

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel**

**Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die
direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in
biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Diplom-Chemikerin

Katrin Georgi

aus

Chemnitz

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Elsenhans
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Hofmann
	Prof. Dr. S. Werner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	10. Januar 2007

Meinen Eltern

„Das Glück Deines Lebens wird bestimmt von der Beschaffenheit Deiner Gedanken.“

Marc Aurel (121-180)

Schlussendlich sind die untersuchten biologischen Flüssigkeiten fraktioniert, abgereichert und dadurch sauber, das Massenspektrometer ist „glücklich“ und somit ist es Zeit, den Personen zu danken, ohne deren Unterstützung die Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dabei halte ich es mit Plinius dem Älteren:

„Es ist nämlich nur recht und billig, wie ich meine, und bezeugt anständige Ehrlichkeit, einzugestehen, wem man etwas zu verdanken hat“

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, für die Anregungen zur inhaltlichen Gestaltung und die Möglichkeit, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Fachtagungen vor- und zur Diskussion zu stellen. *Ohne Ihre herzliche Aufnahme in Ihre Forschungsgruppe sowie Ihr stetiges Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit und die Bereitstellung der optimalen Analysengeräte wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.*

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Dietrich Seidel, Direktor des Instituts für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine stets wohlwollende Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Michael Early und Frau Dr. Dorothy Philips (Waters Corporation, Milford, USA) danke ich für die Bereitstellung der MMP-Materialien.

Herrn Dr. Dieter Lubda (Merck KGaA, Darmstadt) danke ich für die Bereitstellung der LiChrospher[®] XDS SPE-Säule.

Herrn Professor Dr. Manfred Ackenheil und Herrn Dr. Markus Schwarz danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitstellung der Patientenproben.

Bei der Firma Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, und dem beteiligten LC-MS/MS Projekt Team möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung und die wertvollen Diskussionen bedanken. Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Kobold, der mich beim „Zähmen“ eines renitenten Massenspektrometers unterstützt hat.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut danke ich für ihr stets offenes Ohr und das überaus angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima: *Rosa (für die perfekte*

Zusammenarbeit sowie unsere unzähligen wissenschaftlichen und nicht so wissenschaftlichen Diskussionen), Ria (Du bist der Meister beim Packen von Säulen und als „gute Seele“ des Arbeitskreises unverzichtbar), Jelena (Du hast mich von meiner Einsamkeit am MS erlöst), Veronika (Du hast meinen Horizont auch um medizinische Dinge erweitert) und Stefan (für die vielen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen).

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und Heiko. *Ihr habt durch Eure Unterstützung mein Studium, diese Arbeit und unzählige andere Dinge in meinem Leben erst möglich gemacht und immer an mich geglaubt. Was wäre ich nur ohne Euch?!*

Schließlich danke ich auch allen Freunden, Bekannten und Verwandten, die immer an meiner Seite waren, wenn Not am Mann bzw. an der Frau war und auf die ich mich immer verlassen kann. *Hendrik, Dir möchte ich besonders für die Zeit, die wir miteinander verbracht haben und Deine Unterstützung in allen Lebenslagen danken. (Ich werde auch in Zukunft mit meinen Computerproblemen zu Dir kommen.)*

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	11
1.1	Problemstellung	11
1.2	Ziel der Arbeit	13
2	Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten für die LC-MS/MS Analyse	14
2.1	Biologische Flüssigkeiten	14
2.1.1	Blut - Plasma und Serum	14
2.1.2	Urin	15
2.1.3	Anforderungen an die Probenaufbereitung	16
2.2	Verfahren für die Probenaufbereitung	16
2.2.1	Proteinpräzipitation (PP)	17
2.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)	17
2.2.3	Festphasenextraktion (SPE)	18
2.3	Automatisierung der SPE	19
2.3.1	Automatisierung der manuellen off-line SPE	20
2.3.2	Automatisierung durch integrierte (on-line) SPE	20
2.4	Restricted Access Materialien (RAM)	21
2.4.1	Charakteristika der RAM-Materialien	22
2.4.2	LiChrospher ADS	24
2.5	Mixed-Mode Materialien (MMP)	25
3	Massenspektrometrie in der Bioanalytik	27
3.1	Ionisationstechniken	27
3.1.1	Elektrospray (ESI)	27
3.1.2	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI)	28
3.2	Tandem-Massenspektrometrie	29
3.3	Matrixeffekte in der bioanalytischen LC-MS/MS	32
3.3.1	Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte	33
3.3.2	Bestimmung der Matrixeffekte	34
3.3.3	Lösungsansätze	35
4	Trizyklische Antidepressiva	36
4.1	Pharmakodynamik	37
4.1.1	Wirkmechanismus	37
4.1.2	Anwendung und Dosierung	37
4.1.3	Unerwünschte Wirkungen	38
4.2	Pharmakokinetik	39
4.3	Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	40
4.3.1	Indikationen für TDM	42
4.3.2	Analytik der Trizyklischen Antidepressiva	43
5	Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE)	45
5.1	Grundlagen	45
5.1.1	Multidimensionalität	45
5.1.2	Angewandte chromatographische Prinzipien	46
5.1.3	Instrumenteller Aufbau	46
5.2	Arbeitsweise der MD-SPE Plattform	47
5.2.1	Probenaufgabe und Fraktionierung auf der 1. SPE-Säule	48
5.2.2	Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule	49

5.2.3	Fraktionierung auf der 2. SPE-Säule.....	49
5.2.4	Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule.....	50
5.3	Vorgehensweise und Bestimmung von Kenngrößen für die Säulenschaltung:	
	Allgemeiner Teil.....	51
5.3.1	Ausarbeitung der analytischen Trennung und Detektion.....	52
5.3.2	Ermittlung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$ und der Dauer der Elution der Probenmatrix $t_{M, RAM}$	53
5.3.3	Ermittlung der Transferzeit $t_{T, RAM}$ der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule.....	54
5.3.4	Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A, MMP}$	55
5.3.5	Bestimmung der Elutionszeit $t_{M, MMP}$ der Probenmatrix.....	56
5.3.6	Bestimmung der Transferzeit $t_{T, MMP}$ der Analyte auf die analytische Trennsäule.....	57
5.3.7	Schaltzeiten.....	57
5.3.8	Analysenzyklus.....	59
5.4	Optimierung der MD-SPE Plattform.....	60
5.4.1	SPE-Säulen.....	60
5.4.2	Eluenten.....	62
5.4.3	Optimierung der Transferschritte.....	64
6	Entwicklung einer MD-SPE – LC-MS/MS Methode für die Bestimmung trizyklischer Antidepressiva (TZA) in biologischen Flüssigkeiten.....	66
6.1	LC-Trennung.....	66
6.2	MS/MS-Detektion.....	69
6.3	RAM SPE-Säule.....	73
6.3.1	Bestimmung der Elutionszeit $t_{M, RAM}$ der Probenmatrix.....	73
6.3.2	Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$	76
6.3.3	Bestimmung der Transferzeit $t_{T, RAM}$	77
6.4	MMP SPE-Säule.....	79
6.4.1	Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A, MMP}$	80
6.4.2	Bestimmung der Elutionszeit $t_{M, MMP}$ der Probenmatrix.....	81
6.4.3	Bestimmung der Transferzeit $t_{T, MMP}$	83
6.5	Bestimmung der Schaltzeiten.....	86
6.6	Zusammenstellung des Analysenzyklus.....	87
7	Evaluation der entwickelten MD-SPE Plattform.....	90
7.1	Selektivität des MD-SPE-LC-MS/MS Verfahrens.....	90
7.1.1	Entwicklung einer konventionellen on-line SPE-LC-MS/MS Methode für die Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva.....	91
7.1.2	Vergleich der MD-SPE Plattform mit der RAM SPE-LC Kopplung.....	92
7.1.2.1	UV-/Diodenarray Detektor.....	93
7.1.2.2	MS-Detektion.....	96
7.1.2.3	Probenvolumina.....	99
7.1.3	pH-Wert Abhängigkeit der chemoselektiven Fraktionierung.....	101
7.1.4	Einfluss der MMP SPE-Säule.....	104
7.2	Matrixeffekte bei der MS-Detektion.....	107
7.2.1	Nachsäulen-Infusion.....	107
7.2.2	Matrixeffekte der biologischen Flüssigkeiten Plasma und Urin.....	108
7.2.3	Interindividuelle Einflüsse.....	111
7.2.4	Intraindividuelle Einflüsse.....	113
7.2.5	Speziesabhängigkeit der Matrixeffekte.....	115
7.2.6	Einfluss der MMP SPE-Säule.....	116
7.2.7	Ursachen der Matrixeffekte.....	117
7.3	Validierung des MD-SPE-LC-MS/MS Verfahrens für die Analyse trizyklischer Antidepressiva.....	120
7.3.1	Definitionen.....	120
7.3.2	Wiederfindung.....	122
7.3.3	Richtigkeit und Präzision.....	124

7.3.4	Kalibration / Linearität	126
7.3.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	127
7.3.6	Selektivität.....	128
7.3.7	Analyse von Patientenproben.....	128
8	Allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform.....	131
8.1	Trimethoprim.....	131
8.2	Ketamin.....	134
8.3	Clenbuterol.....	136
8.4	„Tuning“	138
9	Zusammenfassung.....	140
10	Anhang.....	144
10.1	Geräte und Materialien	144
10.2	Chemikalien und Lösungsmittel	145
10.3	Geräteparameter.....	146
10.3.1	Retentions- und Tailingfaktoren der analytischen Trennung.....	146
10.3.2	Säulenschaltungen	147
10.3.2.1	MD-SPE trizyklische Antidepressiva	147
10.3.2.2	RAM-LC trizyklische Antidepressiva	148
10.3.2.3	MD-SPE Trimethoprim / Ketamin.....	149
10.3.2.4	MD-SPE Clenbuterol.....	150
10.3.3	MS/MS-Detektion	151
10.3.3.1	Trizyklische Antidepressiva	151
10.3.3.2	Trimethoprim.....	153
10.3.3.3	Ketamin	153
10.3.3.4	Clenbuterol	154
11	Literaturverzeichnis.....	155
12	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	163
13	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit	168
14	Lebenslauf	170



MRM.....	Multiple Reaction Monitoring
MS.....	Massenspektrometer
m/z.....	Masse-zu-Ladungsverhältnis
PP.....	Proteinpräzipitation
RAM.....	Restricted Access Material
RPC.....	Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase Chromatography)
SEC.....	Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography)
SIM.....	Single Ion Monitoring
S/N.....	Signal-zu-Rausch Verhältnis
SPE.....	Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction)
t_0	Totzeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_R	Retentionszeit
TDM.....	Therapeutisches Drug Monitoring
TF.....	Tailingfaktor
TZA.....	trizyklische Antidepressiva
UAW.....	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
UV.....	Ultraviolett
V_d	Verteilungsvolumen
VK.....	Variationskoeffizient
WFR.....	Wiederfindungsrate

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Analytik von Arzneistoffen in biologischen Flüssigkeiten mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigchromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist trotz der sehr effizienten analytischen Trennsäulen und den hochempfindlichen Massenspektrometern noch überaus mit Fehlern behaftet. Basierend auf der sehr hohen Spezifität und Selektivität der Massenspektrometer herrschte nach deren Kopplung mit der HPLC zunächst der Trend vor, auf eine sorgfältige und selektive Probenaufbereitung zu verzichten. Gründe hierfür waren u.a. die meist sehr zeitaufwändigen, unselektiven und nur teilweise automatisierbaren Verfahren für die Aufbereitung komplexer Proben.

Zwischenzeitlich wurde jedoch erkannt, dass gerade die in der Arzneistoffanalytik bevorzugt verwendeten Elektrospray-Ionenquellen sehr anfällig für so genannte Matrixeffekte sind. Dabei handelt es sich um die Beeinflussung der Ionisation der Zielanalyte, die durch in der Probe enthaltene makro- und niedermolekulare Bestandteile verursacht wird. In biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Plasma oder Urin sind diese Effekte zudem infolge der natürlichen Konzentrationsschwankungen endogener Substanzen nicht im Voraus abzuschätzen.

Aus diesen Gründen kann auch bei der modernen LC-MS/MS Analytik biologischer Flüssigkeiten nicht auf eine Probenaufbereitung verzichtet werden. Im Gegenteil, eine LC-MS/MS adäquate Probenaufbereitung der biologischen Flüssigkeiten umfasst meist mehrere Probenaufbereitungsschritte, um die störenden Matrixbestandteile von den Zielanalyten abzutrennen.

In der bioanalytischen HPLC ist die Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction, SPE) die dominierende Probenaufbereitungstechnik. Der hohe Matrixanteil beeinflusst jedoch die Effizienz dieser Technik und führt zur Koelution von störenden Matrixbestandteilen. Dies gilt besonders für Matrices mit hohem Proteinanteil, da die klassischen SPE-Materialien nicht biokompatibel sind und zu einer unspezifischen Adsorption und/oder Präzipitation der Proteine führen. In Abbildung 1 ist beispielhaft die Zusammensetzung von humanem Plasma dargestellt.

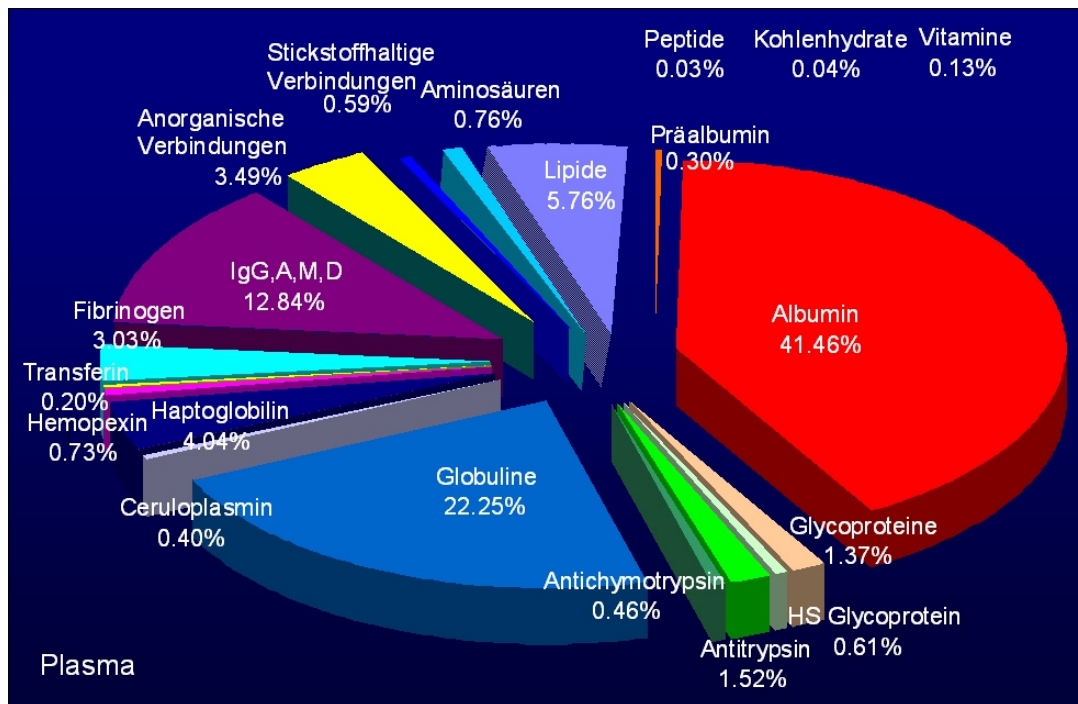


Abbildung 1: Zusammensetzung von humanem Plasma (nach Geigy Scientific Tables^{1,140})

Eine Möglichkeit, diese Effekte zu verhindern, ist die Präzipitation der Proteine vor der Analyse. Dies stellt jedoch einen zusätzlichen, nur schwer automatisierbaren Schritt dar. Darüber hinaus zeigten Polson et al., dass eine Proteinpräzipitation nicht effizient genug ist, um alle Substanzen zu entfernen, die eine Ionensuppression hervorrufen². Zusätzlich werden proteingebundene Analyte oft kopräzipitiert und führen zu falsch negativen Ergebnissen. Eine adäquate Probenaufbereitung für die moderne LC-MS/MS Analytik von Arzneistoffen sollte daher effizient, selektiv und vollständig automatisierbar sein.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung, Validierung und Erprobung einer multidimensionalen SPE-Plattform (MD-SPE) für die direkte, extraktive on-line Probenaufbereitung komplexer biologischer Flüssigkeiten und nachfolgende, störungsfreie LC-MS/MS Analyse basischer Pharmaka.

Ein zentraler Schwerpunkt lag dabei auf der Ausarbeitung und Optimierung einer Ventilschaltung zwischen zwei, mit maßgeschneiderten Adsorbentien gepackten SPE-Säulen und einer konventionellen analytischen Trennsäule. Diese SPE Packungsmaterialien besitzen so genannte Restricted Access und Mixed-Mode Eigenschaften und erlauben eine multidimensionale chromatographische Auf- bzw. Abtrennung von erwünschten bzw. unerwünschten Probenbestandteilen.

Um die Selektivität der MD-SPE Plattform zu evaluieren und zu demonstrieren sollten native und dotierte Plasma- und Urinproben mittels der MD-SPE Plattform und einer konventionellen, dem Stand der Technik entsprechenden RAM SPE-LC Kopplung analysiert und die Ergebnisse verglichen werden. Als Modellsubstanzen sollte eine Auswahl trizyklischer Antidepressiva dienen.

Ein Hauptziel bei der Entwicklung der MD-SPE Plattform sollte darin bestehen, dass eine Qualität für die Aufreinigung komplexer biologischer Flüssigkeiten erreicht wird, die es ermöglicht unter Routinebedingungen eine durch Matrixeffekte weitgehend ungestörte Detektion der Zielanalyte mit Hilfe eines Tandem-Massenspektrometers durchzuführen. Es soll gezeigt werden, dass die Ionisation der Zielanalyte weder durch inter- bzw. intraindividuelle Schwankungen der Zusammensetzung der Matrices noch durch die Herkunft der biologischen Flüssigkeiten beeinflusst wird.

Für die untersuchten trizyklischen Antidepressiva sollte schließlich eine vollständige MD-SPE-LC-MS/MS Methode erstellt und validiert werden. Die MD-SPE Plattform sollte nicht nur für die Analyse trizyklischer Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten geeignet sein. Ihre allgemeine Anwendbarkeit sollte am Beispiel der direkten, vollautomatischen der Analyse von weiteren basischen Substanzen in humanen Plasma- und Urinproben aufgezeigt werden.

2 Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten für die LC-MS/MS Analyse

2.1 Biologische Flüssigkeiten

Biologische Flüssigkeiten, wie z.B. Plasma, Serum oder Urin, bilden das größte Probenkollektiv für die klinisch-chemische Analytik mit Hilfe der Hochleistungs Flüssigchromatographie (HPLC) und deren Kopplung an unterschiedliche Detektoren, wie Ultraviolett (UV), Fluoreszenzdetektion (FD), Elektrochemische Detektion (ECD) und in jüngster Zeit die Massenspektrometer (MS). Aufgrund ihrer Komplexität sind derartige Proben analytisch sehr anspruchsvolle Matrices.

2.1.1 Blut - Plasma und Serum

Vollblut setzt sich aus zwei Fraktionen zusammen: dem flüssigen Blutplasma und den zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten).

Im Allgemeinen werden Arzneistoffbestimmungen aus Blut mit der Plasma- oder Serumfraktion durchgeführt. Plasma ist der flüssige, nach Entfernen der Blutkörperchen verbleibende Anteil des ungerinnbar gemachten Blutes inklusive aller Plasmaproteine. Es enthält etwa 92 % Wasser und 8 % gelöste Bestandteile. Diese Bestandteile setzen sich hauptsächlich aus Plasmaproteinen (z.B. Albumin 55 %, Immunglobuline 20 %, Lipoproteine 11 % und Fibrinogen 7 %), aber auch Elektrolyten, Nährstoffen, Enzymen, Gasen und Abbauprodukten zusammen (Abbildung 1)^{1,3}.

Das wichtigste Plasmaprotein ist das Albumin. Es macht mehr als die Hälfte aller Plasmaproteine aus, bindet zahlreiche saure und zu einem geringeren Anteil auch basische Pharmaka. Andere Plasmaproteine, wie z.B. β -Globulin und α_1 -Glykoprotein, sind ebenfalls an der Bindung bestimmter Arzneistoffe beteiligt.

Serum ist der flüssige, nach erfolgter Blutgerinnung verbleibende Teil des Blutes, der im Gegensatz zum Plasma kein Fibrinogen enthält.

Die zellulären Bestandteile und die flüssige Fraktion des Blutes können einfach durch Zentrifugation voneinander getrennt werden. Die Plasmaproteine müssen allerdings vor einer HPLC-Analyse entfernt werden.

2.1.2 Urin

Urin kann im Gegensatz zu Plasma und Serum nicht-invasiv gewonnen werden und ist dadurch leichter zugänglich. Auch stehen bei menschlichem Urin größere Mengen als bei Blut zur Verfügung. Das durchschnittliche tägliche Ausscheidungsvolumen von 1 – 1,5 l kann je nach Flüssigkeitszufuhr oder körperlicher Belastung jedoch stark schwanken, so dass pro Tag von 0,5 bis zu 2,7 l ausgeschieden werden. Außerdem ist auch der Konzentrationsverlauf renal eliminiertes Stoffes zirkadianen Schwankungen unterworfen. Der pH-Wert des Urins liegt bei etwa 4,8 bis 8. Pro Tag werden etwa 0,5 – 2,5 g Kreatinin ausgeschieden¹.

Die Zusammensetzung des Urins ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie ist stark abhängig von den individuellen Ernährungsgewohnheiten und dem Metabolismus des Patienten, dessen Alter, Geschlecht und auch des Gesundheitszustandes. Mehrere tausend niedermolekulare Verbindungen liegen im Urin vor. Urin stellt damit eine sehr heterogene und komplexe biologische Flüssigkeit dar.

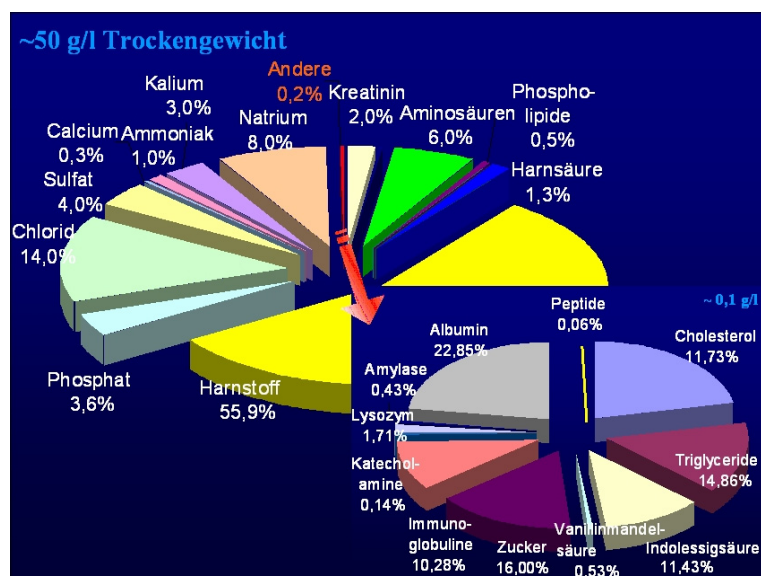


Abbildung 2: Zusammensetzung von humanem Urin (nach Geigy Scientific Tables^{1,140})

2.1.3 Anforderungen an die Probenaufbereitung

Plasma, Serum und Urin bestehen aus einer Vielzahl nieder- und makromolekularer Verbindungen. Die Konzentration dieser endogenen Verbindungen ist beträchtlich höher als die der untersuchten Analyte.

Makromolekulare Bestandteile (z.B. Proteine) von Plasma und Serum sind nicht mit herkömmlichen chromatographischen Packungsmaterialien kompatibel und werden daher unspezifisch und irreversibel an diesen Materialien adsorbiert, wodurch die Kapazität und die Lebensdauer der chromatographischen Säulen drastisch reduziert werden.

Urin enthält dagegen nur eine geringe Konzentration an Proteinen. Eine Herausforderung bei der Analytik in Urin ist jedoch die Trennung einer sehr großen Anzahl an niedermolekularen organischen Verbindungen.

Bei der Verwendung herkömmlicher Detektoren, wie z.B. UV-VIS in der HPLC, wird die Analytik hauptsächlich durch UV-aktive Matrixbestandteile gestört. Bei der LC-MS/MS Analytik biologischer Proben treten vor allem Matrixeffekte auf, die sich z.B. in der Störung der Ionisation der Zielanalyte manifestieren.

Aus diesen Gründen stellen biologische Flüssigkeiten besondere Anforderungen an deren Aufbereitung vor der eigentlichen Analyse. Diese sind:

- selektive und quantitative Extraktion der Zielanalyte,
- Abreicherung störender nieder- und makromolekularer Matrixbestandteile.

2.2 Verfahren für die Probenaufbereitung

Die Analyse biologischer Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Blut, Plasma, Serum oder Urin, mittels LC-MS/MS erfordert eine Aufbereitung der Proben vor der analytischen Trennung und Detektion. Eine entsprechende Probenaufbereitung beinhaltet folgende Schritte⁴:

- die Lösung des Analyten in einem geeigneten Lösungsmittel,
- die Aufkonzentrierung des Analyten,

-
- die Entfernung von Matrixbestandteilen zur Vermeidung von Störungen bei der analytischen Trennung und der massenspektrometrischen Detektion.

In der Bioanalytik werden für die Probenaufbereitung hauptsächlich Techniken wie die Proteinpräzipitation (PP), Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction; LLE) und Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction; SPE) angewendet.

2.2.1 Proteinpräzipitation (PP)

Bei der Proteinpräzipitation werden Säuren, Salze oder organische Lösungsmittel benutzt, um Proteine durch Denaturierung bzw. Präzipitation aus der Probe zu entfernen. Salze wie Zinksulfat und Säuren, wie z.B. Trichloressigsäure oder Perchlorsäure, sind sehr effektiv⁵. In der Bioanalytik werden häufig organische Lösungsmittel, wie z.B. Methanol oder Acetonitril, verwendet, da sie mit den mobilen Phasen der HPLC kompatibel sind³. Nach der Präzipitation wird die Probenmatrix abzentrifugiert und der proteinfreie Überstand bzw. ein Aliquot dessen kann analysiert werden.

Ein Nachteil dieser Art der Probenaufbereitung ist die potentielle Kopräzipitation der zu analysierenden Substanzen, wodurch deren Wiederfindung beeinträchtigt wird sowie die aufwändige Automation des Verfahrens⁶.

2.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction; LLE) zählt zu den bekanntesten Techniken der Probenaufbereitung und wird heute noch in vielen bioanalytischen Laboratorien angewendet.

Bei der LLE erfolgt die Extraktion der Analyte durch Ausschütteln der Probe mit Hilfe eines mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittels (z.B. Hexan oder Ethylacetat). Die Abtrennung der Analyte wird durch deren unterschiedliche Verteilung zwischen der organischen Phase und der wässrigen Probe erreicht. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen den beiden Phasen, das dem Nernst'schen Verteilungsgesetz folgt. Dieses Verteilungsgleichgewicht kann zum Beispiel durch die Wahl

des organischen Lösungsmittels oder die Einstellung des pH-Wertes in der Probe beeinflusst werden^{7,8}.

Trotz der vielseitigen Anwendbarkeit der LLE besitzt diese Technik gravierende Nachteile⁹⁻¹²:

- hoher Arbeits- und Zeitaufwand,
- niedrige Wiederfindungsraten der Analyte,
- schlechte Reproduzierbarkeit,
- ungeeignet für die Extraktion polarer Analyte.

2.2.3 Festphasenextraktion (SPE)

Eine weitere Methode für die Aufbereitung biologischer Proben ist die Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction; SPE). Dabei handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase stattfindet. Der Trennmechanismus der Extraktion verläuft nach dem gleichen Prinzip wie der Trennmechanismus der Flüssigchromatographie und kann in der Theorie analog betrachtet werden¹³.

Die Trennung von Analyt und Matrix erfolgt durch reversible Wechselwirkungen des Analyten mit der festen Phase, dem Adsorbens. Die Retention der Analyte auf dem Adsorbens resultiert aus einer Kombination von Adsorptions- und Verteilungsgleichgewichten.

Bei der klassischen SPE werden kleine Kunststoffkartuschen oder Disks, aber auch zunehmend Konfigurationen im 96-Well Format eingesetzt, die mit dem Adsorbens gefüllt sind¹⁴.

Vor der Aufbereitung proteinhaltiger biologischer Flüssigkeiten mit der SPE werden die vorhandenen Proteine oft durch Präzipitation entfernt, wobei bereits während dieses Schrittes Analytverluste aufgrund von Kopräzipitation und Inklusionen auftreten können. Danach wird die Probe auf die konditionierte SPE-Extraktionskartusche aufgegeben und die Analyte, aber auch ungewünschte Matrixbestandteile, an der stationären Phase adsorbiert. Durch wiederholtes Spülen der Extraktionskartusche wird die Restmatrix abgereichert und danach werden die Analyte mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Kartusche eluiert. Das Eluat

kann dann entweder direkt mittels HPLC analysiert werden oder es wird bis zur Trockne eingengt und im Eluenten der chromatographischen Trennung wieder aufgenommen und anschließend analysiert.

Für die SPE steht eine Vielzahl unterschiedlicher Adsorbentien zur Verfügung. Diese reichen von unpolaren Umkehrphasen und schwachen bzw. starken Ionenaustauschern über modifizierte Kieselgele und Polymere bis hin zu maßgeschneiderten SPE-Adsorbentien (Restricted Access Materialien, Affinitätschromatographische Materialien)¹⁵. Die große Flexibilität und hohe Anwendungsbreite der Festphasenextraktion trugen in den letzten Jahren zu einer immer stärkeren Verdrängung der LLE durch die SPE bei. Daher ist die SPE mittlerweile die dominierende Probenaufbereitungstechnik in der Bioanalytik.

2.3 Automatisierung der SPE

Aus der Praxis und der Literatur ist ersichtlich, dass die Probenaufbereitung oftmals den entscheidenden Engpass in der Analyse biologischer Proben darstellt¹⁶. Die oben beschriebenen manuellen Verfahren sind zeitaufwendig und fehleranfällig, so dass in den vergangenen 15-20 Jahren immer größere Anstrengungen unternommen wurden, um diese Verfahren zu automatisieren. Triebfedern für diese Entwicklung waren zum einen die ständig steigenden Analysenzahlen und die kürzeren Rücklaufzeiten der Analyseergebnisse, und zum anderen ökonomische Gründe, wie der wachsende Kostendruck auf die analytischen Labore und der Wunsch, höhere Probenzahlen mit einem geringeren Personalaufwand bearbeiten zu können. Die automatisierten Verfahren sollen dabei einen höheren Probendurchsatz ermöglichen bei gleichzeitiger Verbesserung der Präzision und der Richtigkeit der erzielten Ergebnisse.

Für die Automatisierung der Probenaufbereitung eignet sich dabei bevorzugt die SPE, da dieses Extraktionsprinzip sowohl verfahrenstechnische wie auch anwendungstechnische Vorteile gegenüber der LLE und der PP aufweist.

Die SPE basiert auf chromatographischen Verfahrensschritten und ist daher apparativ relativ einfach an flüssigchromatographische Trennsysteme und deren Detektoren zu koppeln. Bezüglich einer breiten Anwendbarkeit besitzt die SPE den Vorteil, dass sehr viele stationäre Phasen zur Verfügung stehen und damit ein breites Spektrum an Analyten erfasst werden kann.

2.3.1 Automatisierung der manuellen off-line SPE

Eine Möglichkeit zur Automatisierung der Festphasenextraktion ist die Automatisierung der manuell durchzuführenden Schritte (Probenaufgabe, Abreicherung der Matrixbestandteile durch Waschen, Elution der Analyte, Einengen und Wiederaufnahme des Eluates, Vorbereitung für die Injektion in das HPLC System) durch Robotersysteme, z.B. Tecan, Zinser. Diese Systeme bieten die Möglichkeit bis zu 96 Proben parallel aufzuarbeiten. Aufgrund der hohen Investitionskosten sind sie allerdings nur für Ultra-Hochdurchsatz Labore interessant. Eine Umfrage der Zeitschrift LCGC Europe aus dem Jahre 2001 bestätigt diese Einschätzung¹⁷. Für die Mehrzahl der Anwender sind maßgeschneiderte (dedicated) SPE Lösungen interessanter.

2.3.2 Automatisierung durch integrierte (on-line) SPE

Eine weitere Möglichkeit zur Automatisierung stellt die Integration der SPE in das Analysensystem dar. Dabei ist die Probenaufbereitung direkt mit dem analytischen System verbunden (on-line SPE).

Für diese Art der on-line Kopplung steht zurzeit z.B. ein Gerät von Spark Holland (Emmen, Niederlande) zur Verfügung. Das SymbiosisTM System basiert auf der Verwendung spezieller Einmal-Extraktionskartuschen, die für jede Analyse neu in das System eingesetzt werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser „SPE-Automaten“ besteht auch hier in der Verwendung herkömmlicher SPE Adsorbentien für die Extraktion. Außerdem sind auch diese Systeme mit erheblichen Investitions- und Betriebskosten verbunden.

Die Integration der Probenaufbereitung in das Analysensystem kann auch auf apparativ sehr einfache und kostengünstige Weise erfolgen. Dafür wird eine so genannte SPE-Säule über ein 6-Wege Schaltventil in das HPLC-System eingebunden. Die unbehandelte Probe wird direkt auf die SPE-Säule aufgegeben. Dort werden die Analyte über entsprechende chromatographische Prozesse extrahiert und die Probenmatrix simultan durch den Eluenten

abgereichert. Danach wird das 6-Wege Ventil geschaltet und die Analyte von der SPE-Säule auf eine in Serie geschaltete analytische Trennsäule transferiert.

Diese 2-Säulen-Technik, auch als Säulenschaltung oder LC-LC Kopplung bekannt, wurde zuerst 1971 von Huber et al.¹⁸ für die Bestimmung von Östrogenen im Urin von Schwangeren eingesetzt. Aufgrund der einfachen Instrumentierung und Handhabbarkeit hat die Säulenschaltung viele weitere Anwender gefunden, so dass allein im Jahr 2005 76¹⁹ Publikationen veröffentlicht wurden, die dieses Probenaufbereitungsverfahren zu Grunde legen. Diese Anwendungen stammen zu einem sehr großen Teil aus der Arzneistoffanalytik²⁰⁻²⁴ und zu einem kleineren Teil aus der Umweltanalytik²⁵⁻²⁷.

Die Vor- und Nachteile der on-line SPE sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der on-line SPE

Vorteile	Nachteile
Verbesserte Präzision und Richtigkeit	Mögliche Carry-over Effekte
Verbesserte Arbeitsplatzsicherheit	Mögliche systematische Fehler
Kostenersparnis durch kürzere Analysenzeiten	
Wiederholte Verwendung der SPE-Säulen	
Gesteigerter Probendurchsatz	

2.4 Restricted Access Materialien (RAM)

Werden biologische Flüssigkeiten direkt auf konventionelle SPE-Materialien aufgegeben, kommt es zur Denaturierung und unspezifischen Adsorption makromolekularer Probenbestandteile. Dies führt zum Verlust der Selektivität und der Kapazität der SPE-Kartusche bzw. -Säule. Um diese Effekte zu verhindern, wurden spezielle, maßgeschneiderte Adsorbentien entwickelt, die so genannten Restricted Access Materialien^{15,28,29}.

Die Bezeichnung „Restricted Access Materialien“ (RAM) wurde zum ersten Mal 1991 von Desilets eingeführt³⁰. Diese speziellen Packungsmaterialien erlauben die direkte Injektion und Trennung unbehandelter biologischer Flüssigkeiten. Bei der Probenaufbereitung biologischer

Flüssigkeiten mit Hilfe der Restricted Access Materialien werden zwei chromatographische Trennprinzipien simultan angewandt: Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und Adsorptionschromatographische Verfahren (z.B. Umkehrphasen-Chromatographie).

Das Funktionsprinzip beruht auf dem eingeschränkten Zugang makromolekularer Probenbestandteile zu dem Inneren der porösen Materialien. Probenbestandteile mit einer bestimmten Molekülgröße werden daher ausgeschlossen und eluieren im Totvolumen einer entsprechenden Säule. Wechselwirkungen mit der äußeren Oberfläche der Materialien, auf der beispielsweise hydrophile Glyceryl-Propyl-Gruppen lokalisiert sind, finden nicht statt^{28,31,32}.

2.4.1 Charakteristika der RAM-Materialien

Ausschlussbarriere

Die größe selektive Fraktionierung der Probenbestandteile wird durch eine Ausschlussbarriere erreicht, die den Zugang makromolekularer Verbindungen, z.B. Proteine, zum Poreninneren einschränkt. Dieser Ausschluss kann entweder über eine physikalische Ausschlussbarriere, wie z.B. die Größe des Porendurchmessers, oder über eine chemische Ausschlussbarriere erfolgen. Die chemische Ausschlussbarriere besteht aus einem Polymernetzwerk, welches kovalent oder adsorptiv an der Oberfläche des Materials gebunden ist. Dabei wird die Zugänglichkeit der Poren durch den Grad der Vernetzung bestimmt^{28,31}. Die Einteilung der Restricted Access Materialien ist in Abbildung 3 dargestellt.

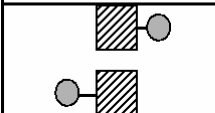
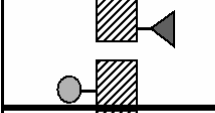
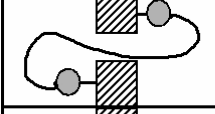
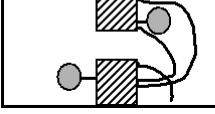
innen außen	Ausschlussbarriere	Topochemie	Typ	Kommerzielle Produkte
	physikalisch	uniform	A	ChromSpher 5 Biomatrix (Chrompack) CAT-PBA (Recipe)
	physikalisch	dual	B	ISRP GFFII (Regis Technologies) LiChrospher ADS (Merck KGaA)
	chemisch	uniform	C	Hisep (Supelco) Capcell Pak MF (Shiseido)
	chemisch	dual	D	Ultrabiosep (Shandon) BioTrap 500 (ChromTech) SPS (Regis Technologies) MAYI-ODS (Shimadzu)

Abbildung 3: Unterteilung der Restricted Access Materialien (nach Boos³³)

Biokompatible äußere Oberfläche

Die äußere Oberfläche der RAM-Materialien ist kompatibel gegenüber biologischen Flüssigkeiten. Daher können makromolekulare Probenbestandteile keine irreversiblen Wechselwirkungen mit dem Adsorbens eingehen und können im Totvolumen der SPE-Säule in den Abfall eluiert werden.

Adsorptive innere Oberfläche

Niedermolekulare Probenbestandteile können aufgrund ihrer Größe ungehindert in die Poren eindringen und werden dort an der adsorptiven Oberfläche extrahiert. Neben der Unterteilung der RAM-Materialien aufgrund der Beschaffenheit der Ausschlussbarriere ist eine weitere Unterscheidung durch die Topochemie möglich. Dabei wird zwischen Materialien mit uniformer und dualer Topochemie unterschieden. Adsorbentien mit dualer Topochemie besitzen auf der äußeren Oberfläche und im Poreninneren verschiedene Liganden, wogegen bei uniformen Adsorbentien innere und äußere Oberfläche die gleichen Liganden aufweisen. Bei den Liganden, die die adsorptive Oberfläche bilden, kann es sich um Umkehrphasen, Ionenaustauscher oder auch Affinitätschromatographische Funktionalitäten (z.B. Phenylboronsäure) handeln.

2.4.2 LiChrospher ADS

In der vorliegenden Arbeit wurde für die verwendeten SPE-Säulen das RAM Adsorbens LiChrospher[®] ADS der Firma Merck KGaA eingesetzt. Dieses für die Bioanalytik maßgeschneiderte SPE-Material wurde von Boos et al. entwickelt und gehört zu den dualen RAM Adsorbentien mit physikalischer Ausschlussbarriere³¹.

Die Bezeichnung ADS steht für Alkyl-Diol-Silica und spiegelt die Topochemie (Abbildung 4) dieser stationären Phase wieder. Der poröse Träger besteht aus ca. 25 µm großen, sphärischen Kieselgelpartikeln, deren äußere Oberfläche Diol-Gruppen aufweist. Diese hydrophilen und elektroneutralen Gruppen gewährleisten die Biokompatibilität dieses SPE-Materials dadurch, dass sie eine irreversible Adsorption von Proteinen und anderen makromolekularen Probenbestandteilen (z.B. Nukleinsäuren, Polysaccharide) verhindern. Im Poreninneren von LiChrospher[®] ADS sind Alkyl-Gruppen (Umkehrphase: C4, C8 oder C18) immobilisiert, die eine adsorptive stationäre Phase für die Extraktion niedermolekularer, apolarer Analyte bilden. Der Porendurchmesser (Ausschlussbarriere) beträgt 6 nm, so dass alle Probenbestandteile mit einem Molekulargewicht größer 15000 Da selektiv ausgeschlossen und im Totvolumen einer entsprechenden SPE-Säule eluiert werden können. Ein Vorteil derartiger RAM, wie z.B. des LiChrospher[®] ADS Materials, ist dessen Lebensdauer. Mit einer LiChrospher[®] ADS SPE-Säule können bis zu 50 ml Plasma analysiert werden, ohne dass eine Verschlechterung der chromatographischen Leistung des Materials auftritt^{31,33,34}.

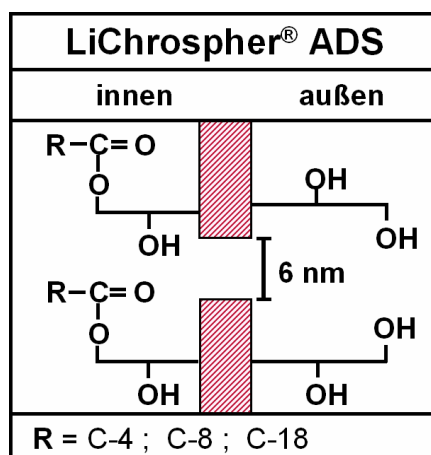


Abbildung 4: Topochemie des LiChrospher[®] ADS Materials³³

2.5 Mixed-Mode Materialien (MMP)

Mixed-Mode Materialien (MMP) sind poröse SPE-Adsorbentien, die eine duale Funktionalität aufweisen. Sie bestehen aus Kopolymer- bzw. Kieselgelpartikeln und besitzen sowohl die Fähigkeit zu hydrophoben Wechselwirkungen als auch zu Ionenaustausch-Wechselwirkungen. Da 80 % der Arzneistoffe Stickstoff enthalten, das sehr leicht protonierbar, d.h. basisch ist, eignen sich diese SPE-Materialien in besonderem Maße für die Extraktion von derartigen Arzneistoffen³⁵.

In der Vergangenheit wurden bevorzugt Mixed-Mode Materialien entwickelt, die starke Ionenaustausch-Funktionalitäten, wie z.B. Sulfonsäuregruppen, besitzen. Bei Verwendung dieser SPE-Materialien erfolgt die Extraktion eines basischen Arzneistoffes in folgender Weise. Zuerst wird das Adsorbens mit einer Säure äquilibriert, so dass der Kationenaustauscher in neutraler Form vorliegt. Der pH-Wert der Probe wird so gewählt, dass auch die Analyte nicht ionisiert sind. Nach der Probenaufgabe werden die Analyte und andere Matrixbestandteile durch hydrophobe Wechselwirkungen auf dem Adsorbens festgehalten. Danach wird das Material mit Wasser oder einer Pufferlösung gespült und erste Matrixbestandteile entfernt. Anschließend werden die Analyte durch einen Eluenten mit saurem pH-Wert ionisiert und durch ionische Wechselwirkungen am Adsorbens gebunden. Diese Wechselwirkungen sind stärker als die hydrophoben Wechselwirkungen, so dass die restlichen Matrixbestandteile durch Spülen mit einem organischen Lösungsmittel entfernt werden können. Die Desorption und Elution der Analyte erfolgt durch einen Eluenten mit basischem pH-Wert, da dieser die Analyte neutralisiert und die ionischen Wechselwirkungen auflöst^{13,36}. Für die LC-MS/MS Analytik basischer Pharmaka sind diese starken Ionenaustausch-Mixed-Mode Materialien nur bedingt geeignet. Gerade für die Elektrospray Ionisation (ESI) sollten die Zielanalyte bereits in einem ionisierten Zustand im Eluenten vorliegen, um die Ausbeute bei der Ionisation zu erhöhen. Bei Eluenten mit basischem pH ist dies nicht der Fall.

In den letzten Jahren wurden aber auch Materialien entwickelt, die schwache Ionenaustausch-Funktionalitäten besitzen. Diese Materialien ermöglichen die Extraktion und Desorption der Analyte durch die Veränderung der Ladung des Adsorbens, so dass die Analyte in einem für die Massenspektrometrie günstigen ionisierten Zustand bleiben³⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurden MMP Materialien untersucht, die schwache Kationenaustausch-Funktionalitäten besitzen. Die Extraktion basischer Analyte mit diesen Materialien unterscheidet sich von der beschriebenen Methode für starke Ionenaustausch MMPs wie folgt: Der pH-Wert des Eluenten und der Probe wird so gewählt, dass die Analyte in ihrer ionisierten Form vorliegen. Die positiv geladenen Analyte werden unter diesen Bedingungen an das Adsorbens gebunden. Für die Desorption bzw. Elution werden saure Eluenten verwendet. Dadurch werden die Karbonsäuregruppen des Austauschers neutralisiert und die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Adsorbens und den Analyten aufgehoben. Die Eigenschaften der verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Zusätzlich zu den vier MMP Materialien wurden im Rahmen der Arbeit auch vergleichend zwei schwache Kationenaustausch-Materialien untersucht.

Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten MMP Materialien

	Hersteller	Material	pH Bereich	Partikelgröße [µm]	Ionenaustausch Kapazität [meq/g]
Oasis WCX	Waters	Kopolymer	0 -14	30	0,75
Strata X-CW	Phenomenex	Kopolymer	1 – 14	33	0,75
CIM-CM		Kopolymer	1 – 14	Zerstoßener Monolith	1,6
Isolute HCX-Q	Separtis	Kieselgel + C8 Umkehrphase	2 - 8	50	0,3
Chromolith Flash XDS (Diol/COOH)	Merck	Modifiziertes Kieselgel	2 - 8	Monolith	-
Chromabond PCA	Macherey-Nagel	Kieselgel + Propylkarbonsäure	2 – 8	45	0,6

3 Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Die Massenspektrometrie (MS) umfasst in der Bioanalytik ein sehr breites Anwendungsspektrum. So wird die MS nach Erhebungen der DFG beispielsweise für Untersuchungen biochemischer Grundlagen, zur Strukturaufklärung, Identifizierung und Sequenzierung von Proteinen und Peptiden und insbesondere zur Analytik von einer Vielzahl endogener Verbindungen genutzt³⁷.

Massenspektrometrische Verfahren sind für die Bioanalytik niedermolekularer Verbindungen schon seit langem bekannt. In diesem Zusammenhang ist jedoch die Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie nur für einen relativ kleinen Teil von Zielanalyten geeignet.

Seit der apparativen Kopplung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) mit einem Massenspektrometer hat diese Technik die klassischen HPLC-Detektoren, wie z.B. UV oder Fluoreszenz, in dem Routinebetrieb der bioanalytischen Laboratorien weitgehend verdrängt. In der pharmazeutischen Industrie erfolgt die Analytik neuer Medikamente fast ausschließlich mittels LC-MS/MS, so dass diese instrumentelle Kopplung heute die bevorzugte Plattform für die Bestimmung organischer Verbindungen in biologischen Flüssigkeiten darstellt. Möglich wurde diese Entwicklung vor allem durch die Arbeiten von Dole und dem Nobelpreisträger Fenn mit der Entwicklung von Ionisationstechniken, die unter Atmosphärendruck arbeiten^{38,39}.

3.1 Ionisationstechniken

3.1.1 Elektrospray (ESI)

Der schematische Aufbau einer Elektrospray Ionisationsquelle (ESI-Quelle) ist in Abbildung 5 dargestellt. Bei der Elektrospray Ionisation werden die Analyte zusammen mit dem HPLC Eluenten durch eine Edelstahlkapillare geleitet, an die eine hohe Spannung angelegt ist, und versprüht. Bei sehr geringen Flussraten ($\mu\text{l}/\text{min}$) ist die Potentialdifferenz ausreichend, um ein Spray zu erzeugen. Bei höheren Flussraten muss die Vernebelung durch einen Stickstofffluss unterstützt werden, um ein stabiles Spray zu erhalten. Für die Ionisierung mittels Elektrospray ist es notwendig, dass die Analyte bereits ionisiert im HPLC-Eluenten vorliegen. Durch die

angelegte Hochspannung werden kleine Tröpfchen erzeugt, die einen Ladungsüberschuss entsprechend der Polarität der angelegten Spannung besitzen. Die überzähligen Ladungen sind an der Oberfläche der Tröpfchen lokalisiert. Beim Verdampfen des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfenoberfläche zunimmt. Wird das so genannte Rayleigh-Limit erreicht, zerfallen die Tröpfchen aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladungen (Coulomb-Explosionen). Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Das Charge Residue Model (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht davon aus, dass letztlich winzige Tropfen von ca. 1 nm Durchmesser verbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Beim Ion Evaporation Model (IEM, Ionen-Emissionsmodell) werden bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert.^{40,41} Danach werden die gebildeten Analyt-Ionen durch die Ionenoptik in den Analysator des Massenspektrometers übergeführt^{39,42,43}. Mit der Elektrospray Ionisation ist es möglich, mehrfach geladene Ionen zu erzeugen. Aus diesem Grund ist die ESI sehr gut für die Analyse großer Moleküle, z.B. von Proteinen, geeignet.

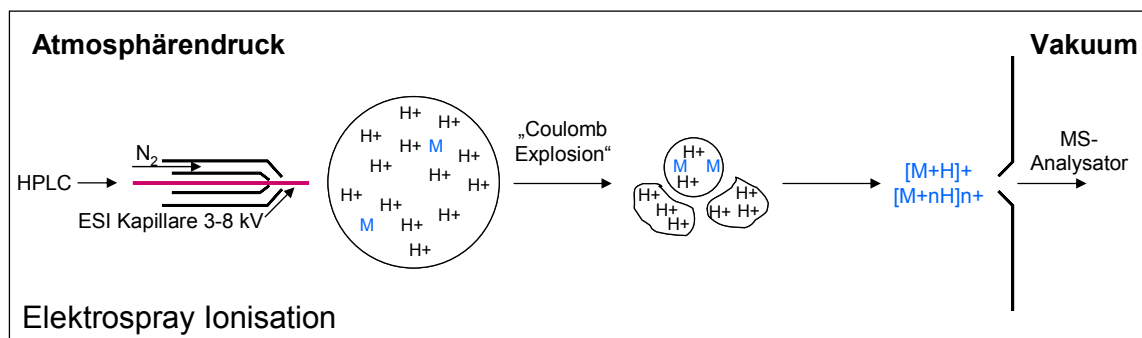


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Elektrospray Quelle

3.1.2 Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI)

Auf die APCI soll nur kurz eingegangen werden, da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der Elektrospray-Ionisation gearbeitet wurde.

Bei der Chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck (siehe Abbildung 6) wird der HPLC-Eluent aus einer Quarzkapillare pneumatisch zerstäubt und dabei durch eine Heizung bereits in die Gasphase überführt. Vor der Quarzkapillare ist eine sehr spitze Metallnadel

positioniert, die ein starkes elektrisches Feld erzeugt. Der Corona-Effekt beschreibt die partielle Entladung um einen elektrischen Leiter mit sehr hohem Potential. Dies führt zur Ionisation der die Nadel umgebenden Atmosphäre. Natürlich auftretende Corona-Effekte sind z.B. Elmsfeuer.

In der APCI-Quelle stellen der Lösungsmitteldampf des HPLC-Eluenten und Stickstoff die Atmosphäre um die Corona-Nadel dar. Der Lösungsmitteldampf wird durch Corona-Entladungen ionisiert. Dabei entstehen reaktive Ionen (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+), die durch Ionen-Molekül-Reaktionen (Clusterbildung) ihre Ladung auf die Analytmoleküle übertragen^{40,41,44}.

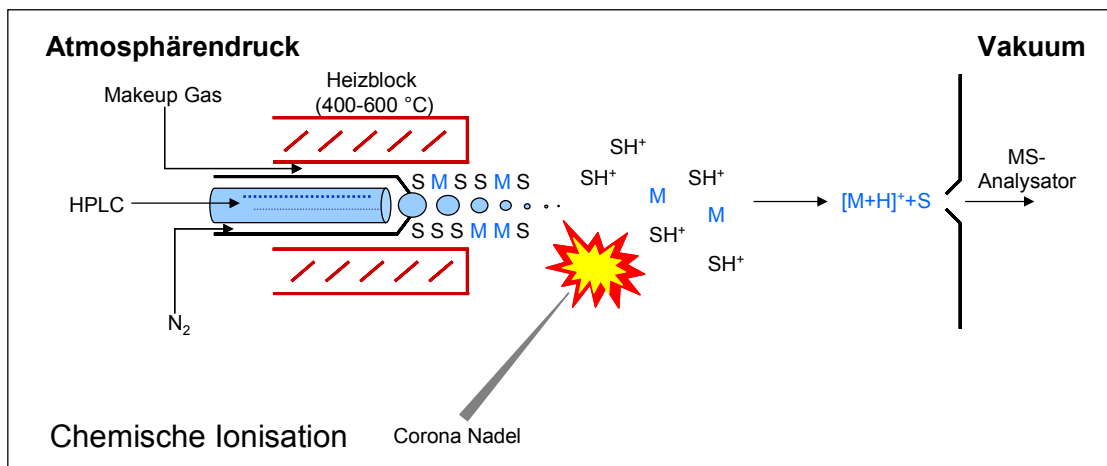


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer APCI-Quelle

3.2 Tandem-Massenspektrometrie

Durch die Verwendung von Tandem-Massenspektrometern (MS/MS) ist es möglich, höhere Selektivitäten und Empfindlichkeiten bei der Detektion der Analyte zu erreichen. Durch die Massenspektrometer erfolgt eine Auftrennung der Analyte nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z).

Die Tandem-Massenspektrometer werden dabei nach ihrem Aufbau unterschieden. Neben dem, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Triple-Quadrupol-MS werden auch Quadrupol-Ion-Trap-MS und Quadrupol-Time-of-Flight-MS in der Praxis eingesetzt.

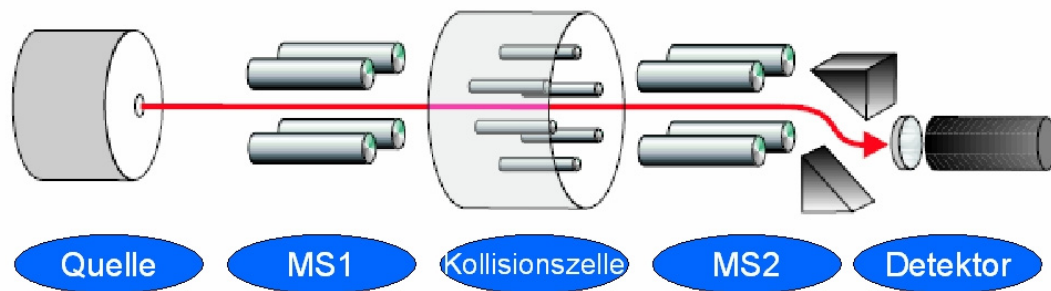


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol Massenspektrometers⁴⁵

Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers, dabei werden drei Quadrupole in Reihe geschaltet. Der erste Quadrupol (MS1) dient der Selektion der in der Quelle (APCI, ESI) ionisierten Analyte. Im zweiten Quadrupol, der so genannten Kollisionszelle, können die Analyt-Ionen fragmentiert und im dritten Quadrupol (MS2) detektiert werden⁴⁰. Durch Stoßaktivierung (Collision Induced Dissociation, CID) werden die in MS1 ausgewählten Precursorionen zu Produktionen fragmentiert. Die notwendige kinetische Energie für diesen Prozess wird durch die an der Kollisionszelle angelegte Spannung gesteuert. Sehr hohe Spannungen führen zu einer sehr starken Fragmentierung der Precursorionen, während niedrige Spannungen zu weniger starken Fragmentierungen führen.

Im Folgenden sollen kurz die Modi Operandi eines Triple-Quadrupol Massenspektrometers erläutert werden. In Abbildung 8 sind diese schematisch dargestellt.

- (1) Produktionen-Scan: Dabei wird ein im MS1 herausgefiltertes Ion in der Kollisionszelle fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden im MS2 detektiert⁴⁶.
- (2) Neutral-Loss-Scan: Beim Neutral-Loss-Scan wird eine Massendifferenz zwischen dem MS1 und MS2 bestimmt, die das Ergebnis der Abspaltung eines Neutralteilchens in der Kollisionszelle ist. Mögliche Neutralteilchen sind z.B. $\text{H}_2\text{O} - 18 \text{ Da}$, $\text{CH}_3\text{OH} - 32 \text{ Da}$ oder $\text{NH}_3 - 17 \text{ Da}$, aber auch Glucuronsäurereste 176 Da ⁴⁶.
- (3) Precursorionen-Scan: Bei dieser Technik wird im MS2 nur die Masse eines festgelegten Fragmentes aus der Kollisionszelle detektiert, während im MS1 über

einen festgelegten Massenbereich gescannt wird. So ist es möglich, alle Moleküle zu detektieren, die ein spezifisches Fragment bilden⁴⁶.

- (4) Multiple Reaction Monitoring (MRM): Dabei werden sowohl im MS1 als auch im MS2 nur bestimmte m/z -Verhältnisse herausgefiltert. Dadurch werden nur Analyte detektiert, bei denen die entsprechenden Precursor- und Produktionen gebildet werden. Mit diesem Modus ist die selektivste und empfindlichste Arbeitsweise mit dem Tandem-MS möglich⁴⁶.

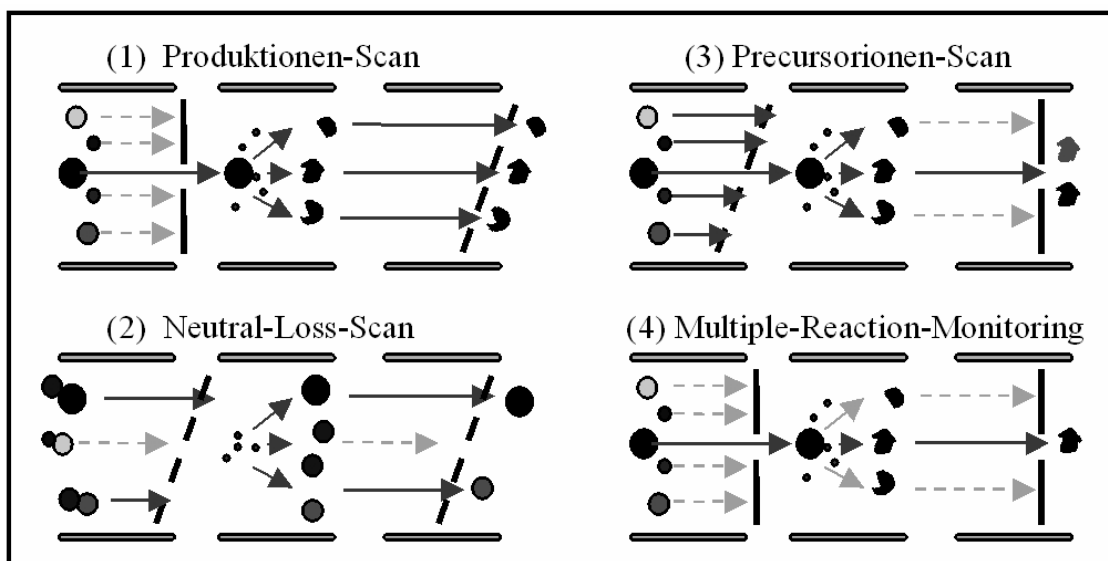


Abbildung 8: Modi Operandi in der Tandem-Massenspektrometrie

Zusätzlich zu den tandem-massenspektrometrischen Modi Operandi kann ein Tripl-Quadrupol MS auch die beiden Aufnahmearten MS-Scan und SIM (single ion monitoring) eines einfachen (single) Massenspektrometers durchführen. In beiden Fällen wird nur der erste Quadrupol (MS1) genutzt. Bei einem MS-Scan werden alle Ionen innerhalb eines gegebenen Massenbereiches aufgezeichnet, während beim SIM-Modus nur ausgewählte Ionen betrachtet werden.

Trotz der hohen Selektivität der Tandem-Massenspektrometrie kann bei komplexen und stark matrixbelasteten Proben, wie z.B. biologischen Flüssigkeiten, auf eine ausreichend selektive HPLC-Trennung und Probenaufbereitung nicht verzichtet werden. Unerwünschte und unvorhersehbare Matrixeffekte verfälschen oftmals das Analyseergebnis^{46,47}.

3.3 Matrixeffekte in der bioanalytischen LC-MS/MS

Basierend auf der Spezifität und Selektivität der Massenspektrometer sind in den vergangenen Jahren Fehleinschätzungen bezüglich deren Anwendung für die quantitative Analyse komplexer biologischer Proben entstanden⁴⁸:

Diese betreffen insbesondere die Aufbereitung von biologischen Flüssigkeiten und deren chromatographische Trennung. Beide Trennschritte wurden dabei minimiert bzw. sogar eliminiert („Dilute and Shoot“-Prinzip)^{49,50}.

Die entsprechenden LC-MS/MS Verfahren sind daher sehr anfällig gegenüber Matrixeffekten, insbesondere der Ionensuppression⁵¹.

80 % aller Publikationen im Bereich der LC-MS/MS nutzen die Elektrospray Ionisation, die sehr vielseitig aber auch anfälliger für Matrixeffekte ist. Im Gegensatz zur APCI finden bei der ESI die Ionisation und die Überführung der Analyte in die Gasphase in einem Schritt statt.

Matrixeffekte resultieren aus der Veränderung der Ionisationseffizienz der Analytmoleküle durch die Anwesenheit koeluierender Substanzen⁵²⁻⁵⁴. Sie können zu Fehlern bei der Quantifizierung der Analyte führen. Auch wenn die Signale der störenden Substanzen nicht aufgezeichnet werden, kann ihre Anwesenheit die Reproduzierbarkeit und die Richtigkeit stark beeinflussen. Daher kann es bei niedrigen Analytkonzentrationen trotz der sehr selektiven Arbeitsweise des Massenspektrometers zur vollständigen Unterdrückung der Analytsignale kommen^{47,51,55}.

Die Matrixeffekte bei der LC-MS/MS beeinflussen sowohl die Nachweisgrenze aufgrund der verminderten Signalintensität als auch die Reproduzierbarkeit, Linearität und Quantifizierung. Es kann zu Unregelmäßigkeiten bei der Berechnung des Verhältnisses gebildeter Ionen kommen. Außerdem wird eine zu geringe Analytkonzentration gefunden⁵⁶.

3.3.1 Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte

Die Mechanismen und Ursachen der Matrixeffekte bei der Elektrospray Ionisation wurden in den letzten Jahren ausführlich untersucht, werden aber immer noch kontrovers diskutiert^{47,48,51-53,56-59}.

Wie bereits beschrieben, werden Matrixeffekte durch koeluiierende Verbindungen ausgelöst. Diese lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Zum einen in endogene Verbindungen, die in der Probe vorliegen und durch die Probenaufbereitung nicht entfernt werden. Zum anderen in exogene Verbindungen, die nicht in der Probe vorliegen, sondern aus externen Quellen stammen^{48,56}.

Zu der ersten Gruppe zählen unter anderem ionische Verbindungen (Elektrolyte, Salze), sehr polare Substanzen (z.B. Phenole) aber auch eine Vielzahl unterschiedlicher organischer Verbindungen, wie zum Beispiel Kohlenhydrate, Amine, Lipide oder auch Peptide.

Zu der zweiten Gruppe gehören zum Beispiel Polymerrückstände, Phthalate, Abbauprodukte von Detergentien, Ionenpaarbildner oder Protonenaustausch fördernde Substanzen (z.B. org. Säuren).

Es wurden drei Mechanismen für die Entstehung der Matrixeffekte postuliert^{56,57,59}:

- Die Verringerung der Verdampfungseffizienz aufgrund der Erhöhung der Viskosität und Oberflächenspannung der Tröpfchen durch die Anwesenheit störender Matrixbestandteile. Dies kann die Möglichkeit der Analyte die Gasphase zu erreichen verringern.
- Die Konkurrenz zwischen den Zielanalyten und Matrixbestandteilen um die maximale Ionisationseffizienz.
- Bereits ionisierte Analytmoleküle können beim Übergang in die Gasphase durch Protonentransfer-Reaktionen mit neutralen Substanzen wieder neutralisiert werden, wenn diese Substanzen eine höhere Protonenaffinität als die Analyte ausweisen.

3.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte

Die Bestimmung der Matrixeffekte kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen.

Eine Methode der Bestimmung basiert auf der Injektion von Standardproben und dotierten Matrixproben mit bekannten Konzentrationen. Auf diese Weise werden Matrixeffekte durch Intensitätsunterschiede sichtbar. Eine geringere Intensität der Analyte in der Matrixprobe lässt auf die Unterdrückung der Ionisation der Analytmoleküle schließen^{48,52,53,60,61}.

Diese schnelle, statische Methode besitzt allerdings den Nachteil, dass die Matrixeffekte nur an der Position des Analytpeaks sichtbar gemacht werden und erlaubt keinen Rückschluss auf die gesamte Analysenzeit.

Eine weitere, dynamischere Vorgehensweise für die Bestimmung der Matrixeffekte wurde 1999 von King et al. beschrieben⁴⁷. Ein Schema dieser Nachsäulen-Infusionstechnik ist in Abbildung 9 dargestellt. Zwischen dem HPLC-System und dem Massenspektrometer wird ein T-Stück eingesetzt, worüber eine Standardlösung der Analyte mittels einer Spritzenpumpe in den Eluentstrom infundiert wird (Abbildung 9 B). Nachdem Erreichen einer stabilen Basislinie, wird eine entsprechend aufbereitete Probe (ohne Analyte) in das HPLC-System injiziert. Alle Substanzen, die vom HPLC-System eluiert werden und die die Ionisation der Analyten beeinflussen, verursachen Störungen in der Basislinie im Infusionschromatogramm (Abbildung 9 C)^{51,52,55,57,62}.

Mit Hilfe dieser Methode können die Matrixeffekte über die gesamte Analysenzeit sichtbar gemacht und aufgezeichnet werden.

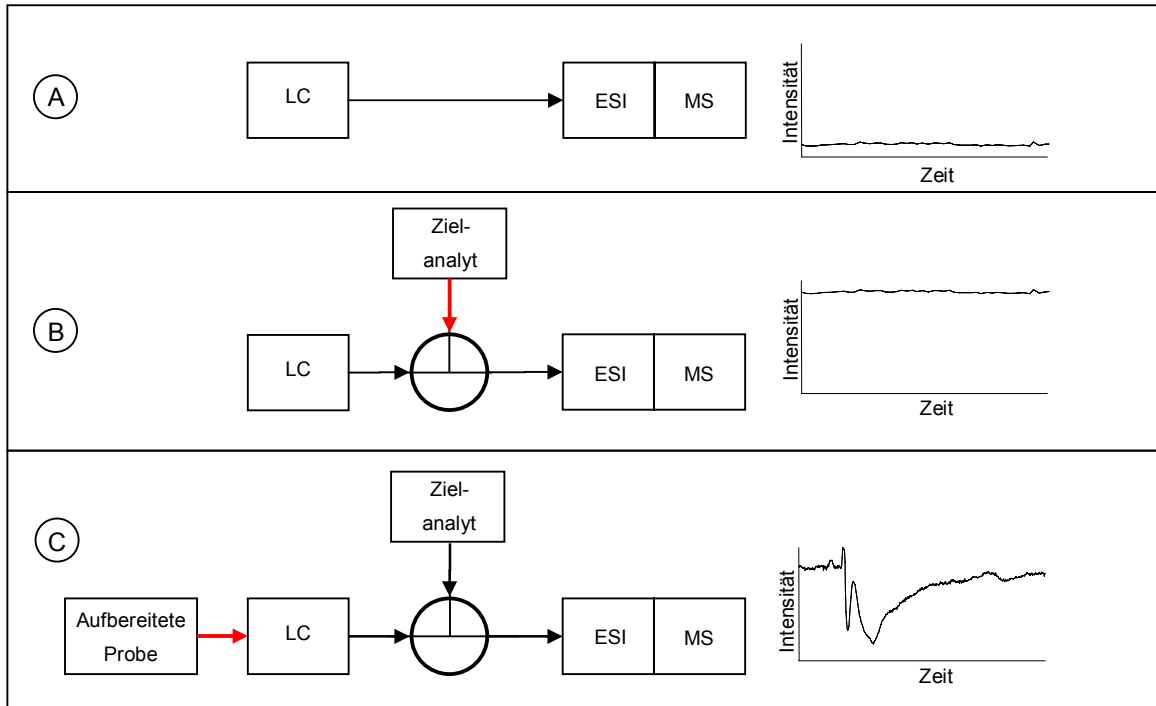


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Nachsäulen-Infusion zur Bestimmung von Matrixeffekten

3.3.3 Lösungsansätze

Für das Problem der Matrixeffekte bei der LC-MS/MS Analytik biologischer Flüssigkeiten wurden einige Lösungsansätze vorgeschlagen. Dazu gehören die Verwendung interner Standards, komplexe Extraktionsprotokolle, schnelle (ballistische) Gradienten und die on-line SPE^{48,51,52,63-65}.

Die Verwendung selbst eines stabilisotopenmarkierten internen Standards (IS) ist kein Garant für eine ungestörte Richtigkeit und Präzision. Matrixeffekte können auch die Intensitätsverhältnisse zwischen Analyt und internem Standard ändern^{48,63}.

Der Lösungsansatz der vorliegenden Arbeit besteht in der Eliminierung der Matrixeffekte durch eine selektive multidimensionale Festphasenextraktion bzw. Anreicherung der Zielanalyte und Abreicherung der störenden makro- und niedermolekularen Matrixbestandteile.

4 Trizyklische Antidepressiva

Für die Entwicklung der MD-SPE Plattform (multidimensionale Festphasenextraktion) wurden die trizyklischen Antidepressiva (TZA) als Modellsubstanzen ausgewählt. Sie sind eine pharmakologisch nicht einheitliche Substanzklasse. Im Gegensatz zu den neueren Antidepressiva, wie den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI), wurden sie nicht aufgrund ihres Wirkmechanismus in einer Gruppe zusammengefasst, sondern aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur. Die TZA leiten sich chemisch vom Dibenzazepingerüst bzw. Dibenzocycloheptadiengerüst ab. Alle tragen an einem N- bzw. C-Atom des zentralen siebengliedrigen Ringes in 5-Stellung eine Seitenkette. Diese besteht aus einer Kette von 3 C-Atomen mit einer Dimethylamino- oder Monomethylamino-Gruppe. Das Dreiringsystem der trizyklischen Antidepressiva ist stark gewinkelt. Bei Maprotilin handelt es sich um ein so genanntes tetrazyklisches Antidepressivum. Es weist ein sehr ähnliches Wirkprofil wie die TZA auf und wird aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als Modellsubstanz verwendet. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der trizyklischen Antidepressiva sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften der trizyklischen Antidepressiva⁶⁶

	pKa	Log P
Amitriptylin	9,1	4,92
Clomipramin	9,71	5,53
Desipramin	10,63	4,13
Doxepin	8,92	3,86
Imipramin	9,73	4,8
Maprotilin	10,63	4,51
Norclomipramin	10,6	4,86
Nordoxepin	9,79	4,59
Nortriptylin	9,98	5,65
Trimipramin	9,73	5,15

4.1 Pharmakodynamik

4.1.1 Wirkmechanismus

Die Wirkung der trizyklischen Antidepressiva (TZA) basiert primär auf einer Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Serotonin (5-HT) und Noradrenalin (NA) aus dem synaptischen Spalt in die Synapse durch die Blockade der entsprechenden Transporter. Die Noradrenalin-Wiederaufnahme wird bevorzugt durch TZA mit sekundärem Amin an der aliphatischen Seitenkette gehemmt (Desipramin, Nortriptylin). Dies geht mit einer stärkeren Antriebssteigerung einher als bei TZA mit tertiärem Amin, welche die Noradrenalin und Serotonin-Wiederaufnahme etwa gleichstark hemmen (Amitriptylin, Imipramin).

Die psychomotorische Wirkung der TZA und die Hemmung der Monoamin-Wiederaufnahme setzten sofort nach Beginn der Therapie ein, während die antidepressive Wirkung erst nach zwei bis vier Wochen einsetzt. Für die stimmungsaufhellende Wirkung der TZA sind demnach neurochemische Folgewirkungen der Transporterhemmung von Bedeutung. Die chronische Erhöhung der Monoaminkonzentration im synaptischen Spalt kann die Affinität und Dichte postsynaptischer β -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A} Rezeptoren sowie präsynaptischer Autorezeptoren beeinflussen - β -Down-Regulation, α_1 -Up-Regulation und 5-HT₂-Down-Regulation.

Diese Erkenntnisse führten zu der heutigen Annahme, dass depressive Störungen durch einen Monoaminmangel verursacht werden, der die Empfindlichkeit prä- und postsynaptischer Rezeptoren für Noradrenalin und Serotonin verändert. Diese Veränderung kann durch die langfristige Therapie mit Antidepressiva normalisiert werden⁶⁷⁻⁶⁹.

4.1.2 Anwendung und Dosierung

Trizyklische Antidepressiva werden seit langem sehr erfolgreich bei der Psychopharmakotherapie depressiver Erkrankungen eingesetzt. Einige TZA, z.B. Clomipramin, wurden auch für die Therapie von Phobien, Panikstörungen und Zwangsstörungen oder auch, wie z.B. Amitriptylin, für die Behandlung chronischer Schmerzen getestet⁶⁸⁻⁷⁰.

Die verschiedenen trizyklischen Antidepressiva besitzen vier Hauptwirkkomponenten:

- a) Depressionslösung,
- b) Psychomotorische Dämpfung bzw. Aktivierung,
- c) Angstlösung (Anxiolyse),
- d) Antisuizidale Wirkung (bei sedierend wirkenden TZA).

Alle Antidepressiva wirken stimmungsaufhellend, unterscheiden sich jedoch durch die vorwiegend psychomotorisch aktivierenden bzw. dämpfenden Eigenschaften. Für die dämpfende Wirkung einiger TZA ist die Blockade von H₁-Histamin-Rezeptoren, z.B. bei Amitriptylin und Doxepin, mitverantwortlich. Bei den TZA Imipramin und Clomipramin ist die dämpfende Wirkung nur gering ausgeprägt und Nortriptylin und Desipramin besitzen eher eine antriebsteigernde Wirkung, wodurch das Suizidrisiko erhöht wird. Aus diesem Grund werden suizidgefährdeten Patienten eher sedierende TZA verordnet⁶⁷.

Durch das häufige Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) werden TZA einschleichend dosiert. Die therapeutische Dosis liegt zwischen 30 bis 250 mg pro Tag. Die Verteilung der Einzeldosen über den Tag ist abhängig von den Eliminationshalbwertszeiten der TZA. Bei den meisten Pharmaka dieser Klasse ist eine Dosis pro Tag ausreichend, die bevorzugt, vor allem bei sedierend wirkenden TZA (ATL), abends verordnet wird.

Aufgrund der unten beschriebenen Nebenwirkungen bei der therapeutischen Dosis liegen fast 90 % aller Verschreibungen von älteren trizyklischen Antidepressiva unter dem anerkannten, effektiven Dosierungslevel. Die tägliche Dosierung der TZA ist in Tabelle 4 aufgeführt.

4.1.3 Unerwünschte Wirkungen

Die medikamentöse Therapie depressiver Erkrankungen durch trizyklische Antidepressiva wird in einer Vielzahl der Fälle durch das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) begleitet. Ein Viertel der Patienten klagt über das Auftreten unerwünschter Wirkungen, dabei ist es zumeist schwierig, die UAW von Krankheitssymptomen zu unterscheiden, da sich diese häufig gleichen. Sowohl die therapeutischen als auch die unerwünschten Wirkungen der trizyklischen Antidepressiva basieren zumeist auf der Beeinflussung synaptischer Prozesse⁶⁷⁻⁶⁹.

Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen lassen sich pharmakologisch auf die Blockade einer ganzen Reihe zentraler und peripherer Rezeptoren zurückführen, die für die antidepressive Wirkung nicht von Bedeutung sind. Das Ausmaß der Blockade dieser Rezeptoren prägt das Bild der Nebenwirkungen. So werden durch die Blockade der Muscarin-Rezeptoren UAW wie Mundtrockenheit, Akkomodationsstörungen, Mydriasis, Obstipation, Tachykardie und Miktionsbeschwerden sowie Delirien ausgelöst, die jedoch bei längerer Therapie wieder abklingen. Durch die Blockade peripherer α_1 -Adrenozeptoren werden unerwünschte Wirkungen wie z.B. orthostatische Störungen mit reflektorischer Tachykardie ausgelöst. Chinidinartige Eigenschaften der TZA sind für direkte, kardiale Wirkungen (Herabsetzung der Erregungsleitung) verantwortlich. Die Blockade von 5-HT₂-Rezeptoren und / oder H₁-Rezeptoren kann zu Gewichtszunahme führen. Außerdem können TZA die Krampfschwelle senken und mit einer Inzidenz von 0,1 – 2,2 % epileptische Anfälle auslösen⁷⁰. Sedation und Schläfrigkeit sind zentrale Nebenwirkungen, die wie bereits erwähnt durch die Blockade von H₁-Rezeptoren verursacht werden⁶⁷⁻⁷⁰.

4.2 Pharmakokinetik

Ein Großteil der pharmakokinetischen Eigenschaften der TZA lässt sich auf die hohe Lipophilie zurückführen. Sie werden sehr schnell und fast vollständig aus dem Gastro-Intestinaltrakt resorbiert und erreichen die maximalen Plasmakonzentrationen ca. 2-12 h nach Einnahme. Aufgrund des hohen hepatischen First-Pass Metabolismus schwankt die endgültige orale Bioverfügbarkeit jedoch sehr stark (30-80 %). Die TZA besitzen eine sehr starke Proteinbindung (> 90 %) und ein großes scheinbares Verteilungsvolumen von ca. 10-50 l/kg. Aus diesem Grund erfolgt die Elimination aus dem Plasma nur langsam (Eliminationshalbwertszeiten $t_{1/2}$ 12-36 h). Die Metabolisierung der TZA erfolgt hepatisch, wobei hauptsächlich die Enzyme des Cytochrom P450 Enzymsystems und UDP-Glucuronosyltransferasen beteiligt sind. In Phase I werden vor allem N-Demethylierungen, N-Oxidationen sowie Ring- und Seitenkettenhydroxylierungen katalysiert. Die bei der N-Demethylierung tertiärer Amine, wie z.B. Amitriptylin oder Imipramin, entstehenden sekundären Amine (Nortriptylin, Desipramin) sind ebenfalls pharmakologisch wirksam. Nach der Konjugation mit Glucuronsäuren in Phase II werden die trizyklischen Antidepressiva renal ausgeschieden^{67-69,71,72}.

In Tabelle 4 sind die pharmakokinetischen Eigenschaften der TZA dargestellt.

Tabelle 4: Pharmakokinetische Daten der TZA⁷²⁻⁷⁵

Substanz	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	Verteilungs- volumen V_d [l/kg]	Protein- bindung [%]	Bioverfüg- barkeit [%]	Dosis [mg/d]
Amitriptylin	9 - 46	8 - 36	> 90	30 - 60	50-150
Clomipramin	20 - 30	7 - 20	> 90	36 - 62	50-200
Desipramin	12 - 28	24 - 60	> 90	33 - 51	75-250
Doxepin	8 - 36	15 - 20	> 80	13 - 45	30-150
Imipramin	6 - 56	9 - 23	80 - 90	22 - 77	50-225
Maprotilin	27 - 58	16 - 32	88	79 - 87	75-200
Nortriptylin	18 - 56	15 - 23	> 90	46 - 70	75-225
Trimipramin	16 - 40	17 - 48	90	18 - 63	75-300

4.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)

Das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) ist ein multidisziplinärer Prozess, der die Lücke zwischen Patient und Arzt durch die klinische Pharmakologie schließen soll. Es wird genutzt, um beispielsweise die psychiatrische Pharmakotherapie durch individuelle Dosisanpassung zu optimieren⁷⁶. Fehlerfreie und klinisch aussagekräftige Ergebnisse können nur durch die Zusammenarbeit von Wissenschaftlern, Ärzten, Krankenschwestern und Pharmakologen erzielt werden.

Für viele Pharmaka konnte eine Beziehung zwischen den klinischen Effekten und den Arzneimittelkonzentrationen im Plasma etabliert werden. Die Plasmakonzentrationen dienen dabei als messbare Alternative für die nur sehr schwer messbaren Konzentrationen in den Geweben.

Die Messung der Plasmakonzentrationen ist besonders für Pharmaka notwendig, die einen sehr engen therapeutischen Bereich und einen niedrigen therapeutischen Index (Digoxin, Lithium) aufweisen, die eine dosisabhängige Eliminationskinetik besitzen (Phenytoin) oder

die große individuelle Unterschiede in der Metabolisierung aufweisen (trizyklische Antidepressiva).

Für das therapeutische Drug Monitoring der trizyklischen Antidepressiva wurde gezeigt, dass die Kombination von therapeutischem Drug Monitoring und der klinischen Beurteilung während der frühen Phase der Behandlung der Depression ein besseres Outcome für den Patienten ermöglicht⁷⁷. Dabei wurde auch festgestellt, dass die Zusammenarbeit zwischen behandelnden Ärzten und dem klinisch-chemischen Personal durchaus zu verbessern ist⁷⁷⁻⁷⁹.

2004 wurden durch die TDM-Gruppe der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) Richtlinien für ein sinnvolles therapeutisches Drug Monitoring und die Anforderungen an die analytischen Methoden ausgearbeitet⁷¹. In diesem Dokument werden auch Indikationen für ein therapeutisches Drug Monitoring und arzneimittelspezifische Empfehlungen für Plasmakonzentrationen gegeben. Die empfohlenen therapeutischen Bereiche sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Empfohlene therapeutische Bereiche für das Monitoring der trizyklischen Antidepressiva in Plasma/Serum⁷¹.

Pharmakon plus aktiver Metabolit	Empfohlener therapeutischer Bereich [ng/ml]
Amitriptylin plus Nortriptylin	80 – 220
Clomipramin plus Norclomipramin	175 – 450
Desipramin	100 – 300
Doxepin plus Nordoxepin	50 – 150
Imipramin plus Desipramin	175 – 300
Maprotilin	125 – 200
Nortriptylin	70 – 170
Trimipramin	150 – 350

Die analytischen Verfahren zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen sollten ausreichend präzise, richtig und robust sein, d.h. die gefundenen Konzentrationen sollten nicht mehr als 15 % vom wahren Wert abweichen und die Variationskoeffizienten sollten kleiner 15 % betragen. Die Methoden müssen im Hinblick auf die Linearität, Selektivität, Richtigkeit, Präzision, Wiederfindungsraten und Sensitivität (Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD), Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ)) validiert werden. Außerdem sollen die

Laboratorien nicht nur die Arzneistoffe sondern auch deren aktive Metabolite bestimmen, wie zum Beispiel Nordoxepin im Fall von Doxepin.

Die Bestimmung der Arzneistoffspiegel erfolgt entweder im Serum oder im Plasma, wobei die gefundenen Konzentrationen im Normalfall übereinstimmen⁸⁰.

4.3.1 Indikationen für TDM

Die Indikationen für ein therapeutisches Drug Monitoring sind im Folgenden kurz aufgeführt^{71,81,82}.

- Verdacht auf Non-Compliance,
- Fehlende oder ungenügende therapeutische Wirkung bei adäquater Dosis,
- Unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei normaler Dosis,
- Verdacht auf Arzneimittelinteraktionen,
- Vorbeugung von Rückfällen bei Langzeit- und Präventivbehandlungen,
- Rückfall bei adäquater Dosis und guter Compliance,
- Vorhandensein genetischer Polymorphismen, die die Metabolisierung des Pharmakons betreffen,
- Kinder und Jugendliche,
- Patienten älter als 65 Jahre,
- Patienten mit Komorbiditäten,
- Forensische Psychiatrie,
- Probleme bei Wechsel von Originalpräparat zu Generikum (oder umgekehrt).

Die trizyklischen Antidepressiva weisen große interindividuelle Unterschiede auf, so dass die Plasmakonzentrationen bei einer bestimmten Dosis bis zu 40-fach schwanken können. Die klinische Relevanz dieser Variabilität ist, dass bei einer Standarddosierung nur einige Patienten die optimale Gewebekonzentration aufweisen, die mit einem guten Ansprechen auf die Therapie verbunden sind⁸³. Alle anderen Patienten haben zu hohe oder zu niedrige Arzneimittelspiegel.

Die große Variabilität der Plasmakonzentrationen beruht auf einer ganzen Reihe von Gründen. Zum einen werden die trizyklischen Antidepressiva unter anderem über das Enzym

Cytochrom P450 2D6 metabolisiert, das einem beträchtlichen Polymorphismus unterliegt^{84,85}. Zum anderen haben aber auch das Alter, das Geschlecht, Rauchen und beeinträchtigte Organfunktionen einen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen^{82,86}.

Eine weitere wichtige Indikation für ein therapeutisches Drug Monitoring ist die Verminderung der Non-Responder. Ein fehlendes Ansprechen auf eine Therapie kann auf die fehlende Compliance des Patienten zurückzuführen sein, aber auch auf Interaktionen mit anderen Arzneimitteln, einer zu schnellen Metabolisierung der TZA oder einer zu geringen Dosis, so dass kein ausreichender Plasmaspiegel aufgebaut werden kann⁸⁷.

4.3.2 Analytik der Trizyklischen Antidepressiva

Die ersten Verfahren für die Bestimmung trizyklischer Antidepressiva wurden 1960 entwickelt⁸⁸. Sie basierten auf Papierchromatographie mit anschließender photometrischer Detektion und besaßen nicht die notwendige Empfindlichkeit für das Monitoring im therapeutischen Bereich.

Seit dieser Zeit wurden andere Verfahren für die Analytik der trizyklischen Antidepressiva entwickelt. Gaschromatographische Verfahren mit Flammenionisationsdetektion⁸⁹ oder auch Stickstoff-Phosphor selektiver Detektion⁹⁰ wurden für das Monitoring verwendet. Spezifischer und sensitiver waren jedoch Verfahren mit einem Massenspektrometer als Detektor⁹¹⁻⁹³. Die gaschromatographischen Verfahren nutzen vor allem die Flüssig-Flüssig Extraktion als Probenaufbereitungsmethode.

Quantitative Immunoassays (EMIT, FPIA) konnten sich aufgrund ihrer Kreuzreaktivitäten und der Überbewertung z.B. von Imipraminkonzentrationen im therapeutischen Drug Monitoring nicht durchsetzen und werden nur für die Bestimmung von Überdosen eingesetzt⁹⁴⁻⁹⁶.

Am weitesten verbreitet für die Analytik der TZA ist die Flüssigchromatographie. Hauptsächlich werden die Analyte mittels UV-Detektion bei den Wellenlängen 254 nm, 242 nm und 226 nm quantifiziert⁹⁷⁻¹⁰⁴. Es wurden aber auch Methoden mit Diodenarray-Detektion^{105,106}, Elektrochemischer-Detektion¹⁰⁷ und Chemilumineszenz-Detektion¹⁰⁸ publiziert.

In neuerer Zeit werden hauptsächlich flüssigchromatographische Methoden gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt, da diese Verfahren die höchste Sensitivität

und Spezifität ermöglichen^{10,109-114}. Bei diesen Methoden stehen aber vorwiegend neuere Antidepressiva im Vordergrund.

In den publizierten Analysemethoden können die verwendeten Probenaufbereitungsverfahren ebenfalls in drei große Gruppen unterteilt werden.

Bei vielen gaschromatographischen Verfahren, zum Teil aber auch bei den HPLC-UV und HPLC-MS Verfahren wurde die Flüssig-Flüssig Extraktion mit Isoamylalkohol oder Hexan für die Probenaufbereitung eingesetzt^{90,91,101,111}.

Bei dem Großteil der flüssigchromatographischen Verfahren wird die Festphasenextraktion verwendet. Hierbei wird zwischen manuellen off-line Methoden^{99,102,104,115,116} und on-line Methoden mit Säulenschaltungen^{103,114,117-119} unterschieden. Für die SPE werden hierbei bevorzugt Umkehrphasen eingesetzt.

5 Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE)

5.1 Grundlagen

5.1.1 Multidimensionalität

Multidimensionale chromatographische Verfahren werden schon seit vielen Jahren verwendet. Hierbei werden eine oder mehrere Fraktionen einer Probe von einem chromatographischen Medium zu einem zweiten transferiert, um bessere Trennergebnisse zu erhalten¹²⁰.

Eine wichtige Bedingung für diese chromatographischen Verfahren ist die Orthogonalität¹²¹. Die Orthogonalität wird in der Chromatographie dadurch definiert, dass die Elutionszeiten der chromatographischen Dimensionen statistisch unabhängig sind, d.h. es werden vollständig unabhängige Trennmechanismen in den entsprechenden Dimensionen angewendet¹²². So können beispielsweise Umkehrphasen- und Ionenaustausch-Chromatographie oder Größenausschluss- und Affinitätschromatographie kombiniert werden.

Die Technik kann prinzipiell in 2 große Anwendungsfelder unterteilt werden¹²⁰. Zum einen kann die multidimensionale Chromatographie für die Auftrennung komplexer Mischungen mit mehreren analytischen Trennsäulen (GC x GC oder LC x LC) verwendet werden. Multidimensionale Verfahren dieser Art werden besonders für die Analyse komplexer Proben, wie z.B. Luft und Kraftstoffen¹²³, oder auch von Polymeren eingesetzt¹²⁴.

Zum anderen kann die multidimensionale Chromatographie für die Probenaufbereitung zur Abreicherung der Probenmatrix (z.B. SPE-LC) verwendet werden^{33,125-127}. Dieses Prinzip der multidimensionalen Chromatographie wurde für die Entwicklung der MD-SPE Plattform genutzt.

Ein zusätzliches Kriterium multidimensionaler, chromatographischer Verfahren ist die so genannte Vollständigkeit (Comprehensiveness). Eine multidimensionale Methode ist dann vollständig, wenn alle Probenbestandteile komplett oder zu gleichen Anteilen allen verwendeten chromatographischen Modi unterliegen¹²².

5.1.2 Angewandte chromatographische Prinzipien

Die MD-SPE Plattform besteht aus einer RAM SPE-Säule (LiChrospher® ADS, siehe Kapitel 2.4.2) sowie einer MMP SPE-Säule (siehe Kapitel 2.5) und kombiniert 4 chromatographische Trennprinzipien. Auf der RAM SPE-Säule wird das Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und der Umkehrphasen-Chromatographie (RPC) simultan angewandt. Auf der MMP SPE-Säule wird das Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) und der Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) ebenfalls simultan angewandt. Die MD-SPE Plattform setzt sich somit aus insgesamt vier chromatographische Dimensionen zusammen, die alle orthogonal zueinander sind.

Die Eigenschaften der ersten beiden Dimensionen sind durch die Verwendung des LiChrospher® ADS Materials teilweise vordefiniert, wie z.B. die Ausschlussgrenze von 15 kDa. Die retentiven Eigenschaften der Umkehrphase können jedoch durch die Auswahl zwischen C4, C8 und C18 Modifikationen variiert werden.

Auf der MMP SPE-Säule können die retentiven Eigenschaften durch Veränderung des pH-Wertes und / oder des Anteils oder der Art des organischen Lösungsmittels im Eluenten so variiert werden, dass nur die interessierenden Analyte extrahiert werden.

5.1.3 Instrumenteller Aufbau

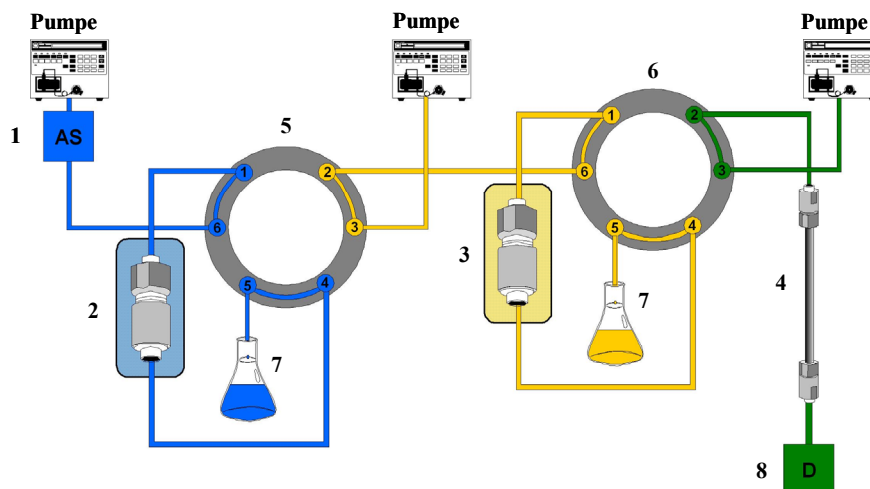


Abbildung 10: Instrumenteller Aufbau der MD-SPE Plattform. 1 – Probengeber, 2 - RAM SPE-Säule, 3 - MMP SPE-Säule, 4 - Analytische Trennsäule, 5 - Schaltventil (1), 6 - Schaltventil (2), 7 – Abfall, 8 - Detektor

Abbildung 10 stellt den instrumentellen Aufbau der MD-SPE Plattform schematisch dar. Das System besteht aus drei HPLC-Pumpen, einem Autosampler, einer RAM SPE-Säule, einer MMP SPE-Säule, einer analytischen Trennsäule, zwei 6-Wege Schaltventilen und einem Detektor. Bei dem Detektor kann es sich wahlweise um einen UV-, einen Diodenarraydetektor oder ein Massenspektrometer handeln. Die beiden SPE-Säulen werden über die zwei 6-Wege Schaltventile mit der analytischen Trennsäule verbunden. Die Probenaufgabe und die Steuerung der Schaltventile erfolgt über den CTC Autosampler, der im Rahmen dieser Arbeit speziell dafür konfiguriert und programmiert wurde.

Die drei HPLC Pumpen fördern jeweils den Eluenten für bestimmte Abschnitte der MD-SPE Plattform. Die erste Pumpe fördert den Eluenten (E1) für das Beladen und die gröbenselektive Fraktionierung auf der RAM SPE-Säule. Die zweite Pumpe fördert den Eluenten (E2) für den Transfer auf die MMP SPE-Säule und die dort stattfindende chemoselektive Fraktionierung. Die dritte Pumpe fördert den Eluenten (E3) für den Transfer der Analyte auf die analytische Säule und die nachfolgende analytische Trennung.

5.2 Arbeitsweise der MD-SPE Plattform

Die Probenaufbereitung unbehandelte biologischer Flüssigkeiten durch die MD-SPE Plattform erfolgt in 4 Arbeitsschritten:

- 1) Probenaufgabe und Fraktionierung auf der 1. SPE-Säule,
- 2) Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule,
- 3) Fraktionierung auf der 2. SPE-Säule,
- 4) Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule.

Im Folgenden sollen diese 4 Schritte kurz erläutert werden.

5.2.1 Probenaufgabe und Fraktionierung auf der 1. SPE-Säule

Dieser Schritt umfasst die direkte Probenaufgabe der unbehandelten biologischen Flüssigkeit auf die 1. SPE-Säule, die mit dem Restricted Access Material (LiChrospher® ADS; siehe Kapitel 2.4) gepackt ist.

Durch die Verwendung dieses maßgeschneiderten Packungsmaterials können wiederholt native, proteinhaltige biologische Flüssigkeiten direkt aufgegeben werden, ohne dass es zu einer Verminderung der Qualität des Packungsmaterials kommt.

Nach der Probenaufgabe, dem Beladen der SPE-Säule, kommt es auf der RAM SPE-Säule zu einer größenselektiven Fraktionierung der Probe. Alle makromolekularen Probenbestandteile, die ein Molekulargewicht größer 15 kDa aufweisen, werden durch Größenausschluss-Chromatographie mit dem Totvolumen der SPE-Säule in den Abfall eluiert. Diese makromolekularen Matrixbestandteile können nicht in die Poren des Packungsmaterials eindringen und gehen mit der biokompatiblen Oberfläche der stationären Phase keine unerwünschten Wechselwirkungen ein.

Niedermolekulare Verbindungen, die in das Poreninnere eindringen können, interagieren mit den dort lokalisierten extraktiven Gruppen. Je nach der Retentionskraft des Packungsmaterials für diese Verbindungen werden diese extrahiert oder mit dem Eluenten direkt in den Abfall eluiert. In Abbildung 11 ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

Nach diesem ersten Fraktionierungsschritt befindet sich auf der RAM SPE-Säule der Anteil an niedermolekularen Probenbestandteilen, der durch die Umkehrphase reteniert wird. Die restlichen niedermolekularen und die makromolekularen Probenbestandteile liegen im Abfall vor.

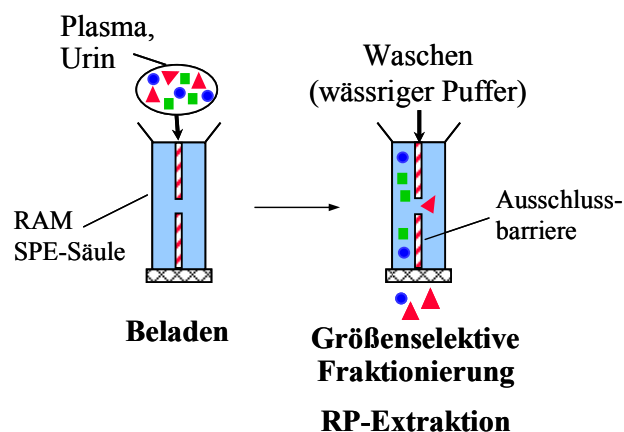


Abbildung 11: Probenaufgabe und Fraktionierung auf der 1. SPE-Säule (RAM) - ■ Analyte; ▲ Makromolekulare Matrixbestandteile; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile

5.2.2 Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule

Nachdem die Fraktionierung der biologischen Probe auf der RAM SPE-Säule abgeschlossen ist, werden die dort retenierten niedermolekularen Verbindungen desorbiert und auf die 2. SPE-Säule, die Mixed-Mode Phase transferiert (Abbildung 12).

Für diesen Schritt wird ein Eluent mit einem hohen Anteil eines organischen Lösungsmittels, wie z.B. Methanol oder Acetonitril, verwendet. Der hohe organische Anteil erlaubt die schnelle Desorption der an der Umkehrphase retenierten Verbindungen. In einem möglichst kleinen Volumen werden diese Verbindungen auf die MMP SPE-Säule transferiert.

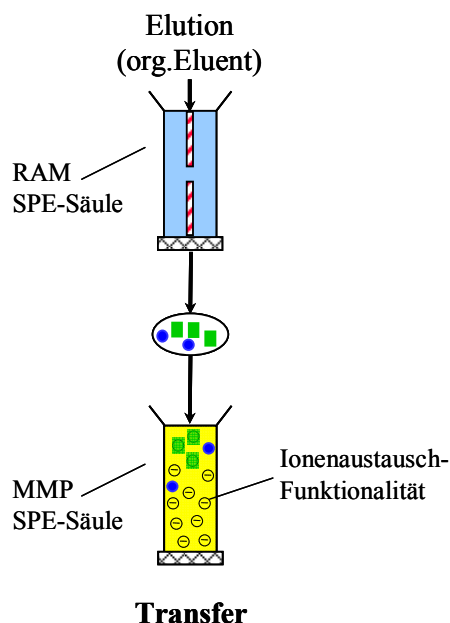


Abbildung 12: Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule (MMP) - ■ Analyte; ▲ Makromolekulare Matrixbestandteile; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile

5.2.3 Fraktionierung auf der 2. SPE-Säule

Im Anschluss an den Transferschritt werden die niedermolekularen Probenbestandteile auf der MMP SPE-Säule chemoselektiv fraktioniert. In diesem Schritt werden die basischen Analyte durch die hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen an die Mixed-Mode Phase

gebunden, während die restlichen niedermolekularen Matrixbestandteile durch den Eluenten in den Abfall gewaschen werden. In Abbildung 13 ist dieser Schritt dargestellt.

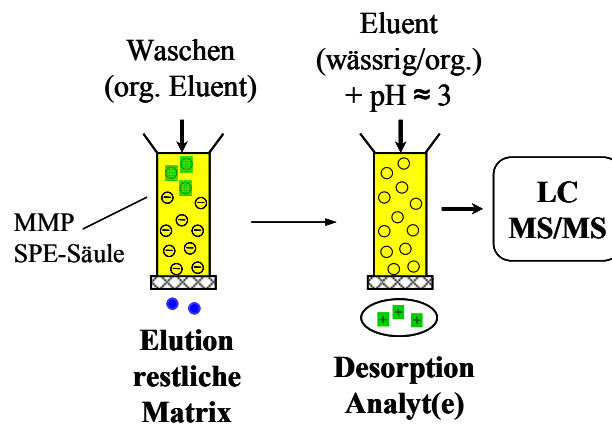


Abbildung 13: Fraktionierung auf der 2. SPE-Säule (MMP) und Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule- ■ Analyte; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile

5.2.4 Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule

Im letzten Schritt der MD-SPE erfolgt die Desorption der Analyte von der MMP SPE-Säule und deren Transfer auf die analytische Trennsäule (RP-Phase). Dazu wird ein wässrig-organischer Eluent mit einem sauren pH-Wert verwendet. Durch diesen pH-Wert werden die Ionenaustausch-Funktionalitäten des MMP Materials (Karbonsäuregruppen) neutralisiert und so die Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Analyt aufgehoben (Abbildung 13). Danach werden die Analyte auf der analytischen Trennsäule separiert. Der gewählte pH-Wert begünstigt zudem die Ionisation der Analyten in der ESI-Quelle, da die Analytmoleküle bereits ionisiert vorliegen.

Abbildung 14 zeigt das gesamte MD-SPE Verfahren schematisch.

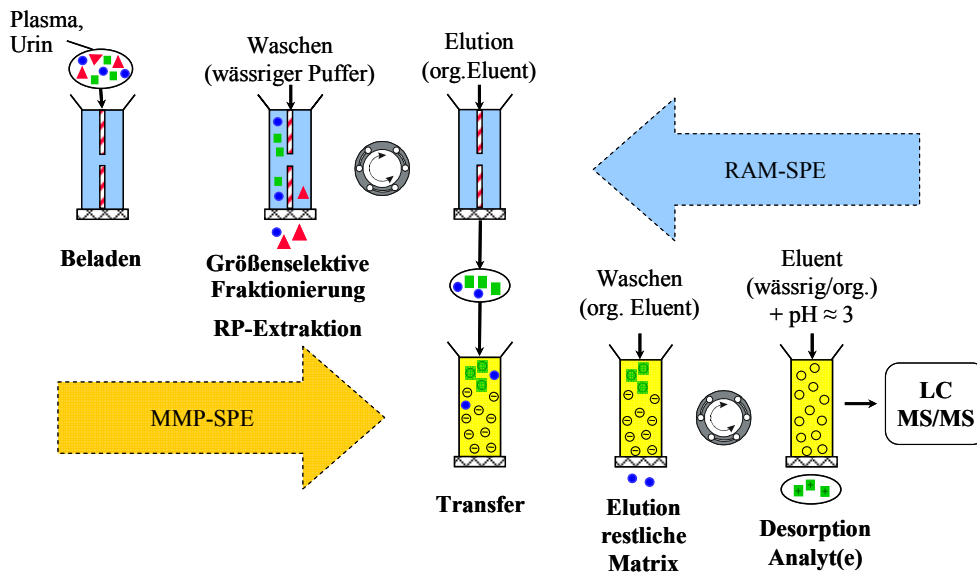


Abbildung 14: Schematische Darstellung des vollständigen MD-SPE Verfahrens

5.3 Vorgehensweise und Bestimmung von Kenngrößen für die Säulenschaltung: Allgemeiner Teil

Die vorgestellte MD-SPE Plattform basiert auf dem Prinzip „Säulenschaltung“. Die Vorgehensweise und die Bestimmung von entsprechenden Kenngrößen bei der Anwendung dieser Technik wurde für die konventionelle zweidimensionale SPE-LC bereits beschrieben²⁸. In der vorliegenden Arbeit werden diese Kenngrößen für ein mehrdimensionales System bestimmt bzw. optimiert.

Zunächst müssen die Parameter t_A , t_M und t_T für die einzelnen Teilschritte der MD-SPE wie bei einer konventionellen on-line SPE-LC Kopplung bestimmt werden. Dabei steht t_A für die Durchbruchzeit der Analyte auf den SPE-Säulen, t_M für die Dauer der Elution der Probenmatrix und t_T für die Dauer des Transferschritts der Analyte.

Für die Optimierung der Einzelschritte müssen zusätzlich die am besten geeignete Zusammensetzung der jeweiligen Eluenten bestimmt sowie die stationären Phasen und Dimensionen der SPE-Säulen und der analytischen Trennsäule ausgewählt werden.

5.3.1 Ausarbeitung der analytischen Trennung und Detektion

Zunächst werden die chromatographischen Bedingungen für die analytische Trennung und die Detektion der zu analysierenden Analyte optimiert bzw. selektiert.

Dieser Schritt kann auch unabhängig von der MD-SPE Plattform erfolgen. Hierfür wird die analytische Trennsäule direkt zwischen dem Probengeber und einem entsprechenden Detektor positioniert. Nach Injektion einer Analytlösung kann dann die chromatographische Trennung optimiert werden. Neben der Auswahl der analytischen Trennsäule tragen z.B. bei der RP-Chromatographie auch die Auswahl des organischen Lösungsmittels und der Ionenpaarreagenzien entscheidend zur Qualität der Trennung bei.

Bei der Detektion der Analyte mit einem Massenspektrometer ist es wichtig, die Ionisation der Analyte zu optimieren. Es gilt, möglichst viele Molekülionen (Precursorionen), die in der Kollisionszelle zu diagnostischen Produktionen fragmentiert werden, zu erzeugen. Dafür ist es notwendig, eine Reihe variabler, geräteabhängiger Parameter zu optimieren, die den Elektrospray-Prozess und die Überführung der gebildeten Ionen in die Gasphase beeinflussen. Zu diesen Parametern gehören u.a. die Spannung der Elektrospraykapillare, die Kollisionsenergie, die Desolvatations- und Quelltemperatur, der Kollisionsgasdruck, das Desolvationsgas und die Linsenspannungen der Ionenoptik.

Das Tuning dieser Parameter erfolgt über die Infusion einer Analytlösung (ca. 1 µg/ml) in das Massenspektrometer mit Hilfe einer Spritzenpumpe. Die Optimierung der Quellen- und Desolvatationstemperatur, aber auch der Gasflüsse erfolgt unter realen analytischen Bedingungen, d.h. die Analytlösung wird in einen Eluentstrom des Eluenten E3 infundiert und danach mit dem MS analysiert.

Bei der Methodenentwicklung für Mehrkomponentengemische muss ein Kompromiss für die optimalen Bedingungen für die Analyte gefunden werden, da nur die Kollisionsenergie und die Cone-Spannung für jeden Analyt einzeln einstellbar ist. Alle anderen Parameter gelten für das gesamte Analytgemisch.

5.3.2 Ermittlung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$ und der Dauer der Elution der Probenmatrix $t_{M, RAM}$

Die Vorgehensweisen zur Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$ und der Dauer der Elution der Probenmatrix $t_{M, RAM}$ sind weitgehend identisch.

Für die Bestimmung von $t_{A, RAM}$ und $t_{M, RAM}$ wird der gleiche instrumentelle Aufbau (vergleiche Kapitel 5.1.3) verwendet. Die MD-SPE Plattform wird so konfiguriert, dass der Detektor an die Position 5 (Abfall) des ersten Schaltventils angeschlossen wird (Abbildung 15). Dieses Schaltschema ermöglicht es, alle von der RAM SPE-Säule eluierenden Verbindungen zu detektieren. Die chromatographischen Bedingungen sind für beide Experimente identisch.

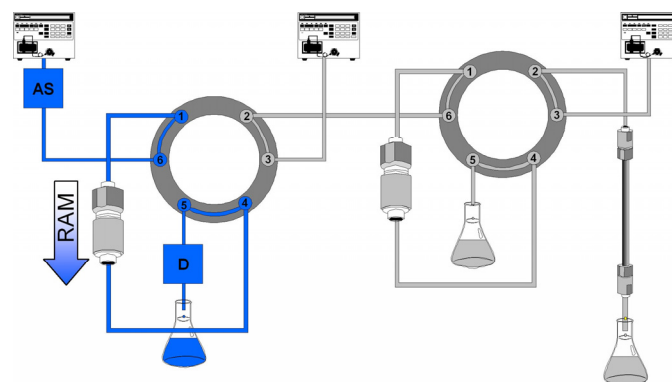


Abbildung 15: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{A, RAM}$ und $t_{M, RAM}$

Die Ermittlung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$ bzw. des Durchbruchvolumens $V_{A, RAM}$ erfolgt elutionschromatographisch. Eine definierte Menge Analyt (idealerweise die zu analysierende Menge) wird über den Probengeber in den Eluentstrom injiziert. Mit dem Detektor wird aufgezeichnet wann der Analytpeak erscheint, d.h. nach welcher Zeit der Analyt auf der RAM SPE-Säule durchbricht. In Abbildung 16 A ist ein schematisches Chromatogramm dargestellt.

$t_{M, RAM}$ gibt den Zeitpunkt an, zu dem alle makromolekularen Probenbestandteile (z.B. Proteine) von der RAM SPE-Säule gewaschen wurden. Hierzu wird eine Realprobe (Plasma, Serum oder Urin) in den Eluentstrom injiziert und das Elutionsprofil der Proben mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm aufgezeichnet. $t_{M, RAM}$ ist erreicht, wenn die gröbenselektive

Fraktionierung beendet ist und der Matrixpeak wieder die Basislinie erreicht hat (Abbildung 16 B).

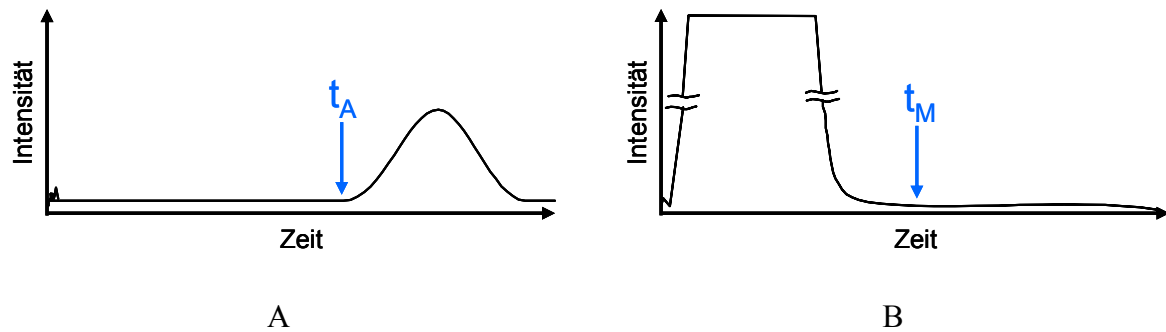


Abbildung 16: Chromatogramme (schematisch) für die Bestimmung von t_A (A) und t_M (B)

Für die quantitative Extraktion der Zielanalyte ist es entscheidend, dass die Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$ größer ist als die Elutionszeit der Probenmatrix $t_{M, RAM}$.

5.3.3 Ermittlung der Transferzeit $t_{T, RAM}$ der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule

Für die Bestimmung der Transferzeit $t_{T, RAM}$ wird in der MD-SPE Plattform anstelle des Detektors die MMP SPE-Säule eingebaut (Abbildung 17).

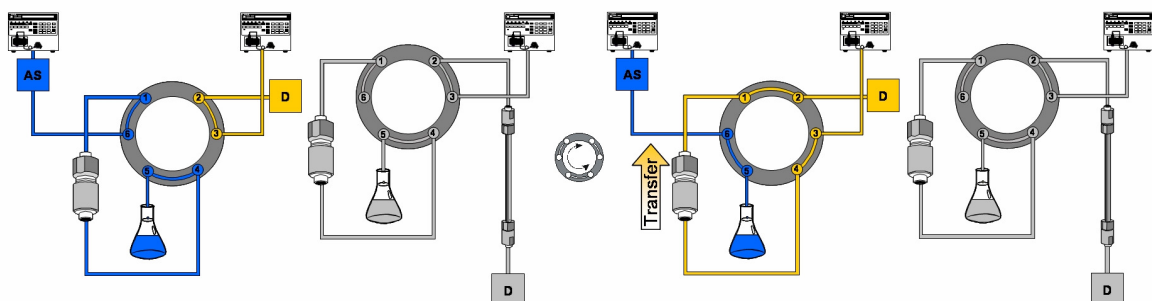


Abbildung 17: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{T, RAM}$

Eine entsprechende Analytlösung wird zunächst auf die RAM SPE-Säule injiziert und dort retiniert. Danach wird das erste Ventil geschaltet und die Analyte mit dem Eluenten E2, unter Umkehrung der Flussrichtung, desorbiert. Ein geeigneter Detektor zeichnet das Elutionsprofil der Analyte auf. Zu dem Zeitpunkt, an dem dieses Signal die Basislinie wieder erreicht hat, ist der Transfer abgeschlossen. In Abbildung 18 ist ein Chromatogramm, welches aus diesem Experiment resultiert, schematisch dargestellt.

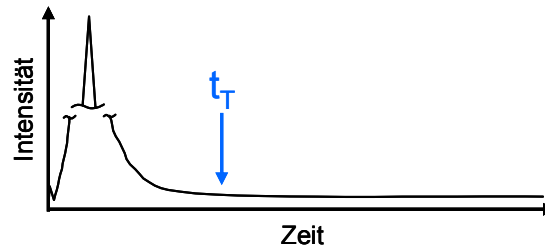


Abbildung 18: Chromatogramm (schematisch) für die Bestimmung von t_T

5.3.4 Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A,MMP}$

Die Vorgehensweise für die Bestimmung der Durchbruchzeit der Analyte auf der MMP SPE-Säule ist die gleiche wie für die Evaluierung von $t_{A, RAM}$. In der MD-SPE Plattform wird die RAM SPE-Säule durch die MMP SPE-Säule ersetzt.

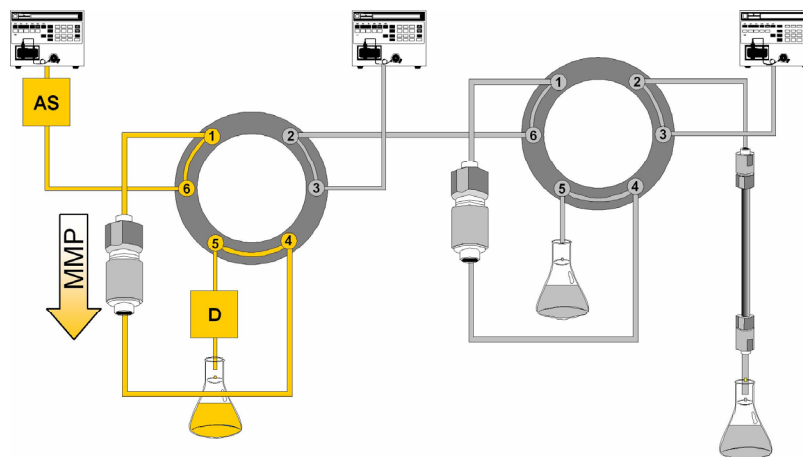


Abbildung 19: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{A,MMP}$

Eine entsprechende Analytlösung wird mit dem Eluenten E2 auf die MMP SPE-Säule aufgegeben. Das Elutionsprofil der Analyte wird durch den Detektor aufgezeichnet und ein ähnliches Chromatogramm wie bei der Bestimmung von $t_{A, RAM}$ (siehe Abbildung 19) erhalten.

5.3.5 Bestimmung der Elutionszeit $t_{M, MMP}$ der Probenmatrix

$t_{M, MMP}$ bestimmt die Dauer der chemoselektiven Fraktionierung der niedermolekularen Probenmatrix auf der MMP SPE-Säule.

Für dieses Experiment wird der Detektor an die Position 5 (Abfall) des zweiten Schaltventils angeschlossen (siehe Abbildung 20).

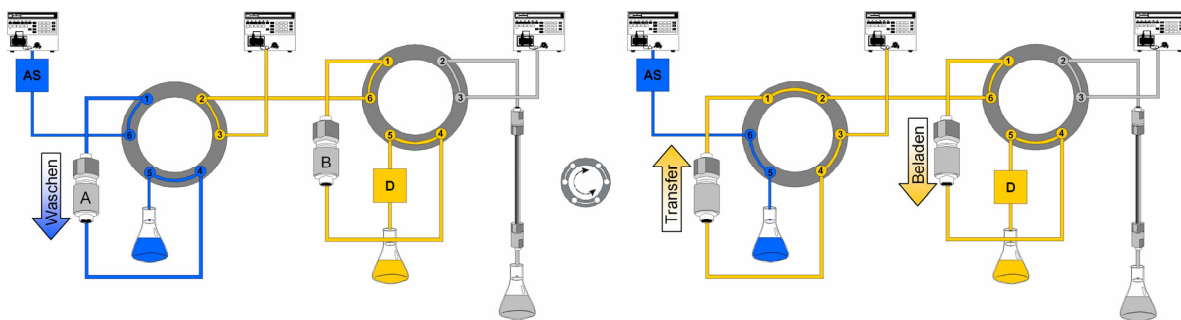


Abbildung 20: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{M, MMP}$. A – RAM SPE-Säule, B – MMP – SPE-Säule

Die zu analysierende Probe wird mit dem Eluenten E1 auf die RAM SPE-Säule aufgegeben und dort größenselektiv fraktioniert. Nachdem dieser Schritt abgeschlossen ist, wird Ventil 1 geschaltet und die restliche Probenmatrix durch den Eluenten E2 auf die MMP SPE-Säule transferiert und dort fraktioniert. Der Detektor registriert das Elutionsprofil der restlichen Matrixbestandteile. Der Zeitpunkt, an dem das entsprechende Signal wieder die Basislinie erreicht hat, entspricht $t_{M, RAM}$.

Für die Bestimmung von $t_{T, RAM}$, $t_{A, MMP}$ und $t_{M, MMP}$ wird jeweils der gleiche Eluent (E2) verwendet.

5.3.6 Bestimmung der Transferzeit $t_{T,MMP}$ der Analyte auf die analytische Trennsäule

Für die Bestimmung der Transferzeit $t_{T,MMP}$ der Analyte von der MMP SPE-Säule auf die in Serie geschaltete analytische Trennsäule wird der instrumentelle Aufbau für die Bestimmung von $t_{T,RAM}$ verwendet. Dafür muss lediglich die RAM SPE-Säule durch die MMP SPE-Säule ausgetauscht werden (Abbildung 21).

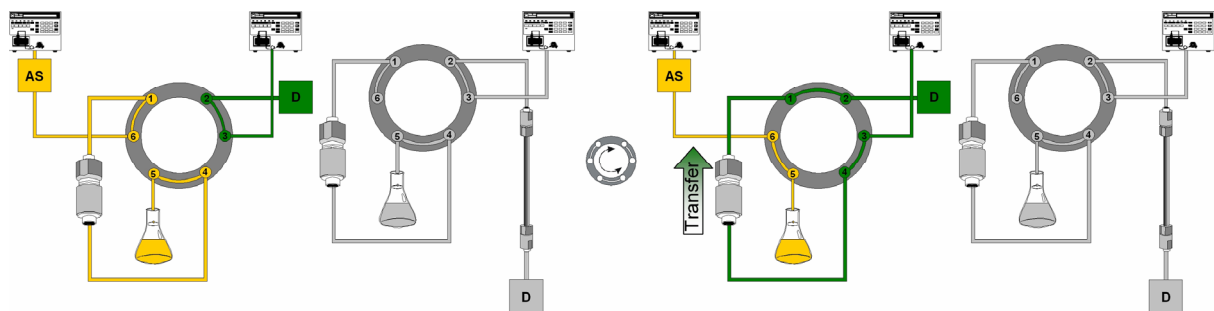


Abbildung 21: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{T,MMP}$

Eine Lösung der Zielanalyte wird mit dem Eluenten E2 auf die MMP SPE-Säule aufgegeben und dort retiniert. Entsprechend der ermittelten Zeit für $t_{A,MMP}$ wird das Ventil geschaltet und die Analyte mit dem Eluenten E3 eluiert und transferiert. $t_{T,MMP}$ gibt den Zeitpunkt an, an dem die Elution und somit der Transfer vollständig abgeschlossen ist.

5.3.7 Schaltzeiten

Der Analysenzyklus des MD-SPE Verfahrens wird durch vier Schaltimpulse der beiden 6-Wege Ventile bestimmt. Diese terminieren die zeitliche Abfolge des Verfahrens und erlauben die Unterteilung des MD-SPE Verfahrens in dessen Teilschritte. Die entsprechenden Schaltzeiten können aufgrund der ermittelten Kenngrößen t_A , t_M und t_T berechnet werden.

Die Schaltzeiten t_{V1} und t_{V2} betreffen das erste 6-Wege-Ventil und die Schaltzeiten t_{V3} und t_{V4} das zweite Ventil.

t_{V1}

Die erste Ventilschaltung t_{V1} erfolgt am Ende des ersten Schrittes, d.h. nach der Probenaufgabe und der gröbenselektiven Fraktionierung. Der Zeitpunkt t_{V1} initiiert den Beginn des Transfers der niedermolekularen Probenbestandteile auf die MMP SPE-Säule und koppelt beide SPE-Säulen miteinander.

Eine wichtige Voraussetzung für die Berechnung dieser Schaltzeit ist, dass die Durchbruchzeit der Analyte größer ist als die Dauer der Elution der makromolekularen Probenbestandteile. Diese beiden Parameter bilden die Grundlage für die Berechnung von t_{V1}.

$$t_{V1} = t_{M, RAM} + X$$

wobei X ein Sicherheitszuschlag ist. Durch den Sicherheitszuschlag wird sichergestellt, dass auch bei kleinen Unregelmäßigkeiten die Elution der Probenmatrix vollständig ist.

t_{V2}

Das Schalten des Ventils zum Zeitpunkt t_{V2} markiert das Ende des Transfers der niedermolekularen Probenmatrix auf die MMP SPE-Säule. Zu diesem Zeitpunkt wird die Kopplung der beiden SPE-Säulen wieder aufgehoben.

$$t_{V2} = t_{V1} + t_{T, RAM} + X$$

Die Berechnung des Zeitpunktes t_{V2} basiert auf der ermittelten Transferzeit t_{T, RAM}. Auch hier wird die ermittelte Transferzeit durch einen Sicherheitszuschlag verlängert.

t_{V3}

Das Schalten des zweiten Ventils zum dritten Schaltzeitpunkt t_{V3} beendet die chemoselektive Fraktionierung auf der MMP SPE-Säule und koppelt diese mit der analytischen Trennsäule für den nachfolgenden Transfer der Analyte. Wie schon bei t_{V1} ist es auch hier entscheidend, dass die Durchbruchzeit der Analyte auf der MMP SPE-Säule t_{A, MMP} größer ist als die benötigte Zeit für die Elution der Restmatrix t_{M, MMP}.

Die Formel zur Berechnung dieser Ventilschaltzeit ist daher auch an die Berechnung von t_{V1} gebunden.

$$t_{V3} = t_{V1} + t_{M,MMP} + X$$

t_{V4}

Das Schalten des zweiten Ventils zum Zeitpunkt t_{V4} beendet den Transfer der Analyte von der MMP SPE-Säule zur analytischen Trennsäule. Die Kopplung der MMP SPE-Säule mit der Trennsäule wird dadurch wieder aufgehoben.

In Anlehnung an die Berechnung von t_{V2} bildet die Transferzeit der Analyte $t_{T,MMP}$ die Grundlage für t_{V4} .

$$t_{V4} = t_{V3} + t_{T,MMP} + X$$

5.3.8 Analysenzyklus

Aus den ermittelten Verfahrensgrößen und den daraus berechneten Schaltzeiten resultiert der vollständige Analysenzyklus für die in der vorliegenden Arbeit entwickelte MD-SPE Plattform. In Abbildung 22 ist dieser Zyklus schematisch dargestellt.

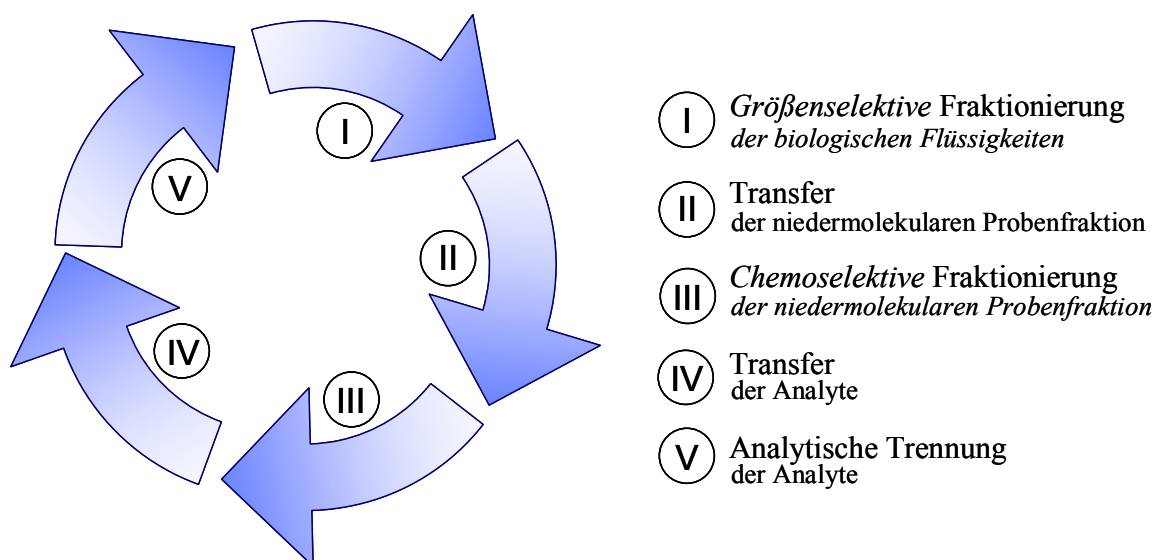


Abbildung 22: Analysenzyklus der MD-SPE-LC Plattform

Der erste Schritt des MD-SPE Verfahrens besteht in der Probenaufgabe und der gröbenselektiven Fraktionierung der Probenmatrix auf der RAM SPE-Säule. Im Anschluss daran erfolgt der Transfer der niedermolekularen Probenbestandteile auf die MMP SPE-Säule und deren chemoselektive Fraktionierung. Diese beiden Schritte lassen sich nicht völlig voneinander abgrenzen, da es schon während des Transfers zu einer partiellen Fraktionierung dieser niedermolekularen Analytfraktion auf der MMP SPE-Säule kommt. Nach der Abtrennung der restlichen niedermolekularen Probenmatrix auf der MMP SPE-Säule erfolgt der Transfer der Zielanalyte auf die analytische Trennsäule und anschließend deren konventionelle chromatographische Trennung.

5.4 Optimierung der MD-SPE Plattform

5.4.1 SPE-Säulen

Dimensionen

Eine wichtige Stellschraube für die Optimierung der verwendeten SPE-Säulen ist deren Dimension. Hierdurch wird zum einen die Menge, d.h. die Kapazität, des verwendeten SPE-Materials bestimmt und zum anderen auch die lineare Fließgeschwindigkeit des Eluenten beeinflusst. So weisen SPE Säulen mit den Dimensionen 20 x 2 mm ID bzw. 5 x 4 mm ID das gleiche Packungsvolumen auf. Die Säule mit dem geringeren Innendurchmesser führt jedoch bei gleicher Flussrate des Eluenten zu einer vierfach höheren linearen Fließgeschwindigkeit in der Säule. In Tabelle 6 sind die linearen Fließgeschwindigkeiten für verschiedene Flussraten dargestellt.

Tabelle 6: Säulendimensionen und lineare Flussgeschwindigkeiten

Dimensionen [mm]	Flussrate [ml/min]	Säulenvolumen [μ l]	Lineare Flussrate u [cm/s]
20 x 2	1	63	0,055
	4	63	0,256
20 x 4	0,4	251	0,021
	4	251	0,197
5 x 4	1	63	0,014
	4	63	0,064

Kommerziell erhältlich sind SPE-Säulen gepackt mit LiChrospher[®] ADS mit den Dimensionen 25 x 4 mm ID und 25 x 2 mm ID (effektive Betthöhe 20 mm). In der vorliegenden Arbeit wurden aber auch entsprechende SPE-Säulen mit der Dimension 5 x 4 mm ID untersucht.

Die MMP SPE-Säulen wurden fast alle selbst gepackt. Kommerziell erhältlich war zum Zeitpunkt der Arbeit nur die Oasis WCX mit den Dimensionen 20 x 2,1 mm ID. Für die MMP-Materialien wurden Säulen mit den Dimensionen 20 x 2 mm ID und 20 x 1 mm ID untersucht, die in der Laborwerkstatt des Institutes für Klinische Chemie hergestellt wurden.

RAM Packungsmaterialien

Die Auswahl eines geeigneten RAM-Materials für die Extraktion eines vorgegebenen Analyten basiert auf dessen physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, gibt es die RAM-Materialien nicht nur mit Umkehrphasen als adsorptiven Zentren, sondern auch als Ionenaustauscher oder mit Liganden für die Affinitätschromatographie. In der vorliegenden Arbeit wurden nur die LiChrospher[®] ADS Materialien mit Umkehrphasen im Poreninneren untersucht. Dafür standen drei verschiedene Materialien mit C4, C8 und C18 Funktionalitäten zur Verfügung.

Für die Auswahl des optimalen SPE-Materials wird der log P Wert des Analyten als wichtige physikalisch-chemische Eigenschaft herangezogen. Relativ polare Analyte können mit einer C18 ADS SPE-Säule extrahiert werden, während für weniger polare und unpolare Analyte bereits eine C8 oder C4 Phase genügt.

Auf diese Weise kann bereits durch die geeignete Wahl der RAM SPE-Säule die Koextraktion störender niedermolekularer Matrixbestandteile minimiert und die Selektivität des ersten Fraktionierungsschrittes verbessert werden.

MMP Packungsmaterialien

Die untersuchten MMP-Materialien (Oasis WCX, Strata-X-CW, LiChrospher[®] XDS Diol, CIM CM, Isolute HCX-Q, Chromabond PCA) unterscheiden sich prinzipiell in Bezug auf die Kapazität der schwachen Kationenaustauscher-Eigenschaft und durch die Art und Retentionskraft der hydrophoben Eigenschaften.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diese Eigenschaften zu evaluieren, zu optimieren und in geeigneter Weise in die erwünschte MD-SPE Plattform zu integrieren.

5.4.2 Eluenten

Die MD-SPE Plattform benötigt drei mobile Phasen, die jeweils hinsichtlich der Zielanalyte und der Matrices optimiert werden müssen.

Eluent E1

Dieser, von der ersten HPLC Pumpe geförderten Eluent, wird für die Beladung und gröbenselektive Fraktionierung der biologischen Flüssigkeit auf der RAM SPE-Säule verwendet.

Da proteinhaltige biologische Flüssigkeiten direkt in das System injiziert werden, darf diese mobile Phase keine denaturierenden Eigenschaften aufweisen. Der pH-Wert darf daher nicht kleiner 5 sein und der Anteil (v/v) des organischen Lösungsmittels darf bestimmte Werte nicht überschreiten (15 % für Methanol, 10 % für Acetonitril und 5 % für Isopropanol), da es sonst zur Präzipitation der Proteine kommt. Es ist allerdings von Vorteil, dem Eluenten mindestens 2 % (v/v) eines organischen Lösungsmittels, bevorzugt Acetonitril oder Methanol, zuzumischen, da dadurch die Plasmaproteinbindung der Arzneistoffe aufgehoben wird.

Eluent E2

Eluent E2 wird von der zweiten HPLC Pumpe gefördert. Durch ihn erfolgt die Desorption der niedermolekularen Fraktion von der RAM SPE-Säule, die Retention der Analyte auf der

MMP SPE-Säule und die möglichst schnelle Elution der restlichen Matrixbestandteile. Die Zusammensetzung dieser mobilen Phase muss so gewählt werden, dass sie diesen vielfältigen Ansprüchen genügt.

Der pH-Wert des Eluenten für diesen Transferschritt muss so gewählt werden, dass einerseits die Analytmoleküle ionisiert vorliegen und andererseits die schwachen Kationenaustausch-Funktionalitäten der stationären Phase nicht protoniert und damit neutralisiert werden.

$$\text{pH}_{\text{Eluent}} \geq \text{pKa}_{\text{Ionenaustauscher}} + 2$$

$$\text{pH}_{\text{Eluent}} \leq \text{pKa}_{\text{Analyt}} - 2$$

Die ionischen Wechselwirkungen werden durch das organische Lösungsmittel nicht behindert. Der relativ hohe Anteil des organischen Lösungsmittels begünstigt die Abtrennung der Restmatrix.

Die Flussrate der beiden Eluenten E1 und E2 ist zwischen 0,4 und 8 ml/min frei wählbar. Höhere Flussraten erlauben die Fraktionierungsschritte der Probenmatrix schneller durchzuführen. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass höhere Flussraten die Durchbruchzeiten und Transferzeiten der Analyte beeinflussen.

Eluent E3

Mit diesem, von der dritten HPLC Pumpe geförderten Eluenten, erfolgt der Transfer der retenierten Analyte von der MMP SPE-Säule zur analytischen Trennsäule und dort deren chromatographische Trennung.

Die Zusammensetzung und die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase E3 sind hauptsächlich durch die zuvor evaluierten Bedingungen für die chromatographische Trennung vorgegeben. Sie sollten aber so gewählt werden, dass ein möglichst kleines Transfervolumen für die Analyte erzielt wird, um eine Peakverbreiterung bei der nachfolgenden chromatographischen Trennung zu vermeiden.

Entscheidend für eine optimale Arbeitsweise der MD-SPE Plattform ist ein saurer pH-Wert des Eluenten E3. Unter diesen pH Bedingungen werden die Karboxylgruppen der schwachen Kationenaustausch-Gruppen der MMP SPE-Säule protoniert und somit neutralisiert. Dies führt zur raschen Desorption der Analyte und begünstigt darüber hinaus deren Ionisation im MS.

Die Auswahl des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase kann einen erheblichen Einfluss auf die chromatographische Trennung haben. In der HPLC werden bevorzugt Acetonitril und Methanol eingesetzt. Beide Lösungsmittel weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Aufgrund der geringeren Viskosität von Acetonitril werden mit diesem Lösungsmittel im Allgemeinen bessere Peaksymmetrien erzielt. In methanolhaltigen mobilen Phasen gleicher Elutionskraft wird in der Regel eine bessere Selektivität erreicht, da Methanol polare/ionische Wechselwirkungen begünstigt. Dies geschieht allerdings auf Kosten schlechterer Peaksymmetrie und längerer Retentionszeiten¹²⁸.

Für die der MD-SPE Plattform nachgeschaltete analytische Trennsäule können Innendurchmesser von ca. 4 – 4,6 mm verwendet werden. Die benötigten Flussraten (0,8 – 1,2 ml/min) sind jedoch für die Elektrospray-Ionenquellen der Massenspektrometer nicht geeignet. Aus diesem Grund müssen die Eluentströme vor dem MS gesplittet werden. Bevorzugt werden daher analytische Trennsäulen mit Innendurchmessern von ca. 2 mm verwendet, da die Flussrate nur 0,2 – 0,4 ml/min beträgt.

5.4.3 Optimierung der Transferschritte

Flussrichtung der Eluenten

Die Elution der beiden SPE-Säulen kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Abbildung 23 zeigt diese Möglichkeiten und den Effekt auf das Elutionsvolumen und die Peakverbreiterung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Elution im so genannten „back-flush“-Modus, d.h. durch Umkehrung der Flussrichtung des Eluenten durchgeführt. Beim Beladen einer SPE-Säule werden die Analyte am Säuleneingang reteniert und mit der Zeit über das gesamte Bett verteilt. Durch die Umkehrung der Flussrichtung bei der Elution kann das Elutionsvolumen und somit die Peakverbreiterung deutlich verringert werden.

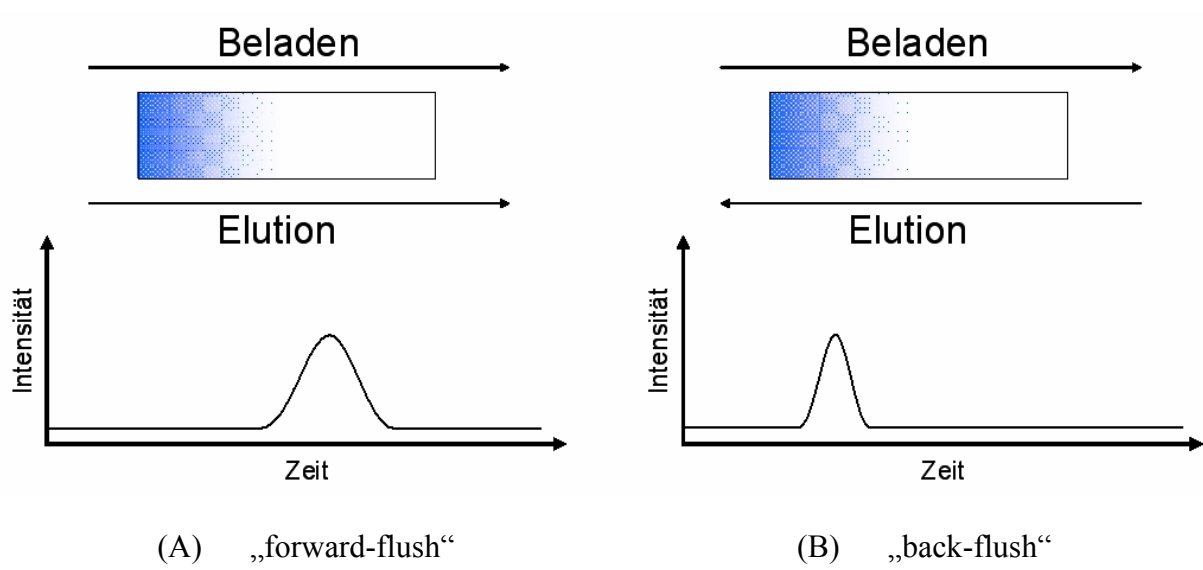


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Elution einer SPE-Säule und des Einflusses auf die Peakverbreiterung bei A – Beibehalten der Flussrichtung und B – Umkehrung der Flussrichtung

6 Entwicklung einer MD-SPE – LC-MS/MS Methode für die Bestimmung trizyklischer Antidepressiva (TZA) in biologischen Flüssigkeiten

6.1 LC-Trennung

Die hohe Effizienz und Selektivität der Probenaufbereitung durch die beschriebene MD-SPE Plattform erfordert keine aufwendige chromatographische Trennung der untersuchten Zielanalyte. Ziel der analytischen Trennung ist keine Basislinien-Trennung, sondern eine schnelle Antrennung der Antidepressiva innerhalb von ca. 5 min, um möglichst kurze Analysenzeiten zu gewährleisten. Daher galt es, ein Optimum zwischen chromatographischer Trennung und Analysenzeit für die untersuchten 8 trizyklischen Antidepressiva und 2 ihrer Metabolite zu finden.

Auswahl der Trennsäule – 2 mm vs. 4 mm Innendurchmesser

Die Abhängigkeit der Elektrospray-Ionisation von der Konzentration des Analyten kann vorteilhaft bei der Auswahl der analytischen Trennsäule eingesetzt werden. Eine höhere Peakhöhe und Messempfindlichkeit kann durch die Verwendung von Narrow-bore Säulen mit einem kleinen Innendurchmesser (2 mm) anstelle von klassischen HPLC-Säulen mit 4 – 4,6 mm Innendurchmesser erreicht werden. Auf diese Weise wird die Peakhöhe der Analyte um ca. den Faktor 5 erhöht.

Für die analytische Trennung der trizyklischen Antidepressiva wurden daher auch Narrow-bore Trennsäulen getestet. Es wurde u.a. eine Sunfire C18 Säule mit einer Flussrate von 0,3 ml/min eingesetzt. Die Verwendung der Narrow-bore Trennsäulen führte aber auch dazu, dass die Ionisationseffizienz der Analyte nicht mehr direkt proportional zu der Konzentration der Analyte in der Probe war. Mit steigenden Analytkonzentrationen wuchsen die Signalintensitäten überproportional stark an, so dass es bei der Messung von Kalibrationsproben zu einer ungewöhnlichen, fast exponentiellen Kalibrationskurve kam. In Abbildung 24 ist eine solche Kalibrationskurve als Beispiel schematisch dargestellt.

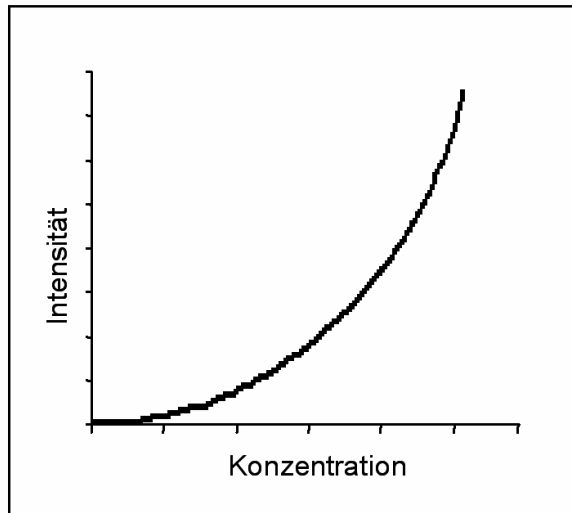


Abbildung 24: Schematische Darstellung einer Kalibrationskurve bei der Verwendung von Narrow-bore Trennsäulen

Durch diese unerwarteten Ionisationseffekte war eine korrekte Berechnung der Analytkonzentration nicht möglich, so dass für die analytische Trennung der TZA auf klassische Trennsäulen mit 4,6 mm Innendurchmesser zurückgegriffen wurde.

In Vorversuchen wurden vier verschiedene Trennsäulen für eine Umkehrphasen-Chromatographie getestet: Zorbax RX-C18, Zorbax Eclipse C8, LiChrospher® 100 RP18 und MZ Aqua (Dimensionen siehe Anhang).

Auf der Zorbax Eclipse C8 konnte keine, den beschriebenen Anforderungen entsprechende, Trennung erzielt werden. Sowohl die LiChrospher® 100 RP18 und die MZ Aqua-Säule führten zu einem starken Tailing der trizyklischen Antidepressiva. Dieses Tailing ist vermutlich auf eine vorhandene Restsilanolaktivität zurückzuführen. Diese führt bei basischen Substanzen zu einer schlechten Peakform und einer hohen Peakasymmetrie.

In Vorversuchen wies die Zorbax RX-C18-Säule die besten Ergebnisse auf.

Optimierung der chromatographischen Trennung auf einer Zorbax RX-C18 Trennsäule

Zunächst wurde in einem weiteren Vorversuch Acetonitril als organisches Lösungsmittel für die mobile Phase ausgewählt, da die Verwendung von Methanol zu einer schlechteren Peakform und höheren Retentionszeiten führte. Anschließend wurde über ein Gradientenprogramm der Anteil des Acetonitrils in der mobilen Phase bestimmt, wobei 40 % (v/v) Acetonitril als Optimum ermittelt wurden.

Bei der LC-MS/MS Kopplung müssen hinsichtlich der verwendeten mobilen Phasen besondere Anforderungen berücksichtigt werden. Es ist nicht möglich, nichtflüchtige Puffersalze (z.B. Phosphate) oder Ionenpaarreagenzien, wie sie bei herkömmlichen HPLC-RP Methoden verwendet werden, einzusetzen. Diese nichtflüchtigen Substanzen kristallisieren an der Ionenoptik aus und verstopfen diese oder verfälschen durch die Verkrustungen die angelegten Spannungen. Aus diesem Grund ist es notwendig, flüchtige Eluentzusätze, wie z.B. Ameisensäure, zu verwenden. Grundsätzlich sollten bei der Methodenentwicklung für die LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) sehr niedrige Additiv- und Pufferkonzentrationen im Eluenten verwendet werden. Dabei werden Konzentration kleiner als 10 mM als ideal angesehen⁴⁴.

Aus diesem Grund wurde die analytische Trennung anfänglich mit einer Pufferkonzentration von 5 mM Ammoniumacetat entwickelt.

Im Verlauf der Optimierung des Transferschritts von der MMP SPE-Säule zur analytischen Trennsäule wurde der Gehalt der mobilen Phase an Ammoniumacetat von 5 auf 25 mM gesteigert. Dieser höhere Anteil an Ammoniumacetat verringert zusätzlich das Tailing der Peaks und hat keinen negativen Einfluss auf die MS-Detektion.

Die analytische LC-Trennung wurde zusätzlich noch über die Säulentemperatur und die Flussgeschwindigkeit optimiert. Für die Optimierung der Säulentemperatur wurde die Trennung bei 22°C, 30°C, 40°C und 50°C durchgeführt. Neben der Verkürzung der Analysenzeit konnte auch das Tailing der trizyklischen Antidepressiva um bis zu 25 % bei einigen TZA verringert werden. Die chromatographische Trennung wurde bei Flussgeschwindigkeiten von 0,8 ml/min, 0,9 ml/min und 1 ml/min durchgeführt.

Das Massenspektrometer ist prinzipiell ein massenflusssensitiver Detektor. Bei dem Elektrospray-Ionisations Verfahren sind die erzeugten Signale jedoch konzentrationsabhängig und die höchste Ionisierungseffizienz wird daher nur bei kleinen Flussraten erreicht¹²⁹. Aus diesem Grund wurde der Eluentstrom der MD-SPE Plattform mit einer Flussrate von 1 ml/min nicht vollständig in das MS geleitet, sondern davor geteilt und nur ein Anteil von ca. 0,2 ml/min mit dem Massenspektrometer analysiert.

Zusammenfassung der analytischen Kenngrößen

Die chromatographische Trennung der 8 trizyklischen Antidepressiva und der 2 Metabolite erfolgt isokratisch auf einer Zorbax RX-C18 Trennsäule (75 x 4,6 mm, 3,5 µm + 10 x 4,6 mm

Guardcolumn) bei 50 °C Säulentemperatur und 1 ml/min Flussgeschwindigkeit mit einer mobilen Phase, bestehend aus 40 % Acetonitril (v/v) und 60 % 25 mM Ammoniumacetatlösung mit einem pH-Wert von 3. Der Eluentstrom wird vor dem Massenspektrometer im Verhältnis 1:5 geteilt, so dass nur ca. 0,2 ml/min in das MS gelangen. In Abbildung 25 ist ein repräsentatives Chromatogramm einer Standardlösung dargestellt. Die Retentions- und Tailingfaktoren der optimierten chromatographischen Trennung sind im Anhang aufgeführt.

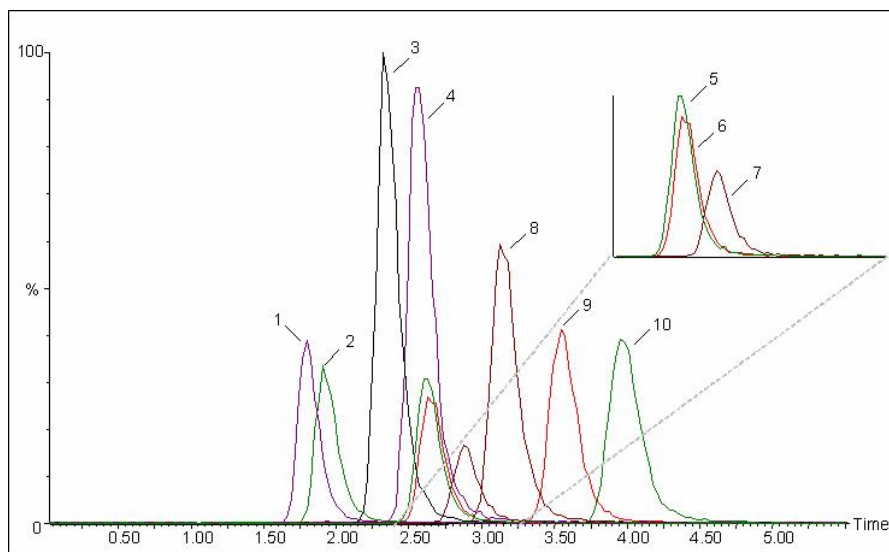


Abbildung 25: Chromatogramm der analytischen Trennung der trizyklischen Antidepressiva. 1 Nordoxepin (NDX), 2 Doxepin (DXP), 3 Desipramin (DSP), 4 Imipramin (IMP), 5 Nortriptylin (NTL), 6 Maprotilin (MTL), 7 Amitriptylin (ATL), 8 Trimipramin (TMP), 9 Norclomipramin (NCP) und 10 Clomipramin (CMP). Injektionsvolumen 20 μ l. Konzentration je Analyt 100 ng/ml.

6.2 MS/MS-Detektion

Ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung einer LC-MS/MS Methode besteht in der Optimierung der Ionisation der untersuchten Analyte, um möglichst intensive Signale und damit eine möglichst niedrige Bestimmungsgrenze zu erreichen.

Zunächst erfolgte daher in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Precursorionen. Dabei wurden die Linsenspannungen und die Kapillarspannung für jeden einzelnen Analyt optimiert und danach über einen Kompromiss die allgemeinen Parameter für alle untersuchten Analyte gemeinsam festgelegt. Lediglich die Cone-Spannung wurde für jeden Analyt einzeln

eingestellt. Unter den gewählten Bedingungen wurden ausschließlich protonierte $[M+H]^+$ Quasimolekülonen gebildet. Es konnten keine Ammonium- oder Natriumaddukte beobachtet werden.

Danach erfolgte mit Hilfe des Kollisionsgases und der Kollisionsenergie die Fragmentierung der Precursorionen zu „diagnostischen“ Produktionen, so dass für jeden Analyt ein charakteristischer Massenübergang definiert wurde. Dabei ist der Druck des Kollisionsgases für alle Analyte gleich, die Kollisionsenergie aber für jeden Analyt frei einstellbar. Die Kollisionsenergie wurde so gewählt, dass möglichst intensive Fragmentationen gebildet wurden, um maximale Messempfindlichkeiten im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) zu erreichen. Dabei durfte die Kollisionsenergie nicht zu hoch gewählt werden, da dann zwar alle Precursorionen fragmentiert wurden, aber auch zu viele kleine und wenig intensive Fragmente entstanden.

Das Precursorion und die Fragmente des Modellanalyten Desipramin und deren strukturelle Zuordnung sind in Abbildung 26 beispielhaft für alle trizyklischen Antidepressiva dargestellt.

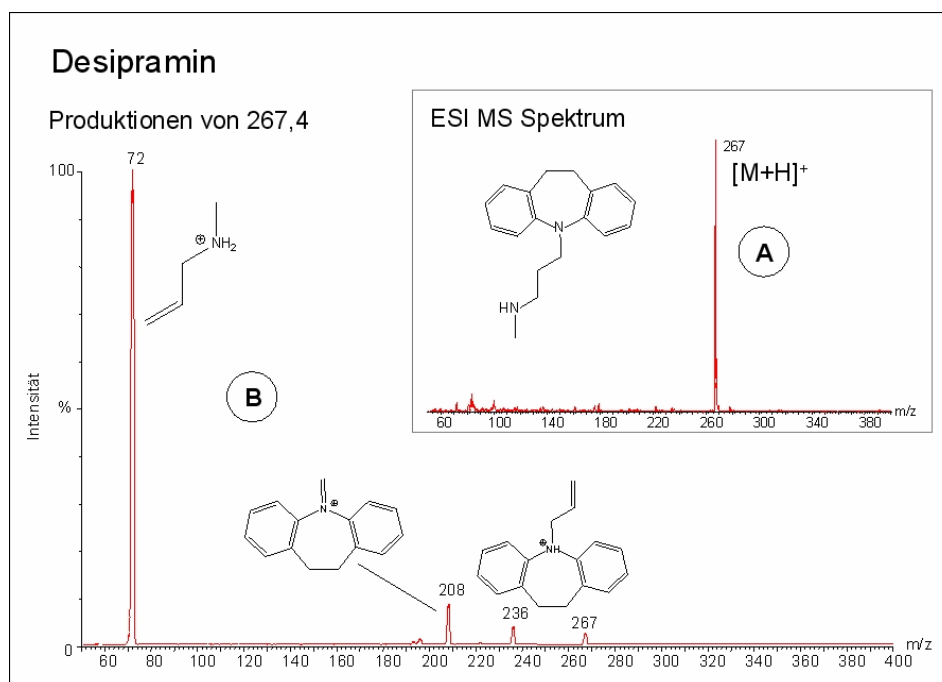


Abbildung 26: MS-Spektrum und Produktionen-Spektrum des Desipramins (267,4 m/z) und strukturelle Zuordnung der gebildeten Fragmentationen

Die verwendeten Massenübergänge, die Cone-Spannung und die Kollisionsenergie für die trizyklischen Antidepressiva sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über die ermittelten Massenübergänge, deren Cone-Spannung und Kollisionsenergie

Analyt	Precursor- ion	Produkt- ion	Cone- Spannung	Kollisions- energie
Amitriptylin (ATL)	278,4	233,4	20	20
Clomipramin (CMP)	315,4	86	25	20
Desipramin (DSP)	267,4	72	20	18
Doxepin (DXP)	280,4	107,3	29	22
Imipramin (IMP)	281,4	86	20	20
Maprotilin (MTL)	278,4	250,3	20	20
Norclomipramin (NCP)	301,4	71,9	20	20
Nordoxepin (NDX)	266,4	107,3	20	20
Nortriptylin (NTL)	264,4	91,2	20	20
Trimipramin (TMP)	295,5	100,4	20	20
Amitriptylin-D6 (ATL-D6)	284,4	90,1	20	20

Die ermittelten Massenübergänge müssen möglichst spezifisch für einen Analyt sein, da es sonst zu falschen Signalen kommen kann. Aus diesem Grund müssen möglichst charakteristische Produktionen generiert werden.

Für Amitriptylin (ATL) und Maprotilin (MTL) ist es entscheidend, spezifische Massenübergänge zu finden, da beide Stoffe die gleiche Masse und daher das gleiche Precursorion besitzen (d.h. isobar sind). Beide Stoffe bilden in der Kollisionszelle überwiegend gleiche Fragmente. Durch eine entsprechende Einstellung der Messparameter war es möglich, für beide Stoffe spezifische Produktionen zu identifizieren. In Abbildung 27 sind die Produktionen-Spektren für Amitriptylin und Maprotilin dargestellt. Die charakteristischen Fragmentationen sind hervorgehoben. Für Amitriptylin wurde das Fragment 233 m/z und für Maprotilin das Fragment 250 m/z ausgewählt. Auf diese Weise ist es möglich, ATL und MTL auch dann zu unterscheiden, wenn beide Stoffe koeluieren.

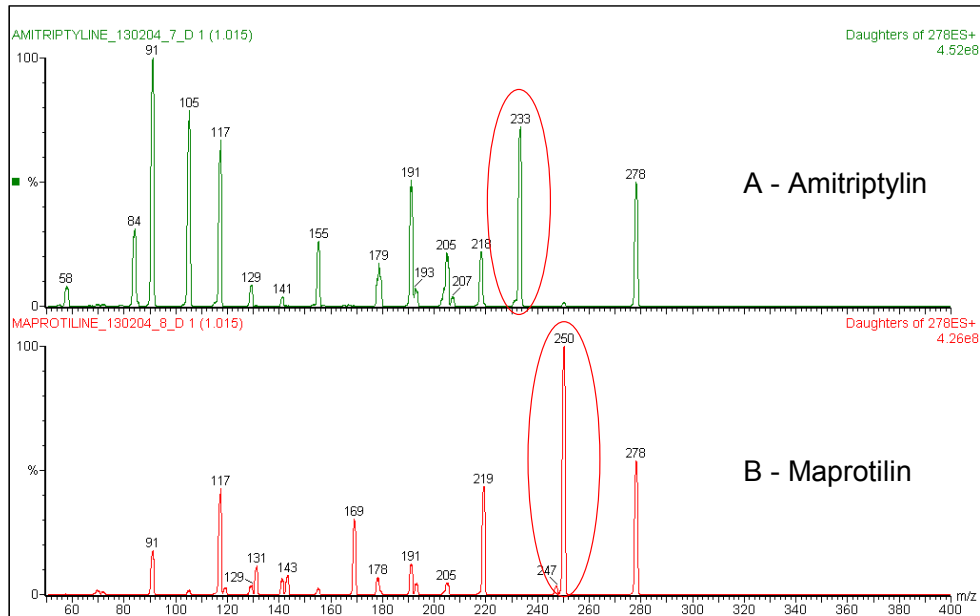


Abbildung 27: Produktions-Spektren des Precursorions 278 m/z von A - Amitriptylin und B - Maprotilin

Die optimierten Bedingungen für die MS-Detektion der untersuchten trizyklischen Antidepressiva sind im Anhang im Detail aufgeführt.

Crosstalk

Die untersuchten trizyklischen Antidepressiva wurden im Verlauf der chromatographischen Trennung nicht Basislinien getrennt. Der Grund hierfür ist eine signifikante Verkürzung der Analysenzeit. Daher muss evaluiert werden, ob es zu einem so genannten Crosstalk kommt, d.h. ob Analytsignale eines Massenübergangs auch auf anderen, nicht zu diesem Analyt gehörenden Massenübergängen detektiert werden. Dafür wurden die TZA einzeln in hohen Konzentrationen (1 µg/ml) auf die analytische Trennsäule gegeben und mit dem MS/MS analysiert.

Tabelle 8: Crosstalk zwischen den Massenübergängen

Analyt	Crosstalk bei	% Crosstalk
Amitriptylin	Doxepin	0,5
Nordoxepin	Desipramin	0,2
Doxepin	Imipramin	0,2

In Tabelle 8 sind die Analyte dargestellt, bei denen ein signifikanter Crosstalk detektiert wurde. Das Amitriptylin-Signal führt zu einem Signal auf der Doxepin Spur (0,5 % der Gesamtintensität des ATL Signals), Nordoxepin führt nur zu einem schwachen Signal auf der Desipramin Spur und Doxepin führt zu einem ebenfalls schwachen Signal auf der Imipramin Spur.

Diese detektierten Störungen sind für die hier angewandte chromatographische Trennung nicht relevant, da sowohl ATL von DXP, NDX von DSP und DXP von IMP chromatographisch abgetrennt wird und sich die Analytsignale nicht überlappen.

6.3 RAM SPE-Säule

6.3.1 Bestimmung der Elutionszeit $t_{M,RAM}$ der Probenmatrix

Wie bereits beschrieben stellen biologische Flüssigkeiten, wie beispielsweise Plasma und Urin, eine extrem heterogene und damit komplexe Probenmatrix dar. Ihre Zusammensetzung unterliegt außerdem starken inter- und intraindividuellen Schwankungen.

Da die wiederholte Injektion und Aufbereitung unbehandelter biologischer Flüssigkeiten mit herkömmlichen Packungsmaterialien nicht möglich ist, wurden in der MD-SPE Plattform so genannte Restricted Access SPE-Packungsmaterialien speziell für die Abtrennung makromolekularer Probenbestandteile eingesetzt.

Das Elutionsprofil der Matrixbestandteile der Plasma-, Serum- und Urinproben und die Kenngröße $t_{M,RAM}$ wurden wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben ermittelt. Vor der direkten Injektion der biologischen Flüssigkeit wurde diese zentrifugiert (3 min, 15584 g), um partikuläre Bestandteile zu entfernen. Für die Abtrennung der makromolekularen Probenbestandteile wurden LiChrospher® ADS RP4 SPE-Säulen mit den Dimensionen 20 x 2 mm und 5 x 4 mm getestet. Die biologischen Proben wurden direkt auf die RAM SPE-Säulen aufgegeben und dort gröÙenselektiv fraktioniert. Dabei wurden die makromolekularen Bestandteile mit Hilfe des Eluenten E1 in den Abfall eluiert, während die Modellanalyte, die trizyklischen Antidepressiva, auf der SPE-Säule retiniert werden. Die Elution der Probenmatrix wurde über einen Diodenarray-Detektor bzw. einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Als Eluent E1 wurde ein Gemisch aus 95 % Wasser und

5 % Acetonitril (v/v) verwendet. Der Zusatz von Acetonitril zu der mobilen Phase gewährleistet die Aufhebung der Proteinbindung der Analyte.

Das Elutionsprofil der makromolekularen Probenmatrix wurde für Human Plasma, Serum und Urin auf beiden RAM SPE-Säulen mit Probenvolumina von 10, 20, 50 und 100 μ l und Flussraten von 1 und 4 ml/min aufgezeichnet.

Auf diese Weise wurde der Einfluss der Flussrate des Eluenten, der Säulendimension, des Injektionsvolumens und der biologischen Matrix untersucht bzw. bestimmt.

Die Abtrennung der Probenmatrix mit einer Flussrate von 4 ml/min anstelle von 1 ml/min führt zu einer 4-fach schnelleren Elution, wobei das für die vollständige Elution der Probenmatrix benötigte Volumen bei beiden Flussraten das gleiche ist. Diese Beobachtung ist nicht unerwartet, da die makromolekulare Probenmatrix keine Wechselwirkungen mit dem Restricted Access Material eingeht (Größenausschlusschromatographie) und mit dem Totvolumen der SPE-Säule eluiert wird.

Aus diesem Grund haben auch die Säulendimensionen der RAM SPE-Säulen keinen Einfluss auf die Elutionszeit, solange das Säulenbettvolumen identisch ist. Aus diesem Grund wurde die Abtrennung der Probenmatrix auf einer 20 x 2 mm und auf einer 5 x 4 mm SPE-Säule untersucht. Beide Säulen besitzen das gleiche Säulenbettvolumen. Infolge des geringeren Innendurchmessers der 20 x 2 mm SPE-Säule ist die lineare Flussgeschwindigkeit des Eluenten 4mal so hoch wie bei der 5 x 4 mm SPE-Säule.

Die Abhängigkeit der Elutionszeit $t_{M, RAM}$ vom Injektionsvolumen und der biologischen Probenmatrix ist in Abbildung 28 für die beiden untersuchten RAM SPE-Säulen dargestellt.

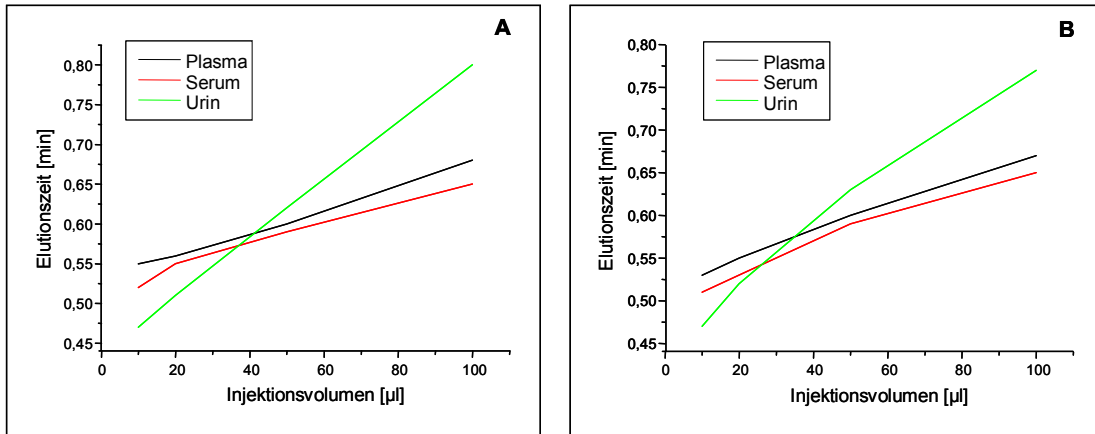


Abbildung 28: Elutionszeiten ($t_{M, RAM}$) der makromolekularen Probenmatrix in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen bei 4 ml/min Flussgeschwindigkeit der Eluenten. A – LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm; B – LiChrospher ADS RP4, 5 x 4 mm

Das Elutionsprofil einer Serumprobe entspricht erwartungsgemäß nahezu dem einer Plasmaprobe. Die kürzere Elutionszeit einer Serumprobe ist wahrscheinlich auf die Abwesenheit des makromolekularen Fibrinogens zurückzuführen. In Urinproben steigt die Elutionszeit im Verhältnis zum Injektionsvolumen stärker an als für Plasma oder Serum. Wahrscheinlich ist dies auf den höheren Anteil an niedermolekularen Matrixbestandteilen im Urin zurückzuführen.

Abbildung 29 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm für die Elution der makromolekularen Matrix einer Human Plasmaprobe (100 µl). Die Probe wurde mit einer Flussrate von 4 ml/min auf einer 20 x 2 mm RAM SPE-Säule fraktioniert.

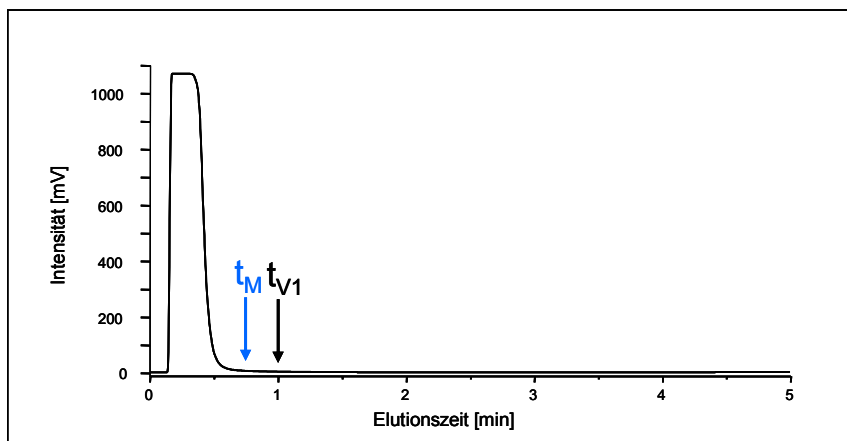


Abbildung 29: Elutionsprofil der makromolekularen Probenmatrix. 100 µl Plasma, 4 ml/min, 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v), $\lambda = 280$ nm, LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass bis zu 100 µl Proben an Plasma, Serum oder Urin durch die LiChrospher® ADS RP4 SPE-Säulen mit einer Flussrate von 4 ml/min innerhalb von weniger als 1 Minute fraktioniert werden können. Für die Injektion einer entsprechenden 20 µl Probe verringert sich diese Zeit auf ca. 0,55 – 0,6 min.

6.3.2 Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A, RAM}$

Die Bestimmung der Durchbruchzeit ($t_{A, RAM}$) bzw. des Durchbruchvolumens der trizyklischen Antidepressiva erfolgte wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben. Analog zur Bestimmung von $t_{M, RAM}$ wurden zwei RAM SPE-Säulen mit den Dimensionen 20 x 2 mm und 5 x 4 mm untersucht, die mit LiChrospher® ADS RP4 Material gepackt waren. 100 µl einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva wurden auf die RAM SPE-Säulen aufgegeben und deren Elutionsprofil mit dem UV- und dem Diodenarray-Detektor aufgezeichnet. Für die Bestimmung der Durchbruchzeit wurde der gleiche Eluent verwendet wie für die Bestimmung von $t_{M, RAM}$. Der Eluent E1 [95/5 Wasser/Acetonitril (v/v)] wurde dabei mit einer Flussrate von 4 ml/min von der ersten HPLC-Pumpe gefördert.

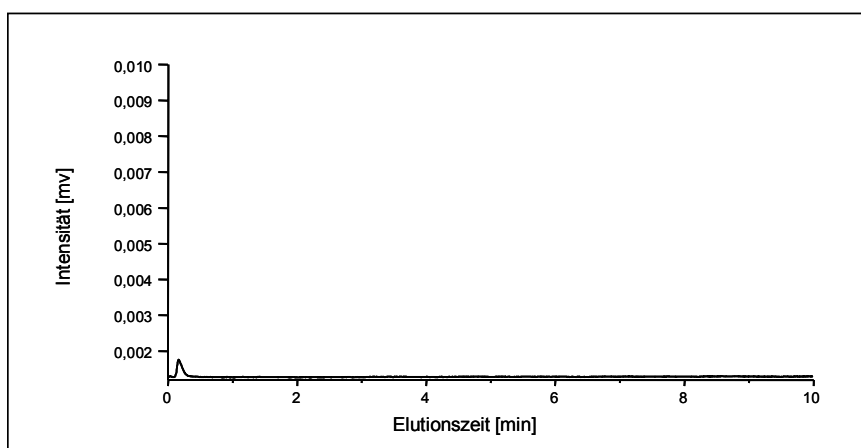


Abbildung 30: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; LiChrospher® ADS RP4, 20 x 2 mm; 4 ml/min, 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration 10 µg/ml pro Analyt; $\lambda = 220$ nm

Aus dem Chromatogramm in Abbildung 30 ist ersichtlich, dass die untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei einer Flussrate von 4 ml/min in einem Zeitraum (Waschphase) von 10 min

nicht von der RAM SPE-Säule eluiert werden. Daraus ergibt sich eine Durchbruchzeit von mindestens 10 min und ein Durchbruchvolumen von mindestens 40 ml. Diese Kenngrößen wurden auch für eine entsprechende SPE-Säule mit den Dimensionen 5 x 4 mm ermittelt.

6.3.3 Bestimmung der Transferzeit $t_{T,RAM}$

Die Bestimmung der Transferzeit der trizyklischen Antidepressiva von der RAM SPE-Säule auf die MMP SPE-Säule erfolgte gemäß der in Kapitel 5.3.3 beschriebenen Vorgehensweise. Eine Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva wurde zunächst auf die RAM SPE-Säule aufgegeben und dort 1 Minute mit Eluent E1 mit 4 ml/min fraktioniert. Danach wurde das erste Schaltventil umgeschaltet und die retenierten Analyte mit dem Eluenten E2 von der RAM SPE-Säule desorbiert. Das Elutionsprofil der trizyklischen Antidepressiva wurde mit einem UV-Detektor ($\lambda = 220$ nm) aufgezeichnet.

Optimierung der Zusammensetzung des Eluenten E2

Zunächst wurde für Eluent E2 reines Acetonitril verwendet. Dies ermöglichte die Elution der trizyklischen Antidepressiva als schmalen Peak mit einer Peakbreite von nur 0,25 min. Ein Carry-over Effekt von bis zu 15 % wies aber darauf hin, dass die Elution der Analyte nicht vollständig war. Die Kombination aus Acetonitril und Wasser bzw. einer Pufferlösung führte zu einem sehr starken Tailing der Analyte bei der Elution. Dieses Tailing wurde auch beobachtet, wenn reines Methanol für die Elution verwendet wurde. Aus verschiedenen Mischungen von Methanol und Wasser bzw. einer Ammoniumacetat Pufferlösung wurde schließlich die Eluentzusammensetzung aus 80 % Methanol und 20 % einer 2 mM Ammoniumacetatlösung (v/v) als beste Mischung ausgewählt.

Einfluss der Flussrate des Eluenten

Im Gegensatz zur Elution der makromolekularen Bestandteile der Probenmatrix ist die Elution der trizyklischen Antidepressiva von der RAM SPE-Säule von der Flussrate des Eluenten abhängig. In Abbildung 31 ist dies dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Elutionszeit am Anfang fast exponentiell abnimmt, sich dann aber sehr schnell einem Wert asymptotisch annähert. Für den Transfer der Analyte von der RAM SPE-Säule auf die MMP SPE-Säule wurde daher eine Flussrate von 3 ml/min ausgewählt.

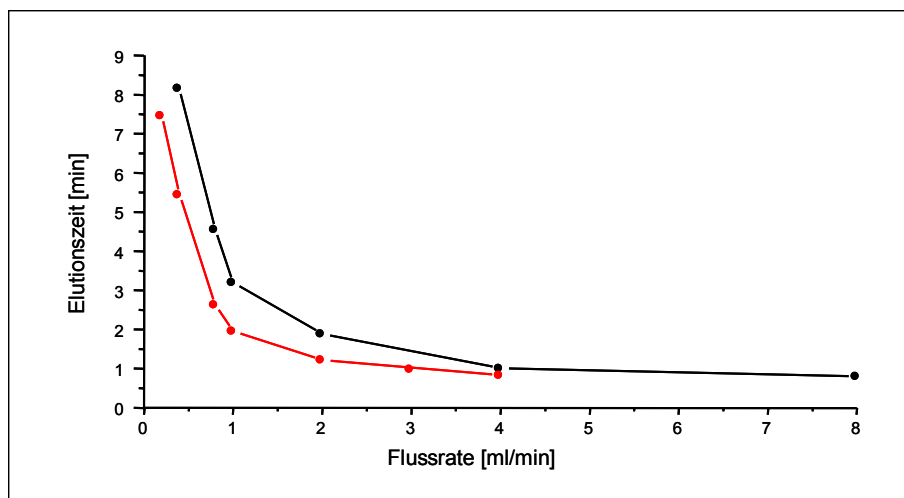


Abbildung 31: Elutionszeiten einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva von der RAM SPE-Säule in Abhängigkeit von der Flussrate des Eluenten E2; ● - LiChrospher ADS RP4, 5 x 4 mm; ● - LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm

Die Elution der TZA von der RAM SPE-Säule ist auch von den Säulendimensionen abhängig. Bei der Betrachtung der Elutionszeiten der 20 x 2 mm SPE-Säule und der 5 x 4 mm SPE-Säule fällt auf, dass die Elutionszeiten auf der 20 mm SPE-Säule generell kürzer sind als auf der 5 mm SPE-Säule. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die höhere lineare Flussgeschwindigkeit des Eluenten auf der schmaleren SPE-Säule zurückzuführen.

Aufgrund dieser Befunde wurde in der MD-SPE Plattform für die on-line Analyse der Antidepressiva eine LiChrospher[®] ADS RP4 SPE-Säule mit den Dimensionen 20 x 2 mm für den ersten Fraktionierungsschritt eingesetzt.

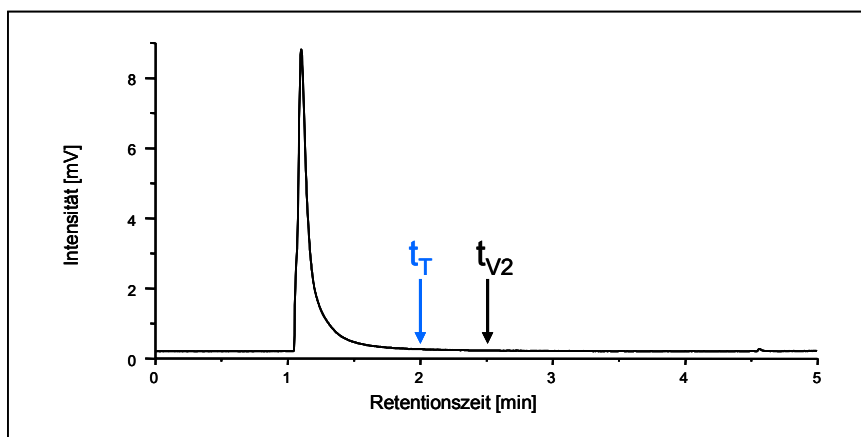


Abbildung 32: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. SPE-Säule LiChrospher® ADS RP4 (20 x 2 mm); Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration 1 µg/ml; Eluent E2 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Flussrate 3 ml/min; $\lambda = 220$ nm

Abbildung 32 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm der Elution der untersuchten Analyte von der RAM SPE-Säule. Nach Injektion von 100 µl einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva (1 µg/ml) wird bei einer Flussrate von 3 ml/min des Eluenten E2 (80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v)) etwa 1 Minute benötigt, um die Zielanalyte quantitativ auf die nachgeschaltete MMP SPE-Säule zu transferieren. Werden nur 20 µl einer Standardlösung injiziert, verringert sich $t_{T,RAM}$ auf ca. 0,65 min bei einer Flussrate von 3 ml/min.

6.4 MMP SPE-Säule

Für den zweiten Fraktionierungsschritt der MD-SPE Plattform, die chemoselektive Abtrennung der niedermolekularen Restmatrix, wurden 4 verschiedene Mixed-Mode Adsorbentien und 2 schwache Kationenaustausch-Materialien untersucht. Folgende Säulendimensionen wurden für diese Untersuchungen verwendet: Oasis WCX – 20 x 2,1 mm und 20 x 1 mm; Strata X-CW – 20 x 2 mm und 20 x 1 mm; Isolute HXC-Q – 20 x 2 mm; Chromabond PCA 20 x 2 mm; LiChrospher® XDS COOH/Diol 20 x 4 mm; CIM-CM 20 x 2 mm. Die Eigenschaften der Materialien sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Auch für diese zweite SPE-Säule wurden die in Kapitel 5.3 beschriebenen Kenngrößen t_A , t_M und t_T bestimmt.

6.4.1 Bestimmung der Durchbruchzeit $t_{A,MMP}$

Entsprechend der in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Vorgehensweise wurden 100 μ l einer Standardlösung (1 μ g/ml pro Analyt) auf die MMP SPE-Säulen aufgegeben und das Elutionsprofil mit einem UV-Detektor bei 220 nm aufgezeichnet (Abbildung 33). Die mobile Phase für die Bestimmung der Durchbruchzeit war identisch mit dem Eluenten des Analyttransfers von der RAM zur MMP SPE-Säule: 80/20 Methanol/ 2 mM Ammoniumacetat (v/v).



Abbildung 33: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; SPE-Säule: Oasis WCX, 20 x 2,1 mm; 4 ml/min 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Injektionsvolumen 100 μ l; Konzentration 1 μ g/ml pro Analyt; λ = 220 nm

Die Bestimmung erfolgte bei Flussraten von 1 und 4 ml/min mit den oben beschriebenen MMP SPE-Säulen. Die erhaltenen Durchbruchzeiten und Volumina sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Durchbruchzeiten und –volumina der untersuchten trizyklischen Antidepressiva auf verschiedenen MMP SPE-Säulen

	Säulendimension [mm]	Durchbruchzeit [min] bei 4 ml/min	Durchbruchs- volumen [ml]
Oasis WCX	20 x 1	≈ 1,5	6
	20 x 2,1	> 5	> 20
Strata X-CW	20 x 1	≈ 5	≈ 20
	20 x 2	> 5	> 20
Chromabond PCA	20 x 2	0,3	1,2
LiChrospher® XDS COOH	20 x 4	> 5	> 20
CIM-CM	20 x 2	0,25	1
Isolute HXC-Q	20 x 2	0,3	1,2

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass ausreichend große Durchbruchzeiten für die trizyklischen Antidepressiva nur mit drei SPE-Packungsmaterialien erzielt wurden. Bei diesen stationären Phasen handelt es sich um die beiden Mixed-Mode Materialien Oasis WCX und Strata X-CW und um das Kationenaustausch-Material LiChrospher® XDS COOH. Die MMP-Materialien CIM-CM und Isolute HXC-Q sowie das Kationenaustausch-Material Chromabond PCA retenieren bzw. extrahieren die trizyklischen Antidepressiva in dem Eluenten E2 nicht.

6.4.2 Bestimmung der Elutionszeit $t_{M,MMP}$ der Probenmatrix

Die Analytik von Arzneistoffen wird nicht nur durch makromolekulare Matrixbestandteile gestört, sie kann auch durch interferierende niedermolekulare Probenbestandteile negativ beeinflusst werden. Ziel der Probenaufbereitung muss es daher sein, auch derartige niedermolekulare Matrixbestandteile möglichst quantitativ abzutrennen.

Die Bestimmung der Elutionszeit dieser Restmatrix erfolgte analog der im Kapitel 5.3.5 beschriebenen Methode. Die biologischen Flüssigkeiten wurden direkt auf die RAM SPE-Säule aufgegeben und dort zunächst innerhalb 1 Minute mit Hilfe des Eluenten E1 und einer Flussrate von 4 ml/min fraktioniert. Anschließend wurde das erste Schaltventil umgeschaltet und die niedermolekularen Matrixbestandteile auf die MMP SPE-Säule transferiert und dort

chemoselektiv fraktioniert. Das Elutionsprofil dieser Matrixbestandteile wurde mit einem UV-Detektor bei 220 nm aufgezeichnet.

Für die Abtrennung der niedermolekularen Restmatrix wurde der gleiche Eluent E2 verwendet wie für den Transfer der Analyte.

Auch für diesen Schritt wurde die Abhängigkeit der Elution der Probenmatrix von der Flussrate des Eluenten untersucht. Die Untersuchung erfolgte nur für die MMP-Materialien, die ein genügend hohes Durchbruchvolumen für die trizyklischen Antidepressiva aufwiesen. Als Kontrolle für die Abtrennung der Probenmatrix wurde ein Experiment ohne MMP SPE-Säule durchgeführt.

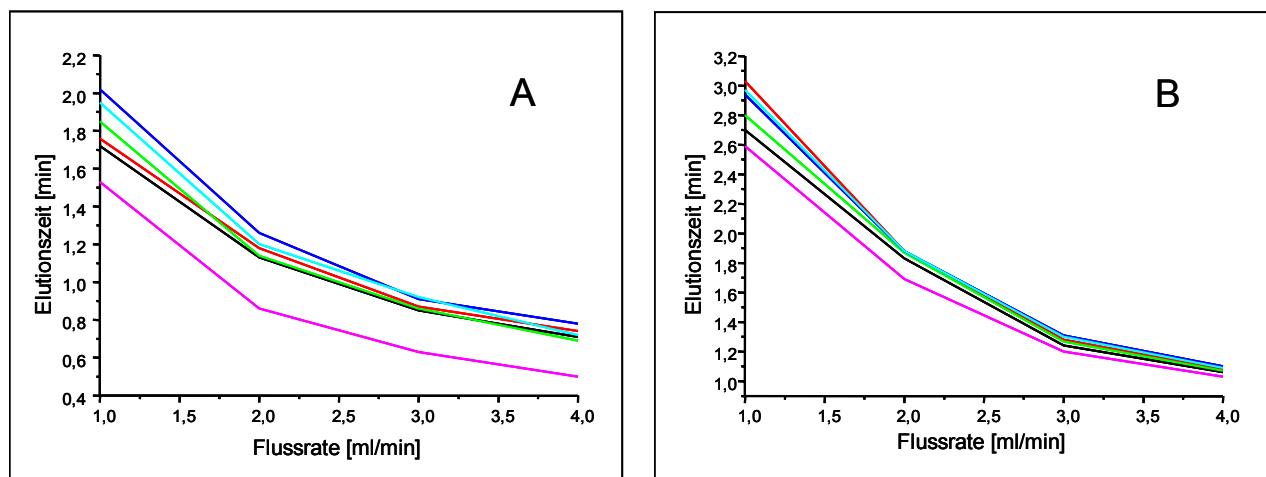


Abbildung 34: Elution der niedermolekularen Probenmatrix in Abhängigkeit von der Flussrate des Eluenten. A – 100 µl Plasma; B – 100 µl Urin; – - WCX 20 x 1 mm; - - WCX 20 x 2,1 mm; - - Strata X-CW 20 x 1 mm; - - Strata X-CW 20 x 2 mm; - - XDS COOH 20 x 4 mm; - - ohne MMP SPE-Säule

Aus den Abbildung 34 A und B ist erkennbar, dass die Probenmatrix von 100 µl Plasma oder Urin bei einer Flussrate von 3 ml/min innerhalb von 1 min bzw. 1,5 min abgetrennt werden kann. Die deutlich längere Elutionszeit für Urinproben kann auf den hohen Gehalt des Urins an niedermolekularen Matrixbestandteilen zurückgeführt werden. Für die weiteren Arbeiten wurde eine Flussrate von 3 ml/min ausgewählt, da die Zeitersparnis durch eine höhere Flussrate nicht mehr so groß ist wie bei der Steigerung der Flussrate von 1 ml/min auf 2 ml/min bzw. auf 3 ml/min. Werden nur 20 µl der biologischen Flüssigkeiten injiziert, reduziert sich diese Elutionszeit nochmals auf etwa 0,5 min bei Plasmaproben und ca. 1 min bei Urinproben. Aus den erhaltenen Zeiten für $t_{M,MMP}$ wird deutlich, dass die Analyte auf den

MMP SPE-Säulen mindestens 1 – 1,5 min retiniert werden müssen, um Analytverluste zu vermeiden. Die trizyklischen Antidepressiva müssen ein Durchbruchvolumen von mindestens 3 – 4,5 ml aufweisen.

Repräsentative Chromatogramme für die Elutionsprofile einer 20 µl Plasma- und Urinprobe sind in Abbildung 35 dargestellt.

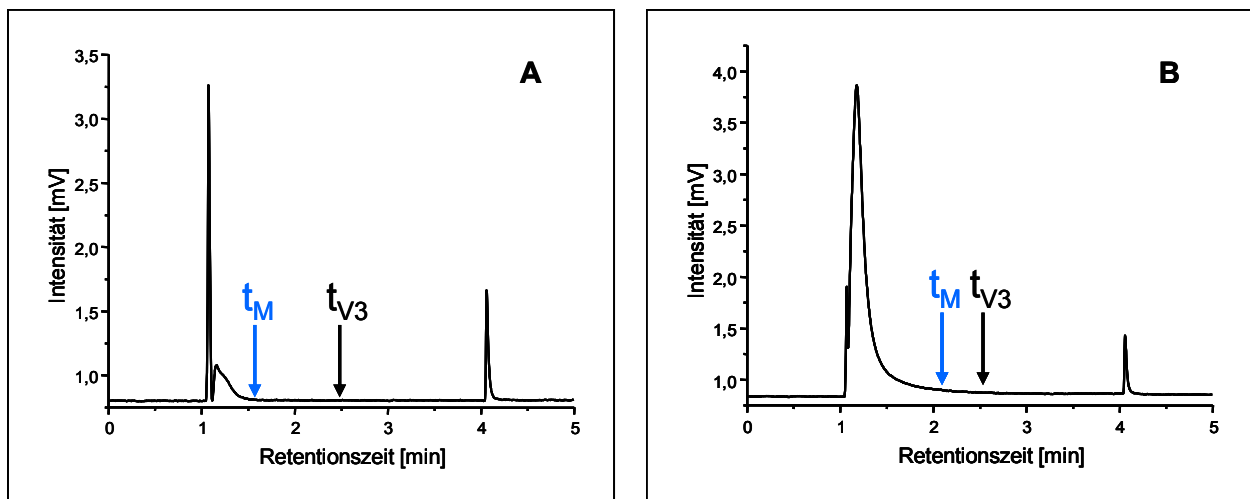


Abbildung 35: Abtrennung der niedermolekularen Probenmatrix: A – 20 µl Plasma, B – 20 µl Urin; Flussrate 3 ml/min; Eluent E2 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Oasis WCX SPE-Säule, 20 x 2,1 mm; $\lambda = 220$ nm

6.4.3 Bestimmung der Transferzeit $t_{T,MMP}$

Die Bestimmung der Transferzeit der trizyklischen Antidepressiva von der MMP SPE-Säule auf die analytische Trennsäule erfolgte wie in Kapitel 5.3.6 beschrieben.

Eine Standardlösung der Analyte (1 µg/ml) wurde mit Hilfe des Eluenten E2 (80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v), 4 ml/min) auf die MMP SPE-Säule aufgegeben und dort 1 min retiniert. Anschließend wurde das Schaltventil geschaltet, um die Analyte durch den Eluenten E3 von der MMP SPE-Säule zu desorbieren. Der saure pH-Wert (pH 3) des Eluenten bewirkt die Protonierung der Carboxylgruppen der MMP-Materialien. Dadurch wird die ionische Bindung zu den Analyten aufgehoben und diese können folglich in einem sehr scharfen Peak eluiert werden. Das Elutionsprofil der trizyklischen Antidepressiva wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgezeichnet. Die Flussrate des Eluenten E3 beträgt dabei, wie in der analytischen Trennung, 1 ml/min. Die Transferzeiten

wurden für die 3 verbliebenen Adsorbentien untersucht, die eine genügend hohe Durchbruchzeit gegenüber den Modellanalyten aufwiesen.

Um die Abhängigkeit der Transferzeit vom Ammoniumacetatgehalt des Eluenten E3 zu untersuchen, wurde $t_{T,MMP}$ für 4 verschiedene Eluenten mit Ammoniumacetatkonzentrationen von 5, 25, 50 und 100 mM bestimmt. In Abbildung 36 sind die entsprechenden Elutionszeiten dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Elutionszeiten für 5 mM deutlich erhöht sind und das Optimum bei 25 oder 50 mM liegt. Im Hinblick darauf, dass für eine massenspektrometrische Detektion kleine Pufferkonzentrationen vorteilhafter sind, wurde der Ammoniumacetatgehalt des Eluenten E3 auf 25 mM festgelegt.

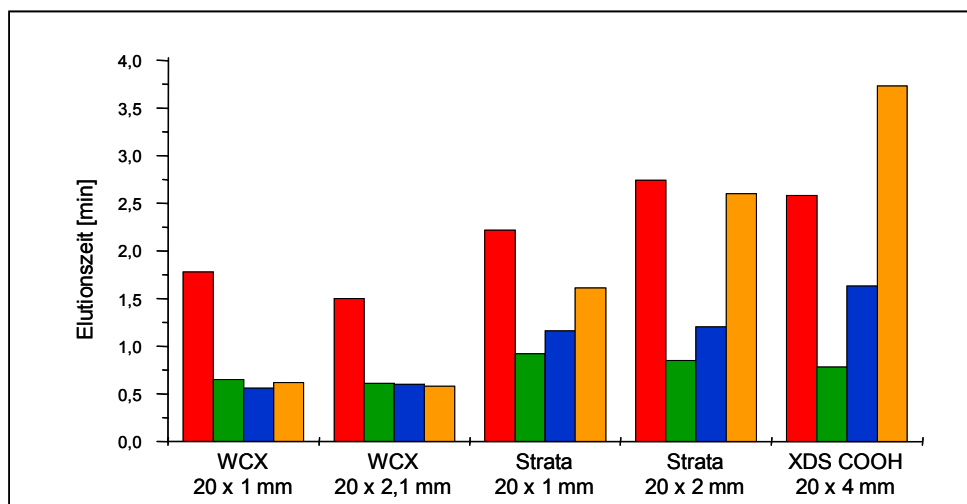


Abbildung 36: Transferzeiten der trizyklischen Antidepressiva von den MMP SPE-Säulen in Abhängigkeit vom Ammoniumacetatgehalt des Eluenten E3. ■ - 5 mM, ■ - 25 mM, ■ - 50 mM, ■ - 100 mM Ammoniumacetat

Aus der Abbildung 36 ist auch ersichtlich, dass für den Transfer der trizyklischen Antidepressiva zur analytischen Trennsäule für alle drei Materialien weniger als 1 min benötigt wird. Bei der Betrachtung der Elutionszeiten fällt auf, dass bei den beiden MMP-Materialien WCX und Strata keine signifikanten Unterschiede zwischen den 20 x 1 mm und den 20 x 2 bzw. 20 x 2,1 mm SPE-Säulen existieren. Es ist aber erkennbar, dass das Material Strata X-CW generell retentiver als das WCX-Material ist, was zu längeren Elutionszeiten führt.

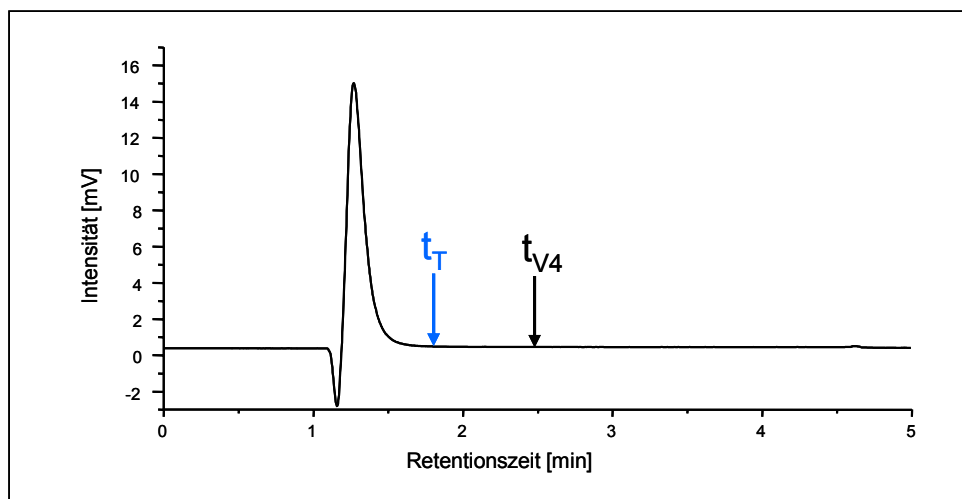


Abbildung 37: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. Injektionsvolumen 100 μ l; Konzentration jeweils 1 μ g/ml; SPE-Säule Oasis WCX, 20 x 2,1 mm; Eluent 40/60 Acetonitril/25 mM Ammoniumacetat pH 3 (v/v) 1 ml/min; $\lambda = 220$ nm

Abbildung 37 zeigt ein Elutionsprofil einer Analyt-Standardlösung (100 μ l) von der Oasis WCX SPE-Säule (20 x 2,1 mm).

Die Transferzeiten $t_{T,MMP}$ für die Injektion von 20 μ l sind in Tabelle 10 für die fünf MMP SPE-Säulen aufgeführt.

Tabelle 10: Transferzeiten $t_{T,MMP}$

	Säulendimensionen [mm]	Transferzeit $t_{T,MMP}$ [min]
Oasis WCX	20 x 1	0,63
	20 x 2,1	0,68
Strata X-CW	20 x 1	0,78
	20 x 2	0,83
LiChrospher [®] XDS COOH	20 x 4	0,78

6.5 Bestimmung der Schaltzeiten

Die Schaltzeiten der beiden 6-Wege-Ventile legen den zeitlichen Ablauf des MD-SPE Verfahrens fest. Sie werden aus den zuvor ermittelten Zeiten für $t_{A, RAM}$, $t_{M, RAM}$, $t_{T, RAM}$, $t_{A, MMP}$, $t_{M, MMP}$ und $t_{T, MMP}$ berechnet. Dabei werden die Schaltzeiten so festgelegt, dass die Analytik der untersuchten Modellsubstanzen in 20 μ l Plasma oder Urin eines Patienten problemlos möglich ist. Der Sicherheitszuschlag wurde dabei großzügig bemessen und so dimensioniert, dass auch 100 μ l analysiert und intra- bzw. interindividuelle Unregelmäßigkeiten der Probenmatrix ausgeglichen werden können. Die Berechnung der Schaltzeiten erfolgt nach den in Kapitel 5.3.7 beschriebenen Formeln.

t_{V1}

Die Schaltzeit t_{V1} gibt das Ende der gröbenselektiven Fraktionierung auf der RAM SPE-Säule an.

$$t_{V1} = t_{M, RAM} + X = 0,6 + 0,4 = \mathbf{1 \text{ min}}$$

Die Bedingung $t_{A, RAM} > t_{M, RAM}$ ist erfüllt, da $t_{A, RAM}$ bei einer Flussrate von 4 ml/min größer als 10 min ist.

t_{V2}

Die Schaltzeit t_{V2} markiert das Ende des Analyttransfers von der RAM zur MMP SPE-Säule. Da das Signal für den Analyttransfer ein starkes „Tailing“ aufweist, wurde ein Sicherheitszuschlag von 0,87 min vorgenommen.

$$t_{V2} = t_{V1} + t_{T, RAM} + X = 1 + 0,63 + 0,87 = \mathbf{2,5 \text{ min}}$$

t_{V3}

Die Schaltzeit t_{V3} gibt das Ende der chemoselektiven Fraktionierung der niedermolekularen Probenmatrix auf der MMP SPE-Säule an.

$$t_{V3} = t_{V1} + t_{M, MMP} + X = 1 + 1 + 0,5 = \mathbf{2,5 \text{ min}}$$

Aus Sicherheitsgründen wurde ein Zuschlag von 0,5 min auf die Zeit für die Abtrennung der niedermolekularen Matrix des Urins vorgenommen.

t_{V4}

Die Schaltzeit t_{V4} markiert das Ende des Analyttransfers von der MMP SPE-Säule auf die analytische Trennsäule. Da das MD-SPE Verfahren für alle untersuchten MMP SPE-Säulen gleichermaßen eingesetzt werden soll, wurde ein Sicherheitszuschlag von 0,65 min vorgenommen.

$$t_{V4} = t_{V3} + t_{T,MMP} + X = 2,5 + 0,85 + 0,65 = 4 \text{ min}$$

6.6 Zusammenstellung des Analysenzyklus

Nach der rechnerischen und experimentellen Bestimmung der Verfahrensgrößen und der chromatographischen Parameter der MD-SPE Plattform wurde der vollständige Analysenzyklus für die Analyse trizyklischer Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten zusammengestellt. Der Analysenzyklus der MD-SPE Plattform setzt sich aus fünf Teilschritten zusammen: (I) gröbenselektive Fraktionierung der biologischen Flüssigkeit, (II) Transfer der niedermolekularen Fraktion von der RAM zur MMP SPE-Säule, (III) die chemoselektive Fraktionierung, (IV) der Transfer der Analyte von der MMP SPE-Säule zur analytischen Trennsäule und (V) die analytische Trennung.

In dem Analysenzyklus werden die einzelnen Verfahrensschritte des MD-SPE Verfahrens in der vorgegebenen zeitlichen Abfolge abgearbeitet. In Tabelle 11 ist der Analysenzyklus detailliert aufgeführt.

Tabelle 11: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Analytik trizyklischer Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten. Ventilposition 6-1 = Beladen; Ventilposition 1-2 = Transfer

Zeit [min]	Schaltventil		RAM	MMP	Analytische
	1	2	SPE-Säule	SPE-Säule	Trennsäule
0	6-1	6-1	Größenselektive Fraktionierung	Reäquilibration	Reäquilibration
1	1-2	6-1	Elution + Transfer	Transfer + chemo- selektive Fraktionierung	Reäquilibration
2,5	6-1	1-2	Waschen / Reäquilibration	Elution + Transfer	Transfer + analytische Trennung
4	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung
8	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung

Für die multidimensionale Probenaufbereitung der trizyklischen Antidepressiva wurden die folgenden Säulen verwendet:

RAM: LiChrospher® ADS RP4, 20 x 2 mm, dp 25 µm
MMP: Oasis WCX, 20 x 1 mm und 20 x 2,1 mm, dp 30 µm
Strata X-CW, 20 x 1 mm und 20 x 2 mm, dp 33 µm
LiChrospher® XDS COOH, 20 x 4 mm, monolith
LC: Zorbax RX-C18, 75 x 4,6 mm, dp 3,5 µm.

Die einzelnen Teilschritte des MD-SPE Verfahrens wurden mit folgenden Eluenten durchgeführt:

E1: 95 / 5 Wasser / Acetonitril (v/v)
E2: 80 / 20 Methanol / 2 mM Ammoniumacetat
E3: 40 / 60 Acetonitril / 25 mM Ammoniumacetat pH 3.

Ein repräsentatives Chromatogramm der Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva in Humanplasma ist in Abbildung 38 dargestellt. Die einzelnen Teilschritte des Analysenzyklus

sind farblich gekennzeichnet. Aus dem Chromatogramm ist erkennbar, dass die direkte Analyse der trizyklischen Antidepressiva inklusive der vollständig automatisierten, multidimensionalen Probenaufbereitung innerhalb von weniger als 8 Minuten möglich ist.

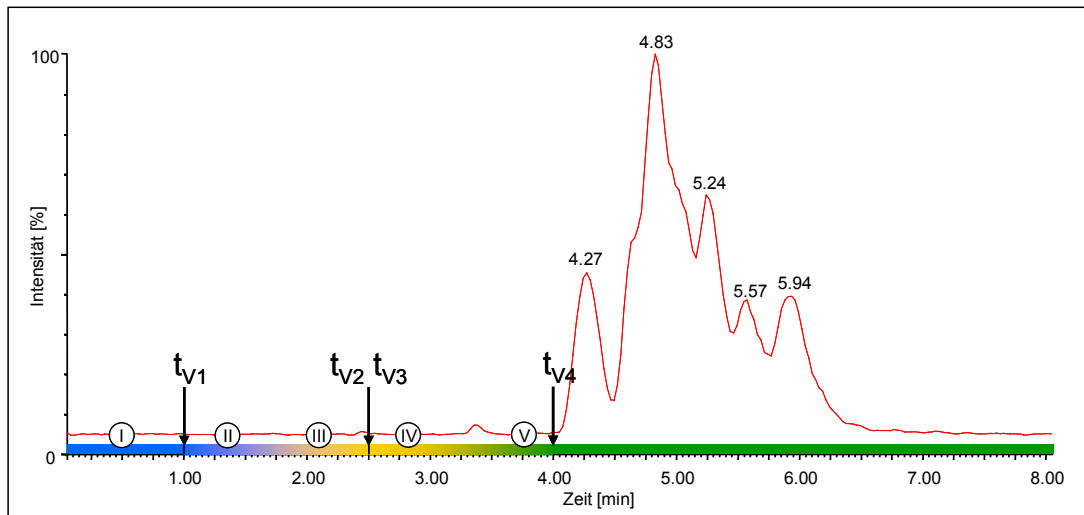


Abbildung 38: MD-SPE-LC-MS/MS Analytik der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; MMP Oasis WCX SPE-Säule, 20 x 2,1 mm; Injektionsvolumen 20 μ l; Konzentration 25 ng/ml Plasma; Detektion MS/MS MRM-Modus, dargestellt ist das Total Ionen Chromatogramm (TIC);

I – Größenselektive Fraktionierung des Plasmas (LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm), II – Transfer der niedermolekularen Fraktion zur MMP SPE-Säule (Oasis WCX, 20 x 2,1 mm), III – Chemoselektive Fraktionierung, IV – Transfer der Analyte zur analytischen Trennsäule (Zorbax RX-C18, 75 x 4,6 mm, 3,5 μ m), V – Analytische Trennung

Die Programme für die HPLC-Pumpen und die Lösungsmittel für das Waschen der SPE-Säulen sind im Anhang aufgeführt.

7 Evaluation der entwickelten MD-SPE Plattform

Das in dieser Arbeit beschriebene MD-SPE Verfahren wurde für die LC-MS/MS adäquate, direkte und vollautomatische Bestimmung basischer Analyte in komplexen biologischen Flüssigkeiten, wie Plasma und Urin, entwickelt. Eine Reihe trizyklischer Antidepressiva wurde dafür als Modellsubstanzen ausgewählt.

Die Qualität der MD-SPE Probenaufbereitung wurde hinsichtlich der folgenden Aspekte evaluiert:

- Selektivität,
- Abhängigkeit von der biologischen Matrix,
- Matrixeffekte (Ionensuppression) bei der LC-MS/MS Detektion.

Außerdem wurde das MD-SPE-LC-MS/MS Verfahren für die Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva vollständig validiert und mit Patientenproben überprüft. Darüber hinaus wurde die allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform für basische Analyte mit Beispielen unterlegt.

7.1 Selektivität des MD-SPE-LC-MS/MS Verfahrens

Die MD-SPE Plattform erlaubt die ungestörte und leistungsfähige Analytik komplexer biologischer Flüssigkeiten. Ziel der Entwicklung des MD-SPE Verfahrens war die vollständige Abtrennung unerwünschter nieder- und makromolekularer Matrixbestandteile. Dadurch sollte sowohl die Selektivität der Probenaufbereitung gesteigert als auch mögliche Matrixeffekte bei der massenspektrometrischen Detektion eliminiert werden.

Nach den Richtlinien der amerikanischen Food and Drug Administration ist die Selektivität die Fähigkeit einer analytischen Methode, den oder die Analyte in Gegenwart anderer Substanzen aus der Probe zu differenzieren und zu quantifizieren.

Um die Selektivität des MD-SPE Verfahrens zu evaluieren, wurde es mit einer konventionellen on-line SPE-LC Methode verglichen, die für die Probenaufbereitung nur eine RAM SPE-Säule verwendet. Durch den Vergleich kann die Qualitätssteigerung der MD-SPE gegenüber einer konventionellen on-line SPE aufgezeigt werden.

7.1.1 Entwicklung einer konventionellen on-line SPE-LC-MS/MS Methode für die Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva

Für die konventionelle on-line SPE werden vorzugsweise so genannte RAM SPE-LC Kopplungen angewendet. Bei diesen Kopplungen wird die unbehandelte biologische Flüssigkeit auf die RAM SPE-Säule aufgegeben und dort gröbenselektiv fraktioniert. Die Analyte werden in den Poren reteniert und die makromolekularen Bestandteile dem Abfall zugeführt. Im Gegensatz zur MD-SPE werden hierbei alle retenierten niedermolekularen Probenbestandteile auf die nachgeschaltete analytische Trennsäule transferiert und detektiert. In Abbildung 39 ist die verwendete RAM SPE-LC Kopplung dargestellt. Die RAM SPE-Säule und die analytische Trennsäule sind dabei über ein 6-Wege-Ventil verbunden.

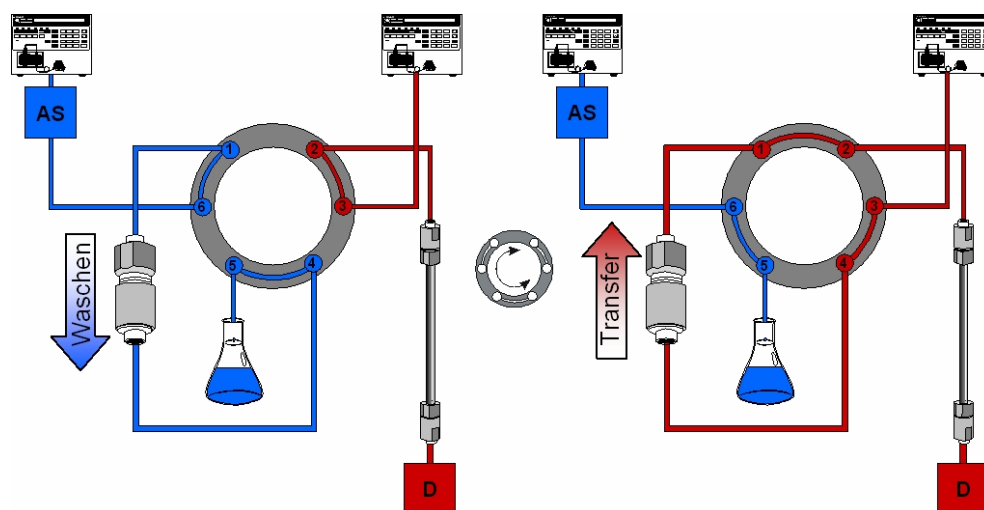


Abbildung 39: Instrumenteller Aufbau der RAM SPE-LC Kopplung für die Analyse trizyklischer Antidepressiva

Für die vergleichenden Untersuchungen mit dem MD-SPE Verfahren wurde eine RAM SPE-LC Methode für die Analyse trizyklischer Antidepressiva entwickelt. Analog der MD-SPE Plattform wurde dafür als RAM SPE-Säule eine LiChrospher® ADS RP4 (20 x 2 mm) und als

analytische Trennsäule eine Zorbax RX-C18 Säule verwendet. Der Eluent für die gröbenselektive Fraktionierung wurde ebenfalls von der MD-SPE Plattform übernommen (95/5 Wasser/Acetonitril (v/v)). Lediglich der Eluent für die analytische Trennung wurde dahingehend verändert, dass er dem Eluenten E2 der MD-SPE Plattform angeglichen wurde und 0,1 % Ameisensäure für die massenspektrometrische Detektion zugegeben wurden (80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat + 0,1 % Ameisensäure (v/v)). Durch den hohen Gehalt an Methanol im Eluenten werden die trizyklischen Antidepressiva nicht aufgetrennt. Dieser ist jedoch notwendig für die Elution der Analyte von der RAM SPE-Säule.

Der Analysenzyklus für die RAM SPE-LC Kopplung ist in Tabelle 12 zusammengestellt. Die Programme für die HPLC-Pumpen sind, wie schon für die MD-SPE Plattform, ausführlich im Anhang aufgeführt.

Tabelle 12: Analysenzyklus der RAM-LC Kopplung für die Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva

Zeit [min]	Schaltventil	RAM SPE-Säule	Analytische Trennsäule
0	6-1	Größenselektive Fraktionierung	Reäquilibrierung
1	1-2	Elution + Transfer	Transfer + Analytische Trennung
3	6-1	Waschen / Reäquilibrierung	Analytische Trennung
6	6-1	Waschen / Reäquilibrierung	Analytische Trennung

7.1.2 Vergleich der MD-SPE Plattform mit der RAM SPE-LC Kopplung

Für die Evaluation der Selektivität des MD-SPE Verfahrens wurden mehrere Plasma- und Urinproben, die zum Teil mit den trizyklischen Antidepressiva dotiert wurden, jeweils mit der MD-SPE Plattform und der konventionellen RAM SPE-LC Kopplung analysiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse und Chromatogramme wurden dann im Hinblick auf die Qualität der

Probenaufbereitung verglichen. Für diesen Vergleich wurde neben dem Massenspektrometer auch ein UV- und ein Diodenarray-Detektor verwendet.

Die Urinproben stammten von gesunden, freiwilligen Spendern, die keine trizyklischen Antidepressiva einnahmen. Die Plasmaproben von Patienten stammten aus der Routineanalytik des Institutes.

7.1.2.1 UV-/Diodenarray Detektor

Für den Vergleich von RAM SPE-LC und der MD-SPE Plattform wurden Plasma-, Urinproben und bidestilliertes Wasser untersucht. Die Detektion erfolgte relativ unselektiv, aber empfindlich bei 220 nm.

In Abbildung 40 A sind die Chromatogramme der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung von jeweils 100 µl nativem bidestilliertem Wasser (1), Plasma (2), Urin (3) dargestellt. Die Chromatogramme der mit trizyklischen Antidepressiva (1 µg/ml) dotierten Proben (bidestilliertes Wasser (4), Plasma (5) und Urin (6)) sind in Abbildung 40 B dargestellt.

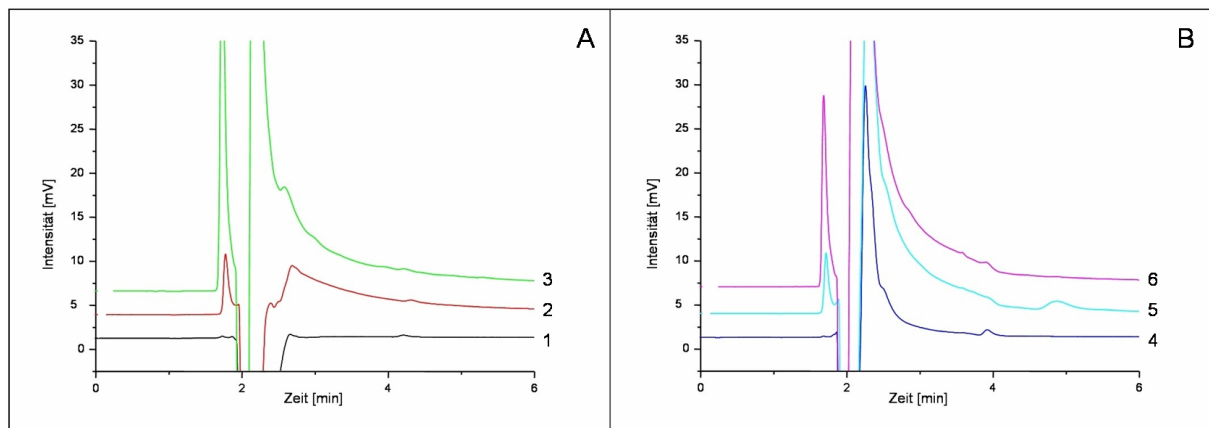


Abbildung 40: RAM SPE-LC-UV Analyse von 100 µl bidestilliertem Wasser (1), nativem Plasma (2), nativem Urin (3) sowie von bidestilliertem Wasser (4), Plasma (5) und Urin (6), die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden; $\lambda = 220 \text{ nm}$

In den Chromatogrammen ist deutlich der Schaltpeak bei ca. 2,5 min erkennbar (negativer Peak). Der zweite Peak bei ca. 3 min resultiert aus der Detektion der niedermolekularen Matrixbestandteile. Dies weist auf eine unzureichende Probenaufbereitung durch die RAM SPE-LC Kopplung hin. Die Antidepressiva können daher nicht identifiziert werden. Im Vergleich der undotierten Plasma- und Urinproben (2 + 3) mit der Wasserprobe (1) sind die

extrahierten Matrixbestandteile deutlich an dem Peak bei ca. 2,9 min erkennbar. Das Signal für die Probenmatrix ist bei der Urinprobe deutlich intensiver als bei der Plasmaprobe. Urin ist bekanntlich eine extrem heterogene und analytisch anspruchsvolle biologische Matrix, die tausende niedermolekulare Verbindungen enthält. Diese Matrixbestandteile können die Detektion der trizyklischen Antidepressiva stören und bei einer massenspektrometrischen Detektion Matrixeffekte wie Ionensuppression hervorrufen. Eine konventionelle RAM SPE-LC Kopplung erfordert deshalb eine sehr aufwendige analytische Trennung, um die trizyklischen Antidepressiva von der restlichen niedermolekularen Probenmatrix abzutrennen. Die Verwendung eines Diodenarray-Detektors (DAD) ermöglicht eine UV-Detektion der extrahierten niedermolekularen Verbindungen über einen Wellenlängenbereich von 220 – 400 nm. Die Chromatogramme sind in Abbildung 41 dargestellt. Der charakteristische Systempeak (Schalten des Schaltventils) ist bei allen Proben bei etwa 2 min zu sehen. Im Vergleich zum bidestillierten Wasser (A) sind die niedermolekularen Verbindungen aus dem Plasma (B) und dem Urin (C) eindeutig an der Absorption über den gesamten Wellenlängenbereich zu erkennen. Dabei fällt auf, dass im Plasma (B) einzelne Substanzen/Fractionen anhand der Absorption bei 2,9, 3,2, 3,9 und 4,4 min unterschieden werden können. Dies ist in der Urinprobe nicht möglich.

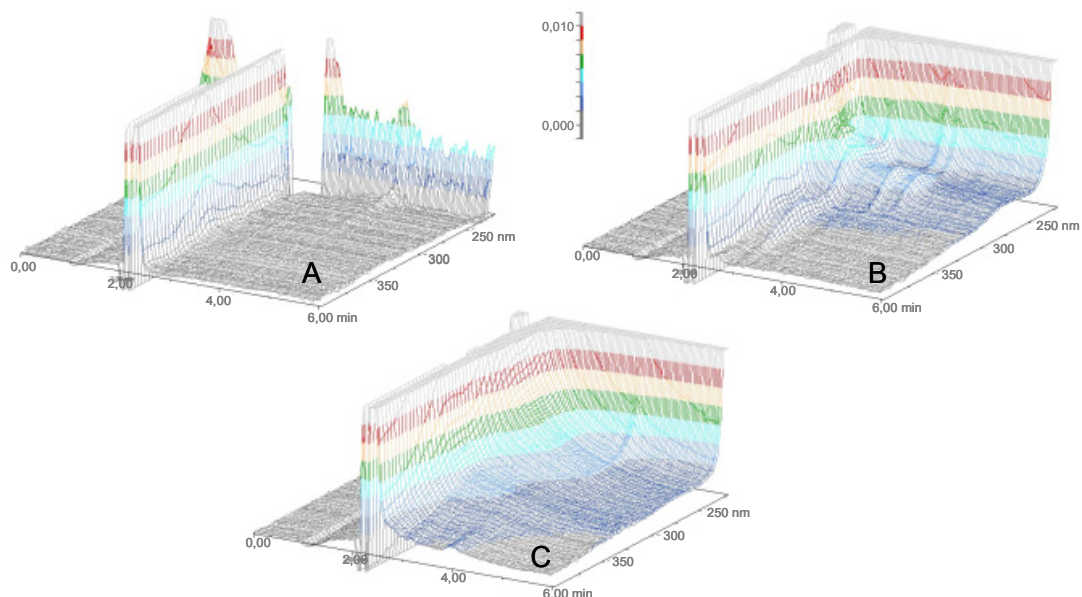


Abbildung 41: RAM SPE-LC-DAD Analyse von 100 µl bidestilliertem Wasser (A), nativem Plasma (B) und nativem Urin (C)

Im nächsten Schritt wurden dieselben Proben mit der MD-SPE Plattform analysiert. In Abbildung 42 A und B sind die entsprechenden Chromatogramme von nativem bidestilliertem Wasser (1), Plasma (2) und Urin (3), sowie dotiertem (trizyklische Antidepressiva (1 µg/ml)) bidestilliertem Wasser (4), dotiertem Plasma (5) und dotiertem Urin (6) dargestellt.

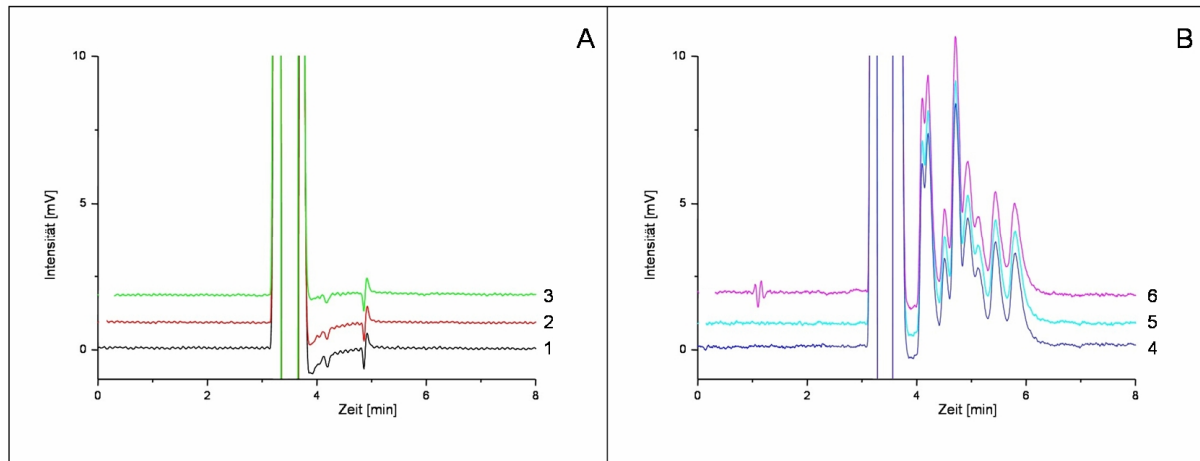


Abbildung 42: MD-SPE-LC-UV Analyse von 100 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin und Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma und (6) Urin, $\lambda = 220 \text{ nm}$

Der Systempeak ist bei ca. 2,9 min erkennbar. Da keine weiteren Peaks bei den undotierten Proben (1 - 3) identifiziert wurden, kann von einer kompletten Abtrennung der niedermolekularen Verbindungen ausgegangen werden. Selbst das Chromatogramm (3) der Urinprobe zeigt keine verbliebenen Matrixbestandteile. Dieses Chromatogramm ist deckungsgleich mit der Wasserprobe. Dies verdeutlicht sehr anschaulich die Vorteile/Qualität der MD-SPE Plattform. Die dotierten Proben zeigen die analytische Trennung der Modellsubstanzen im Bereich von 4 - 6 min. Mit Hilfe der MD-SPE Plattform wurden die interferierenden Matrixbestandteile abgetrennt. Daher ist ein selektiver Nachweis der Analyte möglich.

Die Verwendung des Diodenarray Detektors (Abbildung 43) beweist ebenfalls die vollständige Abtrennung der komplexen Probenmatrix. Die Signale bei ca. 4 min werden durch das Schalten des zweiten Schaltventils hervorgerufen.

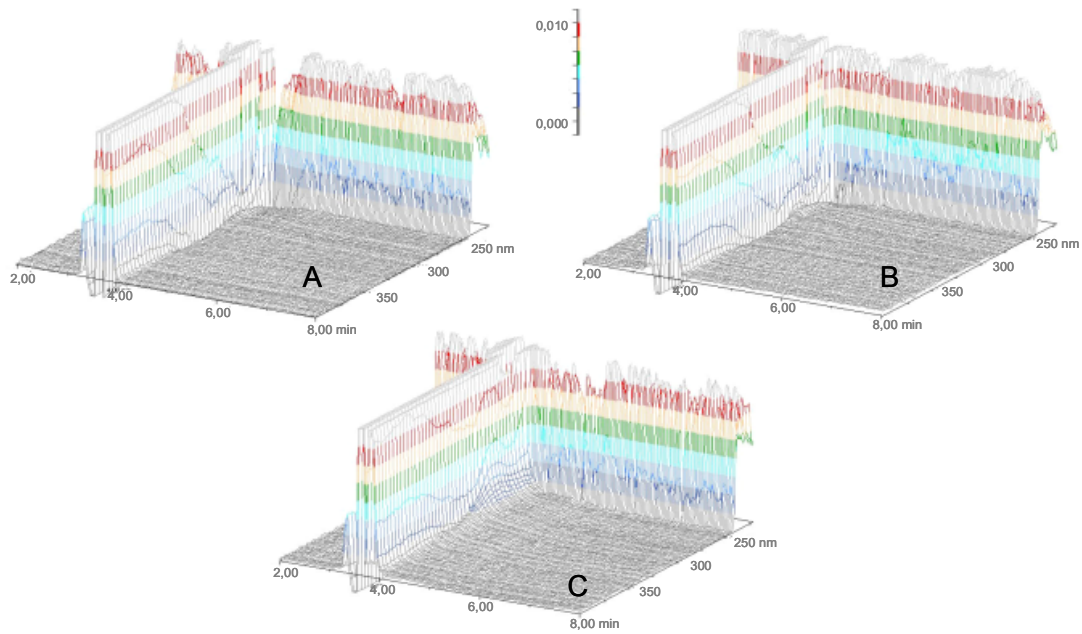


Abbildung 43: MD-SPE-LC-DAD Analyse von 100 µl Proben. (A) bidestilliertes Wasser, (B) natives Plasma und (C) nativer Urin

7.1.2.2 MS-Detektion

Für die vergleichende Untersuchung der Selektivität der Probenaufbereitung bei Verwendung einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung und der MD-SPE Plattform wurde auch ein Massenspektrometer eingesetzt. Dieses erlaubt insbesondere eine sehr empfindliche Detektion der niedermolekularen Verbindungen. Während der gesamten Analysenzeit wurden alle ionisierbaren Substanzen im Massenbereich von 100 – 1000 m/z aufgezeichnet. Die Ionisation erfolgte dabei im positiven Elektrospray-Modus.

Für eine Beurteilung wurden, wie schon für die UV-Detektion, undotierte und dotierte Plasma- und Urinproben analysiert und mit bidestilliertem Wasser verglichen.

Die Chromatogramme für die Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung sind in Abbildung 44 A und B dargestellt.

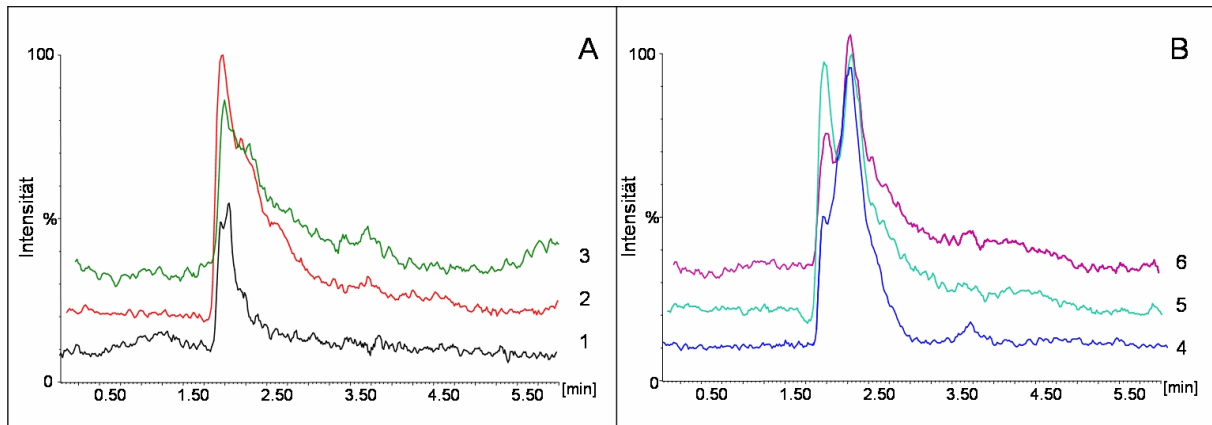


Abbildung 44: RAM SPE-LC-MS Analyse von 20 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin sowie Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma und (6) Urin, MS-Scan 100 – 1000 m/z

Die undotierten Matrixproben zeigen dabei einen Peak bei ca. 1,7 min. Dieser ist durch die Mitextraktion niedermolekularer Matrixbestandteile bedingt. Im Gegensatz zur UV-Detektion (siehe Kapitel 7.1.2.1) ist das Matrixsignal der Urinprobe (2) nicht signifikant größer im Vergleich zur Plasmaprobe (3). Ein möglicher Grund für diesen Effekt ist eine instrumentell bedingte, unvollständige Ionisierung der Substanzen im MS. In Abbildung 44 B sind zwei unvollständig getrennte Peaks bei ca. 2 min erkennbar. Dies weist auf eine Koelution der Analyte mit der niedermolekularen Probenmatrix hin, welche die MS Detektion der Analyte stört. Eine fehlerfreie, quantitative Analyse der trizyklischen Antidepressiva ist durch koeludierende Matrixbestandteile deshalb erschwert. Abbildung 45 zeigt die Spektren von 100 – 1000 m/z des dotierten und nativen Plasmas und Urins. Die Spektren umfassen den Elutionsbereich von 1,9 bis 3 min. Die für die Analyte signifikanten Massenzahlen 264, 266, 278, 280, 281, 295, 301, 318 sind dabei in allen Proben sichtbar. Neben diesen sind sehr deutlich Peaks im Bereich 100 - 300 m/z in allen Proben zu erkennen, welche auf mitextrahierte Substanzen schließen lassen. Diese Überlagerung führt zu einer erheblichen Störung des Analytnachweises in den dotierten Proben. Sowohl in der Plasmaprobe (A) als auch in der Urinprobe (B) verdecken die Signale fast vollständig die Signale des Analyten. Neben der koeludierenden niedermolekularen Matrix weist das hohe Rauschen auf weitere Matrixbestandteile hin.

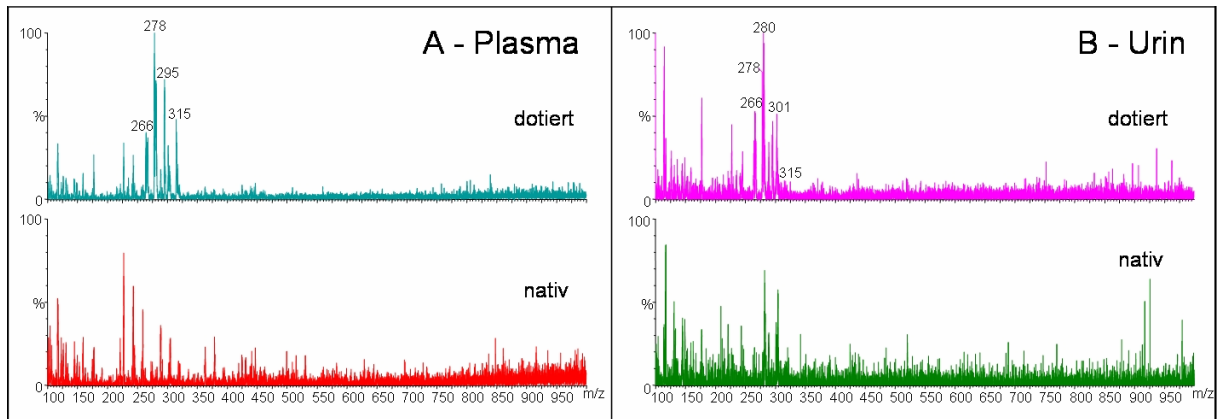


Abbildung 45: Mittlere MS-Spektren der RAM SPE-LC-MS Analyse von jeweils 20 µl nativem (rot) und dotiertem (türkis) Plasma (A) und nativem (grün) sowie dotiertem (rosa) Urin (B) im Elutionsbereich von 1,9 – 3 min.

Die Ergebnisse die mit der MD-SPE Plattform erhalten wurden, sind in Abbildung 46 A + B dargestellt. Die nativen Proben (A) weisen neben dem charakteristischen Schaltpeak (2,9 min) keine weiteren Peaks auf. Alle Proben (2 + 3) zeigen im Vergleich zu bidestilliertem Wasser (1) keine Veränderung. Dies weist auf eine komplette Abtrennung der Matrix hin. Die dotierten Proben (B) zeigen neben dem Schaltpeak die entsprechenden Peaks nach Auftrennung der Analyte. Der Vergleich der dotierten Plasma- (5) und Urinproben (6) mit bidestilliertem Wasser zeigt nach der Aufreinigung keine Unterschiede. Es kann somit von einer nahezu vollständigen Abtrennung der Matrix ausgegangen werden.

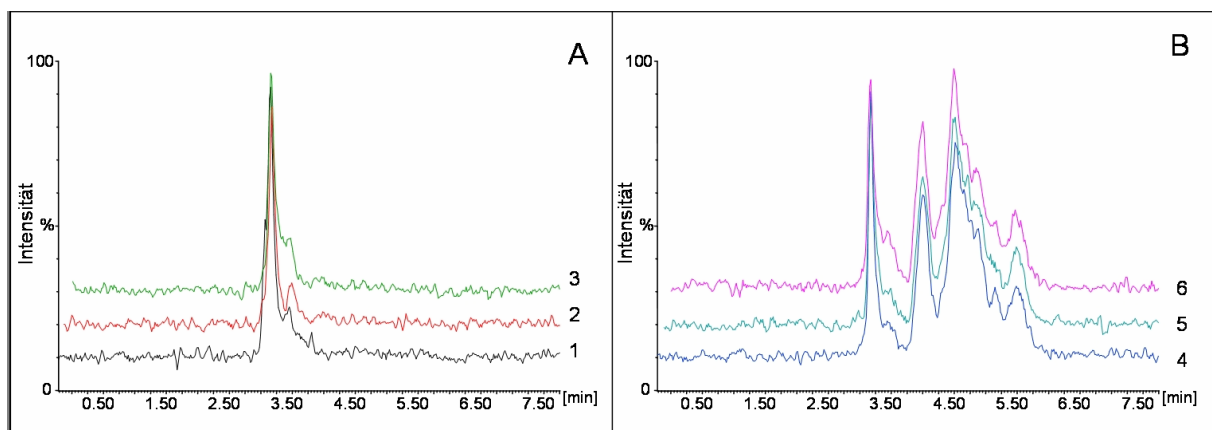


Abbildung 46: MD-SPE-LC-MS Analyse von 20 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin und Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma sowie (6) Urin, MS-Scan 100 – 1000 m/z

Die Ergebnisse der MD-SPE Plattform mit UV-Detektion (siehe Kapitel 7.1.2.1) werden auch durch die Detektion mittels des Massenspektrometers bestätigt. In den aufgearbeiteten nativen

Plasma- und Urinproben, konnten keine niedermolekularen Matrixbestandteile detektiert werden.

Die MS-Spektren (Abbildung 47) der dotierten und nativen Plasma- (A) und Urinproben (B) zeigen nur die für die Analyte spezifischen Massenzahlen (vergleiche Abbildung 45) und beweisen eindrucksvoll die qualitativ hochwertige Aufreinigung durch die MD-SPE Plattform. In den nativen Proben weisen die geringen Intensitäten der Massenzahlen 100 - 300 auf eine vollständige Aufreinigung hin. Die dotierten Proben, sowohl im Plasma als auch im Urin, zeigen nur die für trizyklische Antidepressiva charakteristischen Massenzahlen. Besonders auffällig im Vergleich zur RAM SPE-LC Kopplung ist das sehr geringe Rauschen, das in den MS-Spektren der MD-SPE Plattform detektiert wurde.

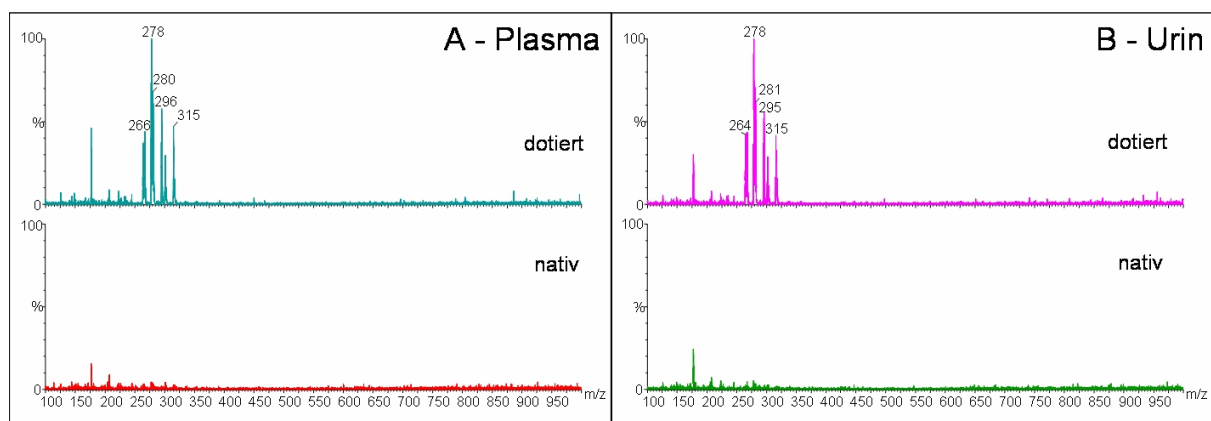


Abbildung 47: Mittlere MS-Spektren der MD-SPE-LC-MS Analyse von jeweils 20 μ l nativem (rot) und dotiertem (türkis) Plasma (A) und nativem (grün) sowie dotiertem (rosa) Urin (B) im Elutionsbereich von 3,7 - 6 min.

7.1.2.3 Probenvolumina

Um den Einfluss des Probenvolumens auf die Selektivität der Probenaufbereitung durch die MD-SPE Plattform zu untersuchen, wurden jeweils 20 μ l und 100 μ l Plasma bzw. Urin mittels der MD-SPE Plattform und der konventionellen RAM-LC Kopplung analysiert.

Abbildung 48 zeigt die Chromatogramme einer Plasma- (A) und Urinprobe (B) nach der Aufreinigung durch die konventionelle RAM-LC Kopplung. Bei den Plasmaproben ist sowohl bei einem Injektionsvolumen von 20 μ l (rot) als auch bei 100 μ l (grün) ein Peak im Bereich von 1,7 – 3,5 min zu erkennen. Die Größe dieses Signals ist bei 20 μ l und 100 μ l nahezu identisch.

Bei den Urinproben ist ebenfalls ein Matrixsignal im Bereich von 1,7 – 3,7 min zu erkennen. Im Gegensatz zur Plasma- (A) ist in der Urinprobe (B) ein deutlicher Unterschied der Signalgröße für 20 µl (rot) und 100 µl (grün) zu erkennen. Das Signal der 100 µl Injektion ist mehr als doppelt so groß, wie für die 20 µl Injektion. Ein Grund für diesen Effekt ist der sehr hohe Anteil niedermolekularer Matrixbestandteile im Urin, die mit der RAM SPE-Säule relativ unselektiv extrahiert werden.

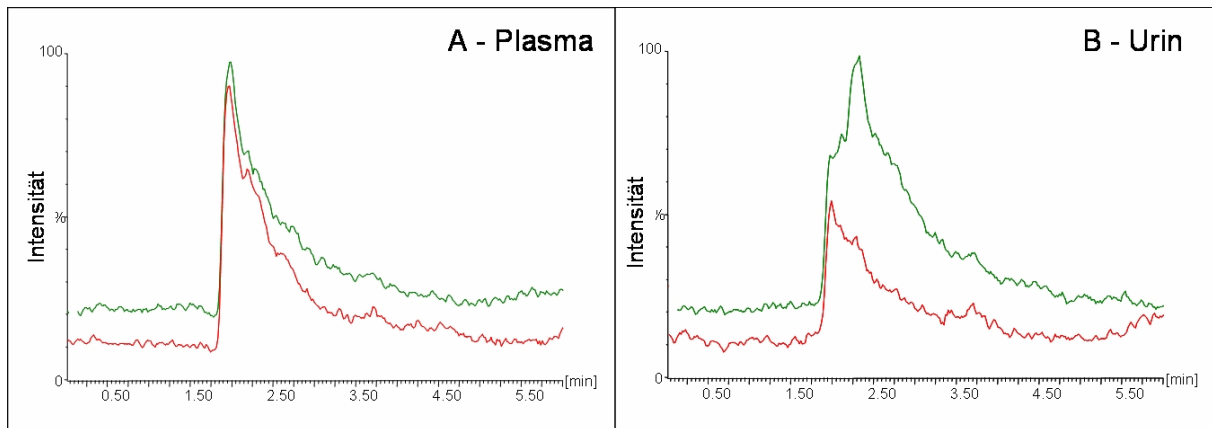


Abbildung 48: RAM SPE-LC-MS Analyse von nativem Plasma (A) und Urin (B). rot - 20 µl, grün 100 µl; MS-Scan 100 – 1000 m/z

In den Abbildung 49 A und B sind die Chromatogramme der Plasma- (A) und Urinprobe (B) nach der Aufreinigung durch die MD-SPE Plattform dargestellt.

Für beide Matrices wird bei ca. 3,4 – 3,5 min ein Systempeak detektiert, der durch das Umschalten des zweiten 6-Wege Schaltventils verursacht wird. Weder für die Plasmaprobe (A) noch für die Urinprobe (B) konnten für die Injektion von 20 µl (rot) bzw. 100 µl (grün) signifikante Unterschiede in den Chromatogrammen nachgewiesen werden.

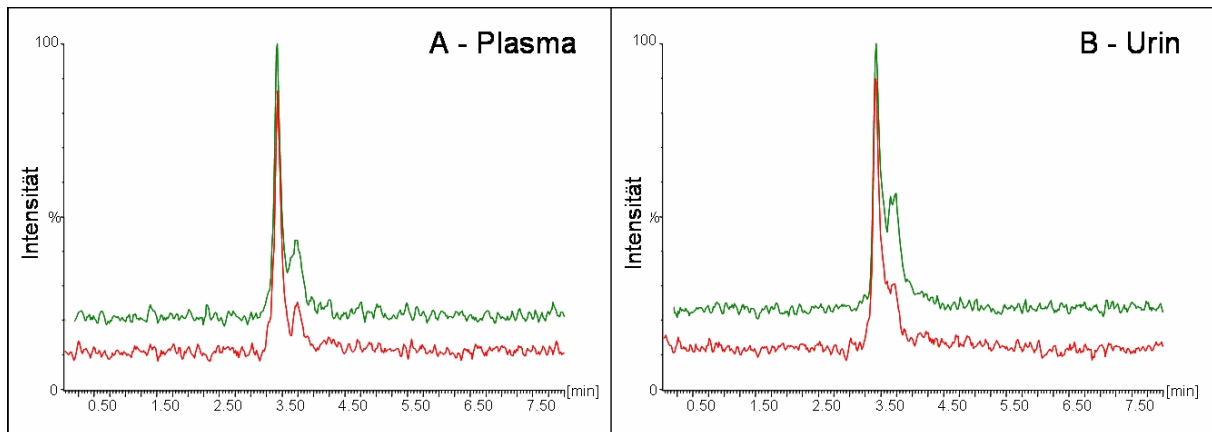


Abbildung 49: MD-SPE-LC-MS Analyse von nativem Plasma (A) und Urin (B). rot - 20 µl, grün 100 µl; MS-Scan 100 – 1000 m/z

Die on-line Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten durch die MD-SPE Plattform ermöglicht somit die nahezu vollständige Abreicherung der niedermolekularen Matrixbestandteile sowohl bei einem Injektionsvolumen von 20 µl als auch von 100 µl.

7.1.3 pH-Wert Abhängigkeit der chemoselektiven Fraktionierung

Der dritte Schritt der Probenaufbereitung durch die MD-SPE Plattform, die chemoselektive Fraktionierung auf der MMP SPE-Säule, ist vom pH-Wert des Eluenten E2 abhängig, da nur ionisiert vorliegende Analytmoleküle auf der MMP SPE-Säule retiniert werden.

Je nachdem, auf welchen pH-Wert der Eluent eingestellt wird, kann die Retention der Analyte und anderer Probenbestandteile positiv oder negativ beeinflusst werden. Entspricht der pH-Wert des Eluenten dem pKa-Wert der Analyte liegen nur 50 % der Analytmoleküle protoniert vor. Erst wenn der pH-Wert zwei Einheiten unter dem pKa-Wert liegt, sind bei basischen Verbindungen alle Analytmoleküle ionisiert. Bei einem pH-Wert, der zwei Einheiten höher als der pKa-Wert ist, sind alle Analyte unprotoniert. In Abbildung 50 ist die Abhängigkeit der Ionisation eines Analyten in Bezug auf den pH-Wert des Eluenten graphisch dargestellt.

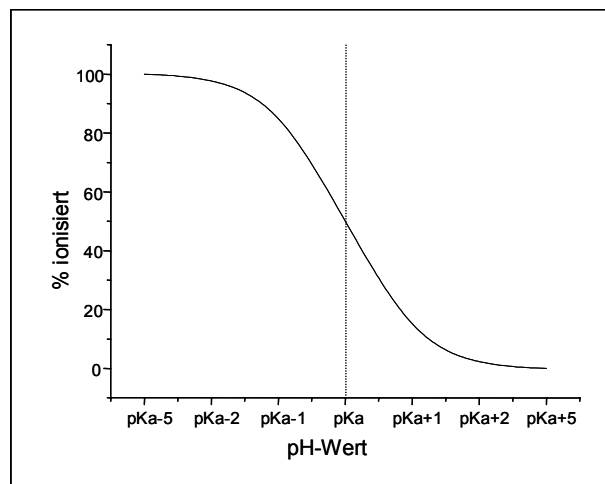


Abbildung 50: Abhängigkeit der Ionisation eines Analyten vom pH-Wert des Eluenten.

Um die pH-Abhängigkeit der chemoselektiven Fraktionierung zu demonstrieren, wurde der pH-Wert des Eluenten E2 so verändert (pH 8,6), dass nicht mehr alle Analytmoleküle ionisiert vorlagen. Die Steigerung des pH-Wertes auf einen Wert, bei dem die Analyte zu 100 % unprotoniert vorliegen, wurde vermieden, da bei pH-Werten von ca. 12 das RAM-Material sofort beschädigt würde.

Eine Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva wurde mit der MD-SPE Plattform unter Verwendung des ursprünglichen und des veränderten Eluenten E2 analysiert. Anschließend wurde die Wiederfindungsrate für die trizyklischen Antidepressiva bei pH 8,6 ermittelt. Bei Verwendung des ursprünglichen Eluenten E2 wurde die Wiederfindung der MD-SPE Plattform als 100 % angenommen.

In Tabelle 13 sind die pKa-Werte der trizyklischen Antidepressiva und die Wiederfindungsraten bei pH 8,6 aufgeführt.

Tabelle 13: Zusammenstellung der pKa-Werte der untersuchten trizyklischen Antidepressiva, der Wiederfindungsraten bei pH 8,6 und des Anteils an ionisiertem Analyt bei pH 8,6

Analyt	pKa-Wert	Wiederfindungsrate bei pH 8,6 [%]	% ionisierter Analyt bei pH 8,6	pH-pKa
Amitriptylin (ATL)	9,10	75,31	75,97	-0,5
Clomipramin (CMP)	9,71	92,96	92,8	-1,11
Desipramin (DSP)	10,63	99,46	99,07	-2,03
Doxepin (DXP)	8,92	66,64	67,63	-0,32
Imipramin (IMP)	9,73	91,41	93,1	-1,13
Maprotilin (MTL)	10,63	100,62	99,07	-2,03
Norclomipramin (NCP)	10,60	99,51	99,01	-2
Nordoxepin (NDX)	9,79	92,46	93,94	-1,19
Nortriptylin (NTL)	9,98	95,61	96,0	-1,38
Trimipramin (TMP)	9,73	61,01	93,1	-1,13

Bei der Betrachtung der erhaltenen Wiederfindungsraten für die TZA bei pH 8,6 fällt auf, dass ein Großteil der trizyklischen Antidepressiva nicht vollständig reteniert wird. Bei einem pH-Wert von 8,6 liegen nicht mehr alle Analytmoleküle ionisiert vor. Die unprotonierten Analyte werden auf der MMP SPE-Säule nicht an die Ionenaustausch-Funktionalitäten gebunden und durch das Waschen mit dem Eluenten E2 von der SPE-Säule gespült.

In der Tabelle sind auch die prozentualen Anteile der Analyte angegeben, die bei dem gewählten pH-Wert von 8,6 ionisiert vorliegen. Diese Anteile wurden über die nachstehende Formel berechnet, die von der Henderson-Hasselbalch Gleichung abgeleitet ist¹³⁰:

$$\% \text{ ionisierter Analyt} = \frac{100}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}}$$

Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Darstellung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit des Anteils an ionisiertem Analyt in Abbildung 51 zeigt, dass diese beiden Parameter sehr gut miteinander korrelieren. Der prozentuale Anteil an ionisiertem Analyt entspricht in etwa der Wiederfindungsrate für die trizyklischen Antidepressiva nach der Probenaufbereitung mit der MD-SPE Plattform bei pH 8,6. Diese

Korrelation besteht für alle trizyklischen Antidepressiva außer dem Trimipramin. Dieses Antidepressivum weist eine wesentlich geringere Wiederfindungsrate auf als es nach der Berechnung des prozentualen Anteils haben dürfte.

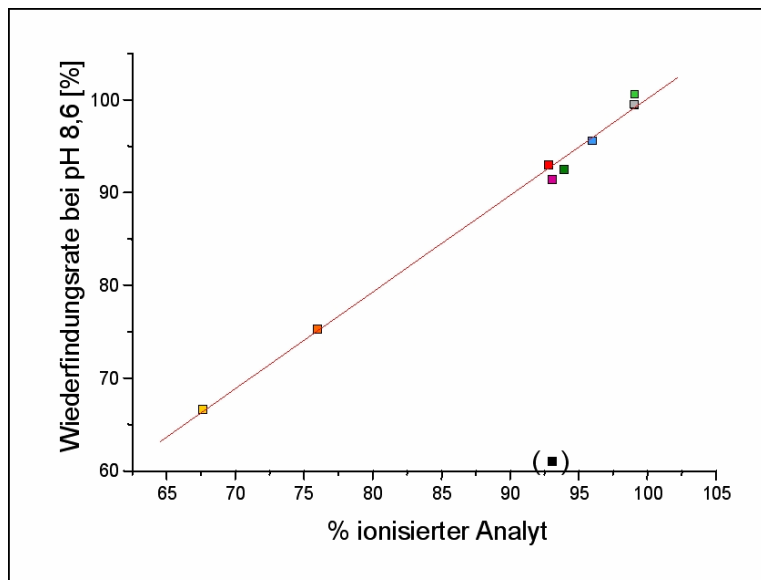


Abbildung 51: Darstellung der Wiederfindungsrate der trizyklischen Antidepressiva bei pH 8,6 in Abhängigkeit von dem Anteil an ionisiertem Analyt bei diesem pH-Wert. ■- ATL, ■- CMP, ■- DSP, ■- DXP, ■- IMP, ■- MTL, ■- NCP, ■- NDX, ■- NTL, ■- TMP

Die Abhängigkeit der chemoselektiven Fraktionierung vom pH-Wert des Eluenten trägt zu der gesteigerten Selektivität der MD-SPE Plattform gegenüber der konventionellen RAM SPE-LC Kopplungen bei. Durch diese pH-Wert Abhängigkeit ist es möglich, bestimmte Analyte sehr selektiv zu extrahieren oder auch ungewollte Matrixbestandteile gezielt zu entfernen. Allerdings sollte der pH-Wert nur in einem Bereich von ca. 5 – 8 variiert werden, da oberhalb von 8 das Packungsmaterial der RAM SPE-Säule beschädigt wird und unterhalb von 5 die Ionenaustausch-Funktionalitäten des MMP-Materials neutralisiert werden.

7.1.4 Einfluss der MMP SPE-Säule

Für die Entwicklung der MD-SPE Plattform wurden acht verschiedene MMP SPE-Säulen (beschrieben in Kapitel 2.5) untersucht. Die drei MMP SPE-Säulen mit den Materialien CIM CM, Isolute HCX-Q und Chromabond PCA wurden aufgrund der geringen Durchbruchzeiten $t_{A,MMP}$ (Kapitel 6.4.1) ausgeschlossen. Die verbleibenden drei MMP-

Materialien (Oasis WCX, Strata X-CW und LiChrospher® XDS) wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Selektivität der MD-SPE Plattform untersucht.

Bei der Methodenentwicklung wurde gezeigt, dass sich das Oasis WCX und das LiChrospher® XDS MMP-Material sehr ähnlich verhalten, obwohl das XDS SPE-Material eher hydrophile als hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt. Das Strata X-CW MMP-Material weist ein größeres Transfervolumen für die Analyte auf die Trennsäule auf.

Abbildung 52 zeigt Chromatogramme von Plasmaproben nach der Analyse mit der MD-SPE Plattform mit den untersuchten MMP SPE-Säulen. Der Vergleich der unterschiedlichen Säulendimensionen des Oasis WCX Materials [20 x 1 mm (1) und 20 x 2,1 mm (2)] sowie des Strata X-CW Materials [20 x 1 mm (3) und 20 x 2 mm (4)] zeigt keinen signifikanten Unterschied der Chromatogramme. Die Elution der trizyklischen Antidepressiva von den MMP-Materialien ist bei den beiden Säulendimensionen nahezu identisch.

Zwischen den Chromatogrammen der MMP-Materialien sind jedoch deutliche Unterschiede erkennbar. Während bei den Materialien Oasis WCX und LiChrospher® XDS die Analyte im Chromatogramm noch angetrennt werden, ist dies bei dem Material Strata X-CW nicht der Fall. Dies beruht auf der bereits beschriebenen höheren Transferzeit $t_{T,MMP}$.

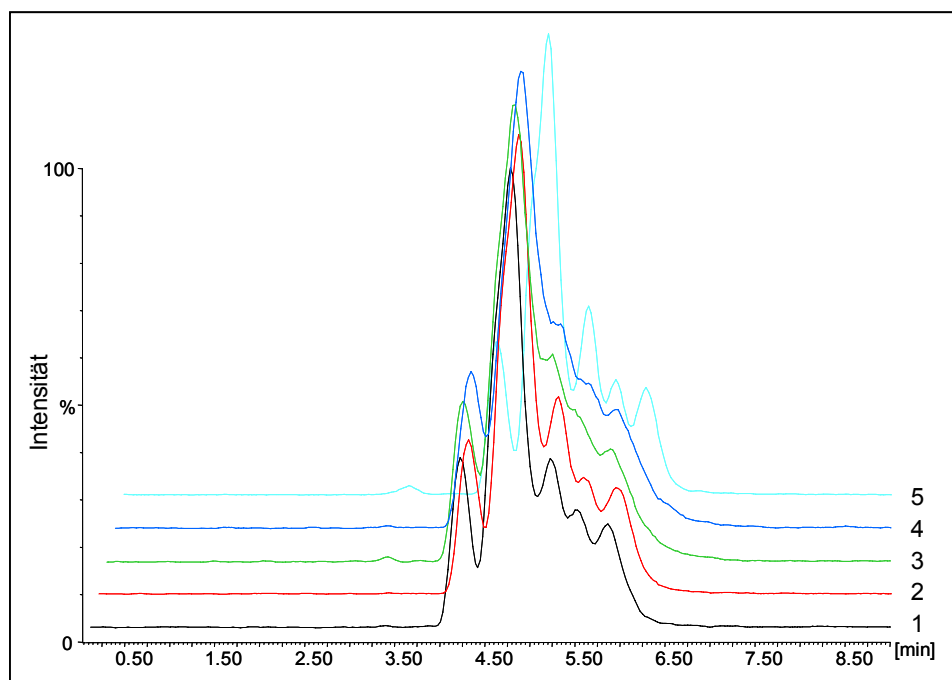


Abbildung 52: Einfluss der MMP-Materialien auf die Selektivität. Analyse von dotiertem Human Plasma (20 μ l) mit der MD-SPE Plattform. 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm. MRM Chromatogramme der trizyklischen Antidepressiva (50 ng/ml je Analyt);

Für die Untersuchung des Einflusses auf die Selektivität der MD-SPE Plattform wurden MS-Scans (m/z 100 – 1000) von Plasmaproben nach jeweiliger Analyse mit den untersuchten MMP-Materialien aufgezeichnet (Abbildung 53). Die Chromatogramme der vier MMP SPE-Säulen Oasis WCX 20 x 1 mm (1), 20 x 2,1 mm (2) sowie Strata X-CW 20 x 1 mm (3) und 20 x 2 mm (4) zeigen nur ein Systemsignal bei 3,4 min. In diesen Chromatogrammen wurden keine niedermolekularen Matrixbestandteile detektiert. In dem Chromatogramm des LiChrospher[®] XDS Materials (5) wurden neben dem Systemsignal bei 3,7 min auch niedermolekulare Matrixbestandteile im Bereich von 3,9 – 4,5 min detektiert. Dies weist daraufhin, dass dieses Material eine Selektivität aufweist, die nicht für die MD-SPE Plattform geeignet ist.

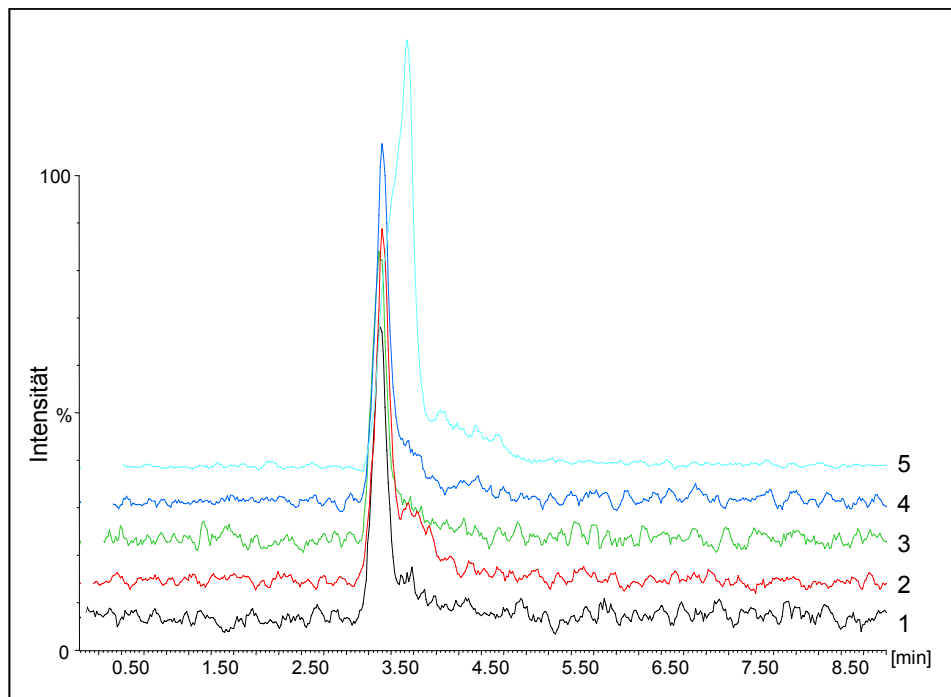


Abbildung 53: Einfluss der MMP-Materialien auf die Selektivität. MS-Scans von nativem Human Plasma (m/z 100 – 1000) nach Analyse mit der MD-SPE Plattform. 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm; Injektionsvolumen 20 μ l.

7.2 Matrixeffekte bei der MS-Detektion

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines vollautomatischen Verfahrens für die MS-adäquate Aufbereitung komplexer biologischer Flüssigkeiten. Das entsprechende Aufbereitungsverfahren sollte daher möglichst alle Probenbestandteile entfernen, die bei der massenspektrometrischen Detektion Matrixeffekte, wie Ionensuppression, auslösen können.

Für die Evaluation der Matrixeffekte wurde die MD-SPE Plattform vergleichend mit einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Matrixeinflüsse der biologischen Flüssigkeiten Plasma und Urin sowie auf inter- und intraindividuelle Einflüsse gelegt. Zusätzlich wurden die Speziesabhängigkeit etwaiger Matrixeffekte und deren mögliche Ursachen evaluiert.

7.2.1 Nachsäulen-Infusion

Die Evaluation der Matrixeffekte bei Anwendung der MD-SPE Plattform und einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung erfolgte über eine so genannte Nachsäulen-Infusion. Für diesen Zweck wurde, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, ein T-Stück zwischen dem Ausgang der analytischen Trennsäule und dem Einlass des Massenspektrometers installiert. Mit Hilfe einer Kolbenspritze wurde eine Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva mit einer Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in den Eluentenstrom infundiert. Anschließend wurden die MRM-Übergänge der Analyte mit dem Massenspektrometer aufgezeichnet.

In Abbildung 54 ist die experimentelle Anordnung dieser Methode für die MD-SPE Plattform (A) sowie für die konventionelle RAM SPE-LC Kopplung (B) dargestellt.

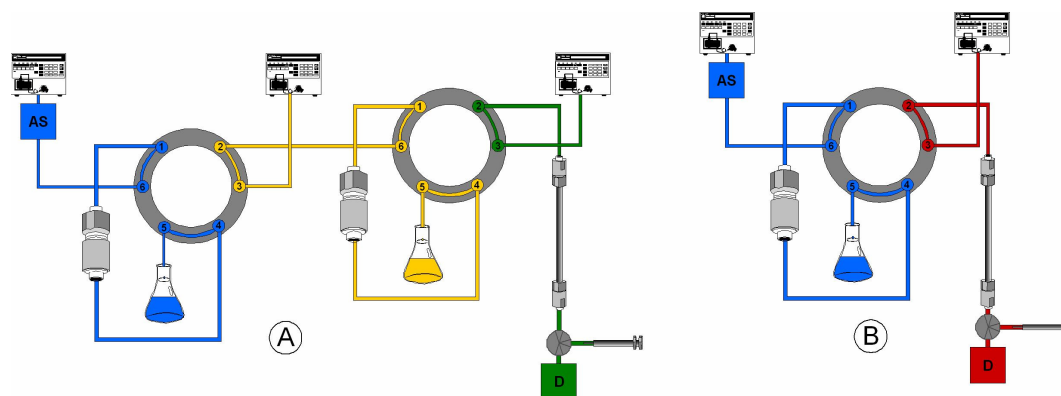


Abbildung 54: Instrumenteller Aufbau der Nachsäulen-Infusionsexperimente für die MD-SPE Plattform (A) und die konventionelle RAM SPE-LC Kopplung (B)

7.2.2 Matrixeffekte der biologischen Flüssigkeiten Plasma und Urin

Die Evaluation der Matrixeffekte der biologischen Flüssigkeiten Plasma und Urin hinsichtlich der MD-SPE Plattform erfolgte, wie schon bei der Selektivität (siehe Kapitel 7.1.2), durch den Vergleich mit einer konventionellen on-line RAM SPE-LC Kopplung. Die Wasser- (bidestilliert), Plasma- und Urinproben wurden mit beiden Verfahren analysiert und die entsprechenden Infusionschromatogramme aufgezeichnet. Das bidestillierte Wasser diente dabei als Referenz für eine matrixfreie Probe.

Die mit der konventionellen RAM SPE-LC Kopplung erhaltenen Infusionschromatogramme sind in Abbildung 55 dargestellt. Alle Chromatogramme zeigen einen negativen Peak bei ca. 2 min, welcher einem Systemsignal, verursacht durch das Schalten des 6-Wege Ventils, zugeordnet werden kann. Das Infusionschromatogramm des bidestillierten Wassers ist als schwarze Spur dargestellt. In der Wasserprobe wurden außer dem Systemsignal keine weiteren Signale beobachtet, was eine Störung der Analytisation ausschließt. Dies zeigt, dass keine exogenen Matrixeffekte die Ionisation der trizyklischen Antidepressiva beeinflussen.

Das Infusionschromatogramm der Plasmaprobe (rote Spur) weist neben dem Systemsignal bei 2 min eine deutliche Absenkung der Basislinie im Bereich von 2,1 bis 4 min auf. In diesem Bereich eluieren die trizyklischen Antidepressiva. Diese Absenkung der Basislinie spiegelt die Unterdrückung (Suppression) der Analytisation in diesem Bereich durch Matrixbestandteile aus der Plasmaprobe wieder. Auch im Infusionschromatogramm der

Urinprobe ist neben dem Systemsignal eine deutliche Suppression der Ionisation der trizyklischen Antidepressiva über den gesamten Trennbereich von 2,1 – 6 min zu erkennen. Die Ionensuppression in der Urinprobe ist stärker ausgeprägt als in der Plasmaprobe. Dies ist auf den hohen Gehalt des Urins an niedermolekularen Matrixbestandteilen zurückzuführen. Ein Vergleich der Infusionschromatogramme der Plasma- und Urinproben mit dem Chromatogramm der Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva (graue Spur) zeigt sehr deutlich, dass der Großteil der Ionensuppression in der zweiten Hälfte des Analytsignals auftritt. Die durch Matrixeffekte verursachte Ionensuppression führt deshalb zur Verringerung der Wiederfindungsraten der trizyklischen Antidepressiva in Plasma- oder Urinproben und folglich zu einer nicht reproduzierbaren Messung.

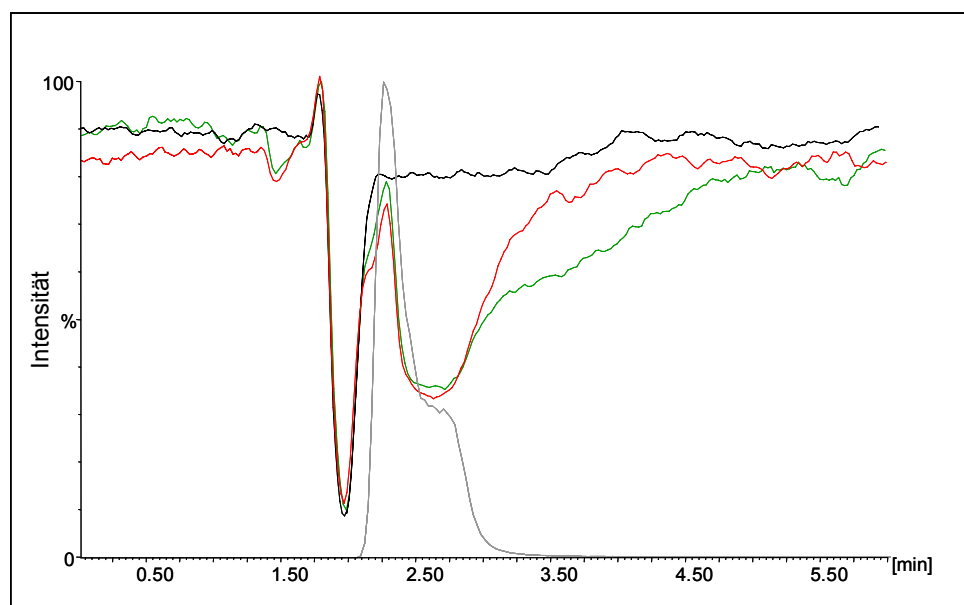


Abbildung 55: Infusionschromatogramme von: ■ - bidestilliertem Wasser, ■ - Plasma und ■ - Urin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. ■ - Chromatogramm einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung.

Die Aufzeichnung der Infusionschromatogramme der Wasser-, Plasma- und Urinproben wurde anschließend mit der MD-SPE Plattform durchgeführt. Die dabei erhaltenen Infusionschromatogramme sind in Abbildung 56 dargestellt.

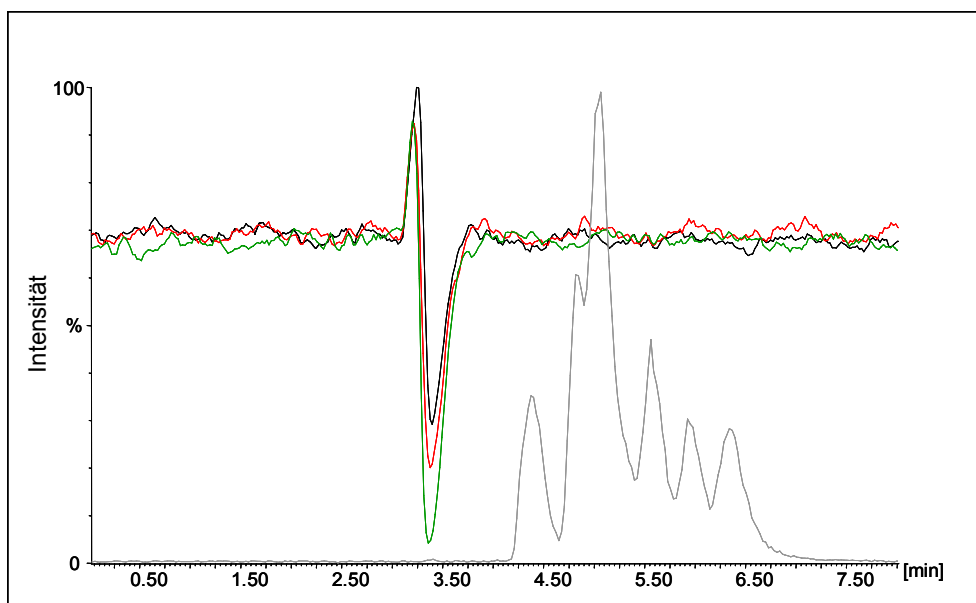


Abbildung 56: Infusionschromatogramme von: ■ - bidestilliertem Wasser, ■ - Plasma und ■ - Urin nach der Analyse mit der MD-SPE Plattform. ■ - Chromatogramm einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva nach Analyse mit der MD-SPE Plattform.

Die graue Spur zeigt das Chromatogramm einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva nach der Analyse mit der MD-SPE Plattform. Alle untersuchten Proben weisen wiederum bei 3,4 min einen negativen Peak auf, welcher durch das Umschalten des zweiten 6-Wege-Ventils verursacht wird. In schwarz ist das Infusionschromatogramm der Wasserprobe dargestellt. Es ist keine Veränderung der Basislinie, d.h. keine Störungen der Analytisation zu erkennen, so dass diese Probe auch für die MD-SPE Plattform als Referenz verwendet werden kann. Dies zeigt, dass auch bei der MD-SPE Plattform keine exogenen Matrixeffekte auftreten.

Bei der Plasmaprobe (rot) und der Urinprobe (grün) wurden neben dem Systemsignal keine weiteren Störungen in den Infusionschromatogrammen detektiert. Im Vergleich zur Wasserprobe ist kein signifikanter Unterschied erkennbar, so dass eine Ionensuppression ausgeschlossen werden kann.

Es kann also nach der Aufreinigung der untersuchten biologischen Flüssigkeiten mittels der MD-SPE Plattform davon ausgegangen werden, dass keine Matrixbestandteile mehr vorhanden sind, welche die Ionisation der untersuchten trizyklischen Antidepressiva beeinflussen. Dies zeigt, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte MD-SPE Plattform eine LC-MS/MS adäquate Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten gewährleistet.

7.2.3 Interindividuelle Einflüsse

Biologische Flüssigkeiten wie Plasma und insbesondere Urin besitzen eine sehr heterogene Matrix. Beide Specimen weisen jedoch große Unterschiede in ihrer Zusammensetzung bei gesunden Probanden und Patienten auf. Diese Schwankungen sind ein großes Problem für die quantitative Massenspektrometrie, da diese die Ionisation der Zielanalyte unkontrolliert beeinflussen können. Eine fehlerfreie Bestimmung der Konzentration eines Zielanalyten in Proben von verschiedenen Patienten kann deshalb nicht a priori garantiert werden.

Um den Einfluss dieser interindividuellen Schwankungen auf die Qualität der Probenaufbereitung durch die MD-SPE Plattform zu untersuchen, wurden Proben verschiedener Patienten mit der MD-SPE Plattform analysiert. Wie bereits bei der Evaluation der Matrixeffekte (siehe oben) wurden die Proben ebenfalls vergleichend mit einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung untersucht.

In Abbildung 57 sind die Infusionschromatogramme der Analyse von Plasma- (A) und Urinproben (B) mit der RAM SPE-LC Kopplung dargestellt. Die Abbildung zeigt die Überlagerung von 11 Plasma- bzw. 6 Urinproben. Alle Proben zeigen den charakteristischen Systempeak bei ca. 2 min und eine anschließende stark variierende Basislinie.

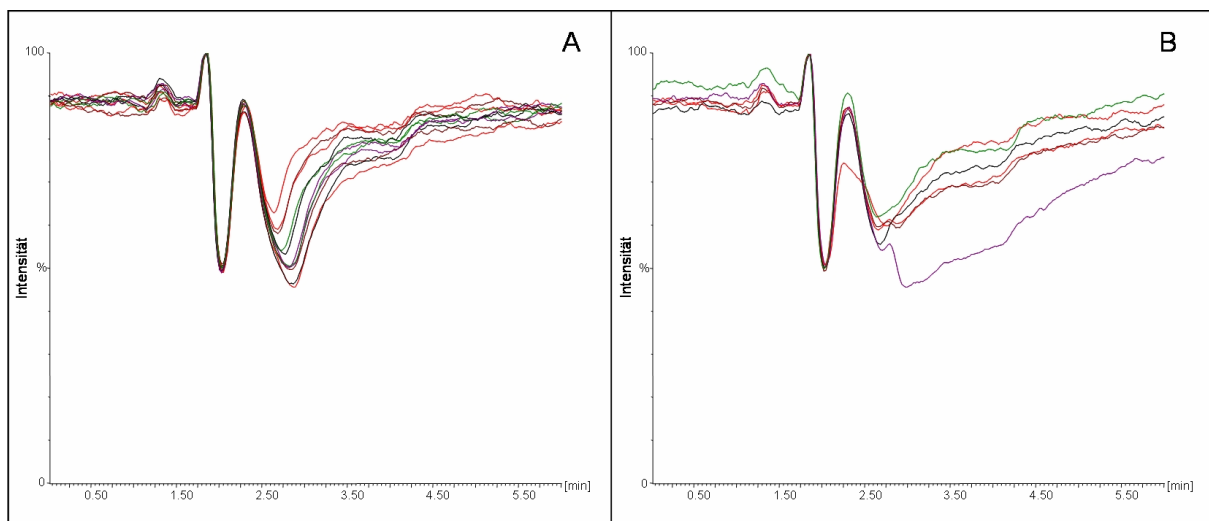


Abbildung 57: Einfluss von Matrixbestandteilen interindividueller Proben auf die Ionisation der Analyte. Infusionschromatogramme von Plasma und Urin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. A - Überlagerung von 11 Plasmaproben verschiedener Patienten. B - Überlagerung von 6 Urinproben verschiedener Patienten. Injektionsvolumen je 20 µl.

Im Bereich von 2,4 – 4 min sind deutliche Unterschiede im Verlauf der Basislinie zwischen den einzelnen Plasmaproben (A) zu erkennen. Eine deutlich niedrigere Basislinie (rote Kurve) weist dabei auf eine wesentlich größere Ionensuppression hin. Diese Unterschiede in den Infusionschromatogrammen sind auf interindividuelle Unterschiede zwischen den Plasmaproben der verschiedenen Patienten zurückzuführen.

Die Plasma- (A) und Urinproben (B) weisen einen stark unterschiedlichen Verlauf der Basislinie für die einzelnen Patientenproben auf. Dies ist insbesondere beim Verlauf des violettfarbenen Chromatogramms zu erkennen. Diese interindividuellen Schwankungen führen zu unterschiedlich starker Ionensuppression im Bereich von 2,1 – 6 min.

In Abbildung 58 sind die Infusionschromatogramme der Analyse von 11 Plasma- (A) und 6 Urinproben (B) mit der neu entwickelten MD-SPE Plattform dargestellt. Alle Chromatogramme weisen neben dem charakteristischen Systempeak eine periodische Wellenbewegung der Basislinie auf. Diese stammt von der Infusion der trizyklischen Antidepressiva über die Spritzenpumpe und ist auf den experimentellen Aufbau zurückzuführen.

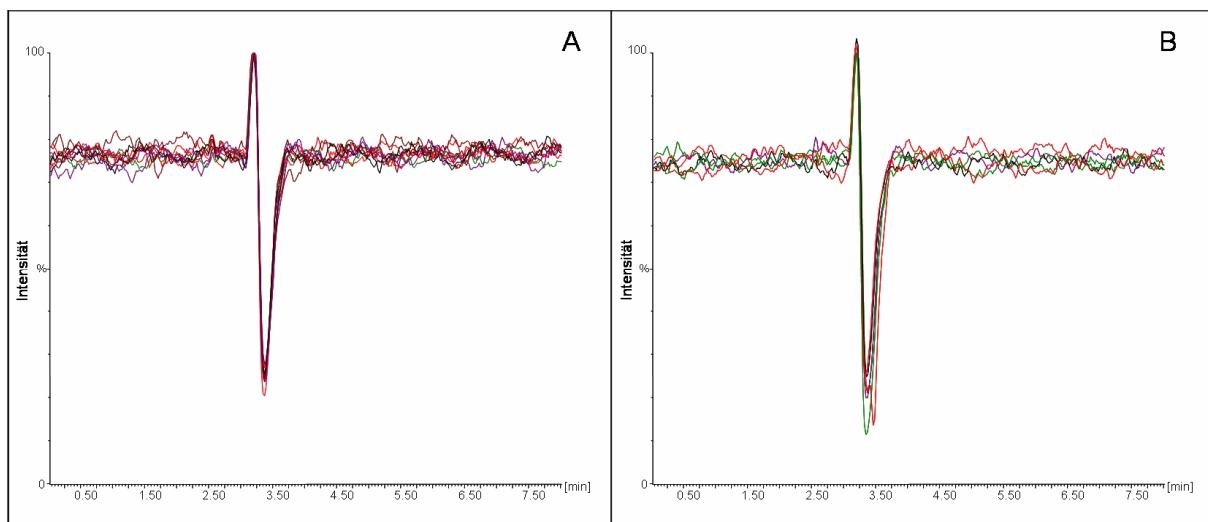


Abbildung 58: Einfluss von Matrixbestandteilen interindividueller Proben auf die Ionisation der Zielanalyte. Infusionschromatogramme nach der Analyse von Plasma und Urin mit der MD-SPE Plattform. A - Überlagerung von 11 Plasmaproben verschiedener Patienten. B – Überlagerung von 6 Urinproben verschiedener Patienten. Injektionsvolumen je 20 µl.

Neben dem Systemsignal bei 3,4 min wurden in beiden biologischen Flüssigkeiten keine Matrixeffekte detektiert. Beim Vergleich der einzelnen Patientenproben ist kein signifikanter

Unterschied erkennbar. Dies zeigt, dass diese Methode zur Probenaufbereitung für beide Specimen, gegenüber einer RAM SPE-LC Kopplung entscheidende Vorteile bietet.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die hochselektive Aufbereitung der komplexen Flüssigkeiten durch die MD-SPE Plattform auch diejenigen Matrixbestandteile entfernt werden, welche die interindividuellen Schwankungen in der Ionisation der Analyte hervorrufen. Auf diese Weise wird die MS/MS-Analyse der untersuchten trizyklischen Antidepressiva nicht nur präziser und reproduzierbarer sondern auch robuster.

7.2.4 Intraindividuelle Einflüsse

Nicht nur interindividuelle Unterschiede, auch intraindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung von biologischen Flüssigkeiten können die Ionisation der untersuchten trizyklischen Antidepressiva beeinflussen. Zur Untersuchung dieses Effekts wurde wiederum die Probenaufbereitung mit Hilfe der MD-SPE Plattform vergleichend mit einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung untersucht.

Für diese Versuchsreihe wurde einer Probandin nüchtern und postprandial Blut abgenommen. Für die aus dem EDTA-Vollblut gewonnenen Plasmaproben wurden die entsprechenden Infusionschromatogramme aufgezeichnet. In Abbildung 59 A und B sind die Ergebnisse der beiden Verfahren dargestellt.

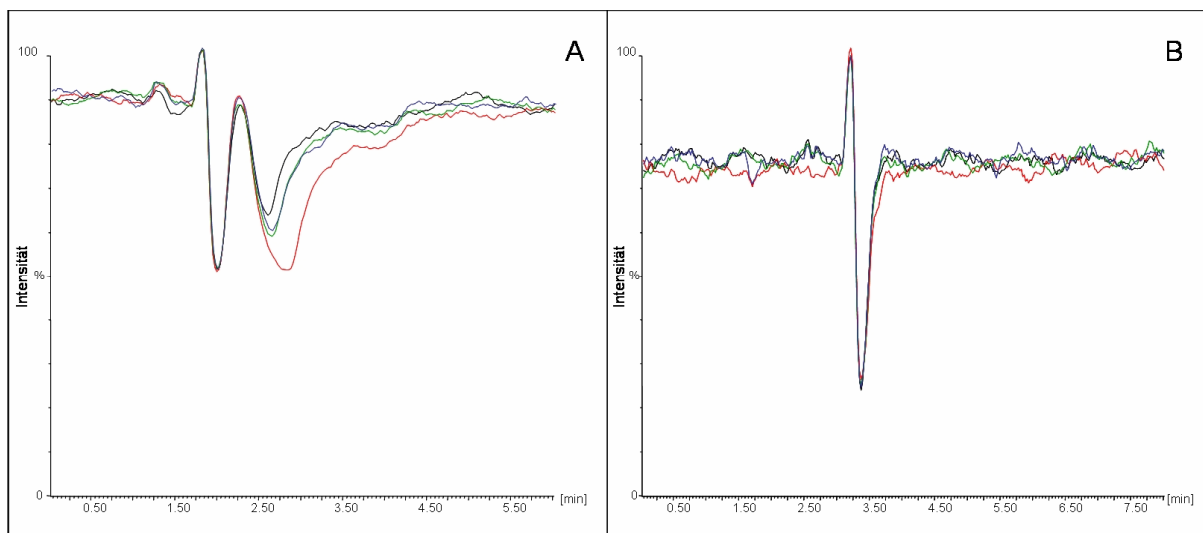


Abbildung 59: Einfluss von Matrixbestandteilen intraindivideller Proben auf die Ionisation der Analyte. Infusionschromatogramme von 4 verschiedenen Plasmaproben einer Probandin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung (A) und der MD-SPE Plattform (B). ■ - nüchtern 9:30 Uhr; ■ - postprandial 11:00 Uhr; ■ - 13:00 Uhr; ■ - 16:00 Uhr. Injektionsvolumen je 20 µl.

In den Proben, die mit der RAM SPE-LC Kopplung (A) analysiert wurden, zeigten sich deutliche Matrixeffekte im Bereich von 2,1 – 4 min. Dabei sind zusätzlich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme erkennbar. Das Infusionschromatogramm der ersten Plasmaprobe (9:30 Uhr, schwarz, nüchtern) weist die geringste Ionensuppression auf. Die beiden Plasmaproben von 13:00 Uhr (grün) und 16:00 Uhr (blau) sind nahezu identisch. Die größte Ionensuppression, gekennzeichnet durch die niedrigste Basislinie, konnte in der 11:00 Uhr abgenommenen Plasmaprobe (nach dem Essen, rot) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch intraindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der biologischen Flüssigkeiten zu erheblichen Schwankungen der Ionisation der Analyte führen können.

Nach der Analyse der gleichen Plasmaproben mit der MD-SPE Plattform (B) wurden keinerlei Unterschiede zwischen den Infusionschromatogrammen festgestellt. Alle Proben weisen eine konstante Basislinie auf, welches eine Ionensuppression in dem aufgezeichneten Bereich ausschließt. Dies zeigt, dass neben den gezeigten interindividuellen auch intraindividuelle Unterschiede nach der Aufbereitung einer komplexen Probe mittels MD-SPE keine Auswirkung auf die Ionisation der Analyte haben. Die potentiell mit der Ionisation interferierenden Matrixbestandteile der untersuchten biologischen Flüssigkeiten werden durch die hochselektive, multidimensionale Probenaufbereitung sehr effektiv entfernt.

7.2.5 Speziesabhängigkeit der Matrixeffekte

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte MD-SPE Plattform ist nicht nur für die Analyse biologischer Flüssigkeiten humanen Ursprungs konzipiert, sondern auch für die Analytik biologischer Flüssigkeiten tierischen Ursprungs.

Aus diesem Grund wurde der Vergleich der konventionellen on-line RAM SPE-LC Kopplung mit der MD-SPE Plattform auf biologische Flüssigkeiten von Tieren ausgeweitet. Die untersuchten trizyklischen Antidepressiva dienten in diesem Fall als reine Modellsubstanzen. Von der Landesuntersuchungsanstalt in Chemnitz wurden für diese Experimente folgende tierische Proben zur Verfügung gestellt: Serum von Geflügel, Urin und Serum von Schweinen und Urin und Serum von Rindern.

In Abbildung 60 sind die Infusionschromatogramme der untersuchten Spezies nach der Analyse mit der konventionellen RAM SPE-LC Kopplung (A) und der MD-SPE Plattform (B) dargestellt.

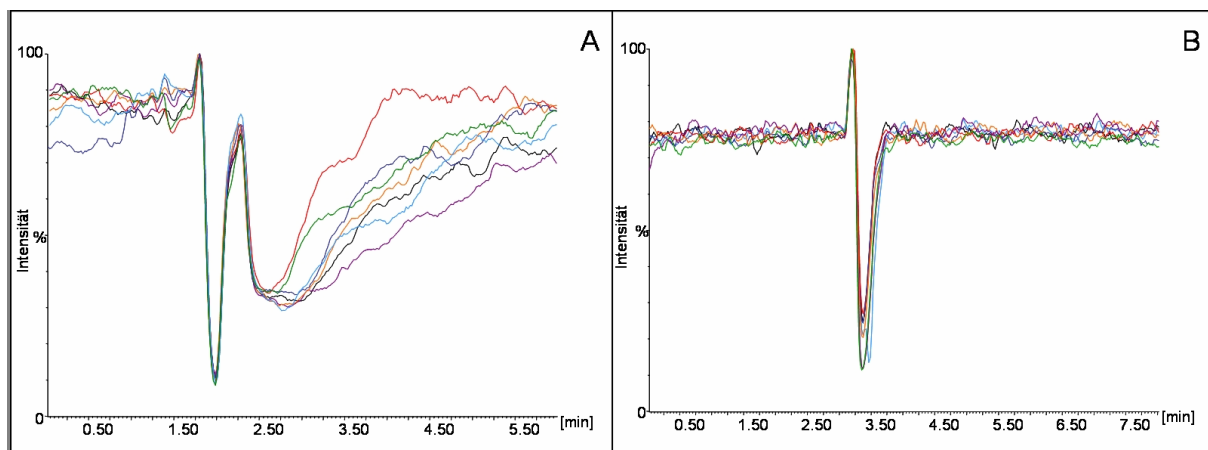


Abbildung 60: Einfluss von Matrixbestandteilen unterschiedlicher Spezies auf die Ionisation von Modellanalyten. Infusionschromatogramme: A – nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung und B – mit der MD-SPE Plattform. Injektion von je 20 µl: ■ - Plasma Human; ■ - Urin Human; ■ - Serum Rind; ■ - Urin Rind; ■ - Serum Geflügel; ■ - Serum Schwein; ■ - Urin Schwein.

In den Chromatogrammen, die mit der RAM SPE-LC Kopplung (A) erhalten wurden, sind die Matrixeffekte, d.h. eine Ionensuppression deutlich zu erkennen. Dabei schwankt das Ausmaß der Ionensuppression nicht nur zwischen den einzelnen Spezies (Geflügel, Rind, Schwein)

sondern auch zwischen den untersuchten Matrices. Insbesondere wird dies durch den großen Unterschied bei den beiden Rinderproben sichtbar. Das Serum (rot) weist die geringste Ionensuppression auf, während in der Urinprobe (violett) die Analyt-ionisation am stärksten unterdrückt wird.

Die Ergebnisse, die nach der on-line Aufreinigung mittels der MD-SPE Plattform erhalten wurden, sind in Abbildung 60 B dargestellt. Neben dem Systempeak wird nur eine konstante Basislinie beobachtet. Daher kann eine Ionensuppression im untersuchten Bereich ausgeschlossen werden. Störende Matrixbestandteile werden somit mit dieser Methode unabhängig von Gattung oder Matrix ebenso hochselektiv entfernt wie aus humanen Plasma und Urinproben.

7.2.6 Einfluss der MMP SPE-Säule

Für die entwickelte MD-SPE Plattform wurde auch der Einfluss der verschiedenen MMP-Materialien auf die Matrixeffekte untersucht. Dafür wurden Plasmaproben mit der MD-SPE Plattform analysiert, wobei die fünf untersuchten MMP SPE-Säulen verwendet wurden. Die erhaltenen Infusionschromatogramme sind in Abbildung 61 dargestellt.

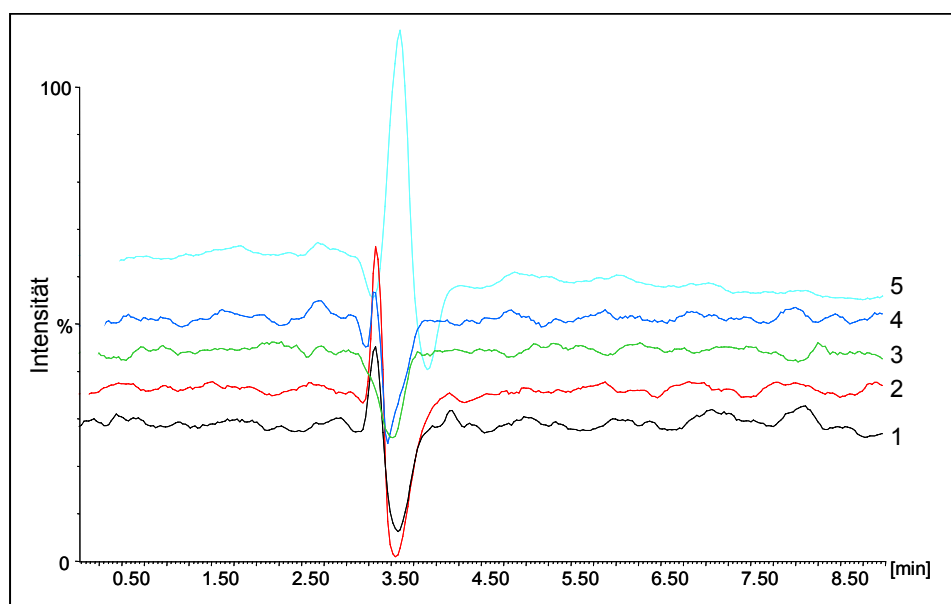


Abbildung 61: Einfluss der verwendeten MMP SPE-Säule auf die Ionisation. Analyse von Human Plasma (20 µl) mit der MD-SPE Plattform. Infusionschromatogramme: 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm

In allen fünf Infusionschromatogrammen ist ausschließlich bei 3,4 min der typische negative Peak zu erkennen, der durch das Schalten des zweiten 6-Wege Ventils verursacht wurde.

Bei dem Oasis WCX MMP-Material sind keine Unterschiede zwischen den Infusionschromatogrammen der beiden untersuchten SPE-Säulen [20 x 1 mm (1) sowie 20 x 2,1 mm (2)] zu erkennen. Für das Strata X-CW MMP-Material [20 x 1 mm (3) sowie 20 x 2 mm (4)] wurde die gleiche Beobachtung gemacht. Dies zeigt, dass weder die Säulendimension noch die beiden verwendeten Packungsmaterialien einen Einfluss auf die Ionisationsausbeute haben.

Bei den Infusionschromatogrammen der drei untersuchten MMP-Materialien Oasis WCX (1/2), Strata X-CW (3/4) sowie LiChrospher[®] XDS (5) sind jedoch Unterschiede erkennbar. Das Systemsignal des LiChrospher[®] XDS Materials ist deutlich größer als bei den anderen untersuchten Materialien. Ob dies durch das Material oder die Säulendimensionen (20 x 4 mm) der SPE-Säule verursacht wird, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden, da das Material nicht in der Säulendimension 20 x 2 mm zur Verfügung stand.

Bei dem Vergleich des Oasis WCX Materials mit dem Strata X-CW Material ist erkennbar, dass das Systemsignal (negativer Peak bei 3,4 min) bei dem Strata X-CW Material deutlich kleiner ist.

In keinem der aufgezeichneten Infusionschromatogramme der untersuchten MMP SPE-Säulen konnten Matrixeffekte nachgewiesen werden.

7.2.7 Ursachen der Matrixeffekte

Die bei einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung auftretenden Matrixeffekte werden nicht durch exogene Verbindungen verursacht, da sie bei der Analyse von bidestilliertem Wasser nicht nachweisbar waren. Aus diesem Grund müssen endogene Verbindungen aus der Probenmatrix für die Matrixeffekte (Ionensuppression) verantwortlich sein.

Insbesondere stehen Phospholipide im Verdacht, Matrixeffekte wie die Unterdrückung der Ionisation auszulösen^{131,132}. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Phospholipide in dem Trennbereich, in dem die Ionensuppression auftritt, nachweisbar sind.

Phospholipide sind die Bausteine zellulärer Membranen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Biochemie lebender Zellen. Aufgrund ihrer Häufigkeit wurden aus der Vielzahl der

Phospholipide in der vorliegenden Arbeit nur die Phosphatidylcholine (Glycerophosphatidylcholine, GPC) und die Lyso-Phosphatidylcholine (lyso-Glycerophosphatidylcholine, lyso-GPC) untersucht. Die Phosphatidylcholine (Abbildung 62) bestehen aus einem Glycerin Grundgerüst mit zwei Fettsäureestern an den Positionen 1 und 2 und einem Phosphatester mit polarer Kopfgruppe (hier Cholin) an Position 3. Bei Lyso-Phosphatidylcholinen befindet sich an der Position 2 (R_2) eine Hydroxygruppe.

Um die Phosphatidylcholine zu bestimmen, wurde eine Plasmaprobe mit der RAM SPE-LC Kopplung analysiert. Die Detektion erfolgte über so genannte Precursorionen Scans (vergleiche Kapitel 3.2) der Ionen m/z 104 und m/z 184. Diese Produktionen sind, wie in Abbildung 62 dargestellt, charakteristische Fragmente von Phosphatidylcholinen^{133,134}.

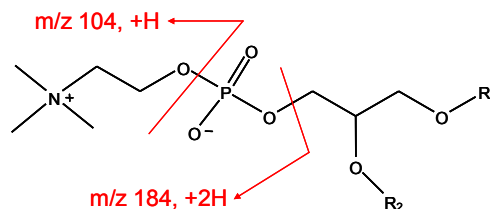


Abbildung 62: Grundgerüst der Phosphatidylcholine und der Lyso-Phosphatidylcholine. R_1 und R_2 bestehen bei Phosphatidylcholinen beide aus Fettsäureestern, während R_2 bei Lyso-Phosphatidylcholinen aus einer Hydroxygruppe besteht. Charakteristische Fragmente m/z 104 und m/z 184.

In Abbildung 63 ist das erhaltene Chromatogramm der Phospholipide im Vergleich zu einem Infusionschromatogramm einer Plasmaprobe dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert das Ende der Analysenzeit der RAM SPE-LC Kopplung.

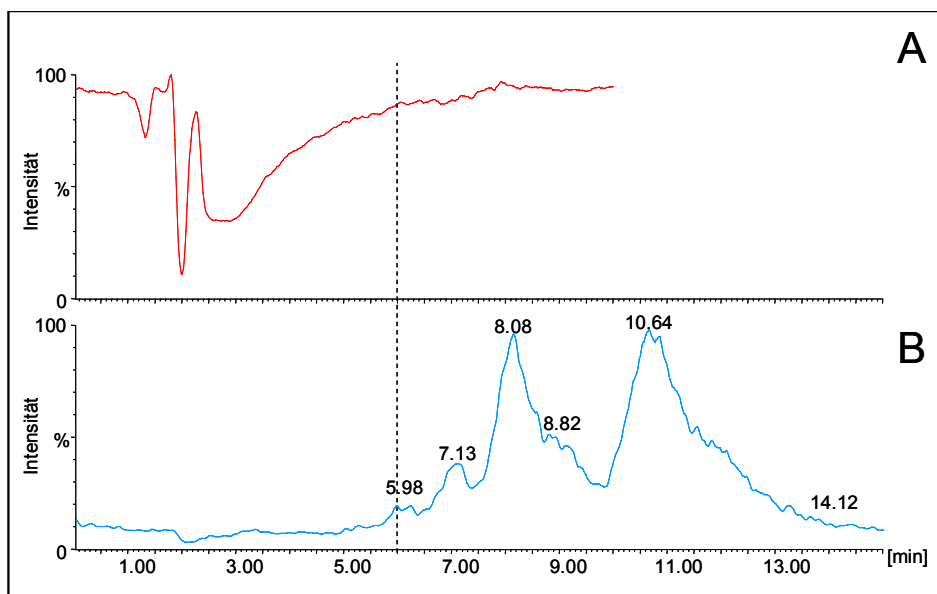


Abbildung 63: Einfluss der Phospholipide auf die Ionisation. A – Infusionschromatogramm einer Plasmaprobe (20 µl) nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. B – Chromatogramm der Phospholipide einer Plasmaprobe (20 µl) nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung, Presursorionen-Scan von m/z 184.

In dem Chromatogramm konnten bei den Retentionszeiten 5,2, 6,0, 7,1, 8,1, 8,8, 10,6 und 14,1 diverse Phospholipide identifiziert werden, wie z.B. 14:0 a/lyso-Phosphatidylcholin (m/z 468) oder 16:0 a/lyso-Phosphatidylcholin (m/z 496), 18:1 a/lyso-Phosphatidylcholin (m/z 522).

Während die Ionensuppression in einem Bereich von 2 – 5 min auftritt, konnte das erste Phospholipid erst bei einer Retentionszeit von 5,2 min detektiert werden. Die beschriebenen Phosphatidylcholone sind daher kein Auslöser für die Unterdrückung der Ionisation der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. In dem Bereich, in dem die Phospholipide von der analytischen Trennsäule eluiert werden (5,2 – 15 min), treten keine Matrixeffekte auf. Für das Hervorrufen der Ionensuppression im Trennbereich von 2 – 5 min sind demnach andere Substanzen verantwortlich.

Aus MS-Scans von Plasmaproben wurden in dem für die Ionensuppression relevanten Bereich von 2 – 5 min einige Substanzen (m/z 227, 289, 391, 429 und 435) gefunden. Diese Substanzen konnten jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden. Außerdem werden in der Zeit von 2 – 2,4 min sehr viele Substanzen mit Massen im Bereich von 700 – 1000 m/z eluiert. Auch diese Verbindungen konnten nicht identifiziert werden.

7.3 Validierung des MD-SPE-LC-MS/MS Verfahrens für die Analyse trizyklischer Antidepressiva

Das Ziel der Validierung einer Analysenmethode ist der Nachweis und die Dokumentation, dass die entwickelte Methode für den beabsichtigten Zweck zuverlässig geeignet ist^{135,136}.

7.3.1 Definitionen

Die einzelnen Parameter für die Validierung eines bioanalytischen Verfahrens stellen wichtige Bewertungskriterien für die Beurteilung der Qualität der Methode dar. Im folgenden sind die Definitionen der wichtigsten Validierungsparameter nach den Vorgaben der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) aufgeführt¹³⁷.

Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, den oder die Analyte in Gegenwart anderer Substanzen in einer Probe zu differenzieren und zu quantifizieren. Diese anderen Substanzen können z.B. makro- und niedermolekulare Matrixbestandteile oder Metabolite des Zielanalyten sein. Für die Bestimmung der Selektivität werden undotierte Proben von mindestens 6 verschiedenen Quellen analysiert. Jede undotierte Probe sollte auf potentielle Störungen im Konzentrationsbereich der unteren Bestimmungsgrenze untersucht werden.

Richtigkeit

Die Richtigkeit einer analytischen Methode spiegelt die Übereinstimmung der Messwerte mit dem wahren Wert wieder. Sie gibt Auskunft über systematische Fehler. Die Ermittlung der Richtigkeit erfolgt über die wiederholte Analyse von Proben mit bekannter Konzentration. Die Abweichung des Mittelwertes der gemessenen Proben vom wahren Wert wird als Maß für die Richtigkeit verwendet. Die FDA empfiehlt dafür die Bestimmung von drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) mit jeweils fünf Wiederholungsmessungen. Der Mittelwert der Messungen sollte dabei nicht mehr als 15 % (für die niedrige Konzentration 20 %) vom wahren Wert abweichen.

Präzision

Der Validierungsparameter Präzision beschreibt die Übereinstimmung mehrerer wiederholter Messungen. Die Präzision gibt Auskunft über zufällige Fehler. Für die Ermittlung der Präzision sollten ebenfalls jeweils fünf Proben bei drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) bestimmt werden. Die Angabe erfolgt als relative Standardabweichung der gemessenen Proben. Auch hier sollte die relative Standardabweichung, auch Variationskoeffizient (VK) genannt, nicht mehr als 15 % bzw. 20 % betragen.

Die Richtigkeit und die Präzision werden unter dem Oberbegriff der Genauigkeit einer analytischen Methode zusammengefasst.

Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate ist ein Maß für die Extraktionseffizienz und eventuelle Matrixeffekte einer Methode. Die Angabe der Wiederfindung erfolgt als prozentuale Ausbeute nach allen Schritten des Verfahrens. Sie wird bestimmt, indem das Messsignal der Analyte nach der Analyse einer biologischen Probe mit dem Messsignal der Analyte einer Standardlösung verglichen wird. Die Ermittlung der Wiederfindungsrate sollte ebenfalls bei drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) durchgeführt werden.

Kalibration – Kalibrationsgerade

Eine Kalibrationsgerade spiegelt die Beziehung zwischen den Messsignalen und der Konzentration der Analyte in der Probe wieder. Für die Bestimmung einer Kalibrationsgerade werden die Messsignale gegen die Analytkonzentrationen aufgetragen und eine Regressionsgerade berechnet. Sind die Messsignale direkt proportional zur Analytkonzentration, so kann eine lineare Kalibrationsfunktion gebildet werden. Ihre Steigung gibt Auskunft über die Empfindlichkeit der analytischen Methode. Nur in dem so genannten linearen Bereich ist eine zuverlässige Berechnung der Analytkonzentrationen in den biologischen Proben möglich.

Die Kalibrationsgerade muss für jeden Analyt separat bestimmt werden. Die Kalibratoren sollten aus der gleichen Matrix wie die zu analysierenden Proben bestehen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze, auch „limit of detection“ (LOD), ist die kleinste Konzentration der Analyte in der Probe, die gerade noch erfasst werden kann. Bestimmt wird die

Nachweisgrenze aus dem Signal-zu-Rausch (S/N) Verhältnis. Für die Nachweisgrenze beträgt dieses Verhältnis $S/N = 3$.

Die Bestimmungsgrenze, auch „limit of quantification“ (LOQ), ist die kleinste Konzentration der Analyte in der Probe, die sicher quantitativ erfasst werden kann. Für die Bestimmungsgrenze wird ein Signal-zu-Rausch Verhältnis von 10 angenommen.

Neben der Bestimmungsgrenze wird von der FDA auch eine untere Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification, LLOQ) genutzt. Als untere Bestimmungsgrenze wird der Kalibrationsstandard mit der geringsten Konzentration verwendet.

7.3.2 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden je 3 Plasma- und Serumproben mit jeweils 10 ng/ml der untersuchten trizyklischen Antidepressiva dotiert. Je 20 µl dieser 6 Proben wurden mit der entwickelten MD-SPE Plattform analysiert. Die Untersuchung wurde für die 5 ausgewählten MMP SPE-Säulen durchgeführt. Als Referenz wurden 6 Proben bidestillierten Wassers ebenfalls mit je 10 ng/ml dotiert und direkt, ohne Säulenschaltung, auf die analytische Trennsäule injiziert und mit dem Massenspektrometer analysiert. Der Mittelwert der erhaltenen Peakflächen wurde für die Berechnung der Wiederfindung als 100 % angenommen.

Durch den Vergleich der aufbereiteten Realproben mit der direkten LC-Analyse der Standardlösung können in einem Schritt 2 Aussagen getroffen werden:

Der Vergleich der direkten LC-Analyse mit der Probenaufbereitung durch die MD-SPE Plattform gibt Auskunft über potentielle Analytverluste durch das Säulenschalten. Der Vergleich der Standardlösung mit den Realproben gibt Auskunft über die Matrixabhängigkeit der Wiederfindung.

Die prozentualen Wiederfindungsraten und die relativen Standardabweichungen (RSD) der dotierten Proben sind in Tabelle 14 für die untersuchten trizyklischen Antidepressiva und die ausgewählten MMP SPE-Säulen aufgeführt.

Tabelle 14: Wiederfindungsraten (WFR) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva für die ausgewählten MMP SPE-Säulen. n = 6

WFR [%]	Oasis WCX (20 x 1 mm)	Oasis WCX (20 x 2,1 mm)	Strata X-CW (20 x 1 mm)	Strata X-CW (20 x 2 mm)	LiChrospher XDS (20 x 4 mm)
ATL	95,0 ± 1,8	101,9 ± 3,4	100,3 ± 3,1	100,8 ± 2,9	99,0 ± 2,6
CMP	99,3 ± 1,7	99,3 ± 1,3	100,9 ± 1,6	99,9 ± 2,2	99,5 ± 2,5
DSP	96,5 ± 2,2	99,6 ± 2,9	95,4 ± 2,1	98,0 ± 2,9	99,0 ± 4,0
DXP	99,2 ± 1,9	98,4 ± 2,5	99,2 ± 2,2	101,0 ± 2,7	100,4 ± 2,6
IMP	98,5 ± 2,5	100,7 ± 1,7	98,0 ± 2,6	100,2 ± 2,1	99,5 ± 2,8
MTL	100,6 ± 2,3	100,5 ± 2,3	98,9 ± 2,0	101,0 ± 1,8	99,2 ± 2,9
NCP	102,0 ± 2,4	100,5 ± 1,8	101,7 ± 2,2	99,7 ± 2,7	101,0 ± 2,9
NDX	96,9 ± 1,7	98,8 ± 2,1	95,7 ± 1,4	97,1 ± 2,2	95,6 ± 3,9
NTL	98,9 ± 2,0	98,1 ± 2,6	98,4 ± 2,1	100,1 ± 2,1	98,3 ± 3,4
TMP	97,6 ± 3,0	99,6 ± 2,1	99,6 ± 1,8	99,7 ± 1,4	99,3 ± 2,2

Die gefundenen Wiederfindungsraten bewegen sich zwischen 95 % und 102 % mit relativen Standardabweichungen von 1,3 % bis 4,0 %. Aus der Tabelle geht hervor, dass die rel. Standardabweichungen für die LiChrospher[®] XDS MMP SPE-Säule generell etwas höher sind als für die anderen untersuchten MMP SPE-Säulen.

Für die Oasis WCX und die Strata X-CW MMP SPE-Säulen mit der Dimension 20 x 1 mm wurden für einige trizyklische Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin, Desipramin oder Nordoxepin, geringere Wiederfindungsraten gefunden.

Für die Oasis WCX und die Strata X-CW MMP SPE-Säulen mit den Dimensionen 20 x 2,1 mm und 20 x 2 mm wurden die besten Wiederfindungsraten von durchschnittlich etwa 100 % mit einer rel. Standardabweichung von ca. 1,5 – 3 % gefunden. Die relativen Standardabweichungen liegen für alle MMP SPE-Säulen deutlich unter den geforderten 15 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wiederfindung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva nicht matrixabhängig ist und keine Analytverluste durch das Säulenschalten auftreten.

Da die Oasis WCX MMP SPE-Säule mit der Dimension von 20 x 2,1 mm zum Zeitpunkt der Untersuchungen die einzige kommerziell erhältliche MMP SPE-Säule war, wurde die Validierung der entwickelten MD-SPE Plattform nur für diese Säule vollständig durchgeführt.

7.3.3 Richtigkeit und Präzision

Für die Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision der MD-SPE Plattform wurden je 5 Plasmaproben mit den untersuchten trizyklischen Antidepressiva dotiert. Die Dotierung der Proben erfolgte mit 5,0, 50,0 und 500,0 ng/ml für jeden Analyt. 20 µl der Plasmaproben wurden injiziert und mit der MD-SPE Plattform analysiert.

Die Richtigkeit der Methode wird als prozentuale Übereinstimmung des Mittelwertes der gemessenen Proben von der bekannten Konzentration angegeben.

Für die Bestimmung der Präzision einer Analysenserie wurden die Proben für die Bestimmung der Richtigkeit verwendet. Für die Bestimmung der Präzision von Tag-zu-Tag wurden am folgenden Tag je 3 Proben der drei Konzentrationen noch einmal analysiert und zu der Berechnung der Präzision hinzuaddiert, so dass sich n = 8 für jede Konzentration ergibt. Die Präzision wird als relative Standardabweichung der gemessenen Peakflächen angegeben. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für die Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision aufgeführt.

Tabelle 15: Richtigkeit und Präzision der MD-SPE Plattform für die Analyse der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.

	Konzentration dotiert [ng/ml]	Konzentration berechnet [ng/ml]	Richtigkeit n = 5 [%]	Präzision Serie n = 5 [%]	Präzision Tag-zu-Tag n = 8 [%]
ATL	5,0	5,0	100,4	3,8	4,5
	50,0	51,6	103,1	3,2	3,4
	500,0	511,5	102,3	1,8	2,2
CMP	5,0	5,0	100,0	2,7	2,7
	50,0	52,0	103,9	2,3	2,6
	500,0	512,2	102,4	2,1	2,3
DSP	5,0	5,2	104,5	2,2	2,6

	50,0	51,9	103,8	2,0	3,0
	500,0	504,5	100,9	1,8	1,9
DXP	5,0	5,0	100,8	3,1	4,2
	50,0	51,7	103,3	3,3	3,3
	500,0	491,7	98,4	2,1	2,2
IMP	5,0	5,2	103,8	2,0	2,8
	50,0	51,9	103,7	2,3	2,5
	500,0	494,7	98,9	2,0	2,1
MTL	5,0	5,2	104,6	3,0	3,3
	50,0	51,6	103,1	2,4	2,5
	500,0	516,2	103,2	2,0	2,2
NCP	5,0	5,2	104,2	3,0	3,3
	50,0	52,5	105,1	2,2	2,4
	500,0	498,6	99,7	2,1	2,1
NDX	5,0	5,2	103,7	3,1	3,4
	50,0	51,1	102,3	2,9	3,1
	500,0	505,8	101,1	1,8	2,0
NTL	5,0	5,3	105,1	3,0	3,3
	50,0	51,5	102,9	2,1	2,2
	500,0	515,8	103,2	1,9	2,2
TMP	5,0	5,2	103,5	2,7	3,0
	50,0	51,2	102,4	2,1	2,1
	500,0	497,1	99,4	2,0	2,0

Für die Richtigkeit der Methode wurden für die untersuchten Proben Übereinstimmungen mit der bekannten Konzentration zwischen 98,4 % und 105,1 % gefunden, wobei die beiden höheren Konzentrationen von 50 und 500 ng/ml durchweg bessere Übereinstimmungen zeigten.

Die Präzision der Messungen in einer Analysenserie lag zwischen 1,8 % und 3,8 % und die Präzision der Messungen von Tag-zu-Tag zwischen 1,9 % und 4,5 %. Alle bestimmten relativen Standardabweichungen lagen weit unter den geforderten 15 % für 50 und 500 ng/ml und 20 % für 5 ng/ml.

7.3.4 Kalibration / Linearität

Für die Kalibrierung der MD-SPE Plattform für die Analyse der trizyklischen Antidepressiva wurden native Plasmaproben mit den untersuchten Analyten dotiert (1, 5, 15, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml).

Die Bestimmung der Wiederfindung zeigte, dass diese MD-SPE Plattform sowohl quantitativ (100 %) als auch unabhängig von der Matrix ist. Obwohl aufgrund dieser Ergebnisse auf den Einsatz eines internen Standards verzichtet werden könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit 6-fach deuteriertes Amitriptylin als interner Standard verwendet, um potentielle Fehler des Probengebers auszugleichen. Hierfür wurden die Kalibrationsstandards zusätzlich mit 100 ng/ml Amitriptylin-d6 dotiert. 20 µl der Kalibrationsproben wurden direkt in die MD-SPE Plattform injiziert und analysiert.

Die Quantifizierung erfolgte über die Auswertung des Verhältnisses der Peakflächen des internen Standards mit den Peakflächen der untersuchten Analyte. Die Kalibrationsgerade wurde durch eine lineare Regression ermittelt, bei der die Konzentrationen $1/x$ gewichtet wurden. In Tabelle 16 sind die erhaltenen Kalibrationsgeraden, die Kalibrationsbereiche und die Korrelationskoeffizienten aufgeführt. Die sehr hohen Korrelationskoeffizienten (nahezu 1) zeigen die sehr gute Linearität der erhaltenen Kalibrationsgeraden über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich.

Tabelle 16: Kalibrationsbereich, Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten der MD-SPE Plattform für die untersuchten trizyklischen Antidepressiva.

	Kalibrations- bereich [ng/ml]	Geradengleichung $y = a x + b$	Korrelations- koeffizient
ATL	5 – 1000	$y = 0,018 x + 0,0051$	0,9990
CMP	5 – 1000	$y = 0,083 x + 0,0039$	0,9999
DSP	1 – 1000	$y = 0,093 x + 0,0090$	0,9998
DXP	5 – 1000	$y = 0,040 x + 0,0027$	0,9994
IMP	5 – 1000	$y = 0,111 x + 0,0081$	0,9996
MTL	1 – 1000	$y = 0,030 x + 0,0057$	0,9996
NCP	1 – 1000	$y = 0,066 x + 0,0069$	0,9999
NDX	1 – 1000	$y = 0,039 x + 0,0080$	0,9998
NTL	1 – 1000	$y = 0,032 x + 0,0034$	0,9992
TMP	5 – 1000	$y = 0,103 x + 0,0032$	0,9998

7.3.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen für die untersuchten trizyklischen Antidepressiva wurden die Konzentrationen berechnet, bei denen das S/N 3 betrug. Außerdem wurde für die untersuchten Analyte die untere Bestimmungsgrenze ermittelt. Hierfür wurde der niedrigste Kalibrationsstandard verwendet, bei dem das Signal-zu-Rausch Verhältnis größer 5 war. Die erhaltenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Nachweis- (LOD) und untere Bestimmungsgrenzen (LLOQ)

[ng/ml]	ATL	CMP	DSP	DXP	IMP	MTL	NCP	NDX	NTL	TMP
LOD	1,2	1	0,2	0,9	0,9	0,2	0,2	0,4	0,5	1
LLOQ	5	5	1	5	5	1	1	1	1	5

7.3.6 *Selektivität*

Um die Selektivität der entwickelten MD-SPE Plattform bezüglich der Analytik der trizyklischen Antidepressiva zu evaluieren, wurden dotierte Plasmaproben untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Analyte ohne Verfälschung durch Matrixbestandteile und ohne gegenseitige Störungen der trizyklischen Antidepressiva analysiert werden können (vergleiche Kapitel 7.1).

7.3.7 *Analyse von Patientenproben*

Mit der entwickelten MD-SPE Plattform wurden für einen ersten Methodenvergleich Patientenproben aus dem Institut für Neurochemie der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie (Ludwig-Maximilians Universität, München) untersucht. Diese 13 Proben wurden von Dr. Markus Schwarz zur Verfügung gestellt. In der Routine werden die Serumproben zunächst mittels manueller off-line SPE (Oasis HLB) aufbereitet und danach über eine HPLC-Methode mit UV-Detektion analysiert.

Für die Analyse mit der MD-SPE Plattform wurden die Serumproben zentrifugiert (4 min bei 13200 U/min), um partikuläre Bestandteile zu entfernen und anschließend in jede der Proben der interne Standard d6-Amitriptylin zugegeben. 20 µl der Patientenproben wurden danach direkt mit Hilfe des MD-SPE-LC-MS/MS Verfahrens aufgearbeitet und analysiert.

In Tabelle 18 sind die erhaltenen Ergebnisse und die Übereinstimmung mit den bekannten Konzentrationen aus der Routineanalytik aufgeführt.

Tabelle 18: Übereinstimmung der durch die MD-SPE ermittelten Konzentrationen mit den bekannten Konzentrationen aus der Routineanalytik

Nr.	Analyt	Konzentration	Konzentration	Übereinstimmung
		Routine [ng/ml]	MD-SPE [ng/ml]	
1	NTL	95	92	97
2	MTL	198	187	94
3	TMP	222	225	101
4	NTL	59	54	92
5	NTL	90	93	103
6	MTL	138	143	104
7	NTL	71	72	101
	ATL	54	55	102
8	NTL	18	4	22
	ATL	15	5	33
9	NTL	38	33	87
	ATL	84	84	100
10	MTL	141	131	93
11	NTL	82	79	96
	ATL	72	72	100
12	DXP	33	30	91
	NDX	90	53	59
13	TMP	80	80	100

Die Ergebnisse zeigen generell eine sehr gute Übereinstimmung (87 % - 104 %) der untersuchten Patientenproben mit den bekannten Konzentrationen aus der Routineanalytik.

Der Methodenvergleich der entwickelten MD-SPE Plattform mit der Routineanalytik ist in Abbildung 64 grafisch dargestellt. Beide Methoden zeigen eine sehr gute Korrelation ($R = 0,9959$) und weisen einen Anstieg der Regressionsgerade von 1,02 auf. Das Ergebnis des Nordoxepins (rosa) in Probe 12 wurde als Ausreißer nicht in die lineare Regression einbezogen.

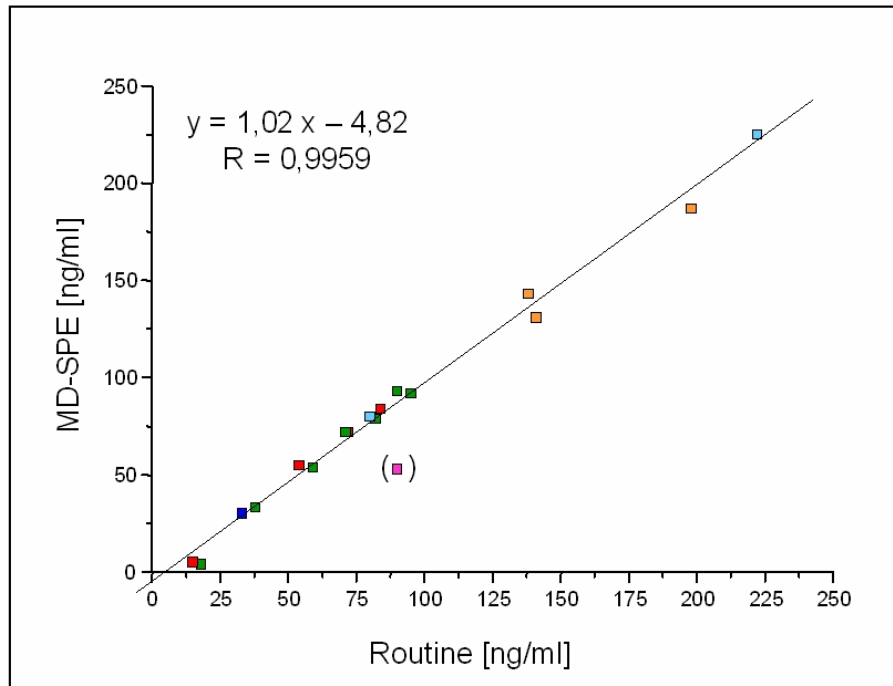


Abbildung 64: Methodenvergleich der MD-SPE Plattform mit der Routineanalytik für die Bestimmung von trizyklischen Antidepressiva in Serum. ■- Amitriptylin, ■- Doxepin, ■- Maprotilin, ■- Nordoxepin, ■- Nortriptylin, ■- Trimipramin.

Mit Ausnahme von zwei Proben (8 und 12) lagen alle Proben innerhalb der geforderten Abweichungstoleranz von $\pm 15\%$. Der Grund für die fehlerhaften Ergebnisse der Proben 8 und 12 konnte nicht ermittelt werden, da nicht genügend Probenmaterial für eine Analyse mit einer dritten Methode zur Verfügung stand.

Aus diesem Grund müssen weitere Methodenvergleiche der entwickelten MD-SPE Plattform mit der Routinemethode durchgeführt werden, bevor diese Methode in der Routine eingesetzt werden kann.

8 Allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform

Nach der Entwicklung des MD-SPE Verfahrens für die direkte und vollautomatische Analyse einer Reihe von trizyklischen Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten soll die allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform anhand der Analyse von drei basischen Modellverbindungen wie Trimethoprim, Ketamin und Clenbuterol gezeigt werden. Die chemischen Eigenschaften der drei Analyte sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Trimethoprim, Ketamin und Clenbuterol^{66,138,139};

	pKa	Log P
Trimethoprim	6,6	1,43
Ketamin	7,5	2,58
Clenbuterol	8,86	2,61

8.1 Trimethoprim

Für die Analyse von Trimethoprim mit der MD-SPE Plattform musste das bereits entwickelte Verfahren nur geringfügig an den Analyten angepasst werden. Aufgrund der höheren Polarität von Trimethoprim (Log P 1,43) wurde für die gröbenselektive Fraktionierung ein LiChrospher[®] ADS Packungsmaterial mit einer C18 Umkehrphase verwendet (LiChrospher[®] ADS RP18; 20 x 2 mm). Die entsprechenden Schaltzeiten konnten für die Bestimmung von Trimethoprim übernommen werden. Als MMP SPE-Säule wurde eine Oasis WCX Säule (20 x 2,1 mm) verwendet und als analytische Trennsäule eine Sunfire C18 Säule (100 x 2,1 mm; 5 µm).

In Tabelle 20 ist der Analysenzyklus für die Bestimmung von Trimethoprim in biologischen Flüssigkeiten aufgeführt. Die Programme für die HPLC-Pumpen und die Lösungsmittel für das Waschen der SPE-Säulen sind im Anhang beschrieben. Die Teilschritte des MD-SPE Verfahrens wurden mit den Eluenten des Verfahrens für die TZA durchgeführt.

Tabelle 20: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Bestimmung von Trimethoprim

Zeit [min]	Schaltventil		RAM	MMP	Analytische
	1	2	SPE-Säule	SPE-Säule	Trennsäule
0	6-1	6-1	Größenselektive Fraktionierung	Reäquilibration	Reäquilibration
1	1-2	6-1	Elution + Transfer	Transfer + chemo- selektive Fraktionierung	Reäquilibration
2,5	6-1	1-2	Waschen / Reäquilibration	Elution + Transfer	Transfer + analytische Trennung
4	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung
6	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung

In Abbildung 65 ist ein Chromatogramm der MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma (Konzentration 85 ng/ml) dargestellt. Die MS-Detektion des Trimethoprim erfolgte mit Hilfe des so genannten Qualifier/Quantifier Prinzips. Hierbei werden für den Analyt zwei MRM-Übergänge aufgezeichnet, bei denen es sich meistens um die beiden intensivsten Produktionen handelt. Der MRM-Übergang 291,4 > 123,3 m/z dient zur Quantifizierung und der MRM-Übergang 291,4 > 230,3 m/z dient zur eindeutigen Identifizierung des Trimethoprim. Das Verhältnis der beiden Produktionen beträgt dabei ca. 1,1. In der chemischen Struktur sind die beiden Produktionen farblich hervorgehoben.

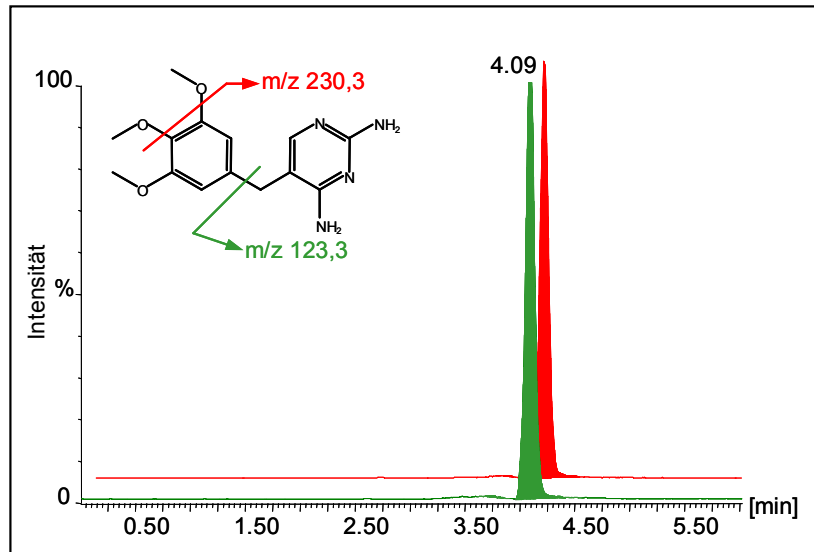


Abbildung 65: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma. Konzentration 85 ng/ml. ■- MRM-Übergang 291,4 > 123,3 m/z Quantifier; ■- MRM-Übergang 291,4 > 230,3 m/z Qualifier. Injektionsvolumen 20µl.

Auch für Trimethoprim wurde der Einfluss des pH-Wertes des Eluenten E2 untersucht. In Abbildung 66 sind Chromatogramme von Plasmaproben, dotiert mit Trimethoprim, nach der Analyse mit dem normalen Eluenten E2 (grün) und dem Eluenten E2 mit pH 8,6 (rot) dargestellt. Trimethoprim besitzt einen pKa Wert von 6,6¹³⁸, d.h. bei einem pH-Wert von 8,6 liegt nur etwa 1 % der Analytmoleküle ionisiert vor und das Trimethoprim wird nicht auf der MMP SPE-Säule retiniert. Aus diesem Grund ist in dem roten Chromatogramm kein Peak bei der Retentionszeit des Analyten 4,1 min zu erkennen. Der Peak bei 3,6 min stammt nicht von Trimethoprim, da in dem MRM-Übergang des Qualifiers (gelb) 291,4 > 230,3 m/z kein Peak detektiert wurde.

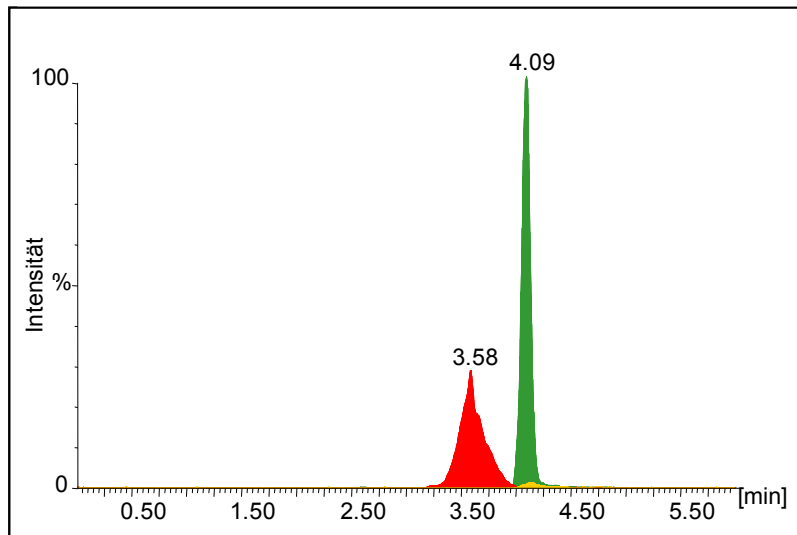


Abbildung 66: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma. Konzentration 85 ng/ml. ■- Analyse mit Eluent E2 (TIC); ■- Analyse mit Eluent E2 pH 8,6 (TIC); ■- Analyse mit Eluent E2 pH 8,6 (MRM-Übergang 291,4 > 230,3, Qualifier).

Außerdem wurde für Trimethoprim eine kurze Kalibrationsgerade in Plasma aufgenommen. Dafür wurden Plasmaproben der Konzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 ng/ml analysiert. Die durch lineare Regression gebildete Kalibrationsgerade ($y = 667,3 x - 523,9$) hat einen Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,9986$. Anhand des Signal-zu-Rausch Verhältnisses (S/N) der Plasmaprobe mit der Konzentration 12,5 ng/ml wurde für die Nachweisgrenze (LOD) für Trimethoprim ein Wert von 0,13 ng/ml ermittelt.

8.2 Ketamin

Ketamin wurde auch aus aktuellem Interesse als Testsubstanz für die MD-SPE Plattform ausgewählt. In den letzten Jahren hat sich Ketamin, das in den 60er Jahren bei schwer verwundeten GIs im Vietnamkrieg eingesetzt wurde, zur Szenedroge entwickelt. In den USA und in Großbritannien hat „Special K“ fast die Beliebtheit von Amphetaminen, Ecstasy und Haschisch erreicht. Typischerweise wird Ketamin geschnupft und führt zu Schwebeständen sowie einem Trennungsgefühl von Geist und Körper, auch Nahtod-Erlebnisse sind möglich. Es ist verwandt mit der Droge „Angeldust“ (PCP) und kann zur Atemlähmung führen.

Für die Bestimmung von Ketamin in humanem Plasma wurde die Methode für Trimethoprim dahingehend verändert, dass eine LiChrospher® ADS SPE-Säule (20 x 2 mm) mit einer C8 Umkehrphase verwendet wurde, um die gröbenselektive Fraktionierung der Polarität des Ketamins anzupassen. Die Schaltzeiten, Eluenten, die MMP SPE-Säule und die analytische Trennsäule wurden von der Methode für die Bestimmung des Trimethoprim übernommen (Tabelle 20).

Die MS-Detektion des Ketamins erfolgte ebenfalls über das Qualifier/Quantifier Prinzip. Als Quantifier wurde der MRM-Übergang $238,3 > 125,3$ m/z verwendet und als Qualifier der MRM-Übergang $238,3 > 162,9$ m/z. Das Verhältnis der beiden Produktionen ist etwa 7,4.

In Abbildung 67 sind die beiden MRM-Übergänge dargestellt. Sie zeigen das Chromatogramm einer mit Ketamin dotierten Plasmaprobe (68 ng/ml) nach der Analyse mit der MD-SPE Plattform.

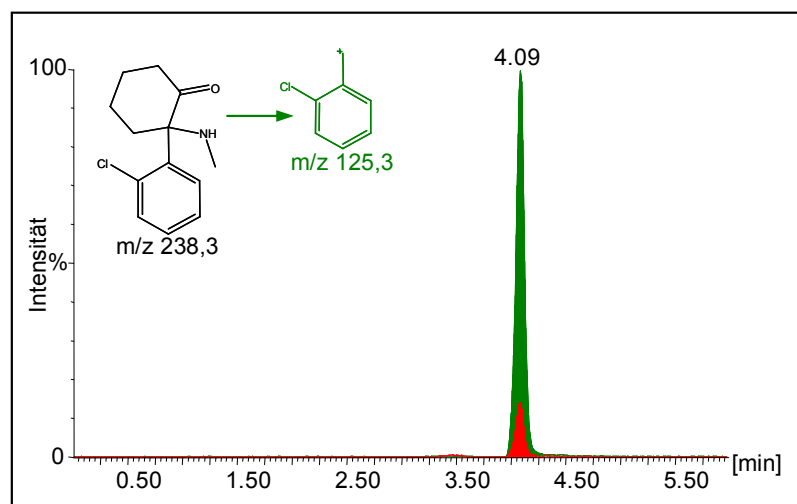


Abbildung 67: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Ketamin in humanem Plasma; Konzentration 68 ng/ml; Injektionsvolumen 20 µl; - MRM-Übergang $238,3 > 125,3$ m/z, - MRM-Übergang $238,3 > 162,9$ m/z.

Anhand des Signal-zu-Rausch Verhältnisses der dotierten Plasmaprobe wurde für die Ketaminbestimmung eine Nachweisgrenze von 0,3 ng/ml bestimmt.

8.3 Clenbuterol

Als letztes Beispiel für die allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform wurde das Clenbuterol ausgewählt. Dieser β -Agonist wird z.B. als Bronchospasmolytikum bei Asthma bronchiale oder auch aufgrund seiner anabolen Wirkung im Doping eingesetzt.

Für die Bestimmung des Clenbuterols in Urin mit der MD-SPE Plattform wurde die nachstehende Methode entwickelt. Die gröÙenselektive Fraktionierung wurde mit einer LiChrospher[®] ADS RP4 SPE-Säule (20 x 2 mm) durchgeführt und die chemoselektive Fraktionierung mit einer kommerziell erhältlichen Oasis WCX MMP SPE-Säule (20 x 2,1 mm). Für die analytische Trennung wurde eine Reprosil Pur C18 Aq Säule (125 x 2 mm, 5 μ m) verwendet. Die Schaltzeiten wurden für die MD-SPE so gewählt, dass der vollständige Transfer des Clenbuterols gewährleistet ist. Der Analysenzyklus für die Analyse von Clenbuterol mit der MD-SPE Plattform ist in Tabelle 21 aufgeführt. Die Programme für die HPLC-Pumpen und die Lösungsmittel für das Waschen der SPE-Säulen sind im Anhang beschrieben.

Die einzelnen Teilschritte des MD-SPE Verfahrens wurden mit folgenden Eluenten durchgeführt:

- E1: 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v)
- E2: 50/50 Acetonitril/2,5 mM Ammoniumacetat pH 6
- E3: 45/55 Acetonitril/50 mM Ammoniumacetat pH 3.

Tabelle 21: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Bestimmung von Clenbuterol

Zeit [min]	Schaltventil		RAM	MMP	Analytische
	1	2	SPE-Säule	SPE-Säule	Trennsäule
0	6-1	6-1	Größenselektive Fraktionierung	Reäquilibration	Reäquilibration
1	1-2	6-1	Elution + Transfer	Transfer + chemo- selektive Fraktionierung	Reäquilibration
2	6-1	1-2	Waschen / Reäquilibration	Elution + Transfer	Transfer + analytische Trennung
6	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung
8	6-1	6-1	Waschen / Reäquilibration	Waschen / Reäquilibration	Analytische Trennung

Die Detektion des Clenbuterols erfolgte über den MRM-Übergang $277,3 > 203$ m/z. In Abbildung 68 ist ein Chromatogramm des Clenbuterols nach Analyse einer dotierten Urinprobe (500 ng/ml) mit der MD-SPE Plattform dargestellt. Anhand der dotierten Urinprobe wurde auch für Clenbuterol mit Hilfe des Signal-zu-Rausch Verhältnisses die Nachweisgrenze (LOD) ermittelt. Bei einem S/N Verhältnis von 5145 und einer Konzentration von 500 ng/ml können 0,29 ng/ml als Nachweisgrenze für die Analyse von 20 µl Urin angenommen werden.

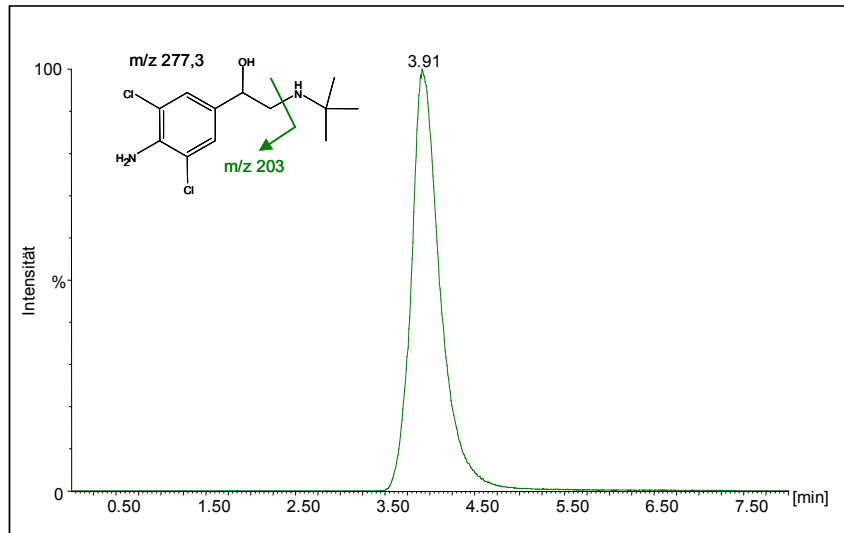


Abbildung 68: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Clenbuterol in humanem Urin; Konzentration 500 ng/ml; Injektionsvolumen 20 µl; MRM-Übergang 277,3 > 203 m/z.

8.4 „Tuning“

Aus den oben beschriebenen Beispielen ist ersichtlich, dass die entwickelte MD-SPE Plattform ein generisches Potential besitzt. Durch Veränderungen in der Zusammensetzung der Eluenten und durch Auswahl der SPE-Säulen ist es möglich die Plattform zielgerichtet für die Analyse bestimmter basischer Analyte anzupassen.

Dieses „Tuning“ der Methode basiert prinzipiell auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften $\log P$ und dem pK_a -Wert der Zielanalyte.

Der $\log P$ Wert einer Substanz gibt Auskunft über deren Polarität. Durch diesen Wert ist es möglich die ideale RAM SPE-Säule auszuwählen, ohne aufwendige Experimente durchzuführen. Für die Retention polarer Verbindungen, wie z.B. Trimethoprim ($\log P$ 1,43) ist es notwendig stark retenierende, d.h. C18 modifizierte RAM Packungsmaterialien zu verwenden. Mit abnehmender Polarität der Analyte (z.B. Ketamin; $\log P$ 2,58) können Packungsmaterialien mit geringerer Retentionskraft, z.B. C8 eingesetzt werden und für die Extraktion sehr unpolarer Analyte, wie beispielsweise den trizyklischen Antidepressiva ($\log P$ ca. 4 – 5) sind C4 modifizierte RAM Packungsmaterialien ausreichend.

Der pKa-Wert einer Substanz ist hauptsächlich für die chemoselektive Fraktionierung der niedermolekularen Probenbestandteile auf der MMP SPE-Säule relevant. Bei diesem Fraktionierungsschritt ist es entscheidend, dass die Zielanalyte ionisiert vorliegen. Dafür muss der pH Wert des Eluenten E2 ca. 2 Einheiten unter dem pKa-Wert des Analyten liegen. Über die Veränderung des pH Wertes des Eluenten E2 ist es möglich die Extraktion basischer Substanzen so zu beeinflussen, dass speziell diese Substanzen an- bzw. abgereichert werden. Dem für dieses „Tuning“ möglichen pH Bereich sind jedoch nach oben sowie unten Grenzen gesetzt. Der pH Wert sollte nicht kleiner als 4 – 4,5 sein, da bei saureren pH Werten die Karboxylgruppen der MMP Packungsmaterialien protoniert und somit neutralisiert werden. pH Werte größer 8 sollten ebenfalls vermieden werden, da sonst das Kieselgelgerüst der RAM Packungsmaterialien beschädigt wird.

9 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine multidimensionale hochleistungs-chromatographische Methode zur direkten und vollautomatischen Probenaufbereitung basischer Substanzen in biologischen Flüssigkeiten entwickelt. Für die Erprobung und Validierung der klinisch-chemischen MD-SPE Plattform (Multidimensionale Solid-Phase Extraction) wurden bestimmte trizyklische Antidepressiva als Modellsubstanzen ausgewählt.

Das Kernstück der bioanalytischen SPE-Plattform ist eine elektrisch betriebene Ventilschaltung zwischen zwei, mit maßgeschneiderten Adsorbentien gepackten, SPE-Säulen (Säulendimensionen: Länge 10 – 20 mm, Innendurchmesser 1 – 2 mm). Die Trennleistung und Selektivität der MD-SPE Plattform beruht auf vier chromatographischen Modi, d.h. vier Dimensionen. Diese vier Dimensionen erfüllen das Kriterium der Orthogonalität (Unabhängigkeit), welche eine Grundvoraussetzung für Multidimensionalität ist. Nur die niedermolekularen Probenbestandteile werden allen 4 Trennverfahren zugeführt. Die Methode erfüllt somit für diese Fraktion auch das Kriterium der Vollständigkeit.

Auf der ersten SPE-Säule, die mit einem "Restricted Access Material" (RAM, LiChrospher[®] ADS) gepackt ist, werden zwei chromatographische Prinzipien simultan angewandt, Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase Chromatography, RPC). Bei den LiChrospher[®] ADS Materialien liegt die Ausschlussgrenze für Probenkomponenten bei einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa. Für die RPC sind C4, C8 oder C18 Phasen wählbar.

Die zweite SPE-Säule wurde mit einer neuartigen Mixed-Mode Phase gepackt. Auf dieser SPE-Säule werden zwei weitere chromatographische Prinzipien ebenfalls simultan angewandt, Ionenaustausch-Chromatographie (Ion Exchange Chromatography, IEC) und hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC). Die Verwendung eines schwachen Kationenaustauschers ermöglicht es, die basischen Zielanalyte über eine entsprechende Veränderung des pH-Wertes der mobilen Phase selektiv zu extrahieren und zu desorbieren.

Ein vollständig automatisierter Analysenzyklus besteht darin, dass die unbehandelte biologische Flüssigkeit, wie beispielsweise Plasma oder Urin über einen Probengeber auf die RAM SPE-Säule aufgegeben wird. Dort werden alle Matrixbestandteile, die größer als 15000 Da sind, in den Abfall eluiert, während die niedermolekularen Bestandteile, zu denen auch die

Zielanalyte gehören, durch die RP-Phase extrahiert werden. Diese Fraktion wird dann mit einem Eluenten, welcher einen hohen Anteil eines organischen Lösungsmittels enthält, auf die MMP SPE-Säule transferiert und dort chemoselektiv fraktioniert. Die Zielanalyte werden an dem MMP Material retiniert, während die restlichen niedermolekularen Matrixbestandteile mit dem Eluenten in den Abfall gespült werden. Danach werden die Zielanalyte durch die analytische mobile Phase von der MMP SPE-Säule desorbiert und auf der analytischen Säule aufgetrennt. Die Dimensionen der SPE-Säulen und die Flussraten der Eluenten wurden dabei dahingehend optimiert, dass die on-line Probenaufbereitung in 2,5 min abgeschlossen ist.

Um die Selektivität der MD-SPE Plattform zu untersuchen und zu demonstrieren wurden native und dotierte Plasma- und Urinproben mittels der MD-SPE Plattform und einer konventionellen, dem Stand der Technik entsprechenden, RAM SPE-LC Kopplung analysiert und die Ergebnisse verglichen. Die Chromatogramme wurden mit UV-, Diodenarray-Detektion und massenspektrometrischer Detektion aufgezeichnet.

Die bei dem Vergleich erhaltenen Ergebnisse beweisen eindeutig die sehr hohe Qualität und Selektivität der MD-SPE Plattform. Durch dieses Verfahren werden nicht nur die makromolekularen Matrixbestandteile sehr selektiv abgetrennt (RAM SPE-Säule) sondern auch die niedermolekularen Matrixbestandteile hochselektiv und nahezu vollständig abgereichert (MMP SPE-Säule). Anhand der Untersuchung verschiedener MMP Packungsmaterialien konnte die chemoselektive Fraktionierung optimiert werden.

Das entwickelte MD-SPE Verfahren besitzt eine hohe An- bzw. Abreicherungskapazität und erlaubt die hochselektive Aufreinigung von bis zu 100 µl einer Plasma- bzw. Urinprobe.

Die Selektivität der MD-SPE Plattform kann zielgerichtet auf einen bestimmten basischen Analyten hin optimiert werden. So kann beispielsweise bei der RAM SPE-Säule ein C4-, C8- oder C18 modifiziertes Packungsmaterial eingesetzt werden. Über die Wahl des pH-Wertes des Eluenten E2 kann insbesondere die Selektivität der MMP SPE-Säule sehr einfach verändert bzw. optimiert werden.

Das Hauptziel bei der Entwicklung der MD-SPE Plattform bestand darin, dass eine Qualität für die Aufreinigung komplexer biologischer Flüssigkeiten erreicht wird, die es ermöglicht unter Routinebedingungen eine durch Matrixeffekte weitgehend ungestörte Detektion der Zielanalyte mit Hilfe eines Tandem-Massenspektrometers durchzuführen.

Um diese MS-adäquate Aufreinigung aufzuzeigen, wurden so genannte Nachsäulen-Infusionsexperimente durchgeführt. Hierdurch kann der Einfluss von Matrixbestandteilen auf

die Ionisationsausbeute der untersuchten Analyte sichtbar gemacht werden. Auch in diesen Experimenten wurde die MD-SPE Plattform vergleichend mit einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der bei einer konventionellen on-line Probenaufbereitung auftretende Matrixeffekt, d.h. die Ionensuppression, bei Verwendung der MD-SPE Plattform erstmalig vollständig eliminiert werden kann. Dies erlaubt nicht nur eine schnellere sondern auch eine wesentlich robustere LC-MS/MS Analytik.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit mit den untersuchten trizyklischen Antidepressiva gezeigt werden, dass im Gegensatz zu einer konventionellen RAM SPE-LC Kopplung die Ionisation der Modellanalyte weder durch interindividuelle noch durch intraindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung der biologischen Matrices gestört wird. Bei Verwendung der MD-SPE Plattform ist die Ionenausbeute nicht nur unabhängig von der Art und Zusammensetzung der biologischen Flüssigkeit, sondern auch von deren Herkunft. Dies konnte durch die Analyse von Serum- und Urinproben der Spezies Mensch, Schwein, Rind und Geflügel gezeigt werden.

Mit der MD-SPE Plattform wurden dann auch Humanplasmaproben analysiert, die zuvor mit neun verschiedenen trizyklischen Antidepressiva dotiert wurden. Alle Substanzen können innerhalb von 8 min ohne chromatographische oder massenspektrometrisch bedingte Probleme vollautomatisch quantifiziert werden.

Die Validierung der MD-SPE Plattform lieferte sehr gute Ergebnisse für die Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung, Linearität und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die ermittelten Abweichungen, beispielsweise für die Richtigkeit $< 6 \%$, liegen weit unter den geforderten 15% , bzw. 20% an der unteren Bestimmungsgrenze. Ein Methodenvergleich mit Patientenproben aus der Routineanalytik des Instituts für Neurochemie und der MD-SPE Plattform lieferte ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung ($R^2: 0,9959$).

Die entwickelte multidimensionale SPE-Plattform mit der Kombination eines RAM Packungsmaterials und eines MMP Packungsmaterials ist nicht nur für Analyse trizyklischer Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten geeignet. Die allgemeine Anwendbarkeit der MD-SPE Plattform wurde am Beispiel der Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma, Ketamin in humanem Plasma und Clenbuterol in humanem Urin gezeigt.

Die Methode erfasst basische Analyte mit pKa-Werten größer 6,5 und einer mittleren bis schwachen Polarität. Diese physikalisch-chemischen Eigenschaften weisen eine Vielzahl von Pharmaka auf. Die erarbeitete MD-SPE-LC-MS/MS Methode besitzt daher ein generisches Potential, welches die Plattform für eine Routineanwendung im pharmazeutischen und klinisch-chemischen Labor attraktiv macht.

10 Anhang

10.1 Geräte und Materialien

MD-SPE-LC-MS/MS / RAM-LC-MS/MS

Probengeber:	HTC PAL (CTC Analytics, Zwingen, CH)
HPLC-Pumpen:	2x Agilent 1100 Binary Pump (Agilent, Waldbronn) 1x Merck Hitachi L-6200 (Merck KGaA, Darmstadt)
Massenspektrometer:	Quattro Micro (Micromass, Manchester, UK)
Software:	Masslynx 3.5 (Micromass, Manchester, UK)

MD-SPE-LC-UV/DAD / RAM-LC-UV/DAD

Probengeber:	Merck Hitachi AS-4000 (Merck KGaA, Darmstadt)
HPLC-Pumpen:	2x Merck Hitachi L-6200A (Merck KGaA, Darmstadt) 1x Merck Hitachi, L-6200 (Merck KGaA, Darmstadt)
Schaltventile:	ELV-7000 (W. Krannich GmbH & Co. KG, Göttingen)
UV-Detektor:	Merck Hitachi L-4250 (Merck KGaA, Darmstadt)
DAD-Detektor:	Merck Hitachi L-7450 (Merck KGaA, Darmstadt)
Software:	D-6000 Interface HSM-Software (Merck KGaA, Darmstadt)

SPE-Packungsmaterialien

RAM:	LiChrospher [®] ADS RP 4, dp 25 µm (Merck KGaA, Darmstadt) LiChrospher [®] ADS RP 8, dp 25 µm (Merck KGaA, Darmstadt) LiChrospher [®] ADS RP 18, dp 25 µm (Merck KGaA, Darmstadt)
MMP:	Oasis WCX, dp 30 µm (Waters Corp., Milford, USA) Strata X-CW, dp 33 µm (Phenomenex GmbH, Aschaffenburg) LiChrospher [®] XDS COOH, monolith (Merck KGaA, Darmstadt) CIM CM, monolith (BIA Separations, Ljubljana, SL) Chromabond PCA, dp 45 µm (Macherey-Nagel, Düren) Isolute HCX-Q, dp 50 µm (Separtis, Grenzach-Wyhlen)

Analytische Trennsäulen

TZA:	Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150 x 4,6 mm (Agilent, Waldbronn) LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt) MZ-Aqua Perfect C18, 5 µm, 150 x 3 mm (MZ-Analysentechnik, Mainz) Zorbax RX-C18, 3,5 µm, 75 x 4,6 mm (Agilent, Waldbronn) Sunfire C18, 5 µm, 100 x 2,1 mm (Waters Corp., Milford, USA)
Trimethoprim/Ketamin:	Sunfire C18, 5 µm, 100 x 2,1 mm (Waters, Milford, USA)
Clenbuterol:	ReproSil-Pur C18 Aq, 5 µm, 125 x 2 mm (Maisch, Ammerbuch)

10.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Trizyklische Antidepressiva	alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
d6-Amitriptylin	Euriso-top, Gif-sur-Yvette, F
Trimethoprim	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clenbuterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser	Mallinckrodt Baker BV., Deventer, NL
Methanol	Mallinckrodt Baker BV., Deventer, NL
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt

10.3 Geräteparameter

10.3.1 Retentions- und Tailingfaktoren der analytischen Trennung

	Retentionsfaktor k'	Tailingfaktor TF
Amitriptylin	2,95	1,57
Clomipramin	4,42	1,65
Desipramin	2,19	1,75
Doxepin	1,62	1,77
Imipramin	2,52	1,69
Maprotilin	2,60	1,75
Norclomipramin	3,85	1,56
Nordoxepin	1,47	1,64
Nortriptylin	2,56	1,69
Trimipramin	3,29	1,68

Die analytische Trennsäule und die chromatographischen Bedingungen für die Berechnung der Retentions- und Tailingfaktoren sind in Kapitel 6.1 aufgeführt.

Retentionsfaktor k'

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

wobei t_R die Retentionszeit des Analyten und t_0 die Totzeit ist.

Tailingfaktor TF

Die Tailingfaktoren werden wie in Abbildung 69 beschrieben ermittelt.

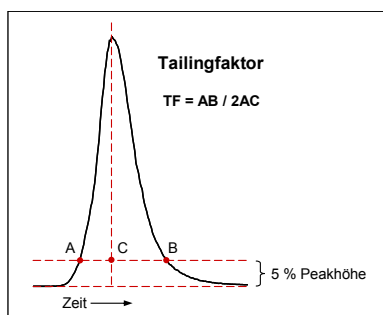


Abbildung 69: Berechnung der Tailingfaktoren TF.

10.3.2 Säulenschaltungen

10.3.2.1 MD-SPE trizyklische Antidepressiva

Tabelle 22: Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik der TZA

Zeit [min]	Pumpe RAM		Pumpe MMP		Pumpe LC	
	% B (E1)	Fluss [ml/min]	% B (E2)	Fluss [ml/min]	% B (E3)	Fluss [ml/min]
0,00	100	4,0	100	0,5	100	1,0
0,90	100	4,0	100	3,0	100	1,0
1,00	0	0,1	100	3,0	100	1,0
2,50	0	2,0	0	0,1	100	1,0
3,50	100	2,0	0	2,0	100	1,0
4,50	100	0,5	100	2,0	100	1,0
5,50	100	0,5	100	0,5	100	1,0
8,00	100	0,5	100	0,5	100	1,0

Pumpe RAM

A Acetonitril

B 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v) – Eluent E1

Pumpe MMP

- A Acetonitril + 0,4 % Ameisensäure (v/v)
B 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v) – Eluent E2

Pumpe LC

- B 40/60 Acetonitril/25 mM Ammoniumacetat pH 3 (v/v) – Eluent E3

10.3.2.2 RAM-LC trizyklische Antidepressiva

Tabelle 23: Bedingungen der Säulenschaltung für die RAM SPE-LC Analytik der TZA

Zeit [min]	Pumpe RAM		Pumpe LC	
	% B (E1)	Fluss [ml/min]	% B (E2)	Fluss [ml/min]
0,00	100	4,0	100	1,0
1,00	0	0,1	100	1,0
3,00	100	2,0	100	1,0
4,00	100	0,5	100	1,0
6,00	100	0,5	100	1,0

Pumpe RAM

- A Acetonitril
B 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v) – Eluent E1

Pumpe LC

- B 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat + 0,1 % Ameisensäure (v/v) – Eluent E2

10.3.2.3 MD-SPE Trimethoprim / Ketamin

Tabelle 24: Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik von Trimethoprim und Ketamin

Zeit [min]	Pumpe RAM		Pumpe MMP		Pumpe LC	
	% B (E1)	Fluss [ml/min]	% B (E2)	Fluss [ml/min]	% B (E3)	Fluss [ml/min]
0,00	100	4,0	100	0,5	100	0,25
0,90	100	4,0	100	3,0	100	0,25
1,00	0	0,1	100	3,0	100	0,25
2,50	0	2,0	0	0,1	100	0,25
3,50	100	2,0	0	2,0	100	0,25
4,50	100	0,5	100	2,0	100	0,25
5,50	100	0,5	100	0,5	100	0,25
6,00	100	0,5	100	0,5	100	0,25

Pumpe RAM

- A Acetonitril
- B 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v) – Eluent E1

Pumpe MMP

- A Acetonitril + 0,4 % Ameisensäure (v/v)
- B 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v) – Eluent E2

Pumpe LC

- B 40/60 Acetonitril/25 mM Ammoniumacetat pH 3 (v/v) – Eluent E3

10.3.2.4 MD-SPE Clenbuterol

Tabelle 25 Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik von Clenbuterol

Zeit [min]	Pumpe RAM		Pumpe MMP		Pumpe LC	
	% B (E1)	Fluss [ml/min]	% B (E2)	Fluss [ml/min]	% B (E3)	Fluss [ml/min]
0,00	100	4,0	100	0,5	100	0,25
0,90	100	4,0	100	4,0	100	0,25
1,00	100	0,5	100	4,0	100	0,25
2,00	100	0,5	100	0,5	100	0,25
8,00	100	0,5	100	0,5	100	0,25

Pumpe RAM

B 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v) – Eluent E1

Pumpe MMP

B 50/50 Acetonitril/2,5 mM Ammoniumacetat pH 6 (v/v) – Eluent E2

Pumpe LC

B 45/55 Acetonitril/50 mM Ammoniumacetat pH 3 (v/v) – Eluent E3

10.3.3 MS/MS-Detektion

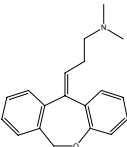
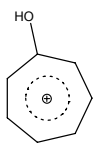
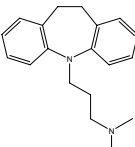
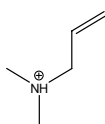
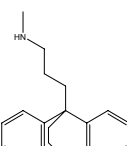
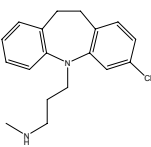
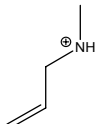
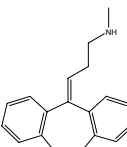
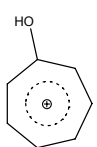
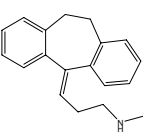
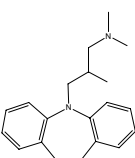
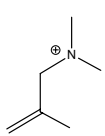
10.3.3.1 Trizyklische Antidepressiva

Tabelle 26: MS-Parameter für die Analyse der TZA

Parameter		Parameter	
Capillary Voltage (kV)	3,2	LM 1	12,3
Cone Voltage (V)	20	HM 1	12,3
Extractor (V)	2	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,2	Entrance	-2
Source Temp. (°C)	130	Collision Energy	25
Desolvation Temp. (°C)	330	Exit	2
Cone Gas (l/h)	25	LM 2	12,0
Desolvation Gas (l/h)	700	HM2	12,0
		Ion Energy 2	3,0
		Multiplier	650

Tabelle 27: Precursor- und Produktionen der trizyklischen Antidepressiva

Analyt	Struktur	Precursor ion	Produkt ion	Fragment	Cone-Spannung	Kollisionsenergie
Amitriptylin (ATL)		278,4	233,4		20	20
Clomipramin (CMP)		315,4	86		25	20
Desipramin (DSP)		267,4	71,9		20	18

Doxepin (DXP)		280,4	107,3		29	22
Imipramin (IMP)		281,4	86		20	20
Maprotilin (MTL)		278,4	250,3	?	20	20
Norclomi- pramin (NCP)		301,4	71,9		20	20
Nordoxepin (NDX)		266,4	107,3		20	20
Nortriptylin (NTL)		264,4	91,2	?	20	20
Trimipramin (TMP)		295,5	100,4		20	20
Amitriptylin- D6 (ATL-D6)	-	284,4	90,1	-	20	20

10.3.3.2 Trimethoprim

Tabelle 28: MS-Parameter für die Analyse von Trimethoprim

Parameter		Parameter	
Capillary Voltage (kV)	3,2	LM 1	12,3
Cone Voltage (V)	35	HM 1	12,3
Extractor (V)	2	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,1	Entrance	-2
Source Temp. (°C)	120	Collision Energy	23
Desolvation Temp. (°C)	330	Exit	2
Cone Gas (l/h)	25	LM 2	12,0
Desolvation Gas (l/h)	700	HM2	12,0
		Ion Energy 2	3,0
		Multiplier	650

10.3.3.3 Ketamin

Tabelle 29: MS-Parameter für die Analyse von Ketamin

Parameter		Parameter	
Capillary Voltage (kV)	3	LM 1	12,3
Cone Voltage (V)	20	HM 1	12,3
Extractor (V)	2	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,2	Entrance	-2
Source Temp. (°C)	120	Collision Energy	25
Desolvation Temp. (°C)	330	Exit	2
Cone Gas (l/h)	25	LM 2	12,0
Desolvation Gas (l/h)	700	HM2	12,0
		Ion Energy 2	3,0
		Multiplier	650

10.3.3.4 Clenbuterol

Tabelle 30: MS-Parameter für die Analyse von Clenbuterol

Parameter		Parameter	
Capillary Voltage (kV)	3,0	LM 1	12,3
Cone Voltage (V)	20	HM 1	12,3
Extractor (V)	2	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,2	Entrance	-2
Source Temp. (°C)	130	Collision Energy	16
Desolvation Temp. (°C)	300	Exit	2
Cone Gas (l/h)	25	LM 2	12,0
Desolvation Gas (l/h)	700	HM2	12,0
		Ion Energy 2	3,0
		Multiplier	650

11 Literaturverzeichnis

1. Geigy. Units of Measurements, Body Fluids, Comparison of the Body, Nutrition. 8 ed. Basel: Ciba-Geigy AG, 1981.
2. Polson C, Sarkar P, Inledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003;**785**:263-275.
3. Evans G. Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism: CRC Press, 2004.
4. Lingeman H, McDowall RD, Brinkman UAT. Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 1991;**10**(22):48-59.
5. Blanchard J. Evaluation of the relative efficiency of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography* 1981;**226**:455-460.
6. Biddlecombe RA, Pleasance S. Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format. *Journal of Chromatography B* 1999;**734**:257-265.
7. McDowall RD. Sample preparation for biomedical analysis. *Journal of Chromatography* 1989;**492**:3-58.
8. Zhang N, Hoffman KL, Li W, Rossi DT. Semi-automated 96-well liquid-liquid extraction for quantitation of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000;**22**:131-138.
9. Zhang H, Heinig K, Henion J. Atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with fast liquid chromatography for quantitation and accurate mass measurement of five pharmaceutical drugs in human plasma. *Journal of Mass Spectrometry* 2000;**35**:423-431.
10. Pistos C, Panderi I, Atta-Politou J. Liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry method for the quantification of citalopram in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2004;**810**:235-244.
11. Nyanda AM, Nunes MG, Ramesh A. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Quantitation of Tricyclic Antidepressant Drugs in Human Plasma or Serum. *Clinical Toxicology* 2000;**38**:631-636.
12. Nielsen KK, Brosen K. High-performance liquid-chromatography of clomipramine and metabolites in human plasma and urine. *Therapeutic Drug Monitoring* 1993;**15**:122-128.
13. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999;**856**:3-54.
14. Pawliszyn J. Sample Preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry* 2003;**75**:2543-2558.
15. Poole CF. New Trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 2003;**22**(6):362-373.
16. Simpson NJK, ed. Solid-Phase Extraction; Principles, Techniques and Applications. New York, Basel: Marcel Dekker, 2000.
17. Majors RE. Trends in Sample Preparation. *LCGC Europe* 2003;**Feb**:2-8.
18. Huber JFK, Hulsman JARJ, Meijers CAM. Quantitative analysis of trace amounts of estrogenic steroids in pregnancy urine by column liquid-liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1971;**62**:79-91.
19. Web of Science 11.01.2006.
20. Zhang YL, Bendrick-Pearl J, Strom T, Haschke M, Christians U. Development and validation of a high-throughput assay for quantification of the proliferation inhibitor

-
- ABT-578 using LC/LC-MS/MS in blood and tissue samples. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005;**27**(6):770-778.
21. Rbeida O, Christiaens B, Hubert P, et al. Integrated on-line sample clean-up using cation exchange restricted access sorbent for the LC determination of atropine in human plasma coupled to UV detection. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 2005;**36**(5):947-954.
 22. Bourgoigne E, Grivet C, Hopfgartner G. Determination of talinolol in human plasma using automated on-line solid phase extraction combined with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal Of Chromatography B- Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences* 2005;**820**(1):103-110.
 23. Kirschbaum KM, Muller MJ, Zernig G, et al. Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection. *Clinical Chemistry* 2005;**51**(9):1718-1721.
 24. Koehler A, Oertel R, Kirch W. Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A* 2005;**1088**(1-2):126-130.
 25. Watabe Y, Hosoya K, Tanaka N, Kondo T, Morita M, Kubo T. LC/MS determination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularly-imprinted polymer as an on-line pretreatment device. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 2005;**381**(6):1193-1198.
 26. Stoob K, Singer HP, Goetz CW, Ruff M, Mueller SR. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry - Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal Of Chromatography A* 2005;**1097**(1-2):138-147.
 27. Galera MM, Martinez DB, Vazquez PP, Garcia MDG. Online trace enrichment to determine pyrethroids in river water by HPLC with column switching and photochemical induced fluorescence detection. *Journal Of Separation Science* 2005;**28**(17):2259-2267.
 28. Boos K-S, Rudolphi A. The Use of Restricted-Access Media in HPLC, Part I - Classification and Review. *LCGC* 1997;**15**:602-611.
 29. Pyrzynska K, Pobozy E. On-line Coupling of Solid Phase Extraction Sample Processing with High-Performance Liquid Chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2002;**32**:227-243.
 30. Desilets CP, Rounds MA, Regnier FE. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1991;**544**:25-39.
 31. Boos K-S, Rudolphi A, Vielhauer S, Walfort A, Lubda D, Eisenbeiß F. Alkyl-Diol Silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1995;**352**:684-690.
 32. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Restricted-access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *Journal of Chromatography B* 2004;**801**:141-156.
 33. Grimm C-H, Boos K-S. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. *Trends in Analytical Chemistry* 1999;**18**:175-180.
 34. Schäfer C, Lubda D. alkyl diol silica: restricted access pre-column packings for fast liquid chromatography-integrated sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A* 2001;**909**:73-78.

-
35. Thurman EM, Mills MS. Solid-Phase Extraction - Principles and Practice. New York: Wiley, 1998.
 36. Walker V, Mills GA. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry* 2002;**39**:464-477.
 37. DFG. Hochleistungs-Massenspektrometer in den Biowissenschaften: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Proteom-Center Bochum, 2003.
 38. Dole M, Cox HL, Gieniec J. Electrospray Mass-Spectrometry. *Advances in Chemistry Series* 1973;**125**:73-84.
 39. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* 1990;**9**:37.
 40. Gross JH. Mass Spectrometry A Textbook. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2004.
 41. Bruins AP. Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry - I. Instrumentation and ionization techniques. *Trends in Analytical Chemistry* 1994;**13**:37-43.
 42. Enke CG. A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes. *Analytical Chemistry* 1997;**69**:4885-4893.
 43. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000;**35**:804-817.
 44. Niessen WMA. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1999;**856**:179-197.
 45. Micromass. Quattro Micro User's Guide, 2001.
 46. Herbert CG, Johnstone RAW. Mass Spectrometry Basics. London, New York: CRC Press, 2003.
 47. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Communications Mass Spectrometry* 1999;**13**:1175-1185.
 48. Annesley TM. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2003;**49**:1041-1044.
 49. McCauley-Myers DL, Eichhold TH, Bailey RE, et al. Rapid bioanalytical determination of dextromethorphan in canine plasma by dilute-and-shoot preparation combined with one minute per sample LC-MS/MS analysis to optimize formulations for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000;**23**:825-835.
 50. Simpson H, Berthemy A, Buhrman D, et al. High Throughput Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Bioanalysis Using 96-Well Disk Solid Phase Extraction Plate for the Sample Preparation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998;**12**:75-82.
 51. Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004;**18**:49-58.
 52. Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2005;**38**:328-334.
 53. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Analytical Chemistry* 1998;**70**:882-889.
 54. Gustavsson SA, Samskog J, Markides KE, Langström B. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Journal of Chromatography A* 2001;**937**:41-47.
 55. Buhrman DL, Price PI, Rudewicz PJ. Quantitation of SR 27417 in Human Plasma Using Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: A Study of Ion

-
- Suppression. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 1996;**7**:1099-1105.
56. Antignaca J-P, Waschb Kd, Monteaua F, Brabanderb HD, Andrea F, Bizeca BL. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta* 2005;**529**:129-136.
 57. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 2000;**11**:942-950.
 58. Cech NB, Enke CG. Practical Implications of some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 2001;**20**:362-387.
 59. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004;**35**:1149-1167.
 60. Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection1. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998;**18**:347-357.
 61. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003;**75**:3019-3030.
 62. Souverain S, Rudaz S, Veuthey J-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A* 2004;**1058**:61-66.
 63. Jemal M, Schuster A, Whigan DB. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003;**17**:1723-1734.
 64. Tiller PR, Romanyshyn LA. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;**16**:92-98.
 65. Pascoe R, Foley JP, Gusev AI. Reduction in Matrix-Related Signal Suppression Effects in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using On-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 2001;**73**:6014-6023.
 66. PALLAS [program]. 3.1.1.2 version: CompuDrug Chemistry Limited, 2004.
 67. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9 ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2005.
 68. Tretter F, Albus M. Einführung in die Psychopharmakotherapie. 1 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2004.
 69. Laux G, Dietmaier O, König W. Pharmakopsychiatrie. 3 ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2000.
 70. Berger M. Psychische Erkrankungen Klinik und Therapie. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2004.
 71. Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, et al. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry. *Pharmacopsychiatry* 2004;**37**:243-265.
 72. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001.
 73. Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shader RI. Trimipramine Kinetics And Absolute Bioavailability - Use Of Gas-Liquid-Chromatography With Nitrogen-Phosphorus Detection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1984;**35**(3):348-353.

-
74. Devane CL, Rudorfer MV, Potter WZ. Dosage Regimen Design For Cyclic Antidepressants - A Review Of Pharmacokinetic Methods. *Psychopharmacology Bulletin* 1991;**27**(4):619-631.
 75. Linder MW, Keck PE. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clinical Chemistry* 1998;**44**(5):1073-1084.
 76. Mann K, Bisdas S, Hiemke C. Therapeutic drug monitoring for antidepressants and length of hospital stay in psychiatric inpatients. *Psychopharmakotherapie* 2005;**12**:134-138.
 77. Hiemke C, Dragicevic A, Fric M, et al. Therapeutic monitoring of antidepressants. *Psychopharmakotherapie* 2003;**10**:11-14.
 78. Vuille F, Amey M, Baumann P. Use of plasma-level monitoring of antidepressants in clinical practice - towards an analysis of clinical utility. *Pharmacopsychiatry* 1991;**24**:190-195.
 79. Muller MJ, Dragicevic A, Fric M, et al. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants: How does it work under clinical conditions? *Pharmacopsychiatry* 2003;**36**:98-104.
 80. Orsulak PJ. Therapeutic Monitoring of Antidepressant Drugs: Guidelines Updated. *Therapeutic Drug Monitoring* 1989;**11**:497-507.
 81. Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs - TDM "Nouveau". *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;**26**:145-151.
 82. Eilers R. Therapeutic drug monitoring for the treatment of psychiatric disorders - Clinical use and cost effectiveness. *Clinical Pharmacokinetics* 1995;**29**:442-450.
 83. Burke MJ, Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants - Cost implications and relevance to clinical practice. *Clinical Pharmacokinetics* 1999;**37**:147-165.
 84. Brosen K. Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Therapeutic Drug Monitoring* 1996;**18**:393-396.
 85. Grasmader K, Verwohlt PL, Rietschel M, et al. Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2004;**60**:329-336.
 86. Eap CB, Sirot EJ, Baumann P. Therapeutic monitoring of antidepressants in the era of pharmacogenetics studies. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;**26**:152-155.
 87. Rao ML, Deister A, Laux G, Staberock U, Hoflich G, Moller HJ. Low serum levels of tricyclic antidepressants in amitriptyline- and doxepin-treated inpatients with depressive syndromes are associated with nonresponse. *Pharmacopsychiatry* 1996;**29**:97-102.
 88. Herrmann B, Pulver R. The metabolism of the psychopharmacological agent Tofranil. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1960;**126**:454-469.
 89. Louter AJH, Vanderwagt RACA, U.A.Th. B. Online Automated sample Preparation - Capillary Gas-Chromatography for the Analysis of Plasma Samples. *Chromatographia* 1995;**40**:500-506.
 90. Ulrich S, Isensee T, Pester U. Simultaneous determination of amitriptyline, nortriptyline and four hydroxylated metabolites in serum by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus-selective detection. *Journal of Chromatography B* 1996;**685**:81-89.
 91. Pommier F, Sioufi A, Godbillon J. Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography B* 1997;**703**:147-158.
 92. Cosby SH, Craig I, Gill R. Novel solid-phase extraction strategy for the isolation of basic drugs from whole-blood - preliminary-study using commercially available extraction cartridges. *Journal of Chromatography B* 1995;**669**:229-235.

-
93. Wilson JM, Williamson LJ, Raisys VA. Simultaneous Measurement of Secondary and Tertiary Tricyclic Antidepressants by GC-MS Chemical Ionization Mass Fragmentography. *Clinical Chemistry* 1977;**23**:1012-1017.
 94. Hackett LP, Dusci LJ, Ilett KF. A comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay for therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Therapeutic Drug Monitoring* 1998;**20**:30-34.
 95. Rao ML, Staberock U, Baumann P, et al. Monitoring Tricyclic Antidepressant Concentrations in Serum by Fluorescence Polarization Immunoassay Compared with Gas-Chromatography and HPLC. *Clinical Chemistry* 1994;**40**:929-933.
 96. Baskin LB, Morgan DL, Parupia JY. A rapid immunoassay for drugs of abuse and tricyclic antidepressants. *Laboratory Medicine* 1996;**27**:193-197.
 97. Kuss HJ, Feistenauer E. Quantitative high-performance liquid chromatographic assay for the determination of maprotiline and oxaprotiline in human plasma. *Journal of Chromatography* 1981;**204**:349-353.
 98. Segatti MP, Nisi G, Grossi F, Mangiarotti M, Lucarelli C. Rapid and simple high-performance liquid-chromatographic determination of tricyclic antidepressants for routine and emergency serum analysis. *Journal of Chromatography* 1991;**536**:319-325.
 99. Gupta RN. An improved solid-phase extraction procedure for the determination of antidepressants in serum by column liquid-chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 1993;**16**:2751-2765.
 100. Tanaka E, Terada M, Nakamura T, Misawa S, Wakasugi C. Forensic analysis of eleven cyclic antidepressants in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column of 2 μ m porous microspherical silica gel. *Journal of Chromatography B* 1997;**692**:405-412.
 101. Theurillat R, Thormann W. Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998;**18**:751-760.
 102. Olesen OV, Plougmann P, Linnet K. Determination of nortriptyline in human serum by fully automated solid-phase extraction and on-line high-performance liquid chromatography in the presence of antipsychotic drugs. *Journal of Chromatography B* 2000;**746**:233-239.
 103. Hartter S, Weigmann H, Hiemke c. Automated determination of reboxetine by high-performance liquid chromatography with column-switching and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 2000;**740**:135-140.
 104. Frahnert C, Rao ML, Grasmader K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B* 2003;**794**:35-47.
 105. Balikova M. Selective system of identification and determination of antidepressants and neuroleptics in serum or plasma by solid-phase extraction followed by high-performance liquid-chromatography with photodiode-array detection in analytical toxicology. *Journal of Chromatography B* 1992;**581**:75-81.
 106. Aymard G, Livi P, Pham YT, Diquet B. Sensitive and rapid, method for the simultaneous quantification of five antidepressants with their respective metabolites in plasma using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography B* 1997;**700**:183-189.
 107. Ivandini TA, Sarada BV, Terashima C, et al. Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2002;**521**:117-126.

-
108. Ishida J, Horike N, Yamaguchi M. Determination of maprotiline in plasma by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography B* 1995;**669**:390-396.
 109. Heinig K, Henion J. Fast liquid chromatographic-mass spectrometric determination of pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography B* 1999;**732**:445-458.
 110. Needham SR, Brown PR. The high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis of diverse basic pharmaceuticals on cyanopropyl and pentafluorophenylpropyl stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000;**23**:597-605.
 111. Badenhorst D, Sutherland FCW, deJager AD, et al. Determination of doxepin and desmethyldoxepin in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2000;**742**:91-98.
 112. Gutteck U, Rentsch KM. Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003;**41**:1571-1579.
 113. Kollroser M, Schober C. An on-line solid-phase extraction - Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry method for the analysis of citalopram, fluvoxamine, and paroxetine in human plasma. *Chromatographia* 2003;**57**:133-138.
 114. Sauvage FL, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P. Therapeutic Drug Monitoring of Antidepressants in Human Serum Using a Fully Automated Turbulent-Flow - Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Technique. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005;**27**:224.
 115. Cheng YF, Philips DJ, Neue U, Bean L. Solid-phase extraction for the determination of tricyclic antidepressants in serum using a novel polymeric extraction sorbent. *Journal of Liquid Chromatography & Related Techniques* 1997;**20**:2461-2473.
 116. Liu JL, Stewart JT. Quantitation of trimipramine enantiomers in human serum by enantioselective high-performance liquid chromatography and mixed-mode disc solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* 1997;**700**:175-182.
 117. Sachse J, Hartter S, Hiemke C. Automated determination of ziprasidone by HPLC with column switching and spectrophotometric detection. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005;**27**:158-162.
 118. Lee HM, Jeong CK, Choi SJ, et al. Direct analysis of clomipramine in human plasma by microbore high performance liquid chromatography with column switching. *Chromatographia* 2000;**51**:353-356.
 119. Hartter S, Hermes B, Hiemke C. Automated determination of trimipramine and n-desmethyltrimipramine in human plasma or serum by HPLC with online solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography* 1995;**18**:3495-3505.
 120. Majors RE. Multidimensional and Comprehensive Liquid Chromatography. *LCGC North America* 2005;**23**:74-75.
 121. Giddings JC. Concepts and comparisons in multidimensional separation. *Journal of High Resolution Chromatography* 1987;**10**:319-323.
 122. Schoenmakers PJ, Marriott P, Beens J. Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography. *LCGC Europe* 2003;**16**:335-339.
 123. Bertsch W. Two-Dimensional Gas Chromatography, Concepts, Instrumentation, and Applications - Part 1: Fundamentals, Conventional Two-Dimensional Gas Chromatography, Selected Applications. *Journal of High Resolution Chromatography* 1999;**22**:647-665.
 124. Horst Avd, Schoenmakers PJ. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers. *Journal of Chromatography A* 2003;**1000**:693-709.

-
125. Boos K-S, Fleischer CT. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2001;**371**:16-20.
 126. Koch HM, Gonzales-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B* 2003;**784**:169-182.
 127. Sagar KA, Smyth MR. A comparative bioavailability study of different aspirin formulations using on-line multidimensional chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999;**21**:383-392.
 128. Kromidas S. HPLC-Tipps Band 2. Darmstadt: Hoppenstedt Bonnier Zeitschriften GmbH, 2003.
 129. Abian J, Oosterkamp AJ, Gelpi E. Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations. *Journal of Mass Spectrometry* 1999;**34**:244.
 130. Atkins PW. *Physikalische Chemie*. Weinheim, New York, Basel: VCH, 1996.
 131. Shen JX, Motyka RJ, Roach JP, Hayes RN. Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005;**37**:359-367.
 132. Ahnoff M, Wurzer A, Lindmark B, Jussila R. Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2003, Montreal, Canada.
 133. Liebisch G, Drobnik W, Lieser B, Schmitz G. High-Throughput Quantification of Lysophosphatidylcholine by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2002;**48**:2217-2224.
 134. Pulfer M, Murphy RC. Electrospray Mass Spectrometry of Phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* 2003;**22**:332-364.
 135. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* 2003;**987**:57-66.
 136. Swartz M, Krull I. Validation of bioanalytical methods - highlights of FDA's guidance. *LCGC North America* 2003;**21**(2):136.
 137. FDA. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation: Food and Drug Administration, CDER, CVM, 2001.
 138. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12th ed: Merck & Co Inc., 1996.
 139. MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, et al. Actions of ketamine, phenylcyclidine, and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *Journal of Physiology* 1991;**432**:483-508.
 140. Mit freundlicher Genehmigung. Prof. Dr. K. K. Unger; Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie Universität Mainz
-

12 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung von humanem Plasma (nach Geigy Scientific Tables ¹).....	12
Abbildung 2: Zusammensetzung von humanem Urin (nach Geigy Scientific Tables ¹)	15
Abbildung 3: Unterteilung der Restricted Access Materialien (nach Boos ³³)	23
Abbildung 4: Topochemie des LiChrospher [®] ADS Materials ³³	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Elektrospray Quelle	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer APCI-Quelle	29
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol Massenspektrometers ⁴⁵	30
Abbildung 8: Modi Operandi in der Tandem-Massenspektrometrie	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Nachsäulen-Infusion zur Bestimmung von Matrixeffekten	35
Abbildung 10: Instrumenteller Aufbau der MD-SPE Plattform. 1 – Probengeber, 2 - RAM SPE-Säule, 3 - MMP SPE-Säule, 4 - Analytische Trennsäule, 5 - Schaltventil (1), 6 - Schaltventil (2), 7 – Abfall, 8 - Detektor.....	46
Abbildung 11: Probenaufgabe und Fraktionierung auf der 1. SPE-Säule (RAM) - ■ Analyte; ▲ Makromolekulare Matrixbestandteile; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile	48
Abbildung 12: Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Säule (MMP) - ■ Analyte; ▲ Makromolekulare Matrixbestandteile; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile	49
Abbildung 13: Fraktionierung auf der 2. SPE-Säule (MMP) und Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule- ■ Analyte; ● Niedermolekulare Matrixbestandteile	50
Abbildung 14: Schematische Darstellung des vollständigen MD-SPE Verfahrens.....	51
Abbildung 15: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{A,RAM}$ und $t_{M,RAM}$	53
Abbildung 16: Chromatogramme (schematisch) für die Bestimmung von t_A (A) und t_M (B).	54
Abbildung 17: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{T,RAM}$	54
Abbildung 18: Chromatogramm (schematisch) für die Bestimmung von t_T	55
Abbildung 19: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{A,MMP}$	55
Abbildung 20: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{M,MMP}$. A – RAM SPE-Säule, B – MMP – SPE-Säule.....	56
Abbildung 21: Instrumenteller Aufbau für die Bestimmung von $t_{T,MMP}$	57
Abbildung 22: Analysenzyklus der MD-SPE-LC Plattform.....	59
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Elution einer SPE-Säule und des Einflusses auf die Peakverbreiterung bei A – Beibehalten der Flussrichtung und B – Umkehrung der Flussrichtung	65
Abbildung 24: Schematische Darstellung einer Kalibrationskurve bei der Verwendung von Narrow-bore Trennsäulen	67
Abbildung 25: Chromatogramm der analytischen Trennung der trizyklischen Antidepressiva. 1 Nordoxepin (NDX), 2 Doxepin (DXP), 3 Desipramin (DSP), 4 Imipramin (IMP), 5 Nortriptylin (NTL), 6 Maprotilin (MTL), 7 Amitriptylin (ATL), 8 Trimipramin (TMP), 9 Norclomipramin (NCP) und 10 Clomipramin (CMP). Injektionsvolumen 20 μ l. Konzentration je Analyt 100 ng/ml.....	69
Abbildung 26: MS-Spektrum und Produktions-Spektrum des Desipramins (267,4 m/z) und strukturelle Zuordnung der gebildeten Fragmentationen.....	70
Abbildung 27: Produktions-Spektren des Precursorions 278 m/z von A - Amitriptylin und B - Maprotilin	72

Abbildung 28: Elutionszeiten ($t_{M, RAM}$) der makromolekularen Probenmatrix in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen bei 4 ml/min Flussgeschwindigkeit der Eluenten. A – LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm; B – LiChrospher ADS RP4, 5 x 4 mm	75
Abbildung 29: Elutionsprofil der makromolekularen Probenmatrix. 100 µl Plasma, 4 ml/min, 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v), $\lambda = 280$ nm, LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm	75
Abbildung 30: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; LiChrospher [®] ADS RP4, 20 x 2 mm; 4 ml/min, 95/5 Wasser/Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration 10 µg/ml pro Analyt; $\lambda = 220$ nm	76
Abbildung 31: Elutionszeiten einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva von der RAM SPE-Säule in Abhängigkeit von der Flussrate des Eluenten E2; ● - LiChrospher ADS RP4, 5 x 4 mm; ● - LiChrospher ADS RP4, 20 x 2 mm ..	78
Abbildung 32: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. SPE-Säule LiChrospher [®] ADS RP4 (20 x 2 mm); Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration 1 µg/ml; Eluent E2 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Flussrate 3 ml/min; $\lambda = 220$ nm	79
Abbildung 33: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; SPE-Säule: Oasis WCX, 20 x 2,1 mm; 4 ml/min 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration 1 µg/ml pro Analyt; $\lambda = 220$ nm.....	80
Abbildung 34: Elution der niedermolekularen Probenmatrix in Abhängigkeit von der Flussrate des Eluenten. A – 100 µl Plasma; B – 100 µl Urin; ■ - WCX 20 x 1 mm; ■ - WCX 20 x 2,1 mm; ■ - Strata X-CW 20 x 1 mm; ■ - Strata X-CW 20 x 2 mm; ■ - XDS COOH 20 x 4 mm; ■ - ohne MMP SPE-Säule.....	82
Abbildung 35: Abtrennung der niedermolekularen Probenmatrix: A – 20 µl Plasma, B – 20 µl Urin; Flussrate 3 ml/min; Eluent E2 80/20 Methanol/2 mM Ammoniumacetat (v/v); Oasis WCX SPE-Säule, 20 x 2,1 mm; $\lambda = 220$ nm.....	83
Abbildung 36: Transferzeiten der trizyklischen Antidepressiva von den MMP SPE-Säulen in Abhängigkeit vom Ammoniumacetatgehalt des Eluenten E3. ■ - 5 mM, ■ - 25 mM, ■ - 50 mM, ■ - 100 mM Ammoniumacetat.....	84
Abbildung 37: Elutionsprofil einer Standardlösung der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. Injektionsvolumen 100 µl; Konzentration jeweils 1 µg/ml; SPE-Säule Oasis WCX, 20 x 2,1 mm; Eluent 40/60 Acetonitril/25 mM Ammoniumacetat pH 3 (v/v) 1 ml/min; $\lambda = 220$ nm.....	85
Abbildung 38: MD-SPE-LC-MS/MS Analytik der untersuchten trizyklischen Antidepressiva; MMP Oasis WCX SPE-Säule, 20 x 2,1 mm; Injektionsvolumen 20 µl; Konzentration 25 ng/ml Plasma; Detektion MS/MS MRM-Modus, dargestellt ist das Total Ionen Chromatogramm (TIC);	89
Abbildung 39: Instrumenteller Aufbau der RAM SPE-LC Kopplung für die Analyse trizyklischer Antidepressiva	91
Abbildung 40: RAM SPE-LC-UV Analyse von 100 µl bidestilliertem Wasser (1), nativem Plasma (2), nativem Urin (3) sowie von bidestilliertem Wasser (4), Plasma (5) und Urin (6), die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden; $\lambda = 220$ nm.....	93
Abbildung 41: RAM SPE-LC-DAD Analyse von 100 µl bidestilliertem Wasser (A), nativem Plasma (B) und nativem Urin (C)	94
Abbildung 42: MD-SPE-LC-UV Analyse von 100 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin und Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma und (6) Urin, $\lambda = 220$ nm.....	95
Abbildung 43: MD-SPE-LC-DAD Analyse von 100 µl Proben. (A) bidestilliertes Wasser, (B) natives Plasma und (C) nativer Urin	96

Abbildung 44: RAM SPE-LC-MS Analyse von 20 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin sowie Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma und (6) Urin, MS-Scan 100 – 1000 m/z.....	97
Abbildung 45: Mittlere MS-Spektren der RAM SPE-LC-MS Analyse von jeweils 20 µl nativem (rot) und dotiertem (türkis) Plasma (A) und nativem (grün) sowie dotiertem (rosa) Urin (B) im Elutionsbereich von 1,9 – 3 min.	98
Abbildung 46: MD-SPE-LC-MS Analyse von 20 µl Proben. (1) bidestilliertes Wasser, (2) natives Plasma, (3) nativer Urin und Proben die mit 1 µg/ml je TZA dotiert wurden. (4) bidestilliertes Wasser, (5) Plasma sowie (6) Urin, MS-Scan 100 – 1000 m/z.....	98
Abbildung 47: Mittlere MS-Spektren der MD-SPE-LC-MS Analyse von jeweils 20 µl nativem (rot) und dotiertem (türkis) Plasma (A) und nativem (grün) sowie dotiertem (rosa) Urin (B) im Elutionsbereich von 3,7 - 6 min.	99
Abbildung 48: RAM SPE-LC-MS Analyse von nativem Plasma (A) und Urin (B). rot - 20 µl, grün 100 µl; MS-Scan 100 – 1000 m/z.....	100
Abbildung 49: MD-SPE-LC-MS Analyse von nativem Plasma (A) und Urin (B). rot - 20 µl, grün 100 µl; MS-Scan 100 – 1000 m/z.....	101
Abbildung 50: Abhängigkeit der Ionisation eines Analyten vom pH-Wert des Eluenten.	102
Abbildung 51: Darstellung der Wiederfindungsrate der trizyklischen Antidepressiva bei pH 8,6 in Abhängigkeit von dem Anteil an ionisiertem Analyt bei diesem pH-Wert. ■ - ATL, ■ - CMP, ■ - DSP, ■ - DXP, ■ - IMP, ■ - MTL, ■ - NCP, ■ - NDX, ■ - NTL, ■ - TMP	104
Abbildung 52: Einfluss der MMP-Materialien auf die Selektivität. Analyse von dotiertem Human Plasma (20 µl) mit der MD-SPE Plattform. 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm. MRM Chromatogramme der trizyklischen Antidepressiva (50 ng/ml je Analyt);.....	105
Abbildung 53: Einfluss der MMP-Materialien auf die Selektivität. MS-Scans von nativem Human Plasma (m/z 100 – 1000) nach Analyse mit der MD-SPE Plattform. 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm; Injektionsvolumen 20 µl.	106
Abbildung 54: Instrumenteller Aufbau der Nachsäulen-Infusionsexperimente für die MD-SPE Plattform (A) und die konventionelle RAM SPE-LC Kopplung (B).....	108
Abbildung 55: Infusionschromatogramme von: ■ - bidestilliertem Wasser, ■ - Plasma und ■ - Urin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. ■ - Chromatogramm einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung.....	109
Abbildung 56: Infusionschromatogramme von: ■ - bidestilliertem Wasser, ■ - Plasma und ■ - Urin nach der Analyse mit der MD-SPE Plattform. ■ - Chromatogramm einer Standardlösung der trizyklischen Antidepressiva nach Analyse mit der MD-SPE Plattform.....	110
Abbildung 57: Einfluss von Matrixbestandteilen interindividueller Proben auf die Ionisation der Analyte. Infusionschromatogramme von Plasma und Urin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. A - Überlagerung von 11 Plasmaproben verschiedener Patienten. B – Überlagerung von 6 Urinproben verschiedener Patienten. Injektionsvolumen je 20 µl.....	111
Abbildung 58: Einfluss von Matrixbestandteilen interindividueller Proben auf die Ionisation der Zielanalyte. Infusionschromatogramme nach der Analyse von Plasma und Urin mit der MD-SPE Plattform. A - Überlagerung von 11 Plasmaproben verschiedener Patienten. B – Überlagerung von 6 Urinproben verschiedener Patienten. Injektionsvolumen je 20 µl.	112
Abbildung 59: Einfluss von Matrixbestandteilen intraindividuelle Proben auf die Ionisation der Analyte. Infusionschromatogramme von 4 verschiedenen Plasmaproben einer	

Probandin nach der Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung (A) und der MD-SPE Plattform (B). ■ - nüchtern 9:30 Uhr; ■ - postprandial 11:00 Uhr; ■ - 13:00 Uhr; ■ - 16:00 Uhr. Injektionsvolumen je 20 µl.	114
Abbildung 60: Einfluss von Matrixbestandteilen unterschiedlicher Spezies auf die Ionisation von Modellanalyten. Infusionschromatogramme: A – nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung und B – mit der MD-SPE Plattform. Injektion von je 20 µl: ■ - Plasma Human; ■ - Urin Human; ■ - Serum Rind; ■ - Urin Rind; ■ - Serum Geflügel; ■ - Serum Schwein; ■ - Urin Schwein.	115
Abbildung 61: Einfluss der verwendeten MMP SPE-Säule auf die Ionisation. Analyse von Human Plasma (20 µl) mit der MD-SPE Plattform. Infusionschromatogramme: 1 – Oasis WCX 20 x 1 mm, 2 – Oasis WCX 20 x 2,1 mm, 3 – Strata X-CW 20 x 1 mm, 4 – Strata X-CW 20 x 2 mm, 5 – LiChrospher XDS 20 x 4 mm.	116
Abbildung 62: Grundgerüst der Phosphatidylcholine und der Lyso-Phosphatidylcholine. R1 und R2 bestehen bei Phosphatidylcholinen beide aus Fettsäureestern, während R2 bei Lyso-Phosphatidylcholinen aus einer Hydroxygruppe besteht. Charakteristische Fragmente m/z 104 und m/z 184.	118
Abbildung 63: Einfluss der Phospholipide auf die Ionisation. A – Infusionschromatogramm einer Plasmaprobe (20 µl) nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung. B – Chromatogramm der Phospholipide einer Plasmaprobe (20 µl) nach Analyse mit der RAM SPE-LC Kopplung, Presursorionen-Scan von m/z 184.	119
Abbildung 64: Methodenvergleich der MD-SPE Plattform mit der Routineanalytik für die Bestimmung von trizyklischen Antidepressiva in Serum. ■ - Amitriptylin, ■ - Doxepin, ■ - Maprotilin, ■ - Nordoxepin, ■ - Nortriptylin, ■ - Trimipramin.	130
Abbildung 65: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma. Konzentration 85 ng/ml. ■ - MRM-Übergang 291,4 > 123,3 m/z Quantifier; ■ - MRM-Übergang 291,4 > 230,3 m/z Qualifier. Injektionsvolumen 20µl.	133
Abbildung 66: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Trimethoprim in humanem Plasma. Konzentration 85 ng/ml. ■ - Analyse mit Eluent E2 (TIC); ■ - Analyse mit Eluent E2 pH 8,6 (TIC); ■ - Analyse mit Eluent E2 pH 8,6 (MRM-Übergang 291,4 > 230,3, Qualifier)....	134
Abbildung 67: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Ketamin in humanem Plasma; Konzentration 68 ng/ml; Injektionsvolumen 20 µl; ■ - MRM-Übergang 238,3 > 125,3 m/z, ■ - MRM-Übergang 238,3 > 162,9 m/z.	135
Abbildung 68: MD-SPE-LC-MS/MS Analyse von Clenbuterol in humanem Urin; Konzentration 500 ng/ml; Injektionsvolumen 20 µl; MRM-Übergang 277,3 > 203 m/z.	138
Abbildung 69: Berechnung der Tailingfaktoren TF.	147

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der on-line SPE.....	21
Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten MMP Materialien.....	26
Tabelle 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften der trizyklischen Antidepressiva ⁶⁶	36
Tabelle 4: Pharmakokinetische Daten der TZA ⁷²⁻⁷⁵	40
Tabelle 5: Empfohlene therapeutische Bereiche für das Monitoring der trizyklischen Antidepressiva in Plasma/Serum ⁷¹	41
Tabelle 6: Säulendimensionen und lineare Flussgeschwindigkeiten.....	61
Tabelle 7: Übersicht über die ermittelten Massenübergänge, deren Cone-Spannung und Kollisionsenergie.....	71
Tabelle 8: Crosstalk zwischen den Massenübergängen.....	72
Tabelle 9: Durchbruchzeiten und –volumina der untersuchten trizyklischen Antidepressiva auf verschiedenen MMP SPE-Säulen.....	81
Tabelle 10: Transferzeiten $t_{T,MMP}$	85
Tabelle 11: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Analytik trizyklischer Antidepressiva in biologischen Flüssigkeiten. Ventilposition 6-1 = Beladen; Ventilposition 1-2 = Transfer.....	88
Tabelle 12: Analysenzyklus der RAM-LC Kopplung für die Bestimmung der trizyklischen Antidepressiva.....	92
Tabelle 13: Zusammenstellung der pKa-Werte der untersuchten trizyklischen Antidepressiva, der Wiederfindungsraten bei pH 8,6 und des Anteils an ionisiertem Analyt bei pH 8,6103	
Tabelle 14: Wiederfindungsraten (WFR) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva für die ausgewählten MMP SPE-Säulen. n = 6.....	123
Tabelle 15: Richtigkeit und Präzision der MD-SPE Plattform für die Analyse der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.....	124
Tabelle 16: Kalibrationsbereich, Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten der MD-SPE Plattform für die untersuchten trizyklischen Antidepressiva.....	127
Tabelle 17: Nachweis- (LOD) und untere Bestimmungsgrenzen (LLOQ).....	127
Tabelle 18: Übereinstimmung der durch die MD-SPE ermittelten Konzentrationen mit den bekannten Konzentrationen aus der Routineanalytik.....	129
Tabelle 19: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Trimethoprim, Ketamin und Clenbuterol ^{66,138,139}	131
Tabelle 20: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Bestimmung von Trimethoprim	132
Tabelle 21: Analysenzyklus für die MD-SPE-LC-MS/MS Bestimmung von Clenbuterol ...	137
Tabelle 22: Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik der TZA.....	147
Tabelle 23: Bedingungen der Säulenschaltung für die RAM SPE-LC Analytik der TZA	148
Tabelle 24: Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik von Trimethoprim und Ketamin.....	149
Tabelle 25 Bedingungen der Säulenschaltung für die MD-SPE Analytik von Clenbuterol ..	150
Tabelle 26: MS-Parameter für die Analyse der TZA.....	151
Tabelle 27: Precursor- und Produktionen der trizyklischen Antidepressiva.....	151
Tabelle 28: MS-Parameter für die Analyse von Trimethoprim.....	153
Tabelle 29: MS-Parameter für die Analyse von Ketamin.....	153
Tabelle 30: MS-Parameter für die Analyse von Clenbuterol.....	154

13 Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit

- 1 K. Georgi, K.-S. Boos
“Control of matrix effects in bioanalytical MS/MS using on-line multidimensional solid-phase extraction”
LC GC Europe 17 (11A): 21-24 (2004)
- 2 K. Georgi, K.-S. Boos
“Towards a Highly-Selective Clean-up of Biofluids by means of multidimensional Solid-Phase Extraction (MD-SPE)”
Doktorandentagung des Arbeitskreises Separation Science der GDCh, Kloster Banz, 2004
Vortrag
- 3 K. Georgi, K.-S. Boos
“Towards a Highly-Selective Analysis of Drugs in Biofluids by means of Multidimensional Solid-Phase Extraction (MD-SPE) coupled to LC-MS/MS”
52nd ASMS Conference, Nashville, USA, 2004
Posterpräsentation
- 4 K. Georgi, K.-S. Boos
“Control of matrix effects in bioanalytical MS by means of on-line multidimensional SPE”
6th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), Leipzig, 2004
Vortrag
- 5 K. Georgi, K.-S. Boos
“Towards a Highly-Selective Analysis of Drugs in Biofluids by means of Multidimensional Solid-Phase Extraction (MD-SPE) coupled to LC-MS/MS”,
21st LC/MS Montreux Symposium, Montreux, Schweiz, 2004
Vortrag
- 6 K. Georgi, K.-S. Boos
“Control of matrix effects in bioanalytical MS/MS using on-line multidimensional solid-phase extraction”
LC GC NORTH AMERICA 23 (4):396-399 (2005)
- 7 K. Georgi, K.-S. Boos
„Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS“,
ANAKON 2005, Regensburg
Posterpräsentation, prämiert mit dem 1. Preis für Poster
- 8 K. Georgi, K.-S. Boos
“Control of matrix effects in bioanalytical MS by means of on-line multidimensional SPE”

25th International Symposium on Chromatography (ISC 2005), Paris, Frankreich, 2005
Posterpräsentation

- 9 K. Georgi, K.-S. Boos
„Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS“
2. Tübinger Massenspektrometrie-Seminar, Tübingen, 2005
Vortrag
- 10 K. Georgi, K.-S. Boos
“Multidimensional solid-phase extraction (MD-SPE) for the direct and highly-selective analysis of basic drugs in biological fluids by means of LC-MS/MS”
HPLC 2005, Stockholm, Schweden, 2005
Posterpräsentation
- 11 K. Georgi, K.-S. Boos
„On-line Multidimensional SPE for LC-MS/MS Analysis of Basic Drugs in Biofluids“
Chromatographia 63 (No. 11/12): 523-531 (2006)
-

14 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -ort

Katrin Georgi

11.03.1979 in Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Anschrift

Lantfridstraße 46

82275 Emmering

Ausbildung

Seit 08/2002

Doktorandin am Institut für Klinische Chemie,
Laboratorium für BioSeparation, Universitätsklinikum
Großhadern, LMU München
Betreuer: Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

05/2002

Diplom in Chemie

Prädikat: sehr gut (1,3)

Betreuer: Prof. Dr. Werner Engewald

„Untersuchungen zum Einfluss der Matrix bei der SPE
von Antibiotika aus Wässern“

10/1999 – 05/2002

Hauptstudium Chemie an der Universität Leipzig
Schwerpunkt Analytische Chemie

08/1999

Vordiplom in Chemie

10/1997 – 09/1999

Grundstudium Chemie an der Technischen Universität
Chemnitz

06/1997

Abitur

Praktika

08/2000 – 09/2000

Praktikum bei der BASF AG, Ludwigshafen

03/1999 – 04/1999

Praktikum bei der Landesuntersuchungsanstalt für das
Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Chemnitz