

Pharmakokinetik von Medikamenten durch Echtzeit-Analyse der Atemluft von Mäusen**

Xue Li, Pablo Martinez-Lozano Sinues, Robert Dallmann, Lukas Bregy, Maija Hollmén, Steven Proulx, Steven A. Brown, Michael Detmar, Malcolm Kohler und Renato Zenobi*

Abstract: Mittels sekundärer Elektrosprayionisation und hochauflösender Massenspektrometrie wurde eine nichtinvasive Bestimmung der Pharmakokinetik (PK) von Ketamin, Propofol und Valproinsäure sowie deren Metaboliten in der Atemluft von Mäusen erzielt. Das PK-Profil eines Medikaments beeinflusst dessen Wirksamkeit und Toxizität, weil es die Exposition und effektive Dosis bestimmt. Das Antidepressivum und Anästhetikum Ketamin und vier seiner Metaboliten wurden im Detail untersucht, und ihre PK gleichzeitig nach Verabreichen verschiedener sub-anästhetischer Dosen von Ketamin bestimmt. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme und intraperitonealer Injektion wurde ebenfalls untersucht. Im Gegensatz zu konventionellen Studien, bei denen selbst für PK-Kurven niedriger Auflösung viele Tiere geopfert werden müssen, ergibt die hier vorgestellte Echtzeit-PK-Bestimmung eine bisher unerreichte Zeitauflösung (10 s), und keines der Tiere musste getötet werden. Dies stellt somit einen wichtigen Schritt nicht nur für den Tierschutz, sondern auch eine große Kosten- und Zeitsparnis dar.

In der präklinischen Medikamentenentwicklung verlässt man sich heutzutage bei der Charakterisierung von Verbindungen mit unbekannten In-vivo-Eigenschaften stark auf Tiermodelle.^[1] Während der Leitstrukturoptimierung werden pharmakokinetische (PK) Parameter jeder Verbindung im Plasma und gegebenenfalls in spezifischen Zielorganen von Mäusen und Ratten bestimmt. Durch eine Konzentrationsbestimmung jeder Verbindung und seiner Abbauprodukte als Funktion der Zeit in einem bestimmten Gewebe ist es möglich, die Exposition nach Verabreichung einer gegebenen

Dosis abschätzen. Da jeder der Zeitpunkte eines PK-Profil wird die Dosierung bei mehreren Tieren erfordert, müssen größere Mengen der zu untersuchenden Verbindung synthetisiert werden. Zudem können signifikante Schwankungen zwischen Individuen auftreten. Daher wäre es von großem Interesse, eine zeitaufgelöste Analyse in einzelnen Tieren zu erzielen. Durch die Entwicklung hochempfindlicher bioanalytischer Methoden wurde es in letzter Zeit möglich, einige der genannten Einschränkungen zu überwinden, z. B. mittels Analyse getrockneter Blutflecken und anderer Mikroproben-techniken.^[2] Die benötigte Zahl an Tieren und Menge der Verbindung wird dadurch besonders bei Mäusen deutlich reduziert, und Unterschiede zwischen Individuen können ebenfalls reduziert werden. Mikro-Blutentnahmen am Schwanz belasten jedoch die Tiere, was die Verteilung von Medikamenten und den Stoffwechsel verändern könnte.^[3] Obwohl dieses Problem beispielsweise durch Verwendung – allerdings auch invasiver – implantierter Katheter zur automatischen Probenentnahme überwunden werden kann,^[4] ist dies keine ideale Lösung. Trotz Fortschritten in der Hochdurchsatz-Analyse mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden erfordert die Probenvorbereitung und Analyse erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand. Aktuelle Verfahren sind somit immer noch mit Schwierigkeiten verbunden und weit davon entfernt, eine sofortige Entscheidung über die Weiterverfolgung einer Substanz zu erlauben.

Die Atemluft von Mäusen könnte dazu dienen, dieses Dilemma zu überwinden. Wegen ihres nichtinvasiven Charakters wurde der Atemanalytik bereits seit den 1970er

[*] Dr. X. Li,^[+] Dr. P. Martinez-Lozano Sinues,^[+] L. Bregy, Dr. M. Hollmén, Dr. S. Proulx, Prof. M. Detmar, Prof. R. Zenobi Department für Chemie und Angewandte Biowissenschaften ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz) E-Mail: Zenobi@org.chem.ethz.ch Dr. R. Dallmann,^[+] Prof. S. A. Brown Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität Zürich Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz) Prof. M. Kohler Klinik für Pneumologie, Universitätsspital Zürich Rämistrasse 100, 8091 Zürich (Schweiz) Dr. X. Li^[+] Institute of Atmospheric Environmental Safety and Pollution Control, Jinan University Huangpu Road West 601, Guangzhou 510632 (China) Dr. R. Dallmann^[+] University of Warwick, Warwick Medical School Gibbet Hill Road, Coventry, CV4 1L7 (Großbritannien)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde durch einen Marie Curie European Reintegration Grant (an P.M.L.S.), 7. Rahmenprogramm der EU (276860), sowie durch das Zürcher Klinische Prioritäts-Forschungsprogramm „Sleep und Health“ (an S.A.B. und M.K.) unterstützt. R.D. wurde durch die Schweizerische Krebsliga teilfinanziert. Ein herzlicher Dank geht an Dr. Stefan König (Institut für forensische Medizin, Universität Bern) für die Durchführung der LCMS-Messungen. Wir danken auch René Dreier für seine Hilfe beim Bau des Probenahmesystems sowie Dr. Konstantin Baryluk (ETH) für seine konstruktive Kritik und die Hilfe beim Erstellen der Abbildungen. Wir danken Ermanno Moriggi (UZH) für nützliche Hinweise für die Durchführung der Experimente zur Bioverfügbarkeit sowie Katharina Root und Martin Köhler für die Durchsicht der deutschen Fassung des Textes.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201503312> zu finden.

Jahren erhebliche Aufmerksamkeit zuteil.^[5] Im Vergleich zu Plasma, Blut und anderen biologischen Matrices ist die Atemanalytik vorteilhaft, da 1) die Probenahme kaum oder gar nicht invasiv ist, 2) es kaum Einschränkungen in Bezug auf die Probenmenge und die Häufigkeit der Analysen gibt, und 3) die Matrix relativ einfach und sauber ist. Nichtinvasive Online- und direkte Echtzeit-Analysen können daher leicht mittels Analytik der Atemluft realisiert werden.^[6]

Hier zeigen wir, wie die hochauflösende sekundäre Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (SESI-HRMS) genutzt werden kann, um PK-Profiles von Medikamenten nichtinvasiv und in Echtzeit zu bestimmen.^[7] Aufgrund ihrer Empfindlichkeit und ihrer Fähigkeit, Signale von Medikamenten und deren Metaboliten bei relativ hohen Massen zu detektieren, hat die SESI-MS wichtige Vorteile gegenüber der Protonentransferreaktions-MS, um endogene Verbindungen in der Atemluft von Ratten und Mäusen zu überwachen.^[8] In der Atemluft männlicher C57Bl/6J-Mäuse studierten wir die Pharmakokinetik verschiedener Medikamente, unter anderem von Ketamin (Ket) und seinen Metaboliten. Ketamin ist ein Antagonist des NMDA-Rezeptors und wurde ursprünglich als Anästhetikum entwickelt, wird aber hauptsächlich als Schmerzmittel eingesetzt und hat jüngst sogar Potenzial zur Behandlung von Depressionen gezeigt.^[9] Nach Verabreichung eines Medikamentes wurden die Tiere in einer Plexigaskammer platziert, welche mit einem konstanten Luftfluss durchspült wurde. Diese Luft wurde dann direkt mittels SESI-HRMS analysiert (Abbildung 1a, siehe auch Abbildung S1 und Experimentelles).

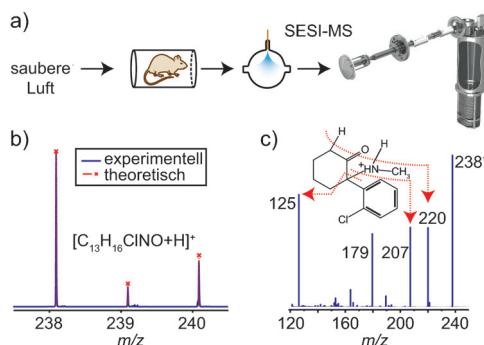


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; ausführlichere Informationen sind in Abbildung S1 zu finden. b) SESI-Massenspektrum der Atemluft einer Maus, welches das Isotopenmuster im m/z -Bereich von protoniertem Ket zeigt. c) Fragmentionen (SESI-MS/MS)-Spektrum, erzeugt aus dem Vorläuferion bei m/z 238.

Um sicherzustellen, dass die Messungen nicht aufgrund einer veränderten Atmungstätigkeit nach der Injektion von Ket beeinflusst wurden, benutzten wir Ganzkörper-Plethysmographie. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied zu publizierten Werten der Minutenvolumina für B6-Mäuse (ca. 70 mL min^{-1})^[10] feststellen, und auch die Injektion von Ket hatte keinen Einfluss auf das Minutenvolumen.

Kurz nach Verabreichen von Ket beobachteten wir einen Anstieg der Signale im Bereich m/z 238–240, welche perfekt zum Isotopenmuster des protonierten Ket-Moleküls ($[M + H]^+$) passen (Abbildung 1b). Außerdem stimmten auch die

Fragmentionen, welche aus den $[M + H]^+$ -Vorläuferionen von Ket (Abbildung 1c) gebildet wurden, mit den bekannten Fragmenten^[11] sowie mit denjenigen einer Ket-Referenz (Abbildung S2a) überein. Nicht nur Ket, sondern auch seine wichtigsten Metaboliten konnten alle mit unserer Methode detektiert werden: Norketamin (NK)^[11,12] konnte eindeutig im Atem der Mäuse identifiziert werden (Abbildungen S2b und S3a). Drei weitere Metaboliten von Ket wurden ebenfalls gleichzeitig nachgewiesen (Abbildungen S3 und S4): Hydroxyketamin (HK), Hydroxynorketamin (HNK) und Dehydronorketamin (DHNK).^[13]

Verabreichen mehrerer subanästhetischer Dosen von Ket resultierte in Konzentrationsverläufen mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 23 min. (Abbildungen 2a und S5), die mit bereits bekannten Werten für Blutplasma übereinstimmen.^[14] Ein häufiger Vergleich von Werten im Atem und im Plasma würde eine häufige Entnahme von Plasmaproben bedingen, was mit gängigen Methoden aufgrund der nur beschränkt zur Verfügung stehenden Volumina schwierig oder sogar unmöglich ist.

Um die biologische Variabilität unserer Methode zu testen, verabreichten wir drei weiteren Mäusen je eine Dosis von 45 mg kg^{-1} Ket (Abbildung S6). Die Unterschiede im maximalen Ket-Signal (I_{\max}) betragen ungefähr 18 %. Im Vergleich zu einem 86 %-igen Anstieg von I_{\max} (von 2.4×10^5 auf 4.4×10^5 Zählimpulse in Abbildung 2a) beim Erhöhen der Dosis von 45 auf 60 mg kg^{-1} zeigt dies, dass unsere Methode eine robuste und reproduzierbare Bestimmung des Medikamentenspiegels ermöglicht.

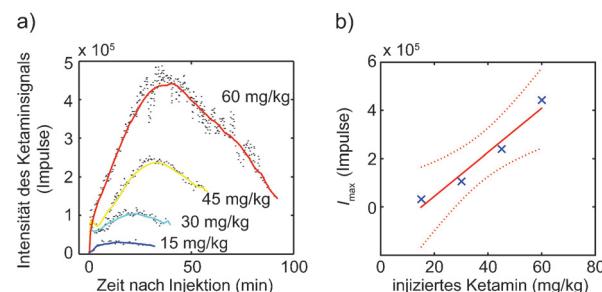


Abbildung 2. a) Zeitabhängiges Ket-Signal für 4 Dosen: 15, 30, 45, und 60 mg kg^{-1} . Jede Dosis wurde einer anderen Maus injiziert ($n=4$). Schwarze Punkte repräsentieren die Rohdaten, die durchgezogenen Kurven sind geglättete Daten. b) Abhängigkeit des maximalen Ket-Signals von der injizierten Menge ($r^2=0.9563$; p -Wert=0.0221). Eine lineare Regression und die 95 %-Vertrauensintervalle sind in rot dargestellt.

Wir stellten eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen I_{\max} und der injizierten Medikamentenkonzentration fest (Abbildung 2b), was ebenfalls mit dem bekannten Verhalten von Ket im Plasma übereinstimmt.^[15] Allerdings trat I_{\max} verzögert im Vergleich zu Literaturdaten für Plasma auf.^[14] Dies könnte mit der Verteilung von Ket (und seiner Metaboliten) zwischen Blut und Atem zusammenhängen.^[16] Verglichen mit früheren Studien verhalten sich die Werte von Ket und seiner Metaboliten im Atem ähnlicher als diejenigen in Organen. Beispielsweise erreicht Ket nach einer intravenösen Injektion seine Maximalkonzentration in der Leber,

der Haut und den Muskeln nach 10–20 min.^[17] Somit ist es wahrscheinlich, dass die im Atem gemessenen Werte eher diejenigen der Lunge als diejenigen des Plasmas widerspiegeln. Allerdings sind die meisten Medikamente darauf ausgelegt, nicht im Blut, sondern in bestimmten Organen zu wirken. Die kinetischen Unterschiede könnten aus diesem Grund signifikant und nützlich sein, was einen weiteren möglichen Vorteil der Atemanalytik darstellt.

Wie Ket zeigten auch seine vier Metaboliten eine lineare Abhängigkeit von I_{\max} von der Dosis (Abbildung S7). In Übereinstimmung mit Resultaten von Ratten-Serumproben traten die Maxima der primären Metaboliten (NK und HK) nach demjenigen von Ket auf.^[13] Obwohl t_{\max} für NK und HK identisch war und eine ähnliche Abnahme für eine Dosis von 15 mg kg⁻¹ gefunden wurde, zeigten die Zerfallskurven bei zunehmender Dosis starke Unterschiede: der Zerfall von NK war bedeutend schneller als derjenige von HK (Abbildung S8).

Die sekundären Metaboliten HNK und DHNK wiesen ein gegenüber NK deutlich verzögertes Maximum auf. Insgesamt fanden übereinstimmend wir für verschiedene Dosen, dass t_{\max} (Ket) < t_{\max} (NK) ≈ t_{\max} (HK) < t_{\max} (HNK) ≈ t_{\max} (DHHK) (Abbildung 3a, S7 und S9), während I_{\max} (HK) < I_{\max} (DHNK) < I_{\max} (HNK) < I_{\max} (NK) < I_{\max} (Ket) (Abbildung 3b).

Wir untersuchten auch den Zusammenhang zwischen der bekannten Plasma-PK und der PK in der Atemluft. Dazu verglichen wir die Intensitäten von Ket und NK in der Atemluft mit den Plasmakonzentrationen desselben Tieres mittels terminaler Blutentnahme zu bestimmten Zeitpunkten

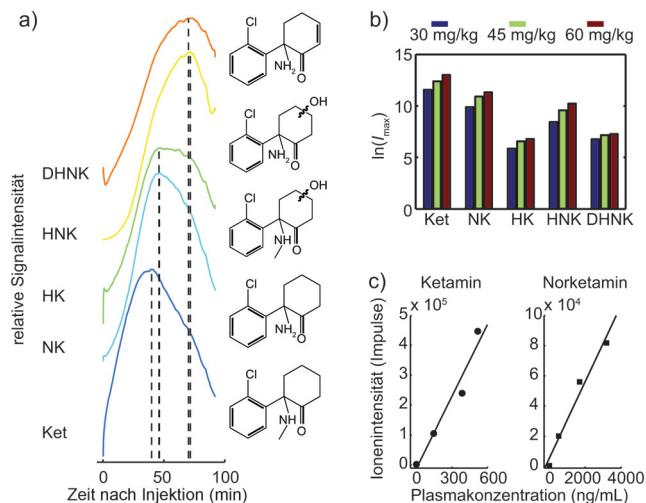


Abbildung 3. a) Normierte Signalintensität für Ket und seine Metaboliten, gemessen in der ausgetatmten Luft einer Maus, welcher 60 mg kg⁻¹ Ket injiziert wurde. Ähnliche Resultate wurden für Dosen von 45 mg kg⁻¹, 30 mg kg⁻¹ und 15 mg kg⁻¹ erhalten. Die gezeigten Daten sind geglättete Kurven; Rohdaten finden sich in Abbildung 2a (Ket) und Abbildung S7 (Metaboliten). Die Kinetiken unterscheiden sich: Die Zeiten der maximalen Konzentration sind für Ket = 34.5; NK = 46; HK = 51; HNK und DHNK = 77 min. b) Maximale Signalintensitäten von Ket und seinen Metaboliten, für drei verschiedene Dosen Ket (15, 30 und 45 mg kg⁻¹) und eine Negativkontrolle. c) Auftragungen der Intensität in der Atemluft gegen die Plasmakonzentration für Ket und NK.

(Abbildung 3c). Wir fanden eine signifikante Korrelation zwischen den Atem- und Plasmawerten für Ket ($r^2 = 0.9498$, p -Wert = 0.0254) und NK ($r^2 = 0.9739$, p -Wert = 0.0131). Die Konzentrationen im Plasma hingen davon ab, wann die Tiere nach Verabreichen von Ket geopfert wurden. Die in Abbildung 3c gezeigten Daten wurden nach 32, 40 und 58 Minuten ermittelt, nachdem jeweils 15, 30 bzw. 45 mg kg⁻¹ Ket injiziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt wird Ket bereits metabolisiert und erreicht verschiedene Kompartimente des Körpers, was eine höhere Plasmakonzentration von NK gegenüber Ket erklärt. Demgegenüber betrug die Signalintensität von NK im Atem nur etwa 20% derjenigen von Ket (Abbildung 3b). Wahrscheinlich reflektiert dies die Verteilung von Ket zwischen Blut und Atem.^[16] Es ist somit denkbar, dass die Intensität im Atem die Organkonzentration reflektiert: Der Transport von NK aus dem Blut in die Lunge und in den Atem sollte aufgrund der geringeren Lipophilie von NK weniger effizient als derjenige von Ket sein. Analog überwindet NK die Blut-Hirn-Schranke schlechter als Ket.^[13] Es müssten allerdings weitere direkte LC/MS-Vergleichsmessungen an Gewebeproben durchgeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen. Außerdem ist die Berechnung absoluter Gasphasenkonzentrationen aus den gemessenen Intensitäten prinzipiell zwar möglich,^[18] aber stark von der Instrumentierung und den verschiedenen Verbindungen abhängig. Aus diesem Grund geben wir hier anstelle absoluter Gasphasenkonzentrationen nur die Signalintensitäten der Ionen an.

Um das Potenzial dieser Technik für In-vivo-Echtzeit-Messungen auf andere Medikamente auszuweiten, haben wir die PK-Kurven von zwei zusätzlichen Substanzen bestimmt: Propofol (ein breit eingesetztes Anästhetikum) und Valproinsäure (ein Antiepileptikum). Abbildung S10 zeigt das Isotopenmuster sowie das Fragmentspektrum von Propofol. Die PK-Kurve ist in Abbildung S11 gezeigt und stimmt mit Literaturwerten überein.^[19] In analoger Weise fanden wir, dass die PK-Kurve von Valproinsäure und einem ihrer Abbauprodukte (Abbildung S12) mit Literaturwerten übereinstimmt.^[20]

Weiter untersuchten wir, ob sich neben der PK auch die Bioverfügbarkeit nach oraler Verabreichung – für viele Indikationen bei weitem bevorzugt – über die Analyse der Atemluft rasch abschätzen lässt. Normalerweise wird dies schon in der Frühphase der Medikamentenentwicklung getestet, zu einem Zeitpunkt, wenn oftmals nur kleine Substanzmengen zur Verfügung stehen. Wir verglichen deshalb die Intensitäten in der Atemluft nach intraperitonealer (IP) und oraler Dosierung (Abbildung S13). Der I_{\max} -Wert für die orale Dosis betrug nur etwa 15% dessen nach einer IP-Dosis. Dies ist konsistent mit Befunden für Ratten und Menschen.^[21]

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die SESI-HRMS-Analyse der Atemluft von Mäusen eine vielversprechende Methode für eine minimal invasive Überwachung der Pharmakokinetik von Medikamenten in Echtzeit erlaubt. Dies wurde am Beispiel von Ket, Propofol, Valproinsäure und ihren Stoffwechselprodukten gezeigt. Der vielleicht wichtigste Vorteil der vorgestellten massenspektrometrischen Atemluft-Analyse ist, dass die PK-Daten sofort – in Echtzeit – mit einer ausgezeichneten Zeitauflösung und vom selben Individuum ermittelt werden können. Unsere Methode führt

nicht nur zu präzisieren Daten mit erheblichen Zeit- und Kosteneinsparungen, sondern stellt auch einen wichtigen Schritt für den Tierschutz dar, da mehrere Verbindungen parallel in einem einzigen Tier gemessen werden können. Die Möglichkeit, eine komplette PK-Kurve mit bloß einer Einzeldosis pro Tier zu erstellen, ist vorteilhaft, falls nur kleine Substanzmengen, z.B. in präklinischen Studien, zur Verfügung stehen. Darüber hinaus sollten auf diese Art Studien zur Wechselwirkung verschiedener Arzneimittel durchgeführt werden können, auch wenn die Verbindungen völlig unterschiedliche Behandlungszeitpläne und Kinetiken aufweisen. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, dass durch Atemanalytik möglicherweise pharmakokinetische Profile gemessen werden, die den Konzentrationsverlauf im Gewebe statt im Plasma widerspiegeln.

Wir sind überzeugt davon, dass die SESI-HRMS-Methode in präklinischen Programmen von Nutzen sein wird, und sie auch während der klinischen Phasen der Medikamentenentwicklung zum Einsatz kommen könnte.^[7]

Stichwörter: Atemanalytik ·

Hochauflösende Massenspektrometrie · Ketamin · Pharmakokinetik · Sekundär-Elektrosprayionisation

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7815–7818
Angew. Chem. **2015**, *127*, 7926–7929

- [1] J. F. Pritchard, et al., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 542–553.
- [2] a) N. Spooner, R. Lad, M. Barfield, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1557–1563; b) K. P. Bateman, et al., *J. Chromatogr. B* **2001**, *754*, 245–251.
- [3] F. Jamali, C. M. Kunz-Dober, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *47*, 391–396.
- [4] P. Wong, R. Pham, C. Whitely, M. Soto, K. Salyers, C. James, B. A. Bruenner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 604–608.
- [5] L. Pauling, A. B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 2374–2376.

- [6] a) A. M. Lovett, N. M. Reid, J. Buckley, J. B. French, M. D. Cameron, *Biomed. Mass Spectrom.* **1979**, *6*, 91–97; b) P. M.-L. Sinues, et al., *Plos One* **2013**, *8*, e50090; c) P. M.-L. Sinues, et al., *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 369–373; d) J. Zhu, et al., *J. Appl. Physiol.* **2013**, *114*, 1544–1549; e) J. Zhu, et al., *J. Breath Res.* **2013**, *7*, 016003; f) P. M.-L. Sinues, et al., *Respiration* **2013**, *87*, 301–310.
- [7] G. Gamez, et al., *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4884–4886.
- [8] a) W. Szymczak, et al., *Mamm. Genom.* **2014**, *25*, 129–140; b) E. Aprea, et al., *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1098–1103.
- [9] D. E. Potter, M. Choudhury, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1848–1854.
- [10] A. Berndt, H. S. Savage, T. M. Stearns, B. Paigen, *Mol. Genet. Genomics* **2011**, *286*, 237–246.
- [11] S. C. Turfus, et al., *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1769–1778.
- [12] X. Zhao, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *74*, 304–314.
- [13] T. Palenicek, et al., *Neuropsychobiology* **2011**, *63*, 202–218.
- [14] Y. Sato, et al., *Br. J. Anaesth.* **2004**, *92*, 859–864.
- [15] N. Gass, et al., *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 895–906.
- [16] a) H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, A. Amann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1423–1449; b) A. Amann, B. d. L. Costello, W. Miekisch, J. Schuert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 034001.
- [17] M. P. Marietta, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, *196*, 536–544.
- [18] P. M.-L. Sinues, J. Rus, G. Fernández de la Mora, M. Hernández, J. Fernández de la Mora, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 287–294.
- [19] L. Guan, X. M. Wu, J. Y. Jiang, *J. Peking Univ. Health Sci.* **2005**, *37*, 187–189.
- [20] W. Ben-Cherif, I. Dridi, K. Aouam, M. Ben-Attia, A. Reinberg, N. A. Boughattas, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 468–473.
- [21] a) M. A. Peltoniemi, T. I. Saari, N. M. Hagelberg, K. Laine, K. J. Kurkinen, P. J. Neuvonen, K. T. Olkkola, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *111*, 325–332; b) M. Shimoyama, N. Shimoyama, A. L. Gorman, K. J. Elliott, C. E. Inturrisi, *Pain* **1999**, *81*, 85–93; c) J. A. Clements, W. S. Nimmo, I. S. Grant, *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 539–542.

Eingegangen am 12. April 2015

Online veröffentlicht am 26. Mai 2015