

Wieviel Ramiprilat kann in Leichenblut und Liquor nachgewiesen werden?

Nadine Theofel, Elke Vejmelka, Sonja Roscher, Michael Tsokos, Stefan Scholtis

Landesinstitut für gerichtliche und soziale Medizin Berlin, Turmstraße 21, 10559 Berlin

Kurzfassung

Auch wenn ACE-Hemmer seit den 80er Jahren auf dem Markt sind, ist bislang recht wenig über die Konzentration in peripherem Blut, Herzblut und Liquor nach Todeseintritt bekannt. Im Folgenden wird daher ein Datensatz präsentiert, welcher Auskunft über die zu erwartende Konzentration von Ramiprilat nach mutmaßlicher therapeutischer Einnahme geben soll. Diese Studie umfasst alle Ramipril-positiven Fälle des Landesinstitutes für gerichtliche und soziale Medizin Berlin für das Jahr 2017. Da bislang noch keine derartige Studie existiert, hat diese einen Mehrwert für die toxikologische Befundung bei Todesfällen.

1. Einleitung

Ramipril ist ein potenter und lang wirkender ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzym) und wird bei essentieller Hypertonie und kongestiver Herzinsuffizienz verschrieben [1]. Es verhindert die Umwandlung von Angiotensin I in das blutdrucksteigernde Peptid Angiotensin II und senkt dadurch den Blutdruck [2].

Das Prodrug Ramipril (**A**) wird im Magen-Darm-Trakt schnell absorbiert und zum aktiven Metaboliten Ramiprilat (**B**) in der Leber hydrolysiert. Aufgrund des beträchtlichen First-Pass-Metabolismus kann das Prodrug Ramipril nur zu einem geringen Anteil im Urin (2 % der Dosis) nachgewiesen werden [3]. Hauptprodukte sind vielmehr das Ramiprilat (**B**) und die Diketopiperazinsäure (**C**) [4]. Für chemische Strukturen siehe Abb. 1.

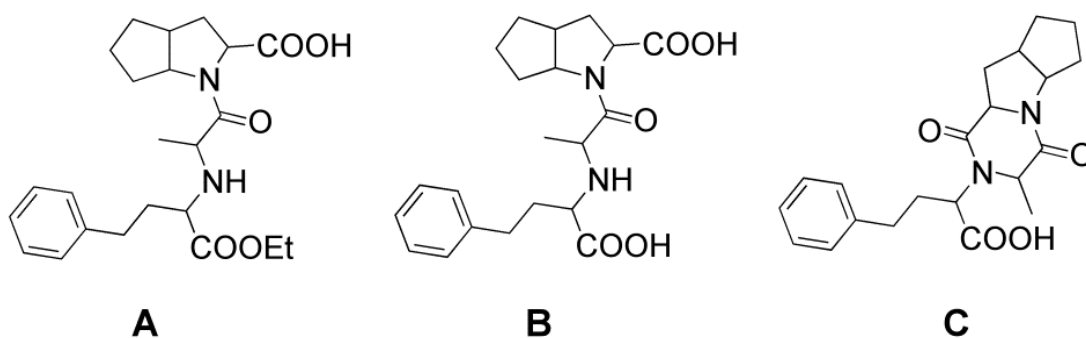


Abb. 1. Ausscheidungsprodukte von Ramipril im Urin. A) Ramipril, B) Ramiprilat, C) Diketopiperazinsäure.

Klinische Studien zeigen, dass eine Ramiprildosis von ein paar Milligramm am Tag ausreicht, um den Blutdruck zu senken [5]. Der Behandlungserfolg kann allerdings noch gesteigert werden, wenn zusätzlich Diuretika eingenommen werden [4]. Die maximale Ramiprilatplasmakonzentration (3 - 22 ng/mL) wird in der Regel 2 - 4 h nach Einnahme des Medikamentes erreicht. Danach benötigt der Körper mehrere Tage, bis nur noch die Hälfte von Ramiprilat im Körper nachweisbar ist [4-6].

2. Methoden

2.1. Qualitativer Nachweis von Ramiprilat in Urin mittels GC-MS

Urin wurde über eine Bond Elut LRC-Certify Kartusche entsprechend Strehmel et al. 2017 [7] aufbereitet. Dazu wurde die Kartusche mit Methanol und Phosphatpuffer aktiviert, nach Anreicherung der Probe mit Phosphatpuffer/Methanol, Essigsäure und Hexan gewaschen und die Analyten schließlich mit Aceton eluiert. Im Anschluss wurde der Rückstand mit TMSH umgesetzt und 1 μL der Lösung in ein Finnigan Trace GC-MS System injiziert. Detaillierte Geräteeinstellungen finden sich in [7].

2.2. Quantitative Bestimmung von Ramiprilat mittels LC-MS/MS

200 μL Blut wurden mit 10 μL internem Standard (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ Nortriptylin- d_3) und mit 590 μL Methanol zur Proteinfällung versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden 400 μL der oberen Phase abgenommen, 10 μL 2-Propanol/HCl hinzugefügt und die Lösung unter einem Stickstoffstrom eingedampft. Danach wurde der Rückstand in 20 μL Methanol gelöst und mit Ammoniumformiatpuffer auf 500 μL aufgefüllt.

200 μL Liquor wurden mit 10 μL internem Standard (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ Nortriptylin- d_3) versetzt und mit Ammoniumformiatpuffer auf 1.000 μL aufgefüllt.

Ramiprilat wurde an einem HPLC-QTRAP-MS-System mit einer gerichteten MRM-Methode (1. Übergang: m/z 389 \rightarrow m/z 206; DP 46 volts, EP 10 volts, CE 29 volts, CXP 16 volts und 2. Übergang: m/z 389 \rightarrow m/z 156; DP 46 volts, EP 10 volts, CE 29 volts, CXP 12 volts) quantifiziert. Alle Fälle wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von Ramipril überprüft. Der 1. Übergang war dabei von m/z 417 auf m/z 234 (DP 46 volts, EP 10 volts, CE 31 volts, CXP 18 volts) und der 2. Übergang von m/z 417 auf m/z 91 (DP 46 volts, EP 10 volts, CE 103 volts, CXP 6 volts). Zu detaillierten Parametereinstellungen siehe [7].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Qualitativer Nachweis von Ramiprilat im Urin

Für die folgende Studie wurden alle Fälle in Betracht gezogen, die im GC-MS Screening einen positiven Hit mit der methylierten Diketopiperazinsäure (Bibliothekseintrag Maurer/Pfleger/Weber: *Ramipril-M/artifact -H₂O ME*), dem Hauptprodukt, ergaben. Das Spektrum wies charakteristische Fragmente bei m/z 91, 248 und 280 auf (Abb. 2), die durch eine benzyliche Spaltung (m/z 91), eine β -H Elimierung entlang der Carbonylgruppe (m/z 248) und eine Elimination von Wasser (m/z 280) erklärt werden können. Für den Fall, dass sehr viel des Umlagerungsproduktes im Urin nachzuweisen war, wurde darüber hinaus zweifach (Abb. 2) und in einigen Fällen sogar dreifach methyliertes Ramiprilat (Bibliothekseintrag Maurer/Pfleger/Weber: *Ramipril-M (Desethyl) 2ME* bzw. *Ramipril-M (Desethyl) 3ME*) im GC-MS Chromatogramm aufgefunden. Beide Spektren wiesen ein sehr charakteristisches Fragment bei m/z 220 bzw. m/z 234 auf, welches aus der alpha-Spaltung in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe resultiert (Abb. 2).

3.2. Analytische Daten für die Ramiprilatbestimmung

Die Kalibrationskurve in Schenkelvenenblut war linear über einen Bereich von 5 ng/mL bis wenigstens 1000 ng/mL . Dazu wurde Schenkelvenenblut mit 5 ng/mL , 10 ng/mL , 20 ng/mL , 100 ng/mL und 1000 ng/mL Ramiprilat versetzt. Der Korrelationskoeffizient betrug an allen drei Tagen 0,999. Weiterhin wurde für Schenkelvenenblut, Herzblut und Liquor sichergestellt, dass kein MRM-Übergang mit dem von Ramiprilat überlappt.

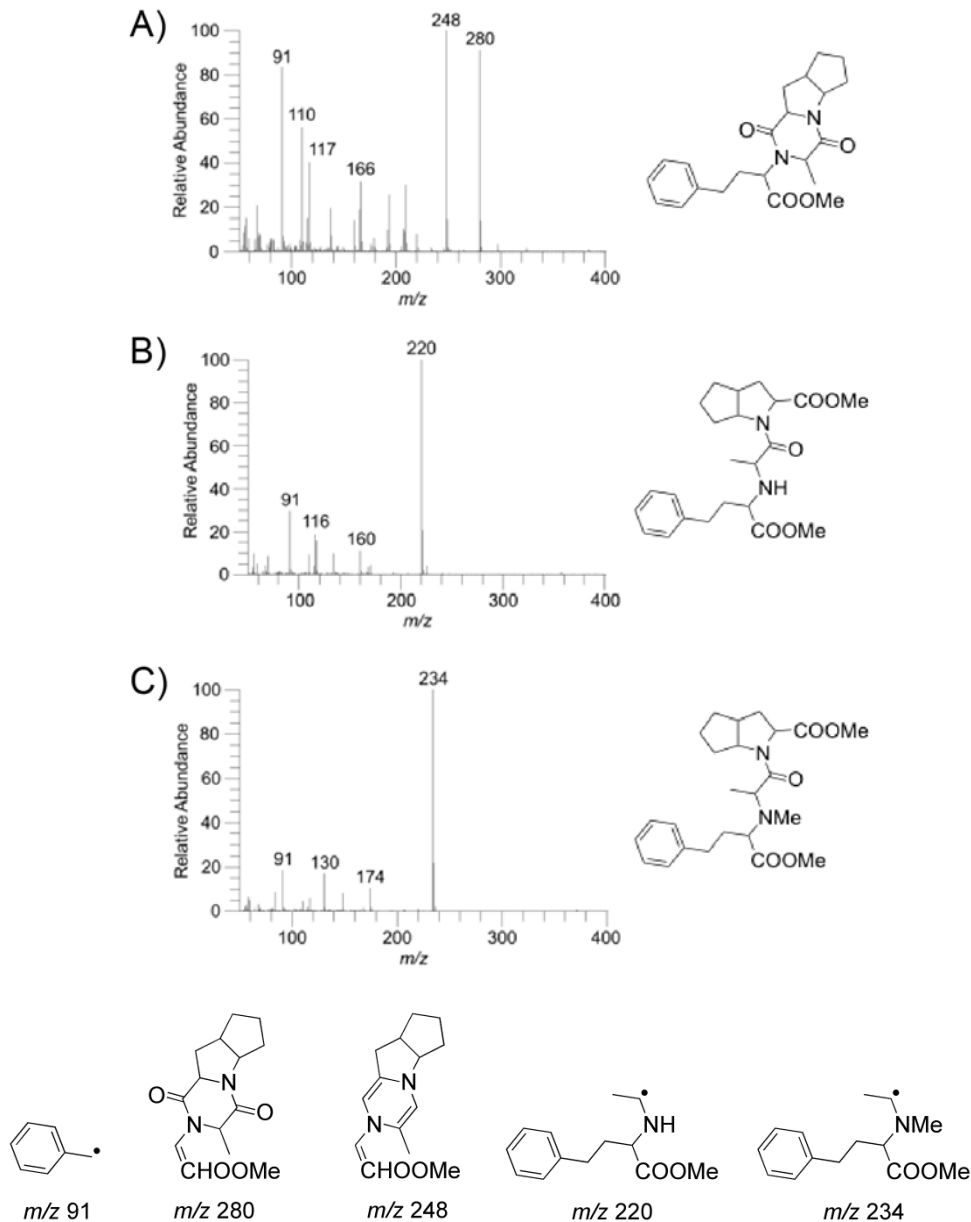


Abb. 2. Nachweis der Hauptausscheidungsprodukte in einer aufbereiteten Urinprobe mittels GC-MS und Interpretation der charakteristischen EI Fragmente. A) Diketopiperazinsäure 2ME, B) Ramiprilat 2ME, C) Ramiprilat 3ME.

3.3. Beschreibung der Stichprobe

Insgesamt ergaben sich für die folgende Untersuchungsreihe Asservate von 25 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von 64 Jahren und Asservate von 8 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 79 Jahren. Das mittlere Gewicht, ausgedrückt als Median, betrug 86 kg für die Stichprobe der Männer und 67 kg für die Stichprobe der Frauen. Die Todesursache war dabei in 12 von 33 Fällen auf das Herz zurückzuführen. Herzinfarkt, Kardiomegalie und Koronarsklerose waren hierbei die am häufigsten genannten Todesursachen. Darüber hinaus wurde Ramiprilat auch in nicht-natürlichen Todesfällen, wie nach Sturz oder Intoxikation mit anderen Medikamenten oder Drogen, nachgewiesen. In diesen Fällen war die Todesursache vielmehr eine Summation verschiedener Parameter und nicht auf die Einnahme von Ramipril zurückzuführen (Tab. 1).

Weiterhin fällt auf, dass in 8 Fällen das Antihypertonikum Metoprolol, in 6 Fällen das Analgetikum Metamizol und in 4 weiteren Fällen das Antidiabetikum Metformin bzw. das Antihypertonikum Amlodipin neben Ramiprilat im Schenkelvenenblut nachgewiesen werden konnten. Dabei war die Konzentration von Metoprolol in 3 von 8 Fällen erhöht (Fall 3, Fall 15 und Fall 21), die Konzentration von Metformin in 1 von 4 Fällen (Fall 19) und die Konzentration von Amlodipin in 2 von 4 Fällen (Fall 19 und Fall 33).

Da bei Leichenproben in den seltensten Fällen konkrete Aussagen zu Dosis, Häufigkeit der Einnahme und Zeitintervall zwischen Todeseintritt und Obduktion gemacht werden können, wurden im Folgenden alle positiven Ramiprilfälle in die Statistik einbezogen mit Ausnahme von Fall 15. Hier wurde nicht nur eine stark erhöhte Konzentration von Ramiprilat (9840 ng/mL), sondern ebenfalls eine stark erhöhte Konzentration an Metoprolol (2200 ng/mL) im Schenkelvenenblut nachgewiesen. Anhand der Aktenlage konnte jedoch nicht geklärt werden, ob vor dem Sturz eine erhöhte Dosis Ramipril eingenommen wurde oder durch den Sturz vermehrt Ramiprilat in das Schenkelvenenblut übergegangen ist.

3.4. Quantitativer Nachweis von Ramiprilat in Schenkelvenenblut, Herzblut und Liquor

Ein Box-Whisker-Plot ist eine gute Möglichkeit, um die Verteilung der Daten zu veranschaulichen. Weiterhin können aus ihm die wichtigen Kennwerte wie Minimum, Maximum, 1. Quartil, Median und 3. Quartil abgeleitet werden. Zuvor wurden die Daten mit dem statistischen Test nach Grubbs auf Ausreißer überprüft (Abb. 3). Dabei wurde bestätigt, dass die Ramiprilatkonzentration im Fall 15 mit 9840 ng/mL stark von der Norm abweicht.

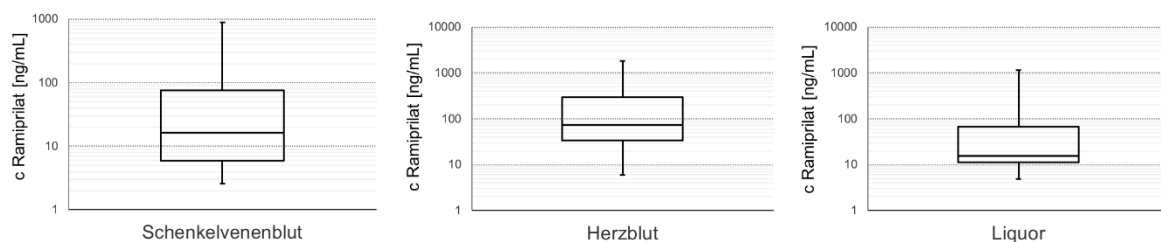


Abb. 3. Ramiprilat-Konzentrationsverteilung in Schenkelvenenblut (n = 31), Herzblut (n = 21) und Liquor (n = 11).

Der Median betrug 17 ng/mL für das Schenkelvenenblut, 75 ng/mL für das Herzblut und 16 ng/mL für den Liquor. Das erste und dritte Quartil hingegen betragen 6 ng/mL bzw. 76 ng/mL für das Schenkelvenenblut, 34 ng/mL bzw. 298 ng/mL für das Herzblut und 11 ng/mL bzw. 69 ng/mL für den Liquor. Das inaktive Prodrug Ramipril hingegen konnte im Schenkelvenenblut und Herzblut nur in 25 % der Fälle nachgewiesen werden, im Liquor hingegen nur zu 18%. Dies bestätigt die Vermutung, dass zur toxikologischen Bewertung vorrangig die Konzentration von Ramiprilat verwendet werden sollte.

Ein Vergleich der gemessenen Ramiprilatwerte mit den Literaturdaten ergibt zunächst eine annähernde Übereinstimmung. Baselt et al. [3] beschreiben nach Einnahme therapeutischer Dosen Serum-/Plasmakonzentrationen für Ramiprilat zwischen 3 ng/mL - 22 ng/mL. Schulz et al. [9] geben den therapeutischen Bereich mit 1 ng/mL - 40 ng/mL an. Berücksichtigt man bei den Betrachtungen jedoch den Koeffizienten zwischen Blut und Plasma von ca. 0,5 - 0,6 [3], so liegen die gemessenen Konzentrationen zum Teil über den beschriebenen therapeutischen Bereichen. Als Ursache dafür muss eine potentielle postmortale Umverteilung des Wirkstoffs in Betracht gezogen werden. Sowohl das Konzentrationsverhältnis von Herzblut zu Schenkelvenenblut (>1), als auch das hohe Verteilungsvolumen (bis zu 9 L/kg) und die Lipophilie von Ramipril/Ramiprilat lassen o.g. Prozess nach Todeseintritt erwarten.

Tab. 1. Zusammenfassung wichtiger Eckdaten der untersuchten Fälle. Es sind die Konzentrationen von Ramiprilat im Schenkelvenenblut (SVB), Herzblut (HB) und Liquor (LQ) sowie weitere nachgewiesene Wirkstoffe aufgeführt. Substanzen oberhalb des üblichen/therapeutischen Bereiches sind fett hervorgehoben.

ID	Alter	Geschlecht	Gewicht [kg]	Größe [cm]	Todesursache	Todesart	SVB [ng/mL]	HB [ng/mL]	LQ [ng/mL]	weitere nachgewiesene Wirkstoffe
1	68	männlich	54	162	Herzinfarkt	natürlich	17	k.A.m.*	k.A.m.	-
2	82	weiblich	72	150	Herzinfarkt	natürlich	41	34	60	-
3	52	weiblich	72	157	Herzinfarkt	natürlich	59	502	k.A.m.	Amfetamin 0,75 µg/mL (hoch) , Cafedrin (therapeutisch), Ibuprofen (subtherapeutisch), Metoprolol 1 µg/mL (erhöht) , Morphin (therapeutisch), Propofol (subtherapeutisch)
4	88	männlich	71	165	Kardiomegalie	natürlich	5	k.A.m.	k.A.m.	Metamizol (subtherapeutisch), Metoprolol (therapeutisch), Torasemid (qual)
5	69	männlich	94	168	Kardiomegalie	natürlich	23	k.A.m.	13	Metformin (therapeutisch), Propranolol (therapeutisch)
6	64	männlich	86	172	Koronarsklerose	natürlich	3	12	5	Carbamazepin 22 µg/mL (erhöht)
7	85	männlich	87	166	Koronarsklerose	natürlich	5	k.A.m.	k.A.m.	Amlodipin (therapeutisch)
8	86	männlich	77	168	Koronarsklerose	unklar	5	k.A.m.	k.A.m.	Zolpidem 1,3 µg/mL (erhöht)
9	54	männlich	86	179	Koronarsklerose	natürlich	11	1830	k.A.m.	-
10	86	männlich	94	172	Koronarsklerose	natürlich	25	k.A.m.	k.A.m.	Metamizol (therapeutisch), Paracetamol (therapeutisch)
11	73	männlich	112	170	Koronarsklerose	natürlich	27	k.A.m.	k.A.m.	Sitagliptin (therapeutisch), Amlodipin (therapeutisch), Rivaroxaban (subtherapeutisch), Bisoprolol (subtherapeutisch), Diazepam (subtherapeutisch)
12	77	männlich	76	171	Koronarsklerose	natürlich	137	201	k.A.m.	-
13	82	weiblich	51	146	Blutung im Hirnstamm	unklar	66	17	k.A.m.	Metoprolol (therapeutisch), Phenprocoumon (therapeutisch)
14	65	männlich	75	168	Bolustod	nicht natürlich	25	64	k.A.m.	Metformin (therapeutisch), Mirtazapin (therapeutisch), Pipamperon 1,3 µg/mL (erhöht)
15	53	männlich	79	166	Brustkorbzertrümmerung	nicht natürlich	9840	k.A.m.	k.A.m.	Diazepam (subtherapeutisch), Metoprolol 2,2 µg/mL (erhöht)
16	70	weiblich	97	170	diabetisches Koma	natürlich	8	6	13	Sitagliptin (therapeutisch), Glucose/Lactat (erhöht)

17	57	männlich	110	186	Leberzirrhose	natürlich	7	37	k.A.m.	-
18	62	männlich	60	166	Lungenentzündung	natürlich	270	k.A.m.	16	Morphin (subtherapeutisch), Tetrabenazin (therapeutisch)
19	51	männlich	105	184	Mallory-Weiss-Syndrom	natürlich	122	298	77	Amlodipin 0,1 µg/mL (erhöht), Metformin 16,1 µg/mL (erhöht), Metoprolol (subtherapeutisch)
20	87	männlich	72	175	Rippenserienfraktur	nicht natürlich	13	k.A.m.	k.A.m.	Metamizol (subtherapeutisch), Zopiclon (therapeutisch)
21	75	weiblich	68	161	Tumorleiden, chron. Grunderkrankungen	natürlich	86	415	45	Metoprolol 0,9 µg/mL (erhöht)
22	71	männlich	102	178	Wirbelsäulenbruch, Herzvergrößerung	nicht natürlich	3	55	9	Carbamazepin (therapeutisch), Metoprolol (subtherapeutisch)
23	62	männlich	71	175	unklar	unklar	3	k.A.m.	5	Olanzapin (therapeutisch), Valproinsäure (subtherapeutisch)
24	52	männlich	90	180	unklar	unklar	4	161	k.A.m.	Metamizol (therapeutisch)
25	45	männlich	124	177	unklar	unklar	7	179	k.A.m.	Heroin (nicht toxisch), Methadon und Metamizol (jeweils subtherapeutisch), Trimipramin 1 µg/mL (erhöht)
26	87	weiblich	52	148	unklar	unklar	105	k.A.m.	k.A.m.	-
27	62	männlich	85	166	unklar	unklar	180	75	k.A.m.	-
28	49	männlich	95	176	unklar	unklar	436	20	k.A.m.	-
29	72	männlich	93	174	unklar	unklar	k.A.m.	48	k.A.m.	Verapamil 1,2 µg/mL (erhöht)
30	66	weiblich	65	162	Intoxikation	unklar	4	25	k.A.m.	Diazepam (subtherapeutisch), Doxepin 4,7 µg/mL (toxisch), Zolpidem 1,6 µg/mL (erhöht)
31	52	männlich	68	170	Intoxikation	nicht natürlich	12	307	357	Lithium (therapeutisch), Venlafaxin+Met 0,7 µg/mL (erhöht) , 2-Oxo PCE (keine Vergleichswerte)
32	61	männlich	98	176	Intoxikation	nicht natürlich	14	k.A.m.	k.A.m.	Fentanylpflaster (therapeutisch), Baclofen 30 µg/mL (erhöht) , Clonazepam (therapeutisch), Metformin, Pregabalin, Metoprolol (jeweils therapeutisch), Metamizol (subtherapeutisch)
33	87	weiblich	49	147	Intoxikation	natürlich	896	1750	1140	Amlodipin 0,3 µg/mL (erhöht) , Mirtazapin und Cinnarizin (jeweils therapeutisch), Diphenhydramin 1,4 µg/mL (erhöht), Salicylsäure 230 µg/mL (erhöht)

* k.A.m. = keine Aussage möglich: Das Asservat wurde während der Obduktion nicht abgenommen.

Bislang wurden in der Literatur keine Todesfälle beschrieben, die auf eine Monointoxikation mit Ramipril zurückzuführen sind. Zu den beobachteten Nebenwirkungen zählen Kopfschmerzen, Schwindel, Schwäche, Übelkeit und Husten [1-3]. Bei Überdosierungen kann es u. a. zu Blutdruckabfall, Bradykardie, Nierenfunktionsstörungen und Leberschädigungen kommen [1,3]. Insbesondere bei Vorerkrankungen der entsprechenden Organe ist mit einer Zunahme der o. g. Nebenwirkungen zu rechnen. Bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen sollte die Möglichkeit einer Beeinflussung des Todeseintritts – insbesondere nach Überdosierungen – diskutiert werden.

4. Fazit

In der vorliegenden Arbeit wird eine Studie präsentiert, in der die postmortalen Konzentrationen von Ramiprilat über 33 Todesfälle ermittelt wurden. Unter Annahme einer postmortalen Umverteilung lagen die im Schenkelvenenblut gemessenen Werte annähernd in dem Bereich, wie man ihn im Serum bzw. Plasma lebender Personen – nach Einnahme therapeutischer Dosen – erwarten würde. Im Liquor wurden vergleichbare Messwerte erzielt, im Herzblut hingegen waren die Werte um ein Vierfaches höher. Die Ergebnisse können bei der toxikologischen Einschätzung von Wirkstoffkonzentrationen z. B. bei Todesfällen hilfreich sein. Das Ausmaß der Beeinflussung des Todeseintritts nach Überdosierungen, insbesondere bei bestehenden Vorerkrankungen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5. Danksagung

Die Autoren danken den Obduzenten der Abteilung für Forensische Pathologie/Klinische Rechtsmedizin unter der Leitung von Dr. Rosenbaum für die Bereitstellung von Probenmaterial und den ärztlichen Sektionsgutachten.

6. Literatur

- [1] Fachinformation Ramipril Sandoz® Tabletten, Stand 2012, http://www.sz-produkte.de/pdf/fi/ramipril_sandoz_tabletten.pdf.
- [2] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie 2008; 9. Auflage: 547-550.
- [3] Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man 2017; 11. Auflage: 1865-1866.
- [4] Ruf G, Gera S, Luus HG, Trenk D, de la Rey N, Löffler K, Schulz W, Jähnchen E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ramipril and piritanide administered alone and in combination. Eur J Clin Pharmacol. 1994; 46(6): 545-550.
- [5] Heintz B, Verho M, Brockmeier D, Lückel G, Maigatter S, Sieberth HG, Rangoonwala B, Bender N. Multiple-dose pharmacokinetics of ramipril in patients with chronic congestive heart failure. J Cardiovasc Pharmacol. 1993; 22 Suppl 9: S36-42.
- [6] Schunkert H, Kindler J, Gassmann M, Lahn W, Irmisch R, Ritz E, Debusmann ER, Pujadas JO, Koch KM, Sieberth HG. Pharmacokinetics of ramipril in hypertensive patients with renal insufficiency. Eur J Clin Pharmacol. 1989; 37(3): 249-256.
- [7] Strehmel N, Vejmelka E, Kastner K, Roscher S, Tsokos M, Scholtis S. NPS-findings in forensic toxicology – three case reports. Toxichem Krimtech 2017; 84(3): 199-204.
- [8] van Griensven JMT, Schoemaker RC, Cohen AF, Luus HG, Seibert-Grafe M, Röthig H-J. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and bioavailability of the ACE inhibitor ramipril. Eur J Clin Pharmacol 1995; 47:513-518.
- [9] Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. Crit Care 2012; 16(4): R136-R139.

Der Beitrag bezieht sich auf das Poster 05 vom XXI. GTFCh-Symposium in Mosbach (Baden).