde für die HILIC ein Ammoniumformiatpuffer verwendet, der ausgehend von einer Stammlösung hergestellt wurde. Die Stammlösung war eine 10 M Lösung der Substanz in Wasser (Analyzed Ultra LC-MS), die bei 4 °C gelagert wurde.

### 1.6.2 Interner Standard

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung von Phenformin und Sitagliptin-d4 Phosphat mit einer Konzentration von 25 µg/mL für Phenformin und 100 ng/mL für Sitagliptin-d4 verwendet. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von - 25 °C gelagert.

### 1.6.3 Spikelösungen für die Kalibriergeraden

Für die Spikelösungen der Kalibriergeraden wurden ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen mit einer Konzentration von  $c = 1 \text{ mg/mL}$  methanolische Verdünnungen hergestellt, die die Analyten in verschiedenen Konzentrationen enthielten (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Konzentrationen häufig genutzter Spikelösungen der Kalibriergeraden (K) für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin in Methanol.**

	c (Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c (Metformin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c (Sitagliptin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]
K1	60	8	0,12
K2	80	12	0,16
K3	100	20	0,28
K4	200	32	0,50
K5	260	40	1,00
K6	320	80	2,00
K7	400	100	4,00
K8	460	120	8,00
K9	520	160	16,00
K10	600	200	20,00
K11			30,00
K12			40,00

### 1.6.4 Extraktionsmittel

Als Extraktionsmittel wurde eine Lösung aus 90 % Acetonitril mit Zusatz von 10 % Ameisensäure verwendet.

## 1.7 Sonstige häufig genutzte Geräte und Materialien

Mikroliterpipetten

0,5 - 10  $\mu\text{L}$

Eppendorf Research Plus Ser.Nr.: H35713D

2 - 20  $\mu\text{L}$

Eppendorf Research Ser.Nr.: 3888958

10 - 100  $\mu\text{L}$

Eppendorf Research Plus Ser.Nr.: H38706D

100 - 1000  $\mu\text{L}$

Eppendorf Research Plus Ser.Nr.: G15492D

Thermomixer

Eppendorf Thermomixer Compact 5350

Zentrifuge

Eppendorf Centrifuge 5702

(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Analysenwaage

Sartorius CPA22D

(Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 255 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
Reagiergefäße 1,5 mL 2,0 mL	Reagiergefäß 1,5 mL; PP Safe Seal Reagiergefäß 2,0 mL; PP
Sarstedt Tubes 15 ml	Röhre 15 mL, 120 x 17 mm, PP (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Stickstoff-Abdampfapparatur	Sonderanfertigung der hausinternen Werkstatt
Vortex	Vortex Genie 2 G560E (Scientific Industries, New York, USA)
Microfuge	Microfuge 22R (Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA)
HPLC-Vials	Certified Clear Glass 8 x 40 mm Snap Neck Total Recovery Vial, 700 µL mit 8x40 mm Snap Neck Cap and Septa (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
Desi Dry 1 g Trockenmittelbeutel	ThoMar OHG, Lüttau, Deutschland
LC-MS/MS Vials für kleine Volumina	Chromacol, Braunglass-Schraubflasche mit 300 µL Glaseinsatz, 03-FISV(A) (VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland)
LC-MS/MS Vials für große Volumina	Verex™ Vial, 9mm Screw Top, 2mL, Amber 51 (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Caps für LC-MS/MS Vials	Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septum (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Formlocher Artemio „Circle“ zum Ausstanzen der Spots	Formlocher Artemio „Circle“ (Stempelmeer, Inh. Silke Juninger, Frankfurt, Deutschland)

---

## 1.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertungen der Daten wurde die Software OriginPro 9.0.0G (Lehre) der Firma OriginLab (Northampton, MA, USA) verwendet.



## **2 Methode zur Quantifizierung von Kreatinin, Metformin und Sitagliptin aus Trockenblut**

### **2.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte**

#### **2.1.1 Substanzen**

Neben den in Exp. Teil, C1.1 aufgeführten Reagenzien wurden Atenolol,  $\geq 98\%$ , 2-Ethoxyethylacetat und PBS-Puffer (DUBLECCO'S Phosphate Buffered Saline) genutzt, die von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen wurden. Essigsäure sowie wässrige Ammoniaklösung, Ammoniumacetat und Ameisensäure wurden von der universitätsansässigen Chemikalienausgabe bezogen.

Weiter wurden Magnesiumsulfat,  $\geq 99,5\%$ , Natriumchlorid,  $\geq 99\%$ , Natriumacetat,  $\geq 99\%$ , tri-Natriumcitrat-dihydrat,  $\geq 99\%$  und Natriumcitrat-dibasic-sesquihydrat,  $\geq 99\%$  von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München), Bondesil-PSA (PSA), 40  $\mu\text{m}$  wurde von Agilent (Santa Clara, CA, USA) bezogen.

#### **2.1.2 Standardlösungen**

##### **2.1.2.1 Standardlösungen für die Methodenentwicklung aus Reinsubstanzen**

###### *HPLC-UV Methode*

Von Metformin, Atenolol und Kreatinin wurde je eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL in 50 % Acetonitril in Wasser hergestellt. Die jeweiligen Stammlösungen wurden mit 50 % Acetonitril in Wasser zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  verdünnt. Es wurden Lösungen der drei Analyten auch in 90 % Acetonitril mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  hergestellt. Neben den Einzellösungen wurde sowohl in 50 % Acetonitril, wie auch in 90 % Acetonitril ein Gemisch der drei Analyten mit einer Konzentration von je 10  $\mu\text{g/mL}$  hergestellt. Die Mischlösung in 90 % Acetonitril wurde weiter verdünnt zu einer Konzentration von  $c = 1\ \mu\text{g/mL}$ . Die Lösungen wurden bei einer Temperatur von  $-25\ ^\circ\text{C}$  gelagert.

###### *LC-MS/MS Methode*

Es wurden von Sitagliptin und Sitagliptin-d4 Phosphat methanolische Lösungen in verschiedenen Konzentrationen, ausgehend von der jeweiligen Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL Sitagliptin, bzw. Sitagliptin-d4 Phosphat hergestellt. Die Verdünnungen für Sitagliptin und Sitagliptin-d4 Phosphat hatten dabei eine Endkonzentrationen von je 10  $\mu\text{g/mL}$ . Zudem wurde eine methanolische Lösung der

beiden Substanzen hergestellt, die die Analyten in einer Konzentration von je 1 µg/mL enthielt. Die Lösungen wurden bei einer Temperatur von - 25 °C gelagert.

#### 2.1.2.2 Standardlösungen für die Methodenentwicklung aus Trockenblut und der Entwicklung der Extraktionsmethode

##### a. HPLC-UV Methode

###### *Interner Standard*

Es wurde eine methanolische Lösung von Atenolol mit einer Konzentration von 100 µg/mL, ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Eine methanolische Stammlösung ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) von Phenformin wurde verdünnt zu folgenden Konzentrationen: Verdünnung 1 ( $V_1 = 100 \text{ µg/mL}$ ,  $V_2 = 50 \text{ µg/mL}$  und  $V_3 = 25 \text{ µg/mL}$ ). Die Lösungen wurden bei einer Temperatur von - 25 °C gelagert.

###### *Spikelösungen für die Methodenentwicklung der HPLC-UV- und Extraktionsmethode*

Als Spikelösung zum Versetzen des Blutes mit Metformin und Kreatinin wurde eine methanolische Lösung verwendet, die, ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ), beide Analyten in einer Konzentration von 400 µg/mL enthielt. Die Lösungen wurden bei einer Temperatur von - 25 °C gelagert.

###### *Spikelösungen für die Optimierung der Extraktionsmethode*

Für die Optimierung der Extraktionsmethode wurde als Spikelösung zum einen eine Lösung verwendet, die beide Analyten in einer Konzentration von 400 µg/mL in Methanol enthielt. Zum anderen wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Analyten in Methanol hergestellt, die Metformin in Konzentrationen von 0,4 µg/mL bis 400 µg/mL und Kreatinin von 20 µg/mL bis 600 µg/mL enthielten. Die Verdünnungen wurden ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt.

###### *Stammlösungen für die Herstellung von Fließmittel*

Neben der in Exp. Teil, C1.6.1 beschriebenen Stammlösung wurde für die HILIC Ammoniumacetatpuffer verwendet, der ausgehend von der Stammlösung (10 M Ammoniumacetatpuffer in Milli-Q-Wasser) hergestellt wurden. Die Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

##### b. LC-MS/MS Methode

###### *Interner Standard*

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung von Sitagliptin-d4 Phosphat und Phenformin verwendet. Phenformin wurde als interner Standard für Metformin und

Kreatinin benötigt, die mittels HPLC-UV bestimmt wurden, allerdings aus demselben Spot extrahiert wurden, weshalb das Auftragen beider internen Standards erforderlich war. Ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen mit Konzentrationen von 1 mg/mL wurden drei methanolische Verdünnungen hergestellt, die Phenformin jeweils in einer Konzentration von 25 µg/mL und Sitagliptin-d4 Phosphat in Konzentrationen von 1 µg/mL ( $V_{1S}$ ), 200 ng/mL ( $V_{2S}$ ) und 100 ng/mL ( $V_{3S}$ ) enthielten. Die Lösungen wurden bei einer Temperatur von -25 °C gelagert.

#### *Spikelösungen für die Methodenentwicklung und –optimierung der LC-MS/MS Methode*

Zum Versetzen des Blutes mit Analyt wurden Spikelösungen verwendet, die ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL durch Verdünnungen mit Methanol hergestellt wurden (Tabelle 21). Die Lösungen wurden bei -25 °C gelagert.

**Tabelle 21: Konzentrationen der methanolischen Verdünnungen von Metformin, Kreatinin und Sitagliptin, die als Spikelösungen für die LC-MS/MS Methodenentwicklung verwendet wurden.**

c(Sitagliptin) [µg/mL]	c(Kreatinin) [µg/mL]	c(Metformin) [µg/mL]
40,00	600	400
4,00	460	120
0,28	100	20
0,40	320	40

#### *Stammlösung für die Herstellung von Fließmittel*

Es wurde die in Exp. Teil, C1.6.1 beschriebene Stammlösung verwendet.

#### 2.1.2.3 Standardlösungen um den Einfluss des Sitagliptins auf die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin zu untersuchen

##### *Interner Standard*

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung von Phenformin mit einer Konzentration von 50 µg/mL verwendet, die ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt wurde. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von -25 °C gelagert.

##### *Standardlösungen der Reinsubstanzen*

Ausgehend von der Stammlösung von Sitagliptin ( $c = 1$  mg/mL in Methanol) wurde eine methanolische sowie eine Verdünnung in PBS-Puffer hergestellt, die Sitagliptin in Endkonzentrationen von  $c = 1$  µg/mL enthielten.

*Spikelösungen für die Kalibriergerade*

Für die Kalibriergerade wurden ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) von Metformin und Kreatinin Verdünnungsreihen in Methanol hergestellt, die beide Analyten in verschiedenen Konzentrationen enthielten (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Konzentrationen der Spikelösung (in Methanol) für die Herstellung einer Kalibriergerade von Metformin und Kreatinin.**

<b>c(Kreatinin)</b> <b>[<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>	<b>c(Metformin)</b> <b>[<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>
60	4
80	8
100	12
200	20
260	32
320	40
400	80
460	120
520	200
600	400

*Spikelösungen für die Proben*

Ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen  $c = 1 \text{ mg/mL}$  wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt, die die Analyten in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Es wurde ein Gemisch von Metformin ( $400 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) und Kreatinin ( $600 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) in Methanol hergestellt sowie eines, das zusätzlich noch Sitagliptin ( $40 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) enthielt. Zudem wurde die Stammlösung des Sitagliptins mit Methanol verdünnt zu  $c = 40 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $60 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $80 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $280 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $400 \text{ }\mu\text{g/mL}$ .

#### 2.1.2.4 Standardlösungen für den Vergleich Dried Blood Spot-Karten und Blotting Papier als Träger des Trockenblutes

*Interner Standard*

Als interner Standard wurde die in Exp. Teil, C1.6.2 beschriebene Lösung verwendet.

*Spikelösungen für die Kalibriergeraden*

Ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen in Methanol mit einer Konzentration von je  $c = 1 \text{ mg/mL}$  wurden methanolische Verdünnungen hergestellt, die die Analyten in verschiedenen Konzentrationen enthielten (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Konzentrationen der Spikelösung für die Herstellung der Kalibriergeraden von Metformin, Kreatinin und Sitagliptin.**

c(Kreatinin) [µg/mL]	c(Metformin) [µg/mL]	c(Sitagliptin) [µg/mL]
60	8	0,04
80	12	0,16
100	20	0,28
200	32	0,50
260	40	1,00
320	80	2,00
400	100	4,00
460	120	8,00
520	160	16,00
600	200	20,00

## 2.1.2.5 Standardlösungen für die Methodvalidierung

Für die Methodvalidierung wurden neben der Spikelösungen für die Kalibriergeraden (Exp. Teil, C1.6.3) ausgehend von den jeweiligen Stammlösungen mit einer Konzentration von  $c = 1$  mg/mL methanolische Verdünnungen hergestellt, die die Analyten für die Qualitätskontrollproben (QC-Proben) in verschiedenen Konzentrationen enthielten (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Konzentrationen der für die Methodvalidierung genutzten Spikelösungen für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin in Methanol.** Bei den Stabilitätsuntersuchungen und auch beim Vergleich des Auftragens mit Pipette und Kapillare wurden die in den Klammern dargestellten Konzentrationen verwendet. Dargestellt sind die Spikelösungen für die Qualitätskontrollproben (QC).

	c (Kreatinin) [µg/mL]	c (Metformin) [µg/mL]	c (Sitagliptin) [µg/mL]
	QC-Proben		
QC_LLOQ	60	8	0,12
QC_low	180	24	0,40
QC_medium	260	80	6,00
QC_high	460	160 (200)	16,00
QC_highSita			30,00
QC_ULOQ	600	200	20,00
QC_ULOQSita			40,00

Als interner Standard wurde die in Exp. Teil, C1.6.2 beschriebene Lösung verwendet.

Zudem wurden für die post-spiked Proben (Exp. Teil, C2.7.8) Lösungen der Analyten, ausgehend von den methanolischen Stammlösungen, in Acetonitril in verschiedenen Konzentrationen hergestellt (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Konzentration der für die Methodvalidierung verwendeten post-spiked (= post-Extraktion-spiked = pEs) Lösungen der Analyten in Acetonitril.** (Krea = Kreatinin, Metf = Metformin, Sita = Sitagliptin, Phen = Phenformin, Sd4 = Sitagliptin-d4 Phosphat)

	c(Krea) [µg/mL]	c(Metf) [µg/mL]	c(Sita) [ng/mL]	c(Phen) [µg/mL]	c(Sd4) [ng/mL]
pEs_LLOQ	0,400	0,053	0,8	1,333	5,333
pEs_Medium	1,730	0,530	4,0	1,333	5,333
pEs_High	3,067	1,067	106,7	1,333	5,333
pEs_HighSita			200,0		5,333

### 2.1.3 Humanes Vollblut

Humanes Vollblut wurde in Exp. Teil, C1.2 beschrieben.

### 2.1.4 Dried-Blood-Spot Träger und Kapillaren

Als Trockenblutträger fanden neben dem in Exp. Teil, C1.3 beschriebenem verschiedene Materialien Anwendung. Filterpapier mit und ohne PE-Beschichtung sowie DC-Platten (sowohl Cellulose-, also auch Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien) wurden von der hauseigenen Chemikalienausgabe bezogen. 100 Dried-Blood-Spot Karten (Perkin Elmer 226 Sample Collection Device GR 2261004) der Firma Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) waren ein Geschenk der Firma Gerstel GmbH & Co KG (Mühlheim an der Ruhr).

Zum Auftragen von Patientenproben wurden die in Exp. Teil, C1.3 beschriebenen Kapillaren verwendet.

### 2.1.5 HPLC-UV-Anlage und LC-MS/MS-Anlage

Die verwendeten Anlagen wurden in Exp. Teil, C1.4 und C1.5 beschrieben.

### 2.1.6 Sonstige Geräte und Materialien

Neben den in Exp. Teil, C1.7 aufgeführten Geräten und Materialien wurden weiterhin verwendet:

---

HPLC Säule SunFire™ C18	SunFire™ C18, 4,9 x 150 mm, 5 µm Partikel, Seriennummer: T41011U
HPLC Säule XBridge™ C18	XBridge™ C18, 4,6 x 150 mm, 5 µm Partikel, Seriennummer: 01513235313817 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)

---

## 2.2 Durchführung der HPLC-UV-Methodenentwicklung

### 2.2.1 Entwicklung der HPLC-UV Methode für Metformin und Kreatinin aus Reinsubstanzen

#### 2.2.1.1 Umkehrphasenchromatographie

Um eine HPLC-UV-Methode zu entwickeln, wurden die Reinsubstanzen mit einer Konzentration von 10 µg/mL in 50 % Acetonitril in Milli-Q Wasser als Einzellösungen oder als Gemisch der drei Substanzen injiziert (je 50 µL Injektionsvolumen). Sowohl mit der Waters SunFire™ Säule, als auch mit der XBridge™ Säule wurde zuerst mit Acetonitril als organischer und 0,2 % Essigsäure in Milli-Q-Wasser als wässriger Phase gearbeitet. Aufgrund der pH-Stabilität der XBridge™ Säule, wurde der pH-Wert variiert. Es wurden hierfür verschiedenen Fließmittel verwendet (Tabelle 26). Da das Absorptionsmaximum von Metformin bei 232 nm [158] und das von Kreatinin bei 233 nm [192] liegt, wurde als Messwellenlänge 230 nm gewählt.

**Tabelle 26: Die verwendeten wässrigen Fließmittel für die Entwicklung der HPLC-UV Methode der Reinsubstanzen unter Verwendung einer Waters XBridge™ Säule.**

Wässrige Phase	pH-Wert	Modifizier
0,2 % Essigsäure in Milli-Q Wasser	3,1	
	5,5; 8,0; 9,0; 9,6	NH <sub>3</sub>
Milli-Q Wasser	8,5	
	10,0	NH <sub>3</sub>

In Kombination mit den verschiedenen Fließmitteln wurden unterschiedliche Fließmittelgradienten getestet (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Die im Zuge der Methodenentwicklung der HPLC-UV Methode der Reinsubstanzen getesteten Fließmittelgradienten unter Verwendung von Umkehrphasenchromatographie. B% stellt dabei den Anteil an organischem Fließmittel dar.**

Benennung	Zeit in min	Fluss in mL/min	B%
A		0,4	20
	15	0,4	20
B1 / B0,5		1 / 0,5	15
	15	1 / 0,5	95
C1 / C0,5		1 / 0,5	50
	15	1 / 0,5	50
D		0,5	15
	15	0,5	50
E		0,5	15
	15	0,5	30
F		0,5	15
	10	0,5	50
	13	0,5	50
G		0,5	15
	10	0,5	95
H		0,5	30
	15	0,5	30
I		0,5	15
	5	0,5	50
	7	0,5	50

Die getesteten Kombinationen, die sich aus Säule, Fließmittel und Fließmittelgradient zusammensetzten, sind im Folgenden dargestellt (Tabelle 28).

**Tabelle 28: Getestete Kombinationen aus Säule, Fließmittel und Fließmittelgradient im Zuge der Entwicklung der HPLC-UV Methode der Reinsubstanzen.** Fließmittel A stellt das wässrige Fließmittel dar, Acetonitril wurde als organisches Fließmittel verwendet. Die Bezeichnungen der Fließmittelgradienten wurden aus vorheriger Tabelle (Tabelle 27) übernommen.

Säule	Fließmittel A	Fließmittelgradient
Waters SunFire	0,2 % Essigsäure	A; B1
Waters XBridge	0,2 % Essigsäure	B1; C1
	0,2 % Essigsäure, pH 8	B0,5; C0,5
	0,2 % Essigsäure, pH 9	B0,5; C0,5; D; E; F; I
	Milli-Q Wasser, pH 10	B0,5; C0,5
	0,2 % Essigsäure, pH 9,6	B0,5; C0,5; E; F; G; H; I



## 2.2.1.2 Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie

Für die Methodenentwicklung auf einer Phenomenex Luna<sup>®</sup> HILIC Säule, wurden die Lösungen der Substanzen in 90 % Acetonitril verwendet. Injiziert wurden jeweils 50 µL der Verdünnungen mit Konzentrationen von 10 µg/mL und 1 µg/mL. Als organisches Fließmittel wurde Acetonitril, als wässriges wurde ein Ammoniumformatpuffer in verschiedenen Konzentrationen (50 mM, 10 mM und 5 mM), der mit Ameisensäure auf einen pH von 3,2 eingestellt wurde sowie ein Ammoniumacetatpuffer in verschiedenen Konzentrationen (50 mM, 10 mM), der mit Essigsäure auf einen pH von 5,8 eingestellt wurde, verwendet.

Als Messwellenlänge wurden 230 nm gewählt. Auch hier wurden wieder in Kombination mit den verschiedenen Fließmitteln unterschiedliche Fließmittelgradienten getestet (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Die im Zuge der Methodenentwicklung der HPLC-UV Methode der Reinsubstanzen getesteten Fließmittelgradienten unter Verwendung einer Phenomenex Luna<sup>®</sup> HILIC. B% stellt dabei den Anteil an organischem Fließmittel dar.**

Benennung	Zeit in min	Fluss [mL/min]	B%
A		0,5 / 1	90
	2,5	0,5 / 1	90
	10	0,5 / 1	50
	12,5	0,5 / 1	50
B		1	90
	2,5	1	90
	10	1	70
	12,5	1	70
C		1	90
	1	1	90
	6	1	70
	10	1	70
D		1	90
	15	1	90
E		1	80
	10	1	80
F		1	70
	10	1	70

Die getesteten Kombinationen aus Fließmittel und Gradient auf genannter Säule, die durchgeführt wurden, sind in nachfolgender Tabelle dargestellt (Tabelle 30).

**Tabelle 30: Getestete Kombinationen aus Fließmittel und Fließmittelgradient im Zuge der Entwicklung der HPLC-UV Methode der Reinsubstanzen für eine Phenomenex Luna<sup>®</sup> HILIC Säule.** Fließmittel A stellt das wässrige Fließmittel dar, Acetonitril wurde als organisches Fließmittel verwendet. Die Bezeichnungen der Fließmittelgradienten wurden aus vorheriger Tabelle (Tabelle 29) übernommen.

<b>Fließmittel A</b>	<b>Fließmittelgradient</b>
50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5,8	A; B; C; D
50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3,2	A; C; D
10 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3,2	A; C; D; E; F
10 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5,8	A; C
5 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3,2	E; F

### **2.2.2 Entwicklung der HPLC-UV Methode für Metformin und Kreatinin aus Trockenblut**

Um die HILIC – Methode für die Reinsubstanzen auf die Analyten mit Matrix zu übertragen, wurden 250 µL Vollblut mit 2,5 % Spikelösung versetzt und davon 50 µL auf ein ausgestanztes rundes Blotting Papier getropft. Nach einer Trocknungsdauer von mindestens 3 Stunden, wurden 5 µL der Lösung des internen Standards auf den Spot getropft und wiederum für eine kurze Zeit getrocknet. Der Spot wurde in einem Eppendorf Cap platziert, es wurden 200 µL 90 % Acetonitril in Milli-Q Wasser als Extraktionsmittel hinzugegeben und für 60 Sekunden auf einem Vortex gemischt und anschließend der Überstand (Extrakt) in die HPLC injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 50 µL. Zudem wurden dem Extrakt Reinsubstanzen zugegeben, um eine detektierbare Menge an Analyt in der Probe zu haben, da das Extraktionsvorgehen noch ein keiner Weise optimiert war.

Nach der entwickelten Methode aus Reinsubstanzen (Tabelle 31 A), wurden verschiedene Fließmittelgradienten getestet (Tabelle 31 B – E).

**Tabelle 31: Die im Zuge der Methodenentwicklung der HPLC-UV Methode aus Trockenblut getesteten Fließmittelgradienten.** B% stellt dabei den Anteil an organischem Fließmittel dar.

Benennung	Zeit in min	Fluss [mL/min]	B%
A		1	70
	6	1	70
B		1	90
	5	1	90
	7	1	70
C		1	90
	3	1	70
	5	1	50
D		1	90
	5	1	50
E		1	70
	3	1	50
	5	1	50

Aufgrund des Wechsels des internen Standards wurde die Methode erneut abgewandelt. Hierzu wurden wiederum unterschiedliche Fließmittelgradienten getestet (Tabelle 32). Zudem wurde bei diesen Proben, sowohl Atenolol, als auch Phenformin zugegeben, um eine Trennung der beiden Substanzen zu erreichen.

**Tabelle 32: Die im Zuge der Methodenanpassung an Phenformin als internen Standard getesteten Fließmittelgradienten für die HPLC-UV Methode.** B% stellt dabei den Anteil an organischem Fließmittel dar.

Benennung	Zeit in min	Fluss [mL/min]	B%
A		1	70
	3	1	50
	5	1	50
B		1	70
	5	1	50
	7	1	50
C		1	80
	5	1	50
	7	1	50
D		1	80
	3	1	50
	5	1	50

## 2.3 Entwicklung der Extraktionsmethode

### 2.3.1 Auswahl des Blutvolumens

Für erste Versuche wurde mit der Eppendorfpipette 50  $\mu\text{L}$  Blut pro Spot aufgetragen und dieser im Gesamten extrahiert. Das Volumen wurde dann auf 40  $\mu\text{L}$  reduziert, um das Blut mit einer Kapillare auftragen zu können. Die hierzu verwendeten Minicaps<sup>®</sup> nach Delbrück sind heparinisierte Kapillaren und umfassen ein Volumen von 40  $\mu\text{L}$  mit einer Richtigkeit von 0,5 % und einer Reproduzierbarkeit von 1 %.

### 2.3.2 Auswahl des Dried-Blood-Spot Trägers

Es wurden je 50  $\mu\text{L}$  Blut auf Dried-Blood-Spot Karten, Filterpapier, PE-beschichtetes Filterpapier, auf eine mit Cellulose beschichtete DC-Platte und auch auf eine mit Kieselgel beschichtete DC-Platte sowie auf Blotting Papier aufgetragen, um Unterschiede im Verhalten, wie z. B. der Größe des Spots, der Form des Spots oder der Handhabung zu untersuchen.

### 2.3.3 Auswahl des Extraktionsmittels

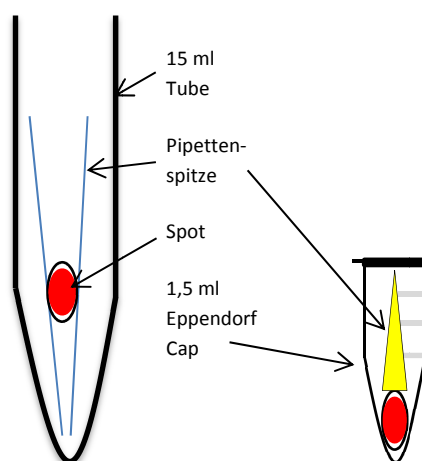
Zum Vergleich verschiedener Extraktionsmittel wurden methanolische Lösungen von Metformin und Kreatinin zum Blut hinzugegeben, sodass eine Konzentration von jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Analyt im Blut resultierte. Dabei betrug das Volumen an Spikelösung nur 2,5 %, sodass dies vernachlässigbar war. Für Kreatinin war allerdings zu beachten, dass dieses schon endogen im Blut vorhanden war. Deshalb wurde in Blutproben von verschiedenen Spendern jeweils ein Blank-Wert der Peakfläche bestimmt und diese von den Flächen der mit Kreatinin versetzten Proben abgezogen (Exp. Teil, C2.7.1).

Die mit den Analyten versetzten Proben wurden auf zuvor ausgestanzte Kreise an Blotting Papier getropft (40  $\mu\text{L}$ ) und für mindestens 3 Stunden getrocknet. Nach Auftragen des internen Standards (5  $\mu\text{L}$  der  $V_1$ ) und Trocknen von diesem, wurden sie durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Extraktionsmittels (Tabelle 33) extrahiert. Für diese ersten Versuche wurden die Spots jeweils in ein 1,5 mL Eppendorf Cap gelegt, mit Extraktionsmittel versetzt und anschließend mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze nach unten in das Eppendorf Cap geklemmt, um zu vermeiden, dass sie bei der Extraktion nach oben auswichen und somit nicht mehr vom Extraktionsmittel erfasst werden konnten (Abbildung 69). Danach wurde das Reagiergefäß auf einem Thermomixer für 30 min bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Anschließend wurde das Filterpapier in eine Einmalpipettenspitze (blau) gegeben, diese in ein 15 mL

Sarstedt Tube gelegt und bei Raumtemperatur mit 4400 g für 5 min zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Filterpapier zu schleudern (Abbildung 69).

**Tabelle 33: Die Extraktionsmittel, die hinsichtlich ihrer Extraktionseffizienz untersucht wurden, waren vor allem verschiedene Konzentrationen an Acetonitril (ACN), Methanol (MeOH), aber auch andere Lösungsmittel, wie Millipore® Wasser (MQ-Wasser) und Gemische mit verschiedenen Modifier. Es wurden 200 µL des jeweiligen Extraktionsmittels verwendet.**

Extraktionsmittel	Anteil in Wasser [%]	Modifier	Anteil des Modifier [%]
ACN	100; 90; 80; 60		
MeOH	100; 90; 80; 60		
MQ-Wasser			
2-Ethoxyethylacetat			
ACN	100	Ameisensäure	0,05; 1; 5
ACN	90	Ameisensäure	0,1; 1; 5; 10; 20
ACN	90	Essigsäure	0,1; 1
ACN	90	Ammoniak	1; 5



**Abbildung 69: Schematische Darstellung des Ausschleuderns der gesamten Flüssigkeit aus dem Filterpapier (links) sowie des Einklemmens des Spots in das Eppendorf Cap (rechts).** Zum Ausschleudern wurde der Spot dabei in eine Pipettenspitze gelegt, die wiederum in ein Sarstedt-Tube gegeben und zentrifugiert wurde. Die Flüssigkeit floss dann nach unten in das Tube ab, wohingegen das Filterpapier in der Pipettenspitze verblieb.

Nachfolgend wurde der gesamte Extrakt bei Raumtemperatur unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 130 µL Acetonitril für 30 s auf einem Vortex gemischt. Nach Überführen in ein 1,5 mL Eppendorf Cap und Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 18000 g, wurden 100 µL des aufgereinigten Extraktes in die HPLC-Anlage injiziert und vermessen.

### 2.3.4 Auswahl des Extraktionsmittelvolumens

Um das für die Extraktion optimale Volumen an Extraktionsmittel zu finden, wurden verschiedene Volumina hinsichtlich der Extraktionseffizienz untersucht.

Das Versetzen der Proben mit Analyt und die Extraktion der Proben wurden wie beschrieben (Exp. Teil, C2.3.3) durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurde 90 % Acetonitril mit Zusatz von 1 % Ameisensäure verwendet. Getestet wurden Extraktionsmittelvolumina von 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  und 1000  $\mu\text{L}$ .

## 2.3.5 Entwicklung und Optimieren des Extraktionsverfahrens

### 2.3.5.1 Entwicklung des Extraktionsverfahrens

Neben dem optimalen Extraktionsmittel und dessen Volumen sollte auch noch die beste Variante an Extraktionsverfahren ermittelt werden. Die mit Analyt versetzte Probe wurde nach der Standardprozedur (Exp. Teil, C2.3.3) extrahiert und dieses Vorgehen durch verschiedene Variationen abgewandelt (Abbildung 70).

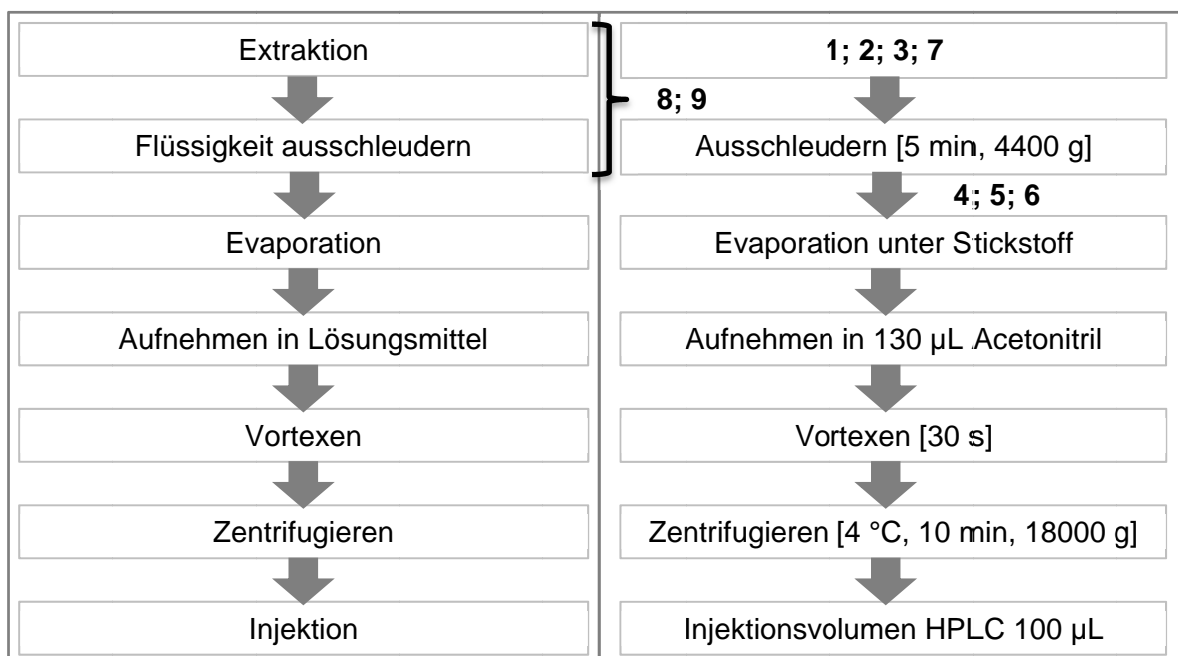


Abbildung 70: Das allgemeine Verfahren der Extraktion eines Dried-Blood-Spots (linke Seite) wurde durch verschiedene Variationen (mit Nummern gekennzeichnet; Erklärung siehe Tabelle 34) verändert (rechte Seite) um das effizienteste Extraktionsvorgehen zu finden.

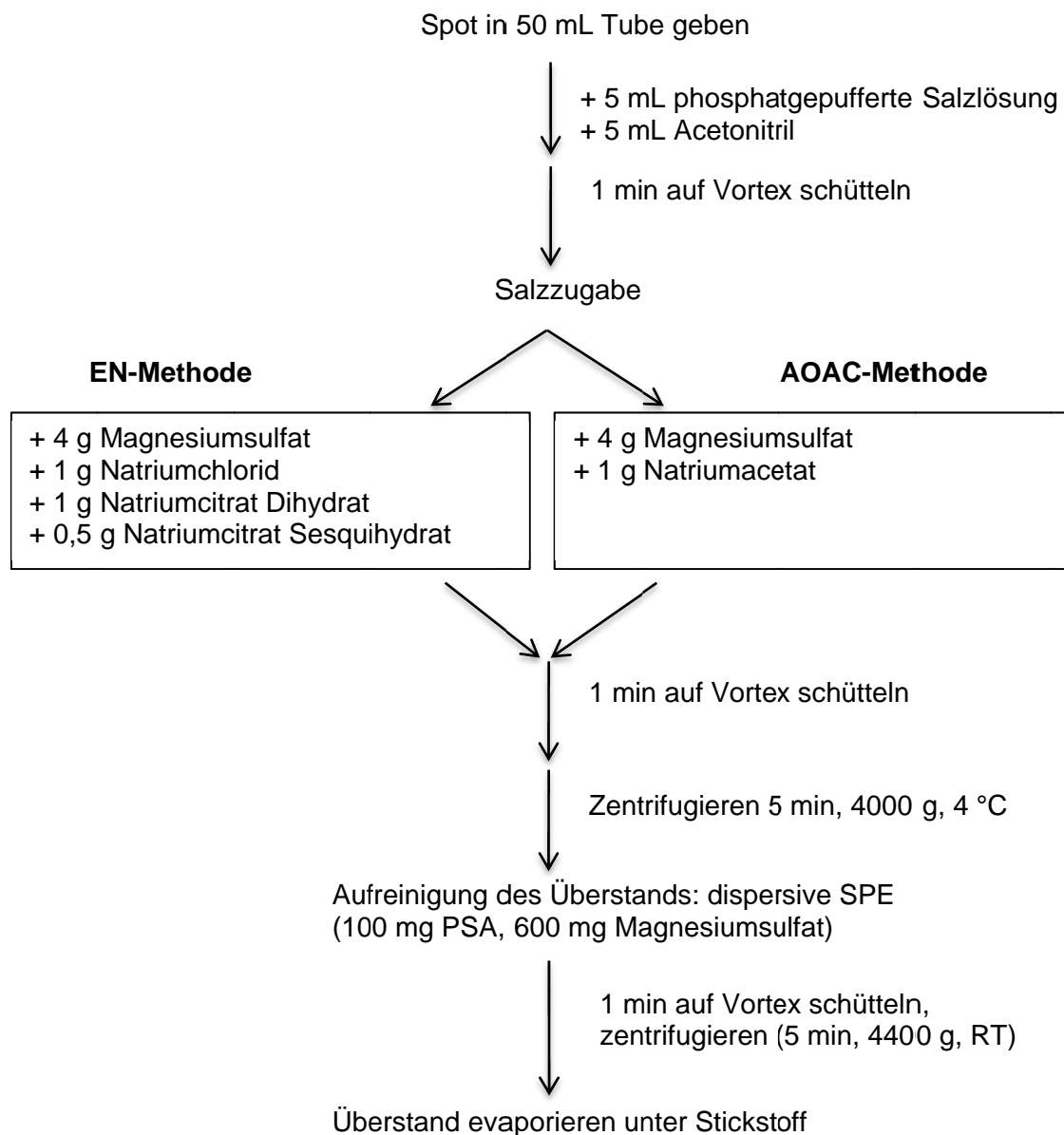
Die durchgeführten Variationen (Tabelle 34) sind mit den entsprechenden Nummern in die obige Darstellung eingefügt.

**Tabelle 34: Die Variationen der Standardprozedur der Extraktion, um das beste Ergebnis hinsichtlich der Extraktionseffizienz zu erreichen.** Die Variationen (1-9) stellen dabei die in Abbildung 70 aufgeführten Nummern dar. Um die Effizienz zu erhöhen wurde die Zeit im Thermomixer (TM) variiert, die Probe wurde im Ultraschallbad (US) behandelt, es wurde eine dispersive Festphasenextraktion (dSPE) nach zwei verschiedenen Vorschriften (EN und AOAC) durchgeführt, es wurden mithilfe von Acetonitril (ACN) Proteine gefällt und die QuEChERS – Methode wurde durchgeführt.

Variation	Extraktionsvorgehen
1	30 min TM
2	60 s Vortex
3	US (10 min) + TM (30 min)
4	US (10 min) + TM (30 min) + dSPE - EN
5	US (10 min) + TM (30 min) + dSPE - AOAC
6	US (10 min) + TM (30 min) + Proteinfällung mit ACN
7	US (10 min)
8	QuEChERS - EN
9	QuEChERS - AOAC

Variation 1 war das beschriebene (Exp. Teil, C2.3.3) Standardverfahren, für Variation 3 wurde die Probe vor der Zeit im Thermomixer für 10 min ins Ultraschallbad gelegt. Variation 2 beinhaltete, dass die Probe für 60 Sekunden auf einem Vortex geschüttelt wurde. Die Variationen 4 und 5 waren Erweiterungen der Variation 3. Nach dem Ausschleudern der Flüssigkeit aus dem Spot wurde der Extrakt mithilfe einer dispersiven Festphasenextraktion (dSPE) aufgereinigt. Hierbei wurde der Extrakt auf eine Mischung von PSA (primäre und sekundäre Amine) und Magnesiumsulfat gegeben. PSA dient dazu, organische Säuren, Fettsäuren und Zucker zu entfernen, Magnesiumsulfat dagegen entfernt Wasser aus der Probe [193]. Nach EN-Norm und AOAC ändert sich nur das Verhältnis der Stoffe zueinander [193]. Nach EN Norm (Variation 4) wurde zu den ca. 200 µL Extrakt 30 mg Magnesiumsulfat und 5 mg PSA gegeben, bei der nach AOAC (Variation 5) wurden 30 mg Magnesiumsulfat und 10 mg PSA zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 1 min auf dem Vortex geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur mit 4000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und entsprechend weiterverarbeitet. Bei Variation 6, die ebenfalls eine Erweiterung der Variation 3 darstellte, wurde nach dem Ausschleudern 100 µL Acetonitril mit einer Temperatur von -20 °C zugegeben, um die Proteine auszufällen. Der Extrakt wurde für 10 Sekunden gemischt und dann für 10 min bei 4 °C und 18000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Bei Variation 7 wurden die Proben für 10 min in einem Ultraschallbad behandelt und anschließend sofort weiterverarbeitet. Die Variationen 8 und 9 wichen von den vorher genannten Variationen in ihrer Vorgehensweise ab. Die QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Methode ist im Folgenden (Abbildung 71) schematisch dargestellt. Während bei dieser Methode nach der europäischen EN-Norm Magnesiumsulfat und Natriumchlorid zur Trocknung der

Acetonitrilphase und Natriumcitrat Dihydrat und Natriumcitrat Sesquihydrat zur Stabilisierung des pH-Wertes eingesetzt wurden, wurde nach AOAC nur Magnesiumsulfat zur Trocknung und Natriumacetat zur pH-Stabilisierung zugegeben und das Salzverhältnis (6:1 Magnesiumsulfat:PSA) für die dSPE der Originalmethode beibehalten [155, 193].



**Abbildung 71: Darstellung der QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Extraktionsmethode nach EN-Norm und AOAC.** Durch Zugabe verschiedener Salze wurden die Analyten extrahiert und durch anschließende dispersive Festphasenextraktion (dSPE) aufgereinigt. (PSA = primäre und sekundäre Amine, RT = Raumtemperatur)



### 2.3.5.2 Optimieren des Extraktionsverfahrens

Nachdem Variation 7 (Exp. Teil, C2.3.5.1, Abbildung 70, Tabelle 34) sich als effizienteste Extraktionsmethode (Allg. Teil, B1.2.2.5) bewiesen hatte, wurde diese optimiert.

Die verwendeten Proben waren mit Analyt versetzte getrocknete Blutproben (Exp. Teil, C2.3.3), die nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Extraktionsmittel (90 % Acetonitril mit 1 % Ameisensäure) 10 min im Ultraschallbad extrahiert wurden. Anschließend wurde die Flüssigphase abgenommen und die letzten Flüssigkeitsreste aus dem Spot geschleudert. Der komplette Extrakt wurde unter einem Stickstoffstrom zur Trockene evaporiert, in 130  $\mu\text{L}$  Acetonitril aufgenommen, 30 Sekunden geschüttelt und nach Zentrifugation wurden 100  $\mu\text{L}$  in die HPLC injiziert.

Um den Einfluss der Zeit, welche die Probe im Ultraschallbad verblieb, auf die Extraktionseffizienz zu testen, wurde diese variiert (5 min, 10 min, 20 min, 30 min). Ebenso wurde auch die Dauer, die die Probe nach Wiederaufnahme in Acetonitril geschüttelt wurde verändert (10 s, 20 s, 30 s, 1 min). Als dritter Punkt wurde das Aufnahme- und Injektionsvolumen optimiert. Dazu wurden verschiedene Kombinationen getestet (Tabelle 35).

**Tabelle 35: Die Kombinationen von Aufnahme- und Injektionsvolumen, die im Zuge der Methodenoptimierung untersucht wurden, um die Effizienz der Extraktion zu steigern.** Das Aufnahmevolumen beschreibt das Volumen, das nach der Evaporation dem Rückstand zugegeben wurde, um diesen zu lösen, das Injektionsvolumen beschreibt das Volumen des Extraktes, das zur Analyse in die HPLC-UV-Anlage injiziert wurde.

Aufnahme-/Injektionsvolumen [ $\mu\text{L}$ ]
130 / 100
130 / 80
100 / 60
60 / 35
50 / 30
150 / 90
170 / 100

Nachdem die effizienteste Extraktionsmethode (Allg. Teil, B1.2.2.5, Abbildung 20) gefunden war, wurden Kalibriergeraden für Metformin und Kreatinin erstellt, um die Linearität zu überprüfen. Die Konzentrationen der Analyten im Blut variierten (Metformin [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]: 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1; 2; 5; 10; Kreatinin [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]: 0,5; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 6,5; 8; 10; 11,5; 13; 15) bis der endgültige Kalibrierbereich (Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44) gefunden war.

### 2.3.6 Anpassen der Konzentration des internen Standards

Bisher wurde für alle Versuche der interne Standard in einer Konzentration von  $c = 100 \mu\text{g/mL}$  und einem Volumen von  $5 \mu\text{L}$  den Proben zugegeben, was einer Menge von  $500 \text{ ng}$  entspricht. Da aber maximal  $200 \text{ ng}$  Metformin und  $600 \text{ ng}$  Kreatinin im Spot vorliegen werden (maximale Konzentrationen in Kalibriergerade, Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44), war die aufgetragene Menge des internen Standards zu hoch.

Diese wurde reduziert, indem die Verdünnungen  $V_2$  und  $V_3$  (Exp. Teil, C2.1.2.2) auf die jeweiligen Proben der Kalibriergeraden (Tabelle 36) aufgetragen und die Linearität überprüft wurde.

**Tabelle 36: Konzentrationen der Spikelösungen sowie die daraus resultierenden Konzentrationen im Blut von Kreatinin und Metformin für die Anpassung der Konzentration des internen Standards.**

Konzentrations-niveau	c(Spikelösung Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c(Spikelösung Metformin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c(Blut Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c(Blut Metformin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	60	4	1,5	0,1
2	80	8	2,0	0,2
3	100	12	2,5	0,3
4	200	20	5,0	0,5
5	260	32	6,5	0,8
6	320	40	8,0	1,0
7	400	80	10,0	2,0
8	460	120	11,5	3,0
9	520	200	13,0	5,0
10	600	400	15,0	10,0

Es wurde Blut für drei Kalibriergeraden mit Analyt versetzt (Exp. Teil, C2.3.3) und gespottet. Zu jeder Kalibriergerade wurde eine Blank Probe gespottet, die mit Methanol versetzt wurde, um identische Bedingungen zu erreichen. Eine Kalibriergerade wurde mit  $400 \text{ ng}$  internen Standard versehen, dafür wurden je  $8 \mu\text{L}$  einer Lösung mit einer Konzentration von  $c = 50 \mu\text{g/mL}$  auf den Spot aufgetragen. Auf die zweite und dritte wurden je  $200 \text{ ng}$  bzw.  $100 \text{ ng}$  interner Standard, also  $8 \mu\text{L}$  bzw.  $4 \mu\text{L}$  einer Lösung von  $c = 25 \mu\text{g/mL}$  aufgetragen. Nach kurzer Trocknungsdauer wurden die Spots extrahiert (Allg. Teil, B1.2.2.5, Abbildung 20) und vermessen.

## 2.4 Einfluss des Sitagliptins auf die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin

Sitagliptin sollte aus demselben Spot extrahiert, allerdings über eine LC-MS/MS Methode vermessen werden. Die Extraktionsmethode sowie die HPLC-UV Methode sollten dabei beibehalten werden.

Um sicherzustellen, dass Sitagliptin die UV-Bestimmung von Metformin und Kreatinin nicht stört, wurde eine methanolische Verdünnung ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ) des Analyten direkt injiziert, die Verdünnung in PBS-Puffer ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ) wurde gespottet, extrahiert und anschließend auch mit der beschriebenen HPLC-UV Methode (Allg. Teil, B1.2.1.2) vermessen. Zusätzlich zu der Messwellenlänge von 230 nm wurden die Lösungen bei 254 nm sowie 266 nm detektiert.

Im weiteren Verlauf wurden Kalibriergeraden (Tabelle 37) für Metformin und Kreatinin aus DBS hergestellt. Hierfür wurde das Blut mit den entsprechenden Spikelösungen versetzt, gespottet, getrocknet, extrahiert und anschließend vermessen.

**Tabelle 37: Konzentrationen an Metformin und Kreatinin im Blut der Kalibriergeraden zum Untersuchen des Einflusses von Sitagliptin auf die Quantifizierung von Metformin und Kreatinin.**

c(Blut Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	c(Blut Metformin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1,5	0,1
2,0	0,2
2,5	0,3
5,0	0,5
6,5	0,8
8,0	1,0
10,0	2,0
11,5	3,0
13,0	5,0
15,0	10,0

Zusätzlich wurden Proben ( $n = 3$ ) zum Etablieren der Konzentration des Sitagliptins, bei welcher die Bestimmung des Kreatinins beeinflusst wird, hergestellt. Ein Probenset enthielt Kreatinin in einer Konzentration von  $15 \mu\text{g/mL}$  und Metformin in  $10 \mu\text{g/mL}$ , ein Zweites enthielt zusätzlich zu den beiden genannten Analyten Sitagliptin in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/mL}$ . Weitere Sets enthielten nur Sitagliptin in verschiedenen Konzentrationen ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ;  $1,5 \mu\text{g/mL}$ ;  $2 \mu\text{g/mL}$ ;  $5 \mu\text{g/mL}$ ;  $7 \mu\text{g/mL}$ ;  $10 \mu\text{g/mL}$ ).

## 2.5 Entwicklung der LC-MS/MS Methode

### 2.5.1 Methodenentwicklung aus der Reinsubstanz

#### 2.5.1.1 Entwicklung der MRM-Methode

Um für Sitagliptin die Übergänge, die zur Quantifizierung genutzt werden können, zu finden, wurden zuerst  $5 \mu\text{L}$  einer methanolischen Verdünnung der Reinsubstanz mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/mL}$  ohne Trennsäule direktinjiziert. Im Elektrospray Ionisation

(ESI) positiven sowie ESI negativen Modus wurde mit den Standardeinstellungen, Fragmentorspannung (FV) = 135 V, Cell accelerator voltage (CAV) = 7 V und electron multiplier voltage ( $\Delta$ EMV) = 0 V, mit einem Full Scan von 10 bis 1000 m/z nach dem Mutterion für Sitagliptin gescannt.

Anschließend wurde im ESI positive Modus die FV optimiert, indem wieder 5  $\mu$ L der genannten Verdünnung direktinjiziert wurde, allerdings bei variiertem Fragmentorspannung. Die getesteten Werte reichten von 35 V bis 200 V.

Nachdem das Mutterion sowie die optimale FV für Sitagliptin bekannt waren (Allg. Teil, B1.2.4.1), wurden die Produktionen gesucht. Dazu wurde wieder 5  $\mu$ L der oben genannten Verdünnung direktinjiziert und mithilfe eines Product Ion Scans vermessen. Die Einstellungen für diesen waren der ESI positive Modus, FV = 150 V, CAV = 7 V,  $\Delta$ EMV = 0 V von 50 bis 408 m/z. Die Kollisionsenergie (CE) wurde von 10 V in Zehnerschritten bis hin zu 60 V variiert.

Für die zwei intensivsten Übergänge (Allg. Teil, B1.2.4.1), wurde nun eine Multi-Reaction-Monitoring (MRM) Methode im ESI positiven Modus entwickelt. Es wurden für die Übergänge die CE sowie die CAV angepasst. Injiziert wurden 5  $\mu$ L der oben beschriebenen Verdünnung und bei gleichbleibenden Parametern für die MS1- und MS2-Resolution (unit/unit), die Dwell Time (100 ms), die FV (100 V) und die CAV (7 V) wurde die CE variiert. Für den Übergang 408  $\rightarrow$  235 m/z wurden CE von 5 V bis 15 V gewählt, für den Übergang 408  $\rightarrow$  174 m/z von 25 V bis 35 V.

Im Anschluss daran wurde die CAV optimiert. Die Parameter für die MS1/2 Resolution, die Dwell Time und die FV blieben bestehen, allerdings wurde für den Übergang 408  $\rightarrow$  235 m/z eine CE von 13 V und für den Übergang 408  $\rightarrow$  174 m/z eine CE von 27 V angelegt. Die CAV wurde für beide Übergänge von 0 V bis 8 V variiert.

Die MRM-Methode wurde für eine methanolische Verdünnung, die Sitagliptin und Sitagliptin-d4 Phosphat jeweils in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/mL enthielt, angewandt. Die berechneten Übergänge sollten 412  $\rightarrow$  239 m/z sowie 412  $\rightarrow$  178 m/z sein. Da allerdings der Übergang 412  $\rightarrow$  178 m/z nicht zu finden war, wurde von der methanolischen Verdünnung von Sitagliptin-d4 Phosphat (c = 10  $\mu$ g/mL) ein Product Ion Scan (CE = 10 V bis 40 V) aufgenommen. Anschließend wurde die Verdünnung, die beide Substanzen (c = 1  $\mu$ g/mL) enthielt mit dem veränderten Übergang für Sitagliptin-d4 Phosphat vermessen.

## 2.5.2 Entwicklung der HPLC-Methode und der Quellenparameter aus Matrixproben

Um für die entwickelte MRM-Methode die Quellenparameter anzupassen, wurden Matrixproben mit verschiedenen Konzentrationen an Sitagliptin, Kreatinin und Metformin (Tabelle 38) extrahiert (Allg. Teil, B1.2.2.5; Abbildung 20). Der interne Standard wurde in einer Konzentration von 1 µg/mL hinzugegeben.

**Tabelle 38: Konzentrationen, der für die LC-MS/MS Methodenentwicklung gespikten Blutproben.**

c(Sitagliptin) [ng/mL]	c(Kreatinin) [µg/mL]	c(Metformin) [µg/mL]
1000	15	10,0
1	5	0,5

Die Matrixproben wurden unter Einbindung der Trennsäule analysiert. Das Injektionsvolumen lag bei 5 µL, als organisches Fließmittel wurde Acetonitril, als wässriges ein 5 mM Ammoniumformiatpuffer mit 0,065 % Ameisensäure verwendet. Es wurde die Verwendung verschiedener Fließmittelgradienten untersucht (Tabelle 39).

**Tabelle 39: Die im Zuge der Methodenentwicklung der LC-MS/MS Methode getesteten Fließmittelgradienten unter Verwendung einer Phenomenex Luna® HILIC. B% stellt dabei den Anteil an organischem Fließmittel dar.**

Benennung	Zeit in min	Fluss [mL/min]	B%
A		0,3	80
	2	0,3	50
	3	0,3	50
	4	0,3	10
	5	0,3	80
B		0,3	90
	3	0,3	50
	4	0,3	10
	5	0,3	90
C		0,3	70
	2	0,3	50
	3	0,3	10
	4	0,3	70
D		0,3	95
	3	0,3	50
	4	0,3	10
	5	0,3	95
E		0,5	95
	3	0,5	50
	4	0,5	10
	5	0,5	95

### 2.5.2.1 Optimieren der MRM-Methode

Um die bestmögliche Empfindlichkeit zu erreichen, wurden im Zuge der Optimierung der MRM-Methode die Auflösung, die Dwell-Time sowie das  $\Delta EMV$ , also die Signalverstärkung durch den Multiplier optimiert. Dazu wurden Matrixproben, die Sitagliptin ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ), Metformin ( $c = 10 \mu\text{g/mL}$ ) und Kreatinin ( $c = 15 \mu\text{g/mL}$ ) enthielten, extrahiert und vermessen. Unter Beibehaltung der Standardeinstellungen der nicht-variiierenden Parameter (MS1/2-Resolution: unit/unit;  $\Delta EMV = 0 \text{ V}$ ; Dwell time = 100 ms), wurden die Einstellungen je eines Parameters variiert. Für die MS1/2-Resolution wurden alle 9 Kombinationen der Einstellungen unit, wide und widest getestet, für die  $\Delta EMV$  wurden 100 V, 200 V und 500 V untersucht und auch die Dwell Time wurde variiert (150 ms; 200 ms; 350 ms; 20 ms). Zur Auswertung wurde der Übergang  $408 \rightarrow 235 \text{ m/z}$  betrachtet.

### 2.5.2.2 Optimieren der Quellenparameter

Zum Erreichen der bestmöglichen Empfindlichkeit wurden die Quellenparameter optimiert. Dazu wurden Blutproben, die Sitagliptin ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ), Metformin ( $c = 10 \mu\text{g/mL}$ ) und Kreatinin ( $c = 15 \mu\text{g/mL}$ ) enthielten, extrahiert und anschließend vermessen. Das Injektionsvolumen betrug jeweils  $5 \mu\text{L}$ . Ausgehend von den Standardeinstellungen für die Quellenparameter (Tabelle 40) wurden die jeweiligen Einstellungen variiert. Zur Auswertung betrachtet wurde jeweils der Übergang  $408 \rightarrow 235 \text{ m/z}$  des Sitagliptins.

**Tabelle 40: Standardeinstellungen der Quellenparameter.**

	<b>Standardbedingungen</b>
<b>Gas Temperatur [°C]</b>	300
<b>Gas Flow [L/min]</b>	10
<b>Nebulizer [psi]</b>	50
<b>Sheath Gas Heater [°C]</b>	400
<b>Sheath Gas Flow [L/min]</b>	12
<b>Capillary [V]</b>	3500
<b>Nozzle Voltage [V]</b>	0

Der zu optimierende Parameter bzw. der Wert für diesen Parameter wurde jeweils unter Beibehaltung der Standardbedingungen für die übrigen Parameter variiert. Eine Ausnahme davon waren das Sheath Gas und Drying Gas. Hierbei wurden sowohl die Temperatur, als auch der Fluss verändert (Tabelle 41). Die Einstellungen für die Kapillarspannung wurden von 1000 V bis 6000 V, die der Nozzle Voltage von 500 V bis 2000 V und die der Nebulizer von 45 psi bis 60 psi variiert.

**Tabelle 41: Darstellung der variierten Parameter für das Sheath und Drying Gas im Zuge der Optimierung der Quellenparameter zur Steigerung der Empfindlichkeit der LC-MS/MS-Methode.** Es wurde das Sheath und Drying Gas jeweils einzeln variiert unter Beibehaltung der Standardparameter für das jeweilig andere Gas.

Sheath Gas		Drying Gas	
Fluss [L/min]	Temperatur [°C]	Fluss [L/min]	Temperatur [°C]
11	400	10	350
8	400	10	200
12	350	13	300
12	250	5	300
10	350	7	300
8	250	12	350
11	300	7	250
		10	150

Im Anschluss wurden Kombinationen der besten Einzelparameter getestet, um die empfindlichste Methode herauszuarbeiten. In nachfolgender Tabelle sind die Variationen dargestellt (Tabelle 42).

**Tabelle 42: Variationen der besten Einzelparameter zum Optimieren der Quellenparameter, um eine maximal empfindliche Methode zu erreichen.**

Kapillar- spannung [V]	Nozzle Voltage [V]	Nebu- lizer [psi]	Drying Gas Temperatur [°C]	Drying Gas Fluss [L/min]	Sheath Gas Temperatur [°C]	Sheath Gas Fluss [L/min]	Dwell time [ms]	MS1- Reso- lution	MS2- Reso- lution	$\Delta$ EMV
3500	0	50	300	10	400	12	150	Unit	Unit	0
4000	500	35	250	7	350	10	150	Wide	Widest	500
4000	500	35	200	7	350	10	150	Wide	Widest	500
4000	500	40	350	13	350	10	150	Wide	Widest	500
4000	500	35	350	7	350	10	150	Wide	Widest	500
4000	500	40	250	13	350	10	150	Wide	Widest	500

### 2.5.2.3 Optimieren der Fließmittelzusammensetzung

Da die Fließmittel einen erheblichen Einfluss auf die Ionisierbarkeit der Analyten haben, wurde auch untersucht, mit welchem Fließmittel die Analyten am empfindlichsten erfasst werden. Die Proben, die injiziert wurden, waren wieder dieselben, wie sie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden. Der Fließmittelgradient war der in Exp. Teil, C2.5.2, Tabelle 39 D beschriebene. Es wurden Fließmittelkombinationen aus 5 mM Ammoniumformiatpuffer mit unterschiedlichen Anteilen an Ameisensäure (0,065 %; 0,05 %; 0,1 %) und neben Acetonitril, dem 0,1 % bzw. 0,2% Ameisensäure zugesetzt war, wurde auch Methanol mit dem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure getestet.

#### 2.5.2.4 Optimieren des Injektionsvolumens

Aufgrund der Tatsache, dass das Volumen an Injektionslösung nach der Extraktion beschränkt war (Allg. Teil, B1.2.4.2), sollte eine möglichst geringe Menge an Probe durch LC-MS/MS Analytik analysiert werden. Die maximale Menge an Injektionsvolumen für den Tripelquadrupol waren 5  $\mu\text{L}$ . Um zu erfahren, ob dieses Volumen bei Beibehaltung der Empfindlichkeit reduziert werden konnte, wurden Proben mit Analytkonzentrationen von  $c(\text{Sitagliptin}) = 7 \text{ ng/mL}$ ,  $c(\text{Kreatinin}) = 2,5 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $c(\text{Metformin}) = 0,5 \text{ }\mu\text{g/mL}$  extrahiert und vermessen. Die injizierten Volumina waren dabei 5  $\mu\text{L}$  sowie 3  $\mu\text{L}$  und 2,5  $\mu\text{L}$ . Für die Auswertung wurde jeweils der Übergang 408  $\rightarrow$  174  $m/z$  betrachtet.

#### 2.5.2.5 Entscheidung für Quantifier und Qualifier

Zur Benennung von Quantifier bzw. Qualifier (Allg. Teil, B1.2.4.2) wurden  $n = 3$  Blutproben, die Sitagliptin ( $c = 1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ), Metformin ( $c = 10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) und Kreatinin ( $c = 15 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) enthielten, extrahiert, vermessen und die Empfindlichkeit der Übergänge miteinander verglichen.

#### 2.5.2.6 Anpassen der Konzentration des internen Standards

Die Konzentration des internen Standards einer Methode sollte abgestimmt sein auf die zu erwartende Analytkonzentration. Diese betrug im Falle des Sitagliptins pro Spot maximal 15,5 ng ( $c_{\text{max}} = 383,3 \text{ ng/mL}$ ; Einleitung, A4.2.1), sodass versucht wurde, die Konzentration des internen Standards möglichst gering zu wählen. Dazu wurden Blutproben, die Sitagliptin in einer Konzentration von  $c = 1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , 100 ng/mL und 10 ng/mL sowie Metformin und Kreatinin enthielten, gespottet (je  $n = 3$ ) und getrocknet. Anschließend wurde auf eine der Verdünnungsreihen 8  $\mu\text{L}$  der  $V_{1S}$  des internen Standards zugegeben, auf eine weitere  $V_{2S}$  und auf die dritte  $V_{3S}$  (Exp. Teil, C2.1.2.2). Der interne Standard wurde für ca. 10 min getrocknet und anschließend wurden die Proben extrahiert und vermessen.

## 2.6 Vergleich DBS Karten mit Blotting Papier

Um zu sehen, ob das als Träger verwendete Blotting Papier dasselbe Verhalten zeigte wie Dried-Blood-Spot Karten der Firma Perkin Elmer, wurde Blut mit Analyt versetzt (Konzentrationen der Spikelösungen: Exp. Teil, C2.1.2.4, Tabelle 23). Die resultierenden Konzentrationen im Blut sind in nachfolgender Tabelle (Tabelle 43) dargestellt. Die Kalibriergerade wurden zum einen auf Blotting Papier, zum anderen auf DBS Karten gespottet, getrocknet, dann 8  $\mu\text{L}$  der Lösung des internen Standards zugegeben, extrahiert und anschließend vermessen.



**Tabelle 43: Darstellung der im Blut resultierenden Konzentrationen der Analyten für die Kalibriergeraden.**

c(Blut Kreatinin) [µg/mL]	c(Blut Metformin) [µg/mL]	c(Blut Sitagliptin) [ng/mL]
1,5	0,2	1,0
2,0	0,3	4,0
2,5	0,5	7,0
5,0	0,8	12,5
6,5	1,0	25,0
8,0	2,0	50,0
10,0	2,5	100,0
11,5	3,0	200,0
13,0	4,0	400,0
15,0	5,0	500,0

## 2.7 Methodvalidierung

Für die Methodvalidierung wurde eine Charge an Blut verwendet, die durch Mischen des Blutes von 10 Einzelspendern mit derselben Blutgruppe, demselben Kell- und Rhesusfaktor hergestellt wurde.

### 2.7.1 Auswertung der Kreatininkonzentration

Kreatinin ist ein im Blut vorkommendes endogenes Abbauprodukt des Kreatins aus dem Muskel [73, 80]. Aus diesem Grund ist es praktisch unmöglich, „Kreatinin-freies“ Blut für die Herstellung von Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben (QC) zu erhalten. Um aber dennoch für die Kalibriergeraden und die QC-Proben dieselbe Matrix (Vollblut) verwenden zu können, wurden zu jeder Kalibriergerade zero-Blank Proben, das heißt Proben, die mit Methanol gespiked wurden und nach Zugabe von internem Standard extrahiert wurden, vermessen. Für die Herstellung der zero-Blank Proben, der QC-Proben und der Kalibriergerade musste Blut derselben Charge verwendet werden. Der Mittelwert der Quotienten Peakfläche Kreatinin/Peakfläche interner Standard dieser zero-Blank Proben aus je drei Bestimmungen wurde jeweils von den Kalibrierstandards und den QC-Proben abgezogen, um nur das dem Blut zugegebene Kreatinin zu quantifizieren.

### 2.7.2 Unterschiede beim Auftragen des Blutes mit einer Pipette gegenüber einer Kapillare

Delbrück-Kapillaren sind natriumheparinisierte end-to-end Kapillaren, die das Volumen, das sie aufnehmen können, durch die beiden Kapillarenden begrenzen. Solche Kapillaren, mit einem Volumen von 40 µL, wurden zur Entnahme von Patientenproben

verwendet (Exp. Teil, C2.3.1). Da es mit einem erheblichem Mehraufwand verbunden war, die Kalibriergeraden, die zur Quantifizierung benötigt wurden, mit Kapillaren anstatt mit einer Eppendorfpipette zu spotten, wurde getestet, ob ein Unterschied zwischen beiden „Spottinghilfen“ existierte. Gepooltes Blut wurde dazu mit 2,5 % Spikelösung versetzt, sodass für Metformin eine Blutkonzentration des Analyten von  $c = 0,2 \mu\text{g/mL}$  bzw.  $5 \mu\text{g/mL}$ , für Kreatinin  $c = 1,5$  bzw.  $11,5 \mu\text{g/mL}$  und für Sitagliptin  $c = 3$  bzw.  $400 \text{ ng/mL}$  resultierte. Für jede Konzentration wurden die Spots (je  $n = 3$ ) mittels Eppendorfpipette und mittels Delbrück-Kapillare gespottet, sie wurden trocken gelassen,  $8 \mu\text{L}$  an internem Standard aufgetragen (Exp. Teil, C2.1.2.5), anschließend extrahiert und vermessen. Der Quotient Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard der zwei Versuchsreihen wurde zur Auswertung miteinander verglichen.

### **2.7.3 Selektivität**

Zur Bestimmung der Selektivität wurde Blut von sechs Einzelspendern verwendet. Es wurden jeweils Blank Proben (je  $n = 3$  pro Einzelspender) und Qualitätskontrollproben analysiert. Für die Blank Proben wurde Blut mit 2,5 % Methanol versetzt, um dieselben Eigenschaften zu erhalten, wie sie bei den QC-Proben durch das Hinzugeben der Spikelösung vorherrschen. Die QC-Proben (je  $n = 3$  pro Einzelspender) waren zum einen LLOQ Proben, zum anderen hohe Konzentrationen des Kalibrierbereichs (Metformin:  $c = 0,2 \mu\text{g/mL}$  und  $5 \mu\text{g/mL}$ ; Kreatinin:  $c = 1,5 \mu\text{g/mL}$  und  $11,5 \mu\text{g/mL}$ ; Sitagliptin:  $c = 3 \text{ ng/mL}$  und  $400 \text{ ng/mL}$ ). Das Blut wurde hierzu ebenfalls mit 2,5 % der entsprechenden Spikelösungen versetzt und anschließend gespottet und nach Auftragen des internen Standards wie beschrieben (Allg. Teil, B1.2.2.5, Abbildung 20) extrahiert und analysiert.

### **2.7.4 Kalibrierfunktion**

An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden Kalibriergeraden erstellt, die die nachfolgend dargestellten Konzentrationsbereiche (Tabelle 44) abdeckten.

**Tabelle 44: Konzentrationen der Analyten im Blut (B) für die Kalibriergeraden (K) der Methodvalidierung.** Für Metformin und Kreatinin wurden 10, für Sitagliptin 12 Kalibrierpunkte verwendet.

Benennung	c (Kreatinin) [µg/mL]	c (Metformin) [µg/mL]	c (Sitagliptin) [ng/mL]
K1B	1,5	0,2	3,0
K2B	2,0	0,3	4,0
K3B	2,5	0,5	7,0
K4B	5,0	0,8	12,5
K5B	6,5	1,0	25,0
K6B	8,0	2,0	50,0
K7B	10,0	2,5	100,0
K8B	11,5	3,0	200,0
K9B	13,0	4,0	400,0
K10B	15,0	5,0	500,0
K11B			750,0
K12B			1000,0

Mit jeder Kalibriergerade wurden ebenso Blank Proben, d.h. mit Methanol versetzte Proben, die ohne internen Standard extrahiert wurden, sowie zero-Blank Proben (n = 3) des gepoolten Blutes vermessen. Zur Auswertung wurde jeweils der Quotient Peakfläche Analyt/Peakfläche IS gegen die Nominalkonzentration aufgetragen.

### 2.7.5 Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Die niedrigste Konzentration, die noch quantifiziert werden kann, wurde bestimmt, indem QC-Proben mit Konzentrationen von Metformin  $c = 0,2 \mu\text{g/mL}$ , Kreatinin  $c = 1,5 \mu\text{g/mL}$  und Sitagliptin  $c = 3 \text{ ng/mL}$ , die durch Versetzen des Blutes mit Spikelösungen hergestellt wurden, extrahiert und vermessen wurden (n = 5). Die Richtigkeit und Präzision der Proben wurden bestimmt.

### 2.7.6 Richtigkeit (Accuracy)

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode, sowohl der intra- als auch interday Richtigkeit, wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je vier bzw. fünf Konzentrationen an QC-Proben analysiert (jeweils n = 5) (Tabelle 45).

**Tabelle 45: Konzentrationen der Analyten im Blut zur Evaluation der Richtigkeit und Präzision.** Die hohe Qualitätskontroll (High-QC) Sita - Probe enthielt nur Sitagliptin, da aufgrund des weiten Kalibrierbereichs eine weitere QC-Konzentration (5 anstatt 4) verwendet wurde.

	c (Kreatinin) [µg/mL]	c (Metformin) [µg/mL]	c (Sitagliptin) [ng/mL]
LLOQ	1,5	0,2	3,0
Low QC	4,5	0,6	10,0
Medium QC	6,5	2,0	150,0
High QC	11,5	4,0	400,0
High QC Sita			750,0

Für die intraday Richtigkeit wurden alle an einem Tag vermessenen Proben der jeweiligen Konzentration miteinander verglichen, für die interday Richtigkeit die Proben der verschiedenen Tage. Die Richtigkeit wurde dann nach folgender Formel (10) berechnet.

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{c(\text{Analyt})_{\text{gemessen}}}{c(\text{Analyt})_{\text{nominal}}} \cdot 100 \quad (10)$$

### 2.7.7 Präzision

Für die Bestimmung der intra- sowie interday Präzision wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen QC-Proben vermessen (n = 5) (Tabelle 45). Die Präzision wurde, ausgedrückt als relative Standardabweichung (RSD) der Messergebnisse zueinander, bestimmt. Analog zur Richtigkeit wurde diese für Proben, die an einem Tag (intraday) sowie an unterschiedlichen Tagen (interday) vermessen wurden, bestimmt.

### 2.7.8 Wiederfindung und Extraktionseffizienz

Die Wiederfindung (Recovery, RE) der Analyten wurde berechnet, indem die Response (Peakfläche) von gespikten QC-Proben mit bekannter Konzentration (Metformin: 0,2; 0,6; 4 µg/mL; Kreatinin: 1,5; 6,5; 11,5 µg/mL; Sitagliptin: 3; 150; 400; 750 ng/mL) verglichen wurde mit der von post-spiked Proben (n = 5). Post-spiked Proben sind Proben, die durch Extraktion von Blank-Matrix hergestellt werden. Die Matrix ohne Analyten wird hierbei extrahiert und nach Abdampfen unter Stickstoff in Lösungsmittel, das die Analyten in, zu den spiked-Proben korrespondierenden Konzentrationen, wenn der Analyt zu 100 % extrahiert wird, enthält, wiederaufgenommen. Sie beschreibt also welcher Prozentsatz an Analyt aus der Probe extrahiert wird. Die Formel zur Berechnung der Wiederfindung ist im Folgenden dargestellt (11).

$$\text{Recovery (RE \%)} = \left( \frac{\text{Peakfläche Analyt (spiked Probe)}}{\text{Peakfläche Analyt (post-spiked Probe)}} \right) \cdot 100 \quad (11)$$

Im Gegensatz dazu beschreibt die Extraktionseffizienz (EE) die Response von spiked-Proben im Verhältnis zu dem der korrespondierenden Konzentrationen der Analyten in Lösungsmittel (post-spiked Lösungen). Hierzu werden dieselben QC-Proben verglichen mit den post-spiked Lösungen (n = 5). Anschließend wird die Extraktionseffizienz mit Formel (12) berechnet.

$$\text{Extraktionseffizienz (EE \%)} = \left( \frac{\text{Peakfläche Analyt (spiked Probe)}}{\text{Peakfläche Analyt (post-spiked Lösung)}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Für Phenformin und Sitagliptin-d4 Phosphat, als interne Standards wurde RE und EE ebenfalls bestimmt (n = 5).

### 2.7.9 Carry over

Um für die Analyten und den internen Standard das Carry-over, also das Verschleppen von Analyt in die nachfolgende Injektion zu prüfen, wurden spiked QC-Proben im höchsten Konzentrationsbereich der Kalibrierfunktion (Metformin: 5 µg/mL; Kreatinin: 15 µg/mL; Sitagliptin: 1000 ng/mL) extrahiert und vermessen (n = 5). Direkt nach Injektion einer solchen Upper-Limit-of-Quantification-Probe (ULOQ) wurde eine Blank-Matrix-Probe injiziert. Der Analyt, der in der Blank-Matrix-Probe zu messen ist, sollte dabei ≤ 20 % der Peakfläche des LLOQs sein, für den internen Standard ≤ 5 % [53].

### 2.7.10 Robustheit

Zur Lagerung der Blutspots nach dem Trocknen wurden diese in Plastiktüten verpackt, die Silica Gel Trockenmittelbeutel enthielten, um die Spots über die Lagerungsdauer trocken zu halten und somit Bakterienwachstum zu verhindern. Um zu testen, ob die Methode bzw. die Quantifizierung auch durchführbar ist, wenn die Spots nicht vollständig getrocknet verpackt werden, wurden spiked QC-Proben (Metformin: 4 µg/mL; Kreatinin: 11,5 µg/mL; Sitagliptin: 400 ng/mL; je n = 5) direkt nach dem Spotten auf das Trägermaterial in die Plastiktüten verpackt und nach einer Lagerung von 3 Tagen extrahiert und analysiert. Zur Auswertung wurden die Richtigkeit und Präzision bestimmt.

### 2.7.11 Matrixeffekte

Auf ein Vorliegen von Matrixeffekten wurde getestet, indem Blut von sechs Einzelspendern sowie eine Charge an Blut, die durch Mischen des Blutes von 10 Einzelspendern mit derselben Blutgruppe, demselben Kell- und Rhesusfaktor hergestellt wurde (gepooltes Blut), verwendet wurde. Es wurde die Peakfläche von post-spiked Proben (Exp. Teil, C2.7.8) verglichen mit der Peakfläche der Analyten in Lösungsmittel (Sitagliptin: c = 0,8; 106,67 ng/mL; n = 3 bzw. n = 5 für gepooltes Blut). Für den internen

Standard Sitagliptin-d4 wurde dies ebenfalls bestimmt (Sitagliptin-d4 Phosphat:  $c = 5,33 \text{ ng/mL}$ ). Anschließend wurden die jeweiligen Matrixfaktoren (MF) (Formel (13)) sowie der auf den internen Standard angepasste Matrixfaktor (MFIS) (Formel (14)) berechnet. Die relative Standardabweichung des MFIS der sechs Einzelmatrixes soll dabei nicht größer als 15 % sein [54].

$$\text{Matrixfaktor (MF \%)} = \left( \frac{\text{Peakfläche Analyt (post-spiked Probe)}}{\text{Peakfläche Analyt (korrespondierende Konzentration in LM)}} \right) \cdot 100 \quad (13)$$

$$\text{Internal standard normalized matrix factor (MFIS \%)} = \left( \frac{\text{MF(Analyt)}}{\text{MF(Interner Standard)}} \right) \cdot 100 \quad (14)$$

## 2.7.12 Stabilität

### 2.7.12.1 Stammlösungsstabilität

Die Stammlösungen der Analyten für die HPLC-UV Methode wurden in einer bzw. zwei Konzentrationen vermessen (Metformin: 1 mg/mL, 100 µg/mL; Kreatinin: 1 mg/mL; Phenformin: 1 mg/mL, 100 µg/mL; je  $n = 5$ ). Dafür wurde von der jeweiligen Stammlösung 10 µL in die HPLC injiziert.

Die Stammlösungen von Sitagliptin, enthielten die folgenden Konzentrationen: 1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL. Vor der Injektion zum Testen der Stabilität mittels LC-MS/MS Analytik wurde die Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL zu 1 µg/mL verdünnt und 3 µL davon injiziert. Die Stammlösungen der Konzentrationen von 100 µg/mL und 10 µg/mL wurden verdünnt zu einer Konzentration von 0,7 µg/mL. Auch von diesen Verdünnungen wurden jeweils 3 µL injiziert. Die Stammlösung, der Konzentration 1 µg/mL wurde ohne weitere Verdünnung injiziert (3 µL). Zusätzlich wurde auch die Stammlösung des internen Standards Sitagliptin-d4 Phosphat in den Konzentrationen 1 mg/mL und 1 µg/mL getestet. Für diese wurde parallel der Sitagliptin Stammlösung vor der Messung eine Verdünnung hergestellt und jeweils 3 µL injiziert ( $n = 5$ ).

Die Stammlösungen wurden jeweils direkt nach der Herstellung, nach 24 h Lagerung bei Raumtemperatur und nach einem Gefrier-Tau-Zyklus (-25 °C) vermessen. Die Mittelwerte ( $\pm$  SD) des Verhältnisses der Peakfläche der Analyten der Probelösungen zu der Peakfläche der Analyten der frisch hergestellten Lösungen wurde berechnet.

#### 2.7.12.2 Kurzzeitstabilität

Um die Stabilität der Analyten unter verschiedenen Kurzzeitlagerungsbedingungen zu testen, wurden mit Analyt versetzte QC-Proben (Metformin: 0,2; 5 µg/mL; Kreatinin: 1,5; 11,5 µg/mL; Sitagliptin: 3; 400 ng/mL; je n = 3) direkt nach 3 h Trocknungsdauer extrahiert. Als zweite Versuchsreihe wurden die Spots vor der Extraktion 24 h bei Raumtemperatur offen, ohne Verpackung gelagert und als dritte Variante wurden sie nach 3 h Trocknungszeit in verschlossene Plastikbeutel, die Silica Gel Trockenmittelbeutel enthielten, verpackt und für ebenfalls 24 h gelagert. Für die Auswertung wurden die Konzentrationen bestimmt und die Richtigkeit und Präzision berechnet und miteinander verglichen.

#### 2.7.12.3 Autosamplerstabilität

Nach der Extraktion verblieben die Proben bis zur Vermessung im Autosampler. Damit sichergestellt war, dass die Analyten während dieser Zeit stabil bleiben, wurde die Stabilität im Autosampler getestet. Dafür wurden QC-Proben in zwei Konzentrationen (Metformin: 0,2; 5 µg/mL; Kreatinin: 1,5; 11,5 µg/mL; Sitagliptin: 3; 400 ng/mL; je n = 6) hergestellt, gespottet und extrahiert und anschließend eine Versuchsreihe (n = 3) sofort vermessen, die zweite (n = 3) für 24 h im Autosampler (HPLC-UV: 10 °C; LC-MS/MS: Raumtemperatur) belassen und erst nach Ablauf dieser Zeit vermessen. Die Konzentrationen, Richtigkeit und Präzision der Proben wurden berechnet und verglichen.

#### 2.7.12.4 Langzeitstabilität

Nach Abnahme der Patientenproben wurden diese bis zur Vermessung maximal 4 Wochen gelagert. Um zu zeigen, dass die Analyten über diesen Zeitraum in der Probe stabil blieben, wurden QC-Proben in zwei Konzentrationen (Metformin: 0,2; 4 µg/mL; Kreatinin: 1,5; 11,5 µg/mL; Sitagliptin: 3; 400 ng/mL; je n = 5) hergestellt, gespottet und nach drei Stunden Trocknungsdauer mit Silica Gel Trockenmittelbeutel in Plastiktüten verpackt und eine Versuchsreihe bei Raumtemperatur, eine weitere bei 4 °C für vier Wochen gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben extrahiert, vermessen und die Richtigkeit und Präzision mit Hilfe einer frisch hergestellten Kalibriergerade bestimmt. Für Sitagliptin wurde die Stabilität zusätzlich für die Lagerung der Spots bei -80 °C für einen Zeitraum von 3 Monaten getestet. Dazu wurden QC-Proben in drei Konzentrationen (3; 400; 750 ng/mL; je n = 5) hergestellt, gespottet und nach drei Stunden Trocknungsdauer mit Silica Gel Trockenmittelbeutel in Plastiktüten verpackt und bei -80 °C für 3 Monate gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben extrahiert, vermessen und die Richtigkeit und Präzision mit Hilfe einer frisch hergestellten Kalibriergerade bestimmt.

## **3 Klinische Studien**

### **3.1 Basisstudie**

Die klinische Studie mit dem Titel „Erhebung von Populationsdaten zu Kapillarblutkonzentrationen von Kreatinin und renal eliminiertes Antidiabetika“ wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Referenznummer: 287/14).

In Zusammenarbeit mit der Praxis Dr. med. Stephan Zieher und Dr. med. Edwin Albert, Ärzte der Allgemeinmedizin und Diabetologie in Marktheidenfeld wurden in ebendieser Praxis, gemäß dem Antrag mit zugehörigem Amendement 70 Patientenproben gewonnen.

Dazu wurden den Patienten nach deren schriftlichem Einverständnis zusätzlich zur routinemäßigen venösen Blutabnahme 40 µL Kapillarblut abgenommen und dieses auf die vorbereiteten Trockenblutträger gegeben. Patienten, die jünger als 18 Jahre alt waren oder eine infektiöse Erkrankung aufwiesen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

### **3.2 Feldstudie**

Die klinische Studie mit dem Titel „Erhebung von Populationsdaten zu Kapillarblutkonzentrationen der renal eliminierten oralen Antidiabetika Metformin und Sitagliptin und Bestimmung der Nierenfunktion mittels Dried-Blood-Spot Analytik“ wurde durch die Freiburger Ethik Kommission International (feki) genehmigt (feki Code 016/1525) und durch die ISRCTN registry (International Standard Randomized Controlled Trial Number) registriert (ISRCTN14518136).

In Zusammenarbeit mit öffentlichen Apotheken deutschlandweit, vor allem in Bayern, wurden gemäß dem Antrag 84 Patientenproben gewonnen.

Den Patienten wurde nach mündlicher Aufklärung und deren schriftlichem Einverständnis 40 µL Kapillarblut abgenommen und dieses auf die vorbereiteten Trockenblutträger gegeben. Waren die Patienten jünger als 18 Jahre alt oder wiesen sie eine infektiöse Erkrankung auf, wurden sie von der Studie ausgeschlossen.



## **4 Abschätzung der Nierenfunktion mit Hilfe der Kreatininkonzentration aus Dried Blood Spots**

### **4.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte**

#### **4.1.1 Substanzen**

Die verwendeten Substanzen wurden in Exp. Teil, C1.1 aufgeführt.

#### **4.1.2 Spikelösungen für die Kalibriergerade, interner Standard, Extraktionsmittel und Stammlösungen für die Herstellung von Fließmitteln**

Die Spikelösungen der Kalibriergerade, der interne Standard, das Extraktionsmittel und die Stammlösung für die Herstellung von Fließmitteln wurden in Exp. Teil, C1.6 beschrieben.

#### **4.1.3 Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger und Kapillaren**

Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger und die Kapillaren wurden in Exp. Teil, C1.2 und C1.3 beschrieben.

#### **4.1.4 *In-vivo*-Proben**

Gemäß den jeweiligen genehmigten Ethikanträgen wurden in der Praxis Dr. med. Stephan Zieher und Dr. med. Edwin Albert, Ärzte der Allgemeinmedizin und Diabetologie in Marktheidenfeld und in verschiedenen Apotheken Patientenproben gewonnen (Exp. Teil, C3.1 und C3.2).

#### **4.1.5 HPLC-UV-Anlage**

Die verwendete HPLC-UV-Anlage wurde in Exp. Teil, C1.4 beschrieben.

#### **4.1.6 Sonstige Geräte und Materialien**

Neben den in Exp. Teil, C1.7 aufgeführten Geräten und Materialien wurden keine weiteren verwendet.

## 4.2 Bestimmung der *in-vivo*-Proben

### 4.2.1 Extraktion der *in-vivo*-Proben

Die Patientenproben wurden getrocknet, anschließend in Plastikbeutel mit Trockenmittel verpackt und bis zur Extraktion bei Raumtemperatur gelagert. Die Lagerungsdauer betrug maximal vier Wochen, sodass die Stabilität gewährleistet war (Allg. Teil, B1.4.1.9). Vor der Extraktion wurden 8 µL der Lösung des internen Standards aufgetragen und nach einer Trocknungsdauer von ca. 10 min wurde der Spot in ein 1,5 mL Eppendorf Cap gegeben. Vor dem Festklemmen des Spots im unteren Bereich des Plastikgefäßes (Exp. Teil, C2.3.3, Abbildung 69) wurden 200 µL des Extraktionsmittels, einer Mischung aus 90 % Acetonitril mit 10 % Ameisensäure hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde das Filterpapier in eine Einmalpipettenspitze (blau) gegeben, diese in ein 15 mL Sarstedt Tube gelegt (Exp. Teil, C2.3.3, Abbildung 69) und bei Raumtemperatur mit 4400 g für 5 min zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Träger zu schleudern. Nachdem die gesamte Flüssigkeit einer Probe vereinigt worden war, wurde sie unter einem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur evaporiert und der Rückstand in 150 µL Acetonitril durch Schütteln mithilfe eines Vortex (30 Sekunden) wiederaufgenommen. Dieser Extrakt wurde für 10 min bei 4 °C und 18000 g zentrifugiert und 100 µL des Überstandes in die HPLC-UV Anlage injiziert und mit der beschriebenen Methode (Exp. Teil, C2.2.2, Tabelle 32 D) vermessen.

### 4.2.2 Quantifizierung der *in-vivo*-Proben

Zur Quantifizierung der Proben wurden diese gegen eine Kalibriergerade vermessen. Hierfür wurde humanes Vollblut mit Spikelösungen verschiedener Konzentrationen versetzt, sodass das Volumen an Spikelösung 2,5 % des Gesamtvolumens betrug. Anschließend wurden jeweils 40 µL gespottet und für mindestens drei Stunden getrocknet, bevor sie analog den Proben extrahiert und vermessen wurden. Die Konzentrationen der Kalibrierpunkte betragen für Kreatinin von 1,5 µg/mL bis 15,0 µg/mL (Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44). Zudem waren in den Proben auch Metformin und Sitagliptin vorhanden (Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44). Zusätzlich zu den spiked-Proben wurde das zur jeweiligen Kalibriergerade verwendete Blut in einer Probenreihe (n = 3) mit Methanol versetzt, wobei das Volumen 2,5 % entsprach und diese Blank Proben wurden ebenfalls extrahiert und vermessen. Der Mittelwert der hieraus erhaltenen Flächen des Kreatinins (endogenes Kreatinin) wurde von den Flächen der Kalibrierstandards abgezogen, um nur die Fläche des zugegebenen Kreatinin zu erhalten und die Proben somit quantifizieren zu können.

## 5 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Metformin

### 5.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

#### 5.1.1 Substanzen

Neben den in Exp. Teil, C1.1 aufgeführten Chemikalien wurden weiterhin PBS-Puffer (DUBLECCO'S Phosphate Buffered Saline) verwendet, der von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen wurde.

#### 5.1.2 Standardlösungen für die Bestimmung der Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen und die Validierung der Methoden

##### 5.1.2.1 Spikelösungen für die Methodvalidierung

Für die Kurzvalidierung der Methoden zum Vermessen von Metformin aus Vollblut und Blutzellen wurden Spikelösungen verwendet, die Metformin in Konzentrationen von 8 µg/mL bis 400 µg/mL enthielten (8; 12; 20; 32; 40; 80; 120; 160; 200; 400 µg/mL). Diese wurden durch methanolische Verdünnung einer Stammlösung ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt.

Zusätzlich zu den Spikelösungen der Kalibriergeraden wurden aus der Stammlösung Spikelösungen für QC-Proben mit Konzentrationen von 8 µg/mL, 80 µg/mL, 200 µg/mL und 400 µg/mL hergestellt. Weiterhin wurden für die post-Extraktion-spiked Proben Lösungen der Analyten in Acetonitril in verschiedenen Konzentrationen, ausgehend von den Stammlösungen hergestellt (Tabelle 46).

**Tabelle 46: Konzentration der für die Methodvalidierung von Metformin im Vollblut und den Blutzellen verwendeten post-Extraktion-spiked Lösungen (pEs) der Analyten in Acetonitril.**

	c(Metformin) [µg/mL]	c(Phenformin) [µg/mL]
pEs_LLOQ	0,062	3,077
pEs_Medium	0,612	3,077
pEs_High	1,539	3,077

##### 5.1.2.2 Spikelösungen für die Proben für die Bestimmung der Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen

Ausgehend von einer Stammlösung von Metformin ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) in Methanol wurden die Spikelösungen durch Verdünnen mit PBS-Puffer hergestellt, sodass Endkonzentrationen an Metformin von 52 µg/mL, 104 µg/mL und 256 µg/mL resultierten. Diese Lösungen wurden täglich frisch hergestellt.

#### 5.1.2.3 Spikelösungen für die Kalibriergeraden zur Bestimmung der Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen

Ausgehend von einer methanolischen Stammlösung von Metformin ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) wurden die Verdünnungen mit PBS-Puffer hergestellt. Die Endkonzentrationen an Metformin reichten von  $12 \text{ }\mu\text{g/mL}$  bis  $400 \text{ }\mu\text{g/mL}$  ( $12,0$ ;  $17,2$ ;  $52,0$ ;  $104,0$ ;  $200,0$ ;  $256,0$ ;  $400,0 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ).

#### 5.1.2.4 Interner Standard

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung von Phenformin verwendet, die ausgehend von einer Stammlösung ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt wurde. Phenformin war darin in einer Konzentration von  $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$  enthalten.

### 5.1.3 Standardlösungen für die Quantifizierung der *in-vivo*-Proben

Die Spikelösungen der Kalibriergerade, der interne Standard, das Extraktionsmittel und die Stammlösung für die Herstellung von Fließmitteln wurden in Exp. Teil, C1.6 beschrieben.

### 5.1.4 Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger, Kapillaren und HPLC-UV-Anlage

Die Verwendung von humanem Vollblut, Blotting Papier, Mikrokapillaren und der HPLC-UV-Anlage wurden in den Kapiteln Exp. Teil, C1.2, C1.3 und C1.4 näher beschrieben.

### 5.1.5 *In-vivo*-Proben

In der Basisstudie wurde Metformin von 67 Patienteneingenommen, in der Feldstudie, von 72 (Exp. Teil, C3.1 und C3.2; Allg. Teil, B2.1 und B2.2).

### 5.1.6 Sonstige Geräte und Materialien

Neben den in Exp. Teil, C1.7 aufgeführten Geräte und Materialien wurden keine weiteren verwendet.

## 5.2 Bestimmung der Metforminkonzentration aus Dried Blood Spots

### 5.2.1 Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Metformin aus Vollblut und Blutzellen aus getrockneten Spots

Die Methode zur Bestimmung von Metformin aus Vollblut wurde erfolgreich nach den FDA und EMA Richtlinien validiert (Allg. Teil, B1.4.2). Für die Verteilungsversuche jedoch wurde eine Methode verwendet, die, im Vergleich zu der in Allg. Teil, B1 aufgeführten Methode, veränderten Parameter enthielt. Diese waren zum einen die Konzentration des internen Standards Phenformin. Während in der schon validierten Methode 8 µL einer Phenforminlösung mit einer Konzentration von  $c = 25 \mu\text{g/mL}$  zum Spot hinzugegeben wurden (All. Teil, B1.2.2.6), wurden in der zur Bestimmung der Verteilung verwendeten Methode 8 µL einer Lösung mit einer Konzentration von  $c = 50 \mu\text{g/mL}$  hinzugegeben. Zum anderen wurden anstatt 150 µL zum Aufnehmen des trockenen Rückstands nur 130 µL verwendet. Außerdem wurde neben Vollblut als Matrix auch Blutzellen verwendet, sodass es notwendig war, diese Methoden ebenfalls zu validieren. Die untersuchten Parameter waren die Kalibrierfunktion mit dem LLOQ-Wert, die Richtigkeit und Präzision, die Extraktionseffizienz und Wiederfindung, das Carry-over sowie die Kurzzeit- und Autosamplerstabilität.

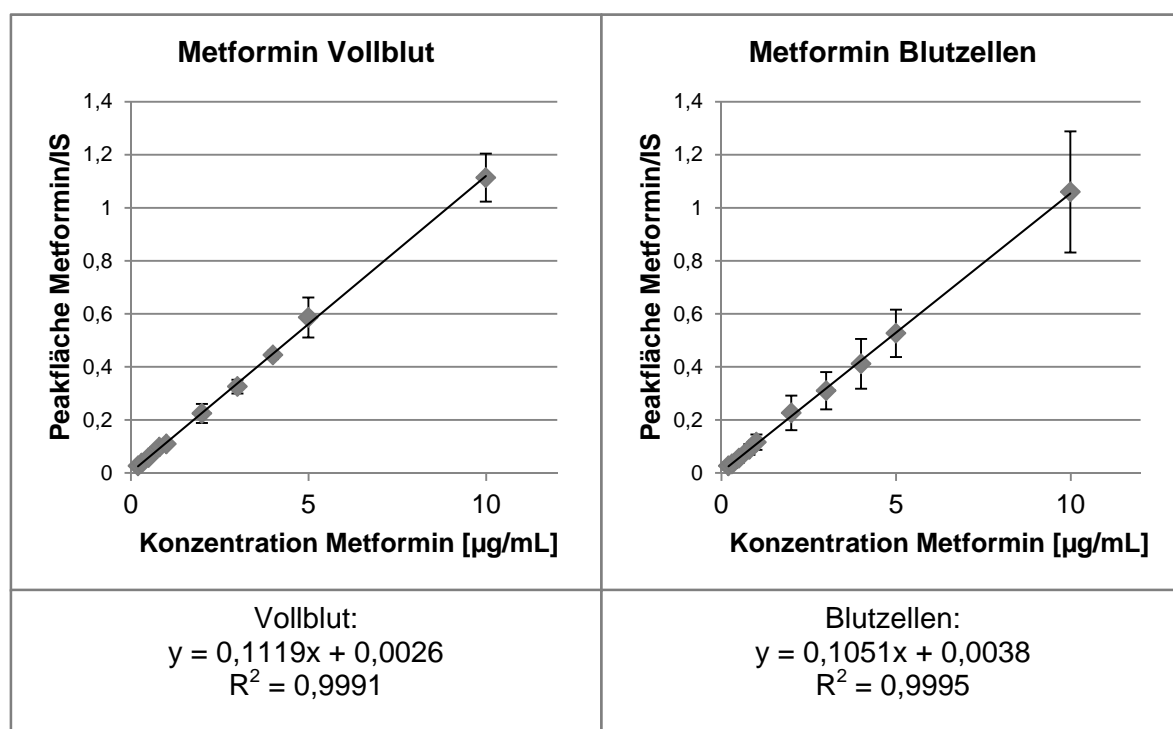
Für die Kurzvalidierung wurde das Blut eines Einzelspenders verwendet

#### 5.2.1.1 Kalibrierfunktion

An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden in der jeweiligen Matrix Kalibriergeraden erstellt, die 10 Konzentrationen (0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0 µg/mL) an Metformin enthielten.

Mit jeder Kalibriergerade wurden ebenso Blank Proben des Blutes sowie zero-Blank Proben ( $n = 3$ ) vermessen. Zur Auswertung wurde jeweils der Quotient Peakfläche Analyt/Peakfläche IS gegen die Nominalkonzentration aufgetragen.

Metformin war sowohl im Vollblut, als auch in den Blutzellen über einen Konzentrationsbereich von 0,2 µg/mL bis 10 µg/mL linear (Abbildung 72). Der Mittelwert ( $\pm$  SD;  $n = 4$ ) der Steigungen der Kalibriergeraden für Metformin im Vollblut lag bei  $0,112 \pm 0,010$ , der in den Blutzellen bei  $0,105 \pm 0,022$ . Der Korrelationskoeffizient ( $\pm$  SD;  $n = 4$ ) betrug für Vollblut  $0,997 \pm 0,002$  und für die Blutzellen  $0,998 \pm 0,001$ .



**Abbildung 72: Kalibriergerade für Metformin in Vollblut und Blutzellen.** Die Punkte sind die berechneten Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus den Einzelbestimmungen ( $n = 4$ ) der Validierung der Methode zur Quantifizierung von Metformin aus Blutzellen und Vollblut.

### 5.2.1.2 Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Die niedrigste, noch zu quantifizierende Konzentration wurde bestimmt, indem QC-Proben mit Konzentrationen von Metformin  $c = 0,2 \mu\text{g/mL}$ , die durch Zugabe der entsprechenden Spikelösung in die jeweiligen Matrix hergestellt wurden, extrahiert und vermessen wurden ( $n = 3$ ). Die Richtigkeit und Präzision der Proben wurde bestimmt.

Die niedrigste Konzentration an Metformin, die die gegebenen Kriterien (Präzision  $\leq 20\%$ ; Richtigkeit  $80 - 120 \%$ ) noch erfüllte (LLOQ), lag sowohl im Vollblut, als auch in den Blutzellen bei  $0,2 \mu\text{g/mL}$ .

### 5.2.1.3 Richtigkeit (Accuracy)

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methoden, sowohl der intra- als auch interday Richtigkeit, wurden für jede Matrix an drei aufeinanderfolgenden Tagen je drei Konzentrationen ( $0,2 \mu\text{g/mL}$ ;  $2,0 \mu\text{g/mL}$  und  $10,0 \mu\text{g/mL}$ ) an QC-Proben analysiert (je  $n = 5$ ). Für die intraday Richtigkeit wurden alle an einem Tag vermessenen Proben der jeweiligen Konzentration der jeweiligen Matrix miteinander verglichen, für die interday Richtigkeit die Proben der verschiedenen Tage.

Für Metformin resultierte im Vollblut eine intraday Richtigkeit von 81,48 – 114,46 % und eine interday Richtigkeit von 94,93 – 110,81 %. In den Blutzellen lagen diese Werte bei 91,50 – 119,42 % bzw. 107,03 – 108,62 % (Tab. Anhang, D4.1.1, D4.1.2).

#### 5.2.1.4 Präzision

Für die Bestimmung der intra- sowie interday Präzision wurden für jede Matrix an drei aufeinanderfolgenden Tagen QC-Proben in jeweils drei Konzentrationen (0,2 µg/mL; 2,0 µg/mL und 10,0 µg/mL) vermessen (n = 5). Die Präzision wurde, ausgedrückt als relative Standardabweichung (RSD) der Messergebnisse zueinander, bestimmt. Analog zur Richtigkeit wurde die Präzision für die Proben, die an einem Tage (intraday) sowie an unterschiedlichen Tagen (interday) vermessen wurden, bestimmt.

Die intraday Präzision für Metformin reichte im Vollblut von 1,65 – 10,41 %, in den Blutzellen von 0,62 – 6,59 %. Die interday Präzision reichte von 1,27 – 5,64 % bzw. von 2,97 – 5,71 % (Tab. Anhang D4.1.1, D4.1.2).

#### 5.2.1.5 Extraktionseffizienz und Wiederfindung

Die Wiederfindung (Recovery RE) von Metformin wurde für Vollblut und Blutzellen als Matrix berechnet, indem die Response (Peakfläche) von gespikten QC-Proben mit bekannter Konzentration (0,2 µg/mL; 2,0 µg/mL und 5,0 µg/mL) verglichen wurde mit der von post-spiked Proben (Exp. Teil, C2.7.8) (n = 5). Für die Bestimmung der Extraktionseffizienz (EE) wurden dieselben QC-Proben verglichen mit den post-spiked Lösungen (n = 5). Für den internen Standard Phenformin wurden RE und EE ebenfalls bestimmt (n = 5).

Die mittlere Wiederfindung für Metformin aus Vollblut lag bei  $8,68 \pm 1,04$  %, die Extraktionseffizienz bei  $9,21 \pm 0,97$  %. Für Metformin aus den Blutzellen lagen diese Werte bei  $10,02 \pm 1,43$  % bzw.  $10,08 \pm 1,48$  %. Für den internen Standard Phenformin betrug die Wiederfindung aus Vollblut  $6,10 \pm 0,30$  %, die Extraktionseffizienz  $6,27 \pm 0,25$  %. Aus den Blutzellen lagen diese Werte für Phenformin bei  $8,88 \pm 0,35$  % bzw.  $8,84 \pm 0,98$  % (Tab. Anhang, D4.1.3, D4.1.4). Die Werte erfüllten, obwohl sie sehr niedrig waren, aufgrund ihrer Präzision und Reproduzierbarkeit alle vorgegebenen Kriterien (Einleitung, A2.5.5).

#### 5.2.1.6 Carry-over

Um für Metformin und den internen Standard Phenformin das Verschleppen von Analyt in die nachfolgende Injektion zu prüfen, wurden spiked QC-Proben im höchsten Konzentrationsbereich der Kalibrierfunktion (c = 10 µg/mL) extrahiert und vermessen

(n = 5). Direkt nach der Injektion einer solchen Upper-Limit-of-Quantification-Probe (ULOQ) wurde eine Blank-Matrix-Probe injiziert und die Menge an verschlepptem Analyt bestimmt.

Weder im Vollblut als Matrix, noch in den Blutzellen war ein Carry-over des Metformins oder des internen Standards Phenformin zu beobachten.

#### 5.2.1.7 Stabilität

##### *Kurzzeitstabilität*

Um die Kurzzeitstabilität des Metformins in der jeweiligen Matrix zu testen, wurden spiked QC-Proben (0,2 µg/mL; 2,0 µg/mL und 10,0 µg/mL; je n = 3) direkt nach 3 h Trocknungsdauer extrahiert. Als zweite Versuchsreihe wurden die Spots vor der Extraktion 24 h bei Raumtemperatur offen, ohne Verpackung gelagert. Für die Auswertung wurde die Konzentration gegenüber frisch hergestellten Kalibriergeraden bestimmt und die Richtigkeit und Präzision berechnet und miteinander verglichen.

Weder im Vollblut, noch in den Blutzellen war eine Instabilität des Metformins zu sehen. Die Richtigkeit bewegte sich für beide Matrices in einem Rahmen von 87,49 – 119,42 % (LLOQ), die Präzision von 2,35 – 11,36 % (Tab. Anhang, D4.1.5, D4.1.6).

##### *Autosamplerstabilität*

Nach der Extraktion standen die Proben bis zur Vermessung im Autosampler. Damit gewährleistet war, dass die Analyten während dieser Zeit stabil bleiben, wurde die Stabilität im Autosampler über 24 h getestet. Dafür wurden für jede Matrix QC-Proben in drei Konzentrationen (Vollblut: 0,2 µg/mL, 2,0 µg/mL und 5,0 µg/mL; Blutzellen: 0,2 µg/mL; 2,0 µg/mL und 10,0 µg/mL) hergestellt, gespottet und extrahiert und anschließend eine Versuchsreihe (n = 3) sofort vermessen, die zweite (n = 3) für 24 h im Autosampler (10 °C) belassen und erst nach Ablauf dieser Zeit vermessen. Die Konzentration, Richtigkeit und Präzision der Proben wurden berechnet und verglichen.

Die extrahierte Lösung des Metformins sowohl aus Vollblut, als auch aus den Blutzellen war im Autosampler bei 10 °C für 24 h stabil, was durch eine Richtigkeit von 85,23 – 114,99 % und eine Präzision von 1,66 – 10,85 % bewiesen wurde (Tab. Anhang, D4.1.5, D4.1.6).



## 5.2.2 Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen

### 5.2.2.1 Festlegen der zu bestimmenden Konzentrationen

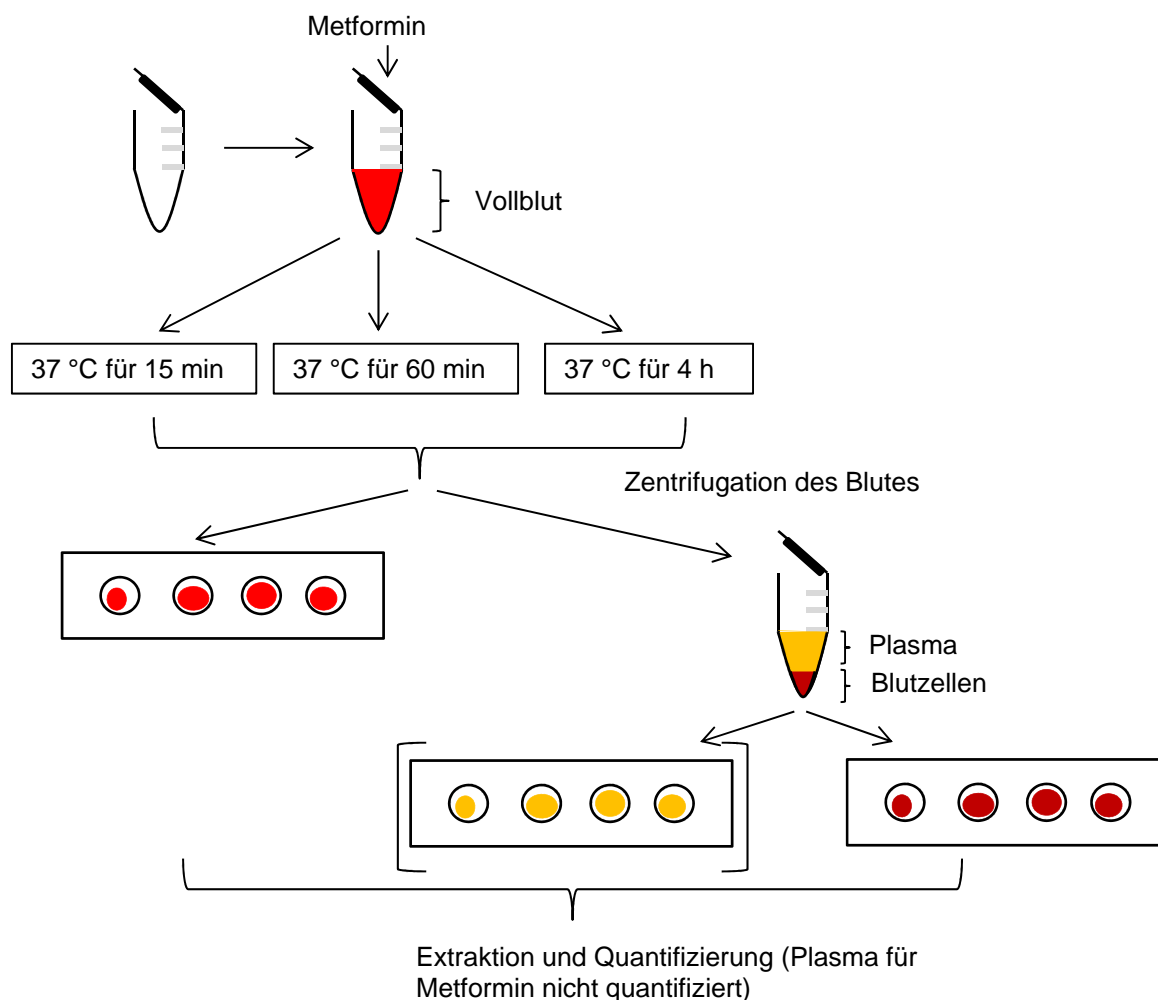
Um nachzuweisen, dass die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und den Blutzellen über einen Konzentrationsbereich konstant ist, wurde der Verteilungskoeffizient  $c_P/c_{BZ}$  (Konzentration im Plasma/Konzentration in den Blutzellen) für verschiedene Konzentrationen (1,3 µg/mL, 2,6 µg/mL, 6,4 µg/mL) aufgestellt. Die Konzentrationen wurden aufgrund der schon publizierten Werte für die Verteilung und Daten zu therapeutischen Bereichen bzw. Maximalkonzentrationen für Metformin gewählt [99, 109].

### 5.2.2.2 Inkubation des Blutes mit Metformin

Für die Inkubationsversuche wurde das Blut zweier Spender mit denselben Rhesus- und Kell-Faktoren sowie derselben Blutgruppe vereinigt. Das Blut wurde im Thermomixer für 10 min auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde es mit der jeweiligen Spikelösung versetzt, sodass das Volumen an Spikelösung 2,5 % des Gesamtvolumens betrug und Metformin in Blut mit Konzentrationen von 1,3 µg/mL, 2,6 µg/mL und 6,4 µg/mL vorhanden war. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben inkubiert. Die Inkubation wurde im Thermomixer bei 37 °C mit 450 rpm durchgeführt, um eine homogene Verteilung zu erhalten. Als Inkubationsdauer wurden 15 min, 60 min und 4 h gewählt (n = 3 für jede Konzentration).

### 5.2.2.3 Auftrennen und Spotten von Vollblut, Plasma und Blutzellen

Nach der Inkubation wurde sofort mit einer Pipette 40 µl Vollblut aus allen Ansätzen auf einen Träger aufgetragen. Anschließend wurde das verbleibende Blut für 15 min mit 3000 g bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, um die Blutzellen und das Plasma voneinander zu trennen. Es wurden dann, analog zu den Vollblutproben, Blutzellproben gespottet (Abbildung 73). Alle diese Proben wurden über Nacht getrocknet und anschließend quantifiziert.



**Abbildung 73: Schematische Darstellung der Ermittlung des Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$  für Metformin.** Vollblut wurde dabei mit Metformin versetzt, für 15 min bzw. 60 min und 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde Vollblut und Blutzellen gespottet, extrahiert und quantifiziert.

#### 5.2.2.4 Extrahieren und Quantifizieren der Proben

Die Extraktion und Quantifizierung erfolgte analog der in Exp. Teil, C4.2.1 und C4.2.2 beschriebenen Methode, allerdings wurde der Rückstand nach dem Evaporieren in 130  $\mu\text{L}$  Acetonitril wiederaufgenommen. 100  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden mittels HPLC-UV gegen eine Kalibriergeraden aus der jeweiligen Matrix quantifiziert. Diese enthielten Metformin im Vollblut in Konzentrationen von 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bis 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und in den Blutzellen von 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bis 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Konzentrationen von Metformin in der Kalibriergeraden in Vollblut und Blutzellen zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten  $c_P/c_{BZ}$ .** Für die Kalibriergerade aus Vollblut wurden 5, für die aus den Blutzellen nur 4 Kalibrierstandards verwendet.

c(Metformin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	
Vollbut	Blutzellen
0,3	0,30
1,3	0,43
2,6	1,30
6,4	5,00
10,0	

Zur Auswertung wurde die Konzentration des Metformins in den Blutzellen von der im Vollblut subtrahiert, um die Plasmakonzentration zu erhalten.

### 5.2.3 Bestimmung von *in-vivo*-Blutproben

Die Extraktion und Quantifizierung der *in-vivo*-Proben erfolgte analog zu Exp. Teil, C4.2.1 und C4.2.2. Die Konzentrationen der Kalibrierpunkte betragen für Metformin 0,2  $\mu\text{g/mL}$ , 0,3  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 3,0  $\mu\text{g/mL}$ , 4,0  $\mu\text{g/mL}$  und 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . Zudem waren in den Proben auch Kreatinin und Sitagliptin vorhanden (Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44).

## 6 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Sitagliptin

### 6.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

#### 6.1.1 Substanzen

Neben den in Exp. Teil, C1.1 aufgeführten Chemikalien wurde weiterhin PBS-Puffer (DUBLECCO'S Phosphate Buffered Saline) verwendet, der von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen wurde.

#### 6.1.2 Standardlösungen für die Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen und die Validierung der Methoden

##### 6.1.2.1 Spikelösungen für die Methodvalidierung

Für die Kurzvalidierung der Methoden zum Vermessen von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen wurden Spikelösungen verwendet, die Sitagliptin in verschiedenen Konzentrationen enthielten. Diese wurden durch methanolische Verdünnung einer

Stammlösung ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt. Sie enthielten Sitagliptin in Konzentrationen von  $0,12 \text{ }\mu\text{g/mL}$  bis  $20,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$  ( $0,12; 0,16; 0,28; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 16,00; 20,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ).

Zusätzlich zu den Spikelösungen der Kalibriergeraden wurden aus der methanolischen Stammlösung Spikelösungen für QC-Proben mit Konzentrationen von  $0,12 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $2,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $6,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $20,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$  hergestellt. Weiterhin wurden für die post-Extraktion-spiked Proben Lösungen der Analyten in Acetonitril, ausgehend von den methanolischen Stammlösungen, in verschiedenen Konzentrationen hergestellt (Tabelle 48).

**Tabelle 48: Konzentration der für die Methodvalidierung von Sitagliptin im Plasma und den Blutzellen verwendeten post-Extraktion-spiked Lösungen (pEs) der Analyten in Acetonitril.**

	c(Sitagliptin) [ng/mL]	c(Sitagliptin-d4 Phosphat) [ng/mL]
pEs_LLOQ	0,8	5,3
pEs_Medium	40,0	5,3
pEs_High	133,3	5,3

#### 6.1.2.2 Spikelösungen für die Proben für die Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen

Ausgehend von einer Stammlösung von Sitagliptin mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg/mL}$  in Methanol wurden Verdünnungen hergestellt, die Sitagliptin in Konzentrationen von  $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$  enthielten. Diese Lösungen wiederum wurden mit PBS-Puffer zu Konzentrationen von  $0,4 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $10,0 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $16,0 \text{ }\mu\text{g/mL}$  verdünnt. Die Verdünnungen in PBS-Puffer wurden täglich frisch hergestellt.

#### 6.1.2.3 Spikelösungen für die Kalibriergeraden zur Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen

Ausgehend von einer Stammlösung von Sitagliptin ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) wurden die methanolischen Verdünnungen hergestellt, die Sitagliptin in Konzentrationen von  $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$  enthielten. Um die Spikelösungen zu erhalten, wurden diese Verdünnungen mit PBS-Puffer auf die jeweilige Konzentration weiterverdünnt. Die Endkonzentrationen an Sitagliptin reichten von  $0,16 \text{ }\mu\text{g/mL}$  bis  $20,00 \text{ }\mu\text{g/mL}$  (Exp. Teil, C6.1.2.1).

#### 6.1.2.4 Interner Standard

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung von Sitagliptin-d4 Phosphat in einer Konzentration von  $100 \text{ ng/mL}$  verwendet, die ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg/mL}$  hergestellt wurde.

### **6.1.3 Standardlösungen für die Quantifizierung der *in-vivo*-Proben**

Die Spikelösungen der Kalibriergerade, der interne Standard, das Extraktionsmittel und die Stammlösung für die Herstellung von Fließmitteln wurden in Exp. Teil, C1.6 beschrieben.

### **6.1.4 Standardlösungen für die Bestimmung der Hämatokritabhängigkeit der Sitagliptinkonzentration im Blut**

#### 6.1.4.1 Spikelösungen für die Kalibriergeraden

Für die Kalibriergeraden wurden Spikelösungen verwendet, die ausgehend von einer Stammlösung von Sitagliptin in Methanol mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt wurden und die Sitagliptin in Konzentrationen von 0,12 µg/mL bis 30,00 µg/mL enthielten (0,12; 0,16; 0,28; 0,50; 1,00; 4,00; 8,00; 16,00; 20,00; 30,00 µg/mL).

#### 6.1.4.2 Spikelösungen für die Proben der Inkubationsversuche

Ausgehend von methanolischen Verdünnungen einer Stammlösung (1 mg/mL) von Sitagliptin mit Konzentrationen von 100 µg/mL, 10 µg/mL und 1 µg/mL wurden die Spikelösungen durch Verdünnen mit PBS-Puffer zu Konzentrationen von 0,4 µg/mL, 10,0 µg/mL und 16,0 µg/mL hergestellt.

#### 6.1.4.3 Spikelösungen für die Proben der Untersuchung der individuellen Unterschiede der Sitagliptinkonzentration im Blut

Ausgehend von einer methanolischen Verdünnung einer Stammlösung (1 mg/mL) von Sitagliptin mit einer Konzentration von 100 µg/mL wurde die Spikelösung durch Verdünnen mit PBS-Puffer zu einer Konzentration von 10 µg/mL hergestellt.

#### 6.1.4.4 Spikelösungen für die Proben der Dialyseversuche

Ausgehend von einer methanolischen Stammlösung von Sitagliptin mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurde die Spikelösung durch Verdünnen zu einer Konzentration von 20 µg/mL hergestellt.

### **6.1.5 Humanes Vollblut, Dried-Blood-Spot Träger, Kapillaren und LC-MS/MS-Anlage**

Die Verwendung von humanem Vollblut, Blotting Papier, Mikrokapillaren und der LC-MS/MS-Anlage wurden in den Kapiteln Exp. Teil, C1.2, C1.3 und C1.5 näher beschrieben.

### **6.1.6 *In-vivo*-Proben**

Von den Patienten der Basisstudie nahmen 37 Sitagliptin ein, in der Feldstudie waren es 32 Patienten, die Sitagliptin eingenommen hatten (Exp. Teil, C3.1 und C3.2; Allg. Teil, B2.1 und B2.2).

### **6.1.7 Sonstige Geräte und Materialien**

Neben den in Exp. Teil, C1.7 aufgeführten Geräten und Materialien wurden weitere Geräte und Materialien verwendet:

---

Inkubator	Heracell (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Rotierender Plattformschüttler	Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
Dialyseeinheiten	Xpress Mini Dialyzer MD1000; 3,5 kDa (Scienova GmbH, Jena, Deutschland)

---

## **6.2 Bestimmung der Sitagliptinkonzentration aus Dried-Blood-Spots**

### **6.2.1 Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen aus getrockneten Spots**

Die Methode aus Vollblut wurde erfolgreich nach den FDA und EMA Richtlinien validiert (Allg. Teil, B1.4.2). Da aber für die Verteilungsversuche auch Messungen aus Plasma bzw. Blutzellen notwendig waren, wurde auch für diese Matrices eine Kurzvalidierung der Methoden angeschlossen. Die validierten Parameter waren die Kalibrierfunktion mit dem LLOQ-Wert, die Richtigkeit und Präzision, die Extraktionseffizienz und Wiederfindung, das Carry-over sowie die Kurzzeit- und Autosamplerstabilität.

Für die Kurzvalidierung wurde das Blut eines Einzelspenders verwendet.

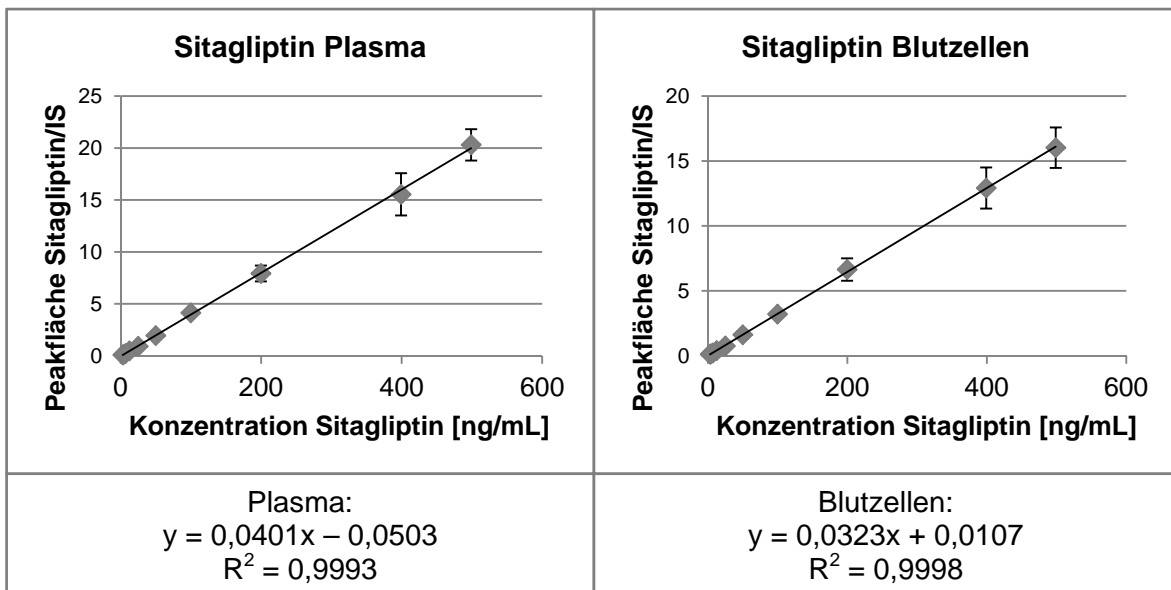
#### **6.2.1.1 Kalibrierfunktion**

An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden in der jeweiligen Matrix Kalibriergeraden erstellt, die 10 Konzentrationen (3; 4; 7; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 500 ng/mL) an Sitagliptin enthielten.

Mit jeder Kalibriergerade wurden ebenso Blank Proben des Blutes sowie zero-Blank Proben ( $n = 3$ ) vermessen. Zur Auswertung wurde jeweils der Quotient Peakfläche Analyt/Peakfläche IS gegen die Nominalkonzentration aufgetragen.

Die Kalibriergerade des Sitagliptins war sowohl im Plasma, als auch in den Blutzellen über einen Konzentrationsbereich von 3 ng/mL bis 500 ng/mL linear (Abbildung 74).

Der Mittelwert ( $\pm$  SD;  $n = 4$ ) der Steigungen für Sitagliptin im Plasma lag bei  $0,040 \pm 0,004$ , der in den Blutzellen bei  $0,032 \pm 0,004$ . Der Korrelationskoeffizient ( $\pm$  SD;  $n = 4$ ) betrug für das Plasma  $0,997 \pm 0,003$  und für die Blutzellen  $0,998 \pm 0,001$ .



**Abbildung 74: Kalibriergerade für Sitagliptin im Plasma und in den Blutzellen.** Die Punkte sind die berechneten Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus den Einzelbestimmungen ( $n = 4$ ) der Validierung der Methode zur Quantifizierung von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen.

#### 6.2.1.2 Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Die niedrigste, noch zu quantifizierende Konzentration wurde bestimmt, indem QC-Proben mit Konzentrationen von Sitagliptin  $c = 3$  ng/mL, die durch Versetzen der jeweiligen Matrix mit der entsprechenden Spikelösung hergestellt wurden, extrahiert und vermessen wurden ( $n = 3$ ). Die Richtigkeit und Präzision der Proben wurde bestimmt.

Die niedrigste Konzentration an Sitagliptin, welche die gegebenen Kriterien (Präzision  $\leq 20\%$ ; Richtigkeit 80 – 120 %) noch erfüllte (LLOQ), lag sowohl im Plasma, als auch in den Blutzellen bei 3 ng/mL.

#### 6.2.1.3 Richtigkeit (Accuracy)

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methoden, sowohl der intra- als auch interday Richtigkeit, wurden für jede Matrix an drei aufeinanderfolgenden Tagen je drei Konzentrationen (3 ng/mL, 50 ng/mL und 500 ng/mL) an QC-Proben analysiert (jeweils  $n = 5$ ). Für die intraday Richtigkeit wurden alle an einem Tag vermessenen Proben der jeweiligen Konzentration der jeweiligen Matrix miteinander verglichen, für die interday Richtigkeit die Proben der verschiedenen Tage.

Für Sitagliptin resultierte im Plasma eine intraday Richtigkeit von 93,43 – 118,44 % und eine interday Richtigkeit von 104,24 – 108,40 %. In den Blutzellen lagen diese Werte bei 88,12 – 114,53 % bzw. 95,37 – 105,15 % (Tab. Anhang, D5.1.1, D5.1.2).

#### 6.2.1.4 Präzision

Für die Bestimmung der intra- sowie interday Präzision wurden für jede Matrix an drei aufeinanderfolgenden Tagen QC-Proben in jeweils drei Konzentrationen (3 ng/mL, 50 ng/mL und 500 ng/mL) vermessen ( $n = 5$ ). Die Präzision wurde, ausgedrückt als relative Standardabweichung (RSD) der Messergebnisse zueinander, bestimmt. Analog zur Richtigkeit wurde die Präzision für Proben, die an einem Tag (intraday) sowie an unterschiedlichen Tagen (interday) vermessen wurden, bestimmt.

Die intraday Präzision für Sitagliptin reichte im Plasma von 1,93 – 7,50 %, in den Blutzellen von 2,62 – 8,59 %, die interday Präzision reichte von 2,56 – 5,17 % bzw. von 4,01 – 6,04 % (Tab. Anhang, D5.1.1, D5.1.2).

#### 6.2.1.5 Extraktionseffizienz und Wiederfindung

Die Wiederfindung (Recovery, RE) von Sitagliptin wurde für Plasma und Blutzellen als Matrix berechnet, indem die Response (Peakfläche) von gespikten QC-Proben mit bekannter Konzentration (3 ng/mL; 150 ng/mL und 500 ng/mL) verglichen wurde mit der von post-spiked Proben ( $n = 5$ ). Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz (EE) wurden dieselben QC-Proben verglichen mit den post-spiked Lösungen ( $n = 5$ ). Für den internen Standard Sitagliptin-d4 Phosphat wurde RE und EE ebenfalls bestimmt ( $n = 5$ ).

Die mittlere Wiederfindung für Sitagliptin aus Plasma lag bei  $10,17 \pm 0,82$  %, die Extraktionseffizienz, welche den Einfluss der Matrix mit umfasst, bei  $11,47 \pm 0,89$  %. Für Sitagliptin aus den Blutzellen lagen diese Werte bei  $3,44 \pm 0,60$  % bzw.  $4,54 \pm 0,80$  %. Für den internen Standard Sitagliptin-d4 betrug die Wiederfindung aus Plasma  $10,83 \pm 0,48$  %, die Extraktionseffizienz dagegen  $11,71 \pm 0,33$  %. Aus den Blutzellen lagen diese Werte bei  $4,18 \pm 0,10$  % bzw.  $6,68 \pm 0,23$  %. Diese Werte sind zwar sehr



niedrig, erfüllen aber aufgrund ihrer Präzision und Reproduzierbarkeit alle vorgegebenen Kriterien (Einleitung, A2.5.5) (Tab. Anhang, D5.1.3, D5.1.4).

#### 6.2.1.6 Carry-over

Um für Sitagliptin und den internen Standard das Verschleppen von Analyt in die nachfolgende Injektion zu prüfen, wurden spiked QC-Proben im höchsten Konzentrationsbereich der Kalibrierfunktion (500 ng/mL) extrahiert und vermessen (n = 5). Direkt nach Injektion einer solchen Upper-Limit-of-Quantification-Probe (ULOQ) wurde eine Blank-Matrix-Probe injiziert und die Menge an verschlepptem Analyt bestimmt.

Weder in Plasma noch in den Blutzellen war ein Carry-over des Arzneistoffes oder des internen Standards zu beobachten

#### 6.2.1.7 Stabilität

##### *Kurzzeitstabilität*

Um die Kurzzeitstabilität des Analyten in der jeweiligen Matrix zu testen, wurden spiked QC-Proben (3 ng/mL, 50 ng/mL und 500 ng/mL; je n = 3) direkt nach 3 h Trocknungsdauer extrahiert. Als zweite Versuchsreihe wurden die Spots vor der Extraktion 24 h bei Raumtemperatur offen, ohne Verpackung gelagert. Für die Auswertung wurden die Konzentrationen bestimmt und die Richtigkeit und Präzision berechnet und miteinander verglichen.

Weder für Plasma, noch für die Blutzellen als Matrix war eine Instabilität des Arzneistoffes zu sehen. Die Richtigkeit bewegte sich im Plasma in einem Rahmen von 89,52 - 118,44 % (LLOQ), die Präzision von 1,93 - 9,94 %. In den Blutzellen lagen die entsprechenden Werte bei 85,94 – 114,53 % bzw. 2,08 – 9,57 % (Tab. Anhang, D5.1.5, D5.1.6).

##### *Autosamplerstabilität*

Für jede Matrix wurden QC-Proben in drei Konzentrationen (3 ng/mL, 50 ng/mL und 500 ng/mL; je n = 6) hergestellt, gespottet, extrahiert und anschließend eine Versuchsreihe (n = 3) sofort vermessen, die zweite (n = 3) für 24 h im Autosampler (Raumtemperatur) belassen und erst nach Ablauf dieser Zeit vermessen. Die Konzentrationen, Richtigkeit und Präzision der Proben wurden berechnet und verglichen.

Die extrahierte Lösung des Sitagliptins sowohl aus Plasma, als auch aus den Blutzellen war im Autosampler für 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil, was durch eine Richtigkeit

von 90,07 – 113,25 % und eine Präzision von 1,56 – 8,41 % bewiesen wurde (Tab. Anhang, D5.1.5, D5.1.6).

## **6.2.2 Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen**

### 6.2.2.1 Festlegen der zu bestimmenden Konzentrationen

Wie auch für Metformin sollte für Sitagliptin die Verteilung des Arzneistoffes zwischen Plasma und den Blutzellen gefunden werden. Die dafür verwendeten Konzentrationen im Vollblut lagen bei 10 ng/mL, 250 ng/mL und 400 ng/mL. Sie wurden anhand der veröffentlichten Maximalspiegel im Plasma ausgewählt [117, 123].

### 6.2.2.2 Inkubation des Blutes mit Sitagliptin

Die Inkubation wurde analog wie in Exp. Teil, C5.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde Blut von zehn Spendern vereinigt und die Inkubationsdauer beschränkte sich auf 15 min und 60 min. Für jede Konzentration (10 ng/mL, 250 ng/mL und 400 ng/mL) und jede Inkubationsdauer wurden jeweils 3 Ansätze inkubiert.

### 6.2.2.3 Auftrennen und Spotten von Vollblut, Plasma und Blutzellen

Die Auftrennung und das Auftragen der Untersuchungsmatrizes auf einen Träger wurde analog Exp. Teil, C5.2.2.3 durchgeführt. Allerdings wurde auch Plasma aufgetragen und analysiert (Exp. Teil, C5.2.2.3, Abbildung 73).

### 6.2.2.4 Extrahieren und Quantifizieren der Proben

Die Extraktion und Quantifizierung erfolgte analog der in Exp. Teil, C4.2.1 und C4.2.2 beschriebenen Methode, allerdings wurden 3 µL der Lösung nach Rekonstitution mit Acetonitril mittels LC-MS/MS Anlage gegen Kalibriergeraden aus den jeweiligen Matrizes (Vollblut, Plasma, Blutzellen) quantifiziert. Diese enthielten Sitagliptin in Konzentrationen von 4 ng/mL bis 500 ng/mL (4,0; 7,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 500,0 ng/mL).

## **6.2.3 Bestimmung von *in-vivo*-Blutproben**

### 6.2.3.1 Extraktion und Quantifizierung der *in-vivo*-Proben

Die Extraktion und Quantifizierung der *in-vivo*-Proben erfolgte analog zu Exp. Teil, C4.2.1 und C4.2.2, allerdings wurden 3 µl der in Acetonitril rekonstituierten Lösung mittels LC-MS/MS Analytik analysiert. Die Konzentrationen der Kalibrierpunkte betragen für Sitagliptin 3,0 ng/mL, 4,0 ng/mL, 7,0 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25,0 ng/mL, 50,0 ng/mL, 100,0 ng/mL, 200,0 ng/mL, 400,0 ng/mL, 500,0 ng/mL, 750,0 ng/mL und 1000,0 ng/mL.

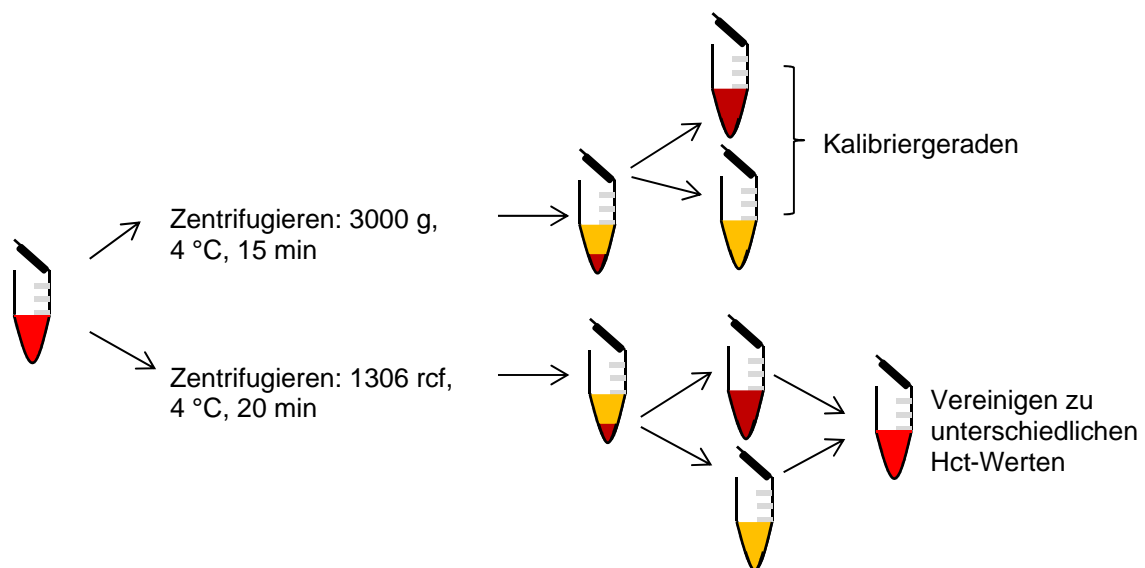
Zudem waren in den Proben auch Metformin und Kreatinin vorhanden (Exp. Teil, C2.7.4, Tabelle 44).

## 6.2.4 Hämatokritabhängigkeit und inter-individuelle Unterschiede der Sitagliptinkonzentration im Blut

### 6.2.4.1 Inkubationsversuche mit Blut mit unterschiedlichem Hämatokrit

#### *Einstellen verschiedener Hämatokritwerte*

Für die Inkubationsversuche wurden 100 mL Vollblut eines Spenders, der kein Sitagliptin oder Metformin eingenommen hatte mit 1306 rcf und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde von den Blutzellen abpipettiert und anschließend wurden Blutzellen und Plasma vereinigt, sodass je 10 mL Blut mit verschiedenen Hämatokritwerten erhalten wurde. Diese waren 30 %, 40 %, 50 %, 60 % und 70 %. Zum Erstellen der Kalibriergeraden waren ebenfalls Vollblut, Plasma und Blutzellen notwendig, sodass 30 mL Vollblut desselben Spenders mit 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert wurden und somit in Plasma und Blutzellen aufgetrennt und anschließend separiert wurden (Abbildung 75).



**Abbildung 75: Schematische Darstellung des Umgangs mit Vollblut zum Einstellen des Hämatokrits (Hct).** Vollblut wurde zentrifugiert, um Plasma und Blutzellen voneinander zu trennen. Anschließend wurden die Spezimen volumetrisch wieder vereinigt, um den gewünschten Hämatokrit zu erhalten.

Das Plasma und die Blutzellen wurden, wie auch das auf verschiedene Hct-Werte eingestellte Vollblut, bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Ebenso wurde auch Vollblut desselben Spenders gelagert, das zuvor nicht zentrifugiert wurde. Die maximale Lagerzeit betrug 4 Wochen.

#### *Erstellen der Kalibriergeraden*

Zum Erstellen der Kalibriergeraden wurde die jeweilige Matrix (Vollblut, Plasma oder Blutzellen) mit 2,5 % frisch hergestellter Spikelösung versetzt, gespottet, getrocknet und extrahiert. Die Konzentrationen von Sitagliptin in der Matrix lagen dabei zwischen 3 ng/mL und 500 ng/mL (3,0; 7,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 500,0 ng/mL).

#### *Inkubation des Blutes mit Sitagliptin*

Das Vollblut des jeweiligen Hämatokrits wurde auf 37 °C vortemperiert und anschließend wurde 2,5 % frisch hergestellte Spikelösung zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Proben für 60 min bei 37 °C und 450 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden Vollblutproben gespottet, danach das restliche Vollblut für 15 min bei 4 °C mit 3000 g zentrifugiert und Plasma und Blutzellen gespottet. Die Proben wurden bis zur Extraktion über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Für jeden Hämatokrit wurden drei Konzentrationen (Vollblutkonzentrationen: 10 ng/mL, 250 ng/mL und 400 ng/mL; n = 3) getestet.

#### *Extraktion und Quantifizierung der Proben*

Vor der Extraktion wurden 8 µL der Lösung des internen Standards aufgetragen und nach einer Trocknungsdauer von ca. 10 min wurde der Spot extrahiert (Exp. Teil, C4.2.1) und 3 µL des Überstandes mittels LC-MS/MS analysiert. Zur Quantifizierung wurde der Quotient Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard gegen die Konzentration aufgetragen.

#### 6.2.4.2 Inter-individuellen Unterschiede der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen

##### *Verwendetes Blut und die Hct-Werte*

Um die inter-individuellen Unterschiede der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen zu untersuchen, wurde Blut von vier Einzelspendern verwendet. Dieses wurde jeweils für 20 min bei einer Temperatur von 4 °C mit 1306 rcf zentrifugiert und anschließend wurden das Plasma und die Blutzellen wieder vereinigt, sodass für jeden Spender ein Hct von 0,4 und 0,6 resultierte (Abbildung 75). Für die Kalibriergeraden wurden Blut bzw. Plasma und Blutzellen eines Einzelspenders verwendet, die durch Zentrifugation (4 °C, 3000 g, 15 min) erhalten wurden.

#### *Erstellen der Kalibriergeraden*

Zum Erstellen der Kalibriergeraden wurde die jeweilige Matrix (Vollblut, Plasma oder Blutzellen) mit 2,5 % frisch hergestellter Spikelösung versetzt, gespottet, getrocknet und

extrahiert. Die Konzentrationen von Sitagliptin lagen dabei zwischen 3 ng/mL und 500 ng/mL (3,0; 4,0; 7,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 500,0 ng/mL).

#### *Inkubation des Blutes mit Sitagliptin*

Die Inkubation wurde analog Exp. Teil, C6.2.4.1 durchgeführt, allerdings wurde für jeden Hct-Wert eines Individualspenders eine Konzentration (Vollblutkonzentrationen  $c = 250 \text{ ng/mL}$ ,  $n = 3$ ) getestet.

#### *Extraktion und Quantifizierung der Proben*

Die Extraktion und Quantifizierung wurde analog der in Exp. Teil, C6.2.4.1 beschriebenen Extraktion durchgeführt.

### 6.2.4.3 Dialyseversuche

#### *Verwendetes Blut und die Hct-Werte*

Für die Dialyseversuche wurde Vollblut eines Spenders, der kein Sitagliptin oder Metformin eingenommen hatte mit 1306 rcf und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde von den Blutzellen abpipettiert und anschließend wurden Blutzellen und Plasma vereinigt, sodass je 30 mL Blut mit verschiedenen Hämatokritwerten erhalten wurde. Diese waren 30 %, 50 % und 70 %. Zum Erstellen der Kalibriergeraden waren ebenfalls Vollblut, Plasma und Blutzellen notwendig, sodass 30 mL Vollblut desselben Spenders mit 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert wurden und somit in Plasma und Blutzellen aufgetrennt und anschließend separiert wurden (Abbildung 75). Das Plasma und die Blutzellen wurden, wie auch das auf verschiedene Hct-Werte eingestellten Vollblut, bei 4 °C gelagert. Ebenso wurde auch Vollblut desselben Spenders gelagert, das zuvor nicht zentrifugiert wurde. Die maximale Lagerzeit betrug 4 Wochen.

#### *Erstellen der Kalibriergeraden*

Zum Erstellen der Kalibriergeraden wurde die jeweilige Matrix (Vollblut, Plasma oder Blutzellen) mit 2,5 % frisch hergestellter Spikelösung versetzt, gespottet, getrocknet und extrahiert. Die Konzentrationen von Sitagliptin lagen dabei für Plasma und die Blutzellen zwischen 3 ng/mL und 500 ng/mL (3,0; 4,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 500,0 ng/mL) und für Vollblut zwischen 3 ng/mL und 750 ng/mL (3,0; 4,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 500,0; 750,0 ng/mL).

#### *Dialyse der Blutproben*

Die Dialyse wurde mit einer Konzentration (Vollblutkonzentration  $c = 500 \text{ ng/mL}$ ;  $n = 3$ ) für jeden Hämatokrit und jeden Zugzeitpunkt durchgeführt. Dazu wurde das zuvor auf einen

Hct eingestellte Vollblut mit Spikelösung versetzt, sodass das Volumen an Spikelösung 2,5 % betrug. 1500 µL dieses mit Sitagliptin versetzten Blutes wurde für 60 min bei 37 °C und 450 rpm im Thermomixer inkubiert, damit der Arzneistoff sich im Blut in die Zellen verteilen konnte. Nach dieser Zeit wurde sofort für jeden Ansatz eine Vollblutprobe gespottet, 1000 µL des inkubierten Vollblutes in eine Dialyseeinheit gefüllt und das restliche Vollblut mit 3000 g bei einer Temperatur von 4 °C für 15 min zentrifugiert, um dieses in Plasma und Blutzellen aufzutrennen. Anschließend wurden jeweils eine Plasma- und eine Blutzellprobe gespottet. Die Dialyseeinheiten wurden in die mit 9 mL PBS-Puffer gefüllten und auf 37 °C vorgewärmten Plastikröhrchen gegeben und im Inkubator bei 37 °C mit einer Rotationsbewegung von 140 rcf dialysiert. Zu jedem Zugzeitpunkt wurden 3 Dialyseproben entnommen, je eine Vollblutprobe gespottet, das restliche Vollblut mit 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert und anschließend je eine Plasma- und eine Blutzellprobe gespottet. Die Zugzeitpunkte waren 5 min, 10 min, 30 min, 1 h und 4 h. Dieses Vorgehen wurde für jede Blutcharge mit voreingestelltem Hämatokrit analog durchgeführt. Nach einer Trocknungsdauer von mindestens 3 Stunden wurden die Proben extrahiert.

### *Extraktion und Quantifizierung der Proben*

Die Extraktion und Quantifizierung wurde analog der in Exp. Teil, C6.2.4.1 beschriebenen Extraktion durchgeführt.

*D*

**Tabellarischer Anhang**





# 1 Methode zur Quantifizierung von Kreatinin, Metformin und Sitagliptin aus Trockenblut

## 1.1 Entwicklung der LC-MS/MS Methode

### 1.1.1 Einfluss der MS1- sowie MS2-Resolution auf die Höhe sowie das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) des Signals für Sitagliptin

MS 1 Resolution	MS 2 Resolution	Höhe des Signals	SNR
Unit	Unit	534	211,8
Unit	Wide	667	218,1
Wide	Wide	1070	237,8
Wide	Widest	1552	266,6
Unit	Widest	1010	249,4
Widest	Widest	2206	190,8
Widest	Wide	1514	241,2
Widest	Unit	1355	253,8
Wide	Unit	994	247,3

## 1.2 Methodvalidierung

### 1.2.1 Lower Limit of Quantification

	Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	gemessene Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]						
		Intraday (n = 5)				Interday (n = 15)		
		Tag	MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]	MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
<b>Metformin</b>	0,2	1	0,19 $\pm$ 0,12	6,45	94,16	0,20 $\pm$ 0,01	4,39	100,35
		2	0,21 $\pm$ 0,02	9,49	104,09			
		3	0,21 $\pm$ 0,02	9,70	102,80			
<b>Kreatinin</b>	1,5	1	1,57 $\pm$ 0,06	4,02	104,76	1,52 $\pm$ 0,07	4,40	101,56
		2	1,43 $\pm$ 0,14	9,49	95,23			
		3	1,57 $\pm$ 0,12	7,41	104,67			

	Konzentration [ $\text{ng/mL}$ ]	gemessene Konzentration [ $\text{ng/mL}$ ]						
		Intraday (n = 5)				Interday (n = 15)		
		Tag	MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]	MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
<b>Sitagliptin</b>	3,0	1	2,93 $\pm$ 0,12	4,14	98,02	2,93 $\pm$ 0,04	1,48	97,81
		2	2,98 $\pm$ 0,24	7,94	99,47			
		3	2,87 $\pm$ 0,15	5,18	95,94			

### 1.2.2 Richtigkeit und Präzision von Metformin

<b>Metformin</b>				
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Tag</b>	<b>gemessene Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>		
		<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>Präzision [%]</b>	<b>Richtigkeit [%]</b>
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
0,2	1	0,19 $\pm$ 0,12	6,45	94,16
	2	0,21 $\pm$ 0,02	9,49	104,09
	3	0,21 $\pm$ 0,02	9,70	102,80
0,6	1	0,58 $\pm$ 0,05	8,26	96,75
	2	0,60 $\pm$ 0,06	9,63	99,31
	3	0,57 $\pm$ 0,04	6,97	95,20
2,0	1	1,94 $\pm$ 0,10	5,13	97,33
	2	1,98 $\pm$ 0,10	5,40	99,13
	3	1,92 $\pm$ 0,14	7,38	96,17
4,0	1	4,27 $\pm$ 0,17	3,90	106,86
	2	4,05 $\pm$ 0,22	5,45	101,45
	3	3,91 $\pm$ 0,36	9,24	97,77
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
0,2		0,20 $\pm$ 0,01	4,39	100,35
0,6		0,58 $\pm$ 0,01	1,75	97,09
2,0		1,95 $\pm$ 0,02	1,25	97,54
4,0		4,08 $\pm$ 0,15	3,66	102,03

### 1.2.3 Richtigkeit und Präzision von Kreatinin

<b>Kreatinin</b>				
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Tag</b>	<b>gemessene Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>		
		<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>Präzision [%]</b>	<b>Richtigkeit [%]</b>
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
1,5	1	1,57 $\pm$ 0,06	4,02	104,76
	2	1,43 $\pm$ 0,14	9,49	95,23
	3	1,57 $\pm$ 0,12	7,41	104,67
4,5	1	4,75 $\pm$ 0,23	4,89	105,45
	2	4,54 $\pm$ 0,35	7,72	100,91
	3	4,55 $\pm$ 0,39	8,62	101,15
6,5	1	6,32 $\pm$ 0,35	5,50	97,30
	2	6,79 $\pm$ 0,65	9,58	104,45
	3	6,18 $\pm$ 0,46	7,46	95,09
11,5	1	10,96 $\pm$ 0,74	6,79	95,28
	2	12,19 $\pm$ 1,09	8,91	105,98
	3	11,34 $\pm$ 0,72	6,36	98,65
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
1,5		1,52 $\pm$ 0,07	4,40	101,56
4,5		4,61 $\pm$ 0,09	2,04	102,50
6,5		6,43 $\pm$ 0,26	4,04	98,95
11,5		11,50 $\pm$ 0,51	4,47	99,97

### 1.2.4 Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin

Sitagliptin				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
3,0	1	2,93 ± 0,12	4,14	98,02
	2	2,98 ± 0,24	7,94	99,47
	3	2,87 ± 0,15	5,18	95,94
10,0	1	10,07 ± 0,32	3,21	100,91
	2	9,61 ± 0,70	7,19	96,29
	3	9,43 ± 0,70	7,45	94,50
150,0	1	153,16 ± 8,88	5,80	102,34
	2	154,90 ± 10,30	7,06	97,49
	3	148,27 ± 10,06	6,79	99,07
400,0	1	433,82 ± 14,15	3,26	108,71
	2	437,01 ± 5,24	1,20	109,50
	3	413,62 ± 27,86	6,74	103,64
750,0	1	702,54 ± 26,10	3,71	93,89
	2	744,08 ± 61,04	8,20	99,44
	3	768,94 ± 68,06	8,85	102,76
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
3,0		2,93 ± 0,04	1,48	97,81
10,0		9,70 ± 0,27	2,78	97,23
150,0		149,11 ± 3,02	2,03	99,63
400,0		428,15 ± 10,36	2,42	107,28
750,0		738,52 ± 61,34	8,31	98,70

### 1.2.5 Einzelwerte für die Wiederfindung und Extraktionseffizienz der Analyten

Die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) wurden aus  $n = 5$  Werten berechnet.

<b>Metformin</b>		
Nominalkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Extraktionseffizienz MW $\pm$ SD [%]	Wiederfindung MW $\pm$ SD [%]
0,2	11,85 $\pm$ 0,76	11,32 $\pm$ 0,93
2,0	10,10 $\pm$ 0,52	9,88 $\pm$ 0,27
4,0	10,84 $\pm$ 1,89	10,48 $\pm$ 1,75
<b>Kreatinin</b>		
Nominalkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Extraktionseffizienz MW $\pm$ SD [%]	Wiederfindung MW $\pm$ SD [%]
1,5	11,99 $\pm$ 1,94	13,38 $\pm$ 1,98
6,5	11,85 $\pm$ 0,68	11,15 $\pm$ 0,28
11,5	11,58 $\pm$ 2,09	11,85 $\pm$ 2,73
<b>Phenformin</b>		
Nominalkonzentration [ng/Spot]	Extraktionseffizienz MW $\pm$ SD [%]	Wiederfindung MW $\pm$ SD [%]
200,0	10,89 $\pm$ 1,01	10,35 $\pm$ 1,24
<b>Sitagliptin</b>		
Nominalkonzentration [ng/mL]	Extraktionseffizienz MW $\pm$ SD [%]	Wiederfindung MW $\pm$ SD [%]
3,0	4,89 $\pm$ 0,96	6,18 $\pm$ 1,45
150,0	4,91 $\pm$ 0,48	6,97 $\pm$ 1,48
400,0	4,81 $\pm$ 1,30	7,08 $\pm$ 2,09
750,0	3,70 $\pm$ 0,31	4,75 $\pm$ 0,15
<b>Sitagliptin-d4 Phosphat</b>		
Nominalkonzentration [ng/Spot]	Extraktionseffizienz MW $\pm$ SD [%]	Wiederfindung MW $\pm$ SD [%]
0,8	2,77 $\pm$ 0,39	6,83 $\pm$ 0,83

### 1.2.6 Robustheit

	Nominalkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	gemessene Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] ( $n = 5$ )		
		MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
<b>Metformin</b>	4,0	4,19 $\pm$ 0,12	2,79	104,75
<b>Kreatinin</b>	11,5	11,22 $\pm$ 0,82	7,31	97,61
	Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL] ( $n = 5$ )		
		MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
<b>Sitagliptin</b>	400,0	389,95 $\pm$ 36,19	9,28	97,71

**1.2.7 Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Metformin**

Nominalkonzentration [µg/mL]	Stabilität	berechnete Konzentration [µg/mL]		
		MW ± SD (n = 3)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,2	3 h trocknen	0,19 ± 0,07	94,96	5,92
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	0,19 ± 0,01	95,08	7,50
	24 h (ohne)	0,18 ± 0,01	92,13	3,42
	0 h (Autosampler)	0,19 ± 0,01	96,56	4,05
	24 h (Autosampler)	0,19 ± 0,01	95,93	4,38
5,0	3 h trocknen	4,64 ± 0,07	92,74	1,58
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	4,70 ± 0,16	94,03	3,29
	24 h (ohne)	4,57 ± 0,19	91,43	4,07
	0 h (Autosampler)	4,78 ± 0,05	95,57	1,14
	24 h (Autosampler)	4,72 ± 0,08	95,38	1,78

**1.2.8 Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Kreatinin**

Nominalkonzentration [µg/mL]	Stabilität	berechnete Konzentration [µg/mL]		
		MW ± SD (n = 3)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
1,5	3 h trocknen	1,59 ± 0,14	105,91	8,57
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	1,58 ± 0,13	105,05	8,09
	24 h (ohne)	1,49 ± 0,05	99,32	3,10
	0 h (Autosampler)	1,49 ± 0,15	99,58	9,83
	24 h (Autosampler)	1,51 ± 0,13	100,39	8,93
11,5	3 h trocknen	11,30 ± 0,91	98,22	8,04
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	12,67 ± 0,25	110,18	2,00
	24 h (ohne)	12,81 ± 0,22	111,37	1,68
	0 h (Autosampler)	12,48 ± 0,35	108,53	2,83
	24 h (Autosampler)	12,86 ± 0,06	111,82	0,47

**1.2.9 Kurzzeit- und Autosamplerstabilität für Sitagliptin**

Nominalkonzentration [ng/mL]	Stabilität	berechnete Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 3)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
3,0	3 h trocknen	2,93 ± 0,24	99,32	7,94
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	3,18 ± 0,27	105,94	8,50
	24 h (ohne)	3,38 ± 0,03	112,81	0,94
	0 h (Autosampler)	3,23 ± 0,08	92,94	2,42
	24 h (Autosampler)	3,13 ± 0,31	96,98	9,84
400,0	3 h trocknen	396,04 ± 29,79	99,01	7,52
	24 h (Plastiktüte + Trocknungsmittel)	362,30 ± 5,78	90,58	1,59
	24 h (ohne)	357,31 ± 4,78	89,33	1,34
	0 h (Autosampler)	429,04 ± 13,61	93,33	3,17
	24 h (Autosampler)	372,56 ± 10,78	107,46	2,89

**1.2.10 Langzeitstabilität für Metformin, Kreatinin und Sitagliptin**

Die Langzeitstabilität wurde über einen Zeitraum von vier Wochen für die Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und 4 °C getestet und die Proben anschließend gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade quantifiziert.

		Nominalkonzentration [µg/mL]	berechnete Konzentration [µg/mL]		
			MW ± SD (n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
<b>Metformin</b>	RT	0,2	0,22 ± 0,004	108,06	1,76
		4,0	3,89 ± 0,18	97,34	4,52
	4 °C	0,2	0,22 ± 0,01	107,43	2,71
		4,0	4,11 ± 0,15	102,76	3,62
<b>Kreatinin</b>	RT	1,5	1,59 ± 0,09	105,65	5,85
		11,5	11,08 ± 1,14	96,32	10,30
	4 °C	1,5	1,52 ± 0,07	101,48	4,29
		11,5	11,74 ± 0,80	102,05	6,82
		Nominalkonzentration [ng/mL]	berechnete Konzentration [ng/mL]		
			MW ± SD (n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
<b>Sitagliptin</b>	RT	3,0	3,24 ± 0,23	108,14	7,00
		400,0	428,85 ± 26,91	107,46	6,28
	4 °C	3,0	2,89 ± 0,27	99,72	9,00
		400,0	440,69 ± 7,03	110,43	1,59

**1.2.11 Erweiterte Langzeitstabilität für Sitagliptin**

Diese wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten für die Lagerung bei einer Temperatur von -80 °C getestet und die Proben anschließend gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade quantifiziert.

		Nominalkonzentration [ng/mL]	berechnete Konzentration [ng/mL]		
			MW ± SD (n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Sitagliptin	RT	3,0	3,05 ± 0,17	101,77	5,41
		400,0	428,42 ± 11,92	107,35	2,78
		750,0	807,69 ± 15,38	107,94	1,90



## 2 Klinische Studien

### 2.1 Basisstudie

#### 2.1.1 Klinische Parameter der 70 Patienten, die im Rahmen der Basisstudie Blut gespendet haben

	m/w	Anzahl AM	Alter [Jahre]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	AMEinnahme - Blutabnahme [min]	C <sub>Plasma</sub> (Kreatinin) [µg/mL]	Hct [%]	HbA <sub>1c</sub> [%]	c(Glu) [mg%]
1	m	6	71	32,28	585	8,5	38,7	7,9	152
2	w	9	74	20,72	530	7,4	34,0	5,6	119
3	m	11	74	43,25	890	12,2	53,3	6,4	129
4	w	4	45	28,91	610	6,5	39,3	5,9	112
5	m	5	67	31,05	775	11,1	46,6	5,5	99
6	m	5	36	28,21	595	9,9	40,9	6,0	103
7	w	5	57	29,07	670	7,2	42,1	5,9	123
8	m	2	58	28,34	45	8,0	46,7	6,3	94
9	m	7	49	28,09	810	11,9	45,6	5,8	119
10	m	2	70	39,02	630	7,2	43,9	6,6	142
11	w	10	69	33,02	835	12,1	33,3	8,6	249
12	w	7	52	31,83	105	7,0	46,4	5,6	84
13	m	7	73	30,25	30	11,2	44,3	5,8	117
14	w	7	39	25,77	755	11,2	45,7	6,6	146
15	w	10	74	36,79	800	12,3	36,3	6,1	70
16	m	11	70	26,85	795	12,4	38,3	6,4	123
17	w	3	48	24,73	800	8,2	39,2	6,4	103
18	w	8	78	26,30	960	5,7	40,0	7,0	133
19	w	4	82	26,95	740	7,0		5,5	97
20	w	4	68	39,13	680	7,3	38,7	6,4	137
21	m	5	66	32,20	600	8,9	46,1	5,6	93
22	w	10	86	25,59	710	10,5		7,4	200
23	w	9	48	32,99	80	6,6	39,1	7,6	115
24	m	4	65	25,34	35	8,0	46,0	5,8	123
25	w	4	49	26,35	710	6,5	40,5	5,9	146
26	m	5	67	44,75	900	9,3	45,6	6,6	114
27	m	6	76	32,54	855	8,9	43,2	7,0	149
28	w	2	53	38,64	70	8,8	44,1	5,7	84
29	m	7	66	37,04	555	8,3	40,9	7,4	116
30	m	6	78	27,55	800	10,0		6,0	110
31	m	6	71	30,27	60	6,8	45,1	6,0	111
32	m	8	78	24,09	755	9,8	41,9	5,9	102
33	w	17	70	19,84	790	8,7	38,9	6,1	110
34	m	6	66	30,12	805	9,2	45,2	5,2	85
35	m	7	56	29,98	70	7,2	40,5	6,3	104

	m/w	Anzahl AM	Alter [Jahre]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	AMEinnahme - Blutabnahme [min]	C <sub>Plasma</sub> (Kreatinin) [µg/mL]	Hct [%]	HbA <sub>1c</sub> [%]	c(Glu) [mg%]
36	w	21	68	25,34	825	9,4	37,8	6,8	176
37	m	3	50	34,40	135	8,0	46,3	5,7	112
38	m	4	62	27,25	35	9,6	44,0	5,9	119
39	w	11	55	27,73	95	5,1	39,3	7,0	142
40	m	6	56	35,74	105	9,6	46,0	5,8	116
41	m	7	79	29,88	780	8,7	46,7	5,9	121
42	w	8	75	22,86	780	6,4	43,2	5,7	150
43	w	3	57	23,71	110	8,4	39,7	6,4	126
44	w	7	42	38,41	95	7,0	43,0	5,7	90
45	m	4	70	32,93	90	11,3	41,1	6,6	120
46	w	5	66	33,71	505	7,3	39,4	6,2	82
47	w	5	76	29,73	750	11,5	38,3	5,7	84
48	w	4	59	33,75	70	5,8	43,5	6,4	121
49	m	4	66	25,93	120	12,0	41,4	5,7	88
50	m	4	54	32,56	60	10,7	47,1	5,8	97
51	w	13	76	30,08	750	8,1	42,0	6,6	122
52	m	4	66	25,34	840	8,1	42,5	5,6	110
53	m	3	58	20,76	660	9,7	48,6	7,1	140
54	w	6	74	32,96	840	7,3	37,2	5,7	93
55	m	12	65	32,19	60	14,4	52,0	6,7	140
56	w	9	65	54,69	120	6,8	41,6	6,3	175
57	w	6	74	37,58	620	7,1	37,0	6,4	117
58	m	5	51	27,78	600	8,5	48,8	5,8	115
59	w	13	48	21,83	840	10,4	39,4	4,9	104
60	w	1	32	30,11	720	7,8	44,7	5,8	86
61	w	10	75	24,45	860	6,8	34,4	6,1	115
62	m	5	64	23,38	210	10,1	44,2	7,5	81
63	w	11	85	28,52	610	11,2	41,0	6,8	165
64	m	10	79	25,39	900	9,0	46,7	6,2	111
65	m	9	72	30,12	60	17,1	35,1	5,6	77
66	w	13	66	28,76	1380	7,2	37,0	6,0	78
67	w	6	82	27,18	650	8,1	43,7	7,1	152
68	m	4	78	22,77	80	10,2	35,3	6,2	130
69	m	9	63	24,62	840	10,4	42,2	7,1	97
70	m	6	67	26,13	80	16,7	40,6	6,8	127

AM = Arzneimittel; BMI = Body-Mass-Index; Hct = Hämatokrit; Glu = Glukose

### 3 Abschätzung der Nierenfunktion mit Hilfe der Kreatininkonzentration aus Dried Blood Spots

#### 3.1 Ermittlung eines Korrelationsfaktors für Kreatinin zur Berechnung der Nierenfunktion

##### 3.1.1 Konzentration des Kreatinins im Plasma im Vergleich zur Kapillarblutkonzentration bei 45 Patienten des Entwicklungssets

Probe	$C_{\text{Plasma}}$ (Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$C_{\text{Kapillarblut}}$ (Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Probe	$C_{\text{Plasma}}$ (Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$C_{\text{Kapillarblut}}$ (Kreatinin) [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	8,5	6,98	24	8,0	8,48
2	7,4	6,98	25	6,5	5,42
3	12,2	10,25	26	9,3	7,75
4	6,5	6,47	27	8,9	7,13
5	11,1	11,07	28	8,8	6,77
6	9,9	9,29	29	8,3	7,80
7	7,2	7,39	30	10,0	9,16
8	8,0	6,27	31	6,8	7,27
9	11,9	9,53	32	9,8	9,72
10	7,2	6,77	33	8,7	9,54
11	12,1	9,99	34	9,2	7,39
12	7,0	7,20	35	7,2	5,79
13	11,2	11,72	36	9,4	9,51
14	11,2	10,92	37	8,0	5,91
15	12,3	12,85	38	9,6	8,40
16	12,4	12,81	39	5,1	4,12
17	8,2	8,20	40	9,6	9,83
18	5,7	4,33	41	8,7	9,34
19	7,0	7,01	42	6,4	6,81
20	7,3	5,59	43	8,4	6,04
21	8,9	7,83	44	7,0	6,40
22	10,5	9,31	45	11,3	9,48
23	6,6	6,55			

### 3.1.2 Gemessene Konzentration des Kreatinins im Plasma ( $c_{P_{gem}}$ ) im Vergleich zur Kapillarblutkonzentration sowie der berechneten Plasmakonzentration ( $c_{P_{ber}}$ ) mit zugehöriger Abweichung in den Proben des Verifizierungssets

Probe	$c_{P_{gem}}$ (Krea) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$c_{\text{Kapillarblut}}$ (Krea) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$c_{P_{ber}}$ (Krea) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Differenz ( $c_{P_{ber}} - c_{P_{gem}}$ ) [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Abweichung $c_{P_{ber}}$ von $c_{P_{gem}}$ [%]
1	7,3	6,44	7,02	-0,28	-3,85
2	11,5	10,47	11,41	-0,09	-0,82
3	5,8	5,49	5,98	0,18	3,12
4	12	10,81	11,78	-0,22	-1,83
5	10,7	9,55	10,40	-0,30	-2,82
6	8,1	7,05	7,68	-0,42	-5,21
7	8,1	7,28	7,94	-0,17	-2,04
8	9,7	8,66	9,43	-0,27	-2,80
9	7,3	6,97	7,59	0,29	3,93
10	14,4	13,48	14,69	0,29	1,99
11	6,8	6,32	6,88	0,08	1,20
12	7,1	6,51	7,09	-0,01	-0,10
13	8,5	7,54	8,22	-0,28	-3,34
14	10,4	9,62	10,48	0,08	0,80
15	7,8	7,19	7,83	0,03	0,35
16	6,8	6,01	6,54	-0,26	-3,80
17	10,1	9,39	10,23	0,13	1,29
18	11,2	10,32	11,24	0,04	0,39
19	9	8,29	9,03	0,03	0,31
20	17,1	15,58	16,97	-0,13	-0,76
21	7,2	6,83	7,44	0,24	3,32
22	8,1	7,37	8,03	-0,08	-0,93
23	10,2	9,41	10,25	0,05	0,45
24	10,4	9,36	10,19	-0,21	-2,00
25	16,7	15,44	16,82	0,12	0,69

## 3.2 Abschätzen der Nierenfunktion mit Hilfe der Cockcroft & Gault Formel

### 3.2.1 Vergleich der Plasmakreatininspiegel der Studienpatienten der Basisstudie

Für jeden Patienten wurden der von der Praxis übermittelte Plasmakreatininwert sowie der mithilfe des Korrelationsfaktors berechnete Wert aufgetragen.

Probe	$c_p(\text{Kreatinin}) [\mu\text{g/mL}]$		Probe	$c_p(\text{Kreatinin}) [\mu\text{g/mL}]$	
	gemessen	berechnet		gemessen	berechnet
1	8,5	7,6	36	9,4	10,4
2	7,4	7,6	37	8,0	6,4
3	12,2	11,2	38	9,6	9,2
4	6,5	7,1	39	5,1	4,5
5	11,1	12,1	40	9,6	10,7
6	9,9	10,1	41	8,7	10,2
7	7,2	8,1	42	6,4	7,4
8	8,0	6,8	43	8,4	6,6
9	11,9	10,4	44	7,0	7,0
10	7,2	7,4	45	11,3	10,3
11	12,1	10,9	46	7,3	7,0
12	7,0	7,9	47	11,5	11,4
13	11,2	12,8	48	5,8	6,0
14	11,2	11,9	49	12,0	11,8
15	12,3	14,0	50	10,7	10,4
16	12,4	14,0	51	8,1	7,7
17	8,2	9,0	52	8,1	8,0
18	5,7	4,7	53	9,7	9,4
19	7,0	7,6	54	7,3	7,6
20	7,3	6,1	55	14,4	14,7
21	8,9	8,5	56	6,8	6,9
22	10,5	10,2	57	16,7	16,9
23	6,6	7,1	58	7,1	7,1
24	8,0	9,3	59	8,5	8,2
25	6,5	5,9	60	10,4	10,5
26	9,3	8,5	61	7,8	7,8
27	8,9	7,8	62	6,8	6,6
28	8,8	7,4	63	10,1	10,3
29	8,3	8,5	64	11,2	11,3
30	10,0	10,0	65	9,0	9,0
31	6,8	7,9	66	17,1	17,0
32	9,8	10,6	67	7,2	7,5
33	8,7	10,4	68	8,1	8,0
34	9,2	8,1	69	10,2	10,3
35	7,2	6,3	70	10,4	10,2

### 3.2.2 Vergleich der Kreatininclearance der Studienpatienten der Basisstudie

Es wurde für jeden Patienten die Kreatininclearance aus dem von der Arztpraxis übermittelten Plasmakreatininwert und dem über den Faktor berechneten Wert ermittelt.

Probe	Kreatininclearance [mL/min]		Probe	Kreatininclearance [mL/min]	
	C <sub>P</sub> gemessen	C <sub>P</sub> berechnet		C <sub>P</sub> gemessen	C <sub>P</sub> berechnet
1	80,73	90,01	36	51,72	46,82
2	70,65	68,65	37	114,69	142,32
3	49,74	54,25	38	71,66	75,05
4	90,93	83,70	39	126,71	143,77
5	63,76	58,57	40	95,76	85,63
6	125,48	122,50	41	68,85	58,74
7	83,97	74,99	42	65,35	56,22
8	91,68	107,22	43	64,62	82,39
9	77,96	89,16	44	101,98	102,12
10	108,84	106,07	45	61,60	67,28
11	40,25	44,68	46	70,61	73,27
12	91,57	81,50	47	36,40	36,62
13	56,50	49,46	48	95,79	92,69
14	61,85	58,11	49	59,78	60,76
15	32,81	28,77	50	72,90	74,84
16	49,08	43,52	51	49,16	51,75
17	85,30	78,12	52	78,29	79,75
18	63,05	76,02	53	77,73	79,79
19	51,55	47,18	54	58,17	55,85
20	56,12	67,18	55	53,10	51,95
21	91,00	94,80	56	68,62	67,66
22	33,64	34,76	57	44,56	44,16
23	97,09	89,66	58	58,82	58,75
24	93,23	80,59	59	108,05	111,54
25	91,56	100,53	60	57,86	57,27
26	81,98	90,14	61	90,56	90,05
27	89,49	102,35	62	58,46	60,63
28	73,06	86,96	63	67,31	66,30
29	93,12	90,76	64	30,55	30,37
30	53,13	53,16	65	53,85	53,56
31	116,13	99,45	66	35,07	35,26
32	56,59	52,27	67	50,84	49,10
33	56,90	47,52	68	42,27	42,57
34	71,94	82,06	69	52,09	51,74
35	118,94	135,46	70	70,85	72,14

### **3.2.3 Plasmakreatininspiegel und Kreatininclearance der Studienpatienten der Feldstudie**

Für jeden Patienten wurden die mithilfe des Korrelationsfaktors berechnete Kreatininkonzentration im Plasma sowie die Kreatininclearance aufgetragen. Für Patient 15 konnte aufgrund fehlender Angaben zum Körpergewicht und der Körpergröße keine Kreatininclearance berechnet werden.

Probe	c <sub>p</sub> (Kreatinin) [µg/mL]	Kreatininclearance [mL/min]	Probe	c <sub>p</sub> (Kreatinin) [µg/mL]	Kreatininclearance [mL/min]
1	6,26	155,91	43	20,35	36,86
2	11,92	66,06	44	16,10	37,65
3	11,14	52,33	45	10,92	46,97
4	10,53	89,99	46	17,98	24,92
6	14,59	53,57	48	13,34	98,86
7	7,95	85,75	49	12,12	80,45
8	10,36	54,39	50	13,50	37,92
9	8,04	71,59	51	11,98	55,38
10	9,97	52,12	52	6,12	115,50
11	14,67	51,42	53	11,47	84,02
12	14,40	47,00	54	7,68	124,88
14	12,37	122,38	55	8,70	121,36
15	11,84		57	11,24	76,45
16	16,28	47,88	58	9,53	69,43
17	14,82	59,99	59	7,39	67,46
18	14,49	85,52	60	11,77	83,94
19	13,17	44,10	62	15,39	54,83
20	16,21	93,47	63	7,42	123,98
21	14,81	54,22	64	9,14	88,09
22	13,57	66,84	65	11,17	38,78
23	8,79	72,41	66	8,35	100,97
24	15,17	38,55	67	7,13	96,71
25	16,33	88,78	68	8,14	68,16
26	15,35	60,33	69	15,70	63,32
27	16,09	52,75	70	10,53	41,59
28	14,91	27,30	71	35,93	21,61
29	11,45	80,78	72	8,44	78,00
30	11,16	79,82	73	13,00	56,58
31	13,15	93,79	74	14,68	77,09
32	6,63	129,36	75	6,96	79,51
33	13,01	70,60	76	9,39	61,47
34	5,75	146,45	77	12,74	63,46
35	21,67	43,34	78	14,39	69,29
36	15,28	50,82	79	14,29	52,88
37	10,59	84,63	80	15,93	47,20
38	10,04	102,79	81	11,79	54,21
40	13,96	46,94	82	10,29	77,07
41	11,17	59,92	83	13,41	50,72
42	18,61	40,25	84	15,99	38,63



## 4 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Metformin

### 4.1 Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Metformin aus Vollblut und Blutzellen aus getrockneten Spots

#### 4.1.1 Richtigkeit und Präzision von Metformin im Vollblut

<b>Metformin im Vollblut</b>				
Nominalkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Tag	gemessene Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]		
		MW $\pm$ SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
0,2	1	0,19 $\pm$ 0,01	5,18	94,81
	2	0,19 $\pm$ 0,01	6,70	96,25
	3	0,19 $\pm$ 0,02	9,98	93,72
2,0	1	2,06 $\pm$ 0,14	6,95	102,98
	2	2,11 $\pm$ 0,22	10,41	105,78
	3	2,19 $\pm$ 0,89	4,05	109,44
10,0	1	11,16 $\pm$ 0,26	1,93	111,73
	2	11,21 $\pm$ 0,14	1,65	112,18
	3	10,84 $\pm$ 0,61	4,09	108,53
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
0,2		0,19 $\pm$ 0,01	2,35	94,93
2,0		2,12 $\pm$ 0,17	1,27	106,07
10,0		11,07 $\pm$ 0,43	5,64	110,81

#### 4.1.2 Richtigkeit und Präzision von Metformin in den Blutzellen

<b>Metformin in den Blutzellen</b>				
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Tag</b>	<b>gemessene Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>		
		<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>Präzision [%]</b>	<b>Richtigkeit [%]</b>
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
0,2	1	0,23 $\pm$ 0,01	4,78	113,06
	2	0,22 $\pm$ 0,01	6,59	109,28
	3	0,20 $\pm$ 0,01	5,77	100,13
2,0	1	2,09 $\pm$ 0,09	4,28	104,52
	2	2,26 $\pm$ 0,01	0,62	113,16
	3	2,16 $\pm$ 0,09	4,01	108,19
10,0	1	10,32 $\pm$ 0,59	5,68	103,27
	2	11,20 $\pm$ 0,25	2,23	112,14
	3	10,56 $\pm$ 0,62	5,91	105,68
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
0,2		0,22 $\pm$ 0,02	5,71	107,49
2,0		2,17 $\pm$ 0,10	2,97	108,62
10,0		10,69 $\pm$ 0,64	4,61	107,03

#### 4.1.3 Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Metformin im Vollblut

<b>Metformin</b>		
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	<b>MW <math>\pm</math> SD [%]</b>	<b>MW <math>\pm</math> SD [%]</b>
0,2	9,80 $\pm$ 0,47	9,11 $\pm$ 0,43
2,0	8,59 $\pm$ 0,85	7,93 $\pm$ 0,81
5,0	9,23 $\pm$ 1,07	8,99 $\pm$ 1,26
<b>Phenformin</b>		
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{Spot}</math>]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	<b>MW <math>\pm</math> SD [%]</b>	<b>MW <math>\pm</math> SD [%]</b>
0,4	6,27 $\pm$ 0,25	6,10 $\pm$ 0,30

## 4.1.4 Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Metformin in den Blutzellen

<b>Metformin</b>		
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	MW $\pm$ SD [%]	MW $\pm$ SD [%]
0,2	9,62 $\pm$ 1,78	9,90 $\pm$ 1,31
2,0	10,21 $\pm$ 1,45	9,98 $\pm$ 1,72
5,0	10,40 $\pm$ 0,99	10,22 $\pm$ 1,12
<b>Phenformin</b>		
<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{Spot}</math>]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	MW $\pm$ SD [%]	MW $\pm$ SD [%]
0,4	8,84 $\pm$ 0,98	8,88 $\pm$ 0,35

## 4.1.5 Stabilität von Metformin im Vollblut

<b>Nominalkonzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Stabilität</b>	<b>berechnete Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>]</b>		
		MW $\pm$ SD (n = 3 bzw. n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,2	3 h trocknen	0,21 $\pm$ 0,02	104,69	11,36
	24 h trocknen	0,19 $\pm$ 0,01	94,81	5,18
	24 h Autosampler	0,19 $\pm$ 0,02	95,84	8,49
2,0	3 h trocknen	2,08 $\pm$ 0,19	103,93	9,07
	24 h trocknen	2,06 $\pm$ 0,14	102,98	6,95
	24 h Autosampler	1,95 $\pm$ 0,21	97,33	10,85
10,0	3 h trocknen	10,52 $\pm$ 0,52	105,26	4,96
	24 h trocknen	11,16 $\pm$ 0,26	111,73	2,35
5,0	24 h Autosampler	4,72 $\pm$ 0,19	94,42	4,09

#### 4.1.6 Stabilität von Metformin in den Blutzellen

Nominalkonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Stabilität	berechnete Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]		
		MW $\pm$ SD (n = 3 bzw. n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,2	3 h trocknen	0,20 $\pm$ 0,01	97,89	5,27
	24 h trocknen	0,23 $\pm$ 0,01	113,06	4,78
	24 h Autosampler	0,22 $\pm$ 0,01	111,10	2,50
2,0	3 h trocknen	2,03 $\pm$ 0,15	101,66	7,54
	24 h trocknen	2,09 $\pm$ 0,09	104,52	4,28
	24 h Autosampler	1,98 $\pm$ 0,15	98,97	7,63
10,0	3 h trocknen	9,85 $\pm$ 0,89	98,60	9,00
	24 h trocknen	10,32 $\pm$ 0,59	103,27	5,68
	24 h Autosampler	11,03 $\pm$ 0,18	110,38	1,66

## 4.2 Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen

### 4.2.1 Verteilung von Metformin zwischen Plasma und Blutzellen

Nominalkonzentration Metformin in Vollblut [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$c_P/c_{BZ}$		
	15 min	60 min	240 min
1,3	8,71	4,55	5,69
	11,34	5,22	7,62
	6,37	6,34	3,55
2,6	n.b.	4,37	3,93
	6,86	4,62	4,35
	16,16	4,71	3,83
6,4	9,79	4,55	4,13
	14,90	4,88	3,79
	13,60	3,89	3,77
MW	10,97	4,79	4,52
MDM	3,03	0,46	0,95
	Mittelwert $c_P/c_{BZ}$		
1,3	8,81	5,37	5,62
2,6	11,51	4,57	4,04
6,4	12,76	4,44	3,90

MDM = mittlere Abweichung vom Mittelwert

## 5 Populationspharmakokinetische Untersuchung von Sitagliptin

### 5.1 Validierung der Methoden zur Quantifizierung von Sitagliptin aus Plasma und Blutzellen aus getrockneten Spots

#### 5.1.1 Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin in Plasma

Sitagliptin im Plasma				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
3	1	3,37 ± 0,17	5,17	112,54
	2	2,94 ± 0,11	3,68	98,26
	3	3,05 ± 0,20	6,65	101,93
50	1	52,37 ± 1,63	3,12	104,99
	2	51,98 ± 3,90	7,50	104,19
	3	53,03 ± 2,27	4,29	106,30
500	1	540,95 ± 10,45	1,93	108,44
	2	548,04 ± 9,07	1,65	109,86
	3	533,30 ± 21,80	4,09	106,91
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
3		3,12 ± 0,25	5,17	104,24
50		52,46 ± 2,81	4,97	105,16
500		540,76 ± 16,08	2,56	108,40

### 5.1.2 Richtigkeit und Präzision von Sitagliptin in den Blutzellen

<b>Sitagliptin in den Blutzellen</b>				
<b>Nominalkonzentration [ng/mL]</b>	<b>Tag</b>	<b>gemessene Konzentration [ng/mL]</b>		
		<b>MW ± SD</b>	<b>Präzision [%]</b>	<b>Richtigkeit [%]</b>
Intraday Variation (n = 5 für jede Konzentration)				
3	1	2,87 ± 0,13	4,53	95,73
	2	3,30 ± 0,09	4,89	110,24
	3	2,80 ± 0,14	2,62	93,69
50	1	47,29 ± 3,03	6,40	94,79
	2	46,85 ± 2,15	7,15	93,91
	3	48,60 ± 3,48	4,58	97,41
500	1	528,09 ± 29,98	5,68	105,86
	2	492,75 ± 42,33	2,08	98,78
	3	552,86 ± 11,52	8,59	110,83
Interday Variation (n = 15 für jede Konzentration)				
3		2,99 ± 0,25	4,01	99,89
50		47,58 ± 3,03	6,04	95,37
500		524,56 ± 39,37	5,45	105,15

### 5.1.3 Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Sitagliptin im Plasma

<b>Sitagliptin</b>		
<b>Nominalkonzentration [ng/mL]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	<b>MW ± SD [%]</b>	<b>MW ± SD [%]</b>
3	10,95 ± 0,68	9,34 ± 0,23
150	11,54 ± 1,01	10,51 ± 0,72
500	11,92 ± 0,65	10,65 ± 0,62
<b>Sitagliptin-d4 Phosphat</b>		
<b>Nominalkonzentration [ng/Spot]</b>	<b>Extraktionseffizienz</b>	<b>Wiederfindung</b>
	<b>MW ± SD [%]</b>	<b>MW ± SD [%]</b>
0,8	11,71 ± 0,33	10,83 ± 0,48

## 5.1.4 Wiederfindung und Extraktionseffizienz von Sitagliptin in den Blutzellen

Sitagliptin		
Nominalkonzentration [ng/mL]	Extraktionseffizienz	Wiederfindung
	MW ± SD [%]	MW ± SD [%]
3	4,65 ± 0,74	3,14 ± 0,44
150	5,23 ± 0,24	3,25 ± 0,37
500	3,73 ± 0,44	3,92 ± 0,62

Sitagliptin-d4 Phosphat		
Nominalkonzentration [ng/Spot]	Extraktionseffizienz	Wiederfindung
	MW ± SD [%]	MW ± SD [%]
0,8	6,68 ± 0,23	4,18 ± 0,10

## 5.1.5 Stabilität von Sitagliptin im Plasma

Nominalkonzentration [ng/mL]	Stabilität	berechnete Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 3 bzw. n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
3	3 h trocknen	3,38 ± 0,07	113,01	1,96
	24 h trocknen	3,37 ± 0,17	112,54	5,17
	24 h Autosampler	3,16 ± 0,18	105,48	5,54
50	3 h trocknen	49,49 ± 4,92	99,21	9,94
	24 h trocknen	52,37 ± 1,63	104,99	3,12
	24 h Autosampler	54,11 ± 0,85	108,47	1,56
500	3 h trocknen	546,90 ± 13,49	109,63	2,47
	24 h trocknen	540,95 ± 10,45	108,44	1,93
	24 h Autosampler	535,20 ± 14,86	107,29	2,78

## 5.1.6 Stabilität von Sitagliptin in den Blutzellen

Nominalkonzentration [ng/mL]	Stabilität	berechnete Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 3 bzw. n = 5)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
3	3 h trocknen	2,74 ± 0,14	91,55	5,29
	24 h trocknen	2,80 ± 0,14	93,69	4,89
	24 h Autosampler	3,04 ± 0,18	101,56	5,86
50	3 h trocknen	50,66 ± 4,85	101,55	9,57
	24 h trocknen	48,60 ± 3,48	97,41	7,15
	24 h Autosampler	48,21 ± 4,06	96,65	8,41
500	3 h trocknen	525,84 ± 28,12	105,41	5,35
	24 h trocknen	552,86 ± 11,52	110,83	2,08
	24 h Autosampler	506,13 ± 42,15	101,46	8,33

## 5.2 Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen

### 5.2.1 Konzentrationen der Proben zur Bestimmung der Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen

Nominalkonzentration Sitagliptin im Vollblut [ng/mL]	Gemessene Konzentration Sitagliptin [ng/mL]					
	15 min			60 min		
	Vollblut	Erythrozyten	Plasma	Vollblut	Erythrozyten	Plasma
10	11,63	3,10	10,64	11,11	2,55	10,89
	10,26	2,95	10,30	10,61	2,08	9,90
	10,37	2,62	10,56	10,66	2,20	9,53
250	227,28	84,25	186,82	200,43	27,23	215,19
	245,66	67,13	221,61	231,09	31,22	208,01
	243,60	78,56	235,88	210,91	37,75	208,00
400	368,91	87,98	404,11	422,63	56,93	341,37
	354,28	107,03	363,69	394,82	51,57	317,83
	393,86	113,27	359,93	400,78	72,19	333,01

### 5.2.2 Verteilung von Sitagliptin zwischen Plasma und Blutzellen

Nominalkonzentration Sitagliptin in Vollblut [ng/mL]	$c_p/c_{BZ}$	
	15 min	60 min
10	3,44	4,27
	3,49	4,76
	4,04	4,34
250	2,22	7,90
	3,30	6,66
	3,00	5,51
400	4,59	6,00
	3,40	6,16
	3,18	4,61
MW	3,41	5,58
MDM	0,43	0,98
	Mittelwert $c_p/c_{BZ}$	
10	3,66	4,45
250	2,84	6,69
400	3,72	5,59

MDM = mittlere Abweichung vom Mittelwert



## 5.3 Hämatokritabhängigkeit der Sitagliptinkonzentration im Blut

### 5.3.1 Anteil des im Plasma bzw. den Blutzellen vorhandenen Sitagliptins bezogen auf die Nominalkonzentration im Vollblut nach Inkubation für 60 min in Blut mit verschiedenem Hämatokrit

Nominalkonzentration im Vollblut [ng/mL]	Gemessene Konzentration im Plasma [ng/mL]					Anteil der Nominalkonzentration im Plasma [%]				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	6,20	6,32	6,25	5,57	4,06	62,18	63,35	62,67	55,85	40,67
	6,38	7,25	5,97	5,20	5,04	63,97	72,64	59,84	52,15	50,49
	6,77	5,82	5,87	5,59	4,36	67,87	58,34	58,83	55,99	43,67
250	160,67	156,71	146,24	144,48	130,12	64,42	62,83	58,63	57,92	52,17
	158,83	168,09	145,66	147,96	124,52	63,68	67,39	58,40	59,32	49,92
	155,09	155,50	142,74	155,00	136,19	62,18	62,34	57,23	62,14	54,60
400	269,97	232,69	248,34	241,02	218,24	67,65	58,31	62,23	60,39	54,69
	265,08	233,12	237,08	253,98	214,93	66,42	58,42	59,41	63,64	53,86
	300,36	238,33	245,73	264,90	221,25	75,26	59,72	61,57	66,38	55,44
					MW	65,96	62,59	59,87	59,31	50,61
					SD	3,85	4,56	1,77	4,14	4,90
					RSD	5,84	7,28	2,96	6,98	9,69

Nominalkonzentration im Vollblut [ng/mL]	Gemessene Konzentration in Blutzellen [ng/mL]					Anteil der Nominalkonzentration in den Blutzellen [%]				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	3,21	4,21	4,44	5,85	5,50	32,21	42,23	44,53	58,65	55,09
	3,41	4,35	4,28	5,45	6,47	34,14	43,61	42,89	54,65	64,81
	3,71	3,68	4,07	5,50	5,44	37,14	36,84	40,75	55,16	54,50
250	86,71	105,01	127,64	132,81	135,15	34,76	42,10	51,17	53,24	54,18
	85,10	103,54	130,52	137,65	133,77	34,12	41,51	52,33	55,19	53,63
	93,93	117,75	126,24	138,50	143,11	37,66	47,21	50,61	55,53	57,37
400	133,46	154,91	200,16	205,49	231,73	33,44	38,82	50,16	51,49	58,07
	138,00	170,27	189,69	218,45	225,69	34,58	42,67	47,53	54,74	56,55
	145,24	163,81	196,63	211,37	241,74	36,39	41,05	49,27	52,96	60,57
					MW	34,94	41,78	47,69	54,62	57,20
					SD	1,68	2,74	3,83	1,89	3,40
					RSD	4,82	6,57	8,03	3,46	5,95

### 5.3.2 Vergleich der Sitagliptinkonzentration im Vollblut gegenüber der im Plasma und den Blutzellen nach einer Inkubation für 60 min in Blut mit verschiedenem Hämatokrit und verschiedenen Konzentrationen

Hct	Nominalkonzentration Sitagliptin [ng/mL]	Gemessene Konzentration an Sitagliptin [ng/mL]					
		Vollblut			Plasma + Blutzellen		
		1	2	3	1	2	3
0,3	10	9,68	10,29	11,15	9,42	9,79	10,48
	250	243,53	246,13	241,87	247,38	243,93	249,03
	400	406,14	394,63	415,10	403,43	403,08	445,60
0,4	10	10,20	11,67	9,71	10,53	11,60	9,50
	250	259,94	253,60	255,74	261,72	271,64	273,25
	400	413,94	416,28	409,13	387,60	403,39	402,14
0,5	10	10,28	11,04	9,09	10,70	10,25	9,94
	250	274,24	250,26	264,56	273,88	276,18	268,99
	400	412,15	419,15	415,65	448,50	426,77	442,36
0,6	10	11,12	9,84	10,66	11,42	10,66	11,09
	250	254,73	282,07	272,70	277,28	285,61	293,50
	400	453,94	446,93	440,82	446,51	472,43	476,27
0,7	10	9,93	10,72	9,51	9,55	11,50	9,79
	250	256,75	254,19	250,67	265,26	258,28	279,29
	400	454,76	447,43	429,92	449,97	440,62	462,99

### 5.3.3 Einzelwerte für die Verteilungskoeffizienten $c_P/c_{BZ}$ des Sitagliptins in Blut mit verschiedenem Hämatokrit nach 60 minütiger Inkubation

Nominalkonzentration [ng/mL]	$c_P/c_{BZ}$				
	Hct 0,3	Hct 0,4	Hct 0,5	Hct 0,6	Hct 0,7
10	1,93	1,50	1,41	0,95	0,74
	1,87	1,67	1,40	0,95	0,78
	1,83	1,58	1,44	1,01	0,80
250	1,85	1,49	1,15	1,09	0,96
	1,87	1,62	1,12	1,07	0,93
	1,65	1,32	1,13	1,12	0,95
400	2,02	1,50	1,24	1,17	0,94
	1,92	1,37	1,25	1,16	0,95
	2,07	1,45	1,25	1,25	0,92
MW	1,89	1,50	1,26	1,09	0,89
SD	0,11	0,11	0,12	0,10	0,08
RSD	5,98 %	7,06 %	9,31 %	8,82 %	9,30 %

## 5.4 Inter-Individuelle Unterschiede der Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und Blutzellen

### 5.4.1 Sitagliptinkonzentration (Nominalkonzentration: 250 ng/mL) im Vollblut verschiedener Einzelspender mit unterschiedlichem Hämatokrit nach 60 minütiger Inkubation

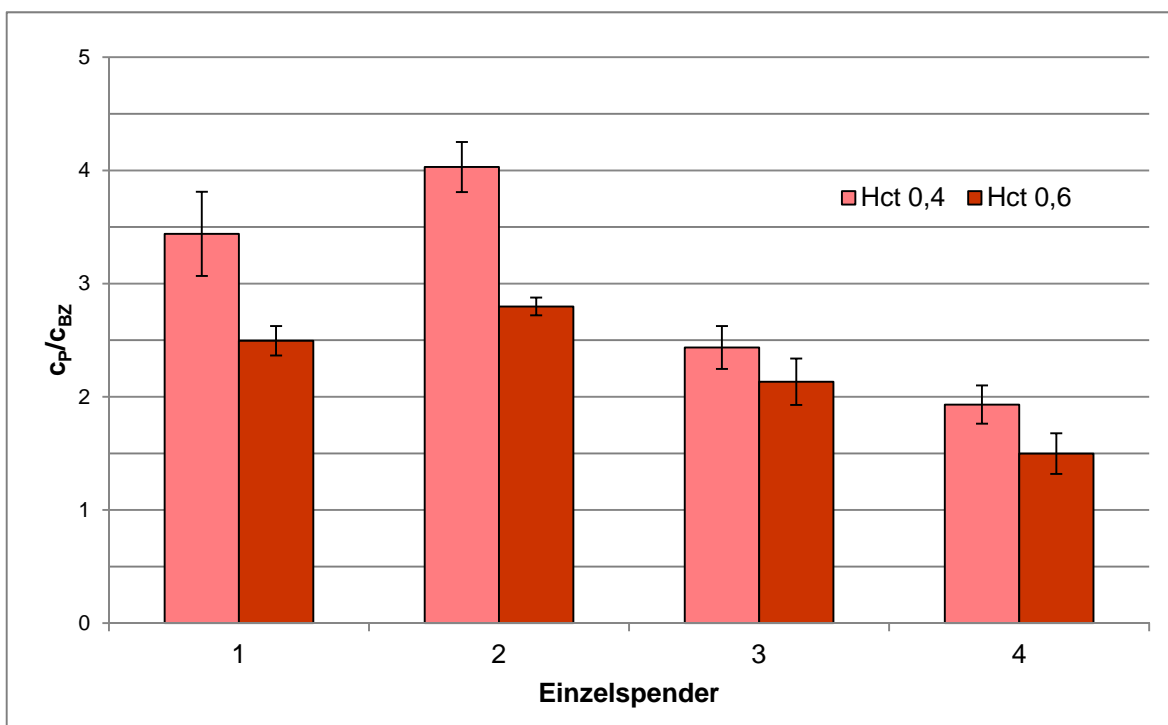
Einzelspender	Hct	c(Sitagliptin) [ng/mL]	Richtigkeit [%]
1	0,4	279,98	112,25
		278,23	111,55
		260,78	104,55
	0,6	274,64	110,11
		279,26	111,96
		250,56	100,45
2	0,4	276,90	111,02
		284,86	114,21
		268,49	107,64
	0,6	273,17	109,52
		273,49	109,65
		273,54	109,67
3	0,4	269,39	108,01
		272,64	109,31
		251,49	100,83
	0,6	267,87	107,39
		265,82	106,57
		263,22	105,53
4	0,4	260,99	104,64
		258,04	103,46
		258,09	103,48
	0,6	259,18	103,91
		260,79	104,56
		274,59	110,09

#### 5.4.2 Vergleich der Sitagliptinkonzentration im Vollblut gegenüber der im Plasma und den Blutzellen sowie Darstellung der Verteilungskoeffizienten $c_P/c_{BZ}$ nach einer Inkubation für 60 min in Blut verschiedener Einzelspender bei verschiedenem Hämatokrit

Einzelspender	Hct	Gemessene Konzentration an Sitagliptin [ng/mL]		Übereinstimmung [%]	$c_P/c_{BZ}$
		Vollblut	Plasma + Blutzellen		
1	0,4	279,98	279,47	99,82	3,71
		278,23	285,94	102,77	3,69
		260,78	286,54	109,88	2,91
	0,6	274,64	267,38	97,36	2,34
		279,26	260,24	93,19	2,66
		250,56	256,73	102,47	2,49
2	0,4	276,90	250,62	90,51	4,28
		284,86	262,19	92,04	3,74
		268,49	254,85	94,92	4,06
	0,6	273,17	292,84	107,20	2,70
		273,49	281,79	103,03	2,89
		273,54	294,25	107,57	2,80
3	0,4	269,39	299,26	111,09	2,69
		272,64	284,84	104,47	2,38
		251,49	281,37	111,88	2,24
	0,6	267,87	261,35	97,57	2,32
		265,82	264,42	99,47	2,23
		263,22	265,93	101,03	1,85
4	0,4	260,99	289,59	110,96	2,17
		258,04	265,52	102,90	1,83
		258,09	277,98	107,71	1,80
	0,6	259,18	238,03	91,84	1,37
		260,79	269,66	103,40	1,75
		274,59	244,91	89,19	1,37

### 5.4.3 Inter-Individuelle Unterschiede des Verteilungskoeffizienten $c_p/c_{BZ}$ bei verschiedenen Hämatokritwerten

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ) der Verteilungskoeffizienten für die jeweiligen Einzelspender 1-4 für einen Hämatokrit von 0,4 und 0,6.





# *E* **Zusammenfassung**





# 1 Zusammenfassung

Die oralen Antidiabetika Metformin und Sitagliptin werden überwiegend renal eliminiert, weshalb während der Therapie regelmäßig die Nierenfunktion abgeschätzt werden sollte. Dies geschieht mithilfe von Serumkreatinin-basierten Formeln, zum Beispiel der Gleichung nach Cockcroft-Gault.

Mit dem Ziel, zukünftig eine Möglichkeit für eine vereinfachte Kontrolle der Therapie mit Metformin und/oder Sitagliptin in Kapillarblutproben zu haben, wurde eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Kreatinin, Metformin und Sitagliptin aus Trockenblutproben (Dried Blood Spots, DBS) entwickelt. Als Träger zeigte Blotting Papier die besten Ergebnisse in Bezug auf die Handhabung und die Extraktionseffizienz. Aus einem einzelnen DBS gelang es, Metformin und Kreatinin mittels HPLC-UV und Sitagliptin mittels LC-MS/MS zu quantifizieren. Die flüssigchromatographischen Methoden wurden entsprechend der EMA- und FDA-Kriterien erfolgreich validiert. Die unteren Nachweisgrenzen (LLOQ) lagen bei 0,2 µg/mL für Metformin, 1,5 µg/mL für Kreatinin und 3 ng/mL für Sitagliptin.

Da Referenzbereiche für Arzneistoffkonzentrationen in der Regel für Serum/Plasma angegeben werden, wurde das Verteilungsverhalten der beiden Antidiabetika zwischen Plasma ( $c_P$ ) und Blutzellen ( $c_{BZ}$ ) mittels *in-vitro* Inkubationsversuchen ermittelt. Für Metformin betrug der Verteilungskoeffizient  $c_P/c_{BZ}$   $4,65 \pm 0,73$ , für Sitagliptin  $5,58 \pm 0,98$ . Damit lagen beide Arzneistoffe mehr als 4-fach höher im Plasma als in den Blutzellen vor. Erythrozyten waren zuvor schon als tiefes Kompartiment für Metformin beschrieben worden, für Sitagliptin waren diese die ersten Daten die zeigten, dass der Arzneistoff ebenfalls eine relevante Verteilung in die Blutzellen zeigt.

In Kooperation mit einer diabetologischen Schwerpunktpraxis wurde eine erste klinische Studie (Basisstudie) durchgeführt, die zum Ziel hatte, aus den DBS die Nierenfunktion abzuschätzen. In DBS von 70 Patienten wurden Metformin, und/oder Sitagliptin sowie Kreatinin quantifiziert. Mit Hilfe der von der Praxis übermittelten Serumkreatinin-konzentration konnte durch den Vergleich mit der Konzentration im Kapillarblut erstmalig ein Korrelationsfaktor bestimmt und verifiziert werden, um die Kapillarblut- in die Serumkonzentration des Kreatinins umzurechnen ( $F = c_{\text{Kapillarblut}}/c_{\text{Plasma}} = 0,916 \pm 0,088$ ). So war es möglich, die Nierenfunktion über die Formel nach Cockcroft und Gault abzuschätzen.

In der Basisstudie fiel auf, dass die Konzentration des Sitagliptins im Blut der Patienten signifikant mit steigendem Hämatokrit korrelierte (Pearson  $R = 0,396$ ;  $p < 0,05$ ). Die

nähere Untersuchung dieser Beobachtung mittels *in-vitro* Verteilungsversuchen zeigte eine sehr stark inter-individuell schwankende Verteilung des Sitagliptins zwischen Plasma und den Blutzellen und eine vom Hämatokrit (Hct) linear abhängige Verteilung. In Blut mit einem höheren Hct fand sich mehr Arzneistoff in den Blutzellen als in Blut mit niedrigerem Hct, was die höheren Gesamtkonzentrationen an Sitagliptin im DBS erklärte. Dialyseversuche *in-vitro* bestätigten, dass die Eliminationszeit mit steigendem Hämatokrit des Blutes anstieg. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Blutzellen ein tiefes Kompartiment für Sitagliptin darstellen.

Eine zweite klinische Studie (Feldstudie) wurde in Kooperation mit 14 öffentlichen Apotheken mit dem Ziel, repräsentative Konzentrationen für die Kapillarblutspiegel der beiden Medikamente unter Alltagsbedingungen zu ermitteln, durchgeführt. In DBS von 84 Patienten wurden wiederum Metformin, Sitagliptin und Kreatinin quantifiziert. Aus den Daten der beiden Studienpopulationen ( $n = 134$ ) wurde für Metformin eine mittlere Konzentration von  $2,22 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$  und für Sitagliptin von  $432,20 \pm 268,79 \text{ ng/mL}$  bestimmt. Mittels populationspharmakokinetischer Methoden konnten für beide Arzneistoffe zum ersten Mal Eliminationshalbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) aus Kapillarblut für Patienten mit einer Kreatininclearance größer und kleiner als  $60 \text{ mL/min}$  bestimmt werden. Erwartungsgemäß waren die  $t_{1/2}$  bei besserer Nierenfunktion kürzer, sowohl für Metformin (11,9 h versus 18,5 h) als auch für Sitagliptin (8,4 h versus 13,0 h). Für Sitagliptin waren dies erstmalige klinische Belege für eine ansteigende Eliminationszeit mit sinkender Nierenfunktion.

Die gewonnenen Daten boten zudem Gelegenheit, den literaturbekannten ungünstigen Effekt einer kombinierten Einnahme von Diuretika, NSAIDs, ACE-Inhibitoren und/oder Angiotensinrezeptorantagonisten („target drugs“) auf die Nierenfunktion („triple whammy“) zu betrachten. Tatsächlich korrelierten die Anzahl der eingenommenen „target drugs“ und auch die Dosis der Diuretika mit einer sinkenden Kreatininclearance der Patienten.

Mit vorliegender Arbeit wurden zum einen neue Erkenntnisse über die Pharmakokinetik des Sitagliptins gewonnen, zum anderen wurde die Grundlage geschaffen, um aus einem DBS die Blutspiegel von Metformin und Sitagliptin im Zusammenhang mit der Nierenfunktion zu betrachten. In Zukunft könnte diese Methode für ein Therapeutisches Drug Monitoring der beiden Arzneistoffe eingesetzt werden um dieses für Patienten aufgrund der minimalinvasiven Blutabnahme wesentlich angenehmer zu gestalten.

## 2 Summary

Patients' kidney function should frequently be monitored under therapy with the oral antidiabetics metformin and sitagliptin due to their renal elimination. The creatinine clearance or the glomerular filtration rate can be estimated using serum creatinine-based equations such as the Cockcroft-Gault equation.

Aiming at simplifying drug monitoring a method was developed to quantify creatinine, metformin and sitagliptin in dried blood spots (DBS). For sample collection blotting paper showed the best results regarding handling and extraction efficiency. A single DBS was used to quantify creatinine and metformin with HPLC-UV and sitagliptin with LC-MS/MS. Both chromatographic methods were subjected to a full validation following the current FDA and EMA guidelines. The lower limits of quantification (LLOQ) were 0.2 µg/mL for metformin, 1.5 µg/mL for creatinine and 3 ng/mL for sitagliptin.

Since reference intervals for drug concentrations are typically reported for plasma/serum, *in-vitro* experiments were performed to investigate the distribution of the drugs between plasma ( $C_P$ ) and blood cells ( $C_{BC}$ ). For metformin the mean ratio of plasma to blood cell concentration  $C_P/C_{BC}$  was  $4.65 \pm 0.73$ , for sitagliptin  $5.58 \pm 0.98$ . Thus, both drugs were present at more than four times higher concentrations in plasma compared to blood cells. The erythrocytes had been identified as deep compartment of metformin before, but for sitagliptin these were the first data showing a drug distributing into blood cells.

In collaboration with a physician specialized in diabetology a first clinical study (basic study) was performed to estimate the kidney function using DBS. In blood spots of 70 patients metformin, creatinine and sitagliptin were quantified. For the first time a correlation factor ( $F = C_{\text{capillary blood}}/C_{\text{plasma}} = 0.916 \pm 0.088$ ) was determined and verified to translate capillary blood concentrations of creatinine into plasma concentrations. Thereby, the Cockcroft-Gault equation could be used to estimate the kidney function.

In capillary blood samples of patients participating in the basic study the concentration of sitagliptin statistically significantly correlated with increasing hematocrit values (Pearson  $R = 0.396$ ;  $p < 0,05$ ). *In-vitro* experiments revealed a strong inter-individual variability of sitagliptin distribution between blood cells and plasma and also a distribution depending on the hematocrit (hct). With a higher hematocrit a bigger amount of the drug resided within the cells compared to blood with a lower hematocrit. In *in-vitro* dialysis experiments an increasing elimination time from venous blood was demonstrated with rising hct. Based on these results blood cells were identified as deep compartment for sitagliptin.

A second clinical study (field study) was performed in cooperation with 14 community pharmacies to determine representative capillary blood concentrations under real-life conditions. In DBS of 84 patients metformin and/or sitagliptin and creatinine were quantified. In the cohort of both studies ( $n = 134$ ) mean concentrations of  $2.22 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$  for metformin and  $432.20 \pm 268.79 \text{ ng/mL}$  for sitagliptin were detected. Population pharmacokinetic methods were applied to calculate elimination half-lives ( $t_{1/2}$ ) from capillary blood for patients with creatinine clearances higher and lower than  $60 \text{ mL/min}$ . As expected,  $t_{1/2}$  were shorter in patients with a better renal function, both for metformin (11.9 h vs. 18.5 h) and for sitagliptin (8.4 h vs. 13.0 h). For the first time an increasing elimination time with decreasing renal function was demonstrated for sitagliptin.

The collected data provided the opportunity to examine the influence of drugs with known unfavorable impact on kidney function. The effect of the combined therapy with diuretics, NSAIDs, ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists (“target drugs”) on the renal function has been termed “triple whammy”. Indeed, in the present study both the number of the target drugs as well as the dose of the diuretics correlated with a decreasing creatinine clearance.

With the herein presented work new insights into the pharmacokinetics of sitagliptin were gained. Additionally, a basis was created to use a single dried-blood-spot for appraisal of the blood levels of metformin and sitagliptin in relation to the kidney function. This method might facilitate an easier and more pleasant future therapeutic drug monitoring of the compounds due to minimal invasive blood collection.

# *F* **Abkürzungsverzeichnis**



---

ACN	Acetonitril
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzellen
CAV	Cell accelerator voltage
CE	Collision energy, Kollisionsenergie
CG Gleichung	Cockcroft-Gault Gleichung
CID	Collision induced dissociation
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
CrCl	Kreatininclearance
DBS	Dried Blood Spot, Trockenblutspot
DC	Dünnschichtchromatographie
DDD	Defined daily dose
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV
dSPE	Dispersive solid phase extraction
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Extraktionseffizienz
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMV	Electron multiplier voltage
ESI	Elektrospray Ionisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FV	Fragmentor voltage
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIP	Glucose-dependent-insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like-Peptide 1
Hct	Hämatokrit
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
IKG	Ideales Körpergewicht
IS	Interner Standard

KHK	Koronare Herzkrankheit
LC	Liquid chromatography
LLOQ	Lower limit of quantification
MDM	Mean deviation of the mean; mittlere Abweichung vom Mittelwert
ME	Matrixeffekte
MeOH	Methanol
MF	Matrixfaktor
MFIS	Auf den internen Standard normalisierter Matrixfaktor
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS/MS	Tripelquadrupol Massenspektrometer
MW	Mittelwert
NKD	<i>National Kidney Foundation</i>
NP	Normalphase
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika
OAD	Orale Antidiabetika
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PBS	Phosphate-buffered saline
pEs	Post-Extraction-spiked
PTFE	Polytetrafluorethylen
QC-Probe	Qualitätskontrollprobe
QQQ	siehe MS/MS
RE	Recovery, Wiederfindung
RP	Reversed phase, Umkehrphase
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TM	Thermomixer
ULOQ	Upper limit of quantification



US	Ultraschallbad
VB	Vollblut
WHO	<i>World Health Organisation</i>



**G**

**Literaturverzeichnis**



1. *Diabetes mellitus in Deutschland*. GBE kompakt. Vol. 3, 2. Jahrgang. (2011) [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Kompakt/Kompakt\\_2011/kompakt\\_2011\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Kompakt/Kompakt_2011/kompakt_2011_node.html) [accessed: 23.01.2017] Robert Koch-Institut Berlin
2. Karow T. and Lang-Roth R., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Fifteenth ed. (2007) Eigenverlag Karow
3. *Global report on diabetes*. (2016) [www.who.int](http://www.who.int) [accessed: 07.12.2016] World Health Organisation (WHO)
4. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., and Schäfer-Korting M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Ninth ed. (2008) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
5. *Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes*. (2013) [http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2\\_Therapie](http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2_Therapie); [accessed: 06.04.2016]
6. Palitzsch K. D., *Oral treatment of type 2 diabetes mellitus*. Dtsch Med Wochenschr, (2012) 137, 1859-1872
7. Hien P., Böhm B., Claudi-Böhm S., Krämer C., and Kohlhas K., *Diabetes-Handbuch*. Seventh ed. (2013) Springer-Verlag
8. Tuch B. E., *Clinical use of GLP-1 agonists and DPP4 inhibitors*. Pancreatology, (2016) 16, 8-9
9. Singh S., Usman K., and Banerjee M., *Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus*. World J Diabetes, (2016) 7, 302-315
10. *IDF Diabetes Atlas*. Seventh ed. (2015) International Diabetes Federation
11. Martin E. and Liebl A., *Diabetes mellitus Typ 2*. Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer Vol. 71. (2005) Govi Verlag
12. Högger P. and Strehl E., *Repetitorium Klinische Pharmazie*. First ed. (2007) Govi Verlag
13. Buse J. B., DeFronzo R. A., Rosenstock J., Kim T., Burns C., Skare S., Baron A., and Fineman M., *The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the circulation: Results from short-term pharmacokinetic and 12-week dose-ranging studies*. Diabetes Care, (2016) 39, 198-205
14. Schwabe U. and Paffrath D., *Arzneiverordnungsreport 2009*. (2009) Springer Verlag

15. Vlotides G. and Mertens P. R., *Sodium-glucose cotransport inhibitors: mechanisms, metabolic effects and implications for the treatment of diabetic patients with chronic kidney disease*. *Nephrol Dial Transplant*, (2015) 30, 1272-1276
16. Schwabe U. and Paffrath D., *Arzneiverordnungsreport 2015*. (2015) Springer Verlag
17. *Auswahl von Antidiabetika bei Typ-2-Diabetes mit Niereninsuffizienz*. *arzneitelegramm*, (2015) 46, 42-47
18. Guthrie R. and Susi A., *A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants*. *Pediatrics*, (1963) 32, 338-343
19. Wagner M., Tonoli D., Varesio E., and Hopfgartner G., *The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots*. *Mass Spectrom Rev*, (2016) 35, 361-438
20. Keevil B. G., *The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Clin Biochem*, (2011) 44, 110-118
21. Edelbroek P. M., van der Heijden J., and Stolk L. M. L., *Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: Methods, assays, and pitfalls*. *Ther Drug Monit*, (2009) 31, 327-336
22. Li W. K. and Tse F. L. S., *Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules*. *Biomed Chromatogr*, (2010) 24, 49-65
23. Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., and Hirtz C., *Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry*. *Clin Chem Lab Med*, (2013) 51, 1897-1909
24. Parker S. P. and Cubitt W. D., *The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies*. *J Clin Pathol*, (1999) 52, 633-639
25. Xu Y., Woolf E. J., Agrawal N.Gb., Kothare P., Pucci V., and Bateman K. P., *Merck's perspective on the implementation of dried blood spot technology in clinical drug development - why, when and how*. *Bioanalysis*, (2013) 5, 341-350
26. Demirev P. A., *Dried blood spots: Analysis and applications*. *Anal Chem*, (2013) 85, 779-789
27. Shi Y. F. and Jiang H. L., *Assay dynamic range for DBS: Battles on two fronts*. *Bioanalysis*, (2011) 3, 2259-2262

28. Mei J. V., Alexander J. R., Adam B. W., and Hannon W. H., *Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens*. J Nutr, (2001) 131, 1631S-1636S
29. Spooner N., *A glowing future for dried blood spot sampling*. Bioanalysis, (2010) 2, 1343-1344
30. McDade T. W., Williams S., and Snodgrass J. J., *What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research*. Demography, (2007) 44, 899-925
31. Williams S. R. and McDade T. W., *The use of dried blood spot sampling in the national social life, health, and aging project*. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci, (2009) 64 Suppl 1, i131-136
32. Wilhelm A. J., den Burger J. C., and Swart E. L., *Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions*. Clin Pharmacokinet, (2014) 53, 961-973
33. Enderle Y., Foerster K., and Burhenne J., *Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications*. J Pharm Biomed Anal, (2016) 130, 231-243
34. van den Ouweland J. M. and Kema I. P., *The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2012) 883-884, 18-32
35. *Agilent 6400 series LC/MS QQQ techniques and operations*. (2013) Agilent Technologies
36. Sharma A., Jaiswal S., Shukla M., and Lal J., *Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis*. Drug Test Anal, (2014) 6, 399-414
37. Timmerman P., White S., Cobb Z., de Vries R., Thomas E., and van Baar B., *Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium*. Bioanalysis, (2013) 5, 2129-2136
38. *FTA DMPK card selection guide*. GE Healthcare UK Limited
39. Eibak L. E., Hegge A. B., Rasmussen K. E., Pedersen-Bjergaard S., and Gjelstad A., *Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis*. Anal Chem, (2012) 84, 8783-8789
40. Mengerink Y., Mommers J., Qiu J., Mengerink J., Steijger O., and Honing M., *A new DBS card with spot sizes independent of the hematocrit value of blood*. Bioanalysis, (2015) 7, 2095-2104

41. Arora R., Hudson W., and Boguszewski P. *Improved sensitivity of basic drugs in dried blood spotting through optimised desorption*. Application Note, Pub. Number: 5590-9929EN, 1-8
42. Rosting C., Sae C. O., Gjelstad A., and Halvorsen T. G., *Evaluation of water-soluble DBS for small proteins: a conceptual study using insulin as a model analyte*. *Bioanalysis*, (2016) 8, 1051-1065
43. Milosheska D., Grabnar I., and Vovk T., *Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment*. *Eur J Pharm Sci*, (2015) 75, 25-39
44. Timmerman P., White S., Globig S., Ludtke S., Brunet L., and Smeraglia J., *EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots*. *Bioanalysis*, (2011) 3, 1567-1575
45. De Kesel P. M. M., Capiou S., Lambert W. E., and Stove C. P., *Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis*. *Bioanalysis*, (2014) 6, 1871-1874
46. den Burger J. C. G., Wilhelm A. J., Chahbouni A. C., Vos R. M., Sinjewel A., and Swart E. L., *Haematocrit corrected analysis of creatinine in dried blood spots through potassium measurement*. *Anal Bioanal Chem*, (2015) 407, 621-627
47. Blessborn D., Skold K., Zeeberg D., Kaewkhao K., Skold O., and Ahnoff M., *Heat stabilization of blood spot samples for determination of metabolically unstable drug compounds*. *Bioanalysis*, (2013) 5, 31-39
48. Youhnovski N., Bergeron A., Furtado M., and Garofolo F., *Pre-cut dried blood spot (PCDBS): An alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, (2011) 25, 2951-2958
49. Li F. M., Ploch S., Fast D., and Michael S., *Perforated dried blood spot accurate microsampling: the concept and its applications in toxicokinetic sample collection*. *J Mass Spectrom*, (2012) 47, 655-667
50. Denniff P. and Spooner N., *Volumetric absorptive microsampling: A dried sample collection technique for quantitative bioanalysis*. *Anal Chem*, (2014) 86, 8489-8495
51. <http://www.trajanscimed.com/pages/hemapen> [accessed 23.11. 2016]
52. Mommers J., Mengerink Y., Ritzen E., Weusten J., van der Heijden J., and van der Wal S., *Quantitative analysis of morphine in dried blood spots by using morphine-d3 pre-impregnated dried blood spot cards*. *Anal Chim Acta*, (2013) 774, 26-32



53. *Guideline on bioanalytical method validation.* (2011) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) [accessed: 23.01.2017] European medicines agency
54. *Guidance for industry - Bioanalytical method validation.* (2001) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> [accessed: 23.01.2017] Food and Drug Administration
55. Li F. M. and Ploch S., *Will 'green' aspects of dried blood spot sampling accelerate its implementation and acceptance in the pharmaceutical industry?* *Bioanalysis*, (2012) 4, 1259-1261
56. Karageorgou E. and Samanidou V., *Youden test application in robustness assays during method validation.* *J Chromatogr A*, (2014) 1353, 131-139
57. van Amsterdam P., Companjen A., Brudny-Kloepfel M., Golob M., Luedtke S., and Timmerman P., *The European Bioanalysis Forum community's evaluation, interpretation and implementation of the European Medicines Agency guideline on Bioanalytical Method Validation.* *Bioanalysis*, (2013) 5, 645-659
58. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., and Chavez-Eng C. M., *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.* *Anal Chem*, (2003) 75, 3019-3030
59. Hall T. G., Smukste I., Bresciano K. R., Wang Y., McKearn D., and Savage R. E., *Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development*, in *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, J. Prasain, Editor (2012) <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles/identifying-and-overcoming-matrix-effects-in-drug-discovery-and-development> [accessed: 06.10.2016] InTech
60. Fang N. B., Yu S. G., Ronis M. J. J., and Badger T. M., *Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples.* *Exp Biol Med*, (2015) 240, 488-497
61. Hiemke C., Baumann P., and Stingl J., *Pharmakokinetik, Pharmakogenetik und therapeutisches Drug Monitoring*, in *Handbuch der psychiatrischen Pharmakotherapie* (2012) Springer-Verlag
62. Kirby B. J., Kalhorn T., Hebert M., Easterling T., and Unadkat J. D., *Sensitive and specific LC-MS assay for quantification of digoxin in human plasma and urine.* *Biomed Chromatogr*, (2008) 22, 712-718

63. Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Zorova L. D., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Zorov S. D., Babenko V. A., Skulachev M. V., et al., *Lithium salts - Simple but magic*. Biochem-Moscow, (2014) 79, 740-749
64. Tolou-Ghamari Z., Zare M., Habibabadi J. M., and Najafi M. R., *A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012*. J Res Med Sci, (2013) 18, S81-S85
65. Ekbal N. J., Holt D. W., and Macphee I. A. M., *Pharmacogenetics of immunosuppressive drugs: prospect of individual therapy for transplant patients*. Pharmacogenomics, (2008) 9, 585-596
66. Scherf-Clavel M. and Högger P., *Analysis of metformin, sitagliptin and creatinine in human dried blood spots*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2015) 997, 218-228
67. Boss G. R. and Seegmiller J. E., *Age-related physiological changes and their clinical significance*. West J Med, (1981) 135, 434-440
68. Lobo K. K. and Shenfield G. M., *Drug combinations and impaired renal function - the 'triple whammy'*. Br J Clin Pharmacol, (2005) 59, 239-243
69. Pazhayattil G. S. and Shirali A. C., *Drug-induced impairment of renal function*. Int J Nephrol Renovasc Dis, (2014) 7, 457-468
70. Falconnier A. D., Haefeli W. E., Schoenenberger R. A., Surber C., and Martin-Facklam M., *Drug dosage in patients with renal failure optimized by immediate concurrent feedback*. J Gen Intern Med, (2001) 16, 369-375
71. Högger P., Strehl E., and Krämer I., *Repetitorium Klinische Pharmazie*. Third ed. (2015) Govi Verlag
72. Haefeli W. E., *Dosing*, [www.dosing.de](http://www.dosing.de) [accessed 31.05. 2016]
73. Hjelmestaeth J., Roislien J., Nordstrand N., Hofso D., Hager H., and Hartmann A., *Low serum creatinine is associated with type 2 diabetes in morbidly obese women and men: a cross-sectional study*. BMC Endocr Disord, (2010) 10, 1-6
74. Wyss M. and Kaddurah-Daouk R., *Creatine and creatinine metabolism*. Physiol Rev, (2000) 80, 1107-1213
75. Mohabbati-Kalejahi E., Azimirad V., Bahrami M., and Ganbari A., *A review on creatinine measurement techniques*. Talanta, (2012) 97, 1-8

76. Smith R. N., Agharkar A. S., and Gonzales E. B., *A review of creatine supplementation in age-related diseases: more than a supplement for athletes.* F1000Res, (2014) 3, 222-233
77. Harita N., Hayashi T., Sato K. K., Nakamura Y., Yoneda T., Endo G., and Kambe H., *Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study.* Diabetes Care, (2009) 32, 424-426
78. Thomas L., *Labor und Diagnose.* Fifth ed. (1998) TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main
79. Löffler G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Seventh ed. (2008) Springer Medizin Verlag
80. Steffl J. L., Bennett W., and Olyaei A. J., *The old and new methods of assessing kidney function.* J Clin Pharmacol, (2012) 52, 63S-71S
81. Hou H., Xiong W., Zhang X., Song D., Tang G., and Hu Q., *LC-MS-MS measurements of urinary creatinine and the application of creatinine normalization technique on cotinine in smokers' 24 hour urine.* J Anal Methods Chem, (2012) 2012, 1-8
82. Park E. K., Watanabe T., Gee S. J., Schenker M. B., and Hammock B. D., *Creatinine measurements in 24 h urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Agric Food Chem, (2008) 56, 333-336
83. Narayanan S. and Appleton H. D., *Creatinine: A review.* Clin Chem, (1980) 26, 1119-1126
84. Selistre L., De Souza V., Cochat P., Antonello I. C., Hadj-Aissa A., Ranchin B., Dolomanova O., Varennes A., et al., *GFR estimation in adolescents and young adults.* J Am Soc Nephrol, (2012) 23, 989-996
85. Becker J. and Friedman E., *Renal function status.* AJR Am J Roentgenol, (2013) 200, 827-829
86. Lamb E. J., Tomson C. R., and Roderick P. J., *Estimating kidney function in adults using formulae.* Ann Clin Biochem, (2005) 42, 321-345
87. Toto R. D., *Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance.* Curr Opin Nephrol Hypertens, (1995) 4, 505-509; discussion 503-504
88. Momaya A., Fawal M., and Estes R., *Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature.* Sports Med, (2015) 45, 517-531

89. Liu W. S., Chung Y. T., Yang C. Y., Lin C. C., Tsai K. H., Yang W. C., Chen T. W., Lai Y. T., et al., *Serum creatinine determined by Jaffe, enzymatic method, and isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry in patients under hemodialysis*. J Clin Lab Anal, (2012) 26, 206-214
90. Kwon W., Kim J. Y., Suh S., and In M. K., *Simultaneous determination of creatinine and uric acid in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with polarity switching electrospray ionization*. Forensic Sci Int, (2012) 221, 57-64
91. Okuda T., Oie T., and Nishida M., *Liquid-chromatographic measurement of creatinine in serum and urine*. Clin Chem, (1983) 29, 851-853
92. Koop D. R., Bleye L. A., Munar M., Cherala G., and Al-Uzri A., *Analysis of tacrolimus and creatinine from a single dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2013) 926, 54-61
93. Koster R. A., Greijdanus B., Alffenaar J. W. C., and Touw D. J., *Dried blood spot analysis of creatinine with LC-MS/MS in addition to immunosuppressants analysis*. Anal Bioanal Chem, (2015) 407, 1585-1594
94. Zhao J., *Simultaneous determination of plasma creatinine, uric acid, kynurenine and tryptophan by high-performance liquid chromatography: method validation and in application to the assessment of renal function*. Biomed Chromatogr, (2015) 29, 410-415
95. Chellouai Z., Zatout S., Benhabib M., Abed A., Moussaoui R., and Messaoudi A., *Creatinine determination in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode-array detection (HPLC-DAD)*. Clin Biochem, (2014) 47, 768-769
96. Cockcroft D. W. and Gault M. H., *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron, (1976) 16, 31-41
97. Helou R., *Should we continue to use the Cockcroft-Gault formula?* Nephron Clin Pract, (2010) 116, c172-185; discussion c186
98. Drenth-van Maanen A. C., Jansen P. A., Proost J. H., Egberts T. C., van Zuilen A. D., van der Stap D., and van Marum R. J., *Renal function assessment in older adults*. Br J Clin Pharmacol, (2013) 76, 616-623
99. *Fachinformation Metformin-ratiopharm<sup>R</sup> 500mg/850mg Filmtabletten*. (2012) Ratiopharm GmbH

100. Mehnert H., *Metformin in diabetes therapy*. Internist, (1998) 39, 222-228
101. Bannister C. A., Holden S. E., Jenkins-Jones S., Morgan C. L., Halcox J. P., Schernthaner G., Mukherjee J., and Currie C. J., *Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls*. Diabetes Obes Metab, (2014) 16, 1165-1173
102. Graham G. G., Punt J., Arora M., Day R. O., Doogue M. P., Duong J. K., Furlong T. J., Greenfield J. R., et al., *Clinical pharmacokinetics of metformin*. Clin Pharmacokinet, (2011) 50, 81-98
103. Bardin C., Nobecourt E., Larger E., Chast F., Treluyer J. M., and Urien S., *Population pharmacokinetics of metformin in obese and non-obese patients with type 2 diabetes mellitus*. Eur J Clin Pharmacol, (2012) 68, 961-968
104. DeFronzo R., Fleming G. A., Chen K., and Bicsak T. A., *Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk*. Metabolism, (2016) 65, 20-29
105. Sambol N. C., Chiang J., Lin E. T., Goodman A. M., Liu C. Y., Benet L. Z., and Cogan M. G., *Kidney function and age are both predictors of pharmacokinetics of metformin*. J Clin Pharmacol, (1995) 35, 1094-1102
106. Robert F., Fendri S., Hary L., Lacroix C., Andrejak M., and Lalau J. D., *Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects*. Diabetes Metab, (2003) 29, 279-283
107. *Fachinformation Glucophage<sup>R</sup> 500 mg/850 mg/1000 mg*. (2015) Merck Serono GmbH
108. *EMA: Metformin (Glucophage u.a.) jetzt auch bei mässiger Niereninsuffizienz*. arznei-telegramm, (2016) 47, 95-96
109. Lalau J. D. and Lacroix C., *Measurement of metformin concentration in erythrocytes: clinical implications*. Diabetes Obes Metab, (2003) 5, 93-98
110. Scheen A. J., *Clinical pharmacokinetics of metformin*. Clin Pharmacokinet, (1996) 30, 359-371
111. Lalau J. D., Lemaire-Hurtel A. S., and Lacroix C., *Establishment of a database of metformin plasma concentrations and erythrocyte levels in normal and emergency situations*. Clin Drug Invest, (2011) 31, 435-438
112. Holstein A. and Stumvoll M., *Contraindications can damage your health--is metformin a case in point?* Diabetologia, (2005) 48, 2454-2459

113. Lalau J. D. and Race J. M., *Metformin and lactic acidosis in diabetic humans*. Diabetes Obes Metab, (2000) 2, 131-137
114. Wang D. S., Kusuvara H., Kato Y., Jonker J. W., Schinkel A. H., and Sugiyama Y., *Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin*. Mol Pharmacol, (2003) 63, 844-848
115. Ärzteschaft Arzneimittelkommission der Deutschen, *Zunahme von Spontanberichten über Metformin-assoziierte Laktatazidosen*. Dtsch Arztebl, (2013) 110, 464
116. Scheen A. J., *Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors*. Diabetes Obes Metab, (2010) 12, 648-658
117. *Januvia Fachinformation*. (2012) MSD Sharp&Dohme GmbH
118. Rohrborn D., Wronkowitz N., and Eckel J., *DPP4 in diabetes*. Front Immunol, (2015) 6, 386-406
119. Nauck M. A. and Meier J. J., *The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions*. Lancet Diabetes Endocrinol, (2016) 4, 525-536
120. Renner S., Blutke A., Streckel E., Wanke R., and Wolf E., *Incretin actions and consequences of incretin-based therapies: lessons from complementary animal models*. J Pathol, (2016) 238, 345-358
121. Bergman A. J., Stevens C., Zhou Y. Y., Yi B. M., Laethem M., De Smet M., Snyder K., Hilliard D., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: A double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers*. Clin Ther, (2006) 28, 55-72
122. Campbell J. E. and Drucker D. J., *Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action*. Cell Metab, (2013) 17, 819-837
123. Bergman A., Ebel D., Liu F., Stone J., Wang A., Zeng W., Chen L., Dilzer S., et al., *Absolute bioavailability of sitagliptin, an oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy volunteers*. Biopharm Drug Dispos, (2007) 28, 315-322
124. Vincent S. H., Reed J. R., Bergman A. J., Elmore C. S., Zhu B., Xu S., Ebel D., Larson P., et al., *Metabolism and excretion of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor [<sup>14</sup>C]sitagliptin in humans*. Drug Metab Dispos, (2007) 35, 533-538
125. Herman G. A., Bergman A., Liu F., Stevens C., Wang A. Q., Zeng W., Chen L., Snyder K., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the oral DPP-*

- 4 inhibitor sitagliptin in middle-aged obese subjects.* J Clin Pharmacol, (2006) 46, 876-886
126. Furukawa S., Kumagi T., Miyake T., Ueda T., Niiya T., Nishino K., Murakami S., Murakami M., et al., *Suicide attempt by an overdose of sitagliptin, an oral hypoglycemic agent: a case report and a review of the literature.* Endocr J, (2012) 59, 329-333
127. Chan J. C., Scott R., Arjona Ferreira J. C., Sheng D., Gonzalez E., Davies M. J., Stein P. P., Kaufman K. D., et al., *Safety and efficacy of sitagliptin in patients with type 2 diabetes and chronic renal insufficiency.* Diabetes Obes Metab, (2008) 10, 545-555
128. Arjona Ferreira J. C., Corry D., Mogensen C. E., Sloan L., Xu L., Golm G. T., Gonzalez E. J., Davies M. J., et al., *Efficacy and safety of sitagliptin in patients with type 2 diabetes and ESRD receiving dialysis: a 54-week randomized trial.* Am J Kidney Dis, (2013) 61, 579-587
129. Arjona Ferreira J. C., Marre M., Barzilai N., Guo H., Golm G. T., McCrary Sisk C., Kaufman K. D., and Goldstein B. J., *Efficacy and safety of sitagliptin versus glipizide in patients with type 2 diabetes and moderate-to-severe chronic renal insufficiency.* Diabetes Care, (2013) 36, 1067-1073
130. Herman G. A., Bergman A., Yi B., and Kipnes M., *Tolerability and pharmacokinetics of metformin and the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin when co-administered in patients with type 2 diabetes.* Curr Med Res Opin, (2006) 22, 1939-1947
131. Liu Y. and Hong T., *Combination therapy of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and metformin in type 2 diabetes: rationale and evidence.* Diabetes Obes Metab, (2014) 16, 111-117
132. Deacon C. F. and Lebovitz H. E., *Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas.* Diabetes Obes Metab, (2016) 18, 333-347
133. Green J. B., Bethel M. A., Armstrong P. W., Buse J. B., Engel S. S., Garg J., Josse R., Kaufman K. D., et al., *Effect of sitagliptin on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes.* N Engl J Med, (2015) 373, 232-242
134. Fisman E. Z. and Tenenbaum A., *Antidiabetic treatment with gliptins: focus on cardiovascular effects and outcomes.* Cardiovasc Diabetol, (2015) 14, 129-142
135. Port R. E., *Populations-Pharmakokinetik und individuelle Dosisanpassung,* in *Onkologie* W.J. Zeller and H. zur Hausen, Editors (2003) ecomed Medizin

136. Aburuz S., Millership J., and McElnay J., *Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2006) 832, 202-207
137. Swales J. G., Gallagher R. T., Denn M., and Peter R. M., *Simultaneous quantitation of metformin and sitagliptin from mouse and human dried blood spots using laser diode thermal desorption tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, (2011) 55, 544-551
138. Daae L. N. W., Halvorsen S., Mathisen P. M., and Mironska K., *A comparison between hematological parameters in capillary and venous blood from healthy adults*. Scand J Clin Lab Invest, (1988) 48, 723-726
139. Kayiran S. M., Ozbek N., Turan M., and Gurakan B., *Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period*. Clin Lab Haematol, (2003) 25, 9-16
140. Nolph K., Felts J., Moore R., and Vanstone J., *Differences in distribution of urea and creatinine between red-cells and plasma in normal and azotemic blood as assessed by autoanalyzer and manual chemical methods*. Int Urol Nephrol, (1978) 10, 59-64
141. Liu A. and Coleman S. P., *Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2009) 877, 3695-3700
142. Huttunen K. M., Rautio J., Leppanen J., Vepsalainen J., and Keski-Rahkonen P., *Determination of metformin and its prodrugs in human and rat blood by hydrophilic interaction liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, (2009) 50, 469-474
143. Pontarolo R., Gimenez A. C., de Francisco T. M., Ribeiro R. P., Pontes F. L., and Gasparetto J. C., *Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2014) 965, 133-141
144. Chhetri H. P., Thapa P., and Van Schepdael A., *Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation*. Saudi Pharm J, (2014) 22, 483-487
145. Sultana N., Arayne M. S., Shafi N., Siddiqui F. A., and Hussain A., *Development and validation of new assay method for the simultaneous analysis of diltiazem, metformin, pioglitazone and rosiglitazone by RP-HPLC and its applications in pharmaceuticals and human serum*. J Chromatogr Sci, (2011) 49, 774-779



146. Ding C. G., Zhou Z., Ge Q. H., Zhi X. J., and Ma L. L., *Simultaneous determination of metformin and glipizide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Biomed Chromatogr, (2007) 21, 132-138
147. Jagadeesh B., Bharathi D. V., Pankaj C., Narayana V. S., and Venkateswarulu V., *Development and validation of highly selective and robust method for simultaneous estimation of pioglitazone, hydroxypioglitazone and metformin in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2013) 930, 136-145
148. Cheng C. L. and Chou C. H., *Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, (2001) 762, 51-58
149. Heinig K. and Bucheli F., *Fast liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS-MS) determination of metformin in plasma samples*. J Pharm Biomed Anal, (2004) 34, 1005-1011
150. Alpert A. J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. J Chromatogr, (1990) 499, 177-196
151. Buszewski B. and Noga S., *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- a powerful separation technique*. Anal Bioanal Chem, (2012) 402, 231-247
152. *Explore LUNA<sup>®</sup> HILIC*. Phenomenex
153. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2010*. (2010) diabetesDE [http://www.diabetesde.org/system/files/documents/gesundheitsbericht\\_2010\\_gesamt\\_28\\_10\\_2009.pdf](http://www.diabetesde.org/system/files/documents/gesundheitsbericht_2010_gesamt_28_10_2009.pdf) [accessed: 23.01.2017]
154. Mohamed R., Mercolini L., Cuennet-Cosandey S., Chavent J., Raggi M. A., and Peyrou M., *Validation of a dried blood spot LC-MS/MS approach for cyclosporin A in cat blood: comparison with a classical sample preparation*. J Pharm Biomed Anal, (2012) 66, 298-305
155. Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., and Schenck F. J., *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J AOAC Int, (2003) 86, 412-431
156. *Pesticide residue analysis - QuEChERS informational booklet*. UCT: [www.unitedchem.com](http://www.unitedchem.com) [accessed: 21.10.2014]

157. Mülek M. and Högger P., *Highly sensitive analysis of polyphenols and their metabolites in human blood cells using dispersive SPE extraction and LC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, (2015) 407, 1885-1899
158. Loni A. B., Ghante M. R., and Sawant S. D., *Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of sitagliptin phosphate and metformin hydrochloride in bulk and tablet dosage form*. Der Pharma Chemica, (2012) 4, 854-859
159. Sreedhar C., Manogna K., Sreenivasa Rao T., Akkamma H. G., Sukanya K., and Shakir V. K., *New analytical method development and validation of some oral hypoglycemic drugs*. Res J Pharm Biol Chem Sci, (2012) 3, 20-30
160. El-Bagary R. I., Elkady E. F., and Ayoub B. M., *Spectrofluorometric and spectrophotometric methods for the determination of sitagliptin in binary mixture with metformin and ternary mixture with metformin and sitagliptin alkaline degradation product*. Int J Biomed Sci, (2011) 7, 62-69
161. Nirogi R., Kandikere V., Mudigonda K., Komarneni P., Aleti R., and Boggavarapu R., *Sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in human plasma using liquid-liquid extraction*. Biomed Chromatogr, (2008) 22, 214-222
162. Adaway J. E. and Keevil B. G., *Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2012) 883-884, 33-49
163. Luyckx A., Westhovens R., Oris E., Papisch W., and Bossuyt X., *Clinical relevance of measurement of antibodies to individual snU1-RNP proteins*. Clin Chem, (2005) 51, 1888-1890
164. Arayne M. S., Sultana N., and Zuberi M. H., *Development and validation of RP-HPLC method for the analysis of metformin*. Pak J Pharm Sci, (2006) 19, 231-235
165. Zhang W., Han F., Zhao H., Lin Z. J., Huang Q. M., and Weng N., *Determination of metformin in rat plasma by HILIC-MS/MS combined with Tecan automation and direct injection*. Biomed Chromatogr, (2012) 26, 1163-1169
166. Mora L., Sentandreu M. A., and Toldra F., *Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine*. J Agric Food Chem, (2007) 55, 4664-4669
167. Zuo Y., Yang Y., Zhu Z., He W., and Aydin Z., *Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography*. Talanta, (2011) 83, 1707-1710

168. Reddy S., Ahmed I., Ahmad I., Mukhopadhyay A., and Thangam S., *Development and validation of a method for simultaneous estimation of metformin and sitagliptin in human plasma by LC-MS-MS and its application in a bioequivalence study.* J Chromatogr Sci, (2015) 53, 1549-1556
169. Burugula L., Mullangi R., Pilli N. R., Makula A., Lodagala D. S., and Kandhagatla R., *Simultaneous determination of sitagliptin and simvastatin in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study.* Biomed Chromatogr, (2013) 27, 80-87
170. Zeng W., Xu Y., Constanzer M., and Woolf E. J., *Determination of sitagliptin in human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, (2010) 878, 1817-1823
171. Porta V., Schramm S. G., Kano E. K., Koono E. E., Armando Y. P., Fukuda K., and Serra C. H., *HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies.* J Pharm Biomed Anal, (2008) 46, 143-147
172. Wu D., Wang Y., Sun Y., Ouyang N., and Qian J., *A simple, rapid and reliable liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of methotrexate in human plasma and its application to therapeutic drug monitoring.* Biomed Chromatogr, (2015) 29, 1197-1202
173. Keevil B. G., Tierney D. P., Cooper D. P., Morris M. R., Machaal A., and Yonan N., *Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring.* Ther Drug Monit, (2002) 24, 757-767
174. Luckwell J., Denniff P., Capper S., Michael P., Spooner N., Mallender P., Johnson B., Clegg S., et al., *Assessment of the within- and between-lot variability of Whatman FTA((R)) DMPK and 903((R)) DBS papers and their suitability for the quantitative bioanalysis of small molecules.* Bioanalysis, (2013) 5, 2613-2630
175. Grouven U., Bender R., Ziegler A., and Lange S., *Comparing methods of measurement.* Dtsch Med Wochenschr, (2007) 132 Suppl 1, e69-73
176. Levey A. S., Bosch J. P., Lewis J. B., Greene T., Rogers N., and Roth D., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation.* Ann Intern Med, (1999) 130, 461-470
177. Fliser D., Franek E., Joest M., Block S., Mutschler E., and Ritz E., *Renal function in the elderly: Impact of hypertension and cardiac function.* Kidney Int, (1997) 51, 1196-1204

178. Cohen E., Nardi Y., Krause I., Goldberg E., Milo G., Garty M., and Krause I., *A longitudinal assessment of the natural rate of decline in renal function with age*. J Nephrol, (2014) 27, 635-641
179. Thomas M. C., *Diuretics, ACE inhibitors and NSAIDs - the triple whammy*. Med J Aust, (2000) 172, 184-185
180. Onuigbo M. A., *The nephrotoxic "triple whammy" of combining diuretics, ACE inhibitors, and diuretics*. BMJ, (2013) 346, f678
181. Fournier J. P., Sommet A., Durrieu G., Poutrain J. C., Lapeyre-Mestre M., and Montastruc J. L., *More on the "Triple Whammy": Antihypertensive drugs, non-steroidal anti-inflammatory agents and acute kidney injury - a case/non-case study in the French pharmacovigilance database*. Ren Fail, (2014) 36, 1166-1168
182. Garcia Camin R. M., Cols M., Chevarria J. L., García Osuna R., Carreras M., Lisbona J. M., and Coderch J., *Acute kidney injury secondary to a combination of renin-angiotensin system inhibitors, diuretics and NSAIDs: "The Triple Whammy"*. Nefrología (English Edition), (2015) 35, 197-206
183. Huerta C., Castellsague J., Varas-Lorenzo C., and Garcia Rodriguez L. A., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population*. Am J Kidney Dis, (2005) 45, 531-539
184. Prieto-Garcia L., Pericacho M., Sancho-Martinez S. M., Sanchez A., Martinez-Salgado C., Lopez-Novoa J. M., and Lopez-Hernandez F. J., *Mechanisms of triple whammy acute kidney injury*. Pharmacol Ther, (2016) 167, 132-145
185. Lapi F., Azoulay L., Yin H., Nessim S. J., and Suissa S., *Concurrent use of diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers with non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: nested case-control study*. BMJ, (2013) 346, e8525
186. Saffar F., Aiache J. M., and Andre P., *Influence of food on the disposition of the antidiabetic drug metformin in diabetic patients at steady-state*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, (1995) 17, 483-487
187. Wunderer H., *Arzneimittel richtig einnehmen - Wechselwirkungen zwischen Medikamenten und Nahrung*. Second ed. (2000) Govi-Verlag
188. Hong Y., Rohatagi S., Habtemariam B., Walker J. R., Schwartz S. L., and Mager D. E., *Population exposure-response modeling of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus*. J Clin Pharmacol, (2008) 48, 696-707

189. de Oliveira Baraldi C., Moises E. C., de Jesus Ponte Carvalho T. M., de Jesus Antunes N., Lanchote V. L., Duarte G., and Cavalli R. C., *Effect of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics of metformin in obese pregnant women*. Clin Pharmacokinet, (2012) 51, 743-749
190. Kajbaf F., Bennis Y., Hurtel-Lemaire A. S., Andrejak M., and Lalau J. D., *Unexpectedly long half-life of metformin elimination in cases of metformin accumulation*. Diabet Med, (2016) 33, 105-110
191. *Vollblutspende*, <https://www.ukb.uni-bonn.de/42256BC8002AF3E7/vwWebPagesByID/3AD00D4598FB53EDC1257E40048651C> [accessed 06.10. 2016]
192. Berlet H. H. and Völkl A., *Die Ultraviolett-Absorption von Kreatinin und Glykocyamidin im Vergleich mit anderen Guanidinverbindungen und analogen Hydantoinen*. Z Klin Chem Klin Biochem, (1975) 2, 53-59
193. *roQ - QuEChERS Kits. Phenomenex:*  
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/0a6eaba2-d9b2-4b74-a391-81ffc3e19379.pdf> [accessed: 18.01.2017]