

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

**Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte
Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben
im Rahmen der LC-MS/MS-Analyse von Arzneistoffen**

Dissertation

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

vorgelegt von Apothekerin

Jelena Milojković

aus

Hanau

Jahr

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm
Prof. Dr. Peter Conzen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Rosa Morello

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juli 2009

Meinen Eltern

„Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen“

(Hermann Hesse)

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos für das sehr interessante und innovative Thema, die herzliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, seine engagierte Betreuung und stete Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Die kritischen Diskussionen mit ihm haben mir alternative Perspektiven aufgezeigt, neue Erkenntnisse generiert und mich im Beschreiten kreativer Forschungsansätze bestärkt. Seine vielseitigen Herausforderungen haben mich in meiner wissenschaftlichen und persönlichen Entwicklung gefordert und gefördert. Mit seiner Arbeits- und Denkweise war Herr Professor Boos stets ein Vorbild, das meine wissenschaftliche Arbeitsweise dauerhaft geprägt hat. Die Tatsache, in einem optimal eingerichteten Labor zu arbeiten, ermöglichte es mir, mich intensiv meiner Forschungsarbeit zu widmen. Aufgrund seines entgegengebrachten Vertrauens war es mir möglich, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Fachtagungen zu präsentieren und zur Diskussion zu stellen. Trotz des in Forschungseinrichtungen permanenten Zeitdrucks herrschte in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Boos stets ein Arbeitsklima, das die Lust am Forschen unterstützt hat und den Spaß an und bei der Arbeit nie vergaß.

Frau Dr. Rosa Morello danke ich für die konsequente Leitung und ihr stetes Interesse am Fortschritt dieses Forschungsprojektes. Ihr unermüdliches Engagement für die Forschungsgruppe auf nationalen und internationalen Tagungen und in ihren Gesprächen mit den Kooperationspartnern haben die Finanzierung des Projektes gesichert, das Ansehen der Arbeit gesteigert und die Grundlagen der hervorragenden Arbeitsbedingungen geschaffen. Darüberhinaus danke ich ihr für die Anregungen zur inhaltlichen Gestaltung meiner Arbeit.

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

Weiterhin geht mein Dank an Herrn Rob Castien und Herrn Rob van der Knaap von der Firma Spark Holland B.V. (Emmen, NL) sowie deren Mitarbeitern Otto Halmingh, Bert Ohms, Dr. Emile Kostner, Peter Ringeling, Michel Koch, German Gijlers und Edwin Göetz für die hervorragende Kooperation, das stete Interesse an dieser Arbeit, die fachlichen Diskussionen und die schnellen Problemlösungen über das Telefon oder vor Ort.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes (E!4112) möchte ich mich bei EUREKA bedanken.

Herrn Privat-Dozent Dr. med. Michael Vogeser und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit in unserem Institut.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Zusammenarbeit, die vielen freiwilligen Blutspenden und insbesondere für die organisatorische Unterstützung dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner lieben Kollegin und Co-Doktorandin Frau Irayani Berger für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielfältigen Diskussionen und die gemeinsame Zeit „extra muros“ bedanken.

Frau Melita Fleischmann danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und für die organisatorische Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den „erlebten“ Mitarbeitern des Arbeitskreises Frau Maria Mezger, Frau Dr. Katrin Georgi, Herrn Bas Teunissen, Frau Giuly Bringiotti, Frau Professor Dr. Dong-Ying Chen, Herrn Dr. Xianzhe Shi, Frau Dr. Veronika Eder und Herrn Dr. Stefan Bengsch für das entgegengebrachte Vertrauen und die zusammen verbrachte Zeit danken.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, meine Schwester und Erik. Sie haben mich während dieser Arbeit begleitet und mich in den schönen Phasen aber auch während der Momente des Zweifels stets unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG.....	15
1.1 Problemstellung.....	15
1.2 Ziel der Arbeit.....	19
2 AUFBEREITUNG BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN FÜR DIE LC-MS/MS-ANALYSE.....	23
2.1 Biologische Flüssigkeiten.....	23
2.1.1 Blut, Plasma und Serum.....	23
2.1.2 Anforderungen an die Probenaufbereitung.....	29
2.2 Verfahren für die Probenaufbereitung.....	31
2.2.1 Proteinpräzipitation (PP).....	31
2.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	33
2.2.3 Membranfiltration (MF) und Dialyse (D).....	35
2.2.4 Getrocknete Blutflecken (DBS).....	36
2.2.5 Hämolyse.....	38
2.2.6 Größenausschlusschromatographie (SEC).....	39
2.2.7 Hitzeschockbehandlung.....	40
2.2.8 Festphasenextraktion.....	41
2.3 Automation der Festphasenextraktion.....	42
2.3.1 Manuelle Festphasenextraktion (off-line SPE).....	44
2.3.2 Einsatz von Robotern (at-line SPE).....	45
2.3.3 Apparative Integration (on-line SPE).....	46
2.4 Maßgeschneiderte SPE-Materialien / Restricted Access Material (RAM).....	51
2.4.1 Definition.....	51
2.4.2 Eigenschaften der RA-Materialien.....	52

3	MASSENSPEKTROMETRIE IN DER BIOANALYTIK (MS/MS)	57
3.1	Ionisationstechniken	58
3.1.1	<i>Elektrospray Ionisation (ESI)</i>	59
3.1.2	<i>Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)</i>	61
3.2	Tandem-Massenspektrometrie.....	62
3.2.1	<i>Aufbau</i>	62
3.2.2	<i>Modi operandi</i>	64
3.3	Matrixeffekte	66
3.3.1	<i>Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte</i>	68
3.3.2	<i>Bestimmung der Matrixeffekte</i>	69
3.3.3	<i>Lösungsansätze</i>	71
4	IMMUNSUPPRESSIVA	73
4.1	Strukturformeln	74
4.2	Pharmakodynamik	77
4.2.1	<i>Wirkmechanismus</i>	77
4.2.1.1	Calcineurin-Inhibitor	77
4.2.1.2	mTOR-Inhibitor.....	79
4.2.2	<i>Anwendung und Dosierung</i>	81
4.2.3	<i>Nebenwirkungen</i>	82
4.2.4	<i>Interaktionen</i>	84
4.3	Pharmakokinetik.....	87
4.3.1	<i>LADME-Modell</i>	87
4.3.2	<i>Pharmakokinetische Daten</i>	88
4.4	Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	92
4.4.1	<i>Indikation für TDM</i>	96
4.4.2	<i>Analytik der Immunsuppressiva</i>	97
5	CDB: NEUE BIOLOGISCHE MATRIX	101
5.1	Definition.....	101
5.2	Charakterisierung	102

5.2.1	<i>Methoden zur Bestimmung der Effizienz der Hitzeschockbehandlung (HST)</i>	102
5.2.1.1	Mikroskop	103
5.2.1.2	Photometer.....	104
5.2.2	<i>Prozessparameter: t_G, t_{max}, t_{min}, t_{heat} und $t_{applied}$</i>	105
5.2.3	<i>Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Prozessparameter</i>	107
5.3	Bestimmung der Prozessparameter im Vollblut verschiedener Spezies.....	112
5.4	Einfluss des Hämatokrit-Wertes auf die Prozessparameter.....	115
5.5	Einfluss verschiedener Infusionslösungen auf die Prozessparameter	123
5.6	Einfluss von humanem AB-Plasma und verschiedener organischer Lösemittel auf die Prozessparameter	125
5.6.1	<i>Zugabe von humanem AB-Plasma (AB-HP)</i>	125
5.6.2	<i>Zugabe von Methanol</i>	129
5.6.3	<i>Zugabe von Acetonitril</i>	134
5.6.4	<i>Zugabe von Ethanol</i>	139
5.6.5	<i>Zugabe von Dimethylsulfoxid</i>	141
5.6.6	<i>Zusammenfassung: Zugabe von verschiedenen organischen Lösemitteln</i>	145
5.7	Desintegration von Leukozyten.....	149
5.7.1	<i>Quantitative mikroskopische Bestimmung der Desintegration von Leukozyten</i>	151
5.7.2	<i>Effizienz der Hitzeschockbehandlung (HST) von Leukozyten</i>	152
5.8	Desintegration von Thrombozyten	154
5.8.1	<i>Quantitative mikroskopische Bestimmung der Desintegration von Thrombozyten</i>	155
5.8.2	<i>Effizienz der Hitzeschockbehandlung von Thrombozyten</i>	157
5.8.2.1	Untersuchung verschiedener organischer Lösemittel bei unterschiedlichen Prozessierungstemperaturen	158
5.8.2.2	Einfluss einer Vorinkubation auf die Desintegration von Thrombozyten.....	159
5.9	Zusammenfassung: Desintegration von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten	163
5.10	Ghosts	164
5.10.1	<i>Definition</i>	164

5.10.2	<i>Thermisch-induzierte Hämolyse</i>	165
5.10.3	<i>Bildung von Ghosts</i>	167
5.10.3.1	Methode zum Nachweis von Ghosts	168
5.10.3.2	Einfluss verschiedener organischer Lösemittel und Prozessierungstemperaturen auf die Bildung von Vesikeln.....	169
5.10.3.3	Einfluss des Hämatokrits auf die Bildung von Vesikeln.....	176
6	VOLLAUTOMATISIERTES TOTALES ANALYSESYSTEM (TAS).....	179
6.1	Instrumenteller Aufbau.....	180
6.2	Arbeitsweise des vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS)	182
6.2.1	<i>Mischung und Injektion</i>	183
6.2.1.1	Aufmischen einer sedimentierten Vollblutprobe.....	184
6.2.1.2	Zugabe des Internen Standards.....	185
6.2.2	<i>Prozessierung</i>	188
6.2.2.1	Transfer: off-line zu in-line Prozessierung von Vollblutproben.....	189
6.2.3	<i>Fraktionierung (SPE-Schritt)</i>	193
6.2.4	<i>Separation</i>	194
6.2.5	<i>Detektion</i>	194
7	METHODENENTWICKLUNG UND BESTIMMUNG VON KENNGRÖßEN FÜR DIE ON-LINE SPE-LC-MS/MS-ANALYSE: ALLGEMEINER TEIL	195
7.1	Ausarbeitung der analytischen Trennung und Detektion	196
7.2	Ermittlung des Fraktionierungsvolumens (V_F) der Probenmatrix	198
7.3	Ermittlung des Durchbruchsvolumens (V_B) der Analyten	200
7.4	Ermittlung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten.....	201
7.5	Programmierte Volumina ($V_{X(P)}$).....	203
7.6	Analysezyklus.....	205
8	ENTWICKLUNG EINER METHODE FÜR DIE DIREKTE INJEKTION UND IN-LINE PROZESSIERUNG VON VOLLBLUT ZUR ANALYSE VON PHARMAKA IN EINEM ON-LINE SPE-LC-MS/MS-SYSTEM.....	207
8.1	LC-Trennung und MS/MS-Detektion	207
8.2	In-line Prozessierung von Vollblutproben	214
8.3	SPE-Kartuschen.....	216

8.3.1	<i>Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) der Probenmatrix</i>	216
8.3.2	<i>Bestimmung des Durchbruchvolumens (V_B) der Analyten</i>	224
8.3.3	<i>Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten</i>	229
8.3.3.1	Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) unter Verwendung eines UV-Detektors	230
8.3.3.2	Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) unter Verwendung eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS)	233
8.3.4	<i>Zusammenfassung der ermittelten Parameter V_F, V_B und V_E</i>	238
8.4	Bestimmung der zu programmierenden Volumina	239
8.5	Zusammenstellung des Analysezyklus	243
8.6	Thermostabilität der untersuchten Immunsuppressiva	248
9	EVALUATION DER IN-LINE PROZESSIERUNG VON VOLLBLUTPROBEN GEKOPPELT AN EIN ON-LINE SPE-LC-MS/MS-SYSTEM	251
9.1	Reproduzierbarkeit der Analyse von nativen Vollblutproben im Totalen Analysesystem (TAS)	251
9.2	Überprüfung der Anwendbarkeit des vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS) zur Analyse von Patientenproben	256
10	ALLGEMEINE ANWENDBARKEIT DER IN-LINE PROZESSIERUNG UND ON-LINE SPE-LC-MS/MS-ANALYSE VON VOLLBLUTPROBEN	261
10.1	Pharmakologische Beschreibung der Azol-Antimykotika	261
10.2	Analyse von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol	262
10.3	Vorteile einer direkten Analyse von Vollblut im Vergleich zur Analyse von Plasmaproben	269
10.4	Vorteile für die LC-MS/MS-Routineanalytik	270
10.5	Bestimmung der Verteilung von Wirkstoffen in Vollblut	273
11	ZUSAMMENFASSUNG	277
12	ANHANG	287
12.1	Abkürzungsverzeichnis	287
12.2	Geräte und Materialien	295
12.3	Chemikalien und Lösungsmittel	298
12.4	Geräteparameter	300

12.4.1	<i>In-line Prozessierung (VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)) -SPE-LC.....</i>	300
12.4.2	<i>Bestimmung des Fraktionierungs- und Durchbruchvolumens (V_F und V_B)</i>	301
12.4.3	<i>Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E).....</i>	302
12.4.4	<i>MS/MS Detektion.....</i>	303
12.4.4.1	<i>Immunsuppressiva.....</i>	303
12.4.4.2	<i>Antimykotika.....</i>	305
12.5	<i>Definitionen.....</i>	306
12.5.1	<i>Standardabweichung</i>	306
13	LITERATURVERZEICHNIS	307
14	VERZEICHNIS: ABBILDUNGEN UND TABELLEN	321
15	VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER ARBEIT.....	329
16	LEBENS LAUF.....	333

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Analyse von Pharmaka aus biologischem Material mittels Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC/LC) gekoppelt an die Massenspektrometrie (MS/MS) hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Dabei handelt es sich um eine Kombination von sehr effizienten analytischen Trennsäulen und einem Detektor, der sich durch seine sehr hohe Selektivität und Spezifität auszeichnet. Bei der Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode, wird schnell deutlich, dass der zeitaufwendigste Teil der Analyse von Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten wie Vollblut, Plasma, Serum oder Urin die Probenaufbereitung ist. Trotz eines sehr selektiven und spezifischen Detektors ist es notwendig, den Analyten möglichst komplett von der biologischen Matrix abzutrennen.

Die direkte Injektion von unbehandelten Vollblutproben in eine on-line SPE-LC-MS/MS-System ist aufgrund der korpuskulären Bestandteile von Vollblut nicht möglich. Die injizierten Blutzellen würden aufgrund ihrer Größe während der Fraktionierung zu einem hohen Rückdruck der SPE-Einheit führen. Feste Bestandteile in nativem Vollblut machen daher eine Aufbereitung dieser Matrix im Vorfeld zur Analyse notwendig.

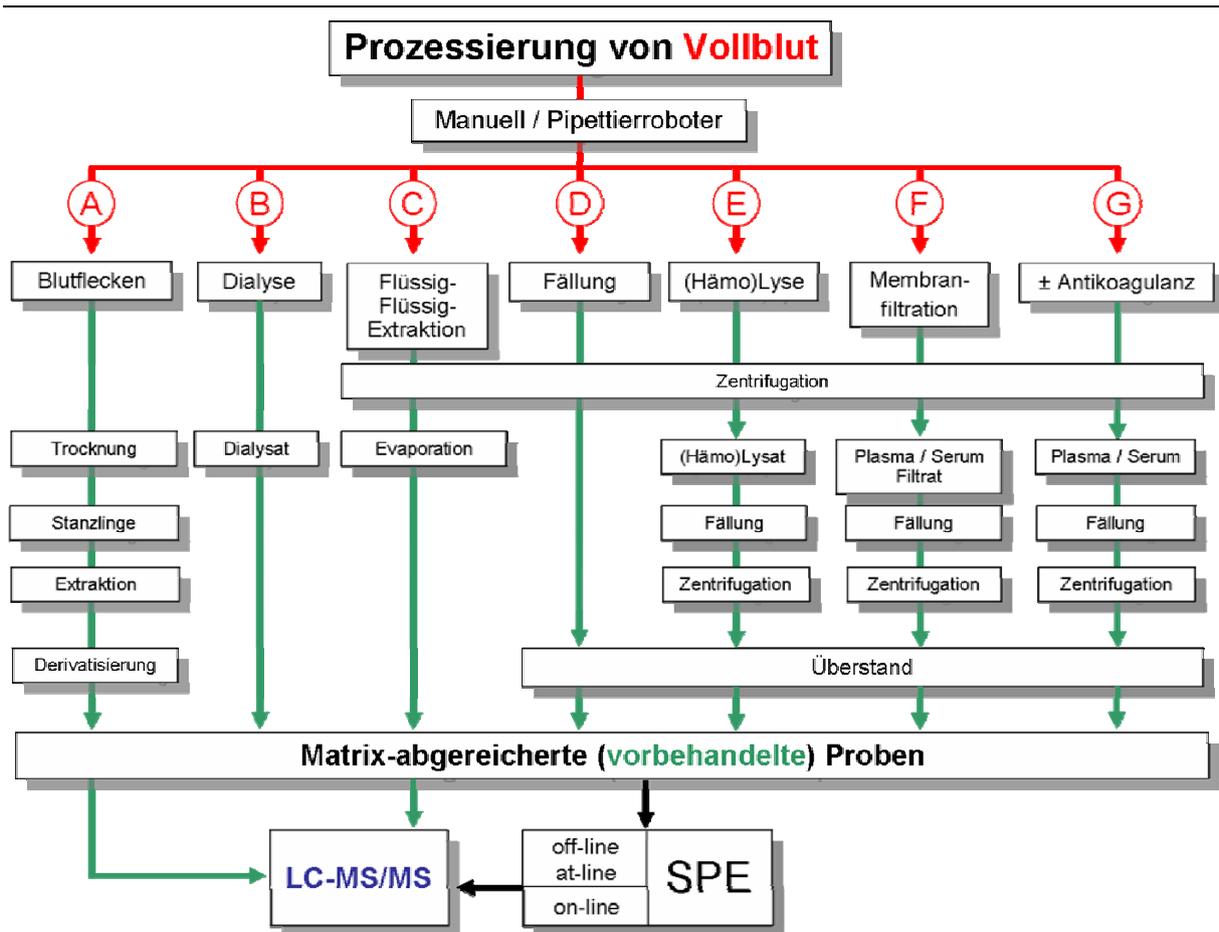


Abb. 1: Manuelle und mit einem Pipettierroboter durchzuführende Methoden zur Aufbereitung von Vollblutproben für die LC-MS/MS-Analyse

Abb. 1 stellt die Methoden zur manuellen und mit dem Pipettierroboter durchzuführende Probenaufbereitung von Vollblut zusammenfassend dar. Nach dem Auftragen von Vollblut auf eine Filterkarte (A), muss das Blut vor dem Ausstanzen vollständig getrocknet sein. Um die Analyten aus dem Stanzlinge zu analysieren, werden diese zunächst extrahiert, im Anschluss derivatisiert und abschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Die Dialyse von Vollblut (B) stellt ein weiteres Verfahren zur manuellen Probenaufbereitung von Vollblut dar. Der im Dialysat enthaltene Analyt muss vor der Detektion mittels Festphasenextraktion (engl.: Solid-Phase-Extraction; SPE) aufkonzentriert werden. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (C) ist ein sehr zeitaufwendiges Ver-

fahren zur Aufbereitung von Vollblutproben. Die Zugabe eines organischen Lösemittels oder einer starken Säure führt zur Fällung (D) von Blutzellen und Plasmaproteinen. Die Lyse (E) von Blutzellen wird durch einen osmotischen Schock oder durch Zugabe eines Detergenzes erreicht. Ein physikalisches Verfahren zur Trennung von Vollblut in Plasma und Blutzellen stellt die Membranfiltration (F) dar. Das am häufigsten angewandte Verfahren zur Gewinnung von Plasma ist die Zentrifugation von anti-koaguliertem Vollblut (G). Serum wird aus der Zentrifugation von geronnenem Vollblut generiert. Der Zentrifugationsschritt ist auch bei den Methoden C-F notwendig. Der aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnene Extrakt wird zur Aufkonzentrierung teilweise oder vollständig eingedampft. Nach Rekonstitution werden die Analyten entweder direkt im LC-MS/MS-System analysiert oder im Vorfeld einer Festphasenextraktion (SPE) unterzogen. Der Überstand einer gefällten Vollblutprobe wird bei einem SPE-Schritt weiter aufgereinigt und anschließend im Tandemmassenspektrometer analysiert. Die Sekundärproben Lysat, Filtrat und Plasma bzw. Serum werden in der Regel zur Proteinanreicherung gefällt und ein zweites Mal zentrifugiert bevor der gewonnene Überstand mittels on-line SPE-LC-MS/MS analysiert werden kann. Wie in **Abb. 2** gezeigt, ist es auch möglich, diese nativen Sekundärproben direkt (on-line) auf spezielle SPE-Säulen zu injizieren und die extrahierten Analyten im Anschluss integriert über eine Säulenschaltung zu analysieren (H).

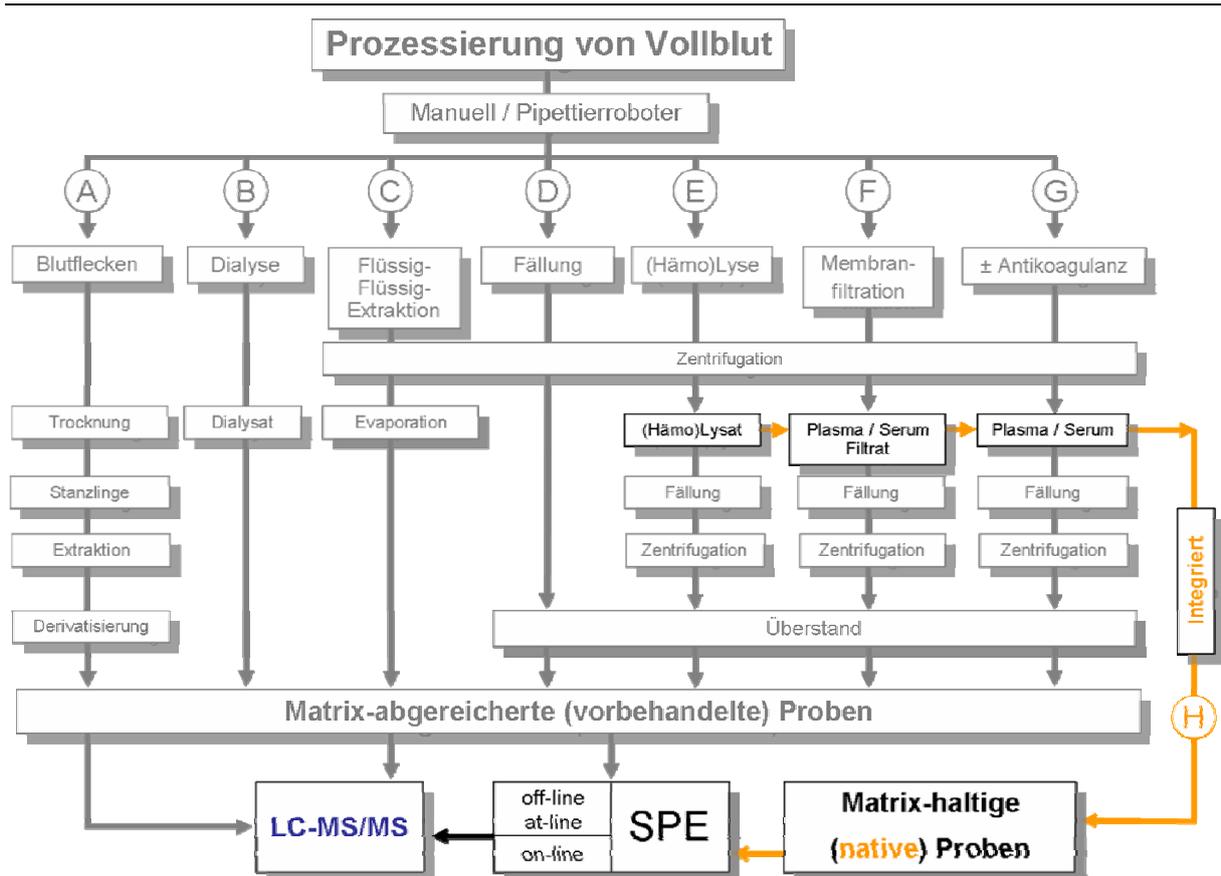


Abb. 2: On-line Methode zur Aufbereitung von proteinhaltigen Sekundärproben

Dafür werden maßgeschneiderte Packungsmaterialien benötigt, die eine eingeschränkte Zugänglichkeit für hochmolekulare Probenbestandteile aufweisen. Diese Packungsmaterialien werden als Restricted Access Materialien (RAM) bezeichnet.

Eine unzureichende Probenaufbereitung führt bei Verwendung eines Massenspektrometers in der Regel zu Matrixeffekten, d.h., die Ionisation der Zielanalyte wird durch koeluierende Matrixkomponenten beeinflusst. Matrixeffekte wirken sich auf die Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse aus.

Die Aufbereitung komplexer biologischer Flüssigkeiten kann mit Hilfe verschiedener Verfahren (**Abb. 1**) durchgeführt werden. Alle Methoden haben jedoch gemeinsam, dass sie manuell durchgeführt werden. Somit sind diese Verfahren zeit- und ar-

beitsaufwendig und nur sehr schwer oder gar nicht automatisierbar. Die manuelle Probenaufbereitung ist aus mehreren Gründen nachteilig. Einerseits kann es sehr leicht zu Fehlern, z.B. Verwechslung der Proben oder Pipettierfehlern kommen. Andererseits bringen Patientenproben immer ein potenzielles Infektionsrisiko mit sich.

In Kombination mit einer LC-MS/MS-Methode sollte daher eine adäquate Probenaufbereitung effizient, selektiv und voll automatisiert sein. Dies führt zudem zu einem hohen Probendurchsatz aufgrund kurzer Gesamtanalysezeiten.

In einem Routinelabor liegt im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings täglich ein hohes Probenaufkommen vor. Eine zeitaufwendige, manuelle Probenaufbereitung, z.B. Proteinpräzipitation mit anschließender Zentrifugation, limitiert die Effizienz der anschließenden LC-MS/MS-Analysetechnik¹. Eine Automatisierung der Probenaufbereitung führt zum einen zu einer Verbesserung des Arbeitsablaufes im Routinelabor und zum anderen zu einer Steigerung der analytischen Qualität. Eine geringe Gesamtanalysezeit der einzelnen Probe gewährleistet einen hohen Probendurchsatz. Derzeit wird für den LC-MS/MS-Schritt einer Probe eine minimale Zeit von 4-6 Minuten benötigt. Hinzu kommt die Zeit, die für die manuelle Probenaufbereitung benötigt wird.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung, Evaluierung und Erprobung eines neuartigen Verfahrens der Probenaufbereitung, welches es erstmalig erlaubt, unbehandelte Vollblutproben direkt in ein on-line SPE-LC-MS/MS-System zu injizieren und die extrahierten bzw. getrennten Analyten im Anschluss zu quantifizieren. In Vorversuchen wurde im Arbeitskreis gefunden, dass die zellulären Bestandteile von antikoaguliertem Vollblut bei einer Hitzeschockbehandlung (engl.: heat shock treatment; HST) desintegriert wurden. Diese neue biologische Matrix wurde zell-desintegriertes Blut bzw. cell-disintegrated blood (CDB) genannt.

Im Rahmen der Dissertationsarbeit sollten die weitgehend unbekannt Prozesse bei der Hitzeschockbehandlung von Vollblut eingehend untersucht und beschrieben werden. Ein Großteil der Versuche sollte zunächst off-line, d.h. manuell, durchgeführt werden, um zu sehen und zu verstehen, was während der thermischen Behandlung von Vollblut geschieht. Nach der vollständigen Erfassung und Beschreibung aller Prozesse und Einflüsse sollte das Verfahren automatisiert werden (in-line Modus, integral) und in eine vollautomatisierte SPE-LC-MS/MS-Plattform implementiert werden.

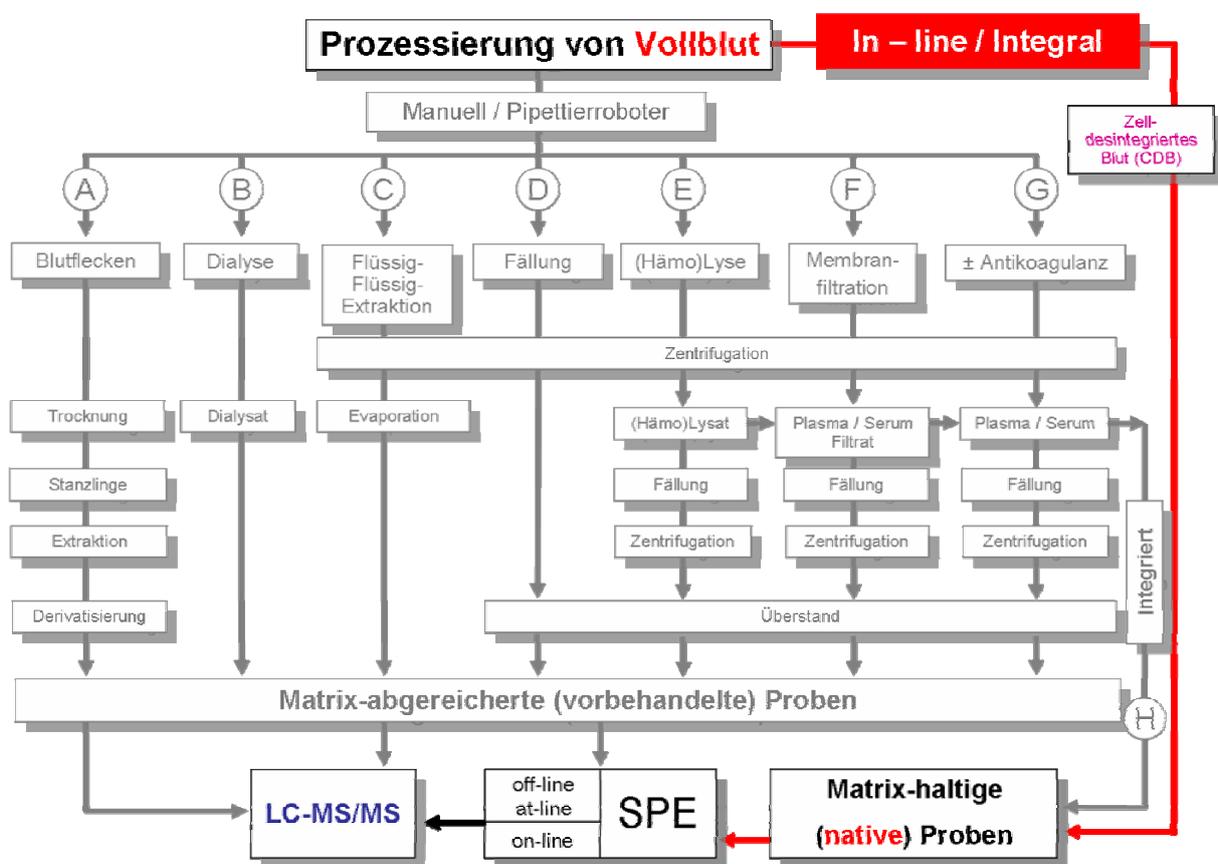


Abb. 3: Gewinnung von CDB durch in-line / integrale Prozessierung von Vollblut und anschließender on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse der Analyten

In der vorliegenden Arbeit dienen Immunsuppressiva, die vorwiegend erythrozytär gebunden sind, als Modellanalyten^{2,3,4,5,6,7,8}. Die Analyse von Immunsuppressiva ist sehr zeitaufwendig, da die Probenaufbereitung mehrere manuelle Schritte beinhaltet.

Diese lassen sich nur schwer bzw. sehr aufwendig automatisieren. Mit der Ausarbeitung des neuartigen Verfahrens zu einem in-line Prozess sollte es zum ersten Mal möglich sein, antikoaguliertes Vollblut direkt, d.h. ohne manuelle Bearbeitung, in ein vollautomatisches on-line SPE-LC-MS/MS-System zu injizieren, zu prozessieren und routinemäßig zu analysieren.

Nach der Prozessierung von Vollblut durch Hitzeschock sollte die neue Matrix CDB durch eine on-line Festphasenextraktion weiter aufgereinigt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung mussten zunächst einige SPE-Parameter bestimmt werden. Um das benötigte Fraktionierungsvolumen (engl.: volume fractionation; V_F) zu evaluieren, sollte zunächst t_M (Fraktionierungsdauer Matrix) bestimmt werden. t_M lässt sich aus dem Elutionsprofil von CDB ablesen und beschreibt die Zeit, die bis zur vollständigen Abreicherung der Matrix notwendig ist. Eine quantitative Fraktionierung findet nur dann statt, wenn während des Fraktionierungsschrittes der Analyt nicht auch von der SPE-Säule bzw. -Kartusche eluiert wird. Durch die Aufzeichnung des Elutionsprofils der in der Probe enthaltenen Analyten während des Fraktionierungsschrittes, erhält man den Wert für den Parameter t_A (Durchbruchzeit Analyt), über den sich leicht das Durchbruchvolumen (engl.: volume breakthrough; V_B) errechnen lässt. Als weiterer SPE-Parameter sollte t_T bestimmt werden. t_T beschreibt die Zeit, die notwendig ist, um die adsorbierten Analyten von der SPE-Säule bzw. -Kartusche auf die analytische Trennsäule zu transferieren. Über t_T lässt sich das Elutionsvolumen (engl.: volume elution; V_E) errechnen.

Zur analytischen Trennung der Immunsuppressiva dienen in der Regel C18-Materialien oder Phenylphasen^{1,9,10,11,12,13,14}. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als chromatographische Trennsäulen einerseits die LiChrospher® 100 RP-18 EC-Säule und andererseits eine Phenyl-Hexyl-Phase eingesetzt.

Abschließend sollte ein Methodenvergleich durchgeführt werden. Dabei sollten zum einen Immunsuppressiva nach direkter Injektion von nativen, antikoagulierten Vollblutproben und in-line Prozessierung in einem on-line SPE-LC-MS/MS-System quantifiziert werden. Zum anderen sollten im gleichen Analysesystem Immunsuppressiva nach einem etablierten Probenaufbereitungsverfahren, welches einen Fällungs- und

einen Zentrifugationsschritt beinhaltet, analysiert werden. Mit diesem Methodenvergleich bezüglich der Probenaufbereitung sollte ein „Proof of Principle“ erbracht werden. Dieser Beweis sollte zeigen, dass das neuartige Verfahren zur Aufbereitung von Vollblut mindestens genau so effizient ist wie die Proteinpräzipitation, die vornehmlich in der Routine-Analytik der Immunsuppressiva eingesetzt wird^{9,10,11,12}.

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

2.1 Biologische Flüssigkeiten

Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Liquor, Speichel, Tränen und Schweiß stellen biologische Flüssigkeiten dar, die vorwiegend mit klinisch-chemischen Methoden untersucht werden^{15,16,17}. Diese Matrices sind hoch komplex und deshalb analytisch sehr anspruchsvoll. Das häufigste Untersuchungsmaterial im klinisch-chemischen Labor ist Vollblut, das meist durch Venenpunktion gewonnen wird. Aus der Vollblutprobe wird in der Regel nach Zentrifugation Serum oder Plasma gewonnen. Diese Sekundärproben werden bevorzugt für Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC/LC) weiter aufbereitet. Dieses Verfahren zur Trennung der Zielanalyten kann mit verschiedenen Detektoren gekoppelt sein, z.B. UV/VIS-, Fluoreszenz-, ECD- oder DAD-Detektoren. Des Weiteren wird aufgrund seiner hohen Selektivität und Sensitivität das Massenspektrometer (MS) als Detektor der Wahl eingesetzt.

2.1.1 Blut, Plasma und Serum

Der Blutkreislauf ist ein Einkompartiment-System und entspricht daher einem Organ. Vollblut wird somit als flüssiges Gewebe bezeichnet, das sich aus zwei Fraktionen zusammensetzt¹⁸. Der flüssige Bestandteil von Vollblut wird als Plasma bezeichnet. Er wird durch Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut gewonnen. Der zelluläre Be-

standteil von Vollblut setzt sich aus Erythrozyten (rot), Leukozyten (gelb) und Thrombozyten (grüngrau) zusammen. (**Abb. 4**)

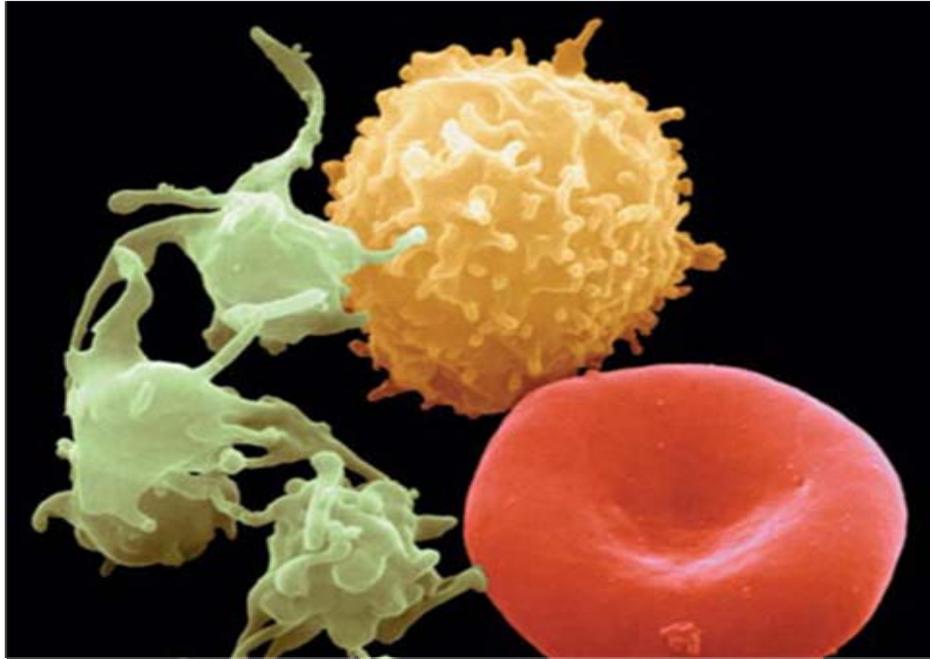


Abb. 4: Aufnahme von Blutzellen mit einem Rasterelektronenmikroskop¹⁹

Abb. 5 zeigt, dass Vollblut zu ca. 50 % aus Plasma besteht. Die größte Fraktion der zellulären Bestandteile stellen die Erythrozyten.

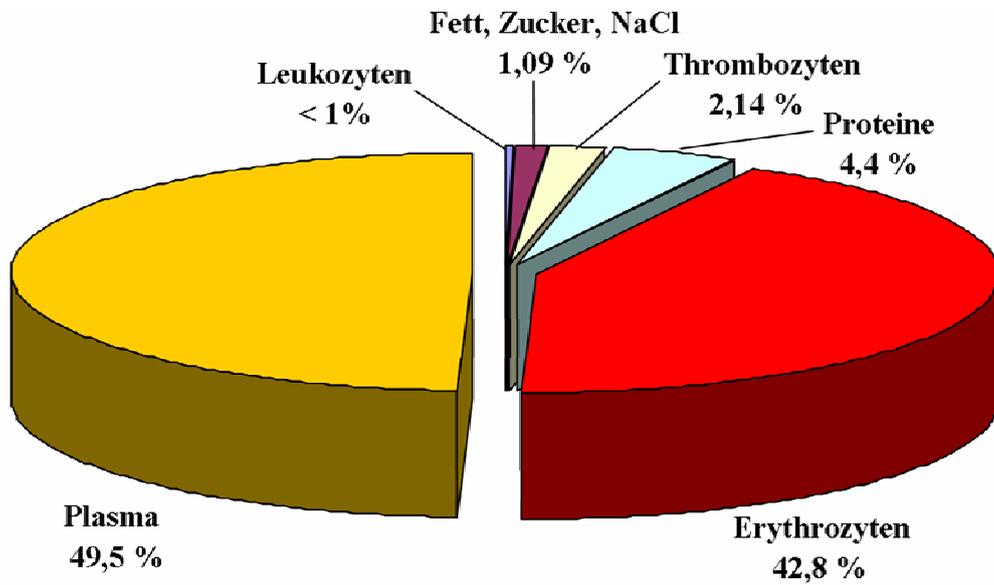


Abb. 5: *Zusammensetzung von Vollblut*

Die Leukozyten werden weiter unterteilt in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Alle zellulären Bestandteile entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den sogenannten pluripotenten Stammzellen, wie in **Abb. 6** zu sehen ist¹⁸.

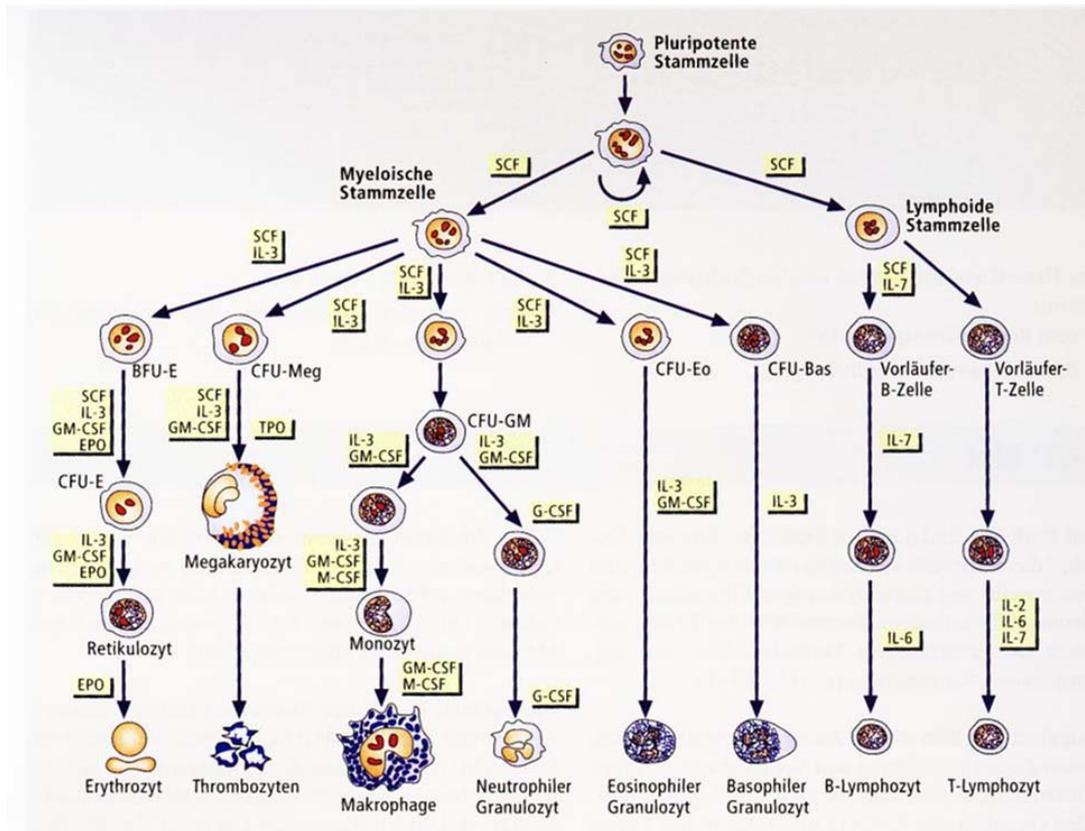


Abb. 6: Schematische Darstellung der Hämatopoese¹⁸

Der Hauptbestandteil von Plasma ist mit ca. 92 % Wasser. Proteine machen ungefähr 7% der löslichen Bestandteile von Blutplasma aus. Als weitere Bestandteile von Plasma sind Gase, Salze, Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren zu nennen. Die Gesamtproteinkonzentration im Plasma ist altersabhängig. (**Tab. 1**)

Entwicklungsstadium	Gesamtproteinkonzentration [g/L]
Erwachsene	66-83
Kinder	60-80
Säuglinge	48-76
Neugeborene	46-68

Tab. 1: Gesamtproteinkonzentration im Plasma in Abhängigkeit vom Alter²⁰

Klinisch wichtige Plasmaproteine sind Albumin, α_1 -Globuline, α_2 -Globuline, β -Globuline und γ -Globuline. Die Plasmaproteinfraktionen sind unterschiedlich groß und bestehen aus mehreren Untergruppen, wie in **Tab. 2** dargestellt.

Fraktion	Relativer Anteil [%]	Absoluter Anteil [g/L]	Spezielle Proteine aus der Fraktion
Albumin	55-69	35-50	Präalbumin
α_1 -Globulin	2-6	1-4	α_1 -Lipoprotein (HDL) α_1 -Glycoprotein
α_2 -Globulin	6-11	4-8	Prä- β -Lipoprotein (VLDL) α_2 -Makroglobulin
β -Globulin	8-14	6-12	β -Lipoprotein (LDL) Transferrin (Tf) Fibrinogen (Fg)
γ -Globulin	11-18	8-15	Immunglobuline (Ig)

Tab. 2: Zusammensetzung der Plasmaproteinfraktionen eines Erwachsenen²⁰

Von Serum spricht man, wenn dem Plasma die Gerinnungsfaktoren entzogen wurden. In der Praxis werden dem Vollblut vor der Zentrifugation gerinnungsfördernde Agenzien zugeführt. Derartige Hilfsmittel sind zum Beispiel kaolinbeschichtete Polystyrolkugeln oder ein Polyester-Trenngel mit Gerinnungsaktivator. Beide Hilfsmittel haben eine Dichte, die zwischen der des Serums und des Blutkuchens liegt. Aus diesem Grund wandern sie während der Zentrifugation an die Grenzschicht und bilden somit eine Diffusionsbarriere. Im Plasma und im Serum ist die Konzentration der meisten klinisch-chemischen Parameter gleich. Ausnahme sind die Werte für Kalium, saure Phosphate und LDH. Diese sind im Plasma etwas niedriger. Hingegen ist das Gesamteiweiß aufgrund des enthaltenen Fibrinogens in Plasma etwas höher²¹.

Für viele klinisch-chemische Untersuchungen ist es notwendig, Vollblut ungerinnbar zu machen. Dies wird durch den Zusatz von Antikoagulantien erreicht. In **Tab. 3** sind häufig eingesetzte Antikoagulantien und ihre Einsatzgebiete dargestellt.

Antikoagulanz	Einsatzgebiet
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Hämatologie Lipoproteinanalytik
Citrat	Gerinnungsdiagnostik Blutsenkungsgeschwindigkeit
Heparin	Elektrolyte, Substrate, Enzyme Blutgasanalytik
Natriumfluorid	Blutzuckerbestimmung

Tab. 3: *Häufig verwendete Antikoagulantien und ihre Einsatzgebiete*
[in Anlehnung an²¹]

Die Hauptaufgabe von Vollblut ist der Stofftransport, wie beispielsweise der Transport von Sauerstoff/Kohlendioxid, Nährstoffen, Mineralien, Hormonen, Stoffwechselprodukten und Arzneimitteln und deren Metaboliten. Weitere Aufgaben von Blut sind die Aufrechterhaltung des pH-Wertes (Pufferkapazität) und Wärmeregulation des Organismus, die humorale Infektionsabwehr und die Volumenaktivität. Die Gesamtmenge des Blutvolumens des Menschen beträgt ca. 7-8 % seines Körpergewichts.

2.1.2 Anforderungen an die Probenaufbereitung

Biologische Flüssigkeiten enthalten wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben endogene nieder- und makromolekulare Verbindungen, deren Gesamtkonzentration die des zu untersuchenden Analyten bis zum 10^6 bis 10^9 -fachen übersteigen. In der Präanalytik ist es wichtig, diese Matrixbestandteile quantitativ zu eliminieren, da es sonst durch koeluierende Matrixbestandteile zu Interferenzen im Chromatogramm kommen kann. Eine weitere Aufgabe der Probenaufbereitung ist es, die unspezifische und oftmals irreversible Adsorption von Proteinen an herkömmliches chromatographisches Packungsmaterial zu unterbinden. Durch die Adsorption von Proteinen sinkt die Kapazität und Selektivität des Trägermaterials drastisch, was sich in einer verringerten Robustheit und Zuverlässigkeit der Methode widerspiegelt. Bei Verwendung eines hohen Anteils an Organik oder Säure im Eluenten können Proteine auf der analytischen Trennsäule präzipitieren. Auch dies führt zu einer stark verkürzten Lebensdauer des chromatographischen Trennmaterials.

Wird mit einem UV-VIS-Detektor gearbeitet, führen UV-aktive koeluierende Matrixbestandteile zu einer Überlagerung des eigentlichen Analytsignals. Für die LC-MS/MS-Analyse biologischer Proben ist die quantitative Elimination der Probenmatrix unumgänglich, da es sonst zu sogenannten Matrixeffekten kommt. Diese führen insbe-

sondere bei dem ESI-Verfahren zu einer Störung der Ionisation der Zielanalyte und somit zu nicht aussagekräftigen Ergebnissen.

Die Anforderung an die Probenaufbereitung von biologischem Material ist somit eine möglichst quantitative Fraktionierung der Probe in Analyt- und Matrixfraktion. Dabei werden die Analyten aus der Probenmatrix extrahiert und anschließend aufkonzentriert. Simultan werden die makromolekularen Bestandteile des Untersuchungsmaterials, z.B. Proteine und Nukleinsäuren, quantitativ abgereichert.

Bei der Probenaufbereitung ist darauf zu achten, dass die Aufbereitungsmethode mit den verschiedenen Analyseverfahren kompatibel ist. Beispielsweise dürfen Proben, die mit einem Massenspektrometer detektiert werden, während der Probenaufbereitung nicht mit Phosphorsäure oder Detergenzien versetzt werden. Diese Zusätze führen zu einer Störung der MS-Detektion^{22,23}. Phosphat- und Citrat-Puffer gehören zu den nichtflüchtigen mobilen Phasen. Diese Art von Pufferlösungen ist nicht anwendbar in der Massenspektrometrie, da die enthaltenen Salze zu einer starken Verunreinigung der Ionenquelle führen. Dies resultiert letztendlich in einer Ionensuppression und somit in einer verminderten Sensitivität des Detektors. Detergenzien wie beispielsweise Natrium Dodecyl Sulphate (SDS) haben Einfluss auf die Chromatographie und MS-Detektion. Die Anwesenheit von SDS während der chromatographischen Trennung führt zur Peakverbreiterung, verlängerter Retentionszeit und Verminderung der Signalauflösung. SDS ist dafür bekannt, dass es an Proteine und Material der stationären Phase bindet und somit die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser verändert²³. Während der Ionisation in der ESI-Quelle kommt es zur Adduktbildung der Analyten mit SDS.

Ziel einer modernen Probenaufbereitung ist immer die Automation und Routinetauglichkeit. Ein automatisiertes Verfahren sollte einen erhöhten Probendurchsatz ermöglichen, sowie die Präzision und Richtigkeit der Ergebnisse verbessern.

2.2 Verfahren für die Probenaufbereitung

Für alle Verfahren der Probenaufbereitung von biologischen Flüssigkeiten gilt, dass sie zu einer möglichst quantitativen Fraktionierung in Analyt- und Matrixfraktion führen sollten. Im Hinblick auf eine Automation sollte erwähnt werden, dass die meisten Methoden zur Probenaufbereitung mehrere manuelle Schritte aufweisen. Diese sind nur schwer oder gar nicht zu automatisieren.

Weit verbreitet in der Bioanalytik ist die Proteinpräzipitation (PP), die Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl.: Liquid-Liquid-Extraction; LLE), die Analyse getrockneter Blutflecken (engl.: Dried Blood Spots; DBS) und die Festphasenextraktion (engl.: Solid-Phase-Extraction; SPE). Weniger Anwendung findet die Membranfiltration (MF) bzw. Dialyse (D), da es sich dabei um sehr zeitaufwendige Verfahren handelt. Weiterhin zu erwähnen ist die Größenausschlusschromatographie (engl.: Size-Exclusion Chromatography; SEC) und Hämolyse. Als völlig neuartiges Verfahren der Probenaufbereitung soll hier die Hitzeschockbehandlung (engl.: heat shock treatment; HST) von Vollblut vorgestellt werden.

2.2.1 Proteinpräzipitation (PP)

Werden biologische Proben mit organischen Lösemitteln oder starken Säuren versetzt, kommt es zur Fällung bzw. Denaturierung von Proteinen. Eine hochkonzentrierte Salzlösung, wie z.B. 4 molares $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder NH_4Cl entzieht dem Protein reversibel die Proteinhülle, was zum Ausfällen des Eiweißes führt²⁴. Oft wendet man eine Kombination aus organischem Lösemittel und einem Salz zur effektiven Proteinfällung an. Vollblutproben für die Analyse von Immunsuppressiva werden routinemäßig mit einer

Mischung aus MeOH/ZnSO₄ (80/20, v/v) gefällt^{9,10,11,12}. Nach dem Zentrifugieren der präzipitierten Probe erhält man einen klaren Überstand, der analysiert werden kann.

Häufig werden Acetonitril (ACN) oder Methanol (MeOH) zum Fällern biologischer Proben verwendet. Beide Lösemittel sind kompatibel mit den mobilen Phasen der LC. Untersuchungen zeigen jedoch, dass es wichtig ist, in welchem Verhältnis die biologische Flüssigkeit mit dem organischen Lösemittel versetzt wird. Je höher der Anteil des organischen Lösemittels, desto effektiver ist die Proteinfällung²⁵. Der Nachteil bei der Fällung mit Acetonitril ist, dass Proteine, die ein Molekulargewicht von < 20 kDa haben, nicht präzipitiert werden²⁵. Diese Makromoleküle führen zu Interferenzen im Chromatogramm und stören die Ionisation. Allgemein kann gesagt werden, dass je apolarer das organische Lösemittel ist, desto effektiver führt es zur Proteinfällung²⁴.

Häufig kommt es zu Verklumpungen, wenn Vollblut mit MeOH/ZnSO₄ vermischt wird. Auch wenn diese Probe im Anschluss mit Acetonitril versetzt und gemischt wird, bleiben die „Pellets“ erhalten. Zusätzlich wird beobachtet, dass die Wiederfindung von Sirolimus unter 100 % liegt, wenn die Proteinfällung in Gegenwart von MeOH/ZnSO₄ stattgefunden hat²⁶. Wird jedoch Vollblut zunächst mit deionisiertem Wasser versetzt und anschließend mit einer wässrigen ZnSO₄-Lösung und Methanol vermischt, so kommt es zu einer Steigerung der Signalintensität für Ciclosporin A, Sirolimus und Tacrolimus und zu einer Verminderung der Matrixeffekte²⁶.

Der Zusatz von Metallionen zu Vollblut, beispielsweise mittels ZnSO₄-Lösung, führt zu schwebstofffreien Überständen nach dem Zentrifugationsschritt²⁷.

Der Vorteil der Proteinpräzipitation ist, dass es ein einfach zu handhabendes, schnelles und universell einsetzbares Verfahren ist. Kopräzipitation oder Inklusion der Analyten und die dadurch verursachte verminderte Wiederfindung sind nicht zu unterschätzende Nachteile dieses Verfahrens.

Obwohl die Proteinpräzipitation schwer zu automatisieren ist, so gibt es einige Anwender, die mit Hilfe von Roboter-Pipettiersystemen, z.B. dem Tecan Freedom Evo, eine Proteinpräzipitation automatisiert haben²⁸.

2.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist die älteste Methode zur Aufbereitung von biologischen Proben. Dabei wird der Analyt durch Ausschütteln eines mit Wasser nicht mischbaren Lösemittels, wie z.B. Hexan oder Ethylacetat extrahiert. Die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts folgt dem Nernst'schen Verteilungsgesetz:

$$K = \frac{c(\text{Analyt}) \text{ in Phase 1}}{c(\text{Analyt}) \text{ in Phase 2}}$$

Die Verteilungskonstante K ist temperaturabhängig, pH-Wert-abhängig und substanzspezifisch.

Klassischer Weise wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion im Schütteltrichter durchgeführt. Alternativ lässt sich eine Flüssig-Flüssig-Extraktion auch mittels einer Säulenelution durch den Einsatz von EXtrelut[®] erreichen²⁹. Dabei wird die wässrige Probe, die den Analyten enthält, auf eine Kieselgur-Kartusche gegeben. Die wässrige Probe sickert ins poröse Trägermaterial. Anschließend kann der Analyt mit einem organischen Lösemittel, das nicht mit Wasser mischbar ist, eluiert werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Durchführung der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist die Anwendung der Flüssig-Membran-Extraktion³⁰. Am häufigsten wird das 3-Phasen-System angewendet, in der eine organische Phase sich zwischen zwei wässrigen Phasen befindet. Die organische Phase ist in einer porösen, hydrophoben Membran immobilisiert. Angewendet wird dieses Verfahren beispielsweise zur Extraktion von Aminen. Die Amine befinden sich zunächst in einer der wässrigen Phasen (Donorphase). Nach ausreichender Erhöhung des pH-Wertes verlieren die Amine ihre Ladung und liegen neutral vor. Nun können sie in die organische Phase diffundieren. Die zweite wässrige Phase (Akzeptorphase) befindet sich auf der anderen Seite der porösen

Membran und stellt einen sauren Puffer dar. Amine, die durch die Membran diffundiert sind, werden sofort positiv geladen, wodurch eine Rückdiffusion verhindert wird.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion bringt viele Nachteile mit sich:

- Hoher Verbrauch an organischem Lösemittel (Ausnahme: Flüssig-Membran-Extraktion)
- Limitierte Auswahl an einsetzbaren organischen Lösemitteln
- Großer Zeit- und Arbeitsaufwand aufgrund vieler Einengungsschritte
- Schlechte Wiederfindungsraten (Ausnahme: EXtrelut[®])
- Schlechte Reproduzierbarkeit (Ausnahme: EXtrelut[®])
- Keine scharfe Phasengrenze aufgrund von Emulsionsbildung
- Schwer automatisierbar (Ausnahme: EXtrelut[®], Flüssig-Membran-Extraktion)

Vorteile der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind:

- Sehr selektives Verfahren
- Ausschütteln ist reversibel durch Änderung des pH-Wertes

In der Rechtsmedizin wird die EXtrelut[®]-Säule zur Analytextraktion aus Blut- oder Urinproben eingesetzt^{31,32}.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wird des Weiteren zur Bestimmung des ungebundenen Anteils an Wirkstoff in einer Probe genutzt.

2.2.3 Membranfiltration (MF) und Dialyse (D)

Bei der Membranfiltration kommt es durch Einsatz einer Membran mit definiertem Porendurchmesser zur Abtrennung von nieder- und hochmolekularen Verbindungen. Die Porengröße limitiert die Penetration der Moleküle und bestimmt dadurch die Selektivität. Häufig werden Filter mit einer Porenweite zwischen 0,22-0,45 µm eingesetzt. So ist es möglich, Proteine mit einer Größe von bis zu 2 kDa zu retenieren.

Bei der Dialyse befindet sich die biologische Probe in einer Kammer (Donator), die nur durch eine semipermeable Membran von einem zweiten Kompartiment (Akzeptor) getrennt ist. Aufgrund eines Konzentrationsgefälles zwischen Donator- und Akzeptorzelle können niedermolekulare Verbindungen, vornehmlich der Analyt, in die Akzeptorzelle diffundieren. Dieser Vorgang wird Osmose genannt. Die passive Diffusion folgt dem Fick'schen Gesetz:

$$m. = \frac{\Delta c * F * D}{l}$$

Somit ist die passive Diffusion (m.) direkt proportional zu dem Konzentrationsgradienten (Δc), der Membranfläche (F) sowie dem Verteilungskoeffizienten (D) der betreffenden Substanz und umgekehrt proportional zu der Membrandicke (l). Darüber hinaus wird die Diffusionsgeschwindigkeit von dem substanzspezifischen Diffusionskoeffizienten bestimmt.

Es besteht die Möglichkeit einer statischen Akzeptorzelle, d.h., ihre Zusammensetzung ändert sich während des Dialysevorganges nicht. Eine Alternative dazu ist die dynamische Akzeptorzelle. Dabei kommt es zu einem kontinuierlichen Abführen der hinein diffundierten niedermolekularen Verbindungen. Dies führt schlussendlich zu einer höheren Wiederfindungsrate³³.

Das Verfahren der Dialyse bringt einige Nachteile mit sich:

- Starke Verdünnung der Analytkonzentration
- Hoher Zeitbedarf bis zur Einstellung des Dialyse-Gleichgewichts
- Maximale Ausbeute von 50 % (statisches System)
- Niedriger Probendurchsatz aufgrund der langsamen Gleichgewichtseinstellung
- Potentielle Adsorption des Analyten an die Dialysemembran
- Schwierige Automation

2.2.4 Getrocknete Blutflecken (DBS)

Bei der Analyse von getrockneten Blutflecken (engl.: Dried Blood Spots; DBS) muss das entnommene Blut zunächst auf spezielles Filterpapier aufgetragen und vollständig getrocknet werden. Das Auftragen des Blutes ist nicht ganz einfach. Dabei sollten die ausgezeichneten Felder vollständig mit Blut durchtränkt werden. Oft jedoch wird Blut mehrfach auf denselben Bereich der Filterkarte aufgetragen oder es kommt zu einer unzureichenden Durchtränkung des markierten Feldes. In der Regel wird das Blut aus der Ferse oder der Fingerbeere entnommen^{34,35}. Die Analyse der Zielanalyten aus getrockneten Blutflecken ist fest etabliert im Rahmen des Neugeborenen Screenings. Sie findet aber auch Anwendung im Bereich des Therapeutischen Drug Monitorings von Malariatherapeutika und antiretroviralen Wirkstoffen³⁶.

Das Verfahren zur Probenaufbereitung getrockneter Blutflecken im Vorfeld zur Detektion bzw. Quantifizierung der Zielanalyten ist sehr aufwendig. Zunächst müssen Tro-

ckenblut-Stanzlinge mit einem definierten Durchmesser aus der Filterkarte gestanzt werden. Dann werden die Analyten aus den Stanzlingen extrahiert. Oft werden die Analyten noch derivatisiert bevor sie mittels LC-MS/MS analysiert werden können³⁷.

Vorteile der Analyse getrockneter Blutflecken sind³⁶:

- Gesteigerte Compliance, da sich der Patient zu jeder Zeit und an jedem Ort die Blutprobe selbst entnehmen kann
- Geringes Probenvolumen
- Lange Haltbarkeit der getrockneten Blutflecken bei Raumtemperatur

Doch diese Art der Probenaufbereitung bringt auch Nachteile:

- Damit der getrocknete Blutfleck ausgewertet werden kann, muss das Blut korrekt auf das Filterpapier aufgetragen werden
- Die Quantifizierung der Zielanalyten ist nicht oder nur semiquantitativ möglich, da sie abhängig ist vom Hämatokrit
- Durch das punktuelle Auftragen des Blutes auf das Filterpapier bildet sich ein Konzentrationsgradient des Zielanalyten
- Eine Varianz in der Filterpapierdicke führt zu einer schlechten Reproduzierbarkeit

2.2.5 Hämolyse

Bei der Hämolyse wird die Membran der Erythrozyten zerstört und Hämoglobin freigesetzt. Diese Art der Probenaufbereitung wird angewendet, wenn Pharmaka, die vornehmlich an erythrozytäre Proteine gebunden sind, quantitativ analysiert werden sollen. Immunsuppressiva gehören beispielsweise zu solch einer Wirkstoffgruppe.

Die Hämolyse kann auf unterschiedliche Weisen durchgeführt werden. Die Zugabe von Wasser oder hypotonen Lösungen führt zu einem sogenannten osmotischen Schock. Die Erythrozyten schwellen bis zu 170 % ihres ursprünglichen Volumens an und zerplatzen im Anschluss. Das Anschwellen der Erythrozyten wird größtenteils über den Wassertransport durch die Aquaporin-Wasserkanäle gesteuert³⁸. Beim Zerplatzen bzw. Entstehen von Löchern in der Erythrozytenmembran werden Proteine und große Teile des Hämoglobins abgegeben. Die entstandenen Löcher müssen eine Größe haben, die es erlaubt, sphärisches Hämoglobin mit den Maßen 65Å x 55Å x 50Å passieren zu lassen³⁹. Sie können aber auch eine Größe von bis zu 1 µm erreichen. Die zerplatzte Membranhülle kann sich wieder verschließen und es entstehen sogenannte farblose Ghosts. Ein Teil des Hämoglobins bindet aufgrund von Adsorption an die Ghosts⁴⁰. Die Größe und Zusammensetzung der Ghosts ist abhängig davon, auf welche Art (pH-Wert, Temperatur, Osmolarität) sie entstanden sind³⁹.

Ein osmotischer Schock kann den Erythrozyten auch durch Zugabe von isoosmotischen Lösungen bestehend aus Glycerol, Propylenglycol, Ethylenglycol oder Harnstoff zugefügt werden. In Folge des Eindringens dieser Substanzen in die Zelle wird Wasser mit eingeschleust. Die Geschwindigkeit der Hämolyse ist abhängig von der Konzentration der isoosmotischen Lösungen. Die Hämolyse dauert in Gegenwart von Glycerol am längsten; sinkt in Gegenwart von Propylenglycol über Harnstoff, Ethylenglycol und ist bei alleinigem Vorliegen von Wasser am kürzesten⁴¹. Auch der Zusatz von Detergenzien, wie beispielsweise Saponinen, führt zu einer Lyse der Erythrozyten³⁹. Dabei kommt es zu einer Perforation der Erythrozytenmembran.

Im Anschluss an die Hämolyse muss das Lysat zur Entfernung der vorhandenen Ghosts zunächst zentrifugiert oder filtriert werden. Der Überstand des Lysats muss anschließend vor einer Analyse weiter aufbereitet werden.

2.2.6 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (engl.: Size-Exclusion Chromatography; SEC) wird auch als Gelchromatographie bezeichnet. Werden als Elutionsmittel organische Lösemittel verwendet, so wird von Gelpermeationschromatographie (GPC), bei der Verwendung von wässrigem Lösemittel von Gelfiltrationschromatographie (GFC) gesprochen. Die Säule ist mit einem porösen Feststoff, wie zum Beispiel einem polymeren Gel mit definierter Porengröße, gefüllt. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Zugänglichkeit und Eindringdauer von Probenmolekülen unterschiedlicher Größen in die Poren. Unterschieden wird zwischen den Molekülen, die in die Poren eindringen können, und den Molekülen, die zu groß sind, um in die Poren einzudringen. Entsprechend große Moleküle werden daher ausgeschlossen und treten als erstes (mit dem Totvolumen) aus der Säule aus⁴².

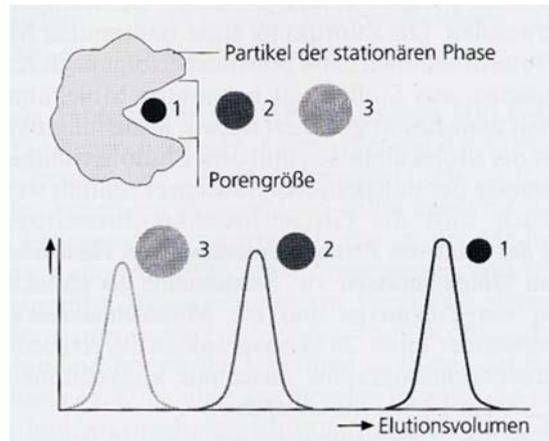


Abb. 7: Schematische Darstellung der Größenausschlusschromatographie (engl.: *Size-Exclusion-Chromatography; SEC*)⁴²

2.2.7 Hitzeschockbehandlung

Bei der Hitzeschockbehandlung von Vollblut handelt es sich um ein neuartiges Verfahren der Probenaufbereitung. Dabei wird die homogene Vollblutprobe bei einer festgelegten Temperatur für eine genau definierte Zeit erhitzt. Dabei kommt es zur Desintegration der zellulären Bestandteile, ohne dass die in der Probe enthaltenen Proteine denaturieren oder präzipitieren. Durch diese Hitzeschockbehandlung wird eine trübe Flüssigkeit in eine klare, homogene, ohne zelluläre Bestandteile, neue biologische Matrix (engl.: *cell-disintegrated blood; CDB*) umgewandelt. Diese wird im Kapitel 5 ausführlich charakterisiert.

2.2.8 Festphasenextraktion

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Probenaufbereitung in der Bioanalytik ist die Festphasenextraktion. Wie auch bei der Flüssigkeitschromatographie kommt es zu Wechselwirkungen des zu extrahierenden Stoffes zwischen einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase. Die Trennung des Stoffgemisches kann auf mehreren Mechanismen beruhen:

- Verteilungsvorgänge
- Adsorptionsvorgänge
- Ionenpaarchromatographie
- Affinitätschromatographie
- Chirale Trennung
- Größenausschlusschromatographie

Am häufigsten kommen Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge zur Abtrennung des Analyten aus dem Stoffgemisch zum Tragen. Diese physikalischen, reversiblen Wechselwirkungen müssen beim Zielanalyten stärker sein als bei den abzutrennenden Matrixbestandteilen.

Zur Festphasenextraktion wird das Packungsmaterial in verschiedenste Behältnisse gepackt. Herkömmlicher Weise werden kleine Kunststoffkartuschen oder kleine Säulen mit dem Adsorbens gefüllt. Seit kurzem gibt es auch SPE-Kartuschen, die die passende Form haben, um direkt in ein Extraktionssystem, Prospekt™, eingesetzt werden zu können⁴³.

Zur Verlängerung der Lebenszeit des Füllmaterials und zur Verbesserung der Effektivität der Festphasenextraktion, werden Proteine aus biologischen Flüssigkeiten in einem ersten Schritt mittels Proteinpräzipitation zum großen Teil eliminiert. Zu beachten ist

jedoch, dass es durch Zugabe des Fällungsreagenzes zu einer Kopräzipitation oder Inklusion des Zielanalyten kommen kann, was sich in einer verminderten Wiederfindung der Substanz widerspiegelt. Darüber hinaus ist bei der bevorzugten Verwendung von organischen Lösemitteln die Fällung der Matrixproteine nicht quantitativ²⁴. Der Überstand der gefällten Probe wird im Anschluss auf eine vorkonditionierte SPE-Kartusche aufgetragen. Dort kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase. Trotz der vorausgehenden Fällung können nicht-eliminierte Matrixbestandteile mit dem Adsorbens unspezifisch interagieren. Zur Extraktion des Analyten aus dem Probengemisch, wird die SPE-Kartusche mit verschiedenen Lösemitteln gewaschen. Dabei werden die Matrixbestandteile in den Abfall gespült. Im letzten Schritt der Festphasenextraktion wird der Analyt von der Kartusche eluiert. Das Eluat wird entweder direkt auf eine analytische Trennsäule transferiert oder zuerst bis zur Trockene eingengt, um danach den Analyten in einem geeigneten Lösemittel zu rekonstituieren und zu analysieren.

Der Vielfalt des Füllmaterials der SPE-Kartuschen sind kaum Grenzen gesetzt. Es besteht die Auswahl zwischen verschiedenen Umkehrphasen, modifizierten Kieselgelen, Polymeren, starken oder schwachen Ionenaustauschern bis hin zu maßgeschneiderten Adsorbentien. Aufgrund dieser großen Vielfalt und der daraus resultierenden Flexibilität hat die Festphasenextraktion die häufigste Verwendung in der Probenaufbereitung.

2.3 Automation der Festphasenextraktion

Der ausschlaggebende Grund für die Automation der Festphasenextraktion war, dass Untersuchungen und Praxiserfahrungen gezeigt haben, dass die Aufbereitung einer biologischen Probe mit Abstand den größten Zeitaufwand beinhaltet. Eine effiziente Probenaufbereitung nimmt in der Regel mehr Zeit in Anspruch als die Probenentnahme, die chromatographische Trennung und Detektion der Analyten und die Auswertung der erhaltenen Daten. Insbesondere ist eine manuelle Probenaufbereitung sehr

zeitaufwendig und vor allem fehleranfällig. Die Entdeckung neuer endogener Markermoleküle und die engmaschige Kontrolle von Arzneimittelspiegeln führten in letzter Zeit zu einem Anstieg der zu untersuchenden Proben. Diese erhöhte Probenanzahl war gekoppelt an einen erhöhten Personalbedarf. Eine weitere Motivation für die Automation der Probenaufbereitung war der steigende Probendurchsatz, der gekoppelt ist an immer kürzere Rücklaufzeiten, und den Druck, die Analysekosten zu reduzieren. In letzter Konsequenz ermöglicht die Automation, das vorhandene Personal effizienter einzusetzen. Natürlich bringt eine Automation der Probenaufbereitung neben der Kostenreduktion auch weitere Vorteile: Neben dem gesteigertem Probendurchsatz wird auch eine Verbesserung der Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse erzielt.

Proteinpräzipitation, Flüssig-Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion sind sehr breit angewendete Probenaufbereitungstechniken, jedoch lässt sich die Festphasenextraktion technisch am leichtesten in ein LC-System implementieren, da es sich hier auch um ein chromatographisches Verfahren handelt. Die große Vielfalt an stationären Phasen und das daraus resultierende große Einsatzgebiet unterstützen die Automation der Festphasenextraktion.

2.3.1 Manuelle Festphasenextraktion (off-line SPE)

Abb. 8 zeigt die manuelle Festphasenextraktion in ihren einzelnen Arbeitsschritten. Diese Arbeitsweise der Festphasenextraktion wird als off-line Verfahren bezeichnet⁴⁴.

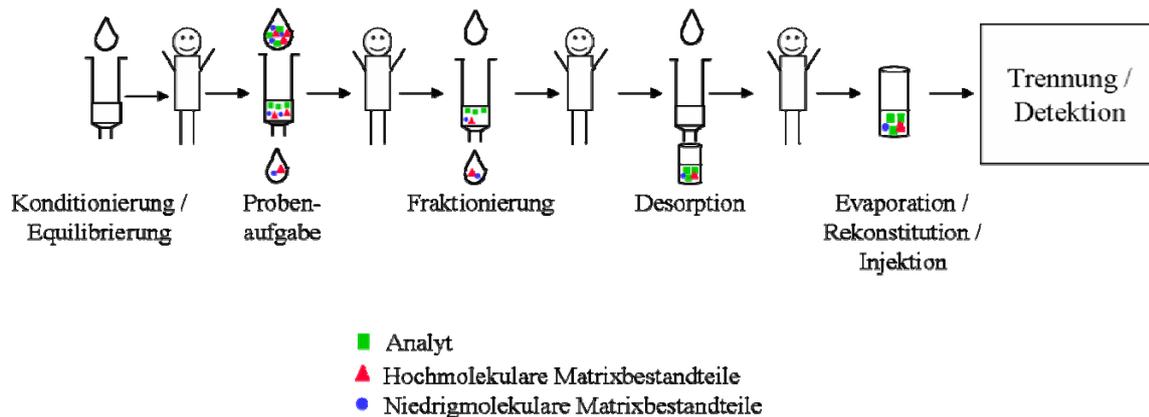


Abb. 8: *Modus operandus der Festphasenextraktion: off-line*⁴⁵

Das Adsorbens befindet sich in Kunststoff-Kartuschen und muss vor dem Auftragen der biologischen Probe konditioniert und equilibriert werden. Nach manueller Aufgabe der Probe wird diese durch Zusatz von Waschflüssigkeit fraktioniert. Dabei werden hoch- und niedermolekulare Verbindungen in den Abfall gespült. Die extrahierte Probe wird mittels eines Lösemittels mit ausreichender Elutionskraft vom Adsorbens desorbiert. Aufgrund des hohen Elutionsvolumens muss das Eluat vor der Injektion in ein Analysesystem zumeist eingeeengt werden. In manchen Fällen ist das Elutionsmittel nicht kompatibel mit dem Material der analytischen Trennsäule. Dann wird das Eluat bis zur Trockene eingedampft und in einem anderen Lösemittel rekonstituiert.

Die manuelle Festphasenextraktion besitzt jedoch, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, mehrere gravierende Nachteile.

2.3.2 Einsatz von Robotern (at-line SPE)

Eine Möglichkeit zur Automation der Festphasenextraktion ist der Einsatz von Pipettierrobotern, wie beispielsweise Tecan Genesis™, Packhard Multiprobe 104DT™ oder Beckman Coulter Biomek 2000^{46,47,48}. Diese können alle manuellen Schritte (Konditionierung/Equilibrierung der Kartusche, Auftragen der Probe, Fraktionierung der Probe, Desorption des Analyten und anschließende Injektion des Eluenten in ein gekoppeltes Analysesystem) durchführen. **Abb. 9** stellt solch ein Pipettiersystem schematisch dar.

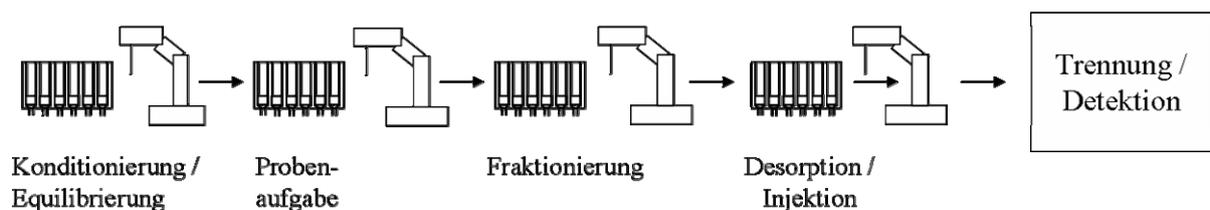


Abb. 9: *Modus operandus der Festphasenextraktion: at-line*⁴⁵

Das halbautomatisierte Verfahren der Festphasenextraktion wird mit at-line SPE bezeichnet⁴⁴.

Diese Vorgehensweise der Probenaufbereitung ist nicht frei von Nachteilen. Einerseits ist die Anschaffung des Pipettierroboters sehr kostspielig und lohnt sich nur in Einrichtungen mit sehr hohem Probendurchsatz. Andererseits ist die at-line Festphasenextraktion mit den gleichen Fehlern behaftet wie das off-line SPE-Verfahren.

2.3.3 Apparative Integration (on-line SPE)

Die apparative Integration der Festphasenextraktion beruht auf der direkten Kopplung der SPE über ein Schaltventil mit dem analytischen System. Bei dieser Kombination spricht man von on-line SPE⁴⁴.

Die Firma Spark Holland B.V. (Emmen, Niederlande) hat ein solches on-line SPE-System entwickelt (**Abb. 10**)⁴³. Das Symbiosis™ Pharma System nutzt zur Festphasenextraktion Einmal-SPE-Kartuschen (10 x 1 mm I.D. oder 10 x 2 mm I.D.). Diese können mit unterschiedlichsten Packungsmaterialien bestückt sein und sind sehr druckbeständig (bis 350 bar).



Abb. 10: *Symbiosis™ Pharma System (Spark Holland B.V., Emmen, Niederlande)*⁴⁹

Das Symbiosis™ Pharma System besteht aus mehreren Einheiten. Das Reliance-Modul setzt sich aus einem temperierten Probengeber (4-20°C) und „Probenhotel“ zusammen. Die mobile Phase für die LC-Trennung wird durch 2 Hochdruckpumpen befördert. Die Extraktionseinheit setzt sich aus 2 Hochdruckkolbenpumpen (engl.: High Pressure Dispenser; HPD) und einer automatischen SPE-Kartuschen-Austauscheinheit (engl.: Automated Cartridge Exchange; ACE), in der vier 6-Wege-Ventile integriert sind, zusammen.

Das Symbiosis™ Pharma System ist sehr flexibel und ermöglicht auch ohne Geräteumbau, das System im LC-Modus, d.h. ohne Extraktionseinheit, zu nutzen. Dabei wird die injizierte Probe mittels der Hochdruckpumpen direkt auf die LC-Säule transferiert. Durch Änderung der Konfiguration des Systems allein in der Software ist es möglich, das Gerät im „XLC-Mode“, d.h. mit integrierter Festphasenextraktion, zu nutzen. Dabei wird die injizierte Probe mittels der HPD in der linken Kartuschenklemme der ACE fraktioniert. Ein Greifer setzt nach Beendigung des Fraktionierungsvorganges die SPE-Kartusche in die rechte Kartuschenklemme der ACE. Durch Schaltung eines der 6-Wege-Ventile der ACE wird der LC-Pumpenfluss auf die SPE-Kartusche umgeleitet und der Analyt auf die gekoppelte analytische Trennsäule transferiert. (**Abb. 11**)

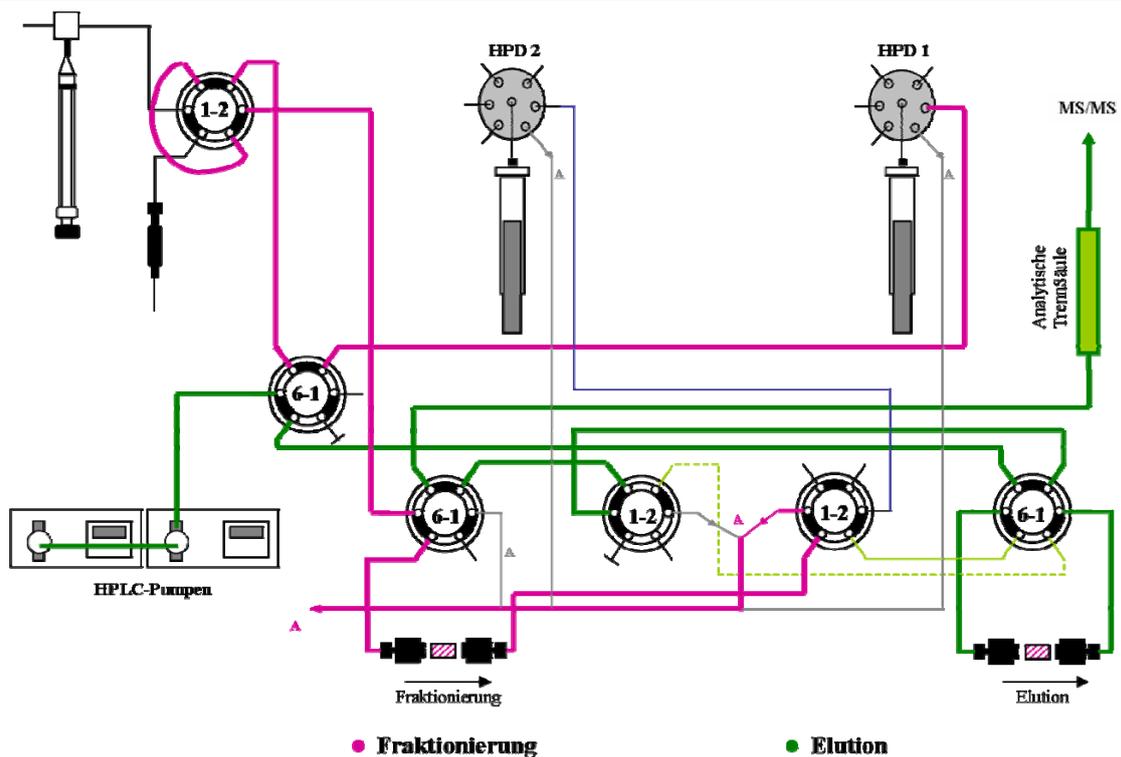


Abb. 11: Schematische Darstellung eines SPE-LC-MS/MS-Verfahrens mit dem Symbiosis™ Pharma System

Die leichtverständliche Software, die integrierte Anleitung zur Methodenentwicklung und die Kartuschen-Kits, die SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Packungsmaterialien enthalten, erleichtern die Methodenentwicklung an diesem System erheblich.

Ein weiterer Vorteil des Symbiosis™ Pharma Systems ist der parallele Ablauf zweier Arbeitsschritte. Auf der linken Kartuschen-Klemme findet die Fraktionierung der Probe statt, während gleichzeitig die zuvor extrahierte Probe in der rechten Kartuschen-Klemme auf die analytische Trennsäule transferiert wird. Dies ermöglicht eine verkürzte Analysezeit und somit einen hohen Probendurchsatz^{50,51}.

Nachteile dieses Systems sind die hohen Anschaffungskosten des Geräts und die zurzeit noch hohen laufenden Kosten durch den Einsatz von Einmal-Kartuschen (ca. 2€ pro Kartusche).

Eine kostengünstigere Alternative zum Symbiosis™ Pharma System ist die Kopplung einer kleinen SPE-Säule mit einem LC-System über ein konventionelles Schaltventil. (Abb. 12)

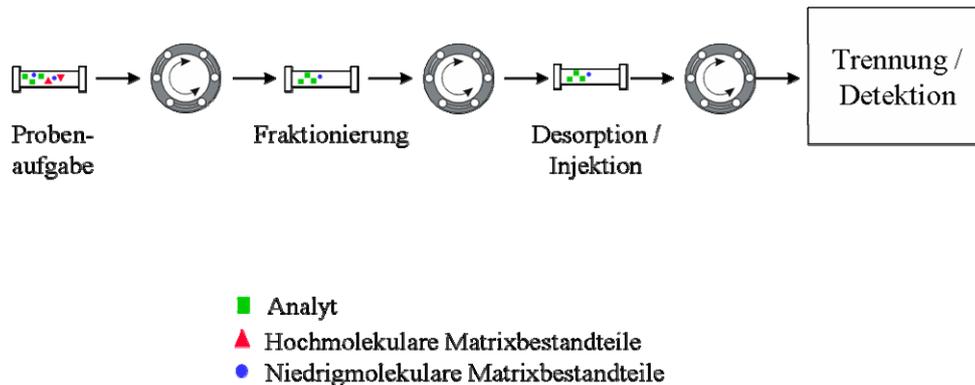


Abb. 12: *Modus operandus der Festphasenextraktion: on-line*⁴⁵

Synonyme für solch ein 2-Säulen-System sind Säulenschaltung oder LC-LC-Kopplung. Ein 2-Säulen-System wurde erstmals von Huber et al. 1971 für die Bestimmung von Östrogen im Urin von Schwangeren eingesetzt⁵². Viele weitere Anwender folgten diesem Schaltschema aufgrund der leichten Instrumentalisierung, der relativ geringen Kosten und der leichten Handhabung^{53,54}. Selbst nach über 35 Jahren sind im ersten Halbjahr 2008 44 Publikationen erschienen, die dieses Schaltsystem verwenden⁵⁵. Die meisten Publikationen über on-line SPE kommen aus dem Bereich der Arzneistoffanalytik^{56,57,58,59}.

Vorteile der on-line Festphasenextraktion:

- Vollständige Automation
- Reduziertes Infektionsrisiko aufgrund eines geschlossenen Systems
- Volle GLP (Good Laboratory Practise)-Tauglichkeit
- Gesteigerte Nachweisempfindlichkeit, da die gesamte aufgearbeitete Probe analysiert wird
- Schonende und schnelle Aufarbeitung empfindlicher Proben
- Kostenersparnis aufgrund geringeren Personalaufwandes / reduzierter Analysezeiten
- Erhöhter Probendurchsatz
- Kürzere Rücklaufzeiten
- Geringere Fehlerquellen, da keine manuellen Schritte notwendig sind
- Verbesserte Präzision und Richtigkeit der Messergebnisse
- SPE und LC, d.h. Probenaufbereitung und analytische Trennung, können parallel durchgeführt werden

Nachteile der on-line SPE:

- Eventuelle systematische Fehler
- Carry-over bei unzureichender Fraktionierung

Obwohl sich die Festphasenextraktion großer Beliebtheit erfreut, stößt man bei der Nutzung von konventionellem Packungsmaterial an Grenzen, wenn eine biologische Probe ohne Vorbehandlung direkt auf eine SPE-Säule injiziert wird. Dies führte zur Entwicklung von speziellen Packungsmaterialien für SPE-Säulen. Diese ermöglichen eine direkte (siehe Kapitel 2.4) und wiederholte Injektion von proteinhaltigen Flüssigkeiten, wie z.B. Humanplasma.

2.4 Maßgeschneiderte SPE-Materialien / Restricted Access Material (RAM)

2.4.1 Definition

Injiziert man unbehandelte biologische Flüssigkeiten auf konventionelle Packungsmaterialien von SPE-Kartuschen oder -Säulen, so kommt es zu einer Präzipitation oder unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Trägermaterial und der biologischen Matrix. Dies hat zur Folge, dass die Selektivität und Kapazität des Adsorbens stark vermindert werden. Darüber hinaus ist eine quantitative Fraktionierung der biologischen Probe so nicht möglich. Die Entwicklung von sogenannten maßgeschneiderten SPE-Materialien mit eingeschränkter Zugänglichkeit (engl.: Restricted Access Material; RAM) ermöglichte es erstmals, aus unbehandelten komplexen biologischen Flüssigkeiten, Zielanalyten abzutrennen und anzureichern⁶⁰. Dies ist möglich, da während der Fraktionierung auf den RAM-Säulen zwei chromatographische Verfahren simultan durchgeführt werden. Es findet gleichzeitig ein größenausschlusschromatographischer und adsorptionschromatographischer Vorgang statt. Der eingeschränkte Zugang von Molekülen ab einer bestimmten Größe in das Innere des porösen Trägermaterials ist das Funktionsprinzip dieser SPE-Materialien. Dadurch werden Matrixbestandteile, die

aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in die Poren eindringen können, mit dem Totvolumen eluiert. Im Inneren der Poren finden selektive Wechselwirkungen mit niedermolekularen Probenkomponenten statt. Charakteristisch für diese Materialien ist, dass auf der Kontaktoberfläche dieser Trägermaterialien keinerlei Wechselwirkungen stattfinden.

Der Begriff „Restricted Access Material“ (RAM) wurde erstmals 1991 von Desilets eingeführt⁶¹. In den letzten 17 Jahren wurden weitere RA-Materialien entwickelt, die heute kommerziell erhältlich sind^{62,63,64,65,66}.

2.4.2 Eigenschaften der RA-Materialien

Ausschlussbarriere

Prinzipiell sind physikalische oder chemische Ausschlussbarrieren für die eingeschränkte Zugänglichkeit von Makromolekülen, wie z.B. Proteinen, ins Poreninnere der RA-Materialien verantwortlich.

Definierte Porengrößen des Trägermaterials stellen physikalische Ausschlussbarrieren dar. Ein Beispiel von maßgeschneiderten RA-Materialien ist das von Boos et al. entwickelte LiChrospher[®] ADS (Alkyl-Diol-Silica). Dieses poröse Trägermaterial hat einen Porendurchmesser von 6 nm und verhindert dadurch, dass Probenbestandteile, die ein Molekulargewicht > 15 kDa haben, in das Poreninnere eindringen können und somit mit dem Totvolumen eluieren^{44,65}.

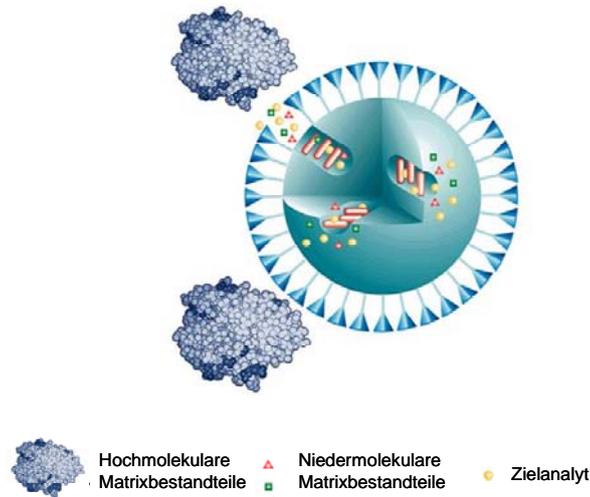


Abb. 13: Schematische Darstellung von LiChrospher® ADS⁶⁷

Unter einer chemischen Ausschlussbarriere versteht man ein polymeres Netzwerk, das makromolekularen Verbindungen den Zugang in das Innere der Pore unmöglich macht. Das Polymer umhüllt das Trägermaterial adsorptiv oder kovalent. Der Vernetzungsgrad des synthetischen oder natürlichen Polymers bestimmt die Zugänglichkeit zu den Poren.

Restricted Access Materialien können in verschiedene Typen eingeteilt werden (**Abb. 14**).

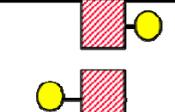
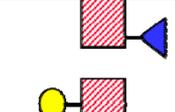
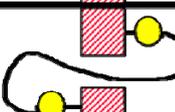
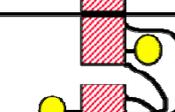
Oberfläche Innen Außen		Ausschluss- barriere	Topochemie	Typ	Kommerziell erhältliche RAM
		physikalisch	uniform	A	ChromSpher 5 Biomatrix (Chrompack) CAT-PBA (Recipe)
		physikalisch	dual	B	ISRP GFFII (Regis Technologies) LiChrospher ADS (Merck, VWR) LiChrospher XDS (Merck, VWR)
		chemisch	uniform	C	HiSep (Supelco) Capcell Pak MF (Shiseido)
		chemisch	dual	D	Ultrabiosep (Shandon) BioTrap 500 (Chrom Tech) SPS (Regis Technologies) MAYI-ODS (Shimadzu)

Abb. 14: Unterteilung der RA-Materialien (nach Boos)⁶⁴

Biokompatible äußere Oberfläche

Das besondere Merkmal der RA-Materialien nach Boos ist die biokompatible Außenoberfläche⁶⁴. Sie ist chemisch inert, elektronenneutral und hydrophil. Dadurch können makromolekulare Probenmoleküle, z.B. Proteine oder Kohlenhydrate, keine irreversiblen Wechselwirkungen mit der Außenoberfläche des Trägermaterials eingehen und werden mit dem Totvolumen eluiert.

Adsorptive innere Oberfläche

Aufgrund ihrer geringen Größe können niedermolekulare Verbindungen, z.B. der Analyt, ungehindert in das Poreninnere eindringen. Dort kommt es zu selektiven Wechselwirkungen (Ionenaustauschchromatographie, Umkehrphasenchromatographie, Affinitätschromatographie) zwischen dem Analyten und der inneren Oberfläche und somit zur Extraktion und Anreicherung des Analyten.

Nicht nur die Ausschlussbarriere ist ein Unterscheidungsmerkmal für RA-Materialien. Auch die Topochemie der stationären Phasen wird in die Unterteilung miteinbezogen. Dabei wird zwischen Materialien mit uniformer und dualer Modifikation unterschieden. Hat das Trägermaterial im Inneren der Pore und auf der Außenoberfläche die gleichen Liganden, dann spricht man von uniformer Topochemie. Unterscheiden sich die Liganden auf der inneren und äußeren Oberfläche liegt eine duale Topochemie vor.

3 Massenspektrometrie in der Bioanalytik (MS/MS)

In den letzten Jahren war ein exponentielles Wachstum von Tandem-massenspektrometrischen Anwendungen im Bereich der klinischen Labordiagnostik, Pharmakologie und Toxikologie zu verzeichnen^{68,69}. Sinkende Anschaffungskosten sowie rasche methodische und apparative Entwicklung sind für diese verstärkte Anwendung verantwortlich. In der klinischen Labordiagnostik reicht das Anwendungsspektrum der MS/MS gegenwärtig von der Bestimmung einzelner klinisch-chemischer Parameter bis hin zur qualitativen und quantitativen Multiparameteranalyse.

Früher wurde der Routinebetrieb in der Labordiagnostik mittels HPLC-UV, HPLC-Fluoreszenzdetektoren oder HPLC-Elektrochemischer-Detektor durchgeführt⁷⁰. Doch die Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC/LC) mit der Massenspektrometrie hat diese Verfahren weitgehend verdrängt. Die Entwicklung der Atmosphärendruck-Ionisationstechniken (APCI und ESI) in der Massenspektrometrie führte zu einer hohen analytischen Sensitivität und Spezifität, Robustheit, geringen Analysenkosten und der Möglichkeit von Hochdurchsatzanalysen. Somit ist die LC-MS/MS attraktiv für die Anwendung in der klinischen Labordiagnostik.

Derzeitige routinemäßige Einsatzgebiete einer LC-MS/MS-Plattform in der Labordiagnostik sind das Therapeutisches Drug Monitoring (TDM), die Hormondiagnostik und das Neugeborenenenscreening (NBS) auf angeborene Stoffwechseldefekte.

3.1 Ionisationstechniken

In der Massenspektrometrie werden Moleküle in positive und negative Ionen überführt. Die Ionisation der Moleküle kann auf verschiedene Weisen erfolgen:

- Elektronenstoß-Ionisation (EI; electron impact)
- Chemische Ionisation (CI)
- Feld Ionisation (FI)
- Feld Desorption (FD)
- Fast atom bombardment (FAD)
- Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation (MALDI; matrix-assisted laser desorption ionisation)
- Elektrospray-Ionisation (ESI)
- Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)
- Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI; atmospheric pressure photo ionisation)

In Kombination der Massenspektrometrie mit der Flüssigkeitschromatographie sind ESI und APCI, die am häufigsten eingesetzten Methoden. Aus diesem Grund werden diese im Kapitel 3.1.1. und 3.1.2 näher vorgestellt. ESI, APCI und APPI sind Ionisationstechniken, die unter Atmosphärendruck durchgeführt werden. Ihr Einsatzgebiet ist vom Molekulargewicht und der Polarität des Analyten abhängig^{68,71}. **Abb. 15** zeigt schematisch die Einsatzgebiete der drei Ionisationstechniken unter Atmosphärendruck.

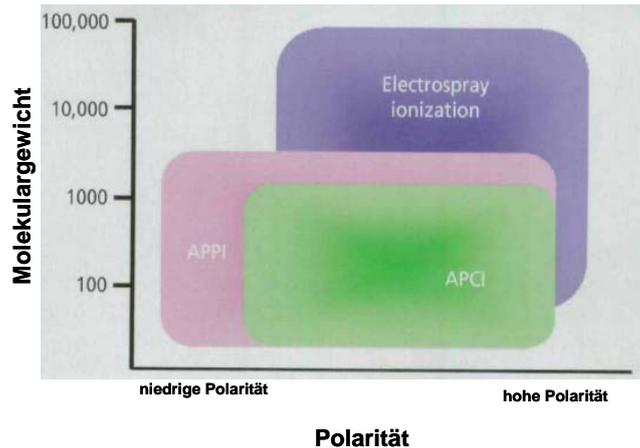


Abb. 15: Einsatzgebiete von ESI, APPI, APCI⁷¹

3.1.1 Elektrospray Ionisation (ESI)

Bei ESI handelt es sich um eine sanfte Ionisationstechnik, die in der Regel in einem intakten Muttermolekül mit einfacher oder multipler Ladung resultiert. Der schematische Aufbau einer Elektrospray Ionisationsquelle (ESI-Quelle) ist in

Abb. 16 dargestellt. Der Analyt befindet sich im LC-Eluentenstrom und wird direkt in eine Edelmetallkapillare geleitet. Zwischen der Kapillare und dem Eingang zum Analysator des Massenspektrometers wird eine Spannung angelegt. Diese Potentialdifferenz ist bei geringen Flüssen ausreichend, um den Eluentenfluss in ein Aerosol umzuwandeln. Der zugeführte Stickstofffluss (Nebuliser Gas) unterstützt die feine Tröpfchenbildung bei höheren Flussraten. Bildet die Edelmetallkapillare den positiven Pol des Feldes, so werden die Tröpfchen positiv geladen (ESI+). Vom ESI- spricht man, wenn das Aerosol negativ geladen wird. Damit die Ionisation der Analyten stattfindet, müssen diese bereits im Eluenten ionisiert vorliegen. Aufgrund der hohen Temperatur des zugeführten Stickstoffflusses und der angelegten Spannung verkleinert sich die Größe der Analyt-Lösemittel-Tröpfchen. Gleichzeitig steigt aber die Dichte des elektrischen

Feldes auf der Tröpfchenoberfläche. Die Abstoßung gleichartiger Ladungen (Coulomb-Explosion) tritt bei Erreichen des Rayleigh Limits auf⁷².

Es gibt zwei Theorien über die Bildung von freien Ionen in der Gasphase. Beim Ion Evaporation Model (IEM) wird postuliert, dass schon aus größeren geladenen Tröpfchen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. Folgt man der Theorie der immer kleiner werdenden Tröpfchen, die am Ende nur noch einen Durchmesser von 1nm haben und im ionisierten Zustand verbleiben, so wird vom Charge Residue Model (CRM) gesprochen^{73,74}.

Die gelösten Ionen werden durch elektrische Kräfte in die Gasphase transferiert und treten dann in das Hochvakuum des Massenanalysators ein.

Muss aufgrund hoher Flussraten der Eluent vor dem Eintreten in die Quelle gesplittet werden, so wird bevorzugt mit der ESI-Quelle gearbeitet. ESI ist konzentrationssensitiv und bildet damit eine Ausnahme in der Massenspektrometrie. Die Sensitivität lässt sich ähnlich wie bei der Arbeit mit dem UV-Detektor durch Konzentrierung der Analyte steigern, jedoch ist sie unabhängig von der in die Quelle eingebrachten Flussrate⁷⁵.

Abb. 16 stellt schematisch eine ESI-Quelle dar.

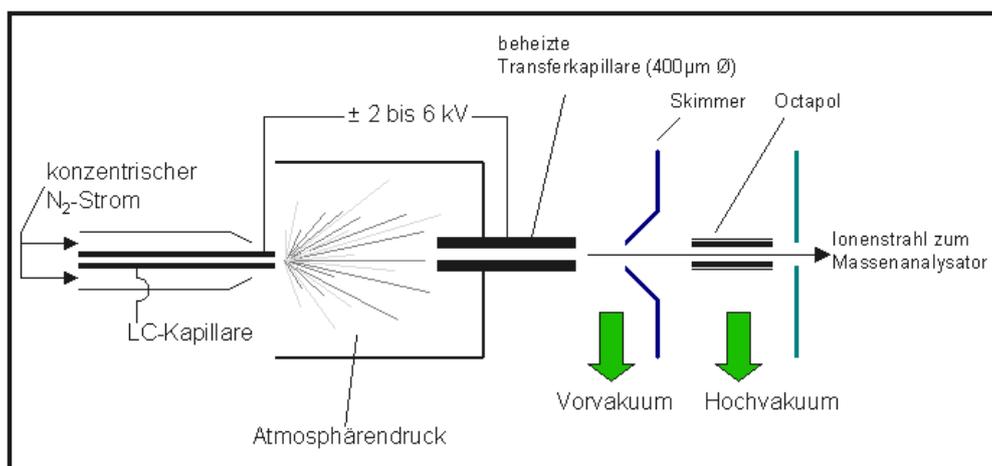


Abb. 16: Schematische Darstellung einer ESI-Quelle⁷⁶

3.1.2 Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)

Bei der APCI handelt es sich wie auch bei ESI um eine sanfte Ionisationstechnik. Dabei erfolgt die Bildung von Quasimolekülonen durch die Vermittlung protonierter Lösemittelmoleküle. **Abb. 17** zeigt schematisch den Aufbau einer solchen APCI-Quelle.

Der Analyt gelangt zusammen mit dem LC-Eluenten durch Versprühen aus einer an die Säule gekoppelten Düse in ein beheiztes Quarzrohr. Die Innenwand dieses Rohres hat eine Temperatur zwischen 400-600°C, was zu einem sofortigen Verdampfen des Lösemittels und Desolvatisierung der noch ungeladenen Analytmoleküle führt. Vor dem Quarzrohr ist eine spitze Nadel (Corona-Nadel) positioniert, auf der eine Spannung von 5 kV anliegt. Zwischen der Corona-Nadel und einer Gegenelektrode bildet sich ein Plasma, das die in Überzahl vorhandenen Lösemittelmoleküle bevorzugt mit elektrischer Ladung versorgt (Corona-Entladungsreaktion). Dadurch entstehen zunächst protonierte Lösemittelmoleküle (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+), die mit den Analytmolekülen Cluster bilden. Innerhalb des Clusters kommt es zur Protonenübertragung zwischen den Lösemittelionen und den Analyten. Kommt es zur Zerstörung der Cluster, werden protonierte Analytionen frei⁴².

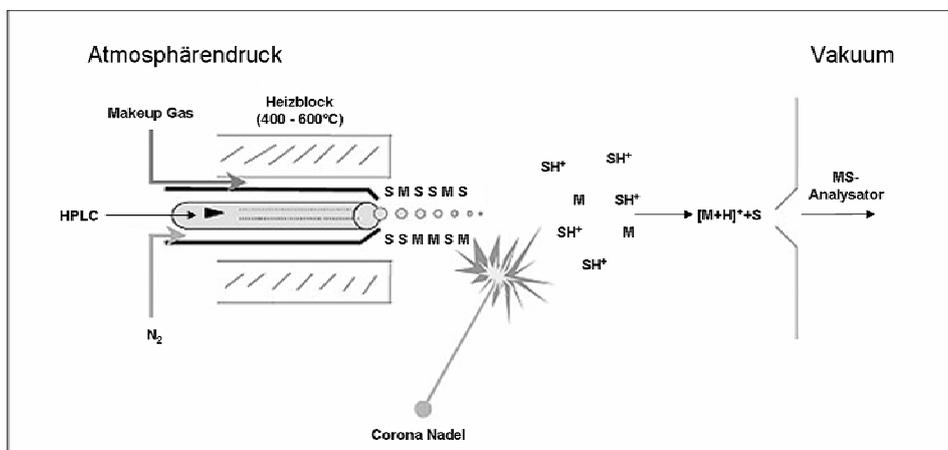


Abb. 17: Schematische Darstellung einer APCI-Quelle [in Anlehnung an⁷⁷]

Die APCI-Quelle ist massenflusssensitiv. Diese Art der Ionenquelle empfiehlt sich, wenn bei höheren Flüssen ohne Splitter gearbeitet werden kann. Im Vergleich zur ESI-Quelle stellt die APCI-Quelle die spezifischere Ionisation dar und liefert damit weniger ausgeprägte Matrixeffekte⁷⁵. Wenn es die Anwendung zulässt, bevorzugen Experten die APCI- gegenüber der ESI-Quelle⁷⁵.

3.2 Tandem-Massenspektrometrie

Bei der Tandem-Massenspektrometrie wird die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Auftrennung geladener Ionen proportional zu ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z). Somit erfasst der Detektor das „Gewicht“ ionisierter Moleküle und ihrer Fragmente. Das Tandemmassenspektrometer (MS/MS) zeichnet sich durch seine hohe analytische Sensitivität und Spezifität aus.

In dieser Arbeit wurde mit einem Triple-Quadrupol-MS gearbeitet, jedoch werden in der Praxis noch Quadrupol-Ion-Trap-MS und Quadrupol-Time-of-Flight-MS als weitere Tandemmassenspektrometer eingesetzt.

3.2.1 Aufbau

Bei einem Triple-Quadrupol-MS befinden sich hinter der Ionenquelle drei Quadrupol-Analysatoren (Q1, Q2, Q3), die hintereinander angeordnet sind. Im Q1 wird ein bestimmtes Ionenmolekül ausgewählt, das im Q2 durch Zugabe eines inerten Kollisionsgases (Argon, Helium oder Stickstoff) in Fragmentationen zerfällt. Die Fragmentationen (Produktionen) sind substanzspezifisch und vergleichbar mit einem Fingerabdruck der

einzelnen Analyte⁶⁹. Im Q3 werden die gebildeten Produktions detektiert. Der Aufbau eines Triple-Quadrupols-MS ist in **Abb. 18** zu sehen.

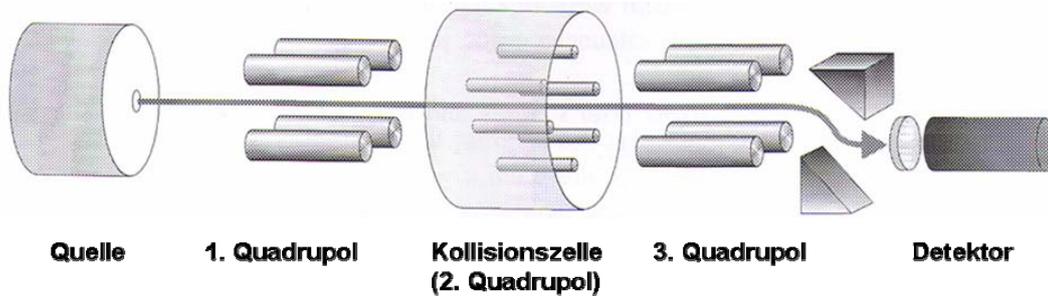


Abb. 18: Schematischer Aufbau eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS)⁷⁸

Q2 wird auch Kollisionszelle genannt. Die in der Kollisionszelle angelegte Spannung ist für das Ausmaß der Fragmentierung verantwortlich. Eine starke Fragmentierung wird durch Anlegen hoher Kollisionsenergien erreicht. Dabei kann es jedoch auch schon zur Fragmentierung des Produktions kommen, was sich in einer Minderung der Signalintensität widerspiegelt.

3.2.2 Modi operandi

Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer kann in verschiedenen Modi bedient werden. **Abb. 19** stellt die verschiedenen Modi operandi dar.

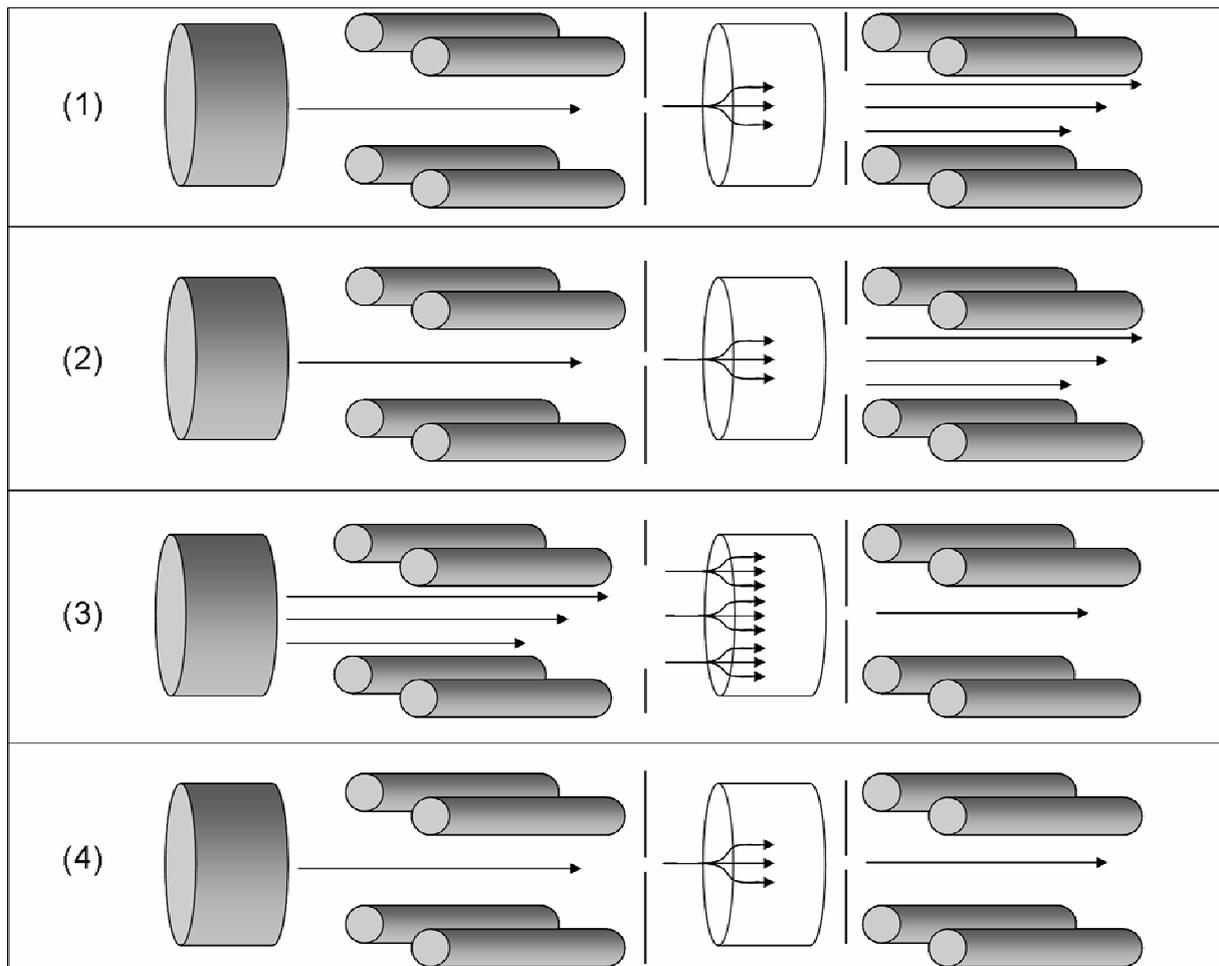


Abb. 19: Schematische Darstellung der Modi operandi eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS) [in Anlehnung an⁷⁸]

-
- (1) Produktionen Scan / Daughter Scan: Dabei wird im Q1 ein Ion selektiert, das in der Kollisionszelle (Q2) fragmentiert wird. Die Produktionen werden im Q3 detektiert.
 - (2) Neutral Loss Scan: Bestimmung einer Massendifferenz zwischen Q1 und Q3, die das Ergebnis der Abspaltung eines Neutralteilchens in der Kollisionszelle ist. Beispiele für Neutralteilchen sind H₂O (18 Da), CH₃OH (32 Da), NH₃ (18 Da) oder Glucuronsäurereste (176 Da).
 - (3) Precursorionen Scan / Parent Scan: Im Q3 wird die Masse eines festgelegten Fragments detektiert, das in der Kollisionszelle entsteht. Um herauszufinden, welche Moleküle dieses spezifische Fragment bilden, wird im Q1 über einen vorher definierten Massenbereich gescannt.
 - (4) Multiple Reaction Monitoring (MRM) / Selected Ion Monitoring (SIM): Herausfiltern von Molekülen bestimmter m/z-Verhältnisse. Das heißt, es werden nur Analyte detektiert, die bestimmte Produktionen und Precursorionen bilden. Im MRM-Modus erreicht man die selektivste und empfindlichste Arbeitsweise der Tandem-Massenspektrometrie.

Ein einfacher Massenspektrometer hat nur einen Quadrupol und ist deshalb begrenzt auf die Aufnahmearten MS-Scan und SIM (Single Ion Monitoring). Beim MS-Scan werden alle vorhandenen Ionen in einem bestimmten Massenbereich detektiert. Im SIM-Modus werden in einem definierten Massenbereich nur ausgewählte Ionen aufgezeichnet. Auch mit einem Triple-Quadrupol-MS ist es möglich, diese Modi operandi durchzuführen, in dem nur der Q1 genutzt wird.

Trotz der hohen Selektivität und Empfindlichkeit des Tandem-MS ist es unumgänglich, eine effektive Probenaufbereitung und selektive LC-Trennung der Detektion voranzustellen. Einerseits sind biologische Proben stark matrixbelastet und können durch hervorgerufene Matrixeffekte zu verfälschten Analyseergebnissen führen⁷⁹. Andererseits ist die chromatographische Trennung insbesondere dann wichtig, wenn Adukkte

der zu detektierenden Analyte isobar sind, wie z.B. Metabolite von Ciclosporin A mit Ciclosporin D. Bei unzureichender Trennung dieser Isobare oder der Koelution von isobaren Metaboliten werden falsche Analyseergebnisse generiert^{13,80}.

3.3 Matrixeffekte

Der Tandem-MS ist ein sehr selektiver und spezifischer Detektor und führte daher zu dem Trugschluss, dass eine vorangehende Probenaufbereitung und chromatographische Trennung der zu untersuchenden Analyte kaum oder gar nicht notwendig sei. Teilweise wird sogar das Prinzip „Dilute and Shoot“ verfolgt^{81,82}. Jedoch hat dies Konsequenzen: Eine unzureichende Probenaufbereitung und schlechte chromatographische Trennung führt zu Matrixeffekten. Matrixeffekte können entweder das Signal im Detektor unterdrücken oder verringern. In diesem Fall spricht man von Ionensuppression. Wird das Analytsignal durch Matrixeffekte verstärkt, wird dies als Ion-Enhancement bezeichnet.

Die ESI-Ionisationstechnik wird vom Großteil der Anwender genutzt, da sie auch für labilere Analyten einsetzbar ist. Nachteilig ist, dass es bei dieser Ionisationstechnik zu stärker ausgeprägten Matrixeffekten kommt als unter Nutzung einer APCI-Quelle⁷⁰. Dies ist auf die spezifischere Ionisation der APCI-Quelle zurückzuführen^{75,83}.

Durch die Veränderung der Ionisationseffizienz der Analytmoleküle aufgrund von koelutierenden Substanzen kommt es zu Fehlern bei der Quantifizierung der Analyte^{13,70}.

Matrixeffekte sind unterschiedlich ausgeprägt und abhängig von mehreren Faktoren^{70,79,84,85}:

- Spezies
- Art der biologischen Probe
- Zeitpunkt der Probenentnahme
- Komedikation
- Art und Menge der Nahrungszufuhr
- Art der Probenaufbereitung
- Konzentration des Analyten (Matrix-Analyt-Verhältnis)
- Flussrate
- Ionisationstechnik

Allgemein ist zusammenzufassen, dass Matrixeffekte große Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit, Richtigkeit, Signalintensität und somit Quantifizierung haben. Kommt es zu Unregelmäßigkeiten bei der Berechnung der Verhältnisse gebildeter Ionen, können unter anderem zu geringe Analytkonzentrationen gefunden werden⁷⁰.

3.3.1 Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte

Da Matrixeffekte in der Tandem-MS eine prägende Rolle spielen, wurden sie in den letzten Jahren intensiv untersucht^{70,79,84,85,86,87}.

Man weiß, dass Matrixeffekte durch koeluiierende Verbindungen ausgelöst werden. Dabei handelt es sich entweder um externe, nicht verdampfbare Verbindungen, wie z.B. Salze (Sulfate, Phosphate) oder Ionenpaar-Reagenzien (PEG, TFA), endogene Verbindungen, wie beispielsweise Metabolite, Phospholipide, Dioctylphthalate oder andere Zusätze, wie Heparin oder EDTA^{70,88}. Zudem können auch eingesetzte Löse-mittel wie Methanol zu unterschiedlich stark ausgeprägten Matrixeffekten führen⁸⁹.

Diskutiert werden folgende Mechanismen zur Entstehung der Matrixeffekte^{83,86,90}:

- (1) Zielanalyt und Matrixbestandteile konkurrieren um die maximale Ionisationseffizienz
- (2) Besitzen die Matrixbestandteile eine höhere Protonen-Affinität als die Zielanalyten, so können bereits ionisierte Analyte beim Übergang in die Gasphase durch einen Protonen-Transfer wieder neutralisiert werden. Dies hat zur Folge, dass sie im Tandem-MS nicht mehr detektiert werden können.
- (3) Anwesende Matrixbestandteile erhöhen die Viskosität und Oberflächenspannung des Aerosols. Dadurch sinkt die Verdampfungseffizienz und eine geringere Anzahl an Zielanalyten kann in die Gasphase übergehen.

3.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte

Es gibt zwei Methoden zur Bestimmung von Matrixeffekten. Bei der statischen Vorgehensweise injiziert man eine Standardprobe und eine gespikete Matrixprobe, die beide die gleiche Analytkonzentration aufweisen, in ein Analysesystem. Sind im Chromatogramm Intensitätsunterschiede zu erkennen, so schließt man auf einen aus der Matrixprobe hervorgerufenen Matrixeffekt⁹¹. Diese Vorgehensweise zur Bestimmung von Matrixeffekten ist sehr schnell. Nachteilig ist jedoch, dass sich keine Rückschlüsse auf mögliche Ionensuppressionen / Ionenenhancements während der gesamten Analysezeit ziehen lassen, da der eingetretene Matrixeffekt nur an der Position des Analytpeaks sichtbar ist.

Alternativ wurde 1999 die dynamische Vorgehensweise für die Bestimmung von Matrixeffekten von King et al. beschrieben⁷⁹. **Abb. 20** zeigt schematisch den Ablauf und den apparativen Aufbau der Nachsäulen-Infusionstechnik.

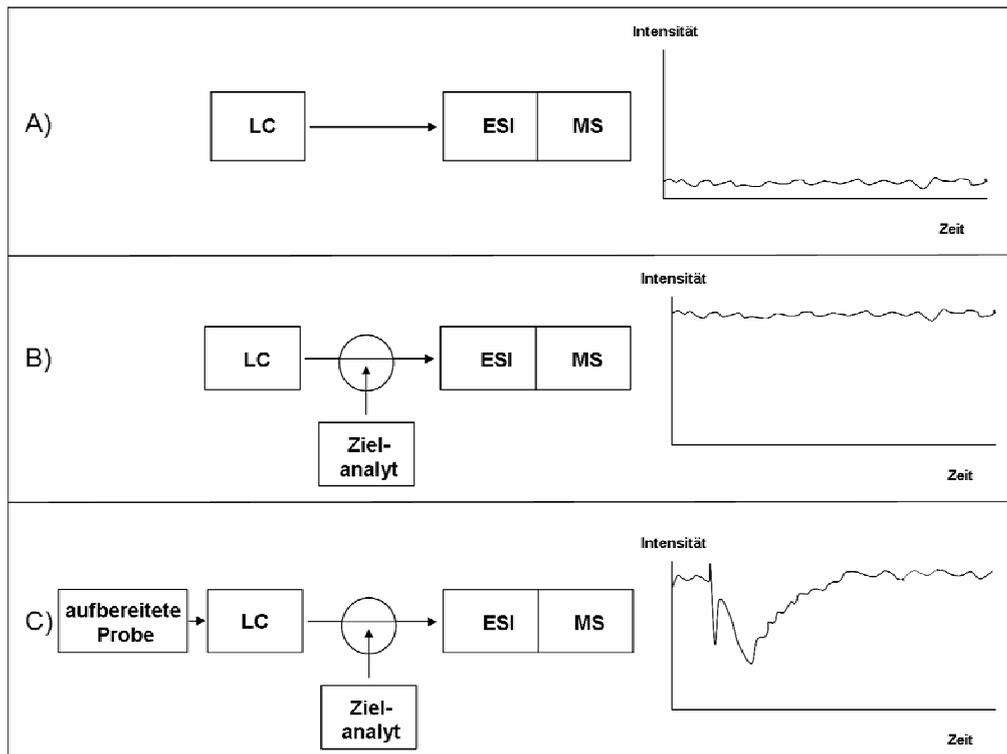


Abb. 20: Schematische Darstellung der Nachsäulen-Infusionstechnik zur Bestimmung von Matrixeffekten [in Anlehnung an⁹²]

Über ein T-Stück zwischen dem LC-System und dem Massenspektrometer wird mittels einer Spritzenpumpe die Analytlösung in den Eluentenstrom infundiert (B). Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wird eine matrixbehaftete, analytfreie Probe in das System injiziert (C). Kommt es zu Störungen in der Basislinie, so ist das auf Matrixeffekte von koelutierenden Verbindungen zurückzuführen. Der experimentelle Aufwand ist relativ groß, hat jedoch den Vorteil, dass die Beeinflussung des Analytions über die gesamte Analysezeit sichtbar ist.

3.3.3 Lösungsansätze

Es gibt einige mehr oder weniger geeignete Lösungsansätze zur Elimination von Matrixeffekten. Ein relativ zeitaufwendiger Ansatz sind komplexe Extraktionsprotokolle. Alternativ kann auf schnelle Gradienten zurückgegriffen werden, die es erlauben, den Analyten zu einem gewünschten Zeitpunkt und ohne eine Koelution von anderen Verbindungen von der analytischen Trennsäule in das Tandem-MS zu transferieren. Jedoch werden Gradienten aufgrund der Reequilibrierung der analytischen Trennsäule vor der Injektion der nächsten Probe nicht bevorzugt eingesetzt. Auch die Verwendung interner Standards ist kein Garant für eine Austarierung der Matrixeffekte. Denn Matrixeffekte können die Intensitätsverhältnisse zwischen Analyt und Internem Standard verändern. Ein idealer Interner Standard ist Isotopen-markiert mit dem Analyten. Solche Internen Standards zeigen ein fast identisches Verhalten in der Probenaufbereitung, Chromatographie und Ionisation im Vergleich zu den Zielanalyten. Nachteilig ist jedoch, dass die Herstellung von Isotopen mit hohem Reinheitsgrad oft sehr schwierig und teuer ist⁹¹. Es ist nicht auszuschließen, dass der Isotopen-markierte Interne Standard mit dem Zielanalyten verunreinigt ist, was zu Fehlern in der Quantifizierung führen kann⁹³. Eine weitere Möglichkeit, den Internen Standard der zu untersuchenden Probe zuzuführen, ist die Nachsäulen-Infusion⁹⁴.

Die Arbeit von Georgi et al. hat auf eindrucksvolle Weise gezeigt, dass durch eine selektive multidimensionale Festphasenextraktion, Matrixeffekte effektiv eliminiert werden können⁸⁴.



4 Immunsuppressiva

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunsuppressiva als Modellanalyten herangezogen. Immunsuppressiva sind Wirkstoffe, die überwiegend erythrozytär gebunden sind^{2,3,4,5,6,7,8}. Zur Bestimmung des Blutspiegels dieser Analytgruppe muss diese erst aus den Blutzellen freigesetzt werden. Zurzeit geschieht dies vorwiegend durch Proteinpräzipitation^{9,10,11,12,26,28,95,96}. In dieser Arbeit wird die integrierte Probenvorbereitung in ein vollautomatisches Analysesystem vorgestellt. Es wird gezeigt, dass eine Hitzeschockbehandlung (engl.: heat shock treatment; HST) zu einer Desintegration von zellulären Bestandteilen führt. Dieser Prozess sollte unter anderm durch die Analyse der Immunsuppressiva näher charakterisiert werden.

Immunsuppressiva sind Substanzen, die die Immunreaktion unterdrücken können. Die Ausschaltung eines der wichtigsten Abwehrsysteme des Organismus ist gerechtfertigt oder zwingend notwendig bei Organtransplantationen und Autoimmunkrankheiten. Immunologische Reaktionen sind nur dann sinnvoll, wenn der Körper zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ unterscheiden kann. Die Unterteilung von Immunsuppressiva erfolgt in verschiedene Gruppen⁹⁷:

- Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus
- Glucocorticoide (z.B. Methylprednisolon)
- Zytostatika (z.B. Mycophenolat-mofetil)
- Monoklonale und polyklonale Antikörper (z.B. Basiliximab)

In dieser Arbeit wird ausschließlich mit den Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus und den entsprechenden Internen Standards gearbeitet.

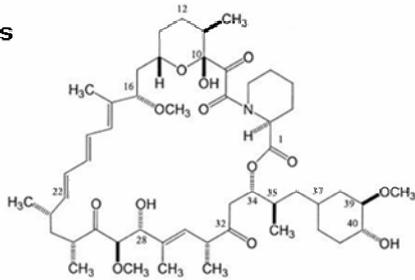
4.1 Strukturformeln

In **Abb. 21** sind die Strukturformeln der untersuchten Immunsuppressiva und der verwendeten Internen Standards abgebildet. Sirolimus und Everolimus sind sich strukturell sehr ähnlich und beziehen sich aus diesem Grund auf denselben Internen Standard. Der Analyt und der entsprechende Interne Standard unterscheiden sich nur minimal. Auf die strukturellen Unterschiede wird mit einem Pfeil hingewiesen⁹⁸.

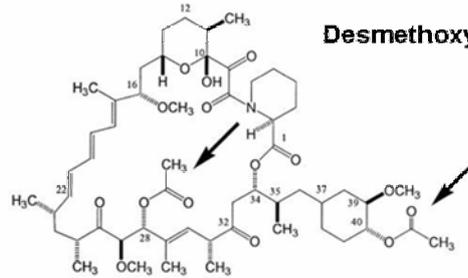
Immunsuppressiva

Interne Standards

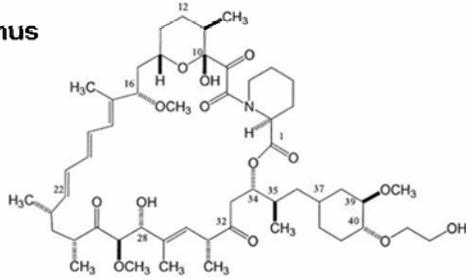
Sirolimus



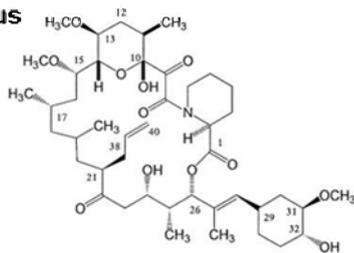
Desmethoxysirolimus



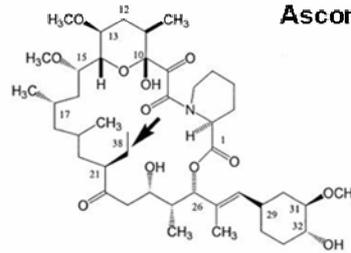
Everolimus



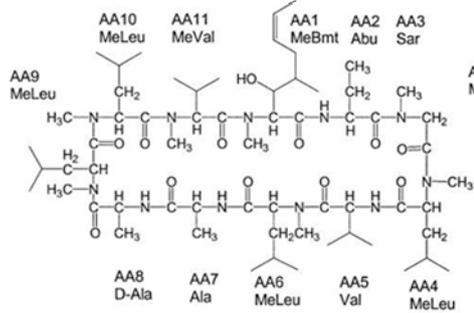
Tacrolimus



Ascomycin



Ciclosporin A



Ciclosporin D

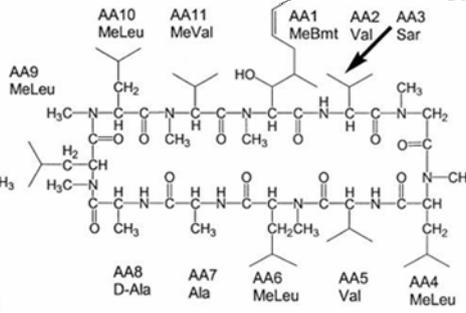


Abb. 21: Strukturformeln der Immunsuppressiva und ihrer Internen Standards⁹⁸

Tab. 4 fasst die Charakteristika der hier untersuchten Immunsuppressiva zusammen^{97,99,100,101}.

Immunsuppressivum	Molekulargewicht [Da]	Herkunft	Handelsname
Sirolimus (Rapamycin)	913,6	Streptomyces hygroscopicus	Rapamune®
Everolimus	957,2	Streptomyces hygroscopicus	Certican®
Tacrolimus (FK 506)	803,5	Streptomyces tsukubaensis	Prograf®
Ciclosporin A	1203,6	Tolypocladium inflatum	Sandimmun® Optoral

Tab. 4: Charakteristika von Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus und Ciclosporin A

Alle hier aufgeführten Immunsuppressiva haben gemein, dass sie gut löslich sind in Alkohol, Acetonitril, Ether und halogenisierten Kohlenwasserstoffen. Sie sind praktisch unlöslich in Wasser und aliphatischen Kohlenwasserstoffen⁹⁸.

Ciclosporin A ist ein neutrales, zyklisch-homodetes und sehr lipophiles Peptid aus elf Aminosäuren. Sieben der elf Stickstoffatome der Peptidbindungen sind methyliert, wodurch ein wesentlicher Beitrag zu hoher Lipophilie und Proteasestabilität geleistet wird. Die vier restlichen Stickstoffatome bilden Wasserstoffbrücken zu bestimmten Carbonylfunktionen aus¹⁰². Tacrolimus weist keine Strukturverwandschaft mit Ciclosporin A auf. Es ist ein Makrolid-Lakton mit einem hemiketal-maskierten α , β -Diketonamid in einem 23-gliedrigen Ring⁹⁷. Sirolimus ist ein 31-gliedriges Makrolid-Lakton, aus dem partialsynthetisch durch Einführung einer Ethoxygruppe in Position 40 Everolimus erzeugt wird. Beide Immunsuppressiva haben strukturell Ähnlichkeit mit Tacrolimus. Im Vergleich zu Sirolimus zeigt Everolimus eine höhere Wasserlöslichkeit aufgrund der Ethoxygruppe in Position 40.

4.2 Pharmakodynamik

Unter Pharmakodynamik versteht man die Lehre von der Beeinflussung biologischer Funktionen oder Strukturen durch Pharmaka¹⁰³. Pharmakodynamische Untersuchungen beschäftigen sich demnach mit Fragen nach:

- der Art der Wirkung (Wirkprofil, Wirkqualität, Struktur-spezifische und Struktur-unspezifische Wirkungen)
- dem Wirkmechanismus
- dem Ort der Wirkung
- der Wirkstärke
- der Wirksamkeit

4.2.1 Wirkmechanismus

Die meisten Immunsuppressiva hemmen die Proliferation aktivierter Lymphozyten. Es wird unterschieden zwischen den Calcineurin-Inhibitoren und den mTOR-Inhibitoren.

4.2.1.1 Calcineurin-Inhibitor

Ciclosporin A und Tacrolimus gehören zu der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Ihr Hauptangriffspunkt sind die T-Lymphozyten. Sobald der Wirkstoff in die Zelle gelangt

ist, bildet er einen Komplex mit einem bestimmten zelleigenen Protein, dem so genannten Immunophilin. Während Tacrolimus einen Komplex mit dem FK-Bindungs-Protein-12 (FKBP-12, 12 kDa) einem Makrophilin bildet, lagert sich Ciclosporin A an Cyclophilin (17 kDa) an¹⁰⁴. Der Komplex aus Wirkstoff und Immunophilin lagert sich an den Calcineurin-Calmodulin-Komplex an. Es kommt zur Hemmung der Ca²⁺-abhängigen Protein-Phosphatase-Aktivität. Somit können die 2 Phosphatgruppen vom nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) nicht abgespalten werden. Als Folge kann dieser Transkriptionsfaktor nicht in den Zellkern eindringen (Translokation) und die Interleukin-2-Synthese (IL-2) wird auf diese Weise gehemmt. IL-2 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Lymphozytenproliferation. Infolge des Mangels an IL-2 kommt es nicht zur Ausreifung von T-Zellen zu zytotoxischen Zellen⁹⁷. In **Abb. 22** ist unter anderem der Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren nochmals dargestellt.

Zusätzlich blockiert Tacrolimus die Aktivierung von B-Zellen, und zwar einerseits indirekt durch die Wirkung auf die T-Zellen, andererseits direkt über die Blockade der TNF- α -Gentranskription. In vitro zeigt Tacrolimus eine 10-100fach stärkere immunsuppressive Wirkung im Vergleich zu Ciclosporin A¹⁰⁵. Somit ist der therapeutische Bereich von Tacrolimus ungefähr 20-mal niedriger im Vergleich zu Ciclosporin A.

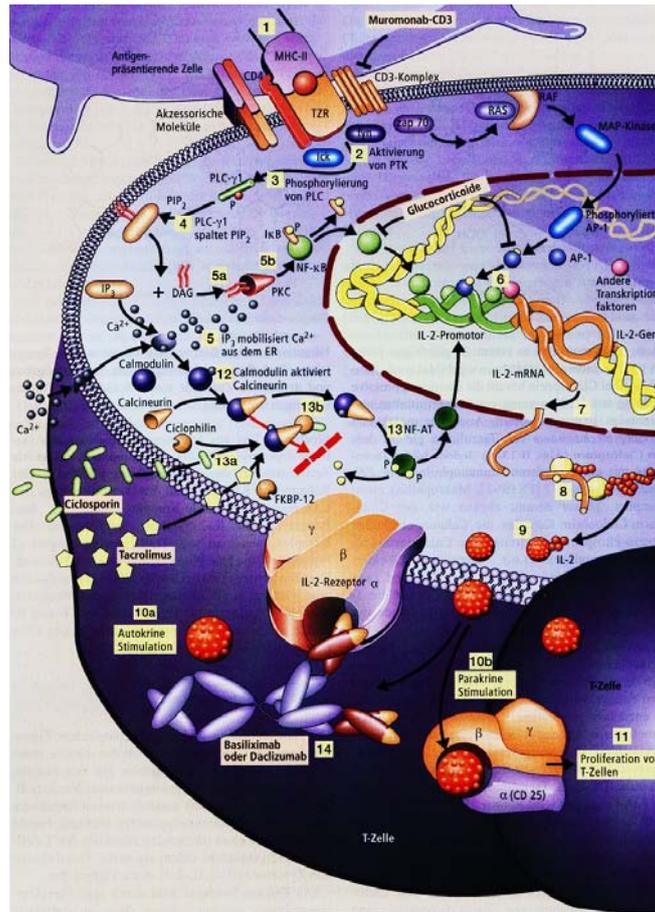


Abb. 22: Schematische Darstellung des zellulären Wirkmechanismus von Cyclosporin A und Tacrolimus⁹⁷

4.2.1.2 mTOR-Inhibitor

Sirolimus und Everolimus zählen zu den mTOR-Inhibitoren. Auch bei den mTOR-Inhibitoren sind die T-Lymphozyten die Hauptangriffspunkte. Beide Immunsuppressiva binden an das FK-Bindungs-Protein-12 (FKBP-12), wie auch Tacrolimus. Werden diese Immunsuppressiva zusammen eingenommen, so sind nur etwa 5 % des FKBP-12 besetzt, wenn die Dosierung im therapeutischen Bereich liegt⁸. Somit stellt eine Einnahme in Kombination kein Problem dar. Die Affinität von Sirolimus an FKBP-12 zu binden, ist etwa 2-mal höher als bei Everolimus⁸.

Der Everolimus/Sirolimus-FKBP-12-Komplex bindet nicht an den Calcineurin-Calmodulin-Komplex, so dass die Synthese von IL-2 nicht gehemmt ist. Sirolimus und Everolimus hemmen die Zellproliferation, indem sie den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase unterbinden.

Die Everolimus/Sirolimus-FKBP-12-Komplexe binden an „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) und hemmen somit die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Aktivität dieses Enzyms. Dies führt zur Blockade von mehreren spezifischen Signaltransduktionspfaden^{100,106}. Durch die Blockade von mTOR kann die ribosomale Serin/Threonin-Kinase p70 S6 nicht phosphoryliert werden. Diese ist verantwortlich für die Translation von Proteinen wie z.B. der cyclinabhängigen Kinasen (CDK) und Cyclinen, die für die Steuerung der Zellproliferation unentbehrlich sind. Die immunsuppressive Wirkung von Everolimus und Sirolimus resultiert aus der Hemmung der Lymphozytenaktivierung. **Abb. 23** stellt neben dem Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren auch den der mTOR-Inhibitoren schematisch dar¹⁰⁷.

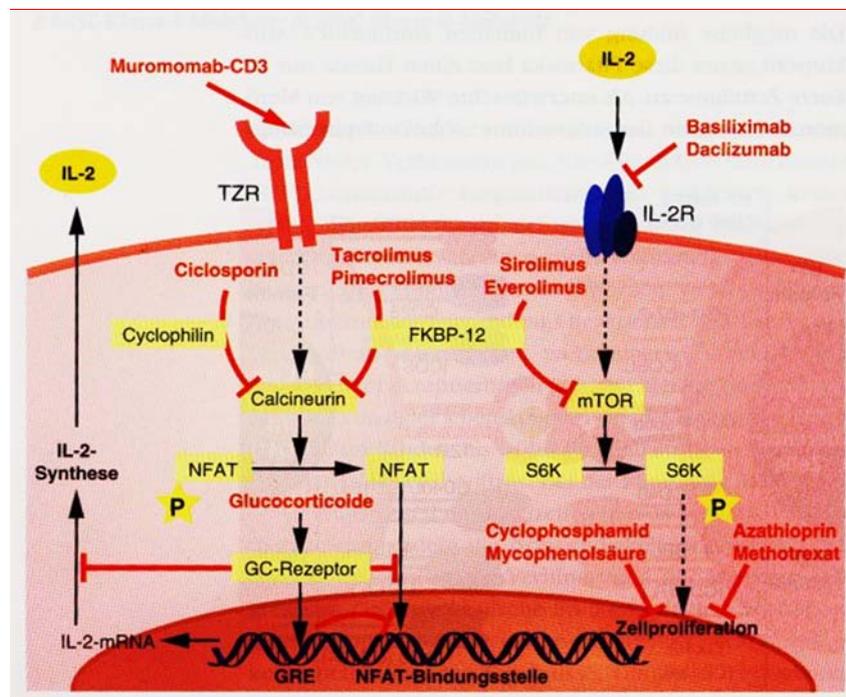


Abb. 23: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von Calcineurin- und mTOR-Inhibitoren¹⁰⁷

4.2.2 Anwendung und Dosierung

Neben dem Einsatz nach Organtransplantationen und bei Autoimmunkrankheiten werden Immunsuppressiva noch bei folgenden Krankheiten verwendet⁹⁷:

- Chronische Glomerulonephritis mit nephrotischem Syndrom
- Chronische entzündliche Darmerkrankungen
- Myasthenia gravis
- Autoimmunhepatitis
- Entzündliche rheumatische Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis)
- Thrombopenische Purpura

Die Dosierung der Immunsuppressiva nach der Organtransplantation ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen unterscheidet man zwischen der Initialtherapie, die 2-3 Monate nach der Transplantation angewandt wird, und der darauf folgenden Erhaltungstherapie. Des Weiteren spielt das transplantierte Organ eine Rolle bei der Dosierung der Immunsuppressiva. Immunsuppressiva können auch kombiniert eingesetzt werden und somit muss auch hier die Dosierung angepasst werden. Das Alter des Patienten hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Dosierung. Da immunsuppressive Wirkstoffe eine geringe therapeutische Breite haben, wird die richtige Dosierung durch das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) individuell bestimmt. Dabei werden die Talspiegelkonzentrationen des Wirkstoffes erfasst.

Tab. 5 fasst die Dosierung und Talspiegelkonzentration der verschiedenen Immunsuppressiva in Abhängigkeit vom transplantierten Organ und dem Zeitpunkt der Therapie zusammen.

Immunsuppressivum	Zeitpunkt der Therapie	Dosierung in Abhängigkeit vom Organ			Therapeutischer Bereich [ng/mL]	Begleittherapie
		Herz	Niere	Leber		
Ciclosporin A	Initial Erhalt		6-14 mg/kg/d 2-6 mg/kg/d		100-400	
Tacrolimus	Initial Erhalt	0,1-0,3 mg/kg/d	0,2-0,3 mg/kg/d	0,075-0,3 mg/kg/d	5-20	
Sirolimus	Initial Erhalt		6 mg/d 1-2 mg/d		4-12 12-20	CyA und GC GC
Everolimus	Initial Erhalt		1,5 mg/d 1,5-3 mg/d		3-8	CyA und GC

Tab. 5: Dosierung und Talspiegelkonzentrationen verschiedener Immunsuppressiva^{101,106,108,109}

4.2.3 Nebenwirkungen

Immunsuppressiva sind Wirkstoffe mit einer geringen therapeutischen Breite. Ihre Dosierung muss individuell angepasst werden, wobei das Ziel, die ausreichende Wirksamkeit in Kombination mit den geringst möglichen Nebenwirkungen sein muss. Bei einer Unterdosierung des Arzneistoffes kommt es zur Abstoßung des Transplantates. Wird der Wirkstoff in zu hohen Dosen verabreicht, wird die toxische Dosis schnell erreicht.

Ciclosporin A:

Eine bekannte mit Ciclosporin A assoziierte Nebenwirkung ist deren Einfluss auf die Nierenfunktion. Dies äußert sich in einer Erhöhung der Serum-Kreatininwerte und durch eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate^{110,111}. Diese unerwünschte Wirkung ist dosisabhängig. Als weitere Nebenwirkungen werden reversible Störungen der Leberfunktion, Kardiotoxizität, Tremor, Hirsutismus, Gingivahyperplasie und Ödeme beobachtet. In seltenen Fällen kommt es vor allem bei Kindern zu Hypertonie mit Flüssigkeitsretention und Krämpfen kommen⁹⁷.

Im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva ist Ciclosporin A nur wenig myelotoxisch und kann somit auch bei Knochenmarktransplantationen angewandt werden.

Tacrolimus:

Die unerwünschten Wirkungen von Tacrolimus gleichen denen von Ciclosporin A mit Ausnahme von Gingivahyperplasie und Hirsutismus. Zusätzlich werden noch neurotoxische Symptome wie Parästhesien und Störungen des Sehvermögens beobachtet. Weiterhin zählen depressive Zustände, sowie Schlaf- und Traumstörungen zu den unerwünschten Wirkungen^{7,97}.

Sirolimus:

Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen von Sirolimus sind Thrombozytopenie, Anämie und Hypokaliämie. Zusätzlich werden noch Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und Bauchschmerzen beobachtet. Auch Infektionen des Harntraktes, periphere Ödeme, Akne, Diarrhoe und erhöhte Laktat-Dehydrogenase-Werte gehören zu den unerwünschten Wirkungen von Sirolimus¹⁰⁶. Die Häufigkeit der Nebenwirkung kann mit ansteigendem Sirolimus-Talspiegel zunehmen.

Die Immunsuppression erhöht die Anfälligkeit, Lymphome oder andere bösartige Neubildungen vor allem der Haut zu entwickeln.

Everolimus:

Unter der Einnahme von Everolimus wurden Leukopenie, Hypercholesterinämie und Hyperlipidämie als sehr häufige unerwünschte Wirkungen beobachtet. Häufig traten Thrombozytopenie, Anämie, Hypertriglyzeridämie, Hypertonie, Bauchschmerzen, Diarrhoe, Erbrechen und Akne auf. Gelegentlich wurde auch über Hautausschlag, Myalgie, Leberfunktionsstörungen und männlichen Hypogonadismus berichtet^{8,101}.

4.2.4 Interaktionen

Ciclosporin A¹⁰⁹:

Ciclosporin A wird wie viele andere Arzneistoffe auch über das CYP 3A4-System metabolisiert. Werden Arzneimittel oder pflanzliche Heilmittel, die auch über das CYP 3A4 verstoffwechselt werden, gleichzeitig mit Ciclosporin A eingenommen, so kann es zur Induktion oder Inhibition von CYP 3A4 kommen. Dies führt zu einer Senkung oder Erhöhung des Blutspiegels von Ciclosporin A. Zu den CYP 3A4-Inhibitoren gehören beispielsweise die Azol-Antimykotika. Ketoconazol beeinträchtigt die Metabolisierung von Ciclosporin A so stark, dass bei gleichzeitiger Gabe eine bis zu 80 %ige Ciclosporin A-Dosisverringering notwendig ist. Eine Erhöhung des Ciclosporin A-Blutspiegels wird des Weiteren bei gleichzeitiger Einnahme von Ciclosporin A mit Makrolidantibiotika, Verapamil, Allopurinol, Metoclopramid, Danazol, Diltiazem und hohen Dosen von Methylprednisolon beobachtet.

Zu den CYP 3A4-Induktoren gehören Barbiturate, Metamizol, Phenytoin, Rifampicin, Johanniskraut und Carbamazepin. Durch gleichzeitige Einnahme dieser Wirkstoffe mit Ciclosporin A kommt es zu einer erhöhten Clearance von Ciclosporin A und somit zu einer deutlichen Senkung des Wirkstoff-Blutspiegels. Orlistat führt zu einer verringerten Resorption von Ciclosporin A.

Flavonoide, die im Grapefruitsaft enthalten sind, inhibieren das CYP 3A4-System. Das führt zu einem Anstieg des Ciclosporin A-Blutwertes. Da die Konzentration an Flavonoiden durch den Hersteller nicht kontrolliert werden kann, sollte eine gemeinsame Einnahme von Ciclosporin A mit Grapefruitsaft vermieden werden.

Tacrolimus⁹⁷:

Tacrolimus wird über CYP 3A4 metabolisiert. Dies führt zu einer Senkung oder Erhöhung der Blutwerte von Tacrolimus. Eine Erhöhung der Blutspiegel von Tacrolimus ist stark ausgeprägt bei gleichzeitiger Einnahme von Azol-Antimykotika, dem Macrolid-Antibiotikum Erythromycin und den HIV-Proteasehemmern, wie z.B. Ritonavir. Schwächer ausgeprägt ist die Wechselwirkung mit Omeprazol, Verapamil, Clarithromycin und Clotrimazol. Auch Grapefruitsaft erhöht den Tacrolimus-Blutspiegel und sollte daher vermieden werden.

Eine starke Senkung des Tacrolimus-Blutspiegels beobachtet man bei gleichzeitiger Einnahme von Rifampicin, Phenytoin oder Johanniskraut. In diesem Fall muss die Dosierung von Tacrolimus erhöht werden. Carbamazepin, Metamizol und Isoniazid können die Tacrolimuskonzentration im Blut herabsetzen.

Tacrolimus selbst ist als CYP 3A4-Hemmer bekannt. Daher führt die gleichzeitige Einnahme von Tacrolimus mit Wirkstoffen, die durch CYP 3A4 metabolisiert werden, zu einer Beeinträchtigung dieser. Bei der gleichzeitigen Gabe von Tacrolimus wird die Halbwertszeit von Ciclosporin A verlängert. Zusätzlich kann es zu synergistischen, additiven nephrotoxischen Effekten kommen. Aus diesen Gründen wird die gleichzeitige Verabreichung von Tacrolimus und Ciclosporin A nicht empfohlen.

Bei gleichzeitiger Gabe von Amphotericin B und Ibuprofen mit Tacrolimus konnte eine verstärkte Nephrotoxizität beobachtet werden. Zusätzlich kann die Wirksamkeit von Impfungen durch Immunsuppressiva beeinträchtigt werden.

Sirolimus¹⁰⁶:

Auch Sirolimus wird vorwiegend über das CYP 3A4-System metabolisiert. Zusätzlich ist es ein Substrat vom P-Glykoprotein. Zu den ausgeprägten CYP 3A4-Inhibitoren zählen Ketoconazol, Voriconazol, Diltiazem, Verapamil und Erythromycin. Schwache Hemmstoffe des CYP 3A4-Systems sind Nicardipin, Fluconazol, Cimetidin, Bromocriptin und Proteasehemmer. All diese Wirkstoffe führen bei gleichzeitiger Einnahme mit Sirolimus zu einer Erhöhung des Sirolimus-Blutspiegels.

Rifampicin, Phenobarbital, Phenytoin, Carbamazepin und Johanniskraut gehören zu den CYP 3A4-Induktoren. Durch die Erhöhung des Sirolimus-Metabolismus wird der Sirolimus-Blutspiegel gesenkt.

Auch die im Grapefruitsaft enthaltenen Flavonoide beeinflussen die CYP 3A4-vermittelte Metabolisierung. Daher sollte die Sirolimus-Medikation nicht zusammen mit Grapefruitsaft durchgeführt werden.

Ciclosporin A ist ein CYP 3A4-Substrat und wirkt daher inhibitorisch auf den Sirolimus-Stoffwechsel. Beim Absetzen von Ciclosporin A muss die Sirolimus-Dosis um das 4-fache erhöht werden.

Everolimus¹⁰¹:

Everolimus wird wie Sirolimus vorwiegend über CYP 3A4 und zusätzlich über das P-Glykoprotein metabolisiert. Zusätzlich wird Everolimus über das CYP 2D6-System verstoffwechselt. Inhibitoren des CYP 3A4-Systems sind Azol-Antimykotika, Makrolidantibiotika, Verapamil, Diltiazem und Proteaseinhibitoren wie Indinavir. Bei kombinierter Einnahme dieser Wirkstoffe mit Everolimus kommt es zu einer Erhöhung des Everolimus-Blutspiegels. Wird Everolimus gleichzeitig mit Johanniskraut, Carbamazepin, Phenytoin oder Efavirenz eingenommen, so bewirken diese CYP 3A4-Induktoren die Senkung der Everolimus-Blutkonzentration. Auch bei der Medikation mit Everolimus sollte Grapefruitsaft vermieden werden, da dieser Flavonoide enthält, die das CYP 3A4-System inhibieren.

4.3 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik befasst sich mit den Konzentrationsveränderungen von Pharmaka im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit. Sie charakterisiert somit die Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung des Arzneistoffes.

4.3.1 LADME-Modell

Das **LADME**-Modell ist eine Möglichkeit, die Pharmakokinetik von Arzneistoffen darzustellen¹¹².

L steht für Liberation, also der Freisetzung des Wirkstoffs aus der Darreichungsform. Mit Hilfe von Freigabe-Tests kann die Freisetzung in vitro bestimmt werden.

A beschreibt die Absorption des Wirkstoffes. Die Absorption hängt von den Eigenschaften des Arzneistoffes ab (Löslichkeit, Lipophilie, Molekulargewicht und chemische Struktur), dem Anwendungsort, der Anwendungsart, der Dosierung, den Hilfsstoffen, der Kontaktzeit mit der Resorptionsoberfläche und der Durchblutung des resorbierenden Organs.

D ist die Abkürzung für den Begriff Distribution. Gemeint sind damit die dem Arzneistoff zur Verfügung stehenden Verteilungsräume. Diese können extrazellulär und/oder intrazellulär sein.

Die Metabolisierung wird mit **M** dargestellt und ist ein Synonym für die Biotransformation. Lipophile Substanzen werden nach der glomerulären Filtration der Niere weitgehend rückresorbiert und können deshalb nur langsam renal ausgeschieden werden. Der Körper ist bestrebt diese Substanzen in hydrophilere, leichter ausscheidbare Stoffe umzuwandeln. Dabei können toxische oder auch potente Metabolite entstehen.

E steht für Elimination, d.h. Ausscheidung des Wirkstoffes. Die häufigste Elimination findet über die Niere oder Leber statt. Moleküle mit einem Molekulargewicht < 300 Da werden renal ausgeschieden. Ist das Molekulargewicht > 500 Da wird der Arzneistoff bilär ausgeschieden. Intestinale und pulmonale Eliminationen finden weitaus seltener statt. Herzglykoside werden beispielsweise in das Darmlumen sekretiert, flüchtige Substanzen wie ätherische Öle oder inhalative Narkotika werden über die Lunge ausgeschieden.

4.3.2 Pharmakokinetische Daten

Tab. 6 fasst die pharmakokinetischen Daten für die Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus zusammen. Die Bioverfügbarkeit (BV) ist abhängig von der Nahrungsaufnahme. Deshalb sollte die Einnahme des Medikaments konstant vor oder während der Mahlzeit stattfinden.

Pharmakokinetische Parameter	Ciclosporin A	Tacrolimus	Sirolimus	Everolimus
BV [%]	35	20-25	10	16
Einfluss Nahrung	+	+	+	+
t_{\max} [h]	2,5	1-3	1	1,3-1,8
$t_{1/2}$ [h]	6-16	3,5-40	62 ±16	18-35
c_{\min} [ng/mL]	100-400	5-15	4-20	3-15
V	3,5 L/kg	1300 L	5,6-16,7 L/kg	342 ±107 L
c_{ss} [d]	k.A	3	5-7	7
B/P-Verhältnis	60/40	20/1	36/1	75/25
PE [%]	90	> 98,8	92	75
CYP	3A4	3A4	3A4	3A4, 2D6
Kot [%]	94	98	91	98
Niere [%]	6	2	2	2

Tab. 6: *Pharmakokinetische Daten für Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus*^{2,8,106,108,109}

In Plasma sind die Immunsuppressiva vorwiegend an Albumin und saures α 1-Glykoprotein gebunden. Eine Ausnahme stellt Ciclosporin A dar. Hier ist der im Plasma vorliegende Wirkstoff vorwiegend an Lipoproteine gebunden. **Abb. 24** zeigt die Verteilung von Ciclosporin A in Vollblut.

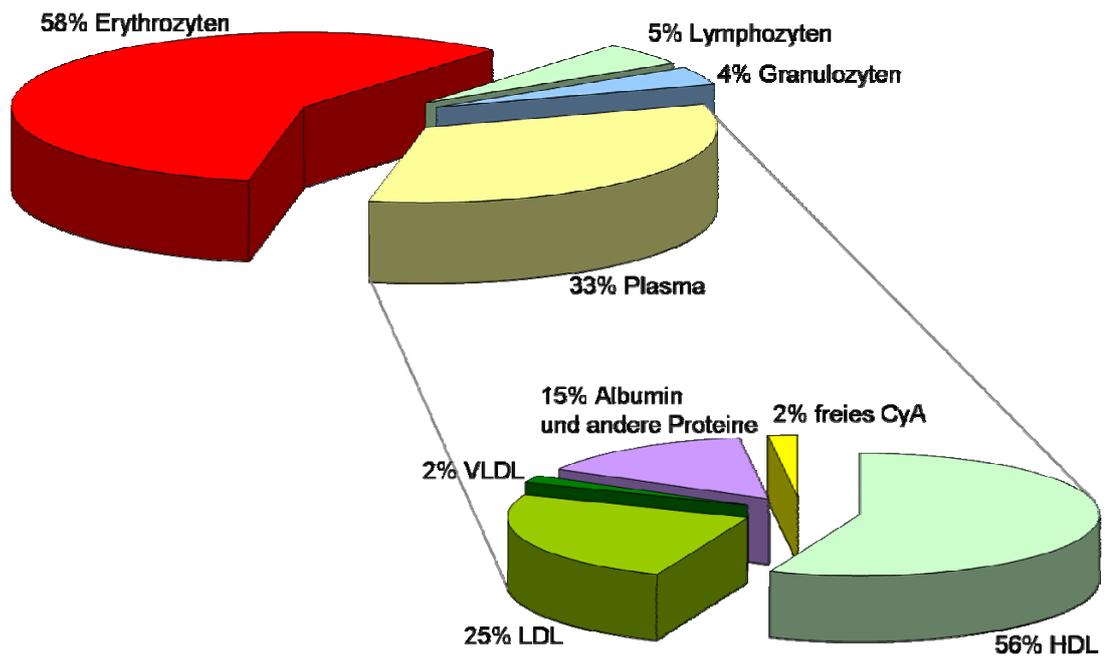


Abb. 24: Schematische Darstellung der Verteilung von Ciclosporin A in Vollblut

In **Tab. 7** ist die Verteilung der Immunsuppressiva im Vollblut detailliert aufgezeigt.

Immunsuppressivum	Prozentuale Verteilung								freier Analyt
	zelluläre Bestandteile				Plasma				
	Erythrocyten	Lymphozyten	Granulozyten	Leukozyten	HDL	LDL	VLDL	sonstige Proteine	
Ciclosporin A	58	5	4	k.A.	43-57	25	2	5-15	1-2
Tacrolimus	74,4 ± 5,0	k.A.	k.A.	1,1 ± 0,4	27,2 ± 6,6	10,0 ± 4,2	2,8 ± 1,8	60,1 ± 6,5	0,7 ± 0,19
Sirolimus	94,5 ± 4,9	1,0 ± 1,0	1,0 ± 0,88		19,5 ± 3,9	20,5 ± 5,9	1,2 ± 0,5	60	0,175
Everolimus	75	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	74	k.A.

Tab. 7: *Prozentuale Verteilung der Immunsuppressiva im Vollblut^{2,3,4,101}*

Die Verteilung von Tacrolimus und Everolimus zwischen Blut und Plasma ist konzentrationsabhängig^{7,101}. Bei Ciclosporin A und Tacrolimus ist die Verteilung zwischen den zellulären Bestandteilen und Plasma temperaturabhängig^{2,7}.

Die pharmakokinetischen Parameter können sich innerhalb ethnischer Gruppen unterscheiden. Mancinelli et al. haben diesbezüglich Untersuchungen für Tacrolimus in drei verschiedenen ethnischen Gruppen (Afro-Amerikaner, Latein-Amerikaner und Weiße) durchgeführt¹¹³. Diese Untersuchung zeigt bei intravenöser Verabreichung keine signifikanten Unterschiede in der Pharmakokinetik, bei per oraler Applikation jedoch

schon. Dies ist wahrscheinlich auf Unterschiede der Aktivität von intestinalen CYP 3A4- und P-Glykoprotein-Enzystemen zurückzuführen.

4.4 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)

Unter Therapeutischem Drug Monitoring (TDM) versteht man die Bestimmung des Wirkstoffspiegels im Blut. Ziel ist es, eine individuelle Pharmakokinetik des betreffenden Patienten zu erhalten, um dadurch, falls erforderlich, die Dosierung gezielt anpassen zu können¹¹⁴. Therapeutisches Drug Monitoring ist nicht immer sinnvoll. Der Nutzen muss klar im Vorteil stehen, denn ein Durchführen des TDM bedeutet immer einen invasiven Eingriff, um an die zu untersuchende Matrix Blut zu kommen. Es gilt festzuhalten, dass bis zum heutigen Zeitpunkt keine randomisierten Studien belegen können, dass Patienten, die sich einem TDM unterziehen, ein Benefit genießen¹¹⁵.

Bei vielen Pharmaka konnte ein Zusammenhang zwischen der Wirkstoffkonzentration im Blut und den klinischen Effekten festgestellt werden, so dass die Blutkonzentration als messbare Alternative für die nur sehr schwer messbare Konzentration des Wirkstoffes in den Geweben gilt. Die Blutprobe wird in der Regel kurz vor der nächsten Wirkstoffapplikation entnommen, so dass die ermittelte Konzentration dem Talspiegel entspricht¹⁰⁵.

Die Blutspiegelkontrollen zur Therapieüberwachung sind dann sinnvoll, wenn das eingesetzte Pharmakon eine geringe therapeutische Breite besitzt und somit bei Überdosierung ein Intoxikationsrisiko besteht. Zeigt der Wirkstoff keine lineare Pharmakokinetik, das heißt, ist keine Dosis-Wirkungsbeziehung ersichtlich, so wird auch in diesem Falle ein TDM durchgeführt. Bei Arzneistoffen, die eine große Blutspiegelschwankung nach Einnahme zeigen (Ciclosporin A), sollte die C₂- (2 Stunden nach Applikation) und Talspiegelkonzentration bestimmt werden. Studien konnten zeigen, dass eine Organabstoßung während einer Therapie mit Ciclosporin A unter Berück-

sichtigung der Talspiegelkonzentration nicht vorhersagbar war. Eine Vorhersage konnte jedoch gemacht werden unter Beobachtung des C2-Spiegels¹¹⁵. Der therapeutische Bereich des C2-Monitorings ist viel geringer als bei der Talspiegelkonzentration. Die Durchführung eines TDM ist unumgänglich bei der Behandlung mit weiteren Arzneistoffen, die eine starke Wechselwirkung mit dem „critical dose pharmakon“ zeigen. Dies ist beispielsweise bei der gleichzeitigen Einnahme von Ciclosporin A und Ketoconazol der Fall. Ein weiterer Grund für das TDM sind gefährliche Nebenwirkungen im oberen therapeutischen Bereich (Nephrotoxizität bei Ciclosporin A). Das Ziel jeder Arzneimitteltherapie ist eine therapeutisch optimale Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort. Immunsuppressiva zeigen eine hohe interindividuelle und intraindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik und -dynamik. Dies würde die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens erhöhen, wenn alle Patienten gleich dosiert therapiert würden¹¹⁶.

Ein Therapeutisches Drug Monitoring wird bei der Behandlung des Patienten mit folgenden Wirkstoffgruppen empfohlen^{117,118}:

- Immunsuppressiva
- Herzglykoside
- Zytostatika
- Aminoglykosid-Antibiotika
- Antiarrhythmika
- Psychopharmaka
- Antikonvulsiva
- Antiepileptika
- HIV/AIDS-Medikamente

Ein TDM ist grundsätzlich nicht erforderlich, wenn die Pharmakodynamik eines Wirkstoffes, z.B. Abnahme der Herzfrequenz durch β -Adrenorezeptorblocker, gut bestimmt werden kann¹¹⁴.

Das TDM bei Immunsuppressiva ist von großer Bedeutung. Die Konsequenzen einer falschen Dosierung des Wirkstoffes sind verheerend. Eine Unterdosierung würde zu einer Abstoßungsreaktion des Transplantates führen, wohingegen eine Überdosierung starke Nebenwirkungen und eine fast komplette Unterdrückung des Immunsystems mit fatalen Folgen nach sich ziehen würde. **Tab. 8** zeigt nochmals die empfohlenen therapeutischen Bereiche der in dieser Arbeit untersuchten Immunsuppressiva. Ein Therapeutisches Drug Monitoring sollte erst nach 4 bis 5 Halbwertszeiten durchgeführt werden. Erst dann ist die Steady-State-Konzentration (c_{ss}) im Blut erreicht und die Ergebnisse aussagekräftig.

Immunsuppressivum	Therapeutischer Bereich [ng/mL] (Talspiegel)
Ciclosporin A	100-400
Tacrolimus	5-15
Sirolimus	4-20
Everolimus	3-15

Tab. 8: *Therapeutische Bereiche für das Monitoring von Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus*

Der therapeutische Bereich ist von vielen Faktoren abhängig. Einerseits sind die Talspiegelwerte von der angewandten analytischen Methode abhängig, andererseits bestimmen die Art des transplantierten Organs, die Zeit seit der Transplantation und das Therapieregime selbst die angestrebte Talspiegelkonzentration¹⁰⁵. Der therapeutische Bereich stellt somit nur einen Richtwert dar. Die Dosierung selbst muss aus dem Gesamtzusammenhang der klinischen Situation heraus bestimmt werden.

Die analytischen Verfahren zur Bestimmung der Blutkonzentration sollten präzise, richtig und robust sein. Somit dürfen die gefundenen Konzentrationen nicht mehr als 15 % vom wahren Wert abweichen und die Variationskoeffizienten sollten < 15 % betragen. Die angewandten Methoden müssen validiert sein. Sinnvoll ist es, die Metaboliten des Wirkstoffes von Interesse mitzubestimmen. Der M1-Metabolit von Ciclosporin A beispielsweise hat noch 1/10 der Potenz vom Ausgangswirkstoff². Den Metaboliten AM1c9 und AM19 von Ciclosporin A wird die Hauptverantwortlichkeit für die Nephrotoxizität angelastet¹¹⁹.

4.4.1 Indikation für TDM

Für das TDM gibt es mehrere Indikationen, die nachstehend aufgelistet sind^{115,117,120,121}:

- Festlegen der Dosis
- Verdacht auf Überdosierung
- Ausbleiben des therapeutischen Effektes bei normaler Dosis
- Compliance (Kontrolle, ob Arzneimittel eingenommen wurde)
- Auftreten von unerwünschten Wirkungen
- „Ausdosieren“ einer Monotherapie (Dosis bis zur toxischen Grenze erhöhen)
- Umstellung der Therapie auf ein anderes Medikament
- Dosisänderung bei Dauertherapie
- Vorliegen von pharmakologischen Metaboliten (Primidon → Phenobarbital)
- Funktionsstörung der Ausscheidungsorgane (Leber, Niere, Galle)
- Eintritt der erwünschten bzw. unerwünschten Wirkung erst nach einer deutlichen Latenz
- Vorhandensein genetischer Polymorphismen, die die Verstoffwechslung des Wirkstoffes betreffen
- Einsatz von Generika

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die erhaltenen Werte im Therapeutischen Drug Monitoring abhängig sind vom Zeitpunkt der Probenentnahme, des analytischen Verfahrens und der Pharmakogenetik des einzelnen Patienten. Eine Weiterentwicklung in der Bioanalytik wird zu einer verbesserten Selektivität und Sensitivität bezüglich der Konzentrationsmessung der Immunsuppressiva führen¹¹⁵. Das Therapeutische Drug Monitoring der Immunsuppressiva gewährleistet die Sicherheit der Patienten und ein möglichst langes Leben mit dem Transplantat.

4.4.2 Analytik der Immunsuppressiva

Mit der Einführung von Ciclosporin A als Immunsuppressivum mit geringer therapeutischer Breite Anfang der 80iger Jahre entstand die Notwendigkeit der quantitativen Analyse dieser Wirkstoffgruppe. Grundsätzlich gibt es mehrere Analyseverfahren, die jeweils Vor- und Nachteile mit sich bringen. Die Quantifizierung der Immunsuppressiva kann mit Hilfe folgende Verfahren durchgeführt werden¹²²:

- Gaschromatographie-MS/MS
- LC-UV / ECD / Fluoreszenz
- Antikörper-Immunoassays
- LC-MS/MS

Bedingungen für angewendete Analyseverfahren sind hohe Richtigkeit, Präzision und Spezifität. Zusätzlich sind niedrige Kosten und einfache Handhabung wünschenswert¹²³. Obwohl Immunoassays eine breite Anwendung für die Routine-Bestimmung gefunden haben, zeigen sie häufig eine variable Kreuzreaktivität mit inaktiven Metaboliten der Muttersubstanz. Daher kommen häufiger spezifische LC-Methoden zum

Einsatz, vor allem in Kombination mit Tandem-massenspektrometrischer Detektion¹⁰⁵. Zur Analyse von Ciclosporin A gibt es 6 verschiedene Immunoassays, z.B. CYCLO-Trac SP[®], FPIA[®], EMIT[®], CEDIA[®] auf dem Markt. Aufgrund ihrer unterschiedlich ausgeprägten Kreuzreaktivität mit Ciclosporin A zeigen sie unterschiedliche Konzentrationen für ein und dieselbe Probe an¹⁰⁵. Ansonsten kann Ciclosporin A auch mittels HPLC-UV und LC-MS/MS quantifiziert werden^{124,125,126}. Tacrolimus wird hochspezifisch und sehr sensitiv mittels LC-MS/MS quantifiziert¹²⁷. Die meisten Untersuchungslaboratorien jedoch verwenden Immunoassays, wie z.B. PRO-Trac II ELISA oder MEIA II. Zu beachten ist, dass beide Immunoassays Kreuzreaktivitäten mit Tacrolimus-Metaboliten zeigen¹⁰⁵. Für die quantitative Untersuchung von Sirolimus und Everolimus stehen zurzeit keine Immunoassays zur Verfügung. Beide Immunsuppressiva können mittels HPLC-UV oder LC-MS/MS analysiert werden^{96,105,128,129,130,131,132}. Sirolimus und Everolimus haben aufgrund ihrer starken strukturellen Ähnlichkeit auch sehr ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften. Dies spiegelt sich in der UV-Detektion wider, denn beide Analyten haben ihr Absorptionsmaximum bei 278 nm. Um Sirolimus und Everolimus in Gegenwart ihres gemeinsamen Internen Standards simultan quantifizieren zu können, müssen alle drei Analyten vorher chromatographisch getrennt werden. Aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten führt die chromatographische Separation unter isokratischen Elutionsbedingungen zu langen analytischen Läufen, die sich auf etwa 20 Minuten belaufen¹³³. In einem Routinelabor mit einem hohen Probendurchsatz ist diese Analyseverfahren daher nur eingeschränkt einsetzbar.

Alle Analyseverfahren bringen Vor- und Nachteile mit sich. Bei den Immunoassays ist die unselektive Kreuzreaktivität der Metaboliten ein nicht unbedeutender Nachteil, der zu fehlerhaften Messergebnissen führt. Weiterhin braucht man zur Detektion verschiedener Immunsuppressiva unterschiedliche Immunoassays. Eine simultane Quantifizierung mehrerer Analyten ist daher nicht möglich. Es ist darauf hinzuweisen, dass es für Everolimus und Sirolimus derzeit keine Immunoassays auf dem Markt gibt. Im Vergleich zu der Analyse gefällter Vollblutproben unter Verwendung eines on-line SPE-LC-MS/MS-Systems sind Immunoassay-Kits sehr teuer, jedoch bedarf es keines aufwen-

digen und kostspieligen apparativen Aufbaus. Eine extensive Probenaufbereitung ist wie auch bei der HPLC-UV-Analyse notwendig.

Ein Vorteil für das HPLC-UV-Verfahren ist die Anwendung eines sensitiven, jedoch nicht besonders teuren Detektors. Es können jedoch auch bei diesem Ansatz nicht alle Immunsuppressiva simultan quantifiziert werden, da sie unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen. Ciclosporin A und Tacrolimus absorbieren am effektivsten bei einer Wellenlänge von 210 nm, Sirolimus und Everolimus hingegen bei 278 nm^{124,131,134,135}. Werden strukturell sehr ähnliche Analyten unter isokratischen Bedingungen voneinander getrennt, so ist ein sehr langer chromatographischer Lauf von Nöten.

Der Einsatz des Massenspektrometers als Detektor mit seiner hohen Sensitivität und Spezifität erlaubt es zum ersten Mal, alle vier Immunsuppressiva simultan zu quantifizieren. Die Ausgangsprobe für alle vier Analyten ist Vollblut, so dass die Probenaufbereitung für die LC-MS/MS-Analyse für alle Zielanalyten gleich durchgeführt wird. Der Massenspektrometer erlaubt einen minimalen chromatographischen Aufwand, denn die Analyten müssen nicht separat von der analytischen Trennsäule eluieren. Eine Koelution der Wirkstoffe beeinflusst die Detektion mit dem MS nicht, denn die Analyten zeigen unterschiedliche Massenübergänge. Eine simultane Quantifizierung aller Immunsuppressiva spart Zeit und ist kosteneffektiv, da nur eine Apparatur notwendig ist. Der Probendurchsatz ist aufgrund der kurzen Analysezeit von nur wenigen Minuten sehr hoch. Nachteilig sind die hohen Investitionskosten für einen Massenspektrometer und die Notwendigkeit von speziell geschultem Personal. Jedoch sind die direkten Kosten eines LC-MS/MS-Laufes inklusive Personalkosten um etwa 50 % niedriger als das Analyseverfahren mit einem Immunoassays¹³⁶. Die Vorteile des HPLC-MS/MS-Verfahrens führen dazu, dass die Methodenentwicklung zur simultanen Quantifizierung aller Immunsuppressiva in letzter Zeit stark zugenommen hat^{9,10,11,12,99,137,138}.



5 CDB: Neue biologische Matrix

CDB steht für „cell-disintegrated blood“. Diese neue biologische Matrix entsteht durch eine Hitzeschockbehandlung (engl.: heat shock treatment; HST) von nativem, antikoaguliertem Vollblut. Die trübe, rote Suspension einer Vollblutprobe wird durch Erhitzen unter definierten Bedingungen in eine klare, homogene, rote Flüssigkeit, die frei von zellulären Bestandteilen ist, umgewandelt.

Das Ziel der Hitzeschockbehandlung ist die komplette Desintegration von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Auf diesem eleganten Weg können ohne Zusatz von Hilfsmitteln intrazelluläre Wirkstoffe freigesetzt und zur quantitativen Analyse zugänglich gemacht werden.

5.1 Definition

Durch die Hitzeschockbehandlung (HST) von nativem, antikoaguliertem Vollblut kommt es zur Desintegration der darin enthaltenen zellulären Bestandteile. Dabei entsteht eine neue biologische Flüssigkeit, das zell-desintegrierte Blut (engl.: cell-disintegrated blood; CDB). Die Zellmembran verändert ihren Aufbau und erlaubt somit das Austreten der intrazellulär lokalisierten Stoffe, wie z.B. Hämoglobin, Immuno-philinen, intrazellulär gebundene Wirkstoffe und viele andere Proteine und Inhaltsstoffe. Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit sind die Ermittlung und Charakterisierung von Einflussfaktoren bei der Herstellung und Verwendung dieser neuen biologischen Matrix im Rahmen des TDM.

5.2 Charakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, bei welcher Temperatur und Heizdauer eine Vollblutprobe einer Hitzeschockbehandlung unterzogen werden kann. Die Temperatur und Heizdauer sollten so gewählt werden, dass eine vollständige Desintegration der Blutzellen auftritt, jedoch gleichzeitig die Proteinmatrix nicht denaturiert.

Daher sollten in einem ersten Schritt bestimmte Prozessparameter definiert und quantifiziert werden. Diese stellen unter anderem die Ober- und Untergrenzen der Hitzeschockbehandlung dar. Außerdem beschreiben sie die optimalen Aufheizbedingungen von Vollblut. Da die Erythrozyten mit nahezu 95 % die größte Fraktion der zellulären Bestandteile im Blut darstellen und die untersuchten Modellanalyten zum größten Teil erythrozytär gebunden sind, liegt das Hauptaugenmerk auf der Desintegration dieser Blutzellen. Die kleinste Fraktion im Vollblut bilden die Leukozyten mit ca. 0,1 %. Thrombozyten stellen knapp 5 % der zellulären Bestandteile im Blut dar.

5.2.1 Methoden zur Bestimmung der Effizienz der Hitzeschockbehandlung (HST)

Die Effizienz der Hitzeschockbehandlung, d.h. das Ausmaß der Zell-Desintegration, wird mit zwei unabhängigen Methoden bestimmt. Zum einen durch Verdünnung der Probe mit Trypanblau-Lösung und der anschließenden Auszählung der Erythrozyten in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops. Zum anderen durch photometrische Quantifizierung des nach der Hitzeschockbehandlung freigesetzten Hämoglobins.

5.2.1.1 Mikroskop

Früher wurde die Zellzahl im Blut ausschließlich durch mikroskopische Zählung mit verschiedenen Zählkammern (Neubauer-, Türk-, Thoma-, Bürker- oder Schilling-Zählkammer) bestimmt¹³⁹. Die Probe wird 2-mal ausgezählt und die Anzahl der Zellen darf um maximal 10 % voneinander abweichen. Zur Bestimmung der Effizienz der Hitzeschockbehandlung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Neubauer-Zählkammer gearbeitet (**Abb. 25**).

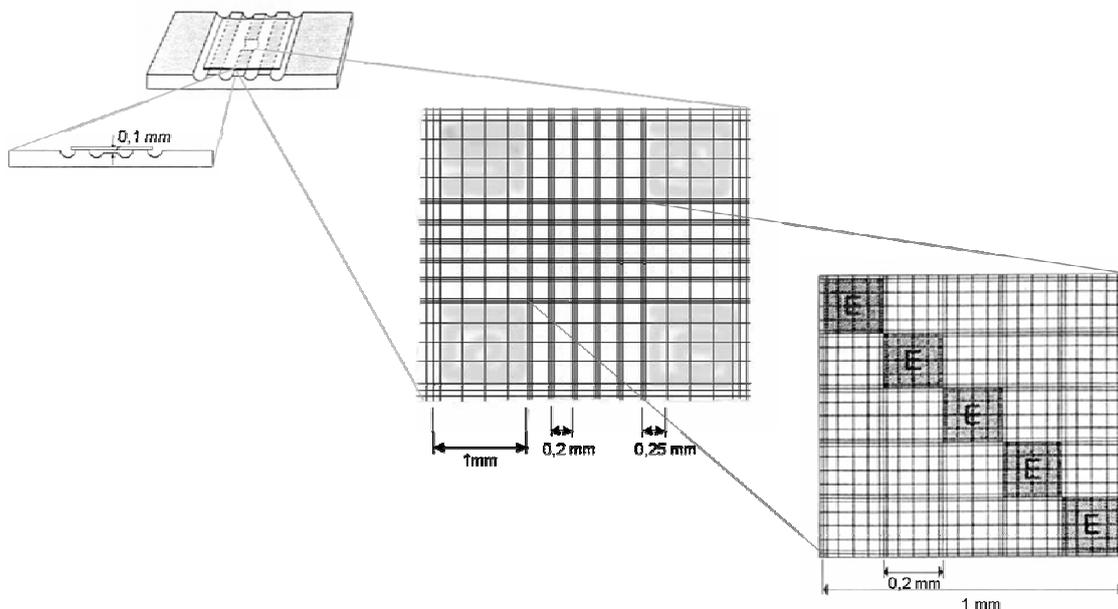


Abb. 25: Aufbau der Neubauer-Zählkammer¹³⁹

Die Zählkammer besteht aus 9 Großquadraten. Zur Auszählung der Erythrozyten wird das mittlere Großquadrat herangezogen, das aus 25 Kleinquadraten besteht. Diese sind jeweils in 16 Kleinstquadrate unterteilt. Zur Quantifizierung der Erythrozyten werden fünf diagonal angeordnete Kleinquadrate ausgezählt. Die Kleinstquadrate werden meanderförmig mit dem Mikroskop (100-fache Vergrößerung) nach Erythrozyten ab-

gesucht. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Kammertiefe und der ausgezählten Kammerfläche kann die Anzahl der enthaltenen Erythrozyten pro μL Blut mit folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Erythrozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Anzahl gezählter Erythrozyten} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Kammerfläche} [\text{mm}^2] \times \text{Kammertiefe} [\text{mm}]}$$

Die zu untersuchende Vollblutprobe wird vor der Auszählung 1:100 mit Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe und dient unter anderem als Farbstoff für Vitalfärbungen¹⁴⁰. Dieser Farbstoff kann nur eine zerstörte, nicht jedoch eine intakte Zellmembran passieren. Tote Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau, da der blaue Farbstoff an zytosolische Proteine bindet. Intakte Zellen (lebende Zellen) nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen gelblich. Die Anzahl der Erythrozyten wird zuerst in einer unbehandelten Probe bestimmt und entspricht dem 100 % -Wert. Nach dem Prozessieren der Probe mittels Hitzeschock werden die verbliebenen Erythrozyten erneut ausgezählt. Die Differenz entspricht der Effizienz der Hitzeschockbehandlung (HST).

5.2.1.2 Photometer

Bei der Hitzeschockbehandlung wird Hämoglobin aus dem Inneren der Erythrozyten freigesetzt. Zur Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration nach der Endpunktmethode von Drabkin wird Vollblut mit Drabkin's Reagenz versetzt. Dieses Reagenz besteht aus $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, KCN, Na_2CO_3 , Brij 35 und Wasser¹⁴¹. Alle Hämoglobinformen außer Sulfhämoglobin werden durch die Reaktion mit Ferricyanid in Methämoglobin

umgewandelt. Dieses bildet mit Cyanid einen Komplex, der bei 540 nm photometrisch detektiert werden kann. Brij 35 ist ein Detergenz, das zur Lyse der Erythrozyten führt. Die Hämoglobin-Freisetzung aus einer unbehandelten Vollblutprobe ist somit auf Brij 35 zurückzuführen. Zur Bestimmung der Effizienz der HST muss die prozessierte Probe zentrifugiert werden, damit sich im Überstand nur durch Hitzeschock freigesetztes Hämoglobin befindet. Ein Aliquot des Überstandes wird anschließend mit Drabkin's Reagenz versetzt und das Hämoglobin photometrisch quantifiziert.

5.2.2 Prozessparameter: t_G , t_{max} , t_{min} , t_{heat} und $t_{applied}$

Zur Charakterisierung und anschließenden Optimierung der Hitzeschockbehandlung von Vollblut mussten zu Beginn der Arbeit Prozessparameter definiert und anschließend experimentell bestimmt werden. t_G , t_{max} , t_{min} , und t_{heat} sind die vier erforderlichen Prozessparameter. Zusätzlich wird der Parameter $t_{applied}$ definiert. Sie beschreiben den Bereich der effizienten Hitzeschockbehandlung und geben die optimalen Bedingungen für das Prozessieren einer Vollblutprobe an.

t_G : *Zeitpunkt der Gelbildung*

Wird Vollblut bei hohen Temperaturen erhitzt, so bildet es ein Gel. Der Zeitpunkt, ab dem die Gelbildung bei einer bestimmten Temperatur eintritt, wird mit t_G bezeichnet.

t_{max}: *Maximale Prozessierungsdauer*

t_{max} entspricht der Heizdauer einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur, bei der gerade noch kein Gel entsteht. Dieser Parameter errechnet sich aus der Subtraktion von 1sec vom ermittelten t_G-Wert.

$$t_{\max} = t_G - 1 \text{ sec}$$

t_{min}: *Minimale Prozessierungsdauer*

t_{min} entspricht der minimalen Aufheizzeit der Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur, die zu einer quantitativen Desintegration der Erythrozyten führt. Somit sind in der Neubauer-Zählkammer keine Erythrozyten mehr sichtbar.

t_{heat}: *Errechnete Prozessierungsdauer*

t_{heat} beschreibt die optimale Heizdauer einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur. Dieser Prozessparameter wird wie folgt berechnet:

$$t_{\text{heat}} = 0,5 \times (t_{\max} + t_{\min})$$

t_{applied}: *Festgelegte Prozessierungsdauer*

t_{applied} gibt beschreibt die angewandte Heizdauer einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur an. Dieser Parameter liegt zwischen t_{min} und t_{max}.

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit EDTA-Blut durchgeführt. Im Folgenden wird dieses einfachheitshalber mit Vollblut bezeichnet.

5.2.3 Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Prozessparameter

Alle Prozessparameter wurden off-line, d.h. manuell, bestimmt. Dazu wurde EDTA-Vollblut in heparinisierte Glaskapillaren (50 x 0,5 mm I.D.) gefüllt, die mit Knete versiegelt wurden. Die gefüllten Glaskapillaren wurden in einem exakt temperierten Wasserbad erhitzt und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Der Temperaturbereich zur Bestimmung der Prozessparameter betrug 60 bis 95°C.

t_G :

Nach dem Abkühlen der Hitzeschock-prozessierten Probe wird der Inhalt der Glaskapillare auf einen Objektträger entleert und die Konsistenz der Probe beurteilt (**Abb. 26**).

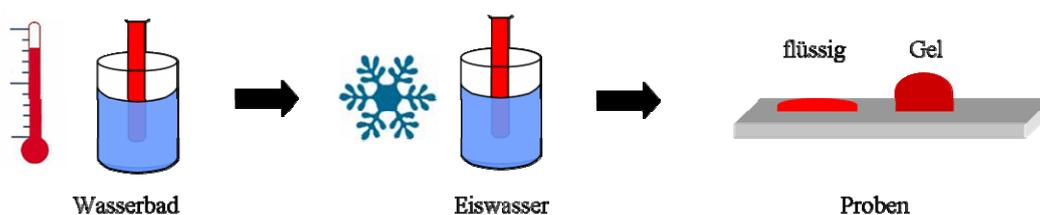


Abb. 26: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung von t_G

t_{min} :

Die prozessierte Probe wird nach dem Abkühlen 1:100 mit Trypanblau-Lösung versetzt und die verbliebenen Erythrozyten mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt (**Abb. 27**).

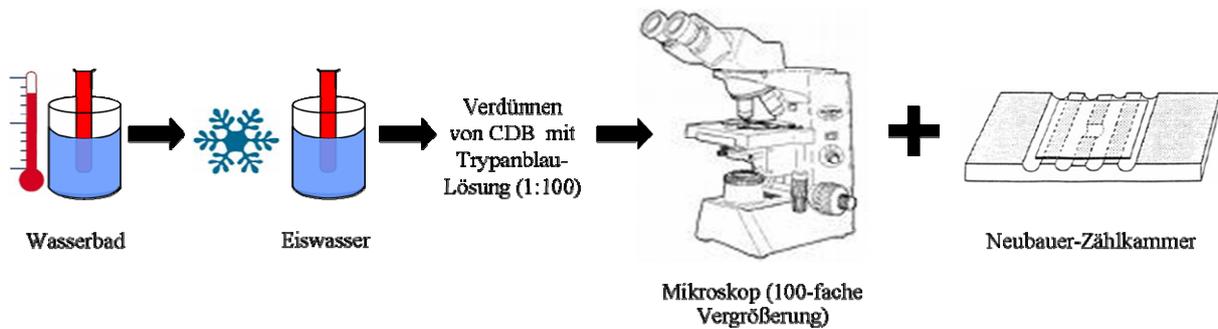


Abb. 27: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung von t_{min}

t_{max} und t_{heat} :

Diese beiden Prozessparameter werden, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, rechnerisch bestimmt.

Abb. 28 zeigt die Gelbildungsgrenze für Vollblut, die für diese graphischen Darstellung in einem Temperaturbereich zwischen 70 und 95°C bestimmt wurde. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass t_G stark temperaturabhängig ist. Ein Anstieg in der Temperatur zieht einen Abfall von t_G nach sich. Das heißt, je höher die Prozessierungstemperatur ist, desto schneller denaturiert Vollblut und bildet ein Gel.

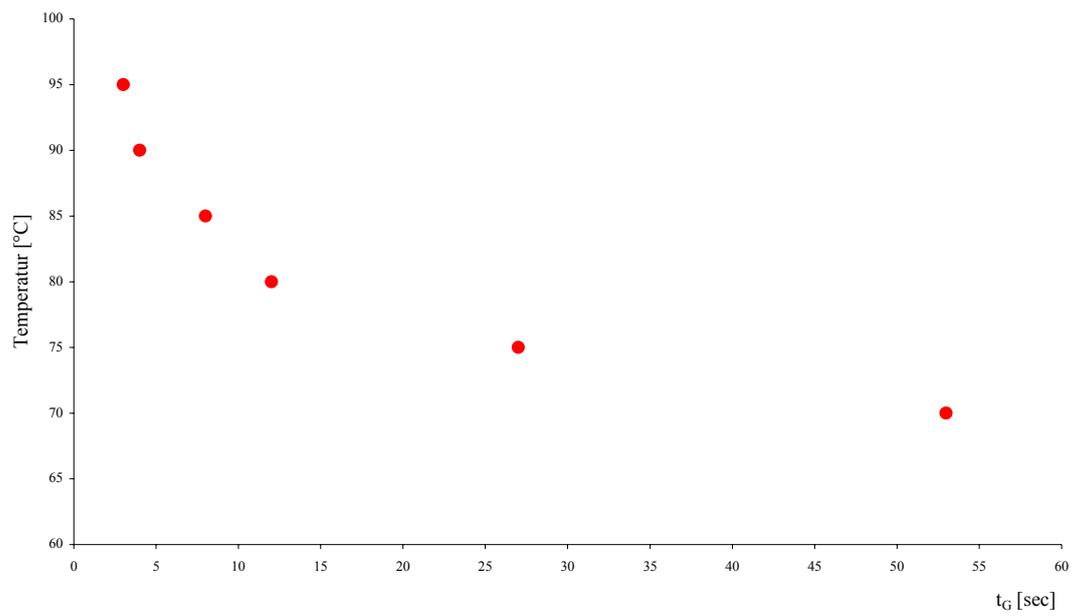


Abb. 28: Gelbildungsgrenze von Vollblut bei unterschiedlichen Temperaturen

Grundsätzlich wurde t_G für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C bestimmt. In **Tab. 9** sind die entsprechenden Werte dargestellt.

Temperatur [°C]	t_G [sec]
95	3
90	4
85	8
80	12
75	27
70	53
65	265
60	840

Tab. 9: *Ermittelte t_G -Werte für Vollblut für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Neben t_G wurden für Vollblut noch die Prozessparameter t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} für Temperaturen zwischen 60 und 95°C experimentell ermittelt bzw. errechnet (**Tab. 10**).

Temperatur [°C]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
95	2	2	2
90	3	3	3
85	7	7	7
80	11	10	11
75	26	6	16
70	52	26	39
65	264	32	148
60	839	420	630

Tab. 10: *Ermittelte Werte für t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} einer Vollblutprobe für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Bei Temperaturen $\leq 65^\circ\text{C}$ kommt es nicht zu einer Hitzeschockbehandlung, sondern einer Wärmebehandlung von Vollblut. Die Desintegration der Erythrozyten findet nur sehr langsam statt. Die daraus resultierenden Werte für t_{heat} sind sehr hoch. Bei hohen Temperaturen (80-95°C) sind die Werte für t_{\max} und t_{\min} gleich. Die Gefahr der Gelbildung durch zu langes Erhitzen ist sehr groß. Die optimale Prozessierungstemperatur liegt zwischen 70 und 75°C. Ausgehend von den Werten für t_{heat} hat man ein größeres Zeitfenster zu längeren und kürzeren Aufheizzeiten der Vollblutprobe, ohne einen Verlust der Desintegrations-Effizienz zu fürchten. Das bedeutet, dass ein geringes Abweichen von t_{heat} die Desintegration der Erythrozyten nicht beeinflusst.

Das off-line Prozessieren von Vollblutproben in Glaskapillaren ist ein reproduzierbarer Vorgang.

5.3 Bestimmung der Prozessparameter im Vollblut verschiedener Spezies

Ziel der Entwicklung neuer Arzneimittel ist es, bessere therapeutische Möglichkeiten zu schaffen. Vor der Erstanwendung eines neuen Wirkstoffes am Menschen, muss die Wirkung eingehend charakterisiert und getestet werden, z.B. mittels In-vitro-Verfahren oder Tierexperimenten. Daher unterscheidet man zwischen einer präklinischen und klinischen Prüfung. In der präklinischen Prüfung werden die Pharmakokinetik, das Teratogenitäts- und Mutationspotential, chronische Toxizitätsuntersuchungen und Nebenwirkungen des potentiell neuen Wirkstoffes unter anderem an Tieren untersucht. Diese Tierversuche sind eine unverzichtbare Vorbedingung für die Anwendung einer Prüfsubstanz am Menschen¹⁴².

In präklinischen Prüfungen werden Tierversuche an verschiedenen Spezies durchgeführt. Aus diesem Grund war es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, die universelle Einsetzbarkeit der neu entwickelten Probenaufbereitungsmethode an Vollblut unterschiedlicher Tierarten zu untersuchen. Dazu wurden die verschiedenen Vollblutproben off-line, d.h. manuell in Glaskapillaren, aufbereitet. Die Prozessierungstemperatur betrug 75°C. In dieser Versuchsreihe wurden alle vier Prozessparameter bestimmt. Zusätzlich wurde der Hämatokrit-Wert der Vollblutproben mit Hilfe einer Hämatokrit-Zentrifuge bestimmt. **Tab. 11** fasst die Ergebnisse zusammen.

Spezies	Anzahl (n)	Hämatokrit-Wert	t_G [sec]	t_{max} [sec]	t_{min} [sec]	t_{heat} [min]
Mensch	1	0.4	27	26	6	16
menschliches Nabelschnurblut	2	0,46-0,55	30-38	29-37	5-14	22-23
Wistar-Ratte	2	0.36	24	23	7	15
Dark-Agouti-Ratte	1	0.35	31	30	7	18
Piebald-Virol-Glaxo-Ratte	2	0.33	42	41	6	23
Sprague-Dawly-Ratte	5	0,39-0,45	37-43	36-42	2-3	19-22
Maus	2	0.34	19	18	7	12
Meerschweinchen	1	0.35	18	17	7	12
Beagle-Hund	1	0.58	32	31	7	19

Tab. 11: *Ermittelte Prozessparameter für Vollblut verschiedener Spezies;
Prozessierungstemperatur: 75°C*

Obwohl sich die Hämatokrit-Werte der verschiedenen Spezies unterscheiden, liegen die ermittelten Werte für t_{min} für alle Blutproben in einem Bereich zwischen 2 bis 14 Sekunden. Die Werte für den Prozessparameter t_{max} reichen von 17 bis 42 Sekunden. Wenn das ermittelte t_{heat} (16 Sekunden bei 75°C) für menschliches Vollblut mit einem Hämatokrit von 0,4 als Standardwert gesehen wird, so lässt sich sagen, dass das Vollblut aller hier untersuchten Spezies unter den gleichen Standardbedingungen effizient prozessiert werden kann. Denn in keinem Fall ist bei einer Temperatur von 75°C t_{min} größer und t_{max} kleiner als 16 Sekunden.

Blut von Neugeborenen besitzt im Vergleich zu Erwachsenenblut einen signifikant höheren Anteil an Retikulozyten (**Tab. 12**). Retikulozyten werden aus kernhaltigen Vorstufen der Erythrozyten, den Normoblasten, gebildet. Nach Abstoßung des Kernes

verbleiben zunächst noch die Ribosomen im Zytoplasma, die nur zu einer sehr begrenzten Proteinsynthese fähig sind. Es handelt sich um noch nicht vollständig ausgereifte Erythrozyten, die Retikulozyten genannt werden. In dieser Versuchsreihe sollte zusätzlich untersucht werden, ob Retikulozyten einen gravierenden Einfluss auf die Prozessparameter haben und beispielsweise t_{\min} so stark erhöhen, dass Vollblut von Neugeborenen nicht unter Standardbedingungen prozessiert werden kann. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie **Tab. 12** zeigt.

Entwicklungsstadium	Alter	Retikulozyten [%]
Neugeborene	1.-4. Tag	1,4-4,1
	1.-2. Woche	0,4-1,0
	2.-4. Woche	0,3-1,1
Säuglinge	4.-12. Woche	0,5-1,9
Säuglinge und Kinder	> 12. Woche	0,5-1,5
Frauen		0,8-4,1
Männer		0,8-2,5

Tab. 12: Referenzwerte der Retikulozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen¹⁴³

5.4 Einfluss des Hämatokrit-Wertes auf die Prozessparameter

Menschen sind Individuen und haben somit keine identische Zusammensetzung von Vollblut. Der Anteil der zellulären Bestandteile, wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, im Blut ist von mehreren Faktoren, wie z.B. Medikation und Gesundheitszustand abhängig. Als Hämatokrit wird der Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtblutvolumen bezeichnet. Wie in **Tab. 13** aufgezeigt ist der Hämatokrit unter anderem abhängig vom Alter. Aber auch die Einnahme von Medikamenten kann die Anzahl der Erythrozyten im Vollblut erhöhen (Erythropoetin) oder erniedrigen (Zytostatika). Zusätzlich führen akute und chronische Blutungen zu Anämien. Eine Erhöhung des Hämatokrits findet man als Folge eines Sauerstoffmangels beim Aufenthalt in größeren Höhen¹⁸.

Entwicklungsstadium	Alter	Hämatokrit-Wert
Neugeborene	1.-4. Tag	0,52-0,68
Säuglinge	1.-2. Woche	0,47-0,63
	2.-4. Woche	0,38-0,51
	4.-12. Woche	0,30-0,38
Säuglinge und Kinder	> 12. Woche	0,31-0,40
Frauen		0,35-0,47
Männer		0,40-0,52

Tab. 13: Referenz-Hämatokrit-Werte in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen¹⁴³

Während der Hitzeschockbehandlung werden Erythrozyten desintegriert. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass der Hämatokrit einer Vollblutprobe einen Einfluss auf die Prozessparameter und vor allem auf die Gelbildungsgrenze (t_G) hat. **Abb. 29** zeigt die Abhängigkeit von t_G vom Hämatokrit. Wieder wurden die Proben off-line bei 75°C prozessiert.

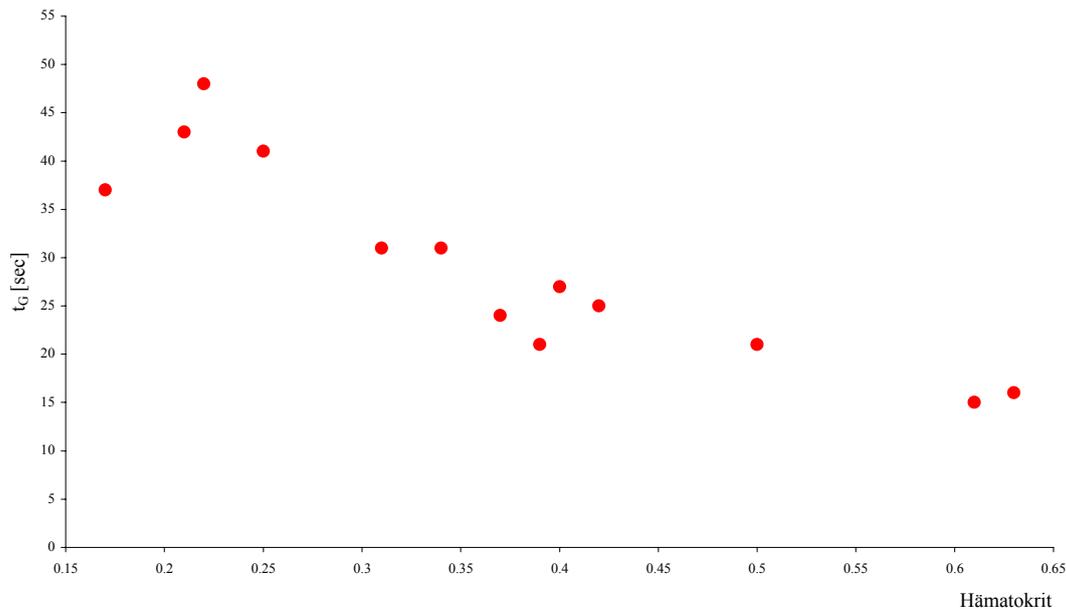


Abb. 29: *Ermittelte Werte für t_G in Abhängigkeit vom Hämatokrit;
Prozessierungstemperatur: 75°C*

Die Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Hämoglobin für die Gelbildung von Vollblut während der Hitzeschockbehandlung verantwortlich ist. Denn mit steigendem Hämatokrit steigt auch die Menge an freigesetztem Hämoglobin. Es galt zu klären, welche Bestandteile im Blut schlussendlich für die Gelbildung verantwortlich sind. In der Literatur wird beschrieben, dass Proteine durch Hitzeschockbehandlung Gele bilden können^{144,145}. Die Gelbildung findet in zwei Schritten statt und kann durch physikalische oder chemische Faktoren ausgelöst werden. Hitze führt zuerst zu einer Dissoziation oder Entfaltung der Proteinmoleküle. Im Anschluss kommt es zu einer erneuten

Assoziation und Aggregation der Proteinmoleküle, die in einem Gelsystem resultieren^{144,145}. Die Heiztemperatur und Heizdauer beeinflussen die Gelstruktur. **Tab. 14** zeigt die physikalischen und chemischen Faktoren, die zu einer Gelbildung bei Proteinen führen. Ein Proteinnetzwerk wird in der Regel über nicht-kovalente Verknüpfungen, wie hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken oder elektrostatische Interaktionen, und seltener über kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken gebildet. Einfluss auf die Gelbildung hat auch das das Gel umgebende Lösemittel. Dabei kommt es zu Protein-Lösemittel Wechselwirkungen. Während der Denaturierung von Blut mittels Hitzeschockbehandlung kommt es zur Bildung einer wässrigen Gelmatrix¹⁴⁶.

Typ	Art	Mechanismus
Physikalisch	Hitze	Native Proteine entfalten sich partiell und bilden ein Netzwerk.
	Hoher Druck	Drücke zwischen 200 und 500 MPa induzieren hydrophobische Wechselwirkungen und Disulfidbindungen zwischen den Proteinmolekülen, was in einer neugeordneten Gelstruktur endet.
Chemisch	Ionen	Nach initialem Heizen und der Zugabe von Salz wird die elektrostatische Abstoßung oder Ladung ausgeblendet und ein Gel gebildet.
	Harnstoff	Harnstoff führt zur intermolekularen Thiol-Disulfid Oxidation von Thiol-Gruppen, was in einem Netzwerk resultiert.
	Säure	Eine langsame pH-Wert Erniedrigung erlaubt eine Denaturierung, die zur Cluster- oder Aggregatbildung führt. Diese fraktalen Strukturen können als Bausteine des Gels gesehen werden.
	Enzyme	Enzyme katalysieren die Vernetzung von Glutaminresten zwischen den Proteinen und bilden somit ein Gel.

Tab. 14: *Physikalische und chemische Faktoren zur Induktion der Gelbildung bei Proteinen¹⁴⁵*

Die Gelbildung von Vollblut durch Hitzeeinwirkung ist schon länger bekannt und wird in der Chirurgie zur Gefäßverödung mittels Laserenergie genutzt¹⁴⁷. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Laser-induzierte Gelbildung in drei Phasen abläuft. In Phase 1 verändert der Erythrozyt seine bikonkave Gestalt in eine sphärische, ohne dabei sein Gesamtvolumen zu verändern. In der nächsten Phase kommt es zur Fragmentierung der Blutzellen und die Hämolyse wird eingeleitet. Die dritte Phase beinhaltet den Aufbau der Gelmatrix aus kleinen, aggregierten Membranvesikeln¹⁴⁸. Zusätzlich wird in der Literatur beschrieben, dass während der Hitzeschockbehandlung (HST) von Blut Hämoglobin denaturiert¹⁴⁶. Mittels Raman-Spektrometrie konnte gezeigt werden, dass es in den Erythrozyten durch Zufuhr von Hitze oder Laser-Energie zur Denaturierung von Hämoglobin und in Folge zur Aggregation von Häm kommt¹⁴⁹.

Zum Beweis, dass freigesetztes Hämoglobin für die Gelbildung während der Hitzeschockbehandlung von Vollblut verantwortlich ist, wurde Humanplasma der Blutgruppe AB mit lyophilisiertem Hämoglobin versetzt. Als Kontrollprobe wurde reines Humanplasma der Blutgruppe AB herangezogen. Für beide Ansätze wurde off-line (manuell in Glaskapillaren) die Gelbildungsgrenze bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. **Tab. 15** fasst die Ergebnisse zusammen.

Temperatur [°C]	t_G [sec] folgender Ansätze	
	AB-HP inkl. Hb	AB-HP
85	2	> 10
70	10	> 27

Tab. 15: Bestimmung der Gelbildungsgrenze für Plasmaproben inklusive und exklusive Hämoglobin

Diese Versuchsreihe zeigt, dass das bei der Hitzeschockbehandlung freigesetzte Hämoglobin bei weiterer Hitzezufuhr die Gelbildung zu verantworten hat. Eine weitere Energiezufuhr führt zu einer Denaturierung des Proteins und zur Aggregation von Häm.

Beim Hämoglobin handelt es sich um ein Chromoprotein, das aus vier Polypeptidketten mit je einer Farbstoffkomponente, die als Häm bezeichnet wird, besteht. Das Molekulargewicht beträgt etwa 64 kDa. **Abb. 30** zeigt den strukturellen Aufbau eines Hämoglobinmoleküls.



Abb. 30: Schematische Darstellung eines Hämoglobin-Moleküls¹⁵⁰

Im Erwachsenenhämoglobin (HbA) liegen zwei α -Polypeptidketten und zwei β -Polypeptidketten in symmetrischer Anordnung vor. Die α -Polypeptidketten bestehen aus je 141 Aminosäuren, die beiden β -Polypeptidketten aus je 146 Aminosäuren. Beim fetalen Hämoglobin (HbF) sind die beiden β -Polypeptidketten durch γ -Ketten mit teil-

weise anderer Aminosäuresequenz ausgetauscht. Die Farbstoffkomponente der Polypeptidketten (das Häm) enthält ein Protoporphyringerüst mit zweiwertigem Eisen als Zentralatom. Das Protoporphyringerüst besteht aus vier Pyrrol-Ringen, die über Methinbrücken miteinander verbunden sind. Die Pyrrol-Ringe tragen unterschiedliche Seitenketten¹⁸.

Da Hämoglobin die Hauptverantwortung für die Gelbfärbung von Hitzeschock-behandeltem Blut trägt, sind die Ergebnisse in **Abb. 29** nicht überraschend. Je höher der Hämatokrit der untersuchten Probe ist, desto mehr Hämoglobin ist in dieser enthalten. Je höher der Hämoglobingehalt der Probe ist, desto schneller kommt es zur Denaturierung dieses Proteins und zu der daraus resultierenden Gelbfärbung.

Weitere Versuche haben gezeigt, dass die Zugabe von Plasma eine Art Schutzfunktion auf die Denaturierung von Hämoglobin hat. Für diesen Versuch wurde zuerst ein Erythrozytenkonzentrat hergestellt. Eine EDTA-Vollblutprobe wurde dazu 10 Minuten bei 1610 G zentrifugiert. Überstehendes Plasma und der Buffy-coat wurden abpipetiert. Das entnommene Volumen wurde mit isotonischer Kochsalz-Lösung substituiert, die Probe kurz gemischt und im Anschluss erneut bei 1610 G für 10 Minuten zentrifugiert. Das Waschen der Erythrozyten wurde insgesamt 3-mal durchgeführt. Ein Aliquot des Erythrozyten-Konzentrats wurde 1:1 mit Humanplasma der Blutgruppe AB (AB-HP) versetzt, ein weiteres Aliquot wurde 1:2 mit AB-HP gemischt. Im Anschluss wurde die Gelbfärbungsgrenze für alle drei Ansätze off-line bei 85°C bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 16** dargestellt.

Temperatur [°C]	t_G [sec] folgender Ansätze		
	reines Erythrozytenkonzentrat	Erythrozytenkonzentrat : AB-HP (1:1)	Erythrozytenkonzentrat : AB-HP (1:2)
85	5	11	12

Tab. 16: Einfluss von AB-HP auf die Gelbildungsgrenze; Prozessierungstemperatur: 85°C

Aus diesen Versuchsergebnissen wird deutlich, dass eine Zugabe von Plasma die Gelbildungsgrenze zu einer längeren Heizdauer verschiebt. Der Einfluss von AB-HP auf die Gelbildungsgrenze wurde auch bei anderen Temperaturen untersucht und wird im Kapitel 5.6 näher beschrieben.

Nicht nur der Einfluss des Hämatokrits auf die Gelbildungsgrenze, sondern auch auf die anderen Prozessparameter t_{max} , t_{min} und dem resultierenden t_{heat} wurde bestimmt. Dazu wurden Vollblutproben mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten zusammenpipettiert und bei 75°C in Glaskapillaren prozessiert. Die Ergebnisse sind in **Tab. 17** dargestellt.

Hct	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
0,22	47	5	26
0,39	27	6	17
0,42	24	7	16
0,50	20	6	13
0,63	15	7	11

Tab. 17: *Ermittelte Prozessparameter für verschiedene Hämatokrit-Werte (Hct);
Prozessierungstemperatur: 75°C*

Die Ergebnisse zeigen, dass der Parameter t_{\max} abhängig ist vom Hämatokrit der untersuchten Probe. Dies ist nicht überraschend, da der Wert direkt gekoppelt ist an t_G . Festzuhalten ist jedoch, dass t_{\min} fast unabhängig vom Hämatokrit zu sein scheint. Für alle hier untersuchten Hämatokrit-Werte liegt das ermittelte t_{\min} zwischen 5 und 7 Sekunden, wenn die Probe bei 75°C prozessiert wird. Dieser Versuch zeigt, dass die Erythrozyten umgebende Plasma keinen Einfluss auf die Desintegration der roten Blutkörperchen hat, sondern ausschließlich den Prozess der Gelbildung beeinflusst. t_{heat} wird rechnerisch ermittelt und ist abhängig von t_{\max} und t_{\min} . Aus diesem Grund steigt der Wert für t_{heat} mit sinkendem Hämatokrit. Das Zeitfenster zur quantitativen Desintegration der Erythrozyten bei 75°C für Proben mit Hämatokrit-Werten im Bereich 0,22 – 0,63 liegt zwischen 7 und 15 Sekunden. Während dieser Heizdauer kommt es in allen Proben zu einer vollständigen Desintegration der Erythrozyten, jedoch noch nicht zur Denaturierung des freigesetzten Hämoglobins. In diesem Zeitfenster lassen sich somit Proben mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten unter identischen Bedingungen quantitativ prozessieren.

5.5 Einfluss verschiedener Infusionslösungen auf die Prozessparameter

Viele stationär behandelten Patienten erhalten Infusionen, um den benötigten Flüssigkeits- oder Elektrolytbedarf zu decken. Parenterale Ernährung ist dann von Nöten, wenn der Patient nicht selbstständig essen kann, oder die Nahrungszufuhr durch selbstständiges Essen nicht ausreichend ist. Tutofusin[®] ist eine Elektrolytinfusionslösung, die z.B. bei hypotoner Dehydratation oder kurzfristig als intravasaler Volumenersatz angewendet wird¹⁵¹. Bei physiologischer Stoffwechsellage werden 30-40 mL/kg KG und Tag infundiert. Zur parenteralen Ernährung dient unter anderem Lipofundin[®] MCT. Diese Emulsion dient zur Kaloriensubstitution mit rasch verwertbaren Fettkomponenten und der Zufuhr essentieller Fettsäuren im Rahmen der vollständigen parenteralen Ernährung¹⁵². Unter Verwendung von Lipofundin[®] MCT 20 % werden dem Patienten zwischen 0,5-2 g/kg KG und Tag infundiert.

Mit dem folgenden Versuch sollte gezeigt werden, ob und welchen Einfluss die Infusion dieser beiden Lösungen auf die Prozessparameter t_G , t_{max} , t_{min} und t_{heat} hat. Dazu wurde zum einen Vollblut in physiologischen Verhältnissen mit der jeweiligen Infusionslösung versetzt (Vollblut:Tutofusin[®], 1:1; Vollblut:Lipofundin[®] MCT 20 %, 69:1). Zum anderen wurde der Volumenprozentsatz von Lipofundin[®] MCT 20 % im Vollblut stark erhöht. All diese Ansätze wurden off-line bei 75°C prozessiert. Die native Vollblutprobe hatte einen Hämatokrit-Wert von 0,4. Die Ergebnisse sind in **Tab. 18** zusammengestellt.

Prozessparameter [sec]	Vollblut	Vollblut : Tutofusin® (1:1)	Vollblut : Lipofundin® MCT 20 % (4:1)	Vollblut : Lipofundin® MCT 20 % (9:1)	Vollblut : Lipofundin® MCT 20 % (69:1)
t_G	27	44	32	29	29
t_{max}	26	43	31	28	28
t_{min}	7	7	7	7	8
t_{heat}	17	25	19	18	17

Tab. 18: *Ermittelte Prozessparameter von Vollblut inkl. verschiedener Infusionslösungen; Prozessierungstemperatur: 75°C*

Die Bestimmung der Prozessparameter aus Vollblut dient als Kontrolle beziehungsweise als Vergleichswert für die zusätzlich ermittelten Werte der anderen Ansätze. Die Zufuhr von Tutofusin® in physiologischer Konzentration führt dazu, dass die Probe länger erhitzt werden kann, bis sie ein Gel bildet. Das Verdünnen der Vollblutprobe mit dieser Elektrolytlösung verlangsamt die Denaturierung vom freigesetzten Hämoglobin und somit die Gelbildung. Die Zugabe von Lipofundin® MCT 20 % hat kaum eine Wirkung auf die Gelbildungsgrenze von Vollblut. Gegenüber der nativen Vollblutprobe ist t_G nur leicht erhöht. Die Menge an zugesetztem Lipofundin® MCT 20 % hat, auch wenn der Zusatz weit über dem physiologischen Wert liegt, keinen Einfluss auf die Gelbildungsgrenze. Auffallend ist auch hier, dass der ermittelte Wert für t_{min} für alle Ansätze nahezu den gleichen Wert hat. Somit wird die Desintegration der Erythrozyten durch das Vorhandensein dieser beiden Infusionslösungen nicht beeinflusst. Die resultierenden Werte für t_{heat} sind für alle Ansätze nahezu gleich. Eine Ausnahme stellt die Tutofusin®-haltige Probe dar, die aufgrund des höheren t_G -Wertes bei vergleichbarem t_{min} -Wert in einem erhöhten t_{heat} -Wert resultiert.

Zusammenfassend gilt festzuhalten, dass das Vollblut von Patienten, die Tutofusin[®] oder Lipofundin[®] MCT 20 % verabreicht bekommen, unter Standardbedingungen prozessiert werden kann.

5.6 Einfluss von humanem AB-Plasma und verschiedener organischer Lösemittel auf die Prozessparameter

Gründe für die Bestimmung der Prozessparameter aus modifizierten Vollblutproben waren der starke Einfluss des Hämatokrits auf den Prozessparameter t_G , das Ziel der Entwicklung einer robusten Methode und die Suche nach einem eleganten Weg zur Zugabe des Internen Standards zu einer nativen Vollblutprobe.

5.6.1 Zugabe von humanem AB-Plasma (AB-HP)

Durch Zugabe von Plasma zu Vollblut verändert sich der Hämatokrit dieser Probe. Die Herabsetzung des Hämatokrit-Wertes verschiebt die Gelbildungsgrenze hin zu einer längeren Heizdauer. Für eine Temperatur von 75°C wurde dies in Kapitel 5.4 bereits gezeigt. Die Werte für t_{\min} blieben bei diesen experimentellen Bedingungen unbeeinflusst vom Hämatokrit-Wert. Wird Vollblut mit Humanplasma der Blutgruppe AB (AB-HP) vermischt, so kommt es zu keiner Agglutination der Erythrozyten, da dieses Plasma weder Antikörper gegen die Blutgruppe A noch gegen die Blutgruppe B besitzt. Im Folgenden wurden die Prozessparameter für eine 1:1 mit AB-HP verdünnte Vollblutprobe für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C off-line (manuell in Glas-

kapillaren) bestimmt. Der Hämatokrit der unverdünnten Probe hatte einen Wert von 0,39. Die Gelbildungsgrenze dieses Probenansatzes für einen Temperaturbereich zwischen 70 und 95°C ist in **Abb. 31** dargestellt.

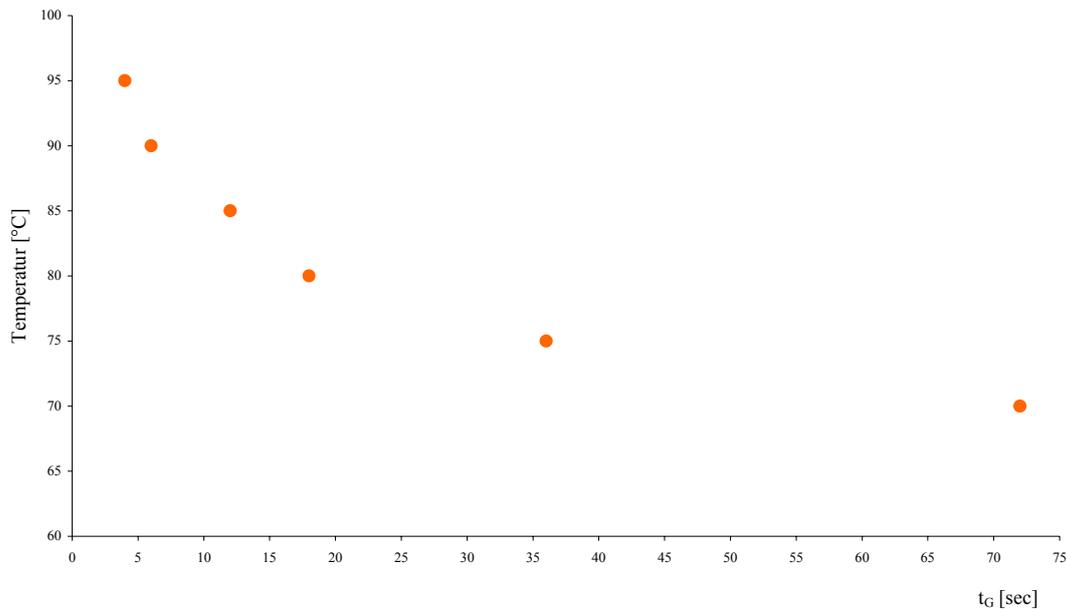


Abb. 31: Gelbildungsgrenze von Vollblut 1:1 mit AB-HP verdünnt bei verschiedenen Temperaturen

Diese Abbildung zeigt eine klare Abhängigkeit der Gelbildungsgrenze von der applizierten Prozessierungstemperatur. Im Vergleich zur nativen Vollblutprobe ist die Kurve zu höheren t_G -Werten hin verschoben. Dies ist auf die Absenkung des Hämatokritwertes der Ursprungsprobe und somit auf die Verzögerung der Aggregation des freigesetzten Hämoglobins zurückzuführen. In **Tab. 19** ist klar zu erkennen, dass die Gelbildung bei niedrigen Prozessierungstemperaturen erst sehr spät eintritt.

Temperatur [°C]	t_G [sec]
95	4
90	6
85	12
80	18
75	36
70	72
65	450
60	1531

Tab. 19: *Ermittelte t_G -Werte für Vollblut : AB-HP (1:1) für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Neben t_G wurden auch die Prozessparameter t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} für die oben beschriebene Probe off-line bestimmt. Die dazugehörigen Werte für den Temperaturbereich von 60 bis 95°C sind in **Tab. 20** zusammengefasst.

Temperatur [°C]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
95	3	3	3
90	5	5	5
85	11	7	9
80	17	8	11
75	35	4	20
70	71	35	53
65	449	72	261
60	1530	50	790

Tab. 20: *Ermittelte Werte für t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} einer 1:1 mit AB-HP verdünnten Vollblutprobe im Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Im Vergleich zu der nativen Vollblutprobe sind alle ermittelten Werte für die 1:1 mit AB-HP verdünnten Vollblutprobe zu einer längeren Heizdauer hin verschoben. Eine Ausnahme bilden die Werte für t_{\min} . Diese sind im oberen Temperaturbereich vergleichbar mit denen der nativen Vollblutprobe, im Bereich der niedrigen Temperaturen weichen sie jedoch stark voneinander ab. Auch bei diesem Ansatz führt eine Prozessierung bei Temperaturen $\leq 70^\circ\text{C}$ nicht zu einem Hitzeschock, sondern zu einer Wärmebehandlung der Erythrozyten, was sich in der relativ langsamen vollständigen Desintegration und den hohen Werten für t_G bzw. t_{\max} ausdrückt. Bei Temperaturen $\geq 85^\circ\text{C}$ liegen die Werte für t_{\max} und t_{\min} sehr nahe beisammen, so dass eine Änderung im Hämatokrit eine unerwünschte Gelbildung schon bei der Prozessierung für eine Dauer von t_{heat} nach sich ziehen kann. Für eine Vollblutprobe, die 1:1 mit AB-HP versetzt ist,

liegt die ideale Prozessierungstemperatur in einem Bereich zwischen 75 bis 80°C. Im Vergleich zur nativen Vollblutprobe hat sich die ideale Prozessierungstemperatur im Mittel um 5°C in Richtung höherer Temperatur hin verschoben.

5.6.2 Zugabe von Methanol

Die Zugabe eines organischen Lösemittels zur Probe bringt zunächst den Vorteil mit sich, dass der Wirkstoff aus seiner Proteinbindung verdrängt wird. Das heißt, der zu untersuchende Analyt liegt frei vor und seine Wiederfindungsrate steigt. Darüberhinaus wird in der LC dem wässrigen Eluenten ein geringer Anteil an organischem Lösemittel zugesetzt, um die Kapillaren, etc. von fetthaltigen Matrixbestandteilen, z.B. Lipiden, freizuhalten.

Es ist bekannt, dass zu einer Vollblutprobe nur ein geringer Teil eines organischen Lösemittels hinzugefügt werden darf, da es sonst zu einer Denaturierung und Präzipitation von Matrixproteinen kommt. Das Fällen der Vollblutprobe mit organischem Lösemittel ist eine weit verbreitete Probenaufbereitungsmethode (siehe Kapitel 2.2.1). Zu Vollblut lassen sich bis zu 15 vol. % Methanol hinzufügen, ohne dass es zu einer Denaturierung der Proteine kommt.

Die Überlegung, der Vollblutprobe ein organisches Lösemittel beizusetzen, beruht auch darauf, dass auf diese Weise der zu untersuchenden Probe vor der Prozessierung ein in Methanol gelöster Interner Standard elegant zugeführt werden kann.

In dieser Versuchsreihe wurde Vollblut direkt mit 5 vol. % Methanol versetzt. Zusätzlich wurde Vollblut mit humanem AB-Plasma verdünnt, das 5, 10 oder 20 vol. % Methanol enthielt. Somit wies die zu untersuchende Probe einen Gesamt-Methanolgehalt zwischen 2,5 und 10 vol. % auf. Der Hämatokrit der nativen Vollblutprobe betrug 0,39. Die frisch hergestellten Proben wurden off-line bei Temperaturen zwischen 60

und 95°C prozessiert, um die Prozessparameter t_G , t_{max} , t_{min} und t_{heat} zu bestimmen. **Abb. 32** zeigt die ermittelte Gelbildungsgrenze.

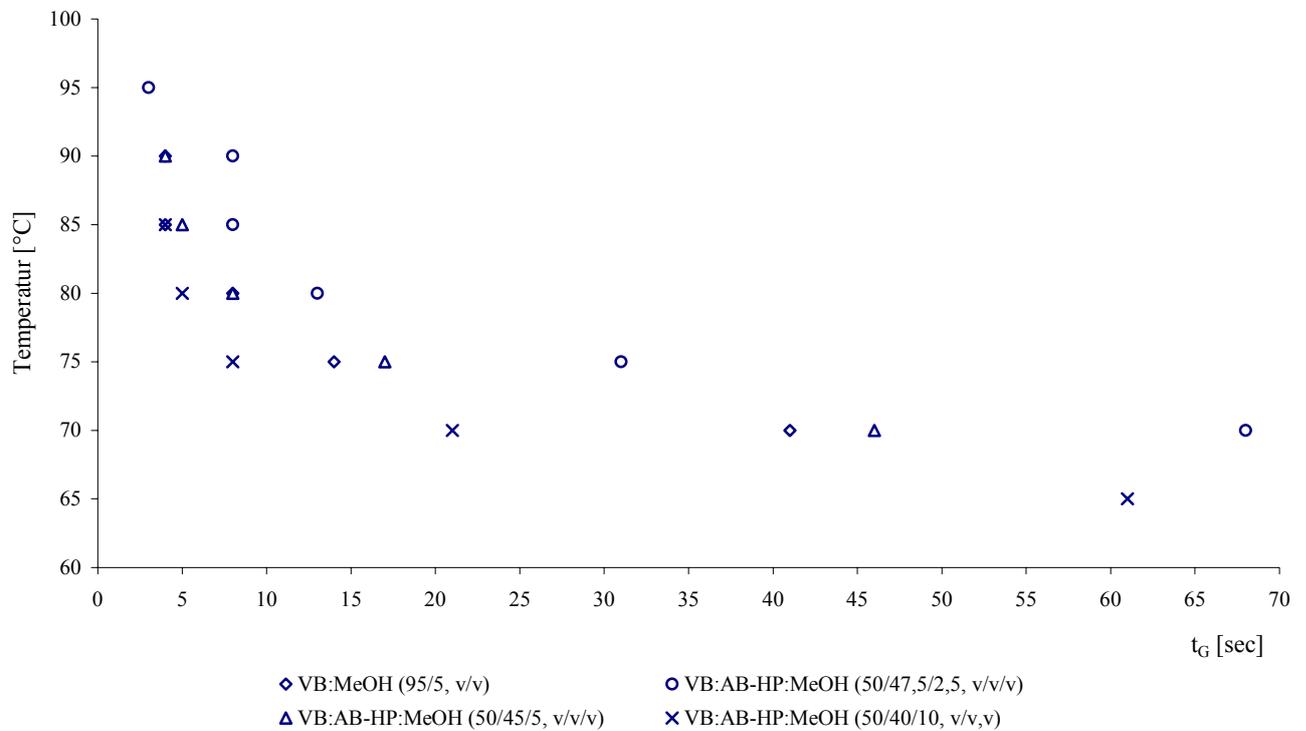


Abb. 32: Gelbildungsgrenze von Vollblut mit unterschiedlichen Anteilen an Methanol bei verschiedenen Temperaturen

In **Tab. 21** sind die Werte für t_G für den gesamten Temperaturbereich zwischen 60 und 95°C dargestellt. Aus dieser Tabelle lässt sich erkennen, dass die Zugabe von Methanol in Anteilen größer als 2,5 vol. % die Prozessierung der Probe bei sehr hohen Temperaturen nicht erlaubt. Die Ursache hierfür liegt bei dem Siedepunkt (64,7°C) des hinzugefügten Methanols, der unterhalb der kritischen Prozessierungstemperatur liegt¹⁵³. Enthält die Probe einen relativ großen Anteil an Methanol, so erleidet sie beim

Prozessieren einen Siedeverzug. Folglich können die Prozessparameter bei diesen Temperaturen nicht bestimmt werden.

Temperatur [°C]	t_G [sec]			
	VB:MeOH (95/5, v/v)	VB: AB-HP: MeOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB: AB-HP: MeOH (50/45/5, v/v/v)	VB: AB-HP: MeOH (50/40/10, v/v/v)
95	-	3	-	-
90	4	8	-	-
85	4	8	4	-
80	8	13	7	-
75	14	31	16	-
70	41	68	46	17
65	146	336	152	61
60	601	1355	721	172

Tab. 21: *Ermittelte t_G -Werte für Vollblut mit verschiedenen Anteilen an Methanol für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Die graphische Darstellung und die Tabelle zeigen sehr schön, dass mit Zunahme des Gehalts an Methanol in der Probe, die Gelbildungsgrenze bei identischer Temperatur zu kürzeren Heizdauern hin verschoben wird. Bei einer Temperatur von 70°C verkürzt sich die Heizdauer bis zur Gelbildung von 336 über 152 bis auf 61 Sekunden bei gleichzeitigem Anstieg des Methanol-Gehaltes von 2,5 über 5 auf 10 vol. % in einer 1:1 mit AB-HP verdünnten Vollblutprobe. Aus **Tab. 21** ist abzulesen, dass der Volumenanteil an Methanol entscheidend für die Gelbildung ist und nicht der Hämatokritwert der Probe. Denn die Proben VB:MeOH (95/5, v/v) und VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v) enthalten den gleichen Anteil an Methanol und zeigen eine vergleichbare Wertlage für t_G im Temperaturbereich zwischen 60 bis 85°C.

Neben t_G wurden auch die anderen Prozessparameter für methanolische Vollblut-Mischungen bestimmt. **Tab. 22** zeigt die ermittelten Werte für t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} .

Temperatur [°C]	VB:MeOH (95/5, v/v)			VB: AB-HP: MeOH (50/47,5/2,5, v/v/v)			VB: AB-HP: MeOH (50/45/5, v/v/v)			VB: AB-HP: MeOH (50/40/10, v/v/v)		
	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
95	-	-		2	2	2	-	-	-	-	-	-
90	3	3	3	7	2	5	-	-	-	-	-	-
85	3	3	3	7	3	5	3	3	3	-	-	-
80	7	7	7	12	3	8	6	3	5	-	-	-
75	13	6	10	31	3	17	15	3	9	-	-	-
70	40	10	25	67	4	36	45	2	24	16	4	10
65	145	18	82	335	46	191	151	9	80	60	15	38
60	600	18	309	1354	551	953	720	22	371	171	5	88

Tab. 22: *Ermittelte Werte für t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} für methanolische Vollblutproben im Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Für die zusätzlich ermittelten Prozessparameter gilt ebenfalls, dass sich mit zunehmendem Methanolgehalt und identischer Temperatur die ermittelten Werte für t_{\min} und die daraus resultierenden Werte für t_{heat} zu den kürzen Heizdauern hin verschieben. Wieder sind die t_{\min} - und t_{heat} -Werte für die beiden Ansätze mit 5 vol. % Methanol vergleichbar. Das bedeutet wiederum, dass auch t_{\min} bei identischer Temperatur nicht vom Hämatokrit der Probe, sondern allein vom Methanolgehalt abhängig ist.

Festzuhalten gilt, dass bei konstantem Gehalt an Methanol, die Prozessparameter temperaturabhängig sind. Mit sinkender Temperatur steigt der Wert für t_G und t_{\min} . Daraus folgt, dass die Probe länger erhitzt werden kann bis ein Gel entsteht. Zudem muss sie länger erhitzt werden, um eine quantitative Desintegration der Erythrozyten zu erreichen. Der ideale Temperaturbereich ist abhängig vom Methanolgehalt der Probe. Enthält die Vollblutprobe 2,5 vol. % Methanol, so liegt der optimale Temperaturbereich für die Prozessierung zwischen 75 und 80°C. Bei einer Probe mit einem Gehalt an 5 vol. % Methanol verschiebt er sich auf 75°C. Wird der Methanolgehalt der Probe auf 10 vol. % erhöht, so sinkt die optimale Prozessierungstemperatur auf 70°C. Allgemein gilt: Werden die Proben bei Temperaturen oberhalb des Idealbereichs prozessiert, liegen die Werte für t_{\max} und t_{\min} sehr nah beisammen oder sind sogar identisch. Das bringt die Gefahr eine Gelbildung während der Hitzeschockbehandlung von Proben mit Hämatokrit-Werten $> 0,4$ mit sich.

5.6.3 Zugabe von Acetonitril

Als organischer Modifier wird in der Chromatographie alternativ Acetonitril zu wässrigen mobilen Phasen hinzugefügt. Acetonitril (ACN) ist auch in der Lage, den Wirkstoff aus der Proteinbindung zu verdrängen und fetthaltige Matrixbestandteile aus den LC-Kapillaren herauszuspülen. Acetonitril weist eine geringere Polarität als Methanol

auf und ist in der eluotropen Reihe aufgrund seiner geringeren Polarität hinter Methanol eingestuft¹⁵⁴.

Zu einer Vollblutprobe können maximal 10 vol. % Acetonitril hinzugefügt werden, ohne dass es zu einer Denaturierung bzw. Fällung von Proteinen kommt.

In der hier beschriebenen Versuchsreihe wurde der Effekt von Acetonitril auf alle vier Prozessparameter in einem Temperaturbereich von 60 bis 95°C untersucht. Die Proben wurden in Glaskapillaren gefüllt und manuell prozessiert. Als Probe diente zum einen Vollblut, das 5 vol. % Acetonitril enthielt, zum anderen wurde Vollblut 1:1 mit AB-Humanplasma verdünnt, das 5, 10 oder 20 vol. % Acetonitril enthielt. Die verdünnten Vollblutproben enthielten somit ein Gesamtvolumen zwischen 2,5 und 10 % Acetonitril. Der Hämatokrit der nativen Vollblutprobe betrug 0,4. **Abb. 33** zeigt die experimentell ermittelten t_G -Werte für die verschiedenen Acetonitril-Vollblut-Mischungen.

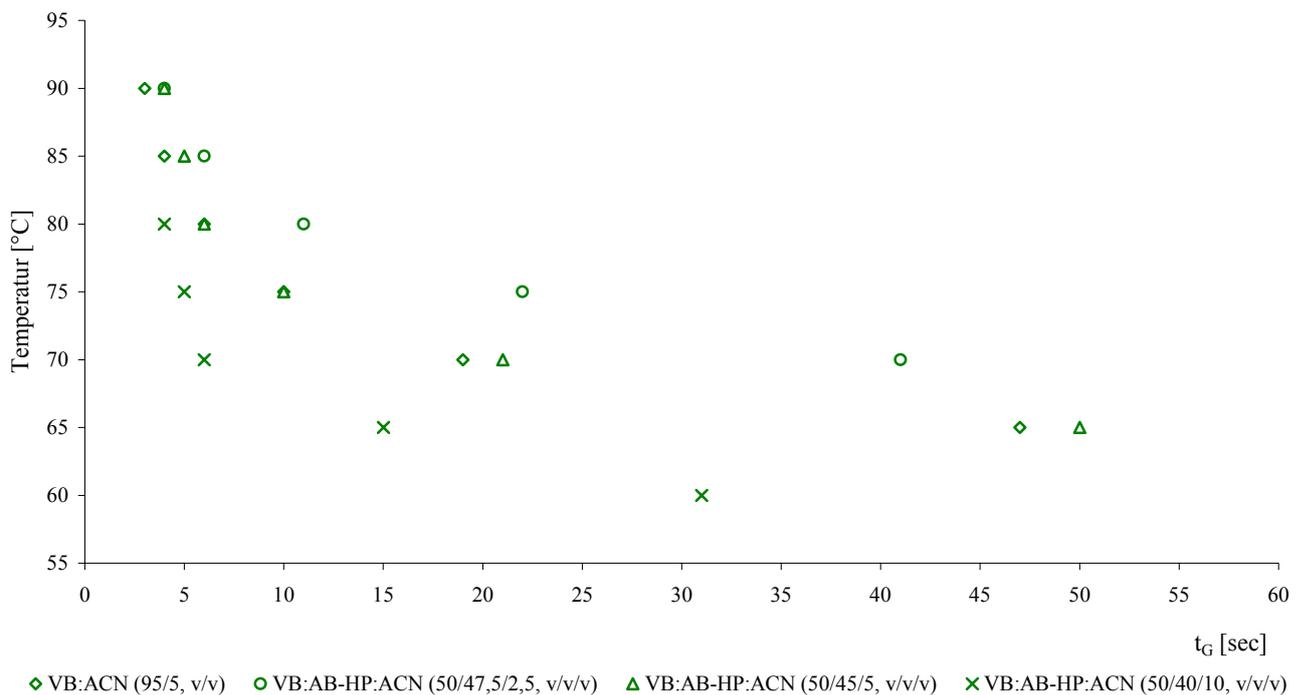


Abb. 33: Gelbildungsgrenze (t_G) von Vollblut mit unterschiedlichen Anteilen an Acetonitril bei verschiedenen Temperaturen

Die ermittelten t_G -Werte der untersuchten Acetonitril-Vollblut-Mischungen für den gesamten Temperaturbereich sind in **Tab. 23** zu sehen.

Temperatur [°C]	t_G [sec]			
	VB:ACN (95/5, v/v)	VB: AB-HP: ACN (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB: AB-HP: ACN (50/45/5, v/v/v)	VB: AB-HP: ACN (50/40/10 v/v/v)
95	-	-	-	-
90	3	4	4	-
85	4	6	4	-
80	6	11	6	4
75	10	22	10	5
70	19	41	21	6
65	47	151	50	15
60	181	735	256	31

Tab. 23: *Ermittelte t_G -Werte für Vollblut mit verschiedenen Anteilen an Acetonitril für einen Temperaturbereich von 65 bis 95°C*

Aus dieser Tabelle lassen sich zwei Schlüsse ziehen. Erstens wird deutlich, dass mit steigendem Volumengehalt an Acetonitril und identischer Temperatur, sich die ermittelten Werte für t_G zu einer kürzeren Heizdauer hin verschieben. Zweitens wird auch hier klar ersichtlich, dass der Gehalt an zugefügtem Acetonitril ausschlaggebend für t_G ist und nicht der Hämatokrit der Probe. Inhaltlich sind diese beiden Schlussfolgerungen mit denen der methanolischen Vollblutproben zu vergleichen (s. Kapitel 5.6.2). Auch hier gilt: Je höher das zugesetzte Volumen an Acetonitril, desto niedriger ist die Temperatur, mit der die Bestimmung der t_G -Werte beginnt. Acetonitril hat einen höheren Siedepunkt (81-82°C) als Methanol¹⁵³. Aus diesem Grund können die Prozessparameter der Acetonitril-haltigen Vollblutprobe in der Regel schon ab 90°C bestimmt werden. **Tab. 24** zeigt die experimentell bestimmten Werte der verbleibenden Parameter.

Temperatur [°C]	VB:ACN (95/5, v/v)			VB: AB-HP: ACN (50/47,5/2,5, v/v/v)			VB: AB-HP: ACN (50/45/5, v/v/v)			VB: AB-HP: ACN (50/40/10, v/v/v)		
	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	2	2	2	3	3	3	3	3	3	-	-	-
85	3	3	3	5	2	4	3	3	3	-	-	-
80	5	5	5	10	5	8	5	5	5	3	1	2
75	9	9	9	21	2	12	9	2	6	4	1	3
70	18	9	14	40	5	23	20	5	13	5	1	3
65	46	11	29	150	9	80	49	12	31	14	1	8
60	180	45	113	734	11	373	255	31	143	30	1	16

Tab. 24: *Ermittelte Werte für t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} für Acetonitril-haltige Vollblutproben im Temperaturbereich von 60 bis 95°C*

Es zeigt sich auch aus den Werten der **Tab. 24**, dass sich mit steigendem Gehalt an Acetonitril in der Probe t_{\min} , t_{\max} und das daraus resultierende t_{heat} bei identischer Temperatur zu den kürzeren Zeiten hin verschieben. Somit lassen sich Proben, die weniger Acetonitril enthalten, bei konstanter Temperatur länger erhitzen bis sie ein Gel bilden. Sie müssen zudem auch länger prozessiert werden, um eine vollständige Desintegration der Erythrozyten zu erzielen. Ein Vergleich der Prozessparameter der beiden Ansätze, die 5 vol. % Acetonitril beinhalten, lässt vermuten, dass auch in diesem Falle bei konstanter Temperatur nur der Volumenanteil an zugegebenem organischem Lösemittel und nicht der Hämatokrit für den Zeitpunkt der Gelbildung und der quantitativen Desintegration der Erythrozyten verantwortlich ist.

Bestätigt wird diese Aussage durch folgende Untersuchung. Vollblut wurde 1:1 mit AB-HP verdünnt, das 10 vol. % ACN enthielt. Somit betrug das Gesamtvolumen an ACN in der Probe 5 %. Es wurden mehrere Ansätze mit der gleichen Zusammensetzung hergestellt, jedoch variierte der Hämatokrit des Vollblutanteils zwischen 0,65 und 0,2. All diese Ansätze wurden bei 75°C off-line prozessiert und die Prozessparameter t_G , t_{\max} , t_{\min} und t_{heat} bestimmt. In **Tab. 25** sind die ermittelten Werte der Prozessparameter zusammengefasst.

Ansatz	Hct der Gesamtprobe	t_G [sec]	t_{\max} [sec]	t_{\min} [sec]	t_{heat} [sec]
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	0,325	11	10	2	6
	0,280	11	10	2	6
	0,250	11	10	2	6
	0,200	13	12	2	7
	0,150	13	12	2	7
	0,100	13	12	2	7

Tab. 25: Prozessparameter einer VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)-Probe mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten; Prozessierungstemperatur: 75°C

Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals, dass der Hämatokrit einer Probe kaum Einfluss auf die Prozessparameter hat, wenn es sich um einen Ansatz handelt, der organischen Modifier enthält. Das bedeutet, Proben, die sich aus VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v) zusammensetzen, können unabhängig vom Hämatokrit des Vollblutanteils unter identischen Bedingungen prozessiert werden, ohne der Gefahr, ein Gel zu generieren oder eine unvollständige Desintegration der Erythrozyten zu erlangen.

Der ideale Temperaturbereich zur Hitzeschockbehandlung der Probe ist vom Acetonitrilgehalt der Probe abhängig. Je höher der Volumenanteil an organischem Lösemittel ist, desto stärker verschiebt sich die optimale Prozessierungstemperatur in den unteren Temperaturbereich. Vollblutproben, die 2,5 vol. % Acetonitril enthalten, werden optimal bei Temperaturen zwischen 75 und 80°C prozessiert. Ein idealer Temperaturbereich zwischen 70 und 75°C ergibt sich für Vollblutproben mit einem Volumenanteil von 5 % Acetonitril. Vollblut, das mit 10 vol. % Acetonitril versetzt ist, wird optimal im Bereich zwischen 60 und 65°C prozessiert.

5.6.4 Zugabe von Ethanol

Ethanol wurde als weiteres organisches Lösemittel zu den Untersuchungen hinzugezogen. Der Vorteil von Ethanol ist, dass es nicht toxisch ist und somit unter anderem schwangere Laborangestellte damit hantieren dürfen. Ein Blick auf die eluotrope Reihe lässt erkennen, dass die Polarität von Ethanol zwischen der von Acetonitril und Methanol einzustufen ist¹⁵⁴. Der Siedepunkt dieses Lösemittel liegt bei 78°C und daher zwischen den Werten von Acetonitril und Methanol¹⁵³. Aus den vorausgehenden Versuchen hat sich ein optimaler Temperaturbereich zur Hitzeschockbehandlung von Vollblut um 75°C herauskristallisiert. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden aus diesem Grund nur bei einer Temperatur von 75°C durchgeführt. Als Probe diente nati-

ves, antikoaguliertes Vollblut, das 1:1 mit humanem AB-Plasma (AB-HP) versetzt wurde. Das AB-HP wurde zuvor mit 5, 10 oder 20 vol. % Ethanol dotiert. Somit betrug der Gesamtvolumenanteil von Ethanol in den Endproben 2,5 bis 10 %. Eine Messung des Hämatokrits der nativen Vollblutprobe ergab einen Wert von 0,42. Die Prozessierung der Proben wurde off-line durchgeführt. **Tab. 26** fasst die ermittelten Prozessparameter zusammen.

Prozessparameter [sec]	VB:AB-HP:EtOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB:AB-HP:EtOH (50/45/5, v/v/v)	VB:AB-HP:EtOH (50/40/10, v/v/v)
t_G	26	13	5
t_{max}	25	12	4
t_{min}	6	3	1
t_{heat}	16	8	3

Tab. 26: *Ermittelte Prozessparameter für Ethanol-haltige Vollblutproben;
Prozessierungstemperatur: 75°C*

Es ist zu sehen, dass sich mit zunehmendem Volumenanteil an Ethanol die Werte der Prozessparameter zu einer kürzeren Heizdauer hin verschieben.

5.6.5 Zugabe von Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist das apolarste organische Lösemittel, das im Rahmen dieser Arbeit zu nativem, antikoaguliertem Vollblut zugesetzt wurde. In der elutropen Reihe ist es hinter Acetonitril einzuordnen. Mit steigender Apolarität steigt auch der Siedepunkt. Für DMSO liegt er bei 189°C ¹⁵³. Wie schon für die Untersuchungen bei der Zugabe von Ethanol zu Vollblut, wurde auch in dieser Versuchsreihe nur bei einer Temperatur von 75°C gearbeitet. Die zu untersuchenden Proben enthielten DMSO in Volumenanteilen von 0,5 bis 10 %. Alle vier Prozessparameter wurden off-line bestimmt. Die native Vollblutprobe hatte einen Hämatokrit von 0,4. Die ermittelten Prozessparameter sind in **Tab. 27** dargestellt.

Prozess-parameter [sec]	VB:DMSO (99,5/0,5, v/v)	VB:DMSO (99/1, v/v)	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	VB:DMSO (95/5, v/v)	VB:DMSO (90/10, v/v)
t_G	33	28	26	24	15
t_{\max}	32	27	25	23	14
t_{\min}	6	3	1	1	1
t_{heat}	19	15	13	12	8

Tab. 27: *Ermittelte Prozessparameter für DMSO-haltige Vollblutproben;*

Prozessierungstemperatur: 75°C

Auch beim Zusatz von DMSO bestätigt sich der Trend, dass mit zunehmendem Volumenanteil an organischem Lösemittel, sich die Heizdauer bis zur Gelbildung bei identischen Temperaturen verkürzt.

Auffällig bei der Bestimmung von t_{\min} war, dass ab einer DMSO-Gehalt $\geq 2,5$ vol. %, der ermittelte Wert bei ungefähr 1 Sekunde lag. Eine Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Volumenanteilen von DMSO auf Erythrozyten bei Raumtemperatur hat gezeigt, dass sich die Anzahl der intakten Erythrozyten bei einem DMSO-Gehalt von > 2 vol. % verändert. **Abb. 34** zeigt die Anzahl der intakten Erythrozyten bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 60 Minuten.

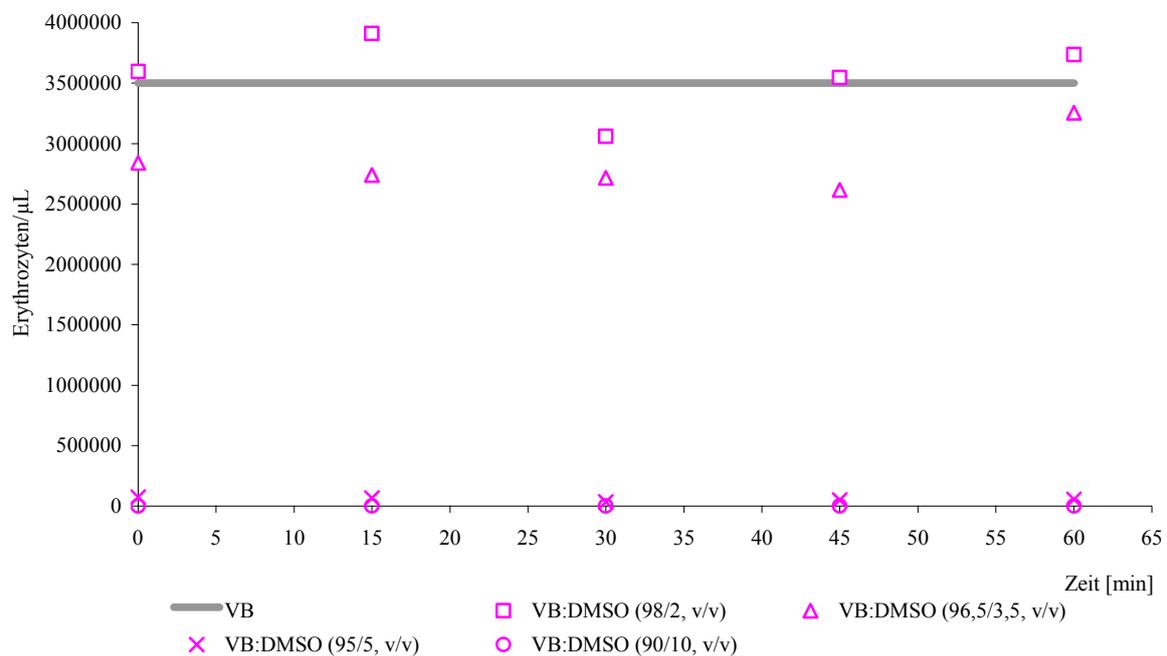


Abb. 34: Einfluss von DMSO auf die Erythrozyten bei Raumtemperatur

Die Vermutung, dass DMSO ab einem Volumenanteil von ungefähr 3,5 % eine Lyse der Erythrozyten herbeiführt, lag auf der Hand. Dies würde auch die niedrigen Werte für t_{\min} erklären. Doch das Stehen lassen der Ansätze für zwei Stunden zeigte deutlich, dass sich ein 2-Phasen-System aus einem dunkelrotem Blutzellensediment und einem rötlich gefärbtem Überstand bildete. Die Intensität der Rotfärbung des Überstands nahm mit steigendem DMSO-Gehalt der Probe zu. Dieses Ergebnis widersprach der Vermutung, dass die alleinige Anwesenheit von DMSO zur Lyse der Erythrozyten führt. Bei einer vollständigen Hämolyse dürfte sich kein 2-Phasen-System bilden. Das mehrmalige Waschen einer mit 10 vol. % DMSO versetzten Vollblutprobe mit physiologischer Kochsalzlösung zeigte, dass DMSO die Erythrozyten maskiert und sie trotz Vitalfärbung mit Trypanblau-Lösung unter dem Mikroskop nicht sichtbar macht. **Abb. 35** zeigt eine Aufnahme der untersuchten Probe vor und nach dem Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung.

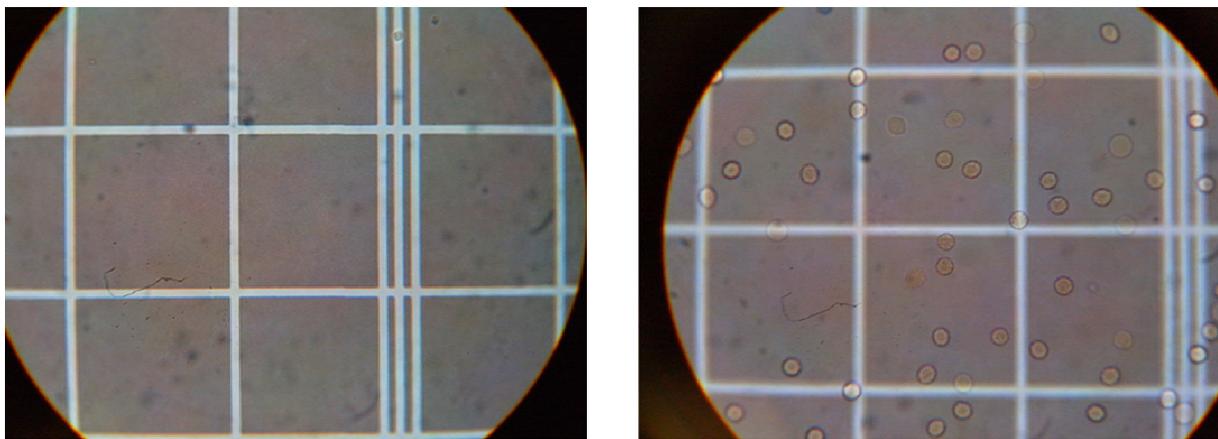


Abb. 35: links: Behandelte Vollblutprobe (VB:DMSO (90/10, v/v)) nach Vitalfärbung mit Trypanblau (100-fache Vergrößerung); rechts: Behandelte Vollblutprobe (VB:DMSO (90/10, v/v)) nach 4-maligem Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung nach Vitalfärbung mit Trypanblau (100-fache Vergrößerung)

Zur Verifizierung der ermittelten t_{\min} -Werte für die Vollblutproben mit $\geq 2,5$ vol. % DMSO wurde der Wert nochmals näherungsweise mit Hilfe von Drabkin's Reagenz bestimmt. Diese zweite Methode zur Bestimmung der Effizienz der Hitzeschockbehandlung ermittelt die Konzentration von freigesetztem Hämoglobin photometrisch. **Tab. 28** zeigt, dass die Tendenz vom sinkendem t_{\min} bei steigendem Volumenanteil an DMSO bestätigt wird. Eine Vollblutprobe, die 10 vol. % DMSO enthält, muss mindestens 4 Sekunden bei 75°C Hitzeschock-behandelt werden. t_{\min} steigt auf ca. 8 Sekunden, wenn die Vollblutprobe nur 2,5 vol. % DMSO enthält.

neu ermittelte Prozessparameter [sec]	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	VB:DMSO (96/4, v/v)	VB:DMSO (94/6, v/v)	VB:DMSO (90/10, v/v)
t_G	26	-	-	15
t_{\max}	25	-	-	14
t_{\min}	8	8	6	4
t_{heat}	17	-	-	9

Tab. 28: *Mit Drabkin's Reagenz ermittelte t_{\min} -Werte für verschiedene Vollblut : DMSO-Ansätze; Prozessierungstemperatur: 75°C*

5.6.6 Zusammenfassung: Zugabe von verschiedenen organischen Lösemitteln

Die beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass organische Lösemittel mit unterschiedlicher Polarität, die Gelbildungsgrenze der Vollblutprobe beeinflussen. Nicht nur die Art des Lösemittels ist ausschlaggebend für t_G , sondern auch der Volumenanteil. **Abb. 36** fasst die off-line bestimmten Gelbildungsgrenzen verschiedener Vollblutansätze bei 75°C zusammen.

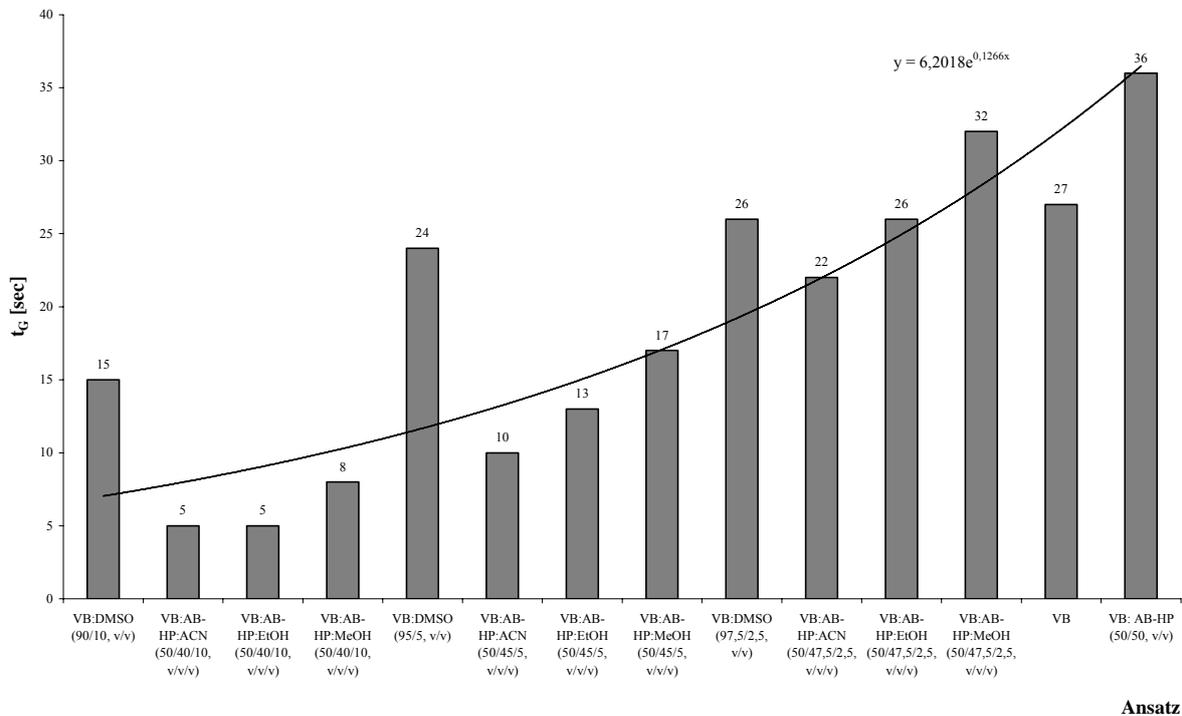


Abb. 36: Bei 75°C ermittelte t_G -Werte verschiedener Vollblutansätze

Die Grafik zeigt nochmals, dass bei steigendem Volumenanteil an organischem Lösemittel in Vollblut und identischer Temperatur, sich die Gelbildungsgrenze zu einer kür-

zere Heizdauer hin verschiebt. Gleichzeitig lässt sich aus dem Graphen herauslesen, dass die Polarität des verwendeten Lösemittels, die Gelbildungsgrenze beeinflusst. Je unpolarer das organische Lösemittel, desto niedriger ist der Wert für t_G . Eine mögliche Erklärung könnte die Wechselwirkung des Lösemittels mit der Zellmembran liefern. Die Membran der Zelle lässt sich mit dem von Lenard und Singer vorgeschlagenen Fluid-Mosaik-Modell beschreiben. Die Membran besteht demnach aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine wie Inseln ein- oder aufgelagert sind und dabei ein Mosaik bilden. Membranüberbrückende Proteine stellen Poren in der Lipiddoppelschicht dar. Aufgrund der dauernden Veränderung der Membran, stellt man sich diese dynamisch und nicht statisch vor. Zwei prinzipiell unterschiedliche Membranstrukturen stehen für den Stoffdurchtritt zur Verfügung. Die Lipidschicht für die Aufnahme lipophiler Stoffe und die wassergefüllten Poren für die Penetration hydrophiler Substanzen¹¹⁴. Die Membran der Erythrozyten besteht aus ca. 50 % Protein und 40 % Lipid¹⁵⁵. Quantitativ gesehen steht die Diffusion durch die Lipidmatrix im Vordergrund. Die in den Membranen enthaltenen Poren besitzen nur für die Resorption schlecht lipidlöslicher Nichtelektrolyte sowie vollständig ionisierter Stoffe mit relativ niedrigem Molekulargewicht eine gewisse Bedeutung. Je apolarer das organische Lösemittel ist, desto besser kann es sich in die Lipiddoppelschicht einlagern. Durch die auf diese Art herbeigeführte Lyse tritt Hämoglobin aus der Zelle aus und wird aufgrund der Hitzezufuhr denaturiert. Es bildet sich ein Gel. DMSO ist das apolarste der in dieser Arbeit eingesetzten organischen Lösemittel. Zu erwarten wäre, dass in Gegenwart von DMSO der entsprechende Wert für t_G am kleinsten ist. Dimethylsulfoxid stellt eine Ausnahme dar. Es scheint, die Aggregation bzw. Denaturierung von freigesetztem Hämoglobin zu verzögern. Aus der Darstellung ist auch deutlich zu erkennen, dass der Zusatz von humanem AB-Plasma zu Vollblut und die dadurch resultierende Herabsetzung des Hämatokrits zu einer Verzögerung der Gelbildung führen.

Im Laufe der Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die ideale Prozessierungstemperatur der Vollblutprobe abhängig von der Art und Menge der zugesetzten organischen Lösemittel ist. Um die ideale Prozessierungstemperatur festzulegen, ist es von Bedeutung, dass das Fenster zwischen t_{max} und t_{min} groß genug ist. Zusätzlich darf der

Wert für t_{heat} nicht zu groß sein, denn das Endziel dieser Untersuchungen ist der Transfer der off-line ermittelten Ergebnisse in ein on-line System, in dem die Probe in-line prozessiert wird. Die Verweilzeit der Probe im Heizelement wird dann über den Fluss geregelt. Ausserdem soll die Prozessierung der Probe so schnell und sicher wie möglich durchgeführt werden, um eine zeiteffiziente und robuste Methode zu erhalten. **Tab. 29** stellt die optimalen Prozessierungstemperaturen für verschiedene Vollblutansätze dar. Anzumerken ist, dass die DMSO- und Ethanol-haltigen Ansätze nur bei einer Temperatur von 75°C untersucht wurden.

kein organischer Modifier						
Ansatz	VB	VB:AB-HP (50/50, v/v)				
ideale Prozessierungstemperatur [°C]	70-75	75-85				
2,5 vol. % organischer Modifier						
Ansatz	VB:AB-HP:MeOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB:AB-HP:ACN (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB:AB-HP:EtOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)		
ideale Prozessierungstemperatur [°C]	75-80	75-80	75	75		
5 vol. % organischer Modifier						
Ansatz	VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	VB:MeOH (95/5, v/v)	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	VB:ACN (95/5, v/v)	VB:AB-HP:EtOH (50/45/5, v/v/v)	VB:DMSO (95/5, v/v)
ideale Prozessierungstemperatur [°C]	75	75	70-75	70	75	75
10 vol. % organischer Modifier						
Ansatz	VB:AB-HP:MeOH (50/40/10, v/v/v)	VB:AB-HP:ACN (50/40/10, v/v/v)	VB:AB-HP:EtOH (50/40/10, v/v/v)	VB:DMSO (90/10, v/v)		
ideale Prozessierungstemperatur [°C]	70	60-65	75	75		

Tab. 29: *Optimale Temperaturen für die Prozessierung von Vollblut nach Zusatz verschiedener Additive*

Vergleicht man die Methanol- mit den Acetonitril-haltigen Vollblutproben, die in einem Temperaturbereich zwischen 60 bis 95°C off-line prozessiert wurden, so lässt sich ableiten, dass mit zunehmender Apolarität des organischen Lösemittels die ideale Prozessierungstemperatur sinkt. Weiterhin fällt auf, dass mit zunehmendem Volumenanteil

an organischem Lösemittel der Bereich der idealen Prozessierungstemperatur hin zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird.

5.7 Desintegration von Leukozyten

Die Leukozyten stellen mit 0,1 % die kleinste Fraktion an zellulären Bestandteilen im Blut dar. Wie in Kapitel 2.1.1 erwähnt, werden die Leukozyten unterteilt in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Bei den Granulozyten wird unterschieden zwischen den Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen. Die Lymphozyten sind unterteilt in B- und T-Lymphozyten. Die Leukozytensubtypen kommen in unterschiedlicher Häufigkeit vor. Die Anzahl der Leukozyten ist abhängig vom Alter, wie in **Tab. 30** dargestellt.

Entwicklungsstadium	Alter	Leukozyten/ μL
Neugeborene	bei der Geburt	9 000 - 30 000
	2 Wochen alt	5 000 - 20 000
Kinder	1-3 Jahre	6 000 - 17 500
	4-7 Jahre	5 500 - 15 500
	8-13 Jahre	4 500 - 13 500
Erwachsene		4 300 - 10 000

Tab. 30: Referenzwerte der Leukozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen¹⁴³

Eine Veränderung der Gesamtleukozytenzahl oder dem Verhältnis zwischen den Leukozytensubtypen gibt Hinweise auf Krankheiten. Mittels eines Differentialblutbildes können wichtige Hinweise für die Differenzialdiagnose oder in manchen Fällen sogar eine Diagnosestellung erfolgen. Dazu wird ein Blutausstrich erstellt, der nach Giemsa oder Pappenheim gefärbt wird¹⁴³. Die Färbung nach Pappenheim setzt sich aus zwei Lösungen, der May-Grünwald und der Giemsa-Lösung, zusammen. In diesen Lösungen sind der saure Farbstoff Eosin und die basischen Farbstoffe Azur 1, Azur 2 und Methyleneblau enthalten. Mit den basischen Farbstoffen werden die sauren Gruppen der Nucleinsäuren und Proteine gefärbt, Eosin hingegen hat eine hohe Affinität zu basischen Gruppen und färbt diese. Nach Trocknung des Ausstriches wird dieser unter dem Mikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung an einer geeigneten Stelle meanderförmig durchmustert. Es werden 100 Leukozyten ausgezählt und prozentual der monozytären, granulozytären oder lymphatischen Fraktion zugeordnet. In **Tab. 31** ist die prozentuale Verteilung der Leukozyten bzw. die absolute Anzahl der entsprechenden Fraktion dargestellt. Von Erwachsenen und Neugeborenen ist das Differentialblutbild sehr ähnlich. Das Verhältnis von Lymphozyten und Neutrophilen ist im Alter von 1 Jahr exakt invers¹⁴³.

Leukozytenart	Vorkommen [%]	Vorkommen/ μ L
Neutrophile	40-75	2 500 - 7 500
Eosinophile	1-6	40 - 400
Basophile	0-1	0 - 100
Monozyten	2-8	200 - 800
Lymphozyten	20-45	1 500 - 3 500

Tab. 31: Referenzwerte für das Vorkommen verschiedener Leukozytenarten im Differentialblutbild¹⁴³

5.7.1 Quantitative mikroskopische Bestimmung der Desintegration von Leukozyten

Zur manuellen Auszählung der Leukozyten wird Vollblut 1:20 mit Türk'scher Lösung (= 3 %iger Essigsäure) versetzt. Es kommt zur Lyse der Erythrozyten, die Leukozyten bleiben jedoch intakt. Die Leukozytenverdünnung wird dann in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl werden die vier äußeren Großquadrate unter dem Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung ausgezählt. **Abb. 37** zeigt die auszuzählenden Quadrate einer Neubauer-Zählkammer.

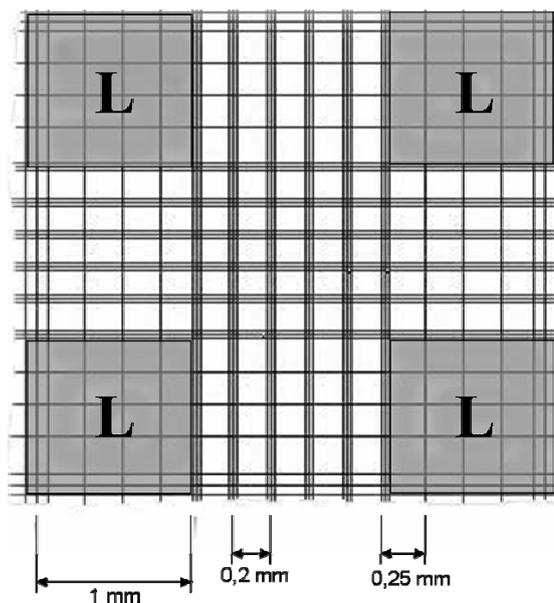


Abb. 37: Neubauer-Zählkammer: Großquadrate zur Auszählung von Leukozyten
[in Anlehnung an¹³⁹]

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Kammertiefe und der ausgezählten Kammerfläche kann die Anzahl der enthaltenen Leukozyten pro μL Blut mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Leukozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Anzahl gezählter Leukozyten} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Kammerfläche} [\text{mm}^2] \times \text{Kammertiefe} [\text{mm}]}$$

Der Nachteil bei Anwendung von Türk'scher Lösung ist, dass es sich hierbei nicht um eine Vitalfärbung handelt. Das bedeutet, es kann nicht zwischen intakten und desintegrierten Leukozyten unterschieden werden.

5.7.2 Effizienz der Hitzeschockbehandlung (HST) von Leukozyten

Wie in Kapitel 5.7.1 beschrieben wird Blut klassischer Weise mit Türk'scher Lösung versetzt bevor die Leukozyten unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Unsere Erfahrung zeigt jedoch, dass bei dieser Färbemethode der Vitalzustand der Leukozyten nicht wiedergegeben wird. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit zur Überprüfung der Effizienz der HST anstelle von Türk'scher Lösung Trypanblau-Lösung eingesetzt.

Im Rahmen der Leukozytenuntersuchung wurden drei unterschiedliche Ansätze untersucht. Wie bei der Desintegration von Erythrozyten wurde auch hier das Blut off-line, d.h. manuell, prozessiert. Der Hämatokrit der nativen Vollblutprobe betrug 0,4. **Tab. 32** fasst die untersuchten Proben, die dazugehörigen Bedingungen und die ermittelten Ergebnisse zusammen.

Ansatz	Prozessierungs- temperatur [°C]	Heizdauer [sec] t_{heat}	Leukozyten/ μL nach Hitzeschockbehandlung
VB	75	16	0
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	75	6	0
VB:ACN (95/5, v/v)	70	14	0

Tab. 32: Desintegrationseffizienz von Leukozyten in verschiedenen Ansätzen

Diese Versuchsreihe zeigt, dass sich die Leukozyten unter Standardbedingungen durch Hitzeschockbehandlung quantitativ desintegrieren lassen. Die Leukozyten sind mit Abstand die kleinste Fraktion der zellulären Bestandteile im Blut, jedoch können die Monozyten eine Größe von bis zu 20 μm erreichen. Auch die anderen Subtypen der Leukozyten sind größer als die Erythrozyten oder Thrombozyten. Die Hitzeschockbehandlung führt somit auch bei relativ großen Zellen zur Bildung subzellulärer Partikel.

Es wurde in dieser Versuchsreihe nur der Einfluss von Acetonitril auf die Desintegration der Leukozyten untersucht. Es hat sich gezeigt, dass Acetonitril die Desintegration der Leukozyten nicht verhindert. Das gleiche wird auch von den anderen, im Vorfeld eingesetzten, organischen Lösemitteln erwartet.

Zusammenfassend gilt zu sagen, dass Erythrozyten und Leukozyten unter den gleichen experimentellen Bedingungen quantitativ desintegriert, d.h. in subzelluläre Partikel überführt, werden können.

5.8 Desintegration von Thrombozyten

Die Thrombozyten stellen mit knapp 5 % die zweitgrößte Zellfraktion im Blut dar. Thrombozyten sind diskusförmige, kernlose Scheibchen mit einer Dicke von 0,5-2 μm und einem Längsdurchmesser von 1,5-4 μm . In ihrem Inneren besitzen die Thrombozyten zahlreiche Granula, in denen hydrolytische Enzyme, Blutgerinnungsfaktoren und Plättchenfaktor 4 enthalten sind. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt 1-2 Wochen¹⁸. Die Anzahl der Thrombozyten pro μL Vollblut ist altersabhängig. **Tab. 33** zeigt Referenzwerte.

Entwicklungsstadium	Thrombozyten/ μL
Neugeborene	100 000 - 250 000
ältere Kinder und Erwachsene	150 000 - 450 000

Tab. 33: *Referenzwerte der Thrombozyten in verschiedenen menschlichen Entwicklungsstadien*¹⁵⁶

Thrombozyten sind für die Blutstillung und Gerinnung unentbehrlich. Folgende Aufgaben erfüllen sie dabei¹⁸:

- Abdichtung von Gefäßlücken in den Kapillaren, sowie im nicht verletzten Gewebe
- Bildung eines mechanischen Verschlusses bei Gefäßverletzungen (Thrombozytenpfropf)
- Freisetzung von Mediatorstoffen, insbesondere Thromboxan A₂. Diese führen zu einer raschen Vasokonstriktion im verletzten Gefäßbereich
- Auslösung der Blutgerinnung
- Förderung des Zusammenziehens (Retraktion) des Blutkuchens

Ähnlich wie Erythropoetin die Zahl der Erythrozyten im Blut vermehrt, wurde mit Thrombopoetin eine endogene Substanz beschrieben, die hauptsächlich in Leber, Niere und Knochenmark gebildet wird und zu einer beschleunigten Entwicklung der Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Blutplättchen, führt.

5.8.1 Quantitative mikroskopische Bestimmung der Desintegration von Thrombozyten

In der Vergangenheit erfolgte die direkte Zählung der Thrombozyten in der Zählkammer nach vollständiger Hämolyse der Erythrozyten in hypotoner Kokainlösung¹³⁹. Das Betäubungsmittelgesetz schränkt jedoch die Verwendung von Kokain ein. Aus diesem Grund wird heute zur Thrombozytenauszählung 2-3 %ige Novokain- oder 1 %ige

Ammoniumoxalat-Lösung verwendet. Zur mikroskopischen Untersuchung der Thrombozyten wurde in dieser Arbeit mit THROMBO PLUS[®] der Firma Sarstedt gearbeitet. Dabei handelt es sich um eine Lösung aus Ammoniumoxalat und Quecksilber(I)-Chlorid. Neben der Hämolyse bewirken alle genannten Reagenzien eine Desaggregation und ein Abrunden der Thrombozyten.

Vollblut wird 1:100 mit THROMBO PLUS[®] versetzt. Die verdünnte Probe wird in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Der Ansatz wird 5-10 Minuten stehen gelassen, damit die Thrombozyten sedimentieren können. Zur Quantifizierung der Thrombozyten werden die gleichen Quadrate wie bei der Erythrozytenbestimmung ausgezählt. In **Abb. 38** sind die auszählenden Kleinquadrate wie schon in Kapitel 5.2.1.1 dargestellt.

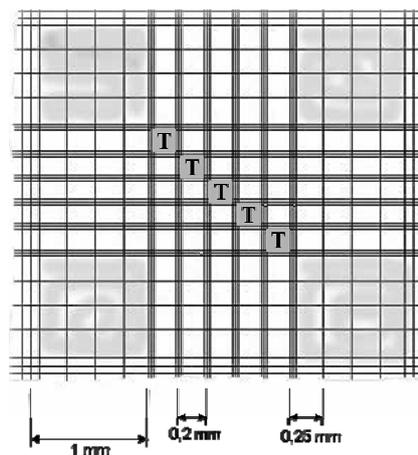


Abb. 38: Neubauer-Zählkammer: Kleinquadrate zur Auszählung von Thrombozyten
[in Anlehnung an¹³⁹]

Die Thrombozyten werden unter dem Mikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops mit Grünfilter erleichtert das Identifizieren und Auszählen der Thrombozyten.

Unter Berücksichtigung der Kammertiefe, der ausgezählten Kammerfläche und der Verdünnung der Probe kann die Anzahl der Thrombozyten mittels folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Thrombozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Anzahl gezählter Thrombozyten} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Kammerfläche} [\text{mm}^2] \times \text{Kammertiefe} [\text{mm}]}$$

Die Thrombozytenzählung aus EDTA-Blut sollte binnen 6 Stunden erfolgen. Ein nicht unerheblicher Teil der Klinikpatienten weist eine durch das Antikoagulant EDTA induzierte in-vitro-Pseudothrombozytopenie auf. Aufgedeckt werden kann dies durch eine vergleichende Thrombozytenzählung aus Citratblut¹⁵⁶.

5.8.2 Effizienz der Hitzeschockbehandlung von Thrombozyten

Um das Ausmaß der Desintegration von Thrombozyten während der Hitzeschockbehandlung zu ermitteln, wurden natives, antikoaguliertes Vollblut (Hct: 0,39) und verschiedene Vollblutmischungen manuell in Glaskapillaren, d.h. off-line, bei unterschiedlichen Temperaturen prozessiert. Die Heizdauer entsprach dem zuvor bestimmten t_{heat} .

5.8.2.1 Untersuchung verschiedener organischer Lösemittel bei unterschiedlichen Prozessierungstemperaturen

Für jeden untersuchten Ansatz wurde zuerst die entsprechende unbehandelte Probe auf die Anzahl der Thrombozyten untersucht. Dieser Wert entsprach dem jeweiligen 100 %-Wert, auf den sich nach der Hitzeschockbehandlung die ermittelte Desintegrations-effizienz bezog. Als organische Lösemittel wurden Acetonitril, Methanol und Dimethylsulfoxid in unterschiedlichen Volumenanteilen eingesetzt. Der Temperaturbereich zur Ermittlung der Desintegrationseffizienz der untersuchten Ansätze erstreckte sich über den Bereich von 75 bis 85°C. **Tab. 34** fasst die ermittelten Ergebnisse zusammen.

Prozessierungs- temperatur [°C]	Ansatz	Heizdauer [sec] t_{heat}	Effizienz [%]
75	VB	16	41
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	6	56
	VB:DMSO (99,5/0,5, v/v)	19	40
	VB:DMSO (90/1, v/v)	15	53
	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	13	56
	VB:DMSO (95/5, v/v)	12	51
	VB:DMSO (90/10, v/v)	8	67
80	VB: AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	5	43
	VB:AB-HP:ACN (50/47,5/2,5, v/v/v)	8	66
85	VB	5	75
	VB:AB-HP (50/50, v/v)	7	75

Tab. 34: Temperaturabhängigkeit der Desintegration von Thrombozyten nach Zusatz verschiedener organischer Lösemittel

Die Ergebnisse zeigen, dass in keinem der untersuchten Ansätze die Desintegration der Thrombozyten vollständig ist. Betrachtet man die native Vollblutprobe, so lässt sich sagen, dass mit steigender Prozessierungstemperatur ($75^{\circ}\text{C} \rightarrow 85^{\circ}\text{C}$) mehr Thrombozyten desintegriert werden (41 % \rightarrow 75 %). Allerdings ist zu beachten, dass die Prozessierung von Vollblut bei Temperaturen $> 75^{\circ}\text{C}$ problematisch ist, da die Werte für t_{max} und t_{min} sehr nah beisammen liegen. Das bedeutet wiederum, dass bei einer Abweichung des Hämatokrits vom Normalwert eine Gelbildung während der Prozessierung unter Standardbedingungen sehr wahrscheinlich ist. Der Einfluss des Hämatokrits auf die Gelbildung wird in Kapitel 5.4 eingehend beschrieben.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass mit steigendem DMSO-Gehalt in der Vollblutprobe und konstanter Temperatur mehr Thrombozyten desintegriert werden.

Auch die Art des organischen Modifiers hat einen Einfluss auf die Effizienz der Desintegration der Thrombozyten. Vergleicht man die Ansätze mit jeweils 5 vol. % MeOH bzw. ACN miteinander, so sieht man, dass die Thrombozyten in der Acetonitrilhaltigen Probe effizienter desintegriert werden (56 %) als in der entsprechenden Methanolhaltigen Probe (43 %). Zu beachten ist hierbei, dass der methanolische Ansatz im Vergleich zum entsprechenden Acetonitrilhaltigen Ansatz bei höheren Temperaturen prozessiert wurde und trotzdem weniger Thrombozyten desintegriert wurden.

5.8.2.2 Einfluss einer Vorinkubation auf die Desintegration von Thrombozyten

Neben dem Einfluss der Temperatur und der Art des organischen Lösemittels in der Vollblutprobe wurden auch die Dauer einer Vorinkubation der Probe bei Raumtemperatur (RT) mit einem organischen Modifier und dessen Auswirkung auf die Desintegration der Thrombozyten in einer entsprechenden Vollblutprobe untersucht. Der Hämatokrit der hier untersuchten nativen Vollblutprobe betrug 0,39. **Tab. 35** enthält die

untersuchten Ansätze, Versuchsbedingungen und die ermittelte Desintegrationseffizienz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Temperatur. **Abb. 39** stellt die ermittelten Ergebnisse graphisch dar.

Ansatz	Prozessierungs- temperatur [°C]	Heizdauer [sec] t_{heat}	Inkubationszeit [min]	Effizienz [%]
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	65	31	0	59
	70	13		83
	75	6		71
	80	5		77
	85	3		50
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	65	31	15	48
	70	13		77
	75	6		71
	80	5		71
	85	3		59
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	65	31	30	73
	70	13		69
	75	6		65
	80	5		73
	85	3		58
VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	70	24	0	58
	75	9		69
	80	5		67
	85	3		33
VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	70	24	15	46
	75	9		69
	80	5		60
	85	3		66
VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	70	24	30	50
	75	9		58
	80	5		65
	85	3		46

Tab. 35: Einfluss der Vorinkubationszeit mit verschiedenen organischen Modifiern auf die Desintegration von Thrombozyten in Vollblutproben; Prozessierungstemperatur: 65 bis 85°C

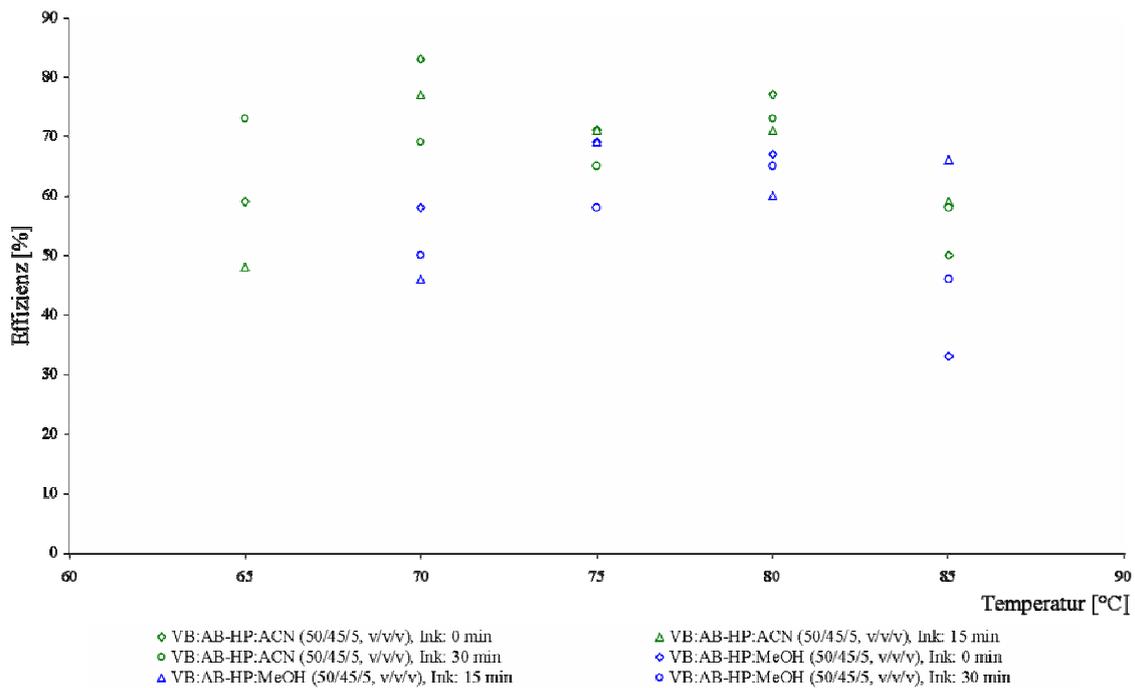


Abb. 39: Einfluss des organischen Modifiers, der Vorinkubationszeit und der Prozessierungstemperatur auf die Desintegration von Thrombozyten in Vollblut; Prozessierungstemperatur: 65 bis 85°C

Der methanolische Ansatz wurde nicht bei 65°C prozessiert, da der t_{heat} -Wert für diesen Ansatz sehr hoch ist (80 sec) und somit nicht in ein on-line System übertragbar (siehe Kapitel 6.2.2.1) ist.

Zusammenfassend kann auch hier festgestellt werden, dass im Vergleich zu Methanol bei Vorliegen von Acetonitril mehr Thrombozyten desintegriert werden.

Für die Methanol-haltige Probe gilt bis zu einer Temperatur von 80°C: Je höher die Prozessierungstemperatur, desto mehr Thrombozyten werden desintegriert. Der Acetonitril-haltige Ansatz zeigt ein Maximum der Desintegration bei 70°C.

Abschließend ist festzustellen, dass die Dauer einer Vorinkubation mit einem organischen Modifier bei Raumtemperatur keinen Einfluss auf das Ausmaß der Desintegration hat. Das heißt, dass nur die Art (Polarität, etc.) des organischen Zusatzes und die

Prozessierungstemperatur die Effizienz der Desintegration der Thrombozyten mitbestimmen.

5.9 Zusammenfassung: Desintegration von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

Im Gegensatz zu den Erythrozyten und Leukozyten werden die Thrombozyten unter keiner der angewendeten Prozessierungsbedingungen vollständig desintegriert. In **Tab. 36** sind beispielhaft die Ergebnisse für eine bei 75°C prozessierte native Vollblutprobe (Hct: 0,4) zusammengefasst.

Zelltyp	Vor Hitzeschockbehandlung		Nach Hitzeschockbehandlung	
	Anzahl / μL	Gesamtanteil [%]	Anzahl / μL	Gesamtanteil [%]
Erythrozyten	$5,0 \times 10^6$	95,12	0	0
Leukozyten	$7,1 \times 10^3$	0,13	0	0
Thrombozyten	$2,5 \times 10^5$	4,75	$1,03 \times 10^5$	1,95
gesamt	$5,26 \times 10^6$	100	$1,03 \times 10^5$	1,95

Tab. 36: Effizienz der Hitzeschockbehandlung einer nativen Vollblutprobe;
Prozessierungstemperatur: 75°C, Heizdauer: 16 Sekunden

Die Tabelle verdeutlicht noch einmal, wie effizient die Hitzeschockbehandlung von nativem, antikoaguliertem Vollblut ist. Bei einer nativen Vollblutprobe werden nach dem Prozessieren bei 75°C 100 % der Erythrozyten und Leukozyten desintegriert. Die Thrombozyten werden nur zu 59 % desintegriert. Das bedeutet, dass nur noch knapp 2 % der ursprünglichen Blutzellen im zell-desintegrierten Blut (CDB) enthalten sind. Die nicht desintegrierten Thrombozyten sind dabei die kleinsten zellulären Bestandteile mit einer Größe von maximal 4 µm.

Wie zu Beginn erwähnt, ist es das Ziel dieser Arbeit, erythrozytär gebundene Immunsuppressiva quantitativ aus CDB zu analysieren. Dazu müssen die zellulären Bestandteile des Vollblutes und insbesondere die Erythrozyten mittels Hitzeschockbehandlung möglichst vollständig desintegriert werden.

5.10 Ghosts

Bei der Hitzeschockbehandlung von Vollblut verändern Blutzellen ihre Struktur. Die nähere Beschreibung dieser modifizierten Blutzellen, vornehmlich der Erythrozyten, ist Schwerpunkt dieses Unterkapitels.

5.10.1 Definition

Als Ghosts bezeichnet man post-hämolytische Zellreste roter Blutkörperchen¹⁵⁷. Der Begriff Ghosts wird anstelle von Membran verwendet, um die grazile scheibenförmige Gestalt hämoglobinfreier Erythrozyten zu beschreiben¹⁵⁸. Der einfachste Weg zur Bildung von Ghosts besteht in der hypotonen Hämolyse der Erythrozyten^{158,159}. Bei der

osmotischen Lyse der Erythrozyten entsteht ein Loch in der Zellmembran, dessen Größe abhängig ist von der Art des Lysepuffers, der Konzentration des enthaltenen Salzes und der Temperatur während des Lysevorganges. Der typische Radius einer solchen Pore beträgt 7-140 Å¹⁶⁰. Das Loch hat eine rundliche Gestalt und eine Länge von ungefähr 60 Å. Diese Länge entspricht in etwa der Membrandicke. Bei einer sehr hohen Ionenkonzentration wird die Größe des Loches auf bis zu 7 Å verkleinert und kann in Gegenwart sehr geringer Ionenkonzentrationen auf bis zu 1 µm geweitet werden¹⁶¹. Des Weiteren lassen sich Ghosts mittels Elektroporation¹⁶², Dialyse¹⁶³ oder Hitzezufuhr¹⁶⁴ generieren. Die Zusammensetzung der Ghosts ist abhängig von der Probenaufbereitung¹⁵⁸.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit die Hitzeschockbehandlung von Blut ist, wird die Bildung von Ghosts unter thermischen Bedingungen an dieser Stelle näher beschrieben und untersucht.

5.10.2 Thermisch-induzierte Hämolyse

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Erythrozyten bei Hitzezufuhr verändern. Zuerst ändern sie ihre Morphologie, dann nimmt ihr Volumen zu, was eine Steigerung der osmotischen und mechanischen Empfindlichkeit nach sich zieht. Schlussendlich kommt es zur Hämolyse¹⁶⁵. Unter bestimmten Bedingungen kommt es zur Mikrovesikulierung, d.h. Ghosts zerbrechen in kleine Vesikel^{160,166}.

Es werden mehrere morphologische Veränderungen beschrieben, die einerseits temperaturabhängig sind und andererseits von der Aufheizgeschwindigkeit und Heizdauer abhängen. Bei einer Aufheizgeschwindigkeit von kleiner 0,75°C / sec kommt es zu zwei typischen Gestaltsveränderungen der roten Blutkörperchen. Aus bikonkaven werden rosettenförmige Erythrozyten geformt. Ausserdem bilden Erythrozyten Vertiefungen, die zu einer Fragmentierung der Zelle führen. Doch nur ungefähr die Hälfte

der roten Blutkörperchen macht diese morphologischen Veränderungen durch. Ab einer Temperatur von über 54°C ändern die Erythrozyten ihre Gestalt nicht mehr. Sie bleibt stabil bis es zur vollständigen Lyse der Zellen kommt¹⁶⁶. Bei einem schnellen Aufheizen der Probe kommt es kaum zur Fragmentierung der Erythrozyten, sondern ausschließlich zur Lyse. Coakley WT et al.¹⁶⁶ haben beobachten können, dass die Mikrovesikelbildung von Ghosts bei langsamer Hitzezufuhr ab einer Temperatur von ca. 70°C eintritt und bei schneller Hitzezufuhr sich hin zu höheren Temperaturen (ca. 80°C) verschiebt.

Bei der thermisch-induzierten Hämolyse werden mit Hilfe der Differentialrasterkalorimetrie vier Hauptübergänge gemessen, die hier mit A-D abgekürzt werden¹⁶⁷. Der erste Übergang (A) wird bei einer Temperatur von 49°C verzeichnet und ist auf die Denaturierung von Spektrin zurückzuführen. Bei Spektrin handelt es sich um ein Strukturprotein der Erythrozytenmembran¹⁴³. Der zweite Übergang (B) findet bei einer Temperatur von 55°C statt und ist begründet mit der Denaturierung von anderen Membranstrukturproteinen und dem zytoplasmatischen Bereich. Bei einer Temperatur von 65°C, dem dritten Übergang (C), denaturiert der transmembrane Bereich. Der vierte Hauptübergang (D) wird bei einer Temperatur von 72,5°C aufgezeichnet und geht auf die Denaturierung von Hämoglobin zurück.

Bei einer Temperatur von 49°C spricht man von der kritischen Temperatur, denn ab dieser setzt die Fragmentierung der Erythrozyten ein¹⁶⁸. Die Fragmentierung intakter Ghosts erfolgt aufgrund der Denaturierung von Spektrin, das verantwortlich ist für die Elastizität der Zellmembran¹⁵⁵. In der Literatur werden drei Formen der Fragmentierung beschrieben, die parallel ablaufen¹⁶⁹. Durch Hitzezufuhr wird die Erythrozytenmembran wellenförmig. Die Amplitude solch einer Welle ist größer als der Durchmesser des gebildeten Vesikels¹⁷⁰. Je älter das Blut ist, desto mehr Wellen bildet die Zellmembran aus.

Lerche D et al.¹⁷¹ untersuchten die Änderung der Viskosität von erhitztem (48,4-49,5°C) Blut im Vergleich zu unbehandeltem (37°C) Blut. Sie fanden heraus, dass die Viskosität von thermisch behandeltem Blut erhöht ist und begründeten dies mit einer

verringerten Deformierbarkeit der Erythrozyten aufgrund der Denaturierung von Spektrin.

Die Änderung des Erythrozytenvolumens lässt sich folgendermaßen erklären: Durch thermische Einflüsse wird ein Anionentransporterprotein, das in der Zellmembran der roten Blutkörperchen lokalisiert ist, denaturiert. Als Folge treten Kalium-Ionen aus den Erythrozyten aus, das Zellvolumen steigt und es kommt schließlich zur Hämolyse¹⁷².

5.10.3 Bildung von Ghosts

Mikroskopisch lässt sich leicht beurteilen, ob die Lyse der Erythrozyten vollständig ist oder nicht. Der Einfluss der Hitzeschockbehandlung (HST) auf die Veränderung der Erythrozytenmembran lässt sich mittels mikroskopischer Untersuchung nur schwer näher ermitteln. Um eine völlig homogene CDB-Probe aus Vollblut mittels HST zu generieren, sollten die Erythrozytenmembranen während dieses Prozesses in subzelluläre Partikel (Vesikel) überführt werden. Die Bildung von Ghosts, d.h. post-hämolytischer Zellreste roter Blutkörperchen, hat zur Folge, dass diese bei der Lagerung der Probe sedimentieren und CDB dadurch nicht mehr homogen ist. Wird CDB, das Ghosts enthält, direkt auf ein on-line SPE-System injiziert und fraktioniert, so steigt der Rückdruck der SPE-Einheit, die mit konventionellem Füllmaterial bestückt ist, aufgrund der großen Partikel (Ghosts). Subzelluläre Partikel der homogenen CDB-Probe hingegen bauen während der Fraktionierung keinen Druck auf der SPE-Einheit auf.

5.10.3.1 Methode zum Nachweis von Ghosts

Die Tatsache, dass die Erythrozytenmembran zu 50 % aus Proteinen und zu 40 % aus Lipiden besteht, erlaubt es, die Vesikelbildung mittels eines Protein-Assays zu beweisen. Verwendet wurde der BCATM Protein Kit. Dabei handelt es sich um ein Reagenz, welches hauptsächlich auf zweiwertigen Kupferionen und der Bicinchoninsäure (BCA) basiert. Das zweiwertige Kupfer wird im alkalischen Milieu in Gegenwart von Proteinen zu einwertigem Kupfer oxidiert. Ein Kupfer(I)-Ion reagiert mit zwei Bicinchoninsäuremolekülen zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. Die maximale Absorption dieses wasserlöslichen Komplexes liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm. Photometrisch lässt sich somit die Gesamtproteinmenge einer Probe quantitativ bestimmen¹⁷³.

Die zu untersuchenden Proben wurden wie folgt behandelt. 10 µL Probe wurden mit 1 mL BCA-Reagenz versetzt, gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die dunkelviolette Lösung wurde anschließend 1:15 mit H₂O/ACN (95/5, v/v) verdünnt, um eine photometrische Messung der Probe mit einer Absorption < 1 durchführen zu können. Vermessen wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 578 nm, da für das verwendete Photometer kein Filter mit der optimalen Wellenlänge (562 nm) vorhanden war.

5.10.3.2 Einfluss verschiedener organischer Lösemittel und Prozessierungstemperaturen auf die Bildung von Vesikeln

In dieser Versuchsreihe wird zur Beurteilung der Vesikelbildung aus Erythrozytenmembranen unter Anwendung von Hitzeschockbehandlung (HST) der Gesamtproteingehalt in drei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zunächst wird der Gesamtproteingehalt einer homogenen Vollblutprobe bestimmt. Ein Aliquot des gleichen Ansatzes wird anschließend für 10 Minuten bei hoher G-Zahl zentrifugiert. Dabei kommt es zu einer Separation der Probe in Plasma und Blutzellen. Ein weiteres Aliquot der Ausgangsprobe wurde bei 75°C für 13 Sekunden off-line (in Glaskapillaren) prozessiert und anschließend ebenfalls für 10 Minuten bei hoher G-Zahl zentrifugiert. Beim Prozessieren entstandene Ghosts werden somit abzentrifugiert. Vesikel sind jedoch kleiner und sedimentieren unter den angewandten Bedingungen nicht; sie verbleiben im Überstand. Im Folgenden wurde der Gesamtproteingehalt der beiden zentrifugierten Proben bestimmt; diesmal jedoch nur aus dem Überstand. Besteht keine oder kaum eine Differenz im Gesamtproteingehalt der unzentrifugierten bzw. zentrifugierten Probe, so kommt es während der Hitzeschockbehandlung zur Vesikelbildung vornehmlich aus der Erythrozytenmembran. **Abb. 40** zeigt deutlich, welchen Einfluss die HST auf den Gesamtproteingehalt einer prozessierten bzw. unprozessierten Probe nach dem Zentrifugieren hat. Untersucht wurde eine VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe, die während der Hitzeschockbehandlung für 13 Sekunden bei 75°C erhitzt wurde. Der Hämatokrit des Vollblutes betrug 0,41.

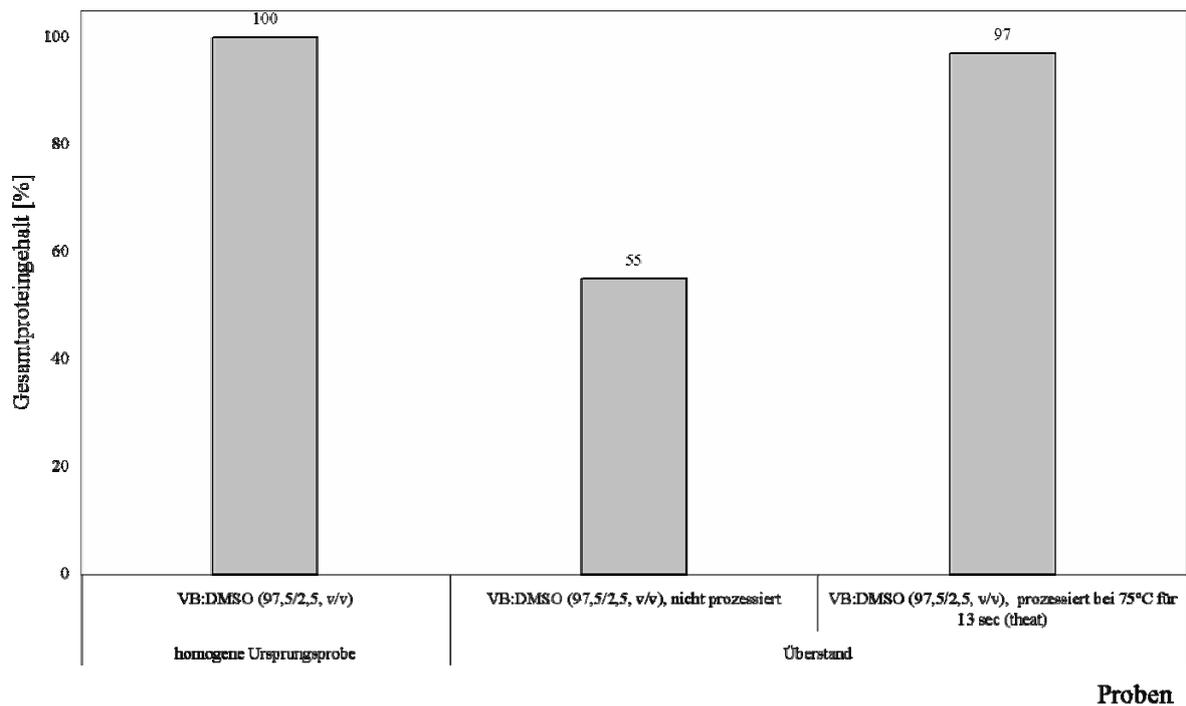


Abb. 40: Gesamtproteingehalt einer prozessierten und unprozessierten VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe

Die Abbildung zeigt, dass die korpuskulären Bestandteile einer unprozessierten Probe beim Zentrifugieren der Probe für 10 Minuten bei 16100 G abzentrifugiert werden. Im Überstand befinden sich fast ausschließlich Plasmaproteine, die mit dem BCA-Reagenz reagieren. Die durch die Hitzeschockbehandlung entstandenen Vesikel sedimentieren unter den angewandten Bedingungen nicht. Der Proteingehalt des Überstandes entspricht daher dem der unbehandelten Probe.

Die Vesikelbildung wurde auch in Vollblutproben (Hct 0,41), die unterschiedliche Volumenanteile an DMSO enthalten, untersucht. Alle diese Proben wurden bei 75°C für 13 Sekunden off-line, d.h. manuell in Glaskapillaren, prozessiert. Zur Quantifizierung der Vesikelbildung wurden die verschiedenen Proben vor und nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 16100 G) mit BCA-Reagenz versetzt. **Tab. 37** stellt die Probenansätze und den Proteingehalt nach dem Zentrifugationsschritt dar.

Ansatz	Proteingehalt im Überstand [%]
VB: DMSO (97,5/2,5, v/v)	97,4
VB:DMSO (96/4, v/v)	88,2
VB:DMSO (94/6, v/v)	89,0
VB:DMSO (90/10, v/v)	68,6

Tab. 37: Einfluss des Volumenanteils an DMSO auf die Bildung von Vesikeln

Diese Untersuchung zeigt, dass sich mit steigendem DMSO-Gehalt in der Vollblutprobe die Vesikelbildung aus der Erythrozytenmembran verringert. Um auszuschließen, dass eine unzureichende Desintegration der Erythrozyten, somit die Anwesenheit von intakten Blutzellen, für den geringen Proteingehalt im Überstand der Probe verantwortlich ist, wurde im Vorfeld zu dieser Untersuchung die Vollständigkeit der Hitze-schockbehandlung mittels Drabkin's Reagenz untersucht. Für alle hier aufgezeigten Ansätze war die Desintegration der Erythrozyten vollständig. Das bedeutet, dass die Zellen unter den beschriebenen Bedingungen quantitativ desintegriert wurden; mit steigendem Anteil an DMSO, verschiebt sich das Gleichgewicht von der Vesikelbildung zu Gunsten der Ghostbildung. Ghosts wurden jedoch unter den aufgeführten Bedingungen abzentrifugiert. Enthält die Vollblutprobe 2,5 vol. % DMSO, so beträgt die Vesikelbildung nahezu 100 %.

In der im Folgenden beschriebenen Versuchsreihe wurde die Vesikelbildung zweier Vollblutproben (Hct: 0,39) mit unterschiedlichen Zusätzen miteinander verglichen. Beide Ansätze wurden bei 75°C und ihrem entsprechenden t_{heat} prozessiert. Nach der

Prozessierung wurden die Proben bei unterschiedlichen G-Zahlen (differentielle Zentrifugation) zentrifugiert. Zusätzlich wurde ein Aliquot der Proben für 24 Stunden stehen gelassen (1G), um zu prüfen, wie homogen und stabil die prozessierten Proben sind. In **Tab. 38** sind die untersuchten Proben, die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse beschrieben.

Ansatz	t _{heat} [sec]	G-Zahl	Proteingehalt im Überstand [%]
VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	13	1	106,9
		1610	96,8
		16100	93,9
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	6	1	78,8
		1610	101,7
		16100	88,7

Tab. 38: *Vergleich der Bildung von Vesikeln unterschiedlicher Vollblutansätze mittels differentieller Zentrifugation; Prozessierungstemperatur: 75°C*

Die Ergebnisse zeigen, dass die VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)-Probe bei der Hitzeschockbehandlung (HST) zur Ghostbildung neigt. Vergleicht man den Proteingehalt der beiden Ansätze nach 24-stündiger Sedimentation (1G), so lässt sich erkennen, dass der Proteingehalt der DMSO-haltigen Probe bei ungefähr 100 % liegt. Die ACN-haltige Probe hingegen, zeigt im Vergleich zur entsprechenden, homogenen Probe einen etwa 20 % niedrigeren Proteingehalt im Überstand. Werden die Proben direkt im Anschluss der HST bei 1610 G zentrifugiert, so liegt der Proteingehalt im Überstand in

beiden Ansätzen bei nahezu 100 %. Diese G-Zahl (1610 G) entspricht der Zentrifugalkraft, die aufgewendet wird, um die korpuskulären Blutbestandteile vom Plasma zu trennen. Die Zentrifugation der Proben bei einer gut 10-fach höheren G-Zahl zeigt, dass der Proteingehalt des DMSO-haltigen Ansatzes bei knapp 100 % liegt. Der Proteingehalt der ACN-haltigen Probe liegt jedoch bei unter 90 %. Daraus kann gefolgert werden, dass die ACN-haltige Probe neben Vesikeln auch Ghosts bildet. Das Zentrifugieren der Probe bei 1610 G reichte nicht aus, um die Ghosts zu sedimentieren.

Abschließend lässt sich zu dieser Versuchsreihe ableiten, dass eine prozessierte VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe eine homogene Matrix darstellt, die mindestens 24 Stunden gelagert werden kann, ohne dass ein Sediment auftritt.

Die oben beschriebenen Ansätze wurden auch auf die Vesikelbildung während der Hitzeschockbehandlung bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Dabei wurden die Proben wieder off-line bei Temperaturen zwischen 75 und 85°C prozessiert. Für die Bestimmung des Proteingehalts im Überstand, wurden die Proben nach dem Prozessieren für 10 min bei 16100 G zentrifugiert. In **Tab. 39** sind die Versuchsbedingungen und Ergebnisse zusammengestellt.

Prozessierungs- temperatur [°C]	Ansatz	Heizdauer [sec] t_{applied}	Proteingehalt im Überstand [%]
75	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	13	96,3
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	6	87,8
80	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	7	81,8
		8	79,6
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	4	88,0
		5	84,0
85	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	2	85,8
		4	89,5
		5	74,5
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	3	73,6

Tab. 39: *Bildung von Vesikeln nach Zusatz verschiedener Lösemittel im Temperaturbereich zwischen 75 und 85°C*

Die DMSO- und ACN-haltigen Ansätze zeigen, dass die Vesikelbildung bei einer Prozessierungstemperatur von 75°C am stärksten ausgeprägt ist.

Im Vorfeld wurde die Effizienz der Hitzeschockbehandlung dieser Ansätze unter den beschriebenen Bedingungen mittels Drabkin's Reagenz untersucht. **Tab. 40** fasst die Ergebnisse zusammen.

Prozessierungs- temperatur [°C]	Ansatz	Heizdauer [sec] t_{applied}	Effizienz [%]
75	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	13	107,6
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	6	97,6
80	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	7	100,0
		8	100,3
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	4	80,0
		5	72,4
85	VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	2	97,1
		4	94,1
		5	89,7
	VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	3	78,2

Tab. 40: *Effizienz der Desintegration unterschiedlicher Vollblutansätze im Temperaturbereich zwischen 75 und 85°C*

Für die DMSO-Ansätze gilt, dass sie bei 75 und 80°C unter den angewandten Aufheizzeiten (t_{applied}) vollständig desintegriert werden. Bei 85°C sinkt das Ausmaß der Desintegration bei steigender Heizdauer. Bei einer unvollständigen Desintegration der Erythrozyten können nicht die gesamten Erythrozytenmembranen während der HST in Vesikel bzw. Ghosts umgewandelt werden.

Die Desintegration der Erythrozyten in der ACN-haltigen Probe ist nur bei 75°C vollständig. Bei den Temperaturen 80 und 85°C liegt die Desintegrationseffizienz bei etwa 80 %. Bei 75°C bestätigt sich, dass sich während der Hitzeschockbehandlung neben Vesikeln auch Ghosts aus den Zellmembranen bilden, denn der Gesamtproteingehalt

der Probe liegt trotz vollständiger Desintegration der Erythrozyten bei ca. 88 % (**Tab. 39**).

5.10.3.3 Einfluss des Hämatokrits auf die Bildung von Vesikeln

Wie in Kapitel 5.4 beschrieben ist der Hämatokrit des Menschen abhängig von mehreren Faktoren, wie beispielsweise Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand. Aus diesem Grund wurde die Bildung von Vesikeln aus zwei unterschiedlichen Vollblutansätzen mit verschiedenen Hämatokrit-Werten (0,2 bis 0,6) untersucht. Alle Ansätze wurden bei 75°C off-line, d.h. manuell in Glaskapillaren, Hitzeschock-behandelt. Um sicher zu stellen, dass die Desintegration der Erythrozyten unter den angewandten experimentellen Bedingungen in allen Ansätzen vollständig ist, wurde die Effizienz der Hitzeschockbehandlung im Vorfeld mittels der Analyse durch Drabkin's Reagenz überprüft. Alle hier untersuchten Ansätze zeigten eine vollständige Desintegration der Zellen. **Tab. 41** zeigt die untersuchten Proben und die Ergebnisse bezüglich der Vesikelbildung nach Zentrifugation der prozessierten Proben für 10 Minuten bei 16100 G.

Ansatz	Heizdauer [sec] t_{heat}	Hct	Proteingehalt im Überstand [%]
VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	13	0,2	94,7
		0,4	104,1
		0,6	98,9
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	6	0,2	94,0
		0,4	89,2
		0,6	87,9

Tab. 41: *Bildung von Vesikeln in Abhängigkeit vom Hämatokrit;
Prozessierungstemperatur: 75°C*

In den DMSO-haltigen Proben findet während der Hitzeschockbehandlung eine vollständige Umwandlung der Erythrozytenmembran in Vesikel statt. Dieser Vorgang ist unabhängig vom Hämatokrit. Die ACN-haltigen Proben zeigen eine verringerte Vesikelbildung während des Prozessierens bei steigendem Hämatokrit.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Bildung von Vesikeln und subzellulären Bestandteilen in einer Vollblutprobe abhängig ist vom Zusatz und der Art an „biologischem“ / organischem Lösemittel, der Prozessierungstemperatur, der Heizdauer und dem Anteil an organischem Modifier. Es wurde gezeigt, dass ACN-haltige Proben neben Vesikeln auch Ghosts generieren und dass deren Menge abhängig ist vom Hämatokrit der prozessierten Probe.

Vollblutproben hingegen, die 2,5 vol. % DMSO enthalten und bei 75°C für 13 Sekunden erhitzt werden, bilden fast ausschließlich Vesikel während der Hitzeschockbehandlung und dieses unabhängig vom Hämatokrit-Wert. Somit resultiert aus dieser Mi-

schung nach dem Prozessieren eine homogene und stabile biologische Matrix, das zell-desintegrierte Blut (CDB).

6 Vollautomatisiertes Totales Analyse- system (TAS)

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung der in Kapitel 5 beschriebenen off-line Methode in ein on-line bzw. in-line System. Dieser Schritt sollte es ermöglichen, ein vollautomatisches Analysesystem aufzubauen, dessen Vorteile auf der Hand liegen:

- Reduziertes Infektionsrisiko, da keine manuelle Interaktion und die Analyse in einem geschlossenen System stattfinden.
- Volle GLP (Good Laboratory Practice)-Tauglichkeit
- Kostenersparnis aufgrund geringeren Personalaufwands
- Erhöhter Probendurchsatz aufgrund reduzierter Analysezeiten / Nacht- und Wochenendbetrieb
- Kürzere Rücklaufzeiten bezüglich des klinisch-chemischen Befundes
- Weniger Fehlerquellen, da keine manuellen Schritte notwendig sind
- Probenaufbereitung und analytische Trennung können z.B. parallel durchgeführt werden

Ein entsprechendes Totales Analysesystem (engl.: Total Analysis System; TAS) für die Aufbereitung und Analyse sollte daher das Aufmischen einer sedimentierten Vollblutprobe, die Hitze-induzierte Desintegration der Blutzellen, die Fraktionierung dieser

Matrix (zell-desintegriertes Blut; CDB) sowie die chromatographische Trennung und die Detektion der Analyten ermöglichen.

6.1 Instrumenteller Aufbau

Das Totale Analysesystem (TAS) setzt sich aus verschiedenen Einheiten zusammen, die in **Abb. 41** schematisch dargestellt sind.

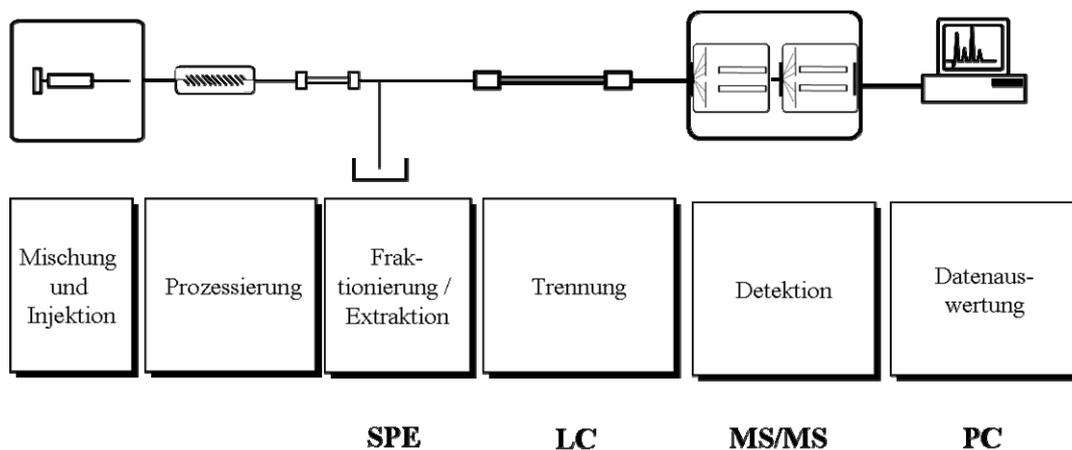


Abb. 41: Schematischer Aufbau eines Totalen Analysesystems (TAS)

Zu Beginn des Analyseprozesses wird die sedimentierte Vollblutprobe mit einem speziellen, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren aufgemischt, aliquotiert und anschließend injiziert. Durch den in Kapitel 5 beschriebenen Prozess der Hitzeschockbehandlung kommt es zu einer Desintegration der Blutzellen. Das generierte zell-desintegrierte Blut (CDB) wird sodann mittels Festphasenextraktion (SPE) fraktioniert und die Zielanalyten dabei extrahiert bzw. angereichert. Im Anschluss erfolgen die

analytische Trennung und die Detektion mittels eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS).

Wie in Kapitel 2.3.3 erwähnt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Symbiosis™ Pharma System der Firma Spark Holland B.V. verwendet. Dieses, für die on-line SPE-LC-Analyse konzipierte System, wurde im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes mit Spark Holland entsprechend modifiziert.

6.2 Arbeitsweise des vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS)

In **Abb. 42** ist das modifizierte Symbiosis™ Pharma System schematisch dargestellt. Die Spirale stellt die Prozessierungseinheit dar. Im Folgenden wird der Ablauf der Analyse in den verschiedenen Einheiten näher beschrieben.

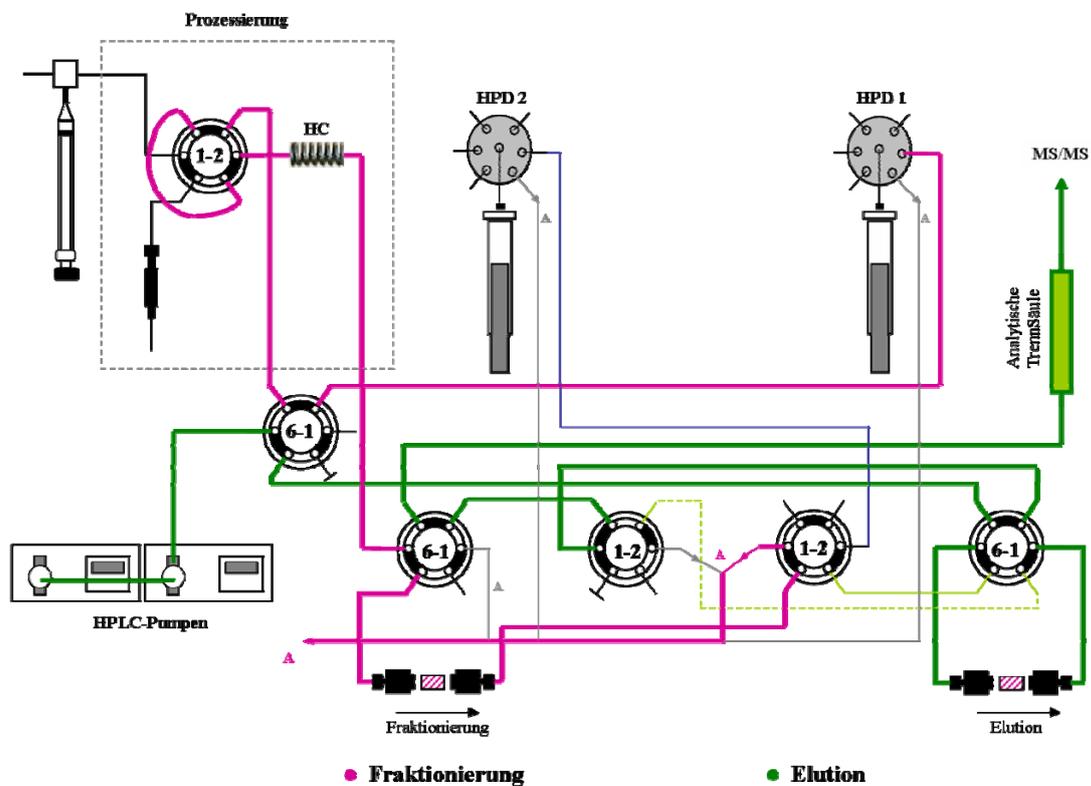


Abb. 42: Schematische Darstellung des modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems; **HC:** beheizte Edelmetallkapillare (engl.: Heated Capillary); **HPD:** Kolbenpumpe (engl.: High Pressure Dispenser); **MS/MS:** Tandemmassenspektrometer

6.2.1 Mischung und Injektion

Die Misch- und Injektionseinheit setzt sich aus einer 1 mL - Aufziespritze, einem 6-Wege-Injektionsventil mit integrierter Injektionsschleife (100 μ L) und einer Seruminjektionsnadel (45 μ L) zusammen. Die Injektionsnadel befindet sich in einer Punktiernadel. Bei der Injektionsnadel handelt es sich um eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Spezialanfertigung. Die tulpenförmige Öffnung führt zu einer Vergrößerung der Apertur. Die Modifikation der Injektionsnadel war notwendig, um den Mischvorgang der sedimentierten Vollblutprobe zu optimieren. **Abb. 43** stellt die modifizierte (tulpenförmige) und ursprüngliche (Standard) Öffnung der Injektionsnadeln schematisch dar.

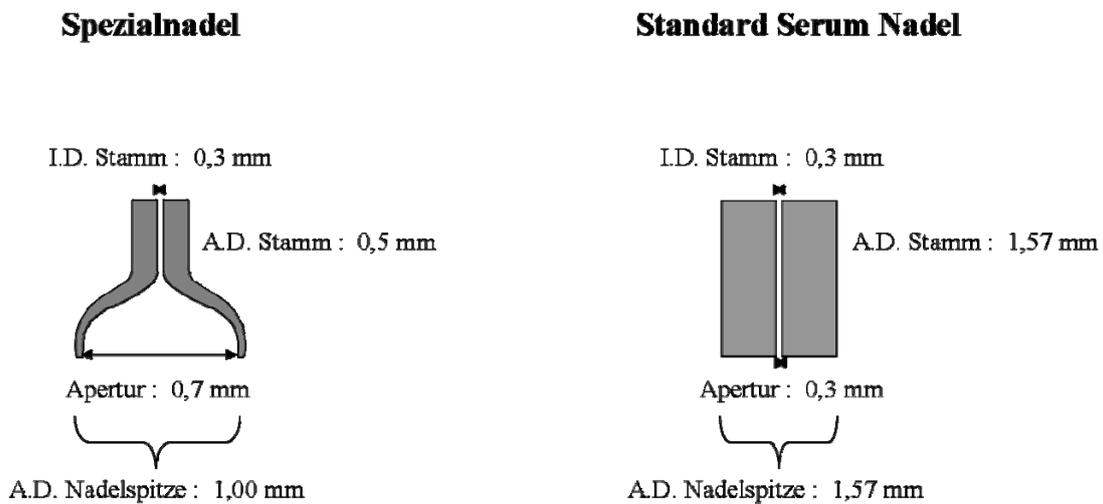


Abb. 43: Schematische Darstellung der Spitze der verwendeten Injektionsnadeln;
I.D.: Innendurchmesser; *A.D.:* Aussendurchmesser

6.2.1.1 Aufmischen einer sedimentierten Vollblutprobe

Lässt man eine Vollblutprobe längere Zeit stehen, so sedimentieren die korpuskulären Bestandteile. Somit entsteht ein 2-Phasen-System mit Plasma im Überstand und Blutzellen als Sediment. Soll eine Vollblutprobe quantitativ analysiert werden, muss sie bei der Injektion ins Analysesystem homogen, d.h. gut gemischt, sein. Das Aufmischen einer sedimentierten Vollblutprobe kann durch die Anwendung eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mischverfahrens realisiert werden. **Abb. 44** stellt diesen Vorgang schematisch dar.

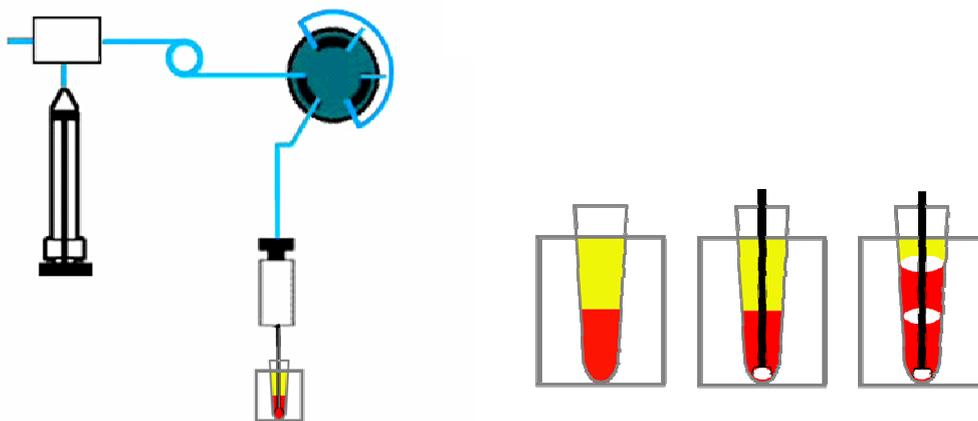


Abb. 44: Schematische Darstellung des Mischvorgangs einer sedimentierten Vollblutprobe unter Anwendung des Probengebers

Das aufzumischende Vollblut befindet sich in einem speziellen Probengefäß, das sich aus einem konventionellen LC-Vial und einem schmalen, konisch geformten, geringvolumigen Einsatz zusammensetzt. Der Mischvorgang beginnt mit dem Aufziehen von Luft in die Injektionsschleife. Die Injektionsnadel taucht dann in das Sediment der Probe ein, und die aufgezogene Luft wird mit hoher Geschwindigkeit in das Sediment

injiziert. Aufgrund des tulpenförmigen Nadeldesigns werden große Luftblasen generiert, die sich zudem an die Größe des Einsatzes anpassen, zur Oberfläche wandern und dadurch zu einer sehr effizienten Durchmischung der Probe führen. Die Effizienz des Mischvorgangs lässt sich mit zwei unabhängigen Verfahren bestimmen. Dazu wird ein Aliquot der aufgemischten Probe direkt unterhalb der Schaumkrone entnommen. Einerseits wird die Erythrozytenanzahl / μL Blut durch Auszählen der Erythrozyten in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Andererseits wird das nach Zugabe von Drabkin's Reagenz freigesetzte Hämoglobin photometrisch bei 546 nm bestimmt. Als Referenz dient eine durch manuelles Aufschütteln gemischte Probe. Beide Verfahren haben gezeigt, dass das Aufmischen einer sedimentierten Vollblutprobe auf diesem Wege sehr effizient ist.

6.2.1.2 Zugabe des Internen Standards

Das Signal des Detektors und somit die Peakfläche stellen ein Maß für die injizierte Substanz dar; jedoch erlaubt die Peakfläche keine direkte Aussage über die in der Probe enthaltene Substanzmenge. Anhand von Standards, d.h. mit Proben bekannter Konzentration, lassen sich Korrektur- bzw. Responsefaktoren ermitteln, mit denen sich die Peakfläche der Probe in die entsprechenden Substanzmengen umrechnen lassen. Im Idealfall besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Detektorsignal und der applizierten Substanzmenge. Abweichungen von diesem Verhalten lassen sich durch die Injektion verschiedener Standardkonzentrationen und Erstellung einer Kalibrationsgerade ermitteln. Bei der Kalibriergerade wird die Peakfläche gegen die Standardkonzentration aufgetragen. Wird der Probe eine bekannte Menge eines Standards zugesetzt, der sich von der zu analysierenden Substanz unterscheidet und einen zusätzlichen Peak im Chromatogramm erscheinen lässt, spricht man von der internen Standardmethode. Die Quantifizierung der Analyten beruht auf der Ermittlung des

Verhältnisses der Peakflächen des Internen Standards und des entsprechenden Analyten¹⁷⁴.

Der Interne Standard muss folgende Eigenschaften haben⁴²:

- Sein Peak muss bei einer Retentionszeit liegen, bei der keine anderen Analyten eluieren
- Sein Peak sollte möglichst nah bei dem Peak des zu untersuchenden Analyten liegen
- Er sollte dem zu untersuchenden Analyten chemisch sehr ähnlich sein
- Seine Anwesenheit in der ursprünglichen Analyse sollte mit Sicherheit ausgeschlossen werden können
- Sein Responsefaktor sollte ähnlich groß sein wie der des zu untersuchenden Analyten
- Er darf, auch bei höheren Temperaturen, keine chemische Reaktion mit einer anderen Komponente des Analysengemisches eingehen.

Die Zugabe des Internen Standards zu Vollblut ist eine Herausforderung. Im Falle der Immunsuppressiva, die in dieser Arbeit als Modellanalyten herangezogen werden, ist festzuhalten, dass sie und ihre Internen Standards aufgrund der stark ausgeprägten Lipophilie nur in organischen Lösemitteln löslich sind. Die Zugabe eines organischen Lösemittels zu einer nativen Vollblutprobe in größerer Menge zieht eine Fällung der Proteine nach sich. Es ist jedoch allgemein bekannt, dass sich kleine Volumina von beispielsweise Methanol nur schwer ohne Verlust pipettieren lassen. Eine Möglichkeit, die Konzentrationsschwankung aufgrund eines Pipettierfehlers möglichst gering zu halten, ist die Zugabe eines relativ großen Volumens einer niedrig konzentrierten in-

ternen Standardlösung. Doch wie bereits weiter oben erwähnt, führt die Addition eines großen Volumens an organischem Lösemittel zu einer Fällung der in der Probe enthaltenen Proteine.

Die Zugabe des Internen Standards zu einer Vollblutprobe ist des Weiteren auf indirektem Wege möglich. Dabei wird der Interne Standard zuerst in beispielsweise Methanol gelöst. Diese Lösung wird dann zu Humanplasma der Blutgruppe AB (AB-HP) hinzupipettiert. Durch Verwendung von Humanplasma der Blutgruppe AB ist eine Agglutination von Erythrozyten nach Zugabe dieses dotierten Plasmas zu der zu analysierenden Vollblutprobe ausgeschlossen. Denn das Humanplasma der Blutgruppe AB enthält keine Antikörper gegen die Erythrozyten der Blutgruppe A und B¹⁸.

Eine spezielle Software des Symbiosis™ Pharma Systems ermöglicht die Programmierung des Zusammenpipettierens eines Aliquots der aufgemischten Vollblutprobe und beispielsweise eines Aliquots des mit Internem Standard dotierten Humanplasmas in ein separates Probengefäß mit anschließender quantitativer Vermischung. Auf diesem eleganten Wege ist es möglich, der zu untersuchenden Vollblutprobe den Internen Standard hinzuzufügen. Die Absolutmenge an hinzugefügtem organischem Lösemittel ist in diesem Falle sehr gering.

Lösemittel wie beispielsweise DMSO sind relativ viskos und lassen sich sehr gut pipettieren. Immunsuppressiva und ihre Internen Standards lösen sich gut in DMSO. Aus diesem Grund ist es möglich, der zu untersuchenden Vollblutprobe den in DMSO gelösten Internen Standard hinzuzupipettieren. Der verwendete Probengeber ist in der Lage, Volumina bis 1 μL (μL -Pick-up) akkurat zu pipettieren⁴⁹.

6.2.2 Prozessierung

Das Herzstück der Prozessierungseinheit ist eine beheizte Edelmetallkapillare, deren Temperatur über die softwaregesteuerte Induktion geregelt wird. Wie in **Abb. 45** dargestellt handelt es sich um eine spiralförmig gewickelte Edelmetallkapillare. Diese ist mit Kunststoff isoliert. Der Innendurchmesser der Edelmetallkapillare beträgt 0,5 mm, die Länge 300 mm, so dass aus diesen Dimensionen ein Volumen von ca. 60 μL resultiert.

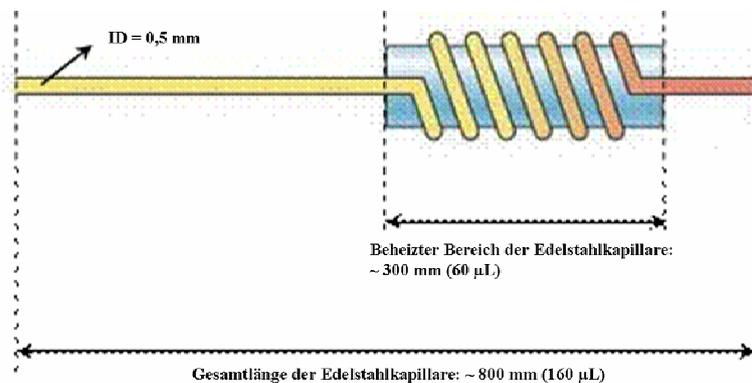


Abb. 45: Schematische Darstellung der beheizten Edelmetallkapillare¹⁷⁵

Installiert ist die beheizte Edelmetallkapillare, die die Abkürzung HC (engl.: Heated Capillary) trägt, direkt hinter dem Injektionsventil. Somit wird gewährleistet, dass die injizierte Probe bis zum Erreichen der HC möglichst wenig verdünnt wird. Die gewünschte Temperatur der HC wird in der Methode festgelegt und lässt sich zwischen 3°C über der Umgebungstemperatur bis maximal 100°C programmieren.

Die Software erlaubt es, die aktuelle Temperatur der HC zu verfolgen. Somit ist es möglich, Temperaturprofile aufzunehmen. Es zeigte sich, dass die benötigte Zeit zum Erreichen der programmierten Temperatur abhängig ist von der Flussrate, mit der die

Flüssigkeiten durch die beheizte Edelstahlkapillare befördert werden. Ist die Flussrate konstant, so schwankt die Temperatur um ca. $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ um den Sollwert.

6.2.2.1 Transfer: off-line zu in-line Prozessierung von Vollblutproben

Ziel der Arbeit ist es, die ermittelten Erkenntnisse aus den off-line Experimenten, d.h. dem manuellen Prozessieren von Vollblutproben in Glaskapillaren, in ein vollautomatisches Analysesystem zu übertragen. Der Innendurchmesser der beheizten Edelstahlkapillare beträgt 0,5 mm, so dass für die off-line Versuche Glaskapillaren mit demselben Innendurchmesser ausgewählt wurden. Bei der manuell durchgeführten Hitzeschockbehandlung (HST) von Vollblutproben liegt ein statisches System vor. Bei der in-line Prozessierung der Probe in der beheizten Edelstahlkapillare handelt es sich um ein dynamisches Verfahren, denn die Probe wird während des Aufheizens kontinuierlich durch die Edelstahlkapillare befördert. Die Verweilzeit der Probe in der HC und somit die Dauer der HST sind abhängig von der Flussrate, mit der die Probe durch die beheizte Edelstahlkapillare gepumpt wird. Die Flussrate muss demnach so programmiert werden, dass die Verweilzeit der Probe t_{heat} entspricht. Mit Hilfe folgender Formel lässt sich die adäquate Flussrate berechnen:

$$\text{Flussrate} [\mu\text{L} / \text{min}] = \frac{\text{Volumen HC} [\mu\text{L}]}{t_{\text{heat}} [\text{sec}]} \times 60$$

Das Volumen der HC bleibt konstant, nur der Wert für t_{heat} ist variabel, da er von dem Probenansatz und der Prozessierungstemperatur abhängig ist (siehe Kapitel 5.6). Das Volumen der zu prozessierenden Probe hat keinen Einfluss auf die Flussrate. Es muss

lediglich sichergestellt werden, dass bei einem größeren Injektionsvolumen die Prozessierungstemperatur ausreichend lang gehalten wird. Ein kleines Probenvolumen hat die HC schneller komplett passiert als ein größeres Probenvolumen. Die Verweilzeit (Dauer der Hitzeschockbehandlung) der Probe in der beheizten Edelstahlkapillare ist für jedes Segment gleich.

Die Berechnung der Flussrate zur in-line Prozessierung einer VB:DMSO-Probe (97,5/2,5, v/v) bei 75°C mit einem off-line ermitteltem t_{heat} von 13 Sekunden ergibt somit:

$$\text{Flussrate} [\mu\text{L} / \text{min}] = \frac{59 [\mu\text{L}]}{13 [\text{sec}]} \times 60 = 272 \mu\text{L} / \text{min}$$

Die zu prozessierende Vollblutprobe wird mit der mobilen Phase, die durch die Kolbenpumpe 1, auch als HPD 1 (High Pressure Dispenser) bezeichnet, befördert wird, aus der Injektionsschleife in die beheizte Edelstahlkapillare gepumpt. Die minimale Flussrate der Kolbenpumpe beträgt 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Daraus folgt im Umkehrschluss, dass die maximal erreichbare Verweilzeit der Probe in der installierten HC 35,4 Sekunden beträgt.

Nach dem Prozessieren wird die Probe weiter zur linken Klemme der SPE-Einheit transportiert.

Versuche haben gezeigt, dass die Probe auf dem Weg zwischen Injektionsventil und der linken Klemme verdünnt wird. **Abb. 46** zeigt, dass die Verdünnung abhängig vom Injektionsvolumen ist, jedoch der Verdünnungsfaktor (F_V) mit zunehmendem Injektionsvolumen abnimmt.

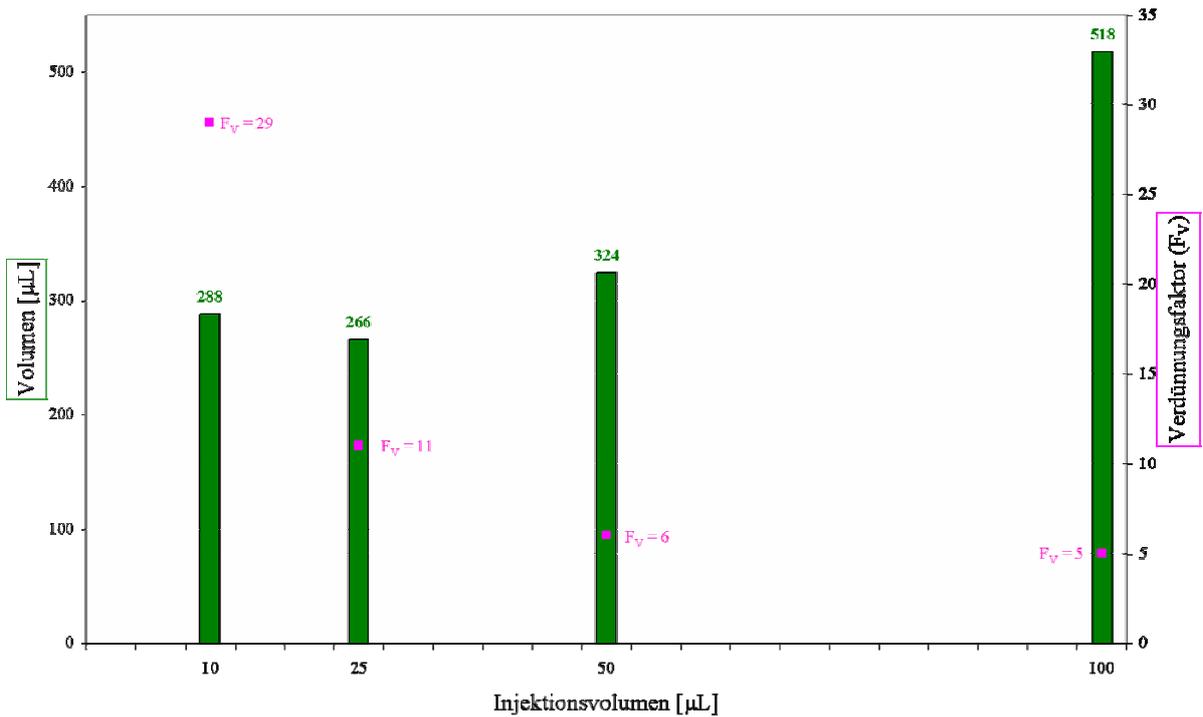


Abb. 46: *Volumen und Verdünnungsfaktoren (F_v) von injizierten Proben nach der Passage eines Totvolumens von $262\mu\text{L}$; Flussrate: $270\mu\text{L}/\text{min}$*

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das resultierende Volumen und somit der Verdünnungsfaktor der Probe unabhängig sind vom Fluss, mit dem die Probe durch das System befördert wird (**Abb. 47**).

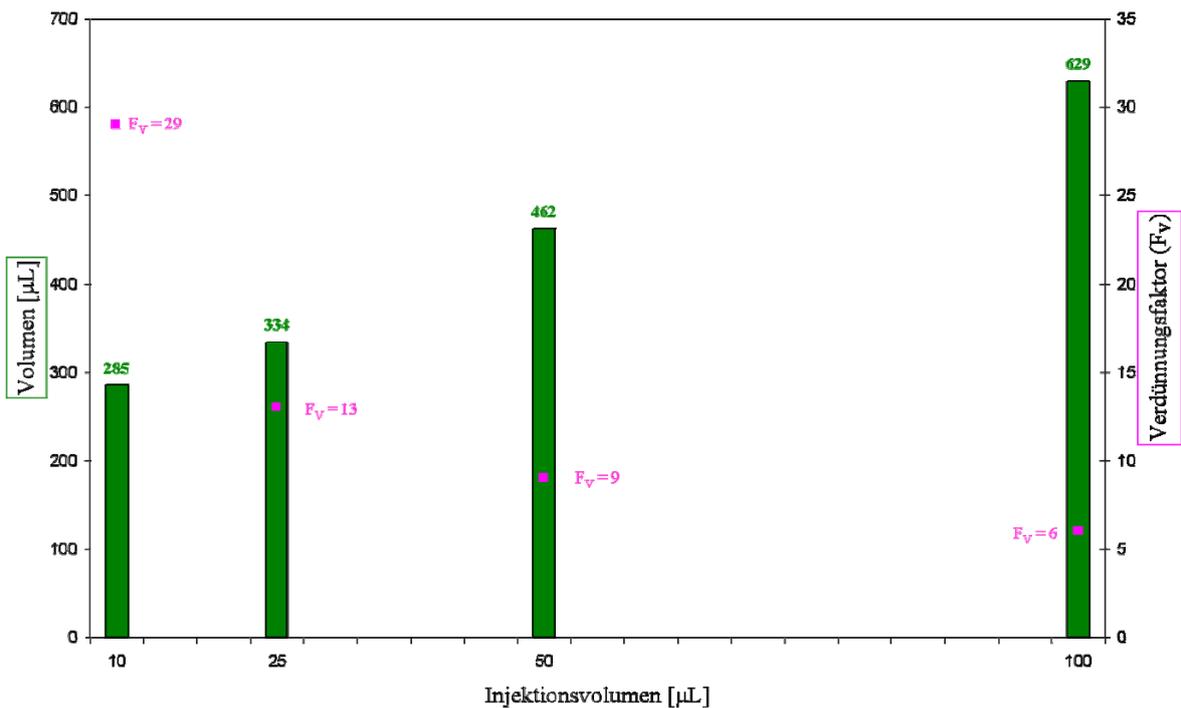


Abb. 47: *Volumen und Verdünnungsfaktoren (F_v) von injizierten Proben nach der Passage eines Totvolumens von 262µL; Flussrate: 590 µL/min*

Wichtig bei der in-line Prozessierung von Vollblutproben ist, dass die Temperatur der HC den Sollwert schon erreicht hat, bevor die Probe in die beheizte Edelstahlkapillare gepumpt wird. Hat die HC eine Temperatur unterhalb der Solltemperatur, so ist die Desintegration der Blutzellen unvollständig. Es bleiben somit viele Zellen intakt. Bei einer zu hohen Temperatur in der HC wird die Probe denaturiert, es bildet sich ein Gel und die Edelstahlkapillare verstopft.

6.2.3 Fraktionierung (SPE-Schritt)

Die Fraktionierung der prozessierten Vollblutprobe findet nach Einsetzen einer Einmal-SPE-Kartusche in die linke Klemme der SPE-Einheit statt. Bei der Festphasenextraktion kommt es zu einer quantitativen Extraktion der Analyte aus dem prozessierten Vollblut. Gleichzeitig findet eine quantitative Abreicherung der Matrixbestandteile des zell-desintegrierten Blutes (CDB) statt.

Der Fraktionierungsschritt ist direkt an die Hitzeschockbehandlung der Probe gekoppelt. Das bedeutet, dass die mobile Phase zur Fraktionierung von CDB auch durch die Kolbenpumpe 1 (HPD 1) befördert wird.

Die Einmal-SPE-Kartuschen sind in zwei Dimensionen erhältlich: 10 x 1 mm I.D. und 10 x 2 mm I.D.. Es gibt eine große Auswahl an Packungsmaterialien, die je nach Analyt und chromatographischen Erfordernissen ausgewählt werden. Auf der Homepage der Firma Spark Holland B.V. (www.sparkholland.com) sind die verschiedenen verfügbaren Packungsmaterialien zu finden.

Die beiden Kolbenpumpenspritzen haben ein Volumen von 2 mL und ihre Flussgeschwindigkeit kann zwischen 0,1-10 mL/min programmiert werden. Die SPE-Kartuschen halten Drücke bis zu 350 bar aus. Bei Übersteigen des Rückdrucks wird der Lauf automatisch abgebrochen.

Die HPD 1 hat die Möglichkeit bis zu neun verschiedene Lösemittel zu befördern, die zum Teil in situ gemischt werden können. Dies ermöglicht die Konditionierung der eingesetzten SPE-Kartusche vor dem Fraktionierungsschritt.

6.2.4 Separation

Auf den Fraktionierungsschritt der CDB-Probe folgt der Separationsschritt der extrahierten Analyten. Ein Greifarm der SPE-Einheit setzt dazu die SPE-Kartusche von der linken Klemme in die rechte um. Nach Schalten des rechten 6-Wege-Ventils der SPE-Einheit in die 6-1 Position wird die mobile Phase, die durch die beiden HPLC-Pumpen befördert wird, so umgeleitet, dass sie die in der rechten Klemme eingesetzte SPE-Kartusche durchspült. Aufgrund der Elutionskraft der mobilen Phase werden die extrahierten Analyten von der SPE-Kartusche eluiert und auf die im direkten Anschluss gekoppelte analytische Trennsäule transferiert.

6.2.5 Detektion

Zur quantitativen Bestimmung der Analyten können verschiedene Detektoren herangezogen werden. Wird beispielsweise mit UV/VIS, Fluoreszenz- oder elektrochemischen Detektoren gearbeitet, so müssen die zu detektierenden Analyten vorher sauber, d.h. basisliniengetrennt, von einander separiert werden. Geschieht dies nicht, kommt es zu Fehlern bei der Quantifizierung, da diese Detektoren nicht in der Lage sind, substanzspezifisch zu messen.

In dem in dieser Arbeit entwickelten Totalen Analysesystem dient ein Tandemmassenspektrometer (MS/MS) als Detektor. Wie in Kapitel 3 erwähnt, handelt es sich hierbei um einen sehr empfindlichen und spezifischen Detektor. Eine vollständige chromatographische Trennung der extrahierten Analyten ist nicht notwendig, da das Tandem-MS substanzspezifisch detektiert. Die Separation von Analyten ist allerdings notwendig, wenn diese die gleiche Masse besitzen, d.h. isobar sind.

7 Methodenentwicklung und Bestimmung von Kenngrößen für die on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse: allgemeiner Teil

Zur Entwicklung einer Methode für die on-line Kopplung eines 2-Säulen-Systems müssen zunächst die Parameter t_A , t_M und t_T bestimmt werden. Die Vorgehensweise und die Bestimmung der entsprechenden Kenngrößen wurden in der Literatur bereits beschrieben¹⁷⁶. Dabei steht t_A für die Durchbruchzeit der Analyten von der SPE-Kartusche, t_M für die Elutionsdauer der Matrix von der SPE-Kartusche und t_T für die Transferzeit des Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Symbiosis™ Pharma System gearbeitet. Die dazugehörige Software erlaubt es nicht, die einzelnen Ablaufschritte zeitbezogen zu programmieren, jedoch ausschließlich über das zu verwendende Volumen. Aus diesem Grund wurden die bekannten Kenngrößen in ihrer Namensgebung geändert. In **Tab. 42** sind die entsprechenden Parameter gegenübergestellt und definiert.

alte Bezeichnung	adaptierte Bezeichnung	Definition
t_A	V_B (Volume breakthrough)	Durchbruchzeit / Durchbruchvolumen des Analyten von der SPE-Kartusche
t_M	V_F (Volume fractionation)	Fraktionierungsdauer / Fraktionierungsvolumen der Matrix von der SPE-Kartusche
t_T	V_E (Volume elution)	Transferzeit / Elutionsvolumen der Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule

Tab. 42: *Ursprüngliche und adaptierte Bezeichnungen der Parameter zur Methodenentwicklung*

Im Zuge der Optimierung der einzelnen Schritte einer on-line SPE-LC-Methode müssen neben den oben beschriebenen Parametern, die am besten geeigneten Eluenten sowie die stationären Phasen und Dimensionen der SPE-Kartuschen und die analytische Trennsäule ausgewählt werden.

7.1 Ausarbeitung der analytischen Trennung und Detektion

Die Methodenentwicklung beginnt mit der Auswahl und Optimierung der chromatographischen Bedingungen für die analytische Trennung und Detektion der zu analysierenden Substanzen.

Die Auswahl des chromatographischen Trennmaterials orientiert sich nach den Eigenschaften der zu analysierenden Analyten. Die Auswahl der Eluenten richtet sich nach der Auswahl der analytischen Trennsäule, den zu trennenden Analyten und dem verwendeten Detektor.

Wird ein Massenspektrometer als Detektor genutzt, so hat die Optimierung der Ionisation der zu detektierenden Analyten höchste Priorität. Ziel ist es, möglichst viele Molekülionen zu erzeugen. Diese werden anschließend in der Kollisionszelle zu charakteristischen Fragmenten fragmentiert. Um möglichst viele Molekülionen zu erzeugen, müssen einige variable, geräteabhängige Parameter optimiert werden. Diese Parameter beeinflussen den Vorgang in der ESI-Quelle und die Überführung der gebildeten Ionen in die Gasphase. Zu den zu optimierenden Einstellungen des Massenspektrometers gehören beispielsweise die Spannung an der Elektrospraykapillare, die Spannungen am Konus und Extraktor, die Quellen- und Desolvatationstemperaturen, die Konus- und Desolvatationsgasflüsse, die Kollisionsenergie und die Linsenspannungen der Ionenoptik¹⁷⁷.

Zur Optimierung des Signals der Analyten werden die oben aufgeführten Geräteparameter „getunt“. Dazu wird über eine Spritzenpumpe eine Analytlösung mit einer Konzentration von ca. 1 µg/mL in das Tandem-MS infundiert (Flussrate: 10 µL/min). Die Geräteparameter sollen unter realen Analysebedingungen optimiert werden, deshalb wird die Analytlösung über ein T-Stück zuerst in den Eluentenstrom infundiert und danach mittels MS analysiert.

Soll ein Analytgemisch analysiert werden, so muss ein Kompromiss für die Einstellungen der Geräteparameter gefunden werden. In einer MS-Tune Methode ist nur die Kollisionsenergie und die Konusspannung individuell für jeden Analyten einstellbar. Alle anderen Geräteparameter sind identisch.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunsuppressiva als Modellanalyten gewählt. Es ist bekannt, dass Sirolimus (Rapamycin) schwer ionisierbar ist und somit relativ schwer im Massenspektrometer zu detektieren ist. Aus diesem Grund wird die Einstellung der Geräteparameter mit Ausnahme der Kollisionsenergie und der Konusspannung auf die besten Ionisationsbedingungen des Sirolimus hin optimiert.

7.2 Ermittlung des Fraktionierungsvolumens (V_F) der Probenmatrix

Der instrumentelle Aufbau zur Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) ist in **Abb. 48** schematisch dargestellt.

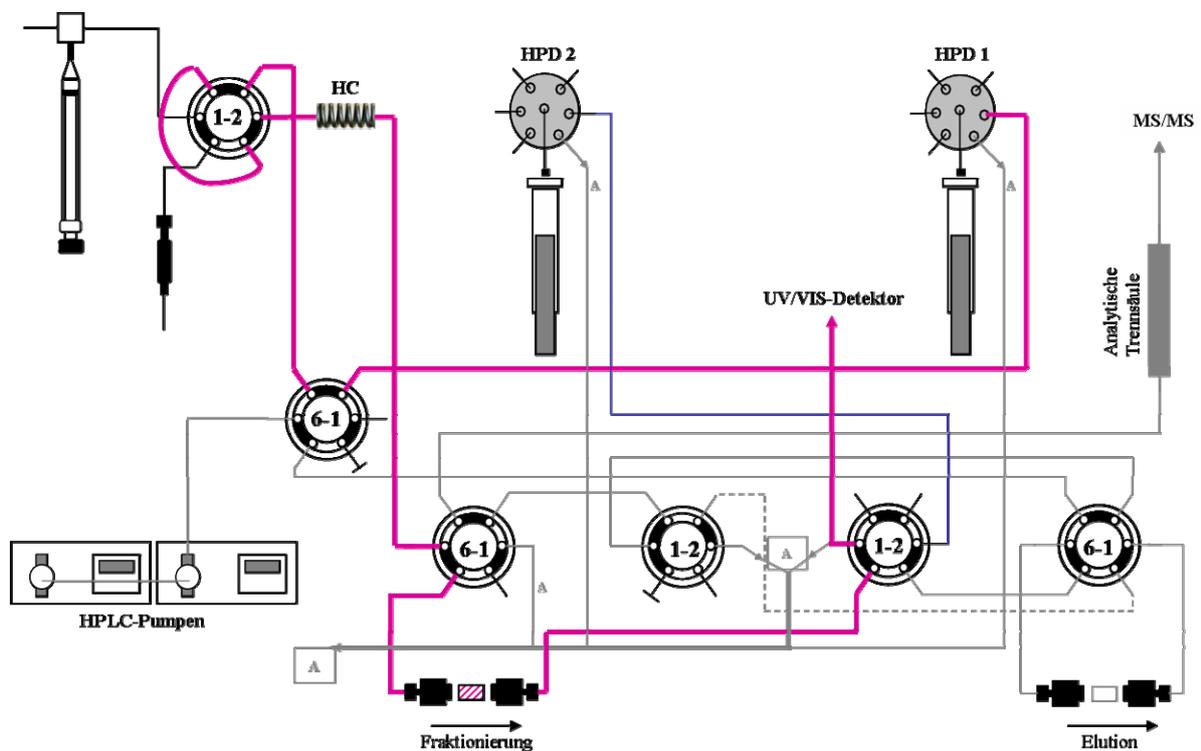


Abb. 48: Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus zur Bestimmung von V_F und V_B

Der erste Schritt in der Methodenentwicklung ist die Bestimmung des Parameters V_F . Dieser definiert das Volumen an Waschlösemittel, das notwendig ist, um die zu untersuchende Probe quantitativ zu fraktionieren. Dazu wird die zu untersuchende Probenmatrix, im vorliegenden Fall Vollblut, in das System injiziert, in-line prozessiert und

das resultierende zell-desintegrierte Blut (CDB) auf der SPE-Kartusche fraktioniert. Die Probe wird mittels der HPD 1 befördert. Die SPE-Kartusche ist direkt mit einem UV/VIS-Detektor gekoppelt. Dieser zeichnet das Elutionsprofil der Matrix auf. Die verwendeten Wellenlängen waren einerseits auf das Absorptionsmaximum von Hämoglobin eingestellt (428 nm), andererseits auf das Absorptionsmaximum von Proteinen bzw. von aromatischen Aminosäuren (280 nm)^{27,178}. Das Fraktionierungsvolumen wird rechnerisch bestimmt. Der Zeitpunkt, an dem der Matrixpeak die Basislinie wieder erreicht (t_M), wird mit der Flussrate multipliziert. Das Produkt entspricht dem benötigten Fraktionierungsvolumen. **Abb. 49** zeigt ein schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_F .

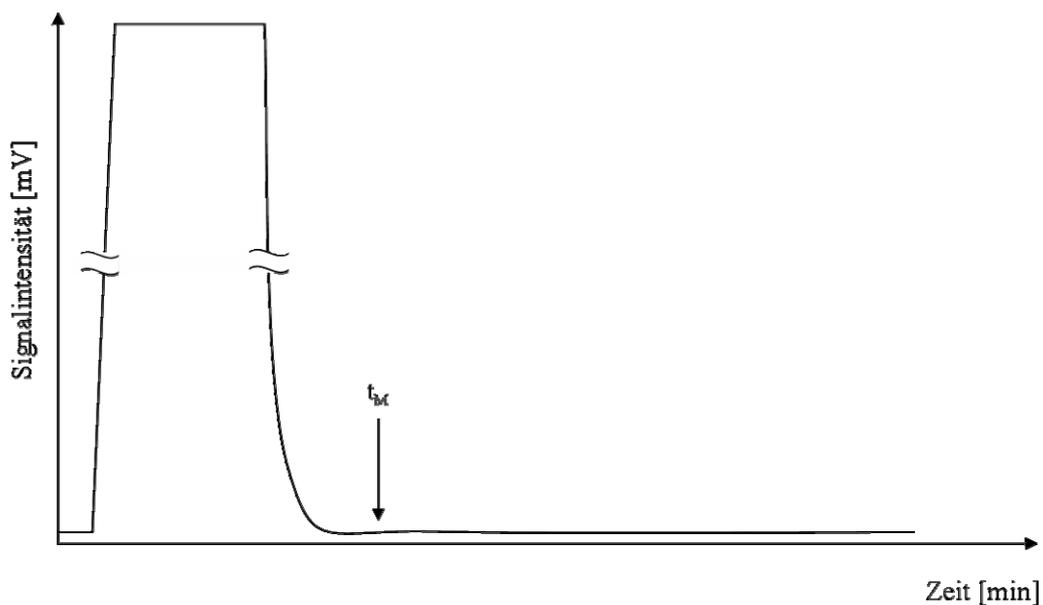


Abb. 49: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_F

7.3 Ermittlung des Durchbruchvolumens (V_B) der Analyten

Im Anschluss an die Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) muss sichergestellt werden, dass während des Fraktionierungsvorgangs die Analyten nicht in den Abfall gespült werden. Aus diesem Grund wird das Durchbruchvolumen (V_B) der Analyten bestimmt. Der instrumentelle Aufbau (siehe **Abb. 48**) und die chromatographischen Bedingungen sind identisch zu denen während der Bestimmung des Fraktionierungsvolumens. Einzig die zu injizierende Probe unterscheidet sich. Zur Bestimmung des Durchbruchvolumens wird eine Analytlösung in das System injiziert. Der UV/VIS-Detektor misst bei der Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des Analyten entspricht. **Abb. 50** stellt ein Elutionsprofil zur Bestimmung des Durchbruchvolumens schematisch dar. Auch in diesem Fall wird das Durchbruchvolumen rechnerisch aus dem Produkt aus Flussrate und Zeitpunkt des Analytdurchbruches (t_A) bestimmt.

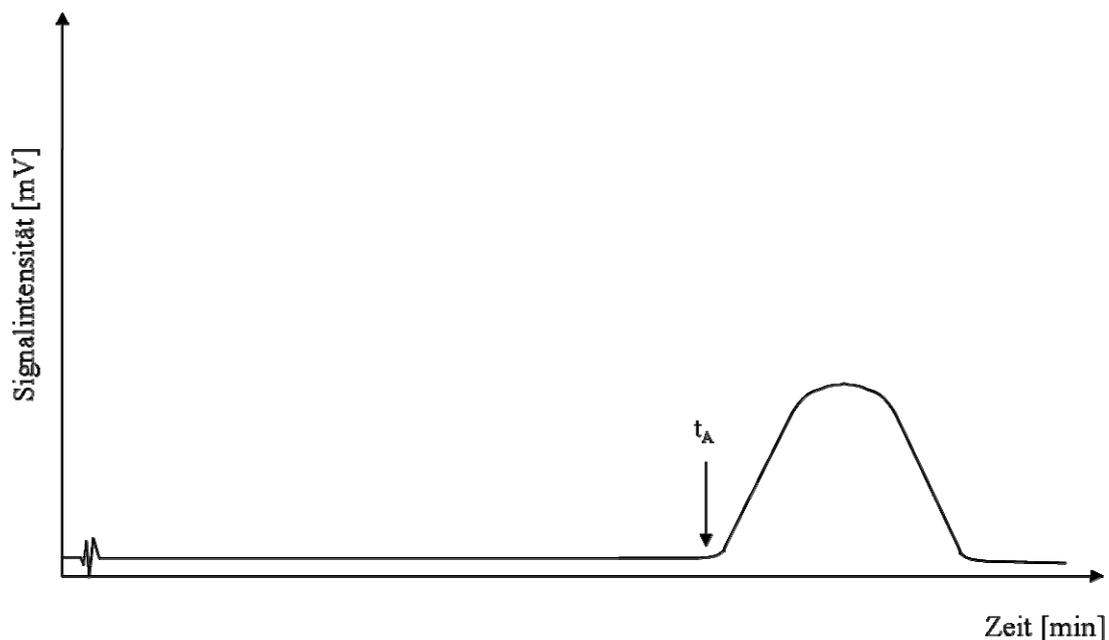


Abb. 50: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_B

Für eine quantitative Fraktionierung ist es entscheidend, dass das Durchbruchvolumen (V_B) größer ist als das Fraktionierungsvolumen (V_F).

7.4 Ermittlung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten

Der instrumentelle Aufbau zur Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten von der SPE-Kartusche ist im Vergleich zur Bestimmung von V_F und V_B leicht verändert. In **Abb. 51** ist dieser daher schematisch dargestellt.

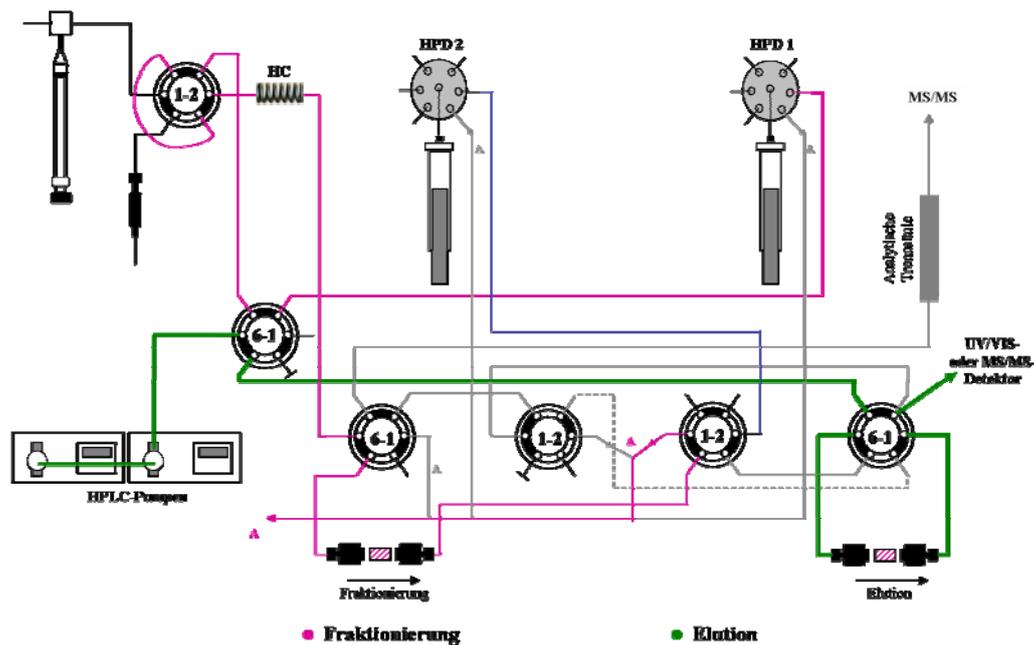


Abb. 51: Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus zur Bestimmung von V_E

Bei der Bestimmung dieses Parameters wird ebenfalls eine Analytlösung injiziert. Nach der Fraktionierung der Probe wird die Kartusche von der linken Klemme in die rechte übersetzt. Die mobile Phase, die nun durch die HPLC-Pumpen befördert wird, eluiert die Analyten von der SPE-Kartusche. Die SPE-Kartusche ist direkt an einen UV/VIS-Detektor gekoppelt, der bei der Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des eluierten Analyten entspricht, misst. Das Elutionsvolumen wird rechnerisch bestimmt. Experimentell wird die Transferzeit (t_T) des Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule ermittelt. Nach Multiplikation des Wertes für t_T mit der Flussrate erhält man das Elutionsvolumen. **Abb. 52** zeigt schematisch, das Elutionsprofil der Analyten.

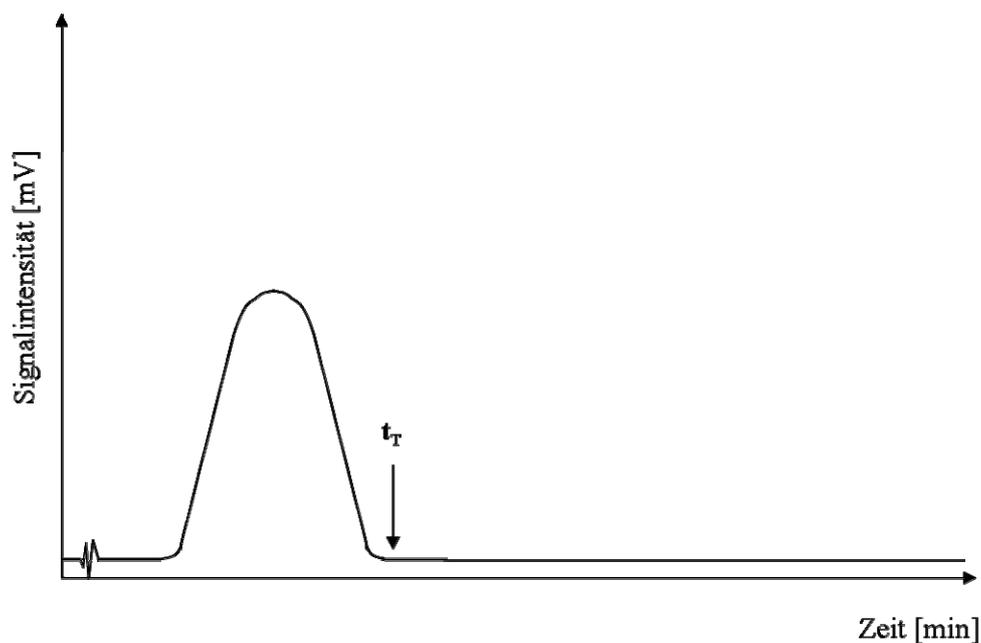


Abb. 52: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_E

Alternativ kann das Elutionsprofil auch mit einem Tandemmassenspektrometer aufgezeichnet werden. Dies hat den Vorteil, dass die Elutionsprofile mehrerer Analyten gleichzeitig aufgezeichnet werden können.

7.5 Programmierte Volumina ($V_{X(P)}$)

Die einzelnen Analyseschritte im Symbiosis™ Pharma System lassen sich in der Software nicht über die Zeit, sondern nur über das verwendete Volumen steuern. Dies betrifft beispielsweise das Umsetzen der SPE-Kartusche von der linken Klemme in die rechte bzw. zurück zum Vorratstablett, als auch die Schaltzeitpunkte verschiedener Ventile. Die entsprechenden Volumina ($V_{X(P)}$) lassen sich aufgrund der ermittelten Kenngrößen t_A , t_M und t_T berechnen und programmieren.

$V_{F(P)}$:

Das programmierte Volumen $V_{F(P)}$ definiert den Endpunkt des Fraktionierungsschrittes und somit den Zeitpunkt des Umsetzens der SPE-Kartusche von der linken in die rechte Klemme. Zusätzlich markiert es den Zeitpunkt des Schaltens des für die rechte Klemme verantwortlichen Ventils. Durch das Schalten dieses Ventils wird der Pumpenfluss der HPLC-Pumpen über die eingesetzte SPE-Kartusche gelenkt. Die extrahierten Analyten können somit eluiert werden.

Die Grundbedingung für eine quantitative Fraktionierung ist, dass das Durchbruchsvolumen der Analyte größer ist als das zu deren quantitativen Extraktion benötigte Volumen.

$$V_{F(P)} [\mu\text{L}] = t_M [\text{min}] \times \text{Flussrate} [\mu\text{L}/\text{min}] + X [\mu\text{L}]$$

X stellt einen Sicherheitszuschlag dar. Dieser garantiert, dass auch bei kleinen Unregelmäßigkeiten die Abreicherung, d.h. die Elution der Probenmatrix von der SPE-Kartusche, vollständig ist.

V_{E(P)}:

Das programmierte Volumen $V_{E(P)}$ definiert den Endpunkt des Elutionsschrittes der Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule und somit den Zeitpunkt des Umsetzens der SPE-Kartusche von der rechten Klemme zurück in das Vorratstablett. Zusätzlich kommt es zur Schaltung des für die rechte Klemme verantwortlichen Ventils. Somit wird der Pumpenfluss nicht mehr über die rechte Klemme geleitet, sondern direkt auf die analytische Trennsäule. Während des Elutionsschrittes sind die SPE-Kartusche und die analytische Trennsäule direkt miteinander gekoppelt.

$$V_{E(P)} [\mu\text{L}] = t_T [\text{min}] \times \text{Flussrate} [\mu\text{L}/\text{min}] + X [\mu\text{L}]$$

Auch bei diesem Analyseschritt wird das Elutionsvolumen und somit die Elutionsdauer um einen Sicherheitszuschlag X vergrößert.

7.6 Analysezyklus

Der Vorteil des Symbiosis™ Pharma Systems ist, dass die Fraktionierung der Probe und die Elution der Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule parallel ablaufen. Dies ist in **Abb. 53** schematisch dargestellt.

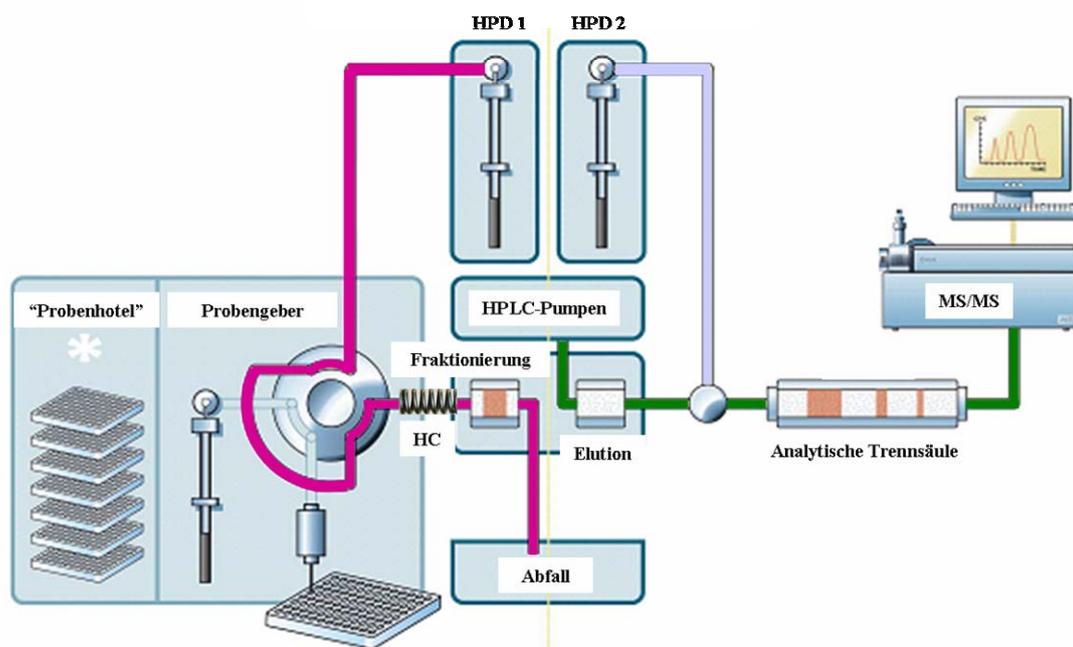


Abb. 53: Schematische Darstellung des parallelen Ablaufs der Fraktionierung (purpur) und Elution (grün) im modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems [in Anlehnung an⁴⁹]

Nachdem die erste Probe in-line in der beheizten Edelstahlkapillare prozessiert und anschließend fraktioniert wurde, wird die SPE-Kartusche von der linken Klemme in die rechte transferiert. Im Anschluss werden mittels der mobilen Phase der HPLC-Pumpen die retenierten Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule eluiert. Während dieses Elutionsschrittes wird die zweite Probe in-line prozessiert

und fraktioniert. Diese spezielle Arbeitsweise des Analysesystems verkürzt signifikant die Gesamtanalysezeit.

8 Entwicklung einer Methode für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von Vollblut zur Analyse von Pharmaka in einem on-line SPE-LC-MS/MS-System

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zur quantitativen Bestimmung von Pharmaka aus unbehandelten Vollblutproben beinhaltet mehrere Teilschritte, die nicht nur optimiert, sondern auch aufeinander abgestimmt wurden.

8.1 LC-Trennung und MS/MS-Detektion

Bei der Verwendung eines MS/MS-Detektors ist es nicht mehr notwendig, die Analyten chromatographisch auf der analytischen Trennsäule basisliniengetrennt zu separieren. Das Tandemmassenspektrometer (MS/MS) ist in der Lage, mehrere gleichzeitig eluierende Analyten simultan zu detektieren. Die einzige Bedingung ist, dass die zu detektierenden Substanzen nicht isobar sind. Aus diesem Grund ist es bei der Analyse der Immunsuppressiva wichtig, Ciclosporin A, dessen Metabolite und den dazugehörigen Internen Standard Ciclosporin D basisliniengetrennt von der analytischen Trennsäule zu eluieren, da Metabolite von Ciclosporin A Addukte bilden können, die mit Ciclosporin A und D isobar sind⁸⁰.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Aufbereitung von Vollblutproben für die on-line SPE-LC-Analyse. Aus diesem Grund wurden die analytische Trennsäule und die entsprechenden mobilen Phasen aus der Literatur übernommen^{1,13}.

Als chromatographische Trennsäule wurde zunächst eine LiChrospher[®] 100 RP 18-EC-Säule mit den Dimensionen 125 x 2 mm I.D. und einer Partikelgröße von 5 µm untersucht (Ziemer Chromatographie).

Alternativ wurden Versuche mit einer Kieselgel-modifizierten Trennsäule (Luna[®] Phenyl-Hexyl, 50 x 2 mm I.D., dp 5 µm, Firma Phenomenex) durchgeführt¹⁷⁹. Diese stationäre Phase weist eine gute Retention von Aminoverbindungen und polaren aromatischen Verbindungen auf. Solch eine Säule wurde bereits zur Analyse von Immunsuppressiva erfolgreich eingesetzt^{9,11}.

Bei der Kopplung der LC mit einem Massenspektrometer werden an die verwendete mobile Phase besondere Anforderungen gestellt. Wie schon in Kapitel 3.3.1 beschrieben, ist es bei dieser Instrumentenkonfiguration nicht erlaubt, nicht verdampfbare Verbindungen wie bestimmte Salze (Sulfate, Phosphate) oder Ionenpaarreagenzien (PEG, TFA) zu verwenden, da diese zu Matrixeffekten führen können. Ausserdem können diese nichtflüchtigen Substanzen an der Ionenoptik auskristallisieren und dadurch die angelegte Spannung verfälschen.

Bei Verwendung einer ESI-Quelle ist es für die Ionenbildung essentiell, dass sich in der mobilen Phase flüchtige Substanzen befinden, die den Analyten ionisieren. Insbesondere Ameisensäure (engl.: formic acid; FA) oder Ammoniumacetat eignen sich hierfür¹⁸⁰. Dabei wurden Konzentrationen kleiner als 10 mM als optimal gefunden.

Die Hauptkomponente der mobilen Phase sollte ein Lösemittel mit hoher Elutionskraft sein, um die Analyten in einem möglichst kleinen Volumen von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule zu transferieren. Organische Lösemittel wie Methanol oder Acetonitril sind dafür geeignet. Zusätzlich sollte die mobile Phase einen möglichst geringen wässrigen Anteil besitzen. Damit Eluenten mit einem hohen wässrigen Anteil

verdampft werden können, müssen die Quellen- und Desolvatationstemperaturen relativ hoch gesetzt werden. Dies führt zu Problemen bei thermolabilen Analyten. Ein wässriger Anteil in der mobilen Phase bis zu 10 vol. % ist in der Literatur häufig zu finden^{1,12,13,28}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mischung aus MeOH und 2mM NH₄Ac (90/10, v/v) als Eluent ausgewählt.

Die analytische Trennung wurde bei einer Temperatur von 40°C durchgeführt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 250 µL/min.

Zusammenfassend lässt sich die chromatographische Trennung wie folgt beschreiben: Die vier Immunsuppressiva und ihre zugehörigen Internen Standards wurden auf einer LiChrospher[®] 100 RP 18-EC Trennsäule (125 x 2 mm I.D., dp 5 µm) isokratisch bei 250 µL/min Flussrate und 40°C Säulentemperatur mit einer mobilen Phase bestehend aus 90 vol. % MeOH und 10 vol. % 2 mM NH₄Ac getrennt. Alternativ wurde eine Luna[®] Phenyl-Hexyl Trennsäule (50 x 2 mm I.D., dp 5 µm) eingesetzt, wobei die chromatographischen Bedingungen konstant blieben. **Abb. 54** stellt ein repräsentatives Chromatogramm einer Standardlösung dar. Die Konzentration der untersuchten Analyten in der methanolischen Standardlösung betrug jeweils 10 ng/mL. Das Injektionsvolumen der Standardlösung betrug 50 µL.

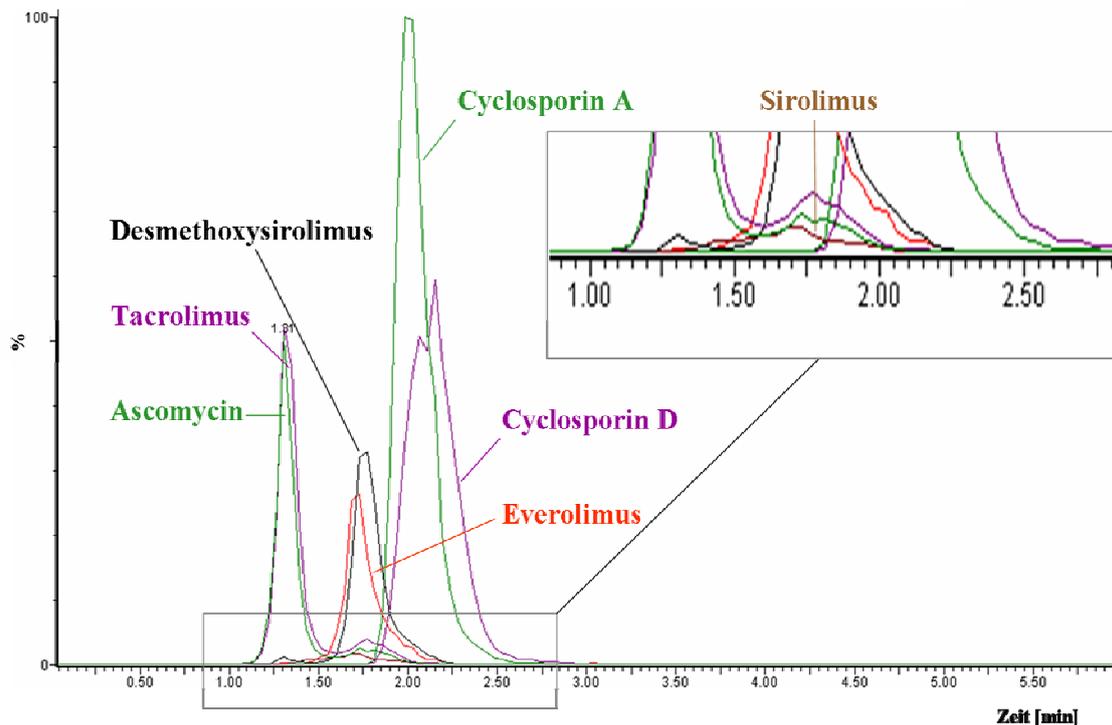


Abb. 54: Repräsentatives Chromatogramm eines MRM-Laufs einer methanolischen Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva und deren Internen Standards; $c(\text{Analyt}) = 10 \text{ ng/mL}$; Injektionsvolumen: $50 \text{ }\mu\text{L}$

Damit möglichst intensive Signale und somit eine möglichst niedrige Bestimmungsgrenze der zu untersuchenden Analyte erreicht wird, muss die Ionisation der Analyten optimiert werden. Der Prozess der Optimierung der Ionisation wird als Ionisations-Tuning bezeichnet. Bei diesem Tuning wird eine Analytlösung mit einer Konzentration von ca. $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ über ein T-Stück unter Verwendung einer Spritzenpumpe ($10 \text{ }\mu\text{L/min}$) in den Eluentenstrom infundiert. **Abb. 55** stellt die Zufuhr der Analytlösung während des Tunings schematisch dar.

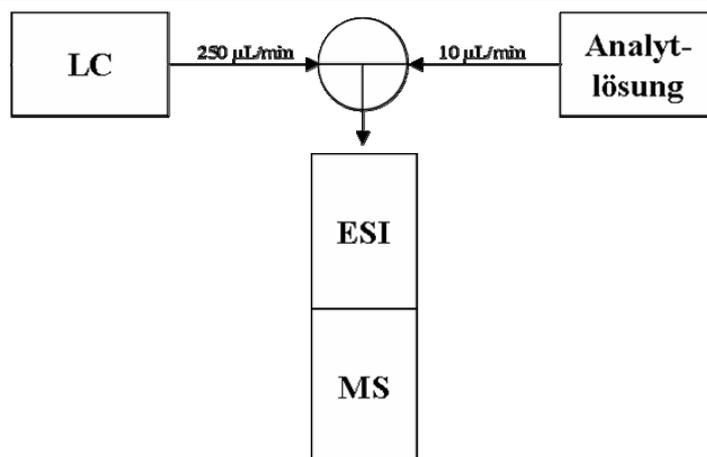


Abb. 55: Schematische Darstellung der zum Tuning verwendeten Systemkonfiguration

Der Tuningprozess beginnt mit der Bestimmung des Precursorions und dessen Optimierung. Dabei werden die verschiedenen Tuningparameter wie beispielsweise Kapillarspannung, Konusspannung, Extraktorspannung, Quelltemperatur, Desolvatationstemperatur, Konus- und Desolvatationsgasfluss für jeden einzelnen Analyten optimiert. Sollen Analyten simultan detektiert werden, muss man sich auf einen Kompromiss der optimalen Tuningparameter einlassen, denn in einer MS-Methode kann nur die Konusspannung für jeden einzelnen Analyten individuell eingestellt werden. Bei der Detektion von Immunsuppressiva werden neben Natriumaddukten auch Ammoniumaddukte gebildet. Bedingung für eine hohe Sensitivität des Detektors ist es, deutlich mehr Ammoniumaddukte als Natriumaddukte zu bilden. Immunsuppressiva und allem voran Ciclosporin A haben eine viel höhere Affinität zu Na^+ -Ionen. Jedoch lassen sich Natriumaddukte in der Kollisionszelle nicht fragmentieren und somit keine Produktionen bilden, die für die Messung von MRM-Übergängen essentiell sind. Durch die Zugabe von NH_4Ac zu der mobilen Phase lassen sich die gewünschten NH_4^+ -Addukte $[\text{M}-\text{NH}_4]^+$ bilden. Zeigt das Massenspektrometer eine Natriumverschmutzung durch beispielsweise Na^+ -kontaminierte Eluenten, wird das Quasiionen-

verhältnis zwischen NH_4^+ - und Na^+ -Addukten zu Gunsten der Na^+ -Addukte hin verschoben. Dies führt zu einem Verlust der Signalintensität.

Nachdem die idealen Bedingungen für die Bestimmung des jeweiligen Precursorions gefunden wurden, kommt es durch Zufuhr von Kollisionsgas zur Fragmentierung der Precursorionen in „diagnostische“ Produktionen (Fragmentationen). Die entstandenen Fragmentationen sind charakteristisch für das jeweilige Precursorion. Für die optimalen Fragmentierungsvorgänge müssen mehrere Geräteparameter getunt werden, wie z.B. die Kollisionsenergie, die Eintritts- und Austrittsgeschwindigkeiten der Ionen in bzw. aus der Kollisionszelle, u.a.. Auch bei diesen Parametern muss ein Kompromiss bezüglich deren Einstellungen gewählt werden. Werden mehrere Analyten gemeinsam in einer MS-Methode vermessen, so kann neben der Konusspannung nur noch die Kollisionsenergie für jeden Analyten individuell eingestellt werden. Bei der Fragmentierung der Precursorionen soll möglichst ein intensives Fragment gebildet werden. Nur so kann eine maximale Messempfindlichkeit im MRM-Modus erreicht werden. Es ist darauf zu achten, dass die Kollisionsenergie nicht zu hoch gewählt wird, denn sonst kommt es zur Fragmentierung der Fragmentationen bzw. das Precursorion wird in viele kleine, jedoch wenig intensive Fragmente unterteilt. Die Gefahr bei kleinen Fragmenten ist zudem, dass sie keine für das Precursorion charakteristischen Fragmente darstellen. In **Tab. 43** sind die variablen Tuning-Parameter, Precursor- und Produktionen für die untersuchten Immunsuppressiva und deren Internen Standards (IS) zusammengefasst.

Analyt	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Precursorion [Da]	Fragmention [Da]
Ascomycin (IS)	25	20	809,8	756,5
Tacrolimus	25	22	821,7	768,6
Desmethoxysirolimus (IS)	20	18	901,8	834,6
Sirolimus	20	20	931,5	864,0
Everolimus	20	20	976,0	908,5
Ciclosporin A	20	15	1220,0	1203,0
Ciclosporin D (IS)	20	15	1234,0	1217,0

Tab. 43: Zusammenstellung der variablen Tuning-Parameter, Precursor- und Produktionen der untersuchten Immunsuppressiva und deren Internen Standards

Nicht alle Immunsuppressiva lassen sich gleich gut ionisieren. Sirolimus ist das am schwierigsten zu ionisierende und somit zu detektierende Immunsuppressivum. Daher sollte bei der Auswahl der nicht variablen Tuning-Parameter Sirolimus eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Ciclosporin A und dessen Interner Standard sind nur bis zu einer Temperatur von ca. 300°C stabil. Die anderen Immunsuppressiva können aber auch sehr gut bei Temperaturen oberhalb 300°C ionisiert werden. Ein Maß für die Signalintensität bzw. Sensitivität des Detektors ist die Auflösung der Peaks. Sie wird definiert mit der Signalbreite auf halber Höhe. Ciclosporin A und D zeigen ein optimales Signal, wenn die Auflösung bei 0,7 Da liegt. Die anderen Immunsuppressiva und ihre Internen Standards weisen bei einer Auflösung von 0,9-1,1 Da ein optimales Signal auf. Aufgrund dieser beiden abweichenden Parameter (Desolvatationstemperatur und Auflösung) wäre ein separates Messen von Ciclosporin A/D von den anderen Immunsuppressiva, einer simultanen Messung vorzuziehen. Jedoch heißt dies, dass jede zu untersuchende Probe

in der Routineanalytik zwei Mal vermessen werden müsste. Dies bedeutet längere Rücklaufzeiten und wirkt sich somit negativ auf die Effizienz der LC-MS/MS-Läufe aus. Aus diesem Grund wird in nur wenigen Routinelaboren die Messung von Ciclosporin A/D unter anderen Bedingungen und somit separat von den anderen Immunsuppressiva durchgeführt.

8.2 In-line Prozessierung von Vollblutproben

Die Möglichkeit, Vollblutproben in-line, d.h. implementiert in einem Analysesystem, zu prozessieren, wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Wie in Kapitel 6.2.2.1 geschildert, geschieht die Hitzeschockbehandlung in einer beheizten Edelstahlkapillare (HC). Diese befindet sich direkt hinter dem Injektionsventil. Die Vollblutprobe wird nach der Injektion direkt in der beheizten Edelstahlkapillare (HC) zu zell-desintegriertem Blut (CDB) prozessiert. Die Flussgeschwindigkeit, mit der die Probe durch die beheizte Edelstahlkapillare befördert wird, bestimmt die Verweilzeit der Probe in der Prozessierungseinheit. In Kapitel 5 sind die Einflüsse von Art und Menge der zur Probe hinzugefügten organischen Lösemittel und des Hämatokrits der Probe auf die optimale Heizdauer der zu untersuchenden Vollblutprobe in off-line Experimenten genau definiert und beschrieben worden.

Mit der in Kapitel 6.2.2.1 vorgestellten Formel lässt sich die off-line bestimmte optimale Heizdauer (t_{heat}) bei gegebenen Bedingungen in die optimale Verweilzeit der Probe in der beheizten Edelstahlkapillare umrechnen.

Im Folgenden werden tabellarisch (**Tab. 44**) die berechneten Flussraten zur optimalen in-line Prozessierung verschiedener Ansätze für den jeweilig optimalen Temperaturbereich zusammengefasst.

Ansatz	optimaler Temperaturbereich [°C] zur Herstellung von CDB	Temperatur [°C]	t _{heat} [sec] (off-line)	Flussgeschwindigkeit [μL/min] (in-line)
VB	70-75	70	39	91
		75	16	221
VB:AB-HP (50/50, v/v)	75-85	75	36	98
		80	18	197
		85	12	295
VB:AB-HP:MeOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	75-80	75	17	208
		80	8	443
VB:AB-HP:MeOH (50/45/5, v/v/v)	75	75	9	393
VB:AB-HP:MeOH (50/40/10, v/v/v)	70	70	10	354
VB:AB-HP:ACN (50/47,5/2,5, v/v/v)	75-80	75	12	295
		80	8	443
VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)	70-75	70	13	272
		75	6	590
VB:AB-HP:ACN (50/40/10, v/v/v)	60-65	60	16	221
		65	8	443
VB:AB-HP:EtOH (50/47,5/2,5, v/v/v)	75	75	16	221
VB:AB-HP:EtOH (50/45/5, v/v/v)	75	75	8	443
VB:AB-HP:EtOH (50/40/10, v/v/v)	75	75	3	1180
VB:MeOH (95/5, v/v)	75	75	10	354
VB:ACN (95/5, v/v)	70	70	14	253
VB/DMSO (97,5/2,5, v/v)	75	75	13	272
VB/DMSO (95/5, v/v)	75	75	12	295
VB/DMSO (90/10, v/v)	75	75	8	443

Tab. 44: Berechnete Flussraten für verschiedene Proben und deren Hitzeschock-induzierte Desintegration; **CDB:** zell-desintegriertes Blut (engl.: cell-disintegrated blood)

Die Kolbenpumpe 1 (HPD 1), die für die Beförderung der zu prozessierenden Probe verantwortlich ist, kann mit einer Flussrate zwischen 100-10000 $\mu\text{L}/\text{min}$ betrieben werden. Sie lässt sich in 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ -Schritten programmieren. Die errechneten Flussraten können somit teilweise nicht exakt programmiert werden. Jedoch verändert sich die Verweilzeit der Probe in der HC nur unmerklich, wenn die Flussrate während der Prozessierung um max. 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ vom optimalen Wert abweicht.

Die errechnete Flussrate zur in-line Prozessierung von VB:DMSO (97,5/2,5, v/v) bei einer Temperatur von 75°C beträgt 272,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ und basiert auf dem off-line ermittelten t_{heat} von 13 sec. Die Kolbenpumpe kann näherungsweise jedoch nur auf einen Fluss von 270 bzw. 275 $\mu\text{L}/\text{min}$ programmiert werden. Dies entspricht einem t_{heat} von 13,11 sec bzw. 12,87 sec. Dieses Beispiel verdeutlicht nochmals, dass eine kleine Varianz in der Flussrate während der in-line Prozessierung von Vollblut keinen Einfluss auf die Effizienz der Hitzeschockbehandlung hat.

8.3 SPE-Kartuschen

8.3.1 Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) der Probenmatrix

Eine quantitative Fraktionierung der CDB-Probe ist essentiell für die Erstellung einer robusten Methode, d.h. die direkte Injektion, in-line Prozessierung und anschließende Analyse von Immunsuppressiva aus nativen Vollblutproben. Biologische Flüssigkeiten stellen eine heterogene und hochkomplexe Probenmatrix dar. Zusätzlich schwankt deren Zusammensetzung intra- und interindividuell, wie beispielsweise im Hämatokritwert.

In der Bioanalytik ist es unabdingbar, die Probenmatrix effektiv von den zu analysierenden Analyten abzutrennen. Wie bereits erwähnt, führt eine unzureichende Abreicherung der Probenmatrix unter anderem zu einer Verkürzung der Lebensdauer der analytischen Trennsäule und einer Zunahme von Matrixeffekten bei Verwendung eines Tandemmassenspektrometers.

Die Vorgehensweise und der instrumentelle Aufbau zur Ermittlung des Fraktionierungsvolumens (V_F) der Probenmatrix wurde bereits in Kapitel 7.2 beschrieben.

Zur Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) wurde beispielsweise die Probe VB:DMSO (97,5/2,5, v/v) (25 μ L) in-line bei 75°C und einem Fluss von 270 μ L/min prozessiert. Der Hämatokrit dieser Vollblutprobe betrug 0,49. Nach Abschluss der in-line Prozessierung wurde der Fluss der Kolbenpumpe (HPD) auf 2 mL/min erhöht, um die Dauer der Fraktionierung bzw. Probenaufbereitung möglichst kurz zu halten.

Für die Bestimmung von V_F wurden folgende SPE-Kartuschen getestet (siehe **Tab. 45**). Die Dimension betrug jeweils 10 x 2 mm I.D..

Bezeichnung	dp [μm]	Kurzbeschreibung
Hysphere C2-SE	7	unpolar, sphärische Gestalt, Silanolgruppen des Kieselgels mit Ethylgruppen modifiziert und abgesättigt
Hysphere C2	7	unpolar, sphärische Gestalt, Silanolgruppen des Kieselgels mit Ethylgruppen modifiziert
Hysphere C8-SE	8	unpolar, sphärische Gestalt, Silanolgruppen des Kieselgels mit Octylgruppen modifiziert und abgesättigt
Hysphere C8	8	unpolar, sphärische Gestalt, Silanolgruppen des Kieselgels mit Octylgruppen modifiziert
Hysphere Resin SH	25-35	SH = stark hydrophob, modifiziertes Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer, unregelmäßige Gestalt
Hysphere Resin GP	10-12	GP = generelle Phase, sphärische Gestalt, Polyvinyl-Benzol-Polymer
C8	40-90	unregelmäßige Gestalt, Silanolgruppen des Kieselgels mit Octylgruppen modifiziert
Oasis HLB	30	HLB = Hydrophile-Lipophile-Balance, Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon (hydrophil) und Divinylbenzol (lipophil)

Tab. 45: *Eigenschaften der verwendeten SPE-Materialien bzw. -Kartuschen*^{181,182}

Die zur Fraktionierung verwendete mobile Phase setzt sich aus H₂O:ACN (95/5, v/v) zusammen. Der Anteil an organischem Lösemittel ist aus zweierlei Gründen wichtig: Erstens führt Acetonitril zur Aufhebung der Proteinbindung der Analyten. Zweitens sorgt es dafür, dass sich Lipide, unpolare Analyte und sonstige wasserunlösliche Matrixbestandteile nicht an Oberflächen, z.B. Kapillaren des Analysesystems, festsetzen.

Das Elutionsprofil der Probenmatrix wurde mit einem UV/VIS-Detektor bei 428 nm, dem Absorptionsmaximum von Hämoglobin, und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, aufgezeichnet.

Abb. 56 zeigt die übereinandergelegten Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Materialien und einer Detektion bei 428 nm.

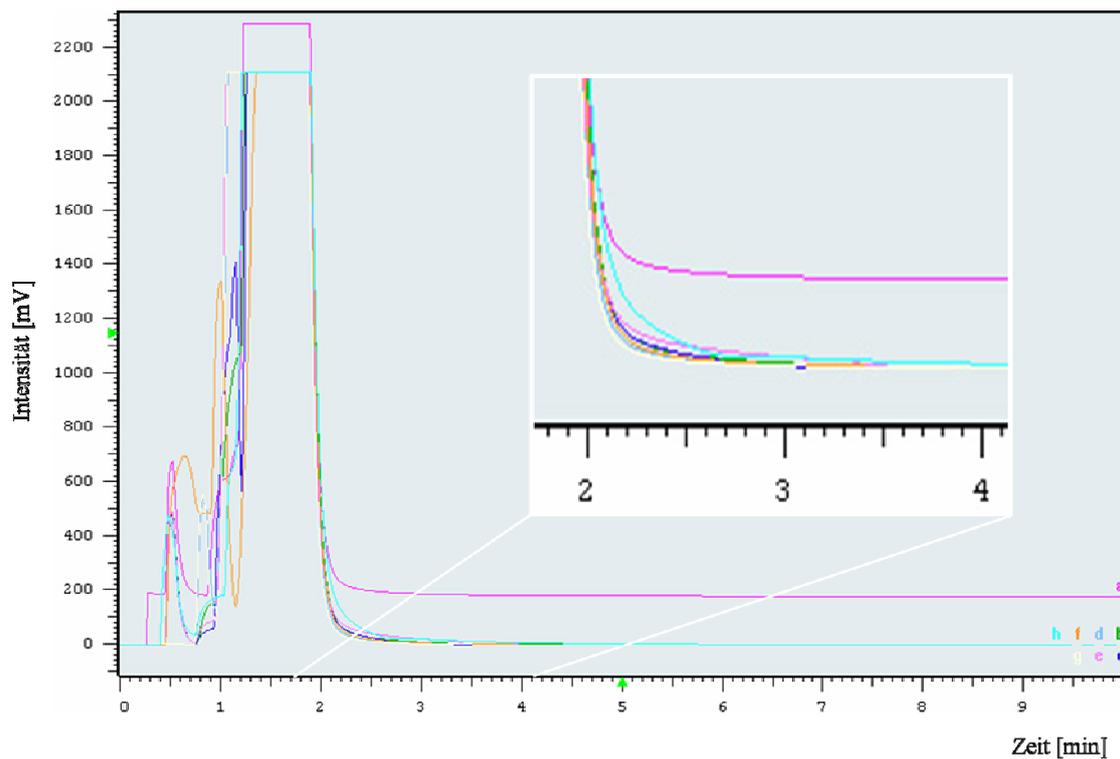


Abb. 56: *Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Materialien und einer Detektion bei 428 nm. a: Hysphere C2-SE, b: Hysphere C2, c: Hysphere C8, d: Hysphere C8-SE, e: Hysphere Resin SH, f: Hysphere Resin GP, g: C8, h: Oasis HLB*

Die entsprechenden Zeiten für die Fraktionierung der Probenmatrix (t_M) und die resultierenden Fraktionierungsvolumina (V_F) sind in **Tab. 46** zusammengefasst.

SPE-Kartusche	t_M [min]	Elutionsvolumen [μL] bei 270 $\mu\text{L}/\text{min}$	Elutionsvolumen [μL] bei 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$	gesamtes Elutionsvolumen [μL]
Hysphere C2-SE	2,68	499,5	1660	2159,5
Hysphere C2	2,95	499,5	2200	2699,5
Hysphere C8-SE	2,70	499,5	1700	2199,5
Hysphere C8	2,80	499,5	1900	2399,5
Hysphere Resin SH	3,45	499,5	3200	3699,5
Hysphere Resin GP	2,80	499,5	1900	2399,5
C8	2,65	499,5	1600	2099,5
Oasis HLB	2,70	499,5	1700	2199,5

Tab. 46: *Ermittelte Prozessparameter (t_M und V_F) für die SPE einer Vollblutprobe [25 μL VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)] bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen. Detektion bei 428 nm.*

In **Abb. 57** sind die übereinandergelegten Elutionsprofile einer CDB-Matrix gezeigt, die bei 280 nm aufgezeichnet wurden. Die Buchstaben a-h bezeichnen die verwendeten SPE-Kartuschen.

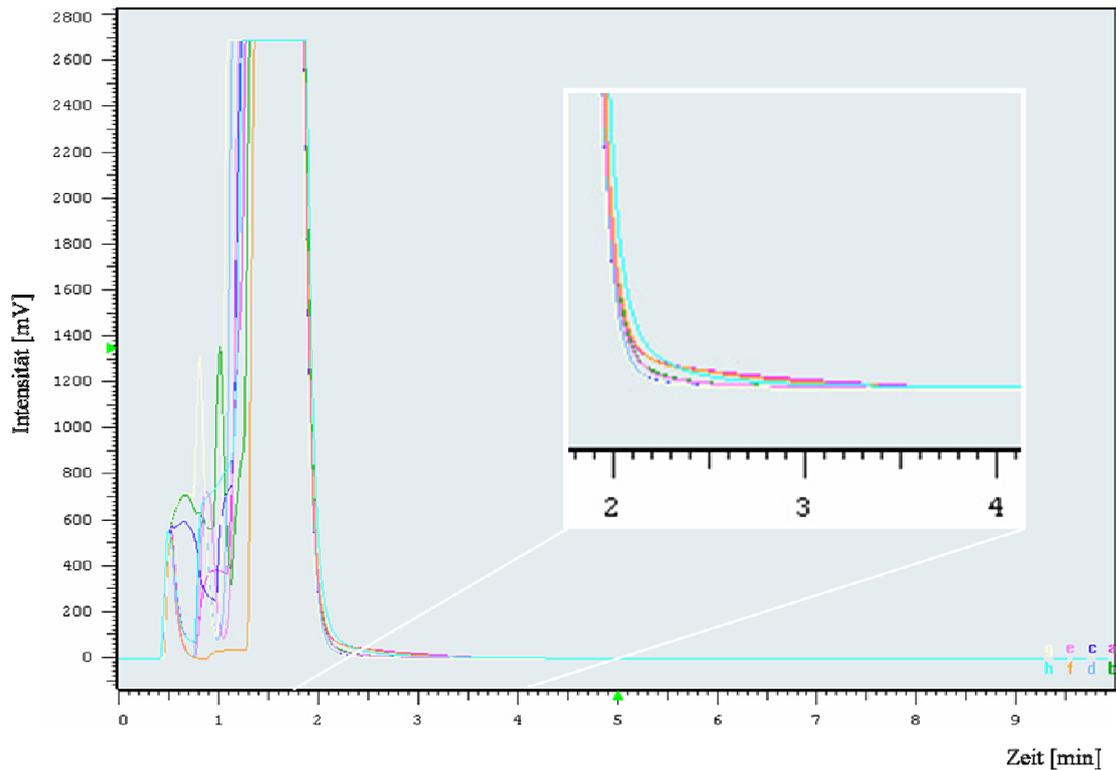


Abb. 57: *Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Materialien und einer Detektion bei 280 nm. a: Hysphere C2-SE, b: Hysphere C2, c: Hysphere C8, d: Hysphere C8-SE, e: Hysphere Resin SH, f: Hysphere Resin GP, g: C8, h: Oasis HLB*

Tab. 47 fasst die ermittelte Dauer der Fraktionierung (t_M) und die resultierenden Volumina der Fraktionierung (V_F) für die bei 280 nm aufgezeichneten Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen zusammen.

SPE-Kartusche	t_M [min]	Elutionsvolumen [μL] bei 270 $\mu\text{L}/\text{min}$	Elutionsvolumen [μL] bei 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$	gesamtes Elutionsvolumen [μL]
Hysphere C2-SE	3,80	499,5	3900	4399,5
Hysphere C2	3,15	499,5	2600	3099,5
Hysphere C8-SE	2,80	499,5	1900	2399,5
Hysphere C8	2,75	499,5	1800	2299,5
Hysphere Resin SH	2,70	499,5	1700	2199,5
Hysphere Resin GP	3,70	499,5	3700	4199,5
C8	2,75	499,5	1800	2299,5
Oasis HLB	3,30	499,5	2900	3399,5

Tab. 47: *Ermittelte Prozessparameter (t_M und V_F) für die SPE einer Vollblutprobe [25 μL VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)] bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen. Detektion bei 280 nm.*

Die entsprechenden Elutionsprofile zeigen, dass die Elution von Hämoglobin (428 nm) bei den meisten Kartuschen schon früher abgeschlossen ist als die Elution der Plasmaproteine (280 nm). Die Elutionsdauer und das entsprechende Elutionsvolumen für die untersuchten SPE-Kartuschen sind in **Tab. 48** nochmals zusammenfassend dargestellt. Bei der Berechnung der Volumina zur Fraktionierung (V_F) ist zu beachten, dass zwischen 0,00-1,85 min die Flussrate 270 $\mu\text{L}/\text{min}$ (entspricht den optimalen Prozessierungsbedingungen dieser Probe bei 75°C) beträgt und ab 1,86 min die Flussrate auf 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ erhöht wurde, um die Elution der Probenmatrix von der SPE-Kartusche zu beschleunigen.

SPE-Kartusche	280 nm		428 nm		maximales	
	t_M [min]	$\sim V_F$ [μL]	t_M [min]	$\sim V_F$ [μL]	t_M [min]	$\sim V_F$ [μL]
Hysphere C2-SE	3,80	4400	2,68	2160	3,80	4400
Hysphere C2	3,15	3100	2,95	2700	3,15	3100
Hysphere C8-SE	2,80	2400	2,70	2200	2,80	2400
Hysphere C8	2,75	2300	2,80	2400	2,80	2400
Hysphere Resin SH	2,70	2200	3,45	3700	3,45	3700
Hysphere Resin GP	3,70	4200	2,80	2400	3,70	4200
C8	2,75	2300	2,65	2100	2,75	2300
Oasis HLB	3,30	3400	2,70	2200	3,30	3400

Tab. 48: Zusammenfassung der ermittelten t_M - und V_F -Werte einer VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe (25 μL) bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen

Die tabellarische Zusammenfassung zeigt, dass die Abreicherung der Plasmaproteine in der Regel ein größeres Volumen an mobiler Phase benötigt als die Abreicherung des bei der in-line Prozessierung freigesetzten Hämoglobins. Einzig für die SPE-Kartuschen Hysphere C8 und Hysphere Resin SH sind die ermittelten Werte für V_F bei 428 nm (Hämoglobin) größer als bei 280 nm (Plasmaproteine).

In **Abb. 58** ist das jeweilige Fraktionierungsvolumen (V_F) in Abhängigkeit von den untersuchten SPE-Kartuschen graphisch dargestellt.

C8 < Hy C8-SE = Hy C8 < Hy C2 < Oasis HLB < Hy Resin SH < Hy Resin GP < Hy C2-SE



Abb. 58: *Erforderliches Volumen an mobiler Phase für die Fraktionierung bei Verwendung verschiedener SPE-Adsorbentien. Hy: Hysphere*

8.3.2 Bestimmung des Durchbruchsvolumens (V_B) der Analyten

Zu einer erfolgreichen, d.h. einer möglichst quantitativen, Fraktionierung bedarf es einer nahezu vollständigen Abreicherung der Probenmatrix und einer nahezu vollständigen Extraktion der Zielanalyte. Es muss somit sichergestellt werden, dass die Analyten während des Fraktionierungsvorganges nicht mit der Probenmatrix in den Abfall gespült werden. Analog zur Bestimmung von V_F wurden für die Bestimmung des Durchbruchsvolumens (V_B) die gleichen SPE-Kartuschen verwendet. Die Eigenschaften der untersuchten SPE-Adsorbentien wurden bereits in Kapitel 8.4.1 näher beschrieben. Der instrumentelle Aufbau zur Bestimmung von V_B ist in Kapitel 7.3 erklärt. Der Eluent zur Bestimmung des Durchbruchsvolumens (V_B) ist $H_2O:ACN$ (95/5, v/v), die Flussrate zur Beförderung der Probe vom Injektionsventil zur SPE-Kartusche beträgt auch in diesem Falle die ersten 1,85 min 270 $\mu L/min$ und wird dann ab 1,86 min auf 2000 $\mu L/min$ gesteigert.

Das Durchbruchsvolumen (V_B) wurde für acht verschiedene SPE-Kartuschen bestimmt, jedoch nicht für alle sieben Analyten (vier Immunsuppressiva und drei Interne Standards). Die Immunsuppressiva unterscheiden sich in ihrer Polarität und somit eluieren sie nicht völlig zeitgleich von der jeweiligen SPE-Kartusche. Tacrolimus stellt

aufgrund seiner molekularen Struktur den hydrophilsten und somit den zuerst eluierenden aller hier untersuchten Analyten dar, Ciclosporin D (CyD) hingegen ist die hydrophobste Substanz. Daher wurde V_B auf allen acht SPE-Kartuschen nur für Tacrolimus bestimmt. Das Absorptionsmaximum, bei dem Tacrolimus detektiert wurde, liegt bei 210 nm. Injiziert wurden 10 μL einer methanolischen Probe mit einer Tacrolimus-Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vorversuche hatten gezeigt, dass Tacrolimus-Konzentrationen $< 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ nur sehr schwache Signale im UV-Detektor zeigen. Dies ist zum Teil mit der starken Verdünnung der injizierten Probe vom Injektionsventil bis zum UV-Detektor begründet (Totvolumen = 753 μL).

Als Vergleichsprobe wurde reines Methanol injiziert, um zu überprüfen, welches Chromatogramm allein durch die Injektion von Methanol erhalten wird. Das Volumen der injizierten Probe betrug 10 μL . Werden die erhaltenen Chromatogramme aus der Injektion von Methanol und Analytlösung übereinandergelegt, so deutet ein Unterschied in den Elutionsprofilen einen Analytdurchbruch von der SPE-Kartusche an. **Abb. 59** zeigt stellvertretend für alle untersuchten SPE-Kartuschen vergleichende Chromatogramme von reinem Methanol (grün) und einer methanolischen Tacrolimus-Standardlösung (pink).

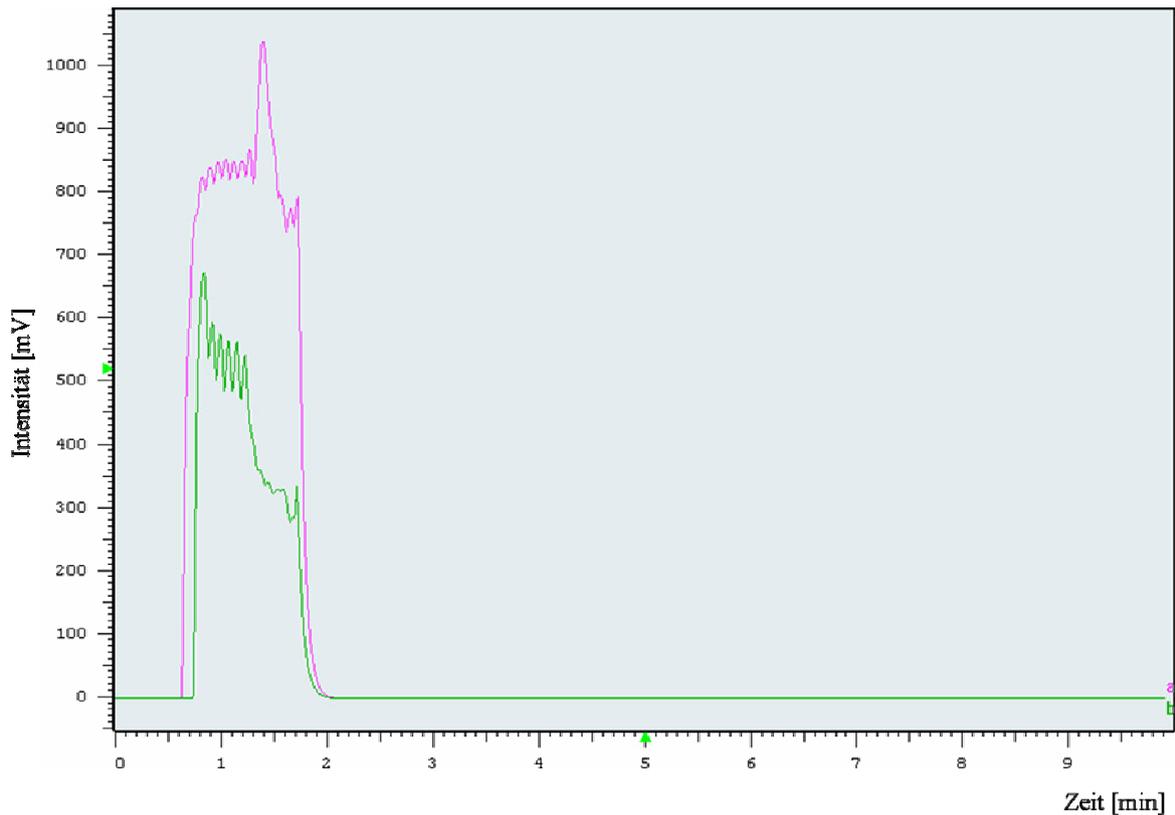


Abb. 59: Durchbruchprofile von MeOH (grün) und Tacrolimus (pink, $c = 100 \mu\text{g/mL}$) von einer Oasis HLB-Kartusche ($10 \times 2 \text{ mm I.D.}$);
 Injektionsvolumen: $10 \mu\text{L}$; Fluss: $270 \mu\text{L/min}$ ($0.00\text{-}1.85 \text{ min}$) und
 $2000 \mu\text{L/min}$ ($1.86\text{-}10.00 \text{ min}$), Detektion: UV bei 210 nm

Dieses Chromatogramm zeigt, dass der Analyt sofort, d.h. mit dem Totvolumen der SPE-Kartusche, eluiert.

Um zu überprüfen, ob sich noch Analyt auf der SPE-Kartusche befindet, wird diese im Anschluss 2-fach mit verschiedenen Lösemitteln gewaschen und das Elutionsprofil während des gesamten Waschganges mit einem UV-Detektor bei 210 nm aufgezeichnet. Die verwendeten Lösemittel haben unterschiedlich starke Elutionseigenschaften. In der ersten Phase wird die SPE-Kartusche mit $1000 \mu\text{L}$ Wasser bei einem Fluss von $2000 \mu\text{L/min}$ gewaschen. Unter diesen Bedingungen werden hydrophile Substanzen von der SPE-Kartusche eluiert. Im zweiten Waschschritt wurden $1000 \mu\text{L H}_2\text{O:MeOH}$

(50/50, v/v) mit einer Geschwindigkeit von 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die SPE-Kartusche gepumpt. Die Elutionskraft dieses Lösemittelgemisches ist etwas stärker, jedoch reicht sie nicht aus, um Tacrolimus von der SPE-Kartusche zu desorbieren. Im Anschluss wurden 2000 μL reines Methanol mit 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die SPE-Kartusche befördert. Wie aus **Abb. 60** ersichtlich ist Methanol in der Lage, das adsorbierte Tacrolimus von der SPE-Kartusche zu eluieren. Der gesamte Waschvorgang wird mit 1000 μL $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (95/5, v/v) (2000 $\mu\text{L}/\text{min}$) abgeschlossen. **Abb. 60** zeigt stellvertretend für alle untersuchten SPE-Kartuschen die übereinander gelegten Elutionsprofile zweier aufeinanderfolgenden Waschvorgänge einer mit Tacrolimus beladenen SPE-Kartusche.

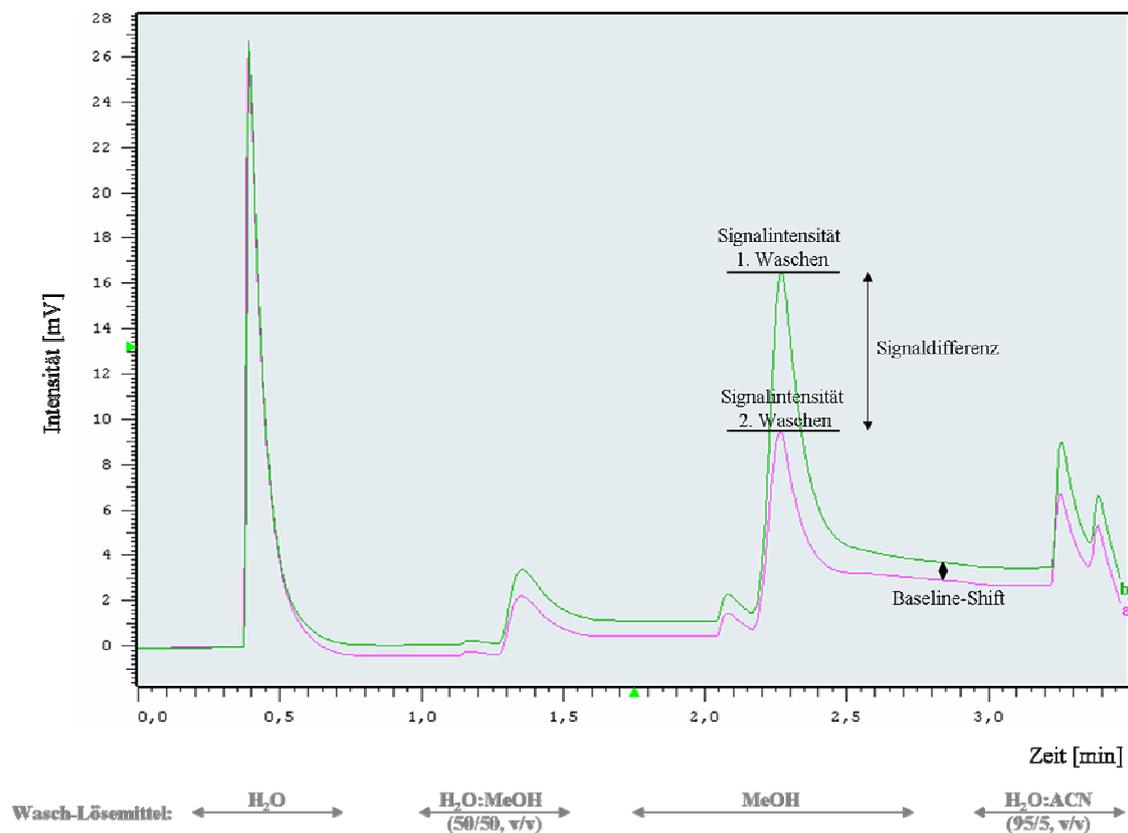


Abb. 60: Elutionsprofile von Tacrolimus während zwei hintereinander durchgeführter Waschgänge (grün = 1. Waschgang, pink = 2. Waschgang) einer Oasis HLB-Kartusche (10 x 2 mm I.D.); Detektion: UV bei 210 nm

Tab. 49 fasst die Ergebnisse für alle untersuchten SPE-Kartuschen zusammen. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine indirekte Bestimmung des Durchbruches der untersuchten Analyten von einer bestimmten SPE-Kartusche.

SPE-Kartusche	Signalintensität 1. Waschen (MeOH) [mV]	Signalintensität 2. Waschen (MeOH) [mV]	Baseline-Shift [mV]	Signaldifferenz [mV]
Hysphere C2	10,0	6,8	1,0	2,2
Hysphere C2-SE	10,0	6,3	0,5	3,2
Hysphere C8	10,0	6,0	-	4,0
Hysphere C8-SE	11,0	6,4	0,4	4,2
Hysphere Resin SH	12,8	7,5	1,0	4,3
Hysphere Resin GP	14,2	8,2	1,1	4,9
C8	12,6	7,1	1,0	4,5
Oasis HLB	16,4	9,4	1,0	4,0

Tab. 49: *Indirekte Ermittlung des Durchbruchverhaltens von Tacrolimus bei Verwendung von SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Packungsmaterialien*

Es ist zuerkennen, dass bei Anwendung von Hysphere C2- und Hysphere C2-SE-Kartuschen, der Unterschied der Signalintensität zwischen den beiden Waschgängen < 4 bzw. 3 mV ist. Bei den anderen getesteten SPE-Kartuschen beträgt der Unterschied in der Signalintensität ≥ 4 mV. Dies lässt vermuten, dass der Analyt (Tacrolimus) bei Verwendung von Hysphere C2- und Hysphere C2-SE-Kartuschen nicht ausreichend stark reteniert wird und bei der Fraktionierung zum Teil mit der Probenmatrix in den

Abfall gespült wird. Die Folge ist ein Verlust an Analyt und somit eine Wiederfindung kleiner 100 %.

Eine Fraktionierung ist nur dann quantitativ, wenn die Probenmatrix während dieses Vorgangs vollständig in den Abfall gespült wird und der zu extrahierende Analyt dabei nicht mit in den Abfall eluiert wird. Die Ergebnisse der hier aufgeführten Untersuchungen schließen daher die Anwendung von Hysphere C2- und Hysphere C2-SE-Kartuschen aus. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung von V_E für diese beiden Kartuschenarten nicht durchgeführt.

8.3.3 Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten

Nach einer erfolgreichen Fraktionierung müssen die retenierten Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule überführt werden, um dort chromatographisch getrennt und anschließend im Detektor erfasst und quantifiziert zu werden. Das benötigte Volumen zur Elution des Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule ist der letzte Schritt in der in diesem Kapitel beschriebenen Vorgehensweise zur Methodenentwicklung. Der instrumentelle Aufbau und die Vorgehensweise zur Ermittlung von V_E wurden bereits in Kapitel 7.4 vorgestellt.

Die untersuchten Immunsuppressiva weisen aufgrund ihrer Molekülstruktur unterschiedliche Polaritäten auf. Somit interagieren sie unterschiedlich stark mit der stationären Phase der SPE-Kartusche. V_E wurde nur für den hydrophilsten Analyten (Tacrolimus) und den hydrophobsten Analyten (Ciclosporin D) bestimmt.

Da sich bei der Bestimmung des Durchbruchvolumens (V_B) herausstellte, dass Tacrolimus auf der Hysphere C2- und Hysphere C2-SE-Kartusche nicht reteniert wird, wurden diese beiden Kartuschentypen bei der hier beschriebenen Versuchsreihe nicht ver-

wendet. In Kapitel 8.4.1 sind die Charakteristika der verwendeten SPE-Kartuschen beschrieben.

10 μL einer methanolischen Lösung der jeweils untersuchten Analyten wurden ins System injiziert. Nach der Fraktionierung dieser Lösung auf der jeweiligen SPE-Kartusche mit 4000 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (95/5, v/v) und einem konstanten Fluss von 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurde die SPE-Kartusche von der linken in die rechte Klemme überführt. Anschließend wurde die Kartusche mit einer mobilen Phase ($\text{MeOH} / 2 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$ (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$) eluiert. Die Elutionskraft dieser mobilen Phase ist hoch genug, um die retenierten Analyten von der SPE-Kartusche zu desorbieren und somit auf eine nachgeschaltete analytische Trennsäule zu transferieren. Zur eindeutigen Interpretation der Peaks wurde neben der Analytlösung auch Methanol (Nullprobe) auf denselben Kartuschentyp injiziert.

8.3.3.1 Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) unter Verwendung eines UV-Detektors

Das Elutionsvolumen (V_E) für Tacrolimus wurde zunächst mit einem UV-Detektor bestimmt. Das Absorptionsmaximum für diesen Analyten liegt bei 210 nm. Injiziert wurden 10 μL einer methanolischen Tacrolimus-Lösung, deren Analytkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betrug. **Abb. 61** zeigt stellvertretend für alle verwendeten SPE-Kartuschenarten ein Elutionschromatogramm, das unter der Verwendung einer Hysphere C8-SE-Kartusche aufgenommen wurde.

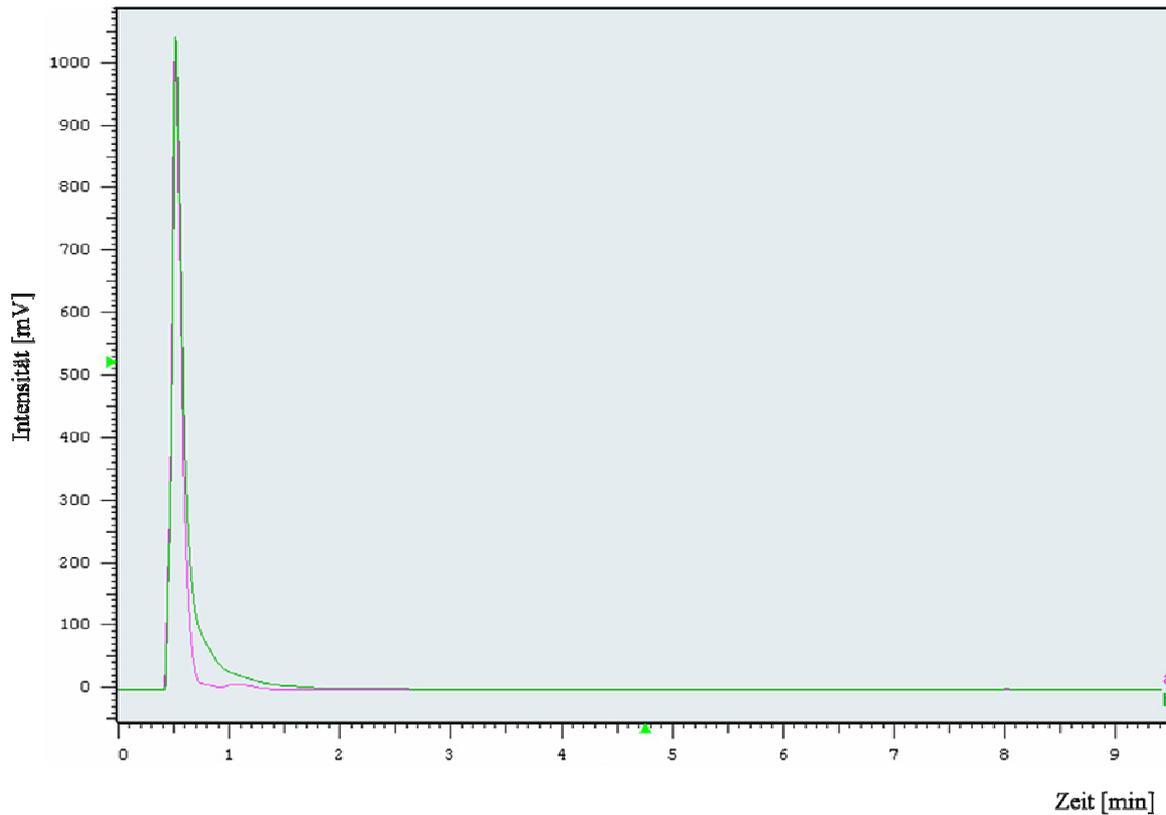


Abb. 61: *Elutionsprofile von MeOH (pink) und Tacrolimus (grün, $c = 100 \mu\text{g/mL}$) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche (10 x 2 mm I.D.);
Injektionsvolumen: 10 μL ; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v);
Fluss: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$; Detektion: UV bei 210 nm*

Die ermittelten Elutionszeiten (t_E) und Elutionsvolumina (V_E) für alle untersuchten SPE-Kartuschen sind in **Tab. 50** dargestellt.

SPE-Kartusche	t_E [min]	V_E [μL]
Hysphere C8	2.3	575
Hysphere C8-SE	2.3	575
Hysphere Resin SH	1.9	475
Hyspere Resin GP	2.3	575
C8	2.3	575
Oasis HLB	2.2	550

Tab. 50: *Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 10 μL einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \mu\text{g}/\text{mL}$) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$; Detektion: UV bei 210 nm*

Wie aus **Tab. 50** ersichtlich wird Tacrolimus von dem Hysphere Resin SH-Füllmaterial im kleinsten Volumen eluiert.

8.3.3.2 Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) unter Verwendung eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS)

Die Elutionsvolumina (V_E) von Tacrolimus und Ciclosporin D wurden auch mit einem Tandemmassenspektrometer als Detektor bestimmt. Der Versuchsaufbau war identisch zu dem zur Bestimmung von V_E mit einem UV-Detektor. Auch in dieser Versuchsreihe wurde Methanol als Nullprobe injiziert. Die Konzentration der methanolischen Tacrolimus-Lösung betrug 100 ng/mL, die der methanolischen Ciclosporin D-Lösung 500 ng/mL. Beide Lösungen wurden mit einem Volumen von 25 μ L injiziert. In **Abb. 62** sind die übereinandergelagerten Elutionschromatogramme für Methanol (grün) und Tacrolimus (rot) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche dargestellt. In **Abb. 63** sind die übereinandergelagerten Elutionschromatogramme für Methanol (grün) und Ciclosporin D (rot) ebenfalls von einer Hysphere C8-SE-Kartusche dargestellt. Die hier gezeigten Chromatogramme stehen stellvertretend für die mit den übrigen untersuchten SPE-Kartuschen generierten Elutionsprofile.

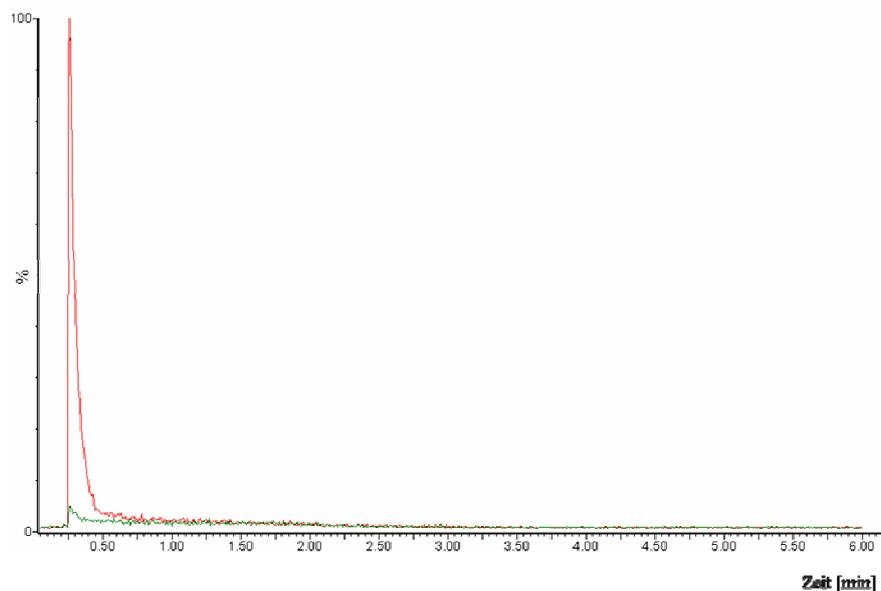


Abb. 62: Elutionsprofile für MeOH (grün) und Tacrolimus (rot, $c = 100 \text{ ng/mL}$) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche; Injektionsvolumen: $25 \text{ }\mu\text{L}$; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: $250 \text{ }\mu\text{L/min}$; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)

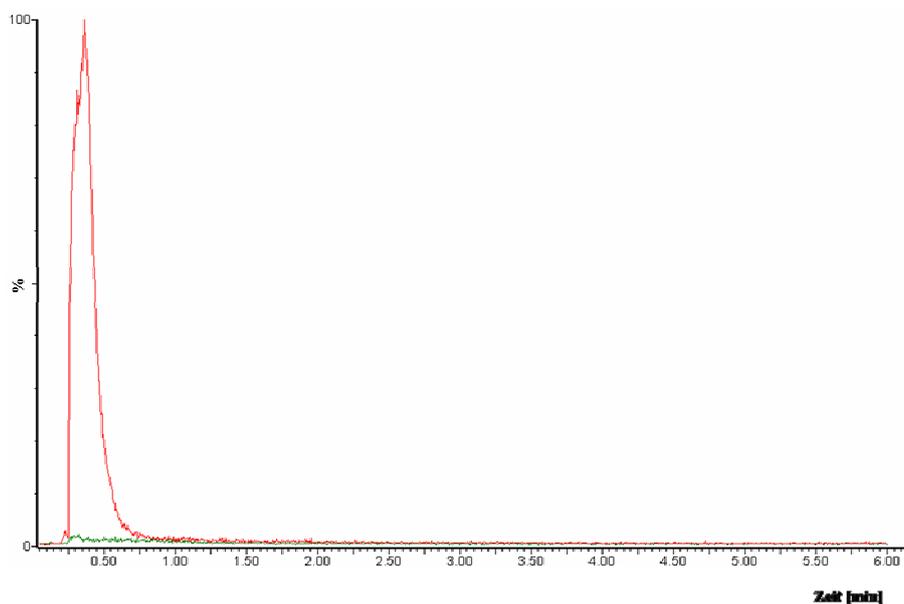


Abb. 63: Elutionsprofile für MeOH (grün) und Ciclosporin D ($c = 500 \text{ ng/mL}$; rot) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche; Injektionsvolumen: $25 \text{ }\mu\text{L}$; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: $250 \text{ }\mu\text{L/min}$; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)

In **Tab. 51** sind die mit dem Tandemmassenspektrometer (MS/MS) ermittelten Elutionszeiten (t_E) und Elutionsvolumina (V_E) für die Analyten Tacrolimus und Ciclosporin D bei Verwendung verschiedener SPE-Packungsmaterialien zusammengefasst.

SPE-Kartusche	Analyt	t_E [min]	V_E [μ L]
Hysphere C8	Tacrolimus	0,65	163
	Ciclosporin D	3,25	813
Hysphere C8-SE	Tacrolimus	0,75	188
	Ciclosporin D	0,90	225
Hysphere Resin SH	Tacrolimus	6,00	1500
	Ciclosporin D	6,00	1500
Hysphere Resin GP	Tacrolimus	3,00	750
	Ciclosporin D	5,50	1375
C8	Tacrolimus	2,50	625
	Ciclosporin D	1,50	375
Oasis HLB	Tacrolimus	1,50	375
	Ciclosporin D	2,00	500

Tab. 51: *Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 25 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100$ ng/mL) bzw. methanolischen Ciclosporin D-Lösung ($c = 500$ ng/mL) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 μ L/min; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)*

Die Zusammenstellung der ermittelten Werte zeigt, dass für die Desorption des hydrophoberen Analyten (Ciclosporin D) ein größeres Elutionsvolumen benötigt wird, als zur Desorption von Tacrolimus. Diese Tendenz wurde auch erwartet, da das hydrophobere Immunsuppressivum stärkere Wechselwirkungen mit den unpolaren Trennmaterien der SPE-Kartuschen eingeht. Die einzige SPE-Kartusche, bei der dies nicht zutrifft, ist die C8. Hier wird Ciclosporin D schneller eluiert als Tacrolimus. Die Detektion mit dem MS/MS zeigt, dass unter den angewandten Bedingungen, beide Analyte nicht vollständig von der Hysphere Resin SH-Kartusche desorbiert werden. Die Desorption von Tacrolimus und Ciclosporin D von der Hysphere Resin GP-Kartusche benötigt ein relativ großes Elutionsvolumen.

In **Tab. 52** sind die Elutionsdauer (t_E) und die Elutionsvolumina (V_E) für Tacrolimus vergleichend für die Detektion mittels UV und Tandem-MS dargestellt.

SPE-Kartusche	UV (210 nm)		MS/MS	
	t_E [min]	V_E [μ L]	t_E [min]	V_E [μ L]
Hysphere C8	2.3	575	0.65	163
Hysphere C8-SE	2.3	575	0.75	188
Hysphere Resin SH	1.9	475	6.00	1500
Hyspere Resin GP	2.3	575	3.00	750
C8	2.3	575	2.50	625
Oasis HLB	2.2	550	1.50	375

Tab. 52: *Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 10 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \mu\text{g/mL}$; UV) bzw. 25 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \text{ ng/mL}$; MS/MS) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: UV (210 nm) und MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)*

Werden die **Abb. 62 und 63** miteinander verglichen, so ist zu erkennen, dass bei der Aufnahme des Elutionsprofils mit einem UV-Detektor, der Elutionspeak später erscheint im Vergleich zur Detektion mit dem Tandemmassenspektrometer. Das ist damit begründet, dass das Totvolumen zwischen der rechten SPE-Klemme und dem UV-Detektor größer ist als das Totvolumen zwischen derselben SPE-Klemme und dem Einlass ins MS/MS. Aus gerätetechnischen Gründen konnte das Totvolumen zwischen der SPE-Kartusche und dem UV-Detektor nicht verringert werden. Daher sind die Elutionsvolumina (V_E), die mit dem MS/MS ermittelt wurden, kleiner.

Abb. 64 zeigt graphisch die Zunahme der benötigten Elutionsvolumina in Abhängigkeit von der verwendeten SPE-Kartusche und dem jeweiligen Detektor.

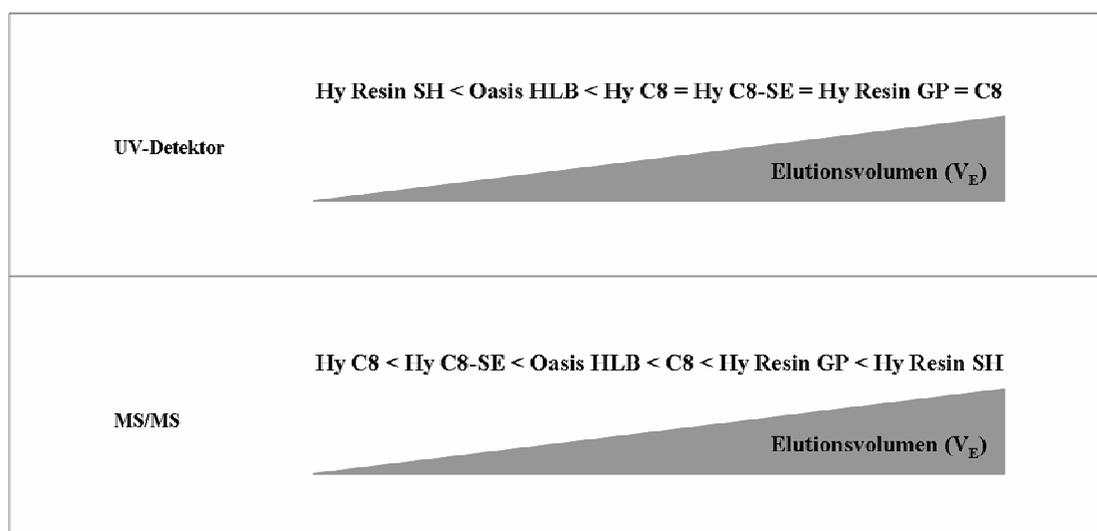


Abb. 64: Vergleich der Elutionsvolumina (V_E) für Tacrolimus bei Verwendung unterschiedlicher SPE-Adsorbentien und Detektoren

8.3.4 Zusammenfassung der ermittelten Parameter

V_F , V_B und V_E

In **Tab. 53** sind die ermittelten Parameter V_F , V_B und V_E nochmals dargestellt. Mit Hilfe dieser tabellarischen Zusammenfassung wurde die Entscheidung getroffen, mit welcher SPE-Kartusche analytische Läufe durchgeführt werden.

SPE-Kartusche	V_F [μ L] VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	Durchbruch von Tacrolimus	V_E [μ L] Ciclosporin D (MS/MS)
Hysphere C2-SE	4400	+	n.b.
Hysphere C2	3100	+	n.b.
Hysphere C8-SE	2400	-	225
Hysphere C8	2400	-	813
Hysphere Resin SH	3700	-	> 1500
Hysphere Resin GP	4200	-	1375
C8	2300	-	375
Oasis HLB	3400	-	500

Tab. 53: Zusammenfassung der ermittelten Werte für die Parameter V_F , V_B und V_E bei Verwendung verschiedener SPE-Adsorbentien

Wie schon in Kapitel 8.3.2 gezeigt, eignen sich die Hysphere C2- und Hysphere C2-SE-Kartuschen nicht zur Analyse von Immunsuppressiva, da die Analyten während des Fraktionierungsschrittes auf diesen SPE-Materialien durchbrechen. Die Hysphere

Resin SH- und Hysphere Resin GP-Kartuschen sind für die Analyse von Immunsuppressiva auch nicht geeignet, da Ciclosporin D ein sehr großes Elutionsvolumen benötigt, um von diesen beiden SPE-Kartuschen desorbiert zu werden.

Die Hysphere C8-, Hysphere C8-SE- und C8-Kartuschen benötigen jeweils ein kleines Fraktionierungsvolumen, um die Probenmatrix von der SPE-Kartusche in den Abfall zu spülen. Vergleicht man die benötigten Volumina, um Ciclosporin D von diesen drei Adsorbentien zu desorbieren, so ist dieses für das Hysphere C8-SE-Material am geringsten.

Zusammenfassend gilt, dass die Hysphere C8-SE-Kartusche am geeignetsten scheint, um Immunsuppressiva aus zell-desintegriertem Blut (CDB) quantitativ zu bestimmen.

8.4 Bestimmung der zu programmierenden Volumina

Wie in Kapitel 7.5 erläutert, lassen sich die einzelnen Analyseschritte im Symbiosis™ Pharma System in der dazugehörigen Software nicht über die Zeit, sondern ausschließlich über das Volumen steuern. Aus diesem Grund müssen die ermittelten zeitlichen Kenngrößen t_A , t_M und t_T in die volumetrischen Parameter V_F , V_B und V_E umgerechnet werden.

In den im Anschluss an die Methodenentwicklung durchgeführten Versuchen wurde mit zwei verschiedenen SPE-Adsorbentien gearbeitet. Um nicht für jede Kartuschenart eine separate Methode mit individuell programmierten Volumina zu schreiben, wird bei der Festlegung der benötigten Volumina von den maximalen Werten für t_M , t_A und t_T bezüglich der beiden Adsorbentien ausgegangen. **Tab. 54** fasst diese nochmals zusammen.

SPE-Kartusche	t_M [min] VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)	t_A [min] Tacrolimus	t_T [min] Ciclosporin D
Hysphere C8-SE	2,80	> 10	0,90
Oasis HLB	3,30	> 10	2,00

Tab. 54: Zusammenfassung der ermittelten Werte für t_M , t_A und t_T für zwei verschiedene SPE-Adsorbentien

Der maximale Wert für den Parameter t_M innerhalb der zwei untersuchten Adsorbentien wurde mit der Oasis HLB ermittelt und beträgt 3,30 Minuten. Beide SPE-Kartuschen lassen einen Durchbruch von Tacrolimus während des Fraktionierungsschrittes nicht zu. Somit ist t_A größer als t_M . Die Desorption von Ciclosporin D von der Oasis HLB-Kartusche ist nach 2 Minuten abgeschlossen und dauert somit ungefähr doppelt so lange wie bei der Verwendung der Hysphere C8-SE-Kartusche. Mittels dieser drei Zeiten werden nun die zu programmierenden Volumina ($V_{X(P)}$) bestimmt.

$V_{F(P)}$:

Der Endpunkt des Fraktionierungsschrittes und somit das Umsetzen der SPE-Kartusche von der linken in die rechte Kartuschenklemme wird mit dem Volumen $V_{F(P)}$ definiert. Zusätzlich markiert es den Zeitpunkt für das Schalten des für die rechte Klemme verantwortlichen Ventils. Die von der Gradientenpumpe geförderte mobile Phase wird durch das Schalten dieses Ventils über die eingesetzte SPE-Kartusche gelenkt. Somit können die retenierten Analyten eluiert werden.

Berechnet wird das zu programmierende Fraktionierungsvolumen wie folgt:

$$V_{F(P)} [\mu\text{L}] = t_M [\text{min}] \times \text{Flussrate} [\mu\text{L}/\text{min}] + X [\mu\text{L}]$$

Nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Flussraten während der Fraktionierung (0,00-1,85 min: 270 $\mu\text{L}/\text{min}$; 1,86-4,00 min: 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$) und einem Sicherheitszuschlag von 25 % des errechneten V_F , erhält man folgendes zu programmierendes Fraktionierungsvolumen:

$$V_{F(P)} [\mu\text{L}] = 3400 \mu\text{L} + 1110 \mu\text{L} = 4590 \mu\text{L}$$

Für eine quantitative Fraktionierung ist entscheidend, dass das für die Fraktionierung benötigte Volumen geringer ist als das Durchbruchsvolumen (V_B). Dies trifft zu, denn es gilt:

$$V_{F(P)} < V_B; \text{ i.e. } 4590 \mu\text{L} < 16800 \mu\text{L}$$

$V_{E(P)}$:

Der Endpunkt des Elutionsschrittes der Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule und somit der Zeitpunkt des Umsetzens der SPE-Kartusche von der rechten Klemme zurück ins Vorratstablett wird über das zu programmierende Volumen $V_{E(P)}$ definiert. Bevor die SPE-Kartusche wieder ins Vorratstablett zurückgesetzt wird, kommt es zur Schaltung des für die rechte Klemme verantwortlichen Ventils. Somit wird die mobile Phase nicht mehr über die SPE-Kartusche geleitet, sondern direkt auf die analytische Trennsäule.

Das Zurücksetzen der SPE-Kartusche von der rechten Klemme zurück ins Vorratstablett wird von der Software erst erlaubt, nachdem der analytische Lauf und somit die Aufzeichnung des Chromatogramms beendet sind. Dies bedeutet, dass die mobile Phase während des gesamten analytischen Laufes über die SPE-Kartusche geleitet wird. Somit ist das programmierte Elutionsvolumen ($V_{E(P)}$) viel größer als das tatsächlich benötigte Elutionsvolumen (V_E).

Um sicher zu gehen, dass die Immunsuppressiva vollständig von der analytischen Trennsäule eluieren, wird die Dauer des analytischen Laufes auf 6 Minuten gesetzt. Dies bedeutet, dass bei einem Fluss von 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ das zu programmierende Volumen ($V_{E(P)}$) 1500 μL beträgt.

Der Zuschlag X wird wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} V_{E(P)} [\mu\text{L}] &= t_T [\text{min}] \times \text{Flussrate} [\mu\text{L}/\text{min}] + X \\ \Leftrightarrow X [\mu\text{L}] &= V_{E(P)} [\mu\text{L}] - t_T [\text{min}] \times \text{Flussrate} [\mu\text{L}/\text{min}] \\ &= 1500 \mu\text{L} - 2,00 \text{ min} \times 250 \mu\text{L}/\text{min} \\ &= 1000 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Die Differenz zwischen $V_{E(P)}$ und X entspricht dem tatsächlich benötigten V_E . In diesem Fall ist das zu programmierende Volumen ($V_{E(P)}$) 3-mal so hoch wie das ermittelte Elutionsvolumen (V_E).

Zusammenfassung:

In **Tab. 55** sind die errechneten und zu programmierenden Volumina für die Anwendung von zwei verschiedenen SPE-Kartuschen (Hysphere C8-SE und Oasis HLB) in einer Methode zusammengefasst.

Parameter	Volumen [μL]
$V_{F(P)}$	4590
$V_{E(P)}$	500

Tab. 55: Berechnete Volumina für $V_{F(P)}$ und $V_{E(P)}$ bei Verwendung von zwei verschiedenen SPE-Adsorbentien

Fraktioniert wird die Probe mit einem Lösemittelgemisch aus $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (95/5, v/v). Die retenierten Analyten werden im Anschluss mit einem Eluenten, der sich aus 90 vol. % MeOH und 10 vol. % 2 mM NH_4Ac zusammensetzt, von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule transferiert, separiert und mit Hilfe eines Tandemmassenspektrometers detektiert.

8.5 Zusammenstellung des Analysezyklus

Nach der experimentellen und rechnerischen Bestimmung der einzelnen Verfahrensgrößen für die angestrebte SPE-LC-Methode wird in diesem Kapitel der vollständige Analysezyklus für die in-line Prozessierung von Vollblut und anschließender Analyse der Immunsuppressiva als Modellanalyten zusammengestellt. Der Analysezyklus setzt sich aus fünf Teilschritten zusammen: (I) Konditionierung der SPE-Kartusche, (II) In-line Prozessierung der Vollblutprobe, (III) Fraktionierung der neuartigen biologischen Matrix, d.h., des zell-desintegrierten Blutes (engl.: cell-desintegrated blood; CDB), (IV) Transfer der Analyte von der SPE-Kartusche auf die analytische Trennsäule und (V) analytische Trennung.

Aufgrund der Gerätekonfiguration des Symbiosis™ Pharma Systems können, wie in Kapitel 7.6 bildlich dargestellt, die Teilschritte (I)-(III) parallel zu den Teilschritten (IV)-(V) durchgeführt werden, somit kann eine Verkürzung der Gesamtanalysezeit ab der Analyse des zweiten Laufes erreicht werden. In **Tab. 56** sind die parallel ablaufenden Arbeitsschritte dargestellt.

	1. Lauf		2. Lauf	
Teilschritte	(IV)-(V)		(I)-(III)	
Vorgang	Transfer analytische Trennung		Konditionierung der Kartusche in-line Prozessierung Fraktionierung	
Klemme	rechts		links	
Pumpe	HPLC-Pumpen		Hochdruckkolbenpumpe 1	
Eluent	Transfer	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	Konditionierung	1000 µL H ₂ O, 1000 µL H ₂ O:MeOH (50/50, v/v), 2000 µL MeOH, 1000 µL H ₂ O:ACN (95/5, v/v)
	analytische Trennung	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	in-line Prozessierung	H ₂ O (95/5, v/v)
			Fraktionierung	H ₂ O (95/5, v/v)
Flussrate [µL/min]	Transfer	250	Konditionierung	2000
	analytische Trennung	250	in-line Prozessierung	270
			Fraktionierung	2000
Volumina [µL]	V _{E(P)}	1500	in-line Prozessierung	590
			V _{F(P)}	4000
Dauer [min]		6		6,7

Tab. 56: *Tabellarische Darstellung der parallel ablaufenden Schritte während einer in-line Prozessierung und on-line SPE-LC-Analyse von Vollblut*

Für die on-line SPE-LC Analyse der Immunsuppressiva aus CDB wurden folgende SPE-Kartuschen und analytische Trennsäulen verwendet:

SPE-Kartuschen: Hysphere C8-SE, 10 x 2 mm I.D., dp 8 µm

Oasis HLB, 10 x 2 mm I.D., dp 30 µm

Analytische Trennsäulen: LiChrospher® 100 RP 18-EC, 125 x 2 mm I.D., dp 5 µm

Luna® Phenyl-Hexyl, 50 x 2 mm I.D., dp 5 µm

Abb. 65 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm der Bestimmung von Immunsuppressiva (methanolische Standardlösung). Die parallelen Analyseschritte sind farblich in diesem Chromatogramm markiert. Die in purpuren Farbtönen dargestellten Teilschritte I-III finden in der linken Klemme des Symbiosis™ Pharma Systems statt. Die Teilschritte IV+V sind grün markiert und laufen parallel in der rechten Klemme des Systems ab.

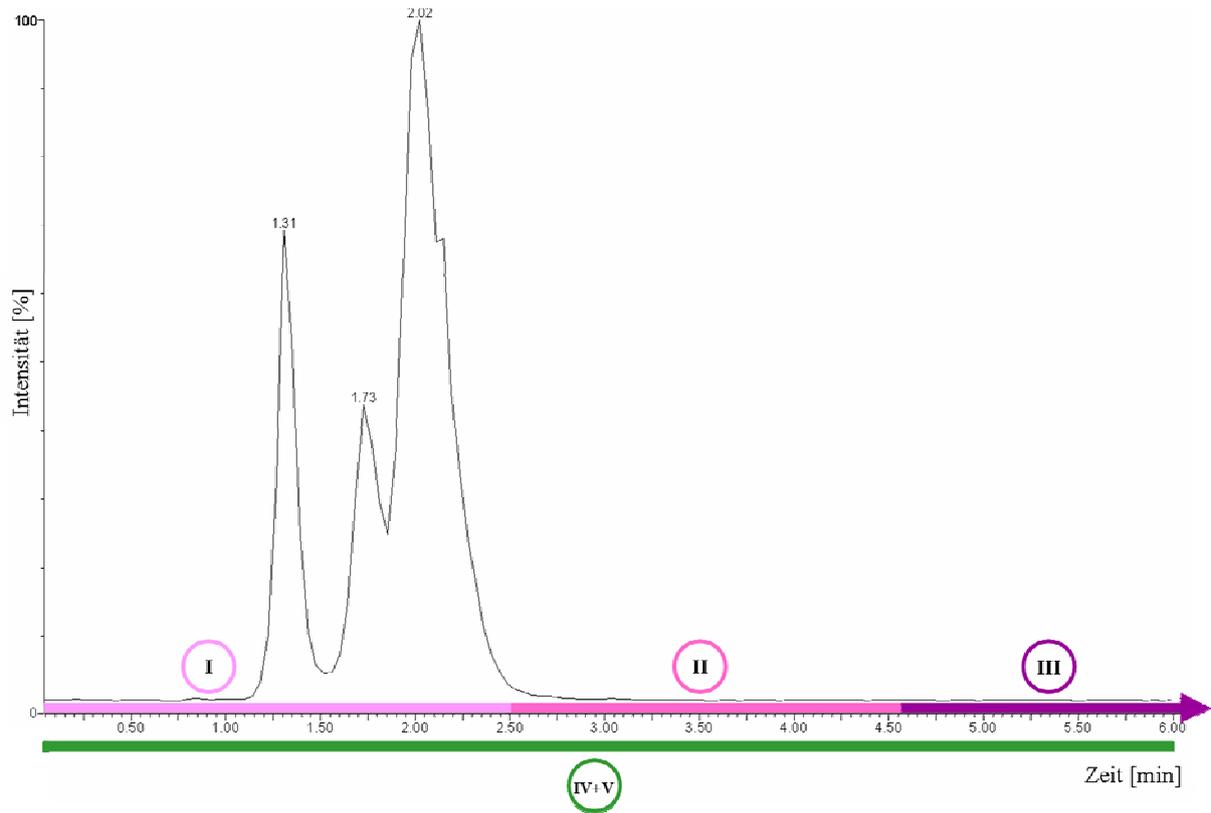


Abb. 65: Repräsentatives Chromatogramm einer Standardlösung aller untersuchten Immunsuppressiva; Injektionsvolumen: 10 μ L; Konzentration je Analyt: 10 ng/mL; Analytische Trennsäule: LiChrospher[®] 100 RP 18-EC, 125 x 2 mm I.D., dp 5 μ m; SPE: Oasis HLB, 10 x 2 mm I.D., dp 30 μ m, Detektion: MS/MS. Farbliche Darstellung der Teilschritte des Analysezyklus

Aufgrund der parallel ablaufenden Teilschritte ist es möglich, die Zeit des gesamten Analysezyklus von knapp 13 Minuten auf etwas unter 7 Minuten zu verkürzen.

8.6 Thermostabilität der untersuchten Immunsuppressiva

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine neuartige Bestimmungsmethode, die es erlaubt, Immunsuppressiva in nativen Vollblutproben mittels Hitzeschockbehandlung und anschließender on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse direkt zu analysieren.

Daher galt es zu zeigen, dass die untersuchten Immunsuppressiva nicht thermolabil sind und somit bei Prozessierungstemperaturen bis 80°C intakt bleiben.

Aus diesem Grund wurde folgende Untersuchung durchgeführt: Patientenproben, die entweder das Immunsuppressivum Sirolimus, Ciclosporin A oder Tacrolimus enthielten, wurden jeweils auf zwei unterschiedliche Weisen aufbereitet. Einerseits wurde ein Aliquot dieser Proben 1:1 mit Fällungsreagenz (Zusammensetzung siehe **Tab. 57**) versetzt, gemischt und anschließend für 10 Minuten bei 16100 G zentrifugiert. Im Anschluss wurden 50 µL des Überstands im Tandemmassenspektrometer analysiert. Andererseits stellte die Hitzeschockbehandlung dieser Proben mit nachfolgender Proteinpräzipitation die zweite Probenaufbereitungsmethode dar. Die Vollblutproben wurden off-line, d.h. in Glaskapillaren, für 11 Sekunden bei 80°C prozessiert. Der Hämatokrit der untersuchten Proben lag zwischen 0,3 und 0,35. Im Anschluss wurde das gewonnene zell-desintegrierte Blut (CDB) mit dem gleichen Fällungsreagenz, das schon zur Fällung der nativen Vollblutprobe herangezogen wurde, präzipitiert und nach dem Zentrifugieren 50 µL des Überstands im Tandemmassenspektrometer analysiert. Die Fraktionierung der Proben fand mit H₂O/ACN (95/5, v/v) auf Oasis HLB-Material statt. Zur analytischen Trennung wurde eine LiChrospher[®] 100 RP 18-EC-Säule (125 x 2 mm I.D., dp 5 µm) verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus MeOH und 2 mM NH₄Ac (90/10, v/v) zusammen. Detektiert wurden die Analyten mit einem Tandemmassenspektrometer.

Interne Standardlösung	Inhaltsstoffe	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Volumen [μL]
	Methanol		500
	Wasser		500
	Ascomycin in MeOH	100	20
	Ciclosporin D in MeOH	100	30
	Desmethoxysirolimus in MeOH	40	40

5 %ige ZnSO_4 -Lösung	Inhaltsstoffe	Menge [g]	Volumen [mL]
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8.9	
	Wasser		100

Fällungsreagenz	Inhaltsstoffe	Volumen [mL]
	Methanol	12
	5 %ige ZnSO_4 -Lösung	3
	Interne Standardlösung	0.375

Tab. 57: Rezeptur zur Herstellung des Reagenzes zur Fällung von Vollblutproben¹⁸⁴

Die in **Tab. 58** zusammengestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass die untersuchten Immunsuppressiva für 11 Sekunden bei einer Temperatur von bis zu 80°C thermostabil sind.

Analyt	Konz. [ng/mL] der gefällten VB-Probe	Konz. [ng/mL] der gefällten CDB-Probe
Sirolimus	5,14	5,41
Ciclosporin A	1270	1144
Tacrolimus	24,31	25,33

Tab. 58: *Thermostabilität der untersuchten Immunsuppressiva; Prozessierung: Temperatur: 80°C, Heizdauer: 11 Sekunden*

9 Evaluation der in-line Prozessierung von Vollblutproben gekoppelt an ein on-line SPE-LC-MS/MS-System

Die in-line Prozessierung von nativen, antikoagulierten Vollblutproben und anschließende on-line Fraktionierung der neuen biologischen Matrix CDB wurde für die LC-MS/MS-adäquate und vollautomatische Bestimmung von zellulär lokalisierten Analyten entwickelt. Als Modellanalyten wurden die Immunsuppressiva ausgewählt, die fast ausschließlich an Erythrozyten gebunden sind.

Dieses Kapitel beschreibt, wie die Qualität der in dieser Arbeit entwickelten Probenaufbereitungsart und anschließenden on-line Fraktionierung evaluiert wurden. Abschließend wurde die Anwendbarkeit dieses Verfahrens anhand von Patientenproben überprüft und mit dem in der Routineanalytik verwendeten Verfahren verglichen.

9.1 Reproduzierbarkeit der Analyse von nativen Vollblutproben im Totalen Analysesystem (TAS)

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Analyse von Vollblutproben mit dem in dieser Arbeit entwickelten vollautomatisierten Totalen Analysesystem (TAS), wurde zunächst EDTA-Vollblut mit Ciclosporin D dotiert. Der Analyt wurde hierzu in DMSO gelöst. Der Gesamtvolumenanteil an DMSO in der Vollblutprobe betrug 2,5 %. Die

Konzentration von Ciclosporin D lag bei 500 ng/mL. Die native Vollblutprobe hatte einen Hämatokrit von 0,46.

Ein Teil der mit Ciclosporin D dotierten Vollblutprobe wurde 1:1 mit einer Methanol/ZnSO₄-Lösung versetzt (siehe Kapitel 8.6). Nach dem ca. 1-minütigen Mischen wurde die Probe bei 16100 G für 10 Minuten zentrifugiert. 50 µL des klaren, farblosen Überstands wurden mittels on-line-SPE-LC-MS/MS analysiert. Ein Aliquot der dotierten Vollblutprobe (25 µL) wurde in-line bei 75°C zu zell-desintegriertem Blut (CDB) prozessiert.

Die Fraktionierung der jeweiligen Probe erfolgte auf Oasis HLB- und Hysphere C8-SE-Kartuschen. Ein Gemisch aus H₂O:ACN (95/5, v/v) diente als mobile Phase. Das Waschvolumen während der Fraktionierung betrug 8590 µL. Als analytische Trennsäule diente eine LiChrospher[®] 100 RP 18-EC-Säule (125 x 2 mm I.D., dp 5 µm), die mit einer mobilen Phase bestehend aus MeOH/2 mM NH₄Ac (90/10, v/v) konditioniert wurde. Beide Ansätze wurden jeweils 5 Mal injiziert.

Stellvertretend für diese Versuchsreihe sind in **Abb. 66** fünf übereinandergelegte Chromatogramme zu sehen, die Ciclosporin D aus CDB-Proben nach Fraktionierung auf einer Hysphere C8-SE-Kartusche darstellen. Bis auf einen Ausreißer (braune Spur) ist die Analyse von Ciclosporin D aus CDB relativ reproduzierbar.

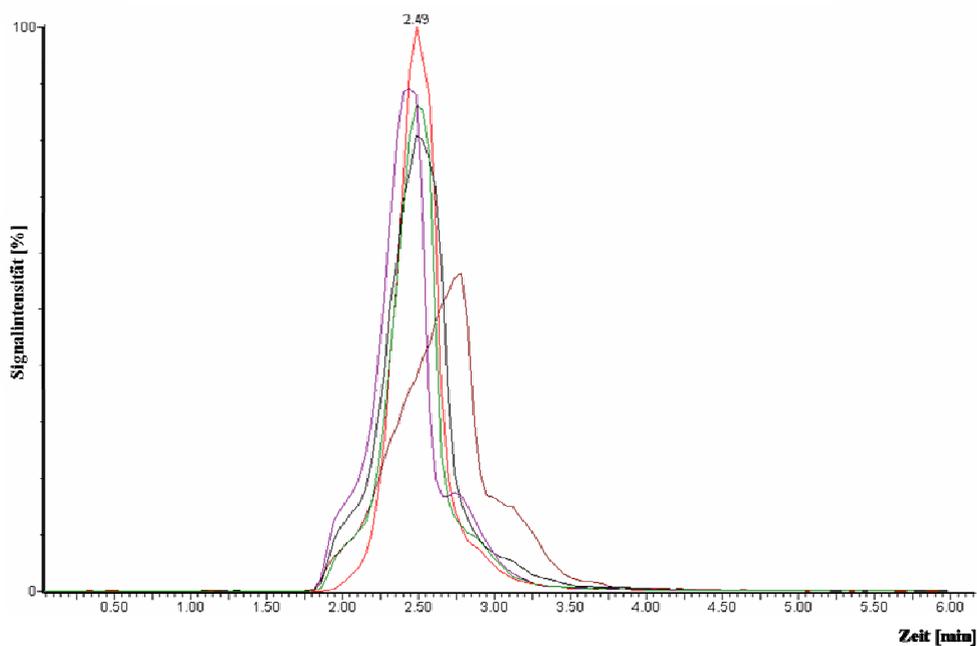


Abb. 66: *Chromatogramme von Cyclosporin D aus CDB nach Analyse im TAS. Injektionsvolumen: 25 μ L; $c(\text{Cyclosporin D}) = 500 \text{ ng/mL}$; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$; Detektor: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)*

Tab. 59 fasst die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammen. Dabei sind die in-line prozessierten Vollblutproben mit CDB und die gefällten Vollblutproben mit PP abgekürzt. Die in Klammern gesetzten Signalintensitäten stellen Ausreißer dar und wurden nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen.

SPE-Kartusche	Probe	Signalintensität	Mittelwert (MW)	SD	RSD [%]
Hysphere C8-SE	PP	1880000 (2850000) 1420000 1130000 1750000	1683333	237136	14,09
	CDB	1770000 (1000000) 1430000 1580000 1530000	1577500	142683	9,04
Oasis HLB	PP	1930000 1760000 1430000 1710000 1610000	1688000	184986	10,96
	CDB	(895000) 1540000 1350000 1380000 1280000	1387500	109962	7,93

Tab. 59: Reproduzierbarkeit der Signalintensität von Cyclosporin D aus CDB- und PP-Proben nach Analyse im TAS; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)

Die Signalintensität der gefällten Vollblutproben ist etwas höher als die der CDB-Proben, obwohl die Menge an Analyt in beiden Probenarten gleich hoch war. Das gilt für beide Kartuschenarten. Der Unterschied in der Signalintensität lässt sich mit den unterschiedlich stark ausgeprägten Matrixeffekten der beiden untersuchten Matrices erklären (siehe Kapitel 9.1.2.4).

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Matrixeffekte nach Fraktionierung der Proben auf Oasis HLB-Kartuschen schwächer ausgeprägt sind. Jedoch sind die Analytsignale in dieser Versuchsreihe nach Fraktionierung der Proben auf Oasis HLB-Kartuschen schwächer im Vergleich zur Verwendung von Hysphere C8-SE-Kartuschen.

Die relative Standardabweichung (engl.: relative standard deviation; RSD) der analysierten CDB-Proben beträgt je nach Kartuschenart 8-9 %. Sie liegt jedoch zwischen 11-14 %, wenn der Analyt aus dem Überstand einer gefällten Vollblutprobe analysiert wird. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass trotz stärker ausgeprägter Matrixeffekte, die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB-Proben reproduzierbarer ist als die Analyse dieser Analyten aus dem entsprechenden Überstand gefällter Vollblutproben.

9.2 Überprüfung der Anwendbarkeit des vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS) zur Analyse von Patientenproben

Im letzten Teil der Evaluation des in dieser Arbeit entwickelten vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS) wurde die Anwendbarkeit dieser Plattform zur Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut immunsupprimierter Patienten überprüft.

Die Patientenproben wurden von dem hiesigen Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München in Grosshadern zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 8 Vollblutproben untersucht.

In dem hier durchgeführten Methodenvergleich, wurden die Patientenproben einerseits nach der am hiesigen Institut etablierten Methode (Proteinpräzipitation, Methode A) und andererseits mit der in dieser Arbeit beschriebenen Hitzeschockbehandlung (Methode B) für die on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse vorbereitet. In **Tab. 60** ist dieser Methodenvergleich nochmals zusammengefasst dargestellt.

Analyseschritte	Methode A	Methode B
Probenaufbereitung	Proteinpräzipitation	Hitzeschockbehandlung
Festphasenextraktion	Modus: on-line	
	Kartuschen: ▪ Hysphere C8-SE ▪ Oasis HLB	
	Eluent: H ₂ O:ACN (95/5, v/v)	
	V _{F(P)} : 8590 µL	
Chromatographische Trennung	Säule: LiChrospher® 100 RP 18-EC	
	Eluent: MeOH/ 2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	
	Flussrate: 250 µL/min	
Detektion	MS/MS	

Tab. 60: *Vergleich verschiedener Aufbereitungsverfahren zur Analyse von Immunsuppressiva aus Patientenproben*

Die Zusammenfassung zeigt, dass sich die beiden Methoden A und B einzig in der Probenaufbereitung unterscheiden. Die Fällung von Vollblut mit MeOH/ZnSO₄-Lösung (Methode A) ergibt nach Zentrifugation einen klaren, farblosen Überstand, der aus einem sehr hohen Anteil an organischem Lösemittel besteht. Wird natives Vollblut Hitzeschock-behandelt (Methode B), so wird eine neue biologische homogene Matrix generiert, das zell-desintegrierte Blut (CDB). Die Fällung der Vollblutprobe wurde offline (manuell) durchgeführt. CDB wurde in-line, d.h. mit der im TAS integrierten beheizten Edelstahlkapillare, gewonnen. Bevor die Vollblutproben auf zwei unterschiedliche Arten aufbereitet wurden, sind sie mit 2,5 vol. % DMSO versetzt worden. Mit dieser Versuchsreihe soll gezeigt werden, dass neben Ciclosporin D auch die anderen

Immunsuppressiva quantitativ aus CDB analysiert werden können. Die Fraktionierung der Proben fand zum einen auf Oasis HLB- und zum anderen auf Hysphere C8-SE-Kartuschen statt. In **Tab. 61** sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe aufgezeigt.

Patient	Analyt	Konzentration [ng/mL]	SPE-Kartusche	Probenart	Signalintensität	Vergleich der Signalintensität PP vs. CDB
1	Sirolimus	18,4	Hysphere C8-SE	PP	40700	CDB > PP
				CDB	52800	
			Oasis HLB	PP	32000	CDB > PP
				CDB	54400	
2	Sirolimus	10,8	Hysphere C8-SE	PP	18200	PP > CDB
				CDB	11500	
			Oasis HLB	PP	10100	CDB > PP
				CDB	13700	
3	Everolimus	7,6	Hysphere C8-SE	PP	20700	PP > CDB
				CDB	12700	
			Oasis HLB	PP	17300	PP > CDB
				CDB	15400	
	Ciclosporin A	64,0	Hysphere C8-SE	PP	397000	PP > CDB
				CDB	183000	
			Oasis HLB	PP	348000	PP > CDB
				CDB	286000	
4	Everolimus	5,4	Hysphere C8-SE	PP	6790	CDB > PP
				CDB	7330	
			Oasis HLB	PP	5950	CDB > PP
				CDB	7630	
	Ciclosporin A	49,0	Hysphere C8-SE	PP	86300	CDB > PP
				CDB	158000	
			Oasis HLB	PP	181000	PP > CDB
				CDB	175000	
5	Ciclosporin A	181,0	Hysphere C8-SE	PP	820000	PP > CDB
				CDB	394000	
			Oasis HLB	PP	736000	PP > CDB
				CDB	611000	
6	Ciclosporin A	123,0	Hysphere C8-SE	PP	200000	CDB > PP
				CDB	737000	
			Oasis HLB	PP	417000	PP > CDB
				CDB	397000	
7	Tacrolimus	14,3	Hysphere C8-SE	PP	66700	PP > CDB
				CDB	47600	
			Oasis HLB	PP	59300	PP > CDB
				CDB	52700	
8	Tacrolimus	12,0	Hysphere C8-SE	PP	33200	CDB > PP
				CDB	48900	
			Oasis HLB	PP	39400	PP > CDB
				CDB	13000	

Tab. 61: *Ergebnisse des Methodenvergleichs: Analyse von Sirolimus, Everolimus, Ciclosporin A und Tacrolimus aus dem Überstand einer gefällten Vollblutprobe (Methode A) und CDB (Methode B) mit dem TAS*

Die Interpretation der Versuchsergebnisse gestaltet sich schwierig, da eine eindeutige Tendenz nicht zu sehen ist. Vergleicht man die Signalintensität der jeweiligen Analyten in Abhängigkeit von der injizierten Probenmatrix, lässt sich aus den Versuchsergebnissen folgern, dass für die Analyse von Sirolimus CDB die geeignetere Matrix ist. Ciclosporin A und Tacrolimus hingegen zeigen intensivere Analytsignale, wenn sie aus dem Überstand der gefällten Vollblutprobe analysiert werden. Eine Aussage für Everolimus ist schwer zu treffen. Die Signalintensität aus der Patientenprobe 3 ist höher, wenn Everolimus aus dem Überstand einer gefällten Probe analysiert wird, bei der Analyse von Everolimus aus der Patientenprobe 4 ist das Analytsignal am höchsten, wenn die Probenmatrix CDB ist.

Zu erwarten wäre, dass das Analytsignal annähernd die gleiche Intensität hat, unabhängig davon, ob es aus der Probenmatrix CDB oder dem klaren Überstand einer gefällten Vollblutprobe resultiert. Betrachtet man die Ergebnisse der Patientenprobe 6 genauer, so fällt auf, dass das Analytsignal für Ciclosporin A nach Fraktionierung auf einer Oasis HLB-Kartusche die gleiche Intensität aufweist, unabhängig davon, ob CDB oder der Überstand einer gefällten Probe untersucht wurden. Werden dieselben Ansätze auf einer Hysphere C8-SE-Kartusche fraktioniert, so ist das Analytsignal aus der CDB-Probe im Vergleich zum Signal aus dem Überstand des Präzipitats ca. 3-mal so hoch.

Diese Versuchsreihe zeigt, dass eine Analyse von Immunsuppressiva aus CDB prinzipiell möglich ist. Eine optimale, d.h. quantitative Messung, ist jedoch nur dann möglich, wenn Matrixeffekte komplett eliminiert werden können. Die Zugabe eines Internen Standards zur Probe stellt eine weitere Möglichkeit dar, eine Messung relativ unabhängig von Matrixeffekten durchzuführen. Es gilt jedoch zu beachten, dass Interne Standards nicht absolut identisch wie die dazugehörigen Analyten von Matrixeffekten erfasst werden. Die Problematik des Internen Standards wurde bereits in Kapitel 6.2.1.2 eingehend beschrieben.

10 Allgemeine Anwendbarkeit der in-line Prozessierung und on-line SPE-LC- MS/MS-Analyse von Vollblutproben

Die Entwicklung eines neuartigen Verfahrens zur Aufbereitung von Vollblutproben hat gezeigt, dass es möglich ist, in Blutzellen lokalisierte Wirkstoffe, wie beispielsweise die Immunsuppressiva, mittels Hitzeschockbehandlung (engl.: heat shock treatment; HST) aus den Blutzellen freizusetzen und somit zugänglich für eine anschließende SPE-LC-MS/MS-Analyse zu machen. Die Bedingungen für eine effiziente Probenaufbereitung mittels Hitzeschockbehandlung wurden für den off-line Modus (manuelle Aufbereitung in Glaskapillaren) und in-line Modus (in-line Prozessierung) evaluiert. Dieses Kapitel soll zeigen, dass nicht nur Vollblut zur Analyse erythrozytär gebundener Wirkstoffe auf diese Weise aufbereitet werden kann, sondern auch Wirkstoffe, die im Plasmakompartiment vorliegen, mit dieser Aufbereitungsart analysiert werden können. Als Modellanalyten dienten hier das Antimykotikum Itraconazol und sein aktiver Metabolit 1-OH-Itraconazol.

10.1 Pharmakologische Beschreibung der Azol-Antimykotika

Itraconazol und sein aktiver Metabolit 1-OH-Itraconazol gehören zu den Azol-Antimykotika. Sie wirken durch Hemmung der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen, fungistatisch. Der Angriff erfolgt an der Lanosteroldemethylase, was zu einer Einlagerung falscher Sterole in die Memb-

ran führt. Dies beeinflusst die Membranfunktion und die Funktion membranständiger Enzyme erheblich¹⁸⁶. Die Wirkung der Azol-Antimykotika tritt nicht sofort ein. Aus diesem Grund eignen sie sich nicht für akut lebensgefährliche Pilzinfektionen.

Die Therapie mit Itraconazol startet in der Regel mit einer intravenösen Applikation und geht dann in eine orale über¹⁸⁷. Itraconazol wirkt im Vergleich zu anderen Azol-Antimykotika, z.B. Fluconazol oder Voriconazol, schwächer gegen Hefen, jedoch zeigt es einen antimykotischen Effekt bei Aspergillus- und Histoplasmaarten.

Oral appliziertes Itraconazol verzeichnet eine Bioverfügbarkeit von 55 % und eine Plasmaproteinbindung von 99,9 %. Die Halbwertszeit dieses Wirkstoffes beträgt 17 Stunden und die Ausscheidung erfolgt fast ausschließlich biliär¹⁸⁶. Indikation für oral verabreichtes Itraconazol sind Haut- und Schleimhautmykosen, die lokal nicht behandelt werden können, sowie Systemmykosen. Die übliche Dosierung dieses Wirkstoffes beträgt bei Erwachsenen 100 mg am Tag.

Itraconazol wird über das CYP 3A4-System metabolisiert. Es ist ein Inhibitor von CYP 3A4 und hemmt daher den Abbau von anderen über dieses Enzymsystem metabolisierten Wirkstoffen, wie beispielsweise das Cyclosporin A. Bei einer Komedikation dieser beiden Wirkstoffe muss die Dosis von Cyclosporin A gegebenenfalls angepasst werden.

10.2 Analyse von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol

Itraconazol und sein aktiver Metabolit sind zu über 99 % an Plasmaproteine gebunden. Daher wird zur Analyse dieser Wirkstoffe aus Vollblut nach Zentrifugation zunächst Plasma gewonnen. Als weiterer Schritt in der Probenaufbereitung wird das gewonnene Plasma mit einem organischen Lösemittel präzipitiert, um nach der Zentrifugation die-

ses Gemisches einen möglichst matrixfreien Überstand in einem SPE-LC-MS/MS-System analysieren zu können. Als Fällungsmittel dient beispielsweise Acetonitril, das im Verhältnis 3:1 mit Plasma versetzt wird¹⁸⁷.

In einem Methodenvergleich sollte gezeigt werden, dass Itraconazol und sein aktiver Metabolit auch aus einer Hitzeschock-behandelten Vollblutprobe quantitativ bestimmt werden können. Dieses Experiment steht stellvertretend für die direkte Analyse von plasmagebundenen Wirkstoffen aus nativen Vollblutproben.

Insgesamt wurden 3 Patientenproben analysiert.

Es wurden jeweils vier unterschiedliche Matrices aus den Patientenproben (EDTA-Vollblut) gewonnen und aus ihnen Itraconazol und 1-OH-Itraconazol quantifiziert. Die zu untersuchenden Proben wurden alle mit einem Internen Standard (R 51012, Fitzgerald Industries) versetzt. **Abb. 67** zeigt die Strukturformeln von Itraconazol, 1-OH-Itraconazol und dem verwendeten Internen Standard.

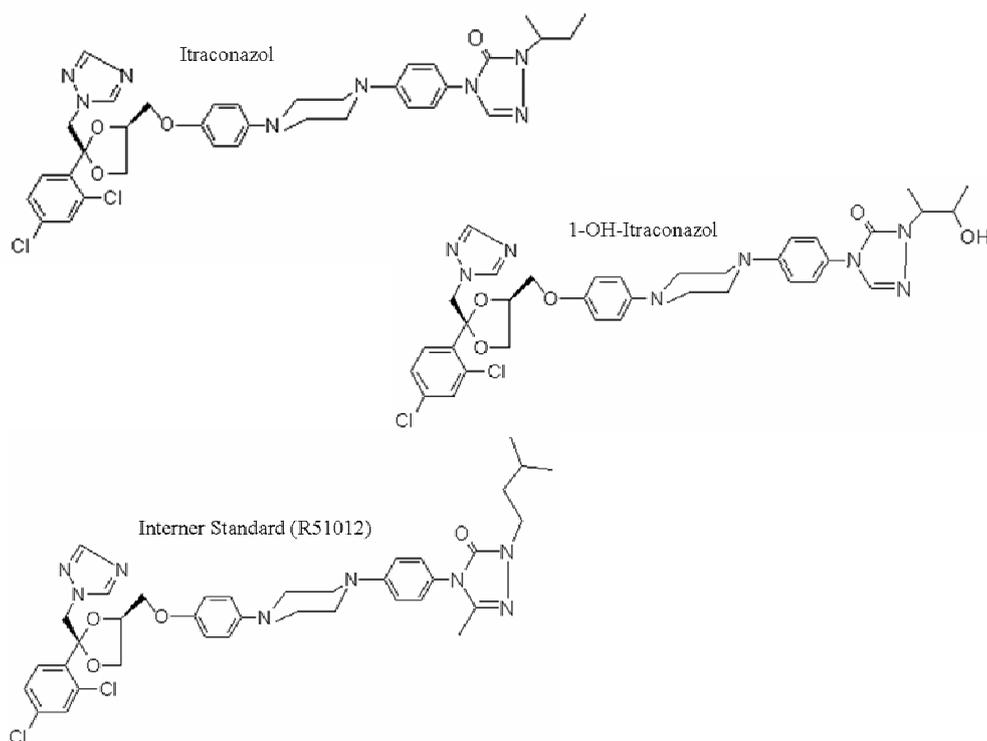


Abb. 67: Strukturformeln der untersuchten Antimykotika

Analysiert wurden der Überstand einer gefällten Plasmaprobe (1), die Sekundärprobe Plasma nach direkter Injektion auf spezielles SPE-Packungsmaterial (on-line RAM) (2), der Überstand einer gefällten Vollblutprobe (3) und eine durch Hitzeschockbe- handlung gewonnene CDB-Probe (4).

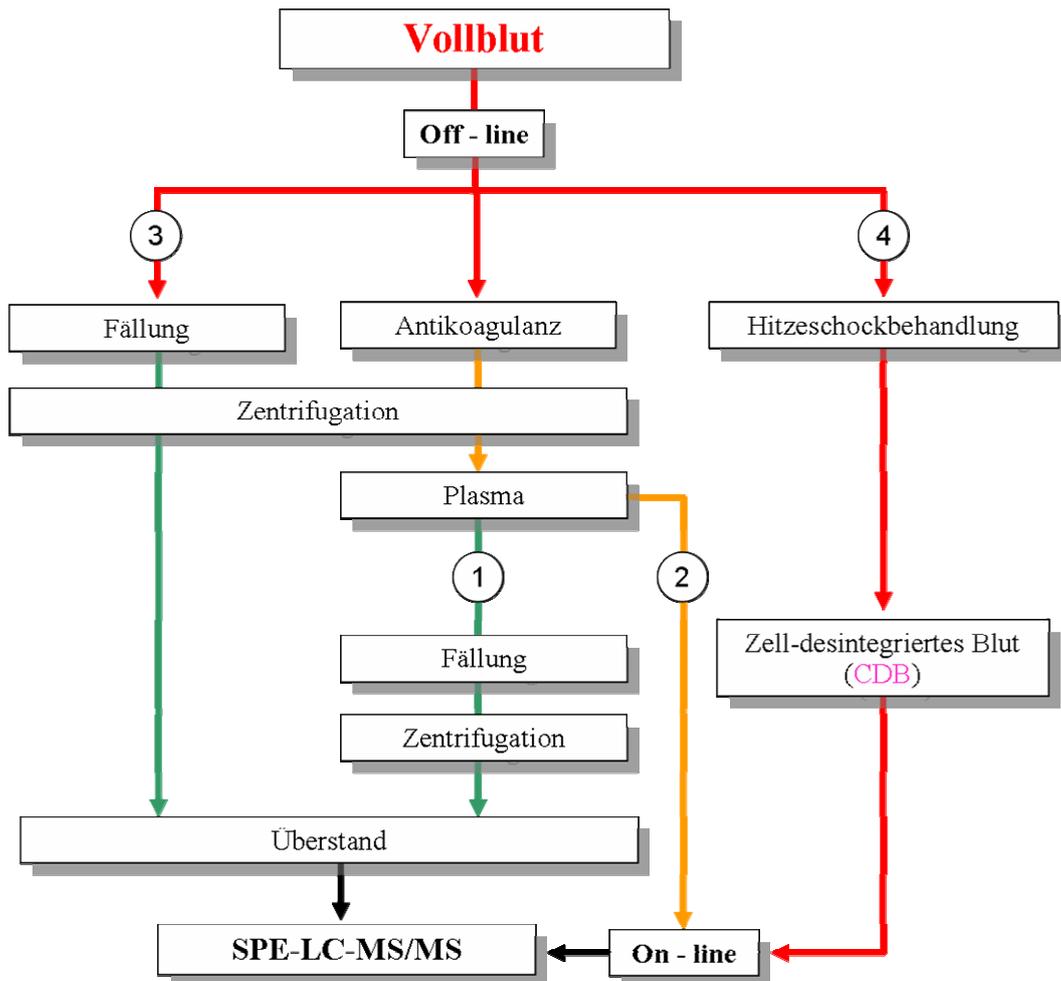


Abb. 68: Unterschiedliche Probenaufbereitungsarten (1-4) für die Analyse von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol

Die Vollblutproben wurden off-line, d.h. manuell in Glaskapillaren, bei 80°C für 11 Sekunden zu CDB prozessiert (4). Um einen klaren Überstand einer gefällten Probe zu gewinnen, wurden 100 µL Plasma (1) bzw. Vollblut (3) mit 1000 µL ACN versetzt, gemischt und im Anschluss für 10 Minuten bei 16100 G zentrifugiert.

Da die zu analysierenden Probenmatrices unterschiedlich waren, wurden für die Quantifizierung der Proben zwei unterschiedliche Kalibrationsgeraden erstellt. Für die Plasma- und CDB-Proben diente zur Quantifizierung eine Kalibrationsgerade, die aus der Vermessung von Plasmaproben unterschiedlicher Konzentrationen hervorging. Die Quantifizierung des Überstandes einer gefällten Plasma- bzw. Vollblutprobe wurde mit Hilfe verschiedener gefällter, kommerziell erhältlicher Kalibratoren für Plasma durchgeführt. Für den Methodenvergleich wurde der Hämatokrit-Wert der untersuchten Patientenproben als Korrekturfaktor miteinbezogen. Bei gleich bleibendem Injektionsvolumen ergibt die Analyse von beispielsweise reinem Plasma eine höhere Analytkonzentration als die Analyse von CDB-Proben. Die Hämatokrit-Werte der Patienten sind in **Tab. 62** dargestellt. Da EDTA-Vollblut das Ausgangsmaterial war, wurden alle vermessenen Werte auf CDB korrigiert.

Patientenprobe	Hämatokrit-Wert	Plasmaanteil [%]	Korrekturfaktor
1	0,274	72,6	0,726
2	0,224	77,6	0,776
3	0,291	58,7	0,587

Tab. 62: *Analyse von Antimykotika aus Patientenproben: Hämatokrit und Korrekturfaktoren*

Zur Fraktionierung von jeweils 50 μL Probe auf Oasis HLB-Material wurde ein Lösemittelgemisch aus $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (95/5, v/v) verwendet. Nach dem Fraktionierungsschritt wurden die extrahierten Analyten mit einem Eluenten bestehend aus $\text{MeOH}/1\%$ Ameisensäure (engl.: formic acid; FA) (90/10, v/v) auf die analytische Trennsäule transferiert. Nach der Trennung auf einer LiChrospher[®] 100 RP 18-EC-Säule (125 x 2 mm I.D., dp 5 μm) konnten Itraconazol und 1-OH-Itraconazol vom Tandemmassenspektrometer detektiert bzw. quantifiziert werden. Jede Probe wurde 3-mal vermessen.

In **Abb. 69** sind Chromatogramme von Itraconazol und seinem Metaboliten dargestellt. Die violette Spur stellt jeweils die CDB-Probe dar, die grüne Spur die Plasmaprobe. Die Signalintensitäten sind vergleichbar, da die Hämatokrit-Werte der Patienten sehr niedrig sind. Zu erwarten wäre, dass das Signal der CDB-Probe etwas geringer ist als das der Plasmaprobe. Matrixeffekte wurden für beiden Analyten unter diesen Versuchsbedingungen nicht untersucht. Durchaus kann auch eine Signalverstärkung während der Analyse von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol aus CDB für die vergleichbare Signalintensität verantwortlich sein.

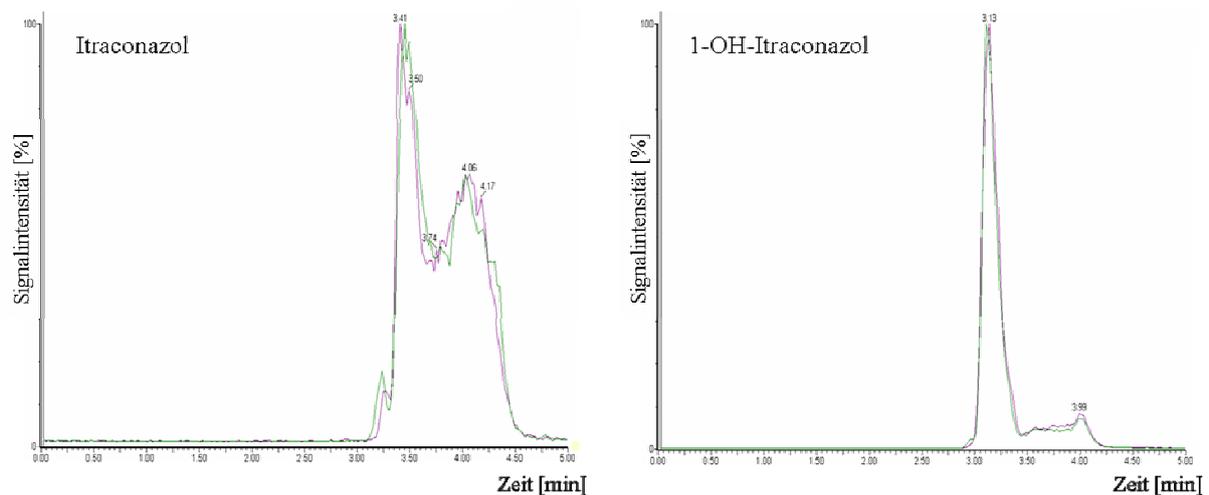


Abb. 69: LC-MS/MS-Chromatogramme von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol:
 ■ Plasmaprobe und ■ CDB-Probe; Eluent: MeOH/1% FA (90/10, v/v);
 Fluss: 250 μ L/min

Tab. 63 zeigt die ermittelten Konzentrationen von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol nach der on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse aus vier verschiedenen Matrices.

Patient	Analyt	Analytkonzentration [ng/mL] in folgenden Matrices			
		Plasma	CDB (off-line)	Überstand einer gefällten Plasmaprobe	Überstand einer gefällten Vollblutprobe
1	Itraconazol	461,3	466,0	536,4	510,6
	1-OH-Itraconazol	417,7	429,6	543,6	693,3
2	Itraconazol	562,2	556,9	511,0	505,3
	1-OH-Itraconazol	668,7	640,9	721,7	749,5
3	Itraconazol	28,5	34,4	46,8	43,7
	1-OH-Itraconazol	44,4	56,6	36,7	47,6

Tab. 63: Vergleich der ermittelten Konzentrationen von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol nach der on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse vier verschiedener Matrices

Wie zu erwarten war, ist in den meisten Fällen die Konzentration des Metaboliten 1-OH-Itraconazol im Vergleich zu Itraconazol etwas höher. Die Analytkonzentrationen aus den stark matrixbelasteten Proben (Plasma und CDB) sind nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors (Hämatokrit) sehr gut miteinander vergleichbar. Auch die Analytkonzentration aus den Überständen von gefällten Plasma- und Vollblutproben zeigen nach Miteinbeziehung des Hämatokrit-Wertes (Korrekturfaktor) eine sehr gute Übereinstimmung. Die Konzentration für 1-OH-Itraconazol aus dem Überstand der gefällten Vollblutprobe des Patienten 1 ist im Vergleich zu den anderen ermittelten Metabolitkonzentrationen desselben Patienten zu hoch und wird aus diesem Grund als Ausreißer betrachtet.

Für die Patienten 1 und 3 gilt, dass die Analytkonzentration ermittelt aus den Überständen der gefällten Plasma- bzw. Vollblutproben höher liegen als nach der Analyse der matrixbelasteten Proben (CDB und Plasma). Bei Patient 2 ist die Tendenz genau umgekehrt. Diese Unregelmäßigkeit ist sehr wahrscheinlich auf Matrixeffekte zurückzuführen.

Die Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, dass es möglich ist, auch plasmagebundene Wirkstoffe quantitativ aus CDB zu analysieren. Die einzige Bedingung ist, dass die Zielanalyten nicht thermolabil sind. Für die Analyse der im Plasmakompartiment vorliegenden Wirkstoffe ist es nicht notwendig, den Hämatokrit-Wert der Proben zu kennen. Dies war nur in diesem speziellen Fall notwendig, da ein Vergleich verschiedener Matrices vollzogen wurde. Das Absolutvolumen an Analyt-haltiger Blutfraktion (Plasma) sollte in allen untersuchten Matrices gleich sein.

10.3 Vorteile einer direkten Analyse von Vollblut im Vergleich zur Analyse von Plasmaproben

Die direkte Analyse von pharmazeutischen Wirkstoffen und/oder endogenen Verbindungen aus nativem, antikoaguliertem Vollblut hat den Vorteil, dass dem Patienten oder dem (Versuchs)tier eine um ca. 50 % geringere Blutmenge entnommen werden kann. Denn es muss im Vorfeld zur Wirkstoffanalyse kein Plasma aus Vollblut generiert werden muss. Die gewonnene Vollblutprobe wird danach vollautomatisiert aufgearbeitet. Durch die integrale Aufbereitung (in-line Prozessierung) werden Kosten für Verbrauchsmaterialien wie Probengefäße, Pipettenspitzen, Verschlüsse und deren Entsorgung eingespart. Auch entfällt der Zentrifugationsschritt zur Gewinnung von Plasma oder Serum. Die vollständige Automation erlaubt einen Nacht- bzw. Wochenendbetrieb und reduziert die Personalkosten. Die in-line Probenaufbereitung senkt schließlich auch das Infektionsrisiko für das Bedienungspersonal und verbessert damit die Sicherheit bzw. Qualität des Arbeitsplatzes.

Die direkte Injektion und die ins System integrierte Aufbereitung einer Vollblutprobe erlaubt es erstmalig, sehr kleine Volumina ($\ll 1 \mu\text{L}$) zu analysieren. Dies ist entscheidend bei pharmakokinetischen Studien an Kleintieren oder bei der Analyse von Vollblut Neugeborener beispielsweise im Rahmen des Neugeborenen Screenings (engl.: Newborn Screening; NBS).

10.4 Vorteile für die LC-MS/MS-Routineanalytik

Die Vorteile für die klinisch-chemische Routineanalytik, relevante Analyte direkt aus Vollblut mit Hilfe der LC-MS/MS zu bestimmen, sind zahlreich. Die Verwendung eines LC-MS/MS-Systems, das gekoppelt ist an das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur integralen Probenaufbereitung (in-line Prozessierung), erlaubt es, Wirkstoffe, die im Kompartiment des Blutplasmas und/oder der Blutzellen lokalisiert sind, direkt aus der Primärprobe (Vollblut) zu analysieren. **Abb. 70** zeigt nochmals die Möglichkeiten zur Aufbereitung von Vollblutproben vor einer LC-MS/MS-Analyse. Dabei sind die manuellen (off-line) und integrierten (on-line) Aufbereitungsarten grau und die integrale (in-line) Aufbereitung farbiger dargestellt.

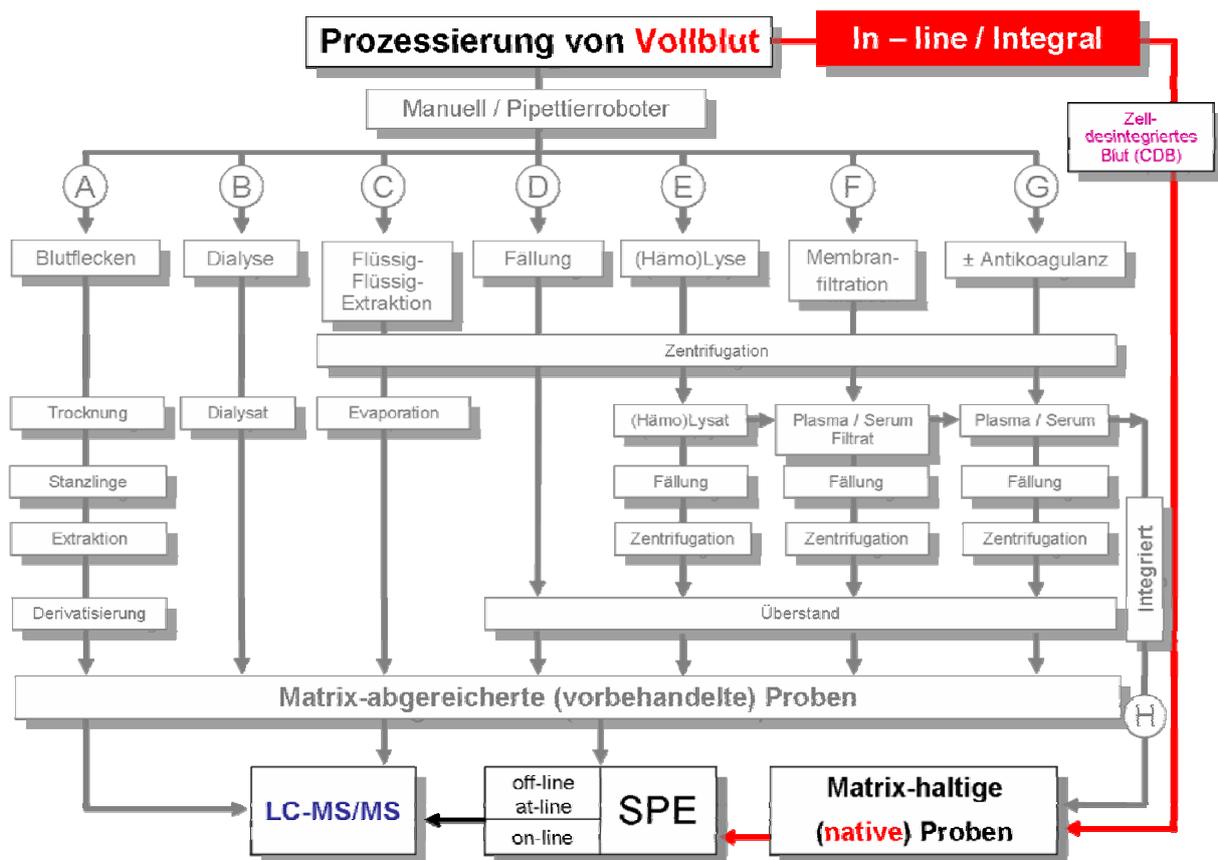


Abb. 70: Manuelle (off-line), integrierte (on-line) und integrale (in-line) Verfahren der Aufbereitung von Vollblut

Das am häufigsten angewandte Verfahren zur Probenaufbereitung in der Routineanalytik ist die Fällung der nativen Vollblutprobe (D) bzw. des nach der Zentrifugation gewonnenen Blutplasmas bzw. Serums. Das Verfahren der Proteinpräzipitation ist zeitaufwendig, da es mehrere manuelle Schritte beinhaltet.

Werden die zu analysierenden Proben manuell aufbereitet, birgt dies Fehlerquellen wie beispielsweise Pipettierfehler und Verwechslung der Probengefäße. Bei der in-line Prozessierung von antikoaguliertem Vollblut sind aufgrund der integralen Probenaufbereitung und anschließenden LC-MS/MS-Analyse keine manuellen Schritte notwendig. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren erlaubt erstmalig folgende Vorgehensweise: Vollblut wird direkt mit einem speziellen Entnahmegefäß dem Patienten bzw. Tier entnommen und antikoaguliert. Dieses Entnahmegefäß dient im Anschluss als Probengefäß (**Abb. 71**).

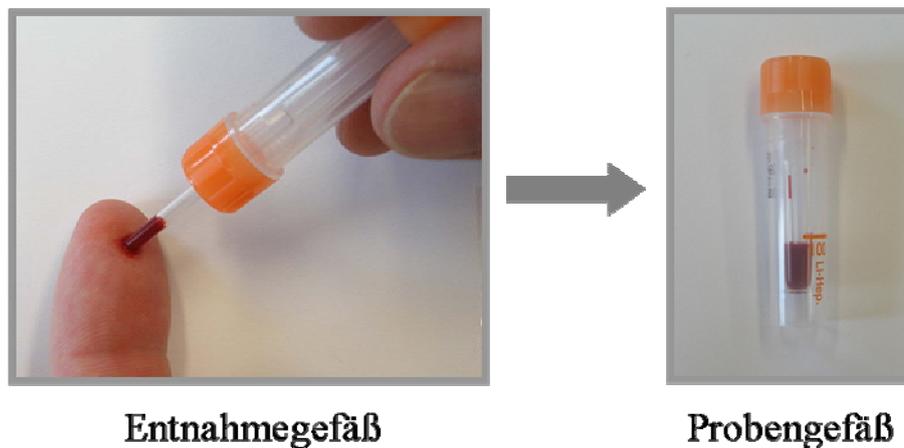


Abb. 71: Beispiel für ein Entnahmegefäß, das im Anschluss als Probengefäß genutzt wird (Microvette[®]; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)

Durch Eliminierung der manuellen Probenaufbereitung vor der LC-MS/MS-Analyse werden Kosten für Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, Probengefäße, Verschlüsse, Lösemittel und deren Entsorgung eingespart.

Müssen im Zuge der Probenaufbereitung keine manuellen Schritte durchgeführt werden, so reduziert sich das Infektionsrisiko für das Personal. Das wiederum steigert die Sicherheit und Qualität des Arbeitsplatzes.

Die manuelle Probenaufbereitung ist zeitaufwendig und stellt dadurch in der Regel den größten Zeitbedarf in der LC-MS/MS-Analyse dar. Die vollautomatisierte in-line Prozessierung von Vollblut ist eine schnelle Art der Probenaufbereitung und verkürzt somit die Gesamtanalysezeit einer Vollblutprobe. Reduzierte Analysezeiten führen zu einem erhöhten Probendurchsatz und zu kürzeren Rücklaufzeiten bezüglich des klinisch-chemischen Befundes. Eine vollständige Automation der Probenaufbereitung ermöglicht einen Nacht- und Wochenendbetrieb und daher die volle Auslastung eines in den Anschaffungskosten hohen LC-MS/MS-Systems.

Immunsupprimierte Patienten oder HIV-Patienten leiden aufgrund ihrer geschwächten Immunabwehr häufig an Pilzinfektionen. Werden sie mit Antimykotika behandelt, so muss neben der Blutspiegelkonzentration der Immunsuppressiva bzw. Virustatika auch die Blutspiegelkonzentration der verabreichten Antimykotika bestimmt werden, da diese Wirkstoffgruppen interagieren. Wie auch bei der Analyse von Antimykotika ist auch bei der Analyse von antiretroviralen Wirkstoffen zurzeit Plasma die Standardmatrix¹⁸⁸. Die beschriebenen Versuche in Kapitel 10.2 haben gezeigt, dass die Analyse von Wirkstoffen, die im Plasmakompartiment lokalisiert sind, auch aus der neuartigen biologischen Matrix CDB (engl.: cell-disintegrated blood) möglich ist. Einzige Bedingung für eine erfolgreiche Quantifizierung der Zielanalyte aus Hitzeschock-behandelten Proben ist, dass diese bis zu einer Temperatur von ca. 80°C thermostabil sind. Würden alle drei Wirkstoffgruppen (Immunsuppressiva, Antimykotika und Virustatika) aus CDB bestimmt werden, wäre es nach Entwicklung einer adäquaten on-line SPE-LC-MS/MS-Methode, durchaus möglich, Immunsuppressiva simultan zu Antimykotika bzw. antiretrovirale Pharmaka ebenfalls simultan zu Antimykotika zu analysieren. Die simultane Analyse der drei Wirkstoffgruppen aus einer Probe nach direkter Injektion und in-line Prozessierung von Vollblut in einem on-line SPE-LC-MS/MS-System würde zu einer signifikanten Zeit-, Personal- und Kostenersparnis führen.

10.5 Bestimmung der Verteilung von Wirkstoffen in Vollblut

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren ist es erstmals möglich, mit einer einfachen Methode genau zu untersuchen, zu welchen Anteilen der Wirkstoff frei vorliegt, an Plasmaproteine gebunden oder in Blutzellen lokalisiert ist. Das Immunsuppressivum Ciclosporin A beispielsweise ist nur zu 67 % in Blutzellen lokalisiert, etwa 1-2 % des Analyten liegen ungebunden und der Rest liegt an Plasmaproteine gebunden vor².

Zur Bestimmung des Anteils an ungebundenem Wirkstoff in einer Vollblutprobe werden zurzeit das Dialyseverfahren und die Membranfiltration angewandt. Diese beiden Methoden (siehe Kapitel 2.2.2) sind äußerst zeitaufwendig und fast ausschließlich manuell durchführbar. Um den Anteil des Wirkstoffes allein in der Fraktion der Blutzellen bzw. des Blutplasmas zu untersuchen, muss Vollblut im Vorfeld zentrifugiert werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur in-line Prozessierung von Vollblut ermöglicht, die Verteilung des Analyten in den verschiedenen Blutkompartimenten schnell und einfach zu bestimmen. In **Tab. 64** sind die Versuchsbedingungen im Totalen Analysesystem (TAS) dargestellt.

Matrix	Hitzeschock- behandlung	mobile Phase zur Fraktionierung	Quantifizierung von		
			freiem Analyt	Plasmaprotein- gebundenem Analyt	in Blutzellen lokalisiertem Analyt
Vollblut	+	isoton. NaCl/ACN (95/5, v/v)	+	+	+
Vollblut	-	isoton. NaCl/ACN (95/5, v/v)	+	+	-
Vollblut	-	isoton. NaCl	+	-	-

Tab. 64: *Versuchsbedingungen im TAS zur Bestimmung der Wirkstoffverteilung in Vollblut; + = ja, - = nein*

In den vorherigen Kapiteln wurde eine Mischung aus H₂O/ACN (95/5, v/v) als mobile Phase zur Fraktionierung beschrieben. Der wässrige Anteil der mobilen Phase muss für diese Untersuchung zur Verhinderung der Hämolyse durch isotonische NaCl-Lösung ausgetauscht werden. Der 5 % ige Anteil an Acetonitril im Eluenten sorgt einerseits dafür, dass wasserlösliche Matrixbestandteile sich nicht an Oberflächen, z.B. Kapillaren des Analysesystems, festsetzen. Andererseits verdrängt der organische Modifier den Analyten aus der Proteinbindung.

Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration des Wirkstoffes in Vollblut muss dieses zunächst mittels Hitzeschockbehandlung zu zell-desintegriertem Blut (CDB) umgewandelt werden. Aufgrund der Desintegration der Blutzellen liegt der Analyt nun frei bzw. proteingebunden vor. Während der Fraktionierung mit 0,9 % iger NaCl/ACN (95/5, v/v) sorgt das organische Lösemittel dafür, dass der Zielanalyt aus der Plasma- und Blutzellproteinbindung verdrängt wird. Die Analytkonzentration, die nach einer

LC-MS/MS-Analyse quantifiziert wird, entspricht der Gesamtmenge an Wirkstoff in Vollblut.

Soll nur der Anteil an Wirkstoff, der frei und an Plasmaproteine gebunden vorliegt, bestimmt werden, so darf das Vollblut nicht in-line zu CDB prozessiert werden. Somit bleiben die Blutzellen intakt und der Wirkstoff kann nicht aus diesen austreten. Während der Fraktionierung der Probe auf einer SPE-Kartusche kommt es nicht zur Hämolyse, da mit einer isotonen mobilen Phase fraktioniert wird. Das enthaltene Acetonitril jedoch verdrängt den Wirkstoff aus der Plasmaproteinbindung. Die Analytkonzentration, die nach einer LC-MS/MS-Analyse quantifiziert wird, entspricht der Menge an plasmagebundenem und freiem Wirkstoff in Vollblut.

Zur Bestimmung des Anteil des in der Vollblutprobe frei vorliegenden Wirkstoffes darf diese nach Injektion in das TAS nicht in-line prozessiert werden. Zur Fraktionierung der Probe wird reine isotonische NaCl-Lösung verwendet. Somit bleibt die Bindung des Analyten zu den Plasmaproteinen bestehen. Die nach der LC-MS/MS-Analyse quantifizierte Analytmenge entspricht dem Anteil an ungebundenem Wirkstoff in der Vollblutprobe.



11 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von antikoagulierten Vollblutproben im Rahmen der bioanalytischen Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC/LC) gekoppelt an einen Tandemmassenspektrometer (MS/MS) beschrieben. Immunsuppressiva, die fast ausschließlich in Erythrozyten lokalisiert sind, dienen als Modellanalyten zur Erprobung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten vollautomatisierten Totalen Analysesystems (TAS). Die Probenaufbereitung hochkomplexer biologischer Flüssigkeiten wie Vollblut, Plasma oder Urin bedarf im Vorfeld zur Festphasenextraktion (SPE-Schritt) und anschließender LC-MS/MS-Analyse meist einer Proteinpräzipitation (PP), Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl.: Liquid-Liquid-Extraction; LLE) oder Membranfiltration (MF), um die Analyten von makromolekularen Matrixbestandteilen zu trennen. **Abb. 72** zeigt die gängigen Aufbereitungsarten von Vollblut.

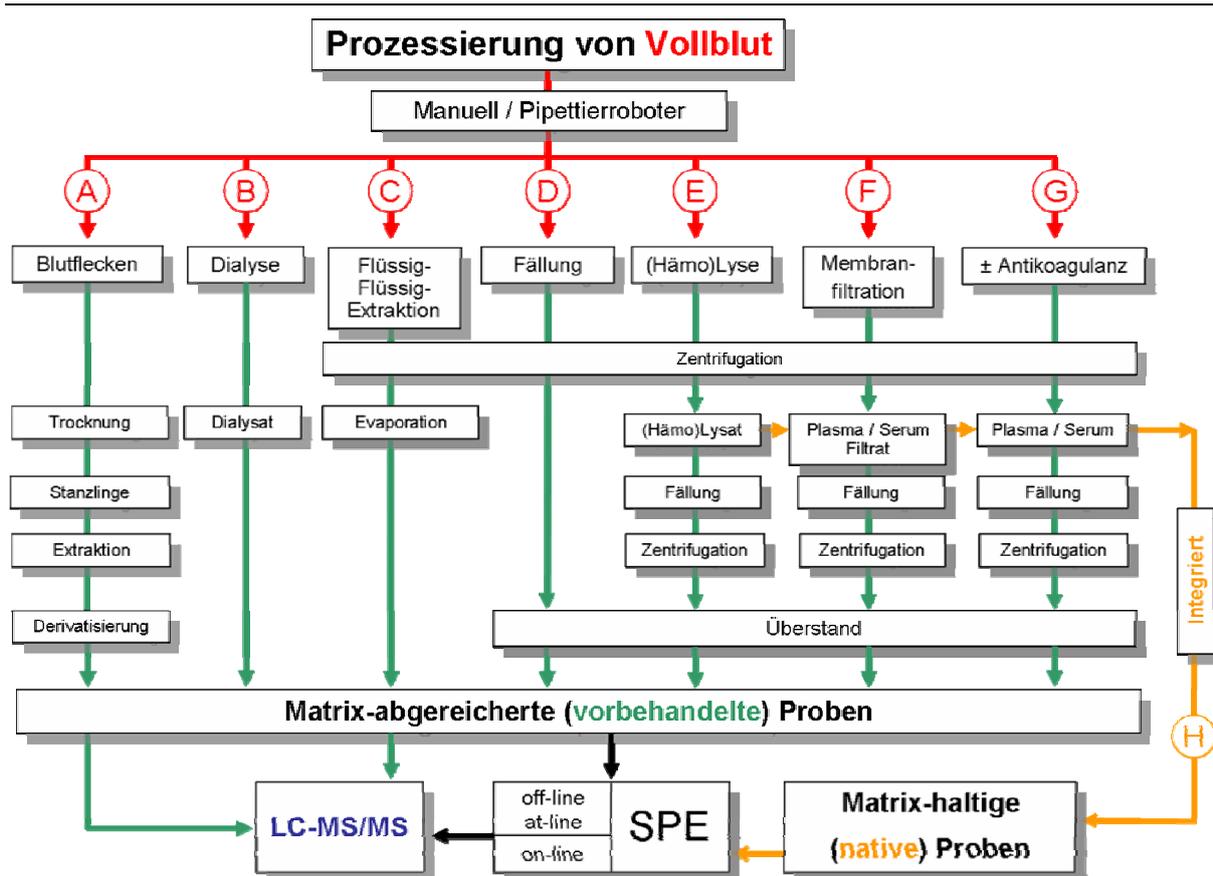


Abb. 72: Manuelle / mit dem Pipettierroboter durchzuführende und integrierte Verfahren der Aufbereitung von Vollblutproben für die LC-MS/MS-Analyse

Die aufgeführten off-line Verfahren zur Aufbereitung einer nativen Vollblutprobe sind zeitaufwendig, meist kostspielig, nicht oder nur schwer zu automatisieren und fehleranfällig. Eine Ausnahme bildet die Methode H. Die proteinhaltigen Sekundärproben werden dabei direkt auf spezielle SPE-Säulen, die mit maßgeschneiderten Packungsmaterialien gepackt sind, den sogenannten RA-Materialien (siehe Kapitel 2.4), injiziert. Das hierzu verwendete SPE-Material besitzt unter anderem ausschlusschromatographische Eigenschaften, d.h., es weist eine eingeschränkte Zugänglichkeit für hochmolekulare Probenbestandteile, z.B. Proteine, auf.

Für die Analyse von Immunsuppressiva dient Vollblut als Matrix. Zur Freisetzung dieser Wirkstoffe aus den Erythrozyten wird Vollblut mit einem Gemisch aus organi-

schem Lösemittel und Salzlösung, wie beispielsweise MeOH/ZnSO₄ (80/20, v/v), präzipitiert, zentrifugiert und der Überstand im Anschluss mittels LC-MS/MS analysiert. Neben der schwierigen Automatisierbarkeit und dem hohen Zeitaufwand dieser Art der Probenaufbereitung ist die potentielle Kopräzipitation der Analyte und somit deren schwankende Wiederfindung ein weiterer Nachteil. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Fällung des Vollblutes nicht alle Proteine entfernt werden können. Die im Überstand verbliebenen Matrixbestandteile (z.B. Proteine und Phospholipide) führen während der ESI-Detektion im Tandemmassenspektrometer zu unerwünschten Störungen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zu entwickeln, das es erlaubt, die Aufbereitung von Vollblut zu automatisieren. Dieses Verfahren sollte darüber hinaus in ein on-line SPE-LC-MS/MS-System implementiert werden, um eine direkte Injektion von nativen, antikoagulierten Vollblutproben mit anschließender Analyse zu ermöglichen. In Vorversuchen wurde im Arbeitskreis festgestellt, dass die zellulären Bestandteile von antikoaguliertem Vollblut durch eine Hitzeschockbehandlung desintegriert werden können.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und erprobte Verfahren zur Aufbereitung von Vollblutproben mittels Hitzeschockbehandlung führt zu einer neuen biologischen Matrix, dem zell-desintegrierten Blut, kurz CDB (engl.: cell-disintegrated blood). Dabei wird die trübe, rote Suspension einer Vollblutprobe durch Erhitzen unter definierten Bedingungen in eine klare, homogene, rote Flüssigkeit umgewandelt. Diese neuartige biologische Matrix ist frei von zellulären Bestandteilen und somit einem Analysesystem direkt zuführbar. Die subzellulären Partikel des CDB bilden während der Lagerung kein Sediment. Zell-desintegriertes Blut kann im Kühlschrank genauso lang gelagert werden wie natives Vollblut, d.h. mindestens eine Woche.

Weitere Schwerpunkte der Arbeit waren die Untersuchung und Beschreibung der weitgehend unbekanntem Prozesse bei der Hitzeschockbehandlung. Es wurde herausgearbeitet, bei welcher Temperatur und Heizdauer die native Vollblutprobe einer Hitzeschockbehandlung unterzogen werden kann. Die Temperatur und Heizdauer mussten so gewählt werden, dass eine vollständige Desintegration der Blutzellen auftritt,

gleichzeitig jedoch die proteinhaltige Matrix nicht denaturiert. Aus diesem Grund wurden zunächst fünf Prozessparameter definiert und anschließend experimentell ermittelt bzw. errechnet. Die Bestimmung der Prozessparameter erfolgte off-line, d.h. manuell durch Prozessierung des Vollblutes in Glaskapillaren und unter Verwendung eines temperierten Wasserbads.

Es wurden folgende Prozessparameter bestimmt:

t_G: Zeitpunkt, ab dem Vollblut bei einer bestimmten Temperatur ein Gel bildet.

t_{max}: Aufheizzeit einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur, bei der gerade noch kein Gel entsteht. $t_{\max} = t_G - 1 \text{ sec}$

t_{min}: Minimale Aufheizzeit der Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur, die zu einer quantitativen Desintegration der Erythrozyten führt.

t_{heat}: Errechnete Heizdauer einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur.

$$t_{\text{heat}} = 0,5 \times (t_{\max} + t_{\min})$$

t_{applied}: Festgelegte Heizdauer einer Vollblutprobe bei einer bestimmten Temperatur

Da die Erythrozyten mit nahezu 95 % die größte Fraktion der zellulären Bestandteile im Blut darstellen und die untersuchten Modellanalyten zum größten Teil erythrozytär gebunden sind, lag das Hauptaugenmerk auf der Desintegration dieser Blutzellen. Zusätzlich wurde jedoch auch die Effizienz der Hitzeschockbehandlung auf die Desintegration von Leukozyten und Thrombozyten untersucht.

Die Effizienz der Hitzeschockbehandlung wurde mit zwei unabhängigen Methoden bestimmt. Erstens durch Verdünnung der Probe mit Trypanblau-Lösung und der anschließenden Auszählung der Erythrozyten in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung eines Mikroskops. Zweitens durch photometrische Quantifizierung des nach der Hitzeschockbehandlung freigesetzten Hämoglobins. Dazu wurde der Überstand einer CDB-Probe mit Drabkin's Reagenz versetzt und bei 540 nm vermessen.

Zur Bestimmung der idealen Aufheizbedingungen zur quantitativen Desintegration der Blutzellen, wurden alle Prozessparameter für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C bestimmt.

Neben nativem, mit EDTA antikoaguliertem Vollblut wurden auch verschiedene Vollblutmischungen, die humanes AB-Plasma und/oder organische Lösemittel wie Methanol, Acetonitril, Ethanol und Dimethylsulfoxid in verschiedenen Volumenanteilen enthielten, untersucht. Die Prozessparameter wurden auch für diese Vollblutmischungen in einem Temperaturbereich von 60 bis 95°C bestimmt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass organische Lösemittel mit unterschiedlicher Polarität, die Gelbildungsgrenze (t_G) der Vollblutprobe beeinflussen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mit abnehmender Polarität des organischen Lösemittels auch die ermittelten Werte für t_G bei identischer Temperatur sinken. Eine mögliche Erklärung könnte die Wechselwirkung des Lösemittels mit der Zellmembran sein, über die dessen Fluidität verändert wird.

Neben der Art des Lösemittels ist auch der Volumenanteil an organischem Lösemittel für t_G ausschlaggebend. Bei steigendem Volumenanteil an organischem Modifier in Vollblut verschiebt sich die Gelbildungsgrenze (t_G) bei identischer Temperatur zu einer kürzeren Heizdauer.

Neben dem Einfluss verschiedener organischer Lösemittel auf die Prozessparameter wurde auch der Einfluss des Hämatokrit-Wertes (Hct untersuchter Proben: 0,22-0,63) auf t_G , t_{max} , t_{min} und t_{heat} bei einer Prozessierungstemperatur von 75°C untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich t_G mit steigendem Hämatokrit-Wert zu einer kürzeren Heizdauer verschiebt. Die ermittelten Werte für t_{min} bleiben jedoch konstant. Somit ist t_{min} unabhängig vom Hämatokrit.

Die Beobachtung, dass der Hämatokrit-Wert einen Einfluss auf die Gelbildungsgrenze (t_G) hat, ließ vermuten, dass das bei der Hitzeschockbehandlung freigesetzte Hämoglobin für die Gelbildung verantwortlich ist. Um zu zeigen, dass eine Denaturierung dieses Proteins bei zu langem Erhitzen von Vollblut zur Gelbildung führt, wurde humanes Plasma der Blutgruppe AB (AB-HP) mit lyophilisiertem Hämoglobin versetzt. Als Kontrollprobe diente reines AB-HP. Für beide Ansätze wurde die Gelbil-

dungsgrenze (t_G) bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hämoglobin-haltige Probe beim Prozessieren sehr schnell ein Gel bildet. Reines Humanplasma hingegen blieb unverändert; auch nachdem der für Vollblut (Hct: 0,4) ermittelte t_G -Wert (z.B. 6 sec bei 85°C) überschritten wurde.

Bei den beschriebenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die ideale Prozessierungstemperatur der Vollblutprobe abhängig ist von der Art und Menge des zugesetzten organischen Lösemittels. Um eine generell gültige Prozessierungstemperatur festzulegen, ist essentiell, dass das Zeitfenster zwischen t_{\max} und t_{\min} möglichst groß ist.

Abb. 73 verdeutlicht dies am Beispiel zweier Vollblutproben mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten.

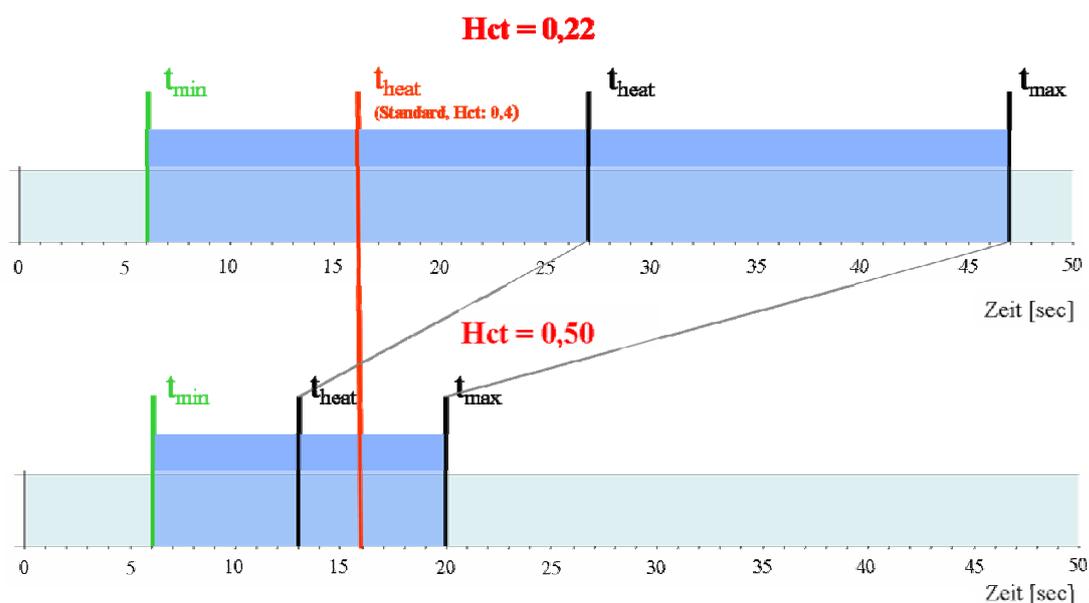


Abb. 73: Einfluss des Hämatokrit-Wertes auf die Prozessparameter;
 Prozessierungstemperatur: 75°C

Aufgrund des großen Zeitfensters zwischen t_{\min} und t_{\max} können beide Proben jedoch unter festgelegten Standardbedingungen (Hct: 0,4; $t_{\text{heat}} = 16$ sec bei 75°C) prozessiert werden. In diesem Fall entspricht $t_{\text{applied}} t_{\text{heat standard}}$.

In Tierversuchen werden die Pharmakokinetik, das Teratogenitäts- und Mutationspotential, chronische Toxizitätsuntersuchungen und Nebenwirkungen eines potentiellen neuen Wirkstoffes im Rahmen von präklinischen Studien untersucht. Tierversuche werden an verschiedenen Spezies durchgeführt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die universelle Einsetzbarkeit der neuartigen Probenaufbereitungsmethode mit Vollblut unterschiedlicher Tierarten untersucht. Bei einer Prozessierungstemperatur von 75°C wurden alle vier Prozessparameter off-line, d.h., manuell in Glaskapillaren, aus Blut verschiedener Rattenarten, Mäusen, Meerschweinchen und Beagle-Hunden bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass das Vollblut dieser Spezies unter Standardbedingungen (Hct: 0,4; $t_{\text{heat}} = 16 \text{ sec}$ bei 75°C) quantitativ zu CDB umgewandelt werden kann. In keinem der untersuchten Fälle war t_{min} größer und t_{max} kleiner als 16 Sekunden.

Zum besseren Verständnis des Prozesses der Desintegration von Blutzellen wurde zusätzlich der Einfluss verschiedener organischer Lösemittel und Prozessierungstemperaturen auf die Bildung von subzellulären Fragmenten aus Zellmembranen während der Hitzeschockbehandlung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Vollblutproben, die 2,5 vol. % DMSO enthielten und bei 75°C für 13 Sekunden erhitzt wurden, während der Prozessierung fast ausschließlich Vesikel bilden und kaum Ghosts.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, die integrale Probenaufbereitung in ein on-line SPE-LC-MS/MS-System zu implementieren. Dazu wurde Vollblut in einer beheizten Edelstahlkapillare (engl.: Heated Capillary; HC) erhitzt und zu CDB umgewandelt. Die HC befindet sich direkt hinter dem Injektionsventil eines im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes mit Spark Holland B.V. modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems (**Abb. 74**).

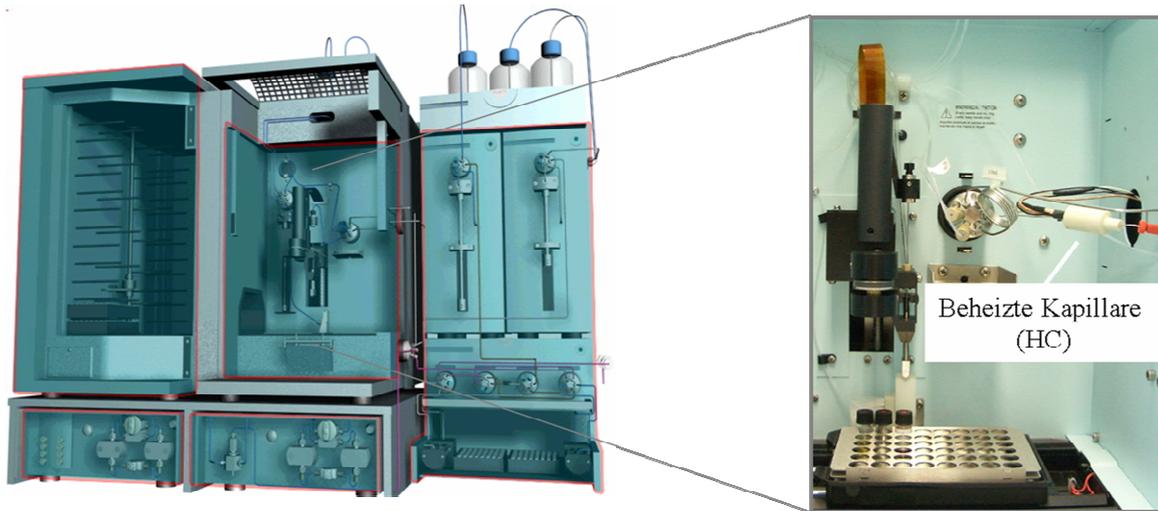


Abb. 74: *Modifiziertes Symbiosis™ Pharma System mit integrierter HC*

In diesem Zusammenhang konnten die verschiedenen Prozessparameter, die off-line in einem statischen System ermittelt wurden, erfolgreich in dieses dynamische in-line System übertragen werden. Die Verweilzeit der Probe in der beheizten Edelstahlkapillare und somit die Dauer der Hitzeschockbehandlung konnte mit einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Formel berechnet werden.

Das endgültige Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer on-line SPE-LC-MS/MS-Methode zur direkten Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben. Für die Methodenentwicklung des SPE-LC- bzw. 2-Säulen-Systems (SPE-Säule/Kartusche gekoppelt mit einer analytischen Trennsäule), war es notwendig, neuartige Kenngrößen wie V_F , V_B und V_E zu bestimmen.

V_F : Fraktionierungsvolumen der Probenmatrix

V_B : Durchbruchvolumen des Analyten

V_E : Elutionsvolumen des Analyten

Verschiedene SPE-Adsorbentien wurden hinsichtlich ihrer Effizienz und Anwendbarkeit getestet.

Hinsichtlich der Evaluation der entwickelten in-line Prozessierung von nativem, anti-koaguliertem Vollblut gekoppelt an ein on-line SPE-LC-MS/MS-System wurden die Thermostabilität der untersuchten Modellanalyten (Immunsuppressiva) und die Reproduzierbarkeit der integralen Probenaufbereitung untersucht. Die Thermostabilität der Analyte bis ca. 80°C ist eine Grundvoraussetzung für die beschriebene in-line Prozessierung von Vollblut. Die untersuchten Modellanalyten erwiesen sich unter diesen Bedingungen als thermostabil.

Die gute Reproduzierbarkeit der in-line Prozessierung von Vollblutproben beweist, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Analyseverfahren zur direkten Injektion von Vollblut gekoppelt an ein on-line SPE-LC-MS/MS-System anwendbar ist für die routinemäßige Analyse von Patientenproben. Dabei kann der Wirkstoff nicht nur an/in Blutzellen, d.h. erythrozytär, gebunden sein, wie beispielsweise die Immunsuppressiva, sondern auch an im Plasmakompartiment vorliegenden Proteinen (Antimykotika).

Zusätzlich ermöglicht das in der Arbeit entwickelte Analyseverfahren, die Verteilung eines pharmazeutischen Wirkstoffes und/oder endogener Markermoleküle in dem zellulären und zellfreien Blutkompartiment direkt und vollautomatisiert zu bestimmen.

Weitere Anwendungsfelder dieser Probenaufbereitungsmethode bzw. dieser vollautomatisierten Plattform sind neben der Therapeutischen Arzneimittelkontrolle (engl.: Therapeutic Drug Monitoring; TDM), das Neugeborenenenscreening, das Drogenscreening und Vor-Ort-Tests (engl.: Point-of-Care Tests; POCT).



12 Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Abfall
Å	Ångström
α	Alpha
AB-HP	Humanplasma der Blutgruppe AB
ACN	Acetonitril
A.D.	Außendurchmesser
ADS	Alkyl-Diol-Silica
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl.: <u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>C</u> hemical <u>I</u> onisation)
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck (engl.: <u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>P</u> hoto <u>I</u> onisation)
β	Beta
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: <u>B</u> icinchonic <u>A</u> cid)
B/P-Verhältnis	Blut-Plasma-Verhältnis
BV	Bioverfügbarkeit
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration (engl.: <u>c</u> oncentration)

C2/C12	Blutspiegelkonzentration 2/12 Stunden nach Applikation
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
CDB	zell-desintegriertes Blut (engl.: <u>C</u> ell- <u>d</u> isintegrated <u>b</u> lood)
CDK	Cyklinabhängige Kinase (engl.: <u>C</u> ycline <u>d</u> ependent <u>k</u> inase)
CH ₃ OH	Methanol
CH ₃ OH ⁺	ionisiertes Methanolmolekül
c _{min}	Talspiegelkonzentrationen
c _{ss}	Konzentration im Fließgleichgewicht (engl.: <u>s</u> teady <u>s</u> tate)
CRM	Charge Residual Model
CyA	Ciclosporin A
CyD	Ciclosporin D
CYP	Isoenzyme des Cytochrom P 450
d	Tag (engl.: <u>d</u> ay)
D	Dialyse
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBS	getrocknete Blutflecken (engl.: <u>D</u> ried <u>B</u> lood <u>S</u> pot)
DMSO	Dimethylsulfoxid

dp	Partikeldurchmesser (engl: <u>d</u> iameter <u>p</u> article)
E	Erythrozyt
ECD	Elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray Ionisation
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
eV	Elektrovolt
FA	Ameisensäure (engl. : <u>f</u> ormic <u>a</u> cid)
FK 506	Tacrolimus
FKBP-12	FK-Bindungsprotein-12
F _v	Verdünnungsfaktor
γ	Gamma
G	Gravitationskraft
GC	Glucocorticoid
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GLP	Good Laboratory Practise
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde (engl.: <u>h</u> our)
Hb	Hämoglobin
HbA	Erwachsenenhämoglobin (engl.: <u>h</u> emoglo <u>b</u> in <u>a</u> adult)
HbF	Fetales Hämoglobin (engl.: <u>h</u> emoglo <u>b</u> in <u>f</u> etal)
HC	beheizte Kapillare (engl.: <u>H</u> eated <u>C</u> apillary)

Hct	Hämatokrit (engl.: hematocrit)
HDL	High-density-Lipoproteine
H ₂ O	Wasser
H ₃ O ⁺	protoniertes Wasser
HPD	Hochdruckkolbenpumpe (engl.: <u>h</u> igh <u>p</u> ressure <u>d</u> is- pender)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (engl.: <u>H</u> igh- <u>P</u> ressure- <u>L</u> iquid- <u>C</u> hromatography)
HST	Hitzeschockbehandlung (engl.: <u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>t</u> reatment)
HWZ	Halbwertszeit
Hy	Hysphere
I.D.	Innendurchmesser
i.e.	it est
IEM	Ion Evaporation Model
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IS	Interner Standard
KCN	Kaliumcyanid
k.A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton (10 ³ Dalton)
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Kaliumcyanoferrat
kg	Kilogramm (10 ³ Gramm)
KG	Körpergewicht

kV	Kilovolt (10^3 Volt)
L	Einheit: Liter Zelle: Leukozyt
λ	Wellenlänge
LC	Flüssigchromatographie (engl.: <u>L</u> iquid- <u>C</u> hromatography)
LDL	Low-density-Lipoproteine
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl.: <u>L</u> iquid- <u>L</u> iquid- <u>E</u> xtraction)
Lsg.	Lösung
max.	maximal
MeOH	Methanol
MF	Membranfiltration
min	Minute
mL	Milliliter (10^{-3} Liter)
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
mM	Millimolar (10^{-3} Mol)
$[M-NH_4]^+$	Ammonium-Addukt
MPa	Mega Pascale (10^6 Pascale)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometer
mTOR	mammalian target of rapamycine

mV	Millivolt (10^{-3} Volt)
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
μL	Mikroliter (10^{-6} Liter)
Na^+	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
n.b.	nicht bestimmt
NBS	Neugeborenenenscreening (engl.: <u>N</u> ew <u>b</u> orn <u>S</u> creening)
NF-AT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NH_3	Ammoniak
NH_4^+	Ammoniumionen
NH_4Ac	Ammoniumacetat
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NH_4OH	Ammoniumhydroxid
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
Nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
PE	Plasmaeiweißbindung
PEG	Polyethylenglycol
POCT	Vor-Ort-Test (engl.: <u>P</u> oint- <u>o</u> f- <u>C</u> are <u>T</u> est)
PP	Proteinpräzipitation
Q1-3	Quadrupol 1-3

RAM	Material mit eingeschränkter Zugänglichkeit (engl.: <u>R</u> estricted <u>A</u> ccess <u>M</u> aterial)
RSD	relative Standardabweichung (engl.: <u>r</u> elative <u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
RT	Raumtemperatur
s	absolute Standardabweichung
SD	Standardabweichung (engl.: <u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
sec	Sekunde (engl.: <u>s</u> ec <u>o</u> nd)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <u>S</u> ize- <u>E</u> xclusion- <u>C</u> hromatography)
SIM	Selected Ion Monitoring
s_{rel}	relative Standardabweichung
T	Thrombozyt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_A	Durchbruchzeit des Analyten
$t_{applied}$	festgelegte Heizdauer
TAS	Totales Analysesystem (engl.: <u>T</u> otal <u>A</u> nalysis <u>S</u> ystem)
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TFA	Trifluoressigsäure
t_{heat}	errechnete Heizdauer
TIC	Total Ionen Chromatogramm
t_M	Fraktionierungsdauer der Matrix

t_{\max}	Pharmakokinetik: Zeitpunkt der maximalen Wirkstoffkonzentration CDB: maximale Aufheizzeit
t_{\min}	minimale Heizdauer
TNF	Tumornekrosefaktor
t_T	Transferzeit
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
V	Pharmakokinetik: Verteilungsvolumen Massenspektrometer: Volt
VB	Vollblut
V_B	Durchbruchvolumen (engl.: <u>v</u> olume <u>b</u> reakthrough)
$V_{F(P)}$	zu programmierendes Fraktionierungsvolumen
V_E	Elutionsvolumen (engl.: <u>v</u> olume <u>e</u> lution)
$V_{E(P)}$	zu programmierendes Elutionsvolumen
V_F	Fraktionierungsvolumen (engl.: <u>v</u> olume <u>f</u> ractionation)
VIS	für das menschliche Auge sichtbar (engl.: <u>v</u> isible)
VLDL	Very-low-density-Lipoproteine
Vk	Variationskoeffizient
vol. %	Volumenprozent
v/v	Volumenanteil
$V_{X(P)}$	zu programmierendes Volumen X
X	Sicherheitszuschlag

z.B.	zum Beispiel
ZnSO ₄	Zinksulfat
%	Prozent
«	bedeutend kleiner als

12.2 Geräte und Materialien

Hitzeschockbehandlung (off-line)

Glaskapillaren	60 x 0,5 mm I.D., No. 565 (Hecht Assistent, Sondheim, D)
Hämatokrit-Versiegelungskit	Cat. No. 749510 (BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D)
Wasserkocher	Emide, Lohr am Main, D
Zählkammer	Neubauer improved bright-line (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, D)
Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Photometer	1101 M (Eppendorf AG, Hamburg, D)

In-line Prozessierung-SPE-LC-UV/-MS/MS

Prozessierung	beheizte Edelstahlkapillare 300 x 0,5 mm I.D. (Spark Holland B.V., Emmen, NL)
Probengeber	Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL)
SPE-Einheit	Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL)
Hochdruckkolbenpumpen	Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL)
HPLC-Pumpen	Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL)
Säulenofen	Mistral (Spark Holland, Emmen, NL)
Interface	D-7000 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D)
UV-Detektor	L-7400 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D)
Massenspektrometer	Quattro Micro™ (Micromass, Manchester, UK)
Software	MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, USA) Symbiosis™ Pharma for MassLynx (Spark Holland B.V., Emmen, NL) SparkLink 3.10 # 3 build 2 (Spark Holland B.V., Emmen, NL) D-7000 HSM vers. 4.1 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D)

Sonstiges

pH-Meter	Metrohm 691 (Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, D)
Ultraschallgerät	Sonorex (Bandelin electronic, Berlin, D)
Waage	CP 225 D-OCE (Sartorius AG, Göttingen, D)
Zentrifuge	centrifuge 5415-D (Eppendorf AG, Leipzig, D)

SPE-Packungsmaterialien

C8, 10 x 2 mm I.D., dp 40-90 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere C2, 10 x 2 mm I.D., dp 7 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere C2-SE, 10 x 2 mm I.D., dp 7 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere C8, 10 x 2 mm I.D., dp 8 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere C8-SE, 10 x 2 mm I.D., dp 8 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere Resin GP, 10 x 2 mm I.D., dp 10-12 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Hysphere Resin SH, 10 x 2 mm I.D., dp 25-35 µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Oasis HLB, 10 x 2 mm I.D., dp 30 µm (Waters Corp., Milford, USA)

Analytische Trennsäulen

Antimykotika:	LiChrospher® 100 RP 18-EC, 125 x 2 mm I.D., dp 5 µm (Ziemer, Langerwehe, D)
Immunsuppressiva:	LiChrospher® 100 RP 18-EC, 125 x 2 mm I.D., dp 5 µm (Ziemer, Langerwehe, D)
	Luna® Phenyl-Hexyl, 50 x 2 mm I.D., dp 5 µm, (Phenomenex GmbH, Aschaffenburg, D)

12.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Ascomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ciclosporin A	Novartis International, Basel, CH
Ciclosporin D	Novartis International, Basel, CH
Clin Cal®	Recipe Chemicals + Instruments GmbH, München, D
Desmethoxysirolimus	Wyeth Research, Princeton, NJ, USA
Everolimus	Novartis International, Basel, CH
Itraconazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1-OH-Itraconazol	Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, B
R 51012 (IS Itraconazol)	Janssen Biotech N.V., Beerse, B
Sirolimus	Wyeth Research, Princeton, NJ, USA
Tacrolimus	Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, J
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, NL

Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ammoniak-Lsg.	Merck KGaA, Darmstadt, D
BCA™ Protein Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Drabkin's Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Isoton. NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Lipofundin® MCT 20 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
THROMBO PLUS®	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Trypanblau-Lösung	Fluka, Steinheim, D
Tutofusin®	Baxter Deutschland GmbH, München-Unterschleißheim, D
Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL

12.4 Geräteparameter

12.4.1 In-line Prozessierung (VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)) -SPE-LC

Kolbenpumpe 1 (HPD 1)				HPLC-Pumpe			
Vorgang	mobile Phase	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Volumen [μL]	Vorgang	mobile Phase	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Volumen [μL]
Konditionierung	H ₂ O	2000	1000	Equilibrierung	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	250	1625
	H ₂ O/MeOH (50/50, v/v)	2000	1000				
	MeOH	2000	2000				
	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	1000				
in-line Prozessierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	270	590				
Fraktionierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	4000	Transfer	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	250	500
				Analytische Trennung	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	250	1000

Tab. 65: Bedingungen für die in-line Prozessierung (VB:DMSO (97,5/2,5, v/v))-SPE-LC; Prozessierungstemperatur: 75°C

12.4.2 Bestimmung des Fraktionierungs- und Durchbruchvolumens (V_F und V_B)

= In-line Prozessierung [VB:DMSO (97,5/2,5, v/v) bzw. Standardlösung]-SPE

Kolbenpumpe 1 (HPD 1)				HPLC-Pumpe				
<i>Vorgang</i>	<i>mobile Phase</i>	<i>Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]</i>	<i>Volumen [μL]</i>	<i>Vorgang</i>	<i>mobile Phase</i>	<i>Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]</i>	<i>Volumen [μL]</i>	
Konditionierung	H ₂ O	2000	1000	Equilibrierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	270	675	
	H ₂ O/MeOH (50/50, v/v)	2000	1000					
	MeOH	2000	2000					
	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	1000					
				in-line Prozessierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	270	590	
				Fraktionierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	16000	

Tab. 66: *Bedingungen für die Bestimmung des Fraktionierungs- und Durchbruchvolumens (V_F und V_B); Prozessierungstemperatur: 75°C*

12.4.3 Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E)

Kolbenpumpe 1 (HPD 1)				HPLC-Pumpe			
Vorgang	mobile Phase	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Volumen [μL]	Vorgang	mobile Phase	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Volumen [μL]
Konditionierung	H ₂ O	2000	1000	Equilibrierung	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	250	1625
	H ₂ O/MeOH (50/50, v/v)	2000	1000				
	MeOH	2000	2000				
	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	1000				
in-line Prozessierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	270	590				
Fraktionierung	H ₂ O/ACN (95/5, v/v)	2000	4000	Transfer	MeOH/2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v)	250	1500

Tab. 67: Bedingungen für die Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E);

Prozessierungstemperatur: 75°

12.4.4 MS/MS Detektion

12.4.4.1 Immunsuppressiva

Source-Parameter (ES+)		Analyser	
Capillary (kV)	3,2	LM 1 Resolution	10,0
Cone (V)	variabel	HM 2 Resolution	10,0
Extractor (V)	2,0	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,1	Entrance	-1
Source Temp. (°C)	120	Collision	variabel
Desolvation Temp. (°C)	220	Exit	1
Cone Gas Flow (L/h)	40	LM 2 Resolution	10,0
Desolvation Gas Flow (L/h)	700	HM 2 Resolution	10,0
		Ion Energy 2	3,0
		Multiplier	650

Tab. 68: MS-Parameter für die Analyse der Immunsuppressiva

Analyt	Precursorion [Da]	Produktion [Da]	Konus- spannung [V]	Kollisions- energie [eV]
Ascomycin (IS)	809,8	756,5	25	20
Ciclosporin A	1220,0	1203,0	20	15
Ciclosporin D (IS)	1234,0	1217,0	20	15
Desmethoxysirolimus (IS)	901,8	834,6	20	18
Everolimus	976,0	908,5	20	20
Sirolimus	931,5	864,0	20	20
Tacrolimus	821,7	768,6	25	22

Tab. 69: *Precursor- und Produktionen der untersuchten Immunsuppressiva*

12.4.4.2 Antimykotika

Source-Parameter (ES+)		Analyser	
Capillary (kV)	3,2	LM 1 Resolution	12,0
Cone (V)	variabel	HM 2 Resolution	12,0
Extractor (V)	2,0	Ion Energy 1	1,0
RF Lens (V)	0,0	Entrance	-1
Source Temp. (°C)	120	Collision	variabel
Desolvation Temp. (°C)	220	Exit	1
Cone Gas Flow (L/h)	40	LM 2 Resolution	12,0
Desolvation Gas Flow (L/h)	700	HM 2 Resolution	12,0
		Ion Energy 2	2,0
		Multiplier	650

Tab. 70: MS-Parameter für die Analyse der Antimykotika

Analyt	Precursorion [Da]	Produktion [Da]	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]
Itraconazol	705,07	392,12	47	35
1-OH-Itraconazol	721,09	408,05	43	35
IS	733,11	420,40	53	38

Tab. 71: Precursor- und Produktionen der untersuchten Antimykotika

12.5 Definitionen

12.5.1 Standardabweichung

Die Präzision (= Grad für die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau den gleichen Bedingungen) wird durch die Standardabweichung erfasst.

Absolute Standardabweichung (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n = Anzahl an Messungen

x_i = Messergebnis (Einzelwert)

\bar{x} = Mittelwert

Relative Standardabweichung (s_{rel})(Variationskoeffizient, Vk):

$$s_{rel} = \frac{s \times 100}{\bar{x}} [\%]$$

s = absolute Standardabweichung

\bar{x} = Mittelwert

13 Literaturverzeichnis

- 1 **Vogeser M et al.** Quantification of Sirolimus by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using On-Line Solid-Phase Extraction. *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**: 40-45
- 2 **Lindholm A** Factors Influencing the Pharmacokinetics of Cyclosporine in Man. *Ther Drug Monit* 1991; **13**: 465-477,
- 3 **Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ** Changes in Tacrolimus Distribution in Blood and Plasma Protein Binding Following Liver Transplantation. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 506-515
- 4 **Yatscoff R, LeGatt D, Keenan R, Chackowsky P** Blood Distribution of Rapamycin. *Transplantation* 1993; **56**: 1202-1206
- 5 **Lemaire M, Tillement JP** Role of lipoproteins and erythrocytes in the vitro binding and distribution of cyclosporine A in the blood. *J. Pharm. Pharmacol.* 1982; **34**: 715-718
- 6 **Kovarik JM et al.** Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post transplant year: Pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**: 48-56
- 7 **Wallemacq PE, Verbeek RK** Comparative Clinical Pharmacokinetics of Tacrolimus in Paediatric and Adult Patients. *Clin Pharmacokinet* 2001; **40**: 283-295
- 8 **Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP** Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clin Pharmacokinetics* 2004; **43**: 83-95
- 9 **Ceglarek U et al.** Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2004; **346**: 181-190
- 10 **Streit F, Armstrong VW, Oellerich M** Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus and Cyclosporine A in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 2002; **48**: 955-958
- 11 **Koal T et al.** Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2004; **805**: 215-222

-
- 12 **Deters M et al.** Simultaneous Quantification of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus and Cyclosporine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**: 285-292
- 13 **Vogeser M, Spöhrer U** Pitfall in the high-throughput quantification of whole blood cyclosporin A using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2005; **43**: 400-402
- 14 **Boernsen KO et al.** Assessment and validation of MS/MS fragmentation patterns of the macrolide immunosuppressant Everolimus. *J. Mass Spectrom.* 2007; **42**: 793-802
- 15 **Kolokolova et al.** Metabolic Analysis of Human Biological Fluids by ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of Analytical Chemistry* 2008; **63**: 104-120
- 16 **Hu S et al.** Human body fluids proteome analysis. *Proteomics* 2006; **6**: 6326-6353
- 17 **de Oliveira CDR et al.** Recent advances in chromatographic methods to detect drugs of abuse in alternative biological matrices. *Current Pharmaceutical Analysis* 2007; **3**: 95-109
- 18 **Mutschler E et al.** Blut Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen.* 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 589-601, 3-8047-1763-2
- 19 **Berger J** Hrsg.: Max-Planck-Institut, Tübingen, Internet:
http://www.bilder.mpg.de/bildergalerie/pic2003_02/Web_Standard.jpg, Stand: 1.11.2008
- 20 **Dörner K et al.** Aminosäuren, Proteine und Enzyme. Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie.* 6., Stuttgart, Thieme, 2006; 103-132, 3-13-129716-6
- 21 **Dörner K et al.** Allgemeine Klinische Chemie. Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie.* 6., Stuttgart, Thieme, 2006; 1-85, 3-13-129716-6
- 22 **Cappiello A, Famiglini G, Rossi L, Magnani M** Use of Nonvolatile Buffers in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Advantages of Capillary-Scale Particle Beam Interfacing. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 5136-5141
- 23 **Vissers JPC, Chervet JP, Salzmann JP** Sodium Dodecyl Sulphate Removal from Tryptic Digest Samples for On-line Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 1996; **31**: 1021-1027
- 24 **Blanchard J** Evaluation of relative efficiency of various techniques for deprotonizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography* 1981; **226**: 455-460
- 25 **Alpert AJ, Shukla AK** *Precipitation of Large, High-Abundance Proteins from Serum with Organic Solvents.* ABRF, Denver, 2003; Poster # P111-W

-
- 26 **Annesley TM, Clayton L** Simple Extraction Protocol for Analysis of Immunosuppressant Drugs in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 2004; **50**: 1845-1848
- 27 **Polson C et al.** 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
- 28 **Vogeser M, Spöhrer U** Automated processing of whole blood samples for the determination of immunosuppressants by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 1126-1130
- 29 **ChromBook** Hrsg.: Merck, *Sample Preparation*, 2006/2007, 18-21
- 30 **Joensson JA, Mathiasson L** Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. *trends in analytical chemistry* 1999; **18**: 318-325
- 31 **Hoeltzenbein P, Bohn G, Rücker G** Entfernung körpereigener Substanzen aus Harnproben an EXTrelut zur gas-chromatographischen Analyse saurer und neutraler Arzneistoffe. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1978; **292**: 216-218
- 32 **Brettel HF, Schmidt K, Koch U** Über rasch tödlich verlaufende Vergiftungen mit Prajmaliumbitartrat. *Z. Rechtsmed.* 1978; **82**: 231-236
- 33 **van de Merbel NC** Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1999; **856**: 55-82
- 34 **Lindner M, Bettendorf M, Hoffmann GF** Fachinformation Neugeborenencreening. *Universitätsklinikum Heidelberg*, Heidelberg, 2006; 1-18
- 35 **Hoogtanders K et al.** Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; **44**: 658-664
- 36 **Hoogtanders K et al.** Dried Blood Spot Measurement of Tacrolimus Is Promising for Patient Monitoring. *Transplantation* 2007; **83**: 237-238
- 37 **Chromsystems** *Probenvorbereitung Neugeborenencreening.*
<http://www.chromsystems.de/Probenvorbereitung.664.0.html>, Stand: 1.9.2008
- 38 **Pribush et al.** Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; **1558**: 119-132
- 39 **Hoffman JF** On red blood cells, Hemolysis and released ghosts. *Adv Exp Med Biol.* 1992; **326**: 1-15
- 40 **Ponder E** On Properties of the Red Cell Ghosts. *Journal of experimental Biology* 1942; **18**: 257-265
- 41 **Jay AWL, Rowlands S** The stages of osmotic haemolysis. *J. Physiol.* 1975; **252**: 817-832

-
- 42 **Rücker G, Neugebauer M, Willems GG** Hochleistungs-Flüssigchromatographie Hrsg.: Rücker G, Neugebauer M, Willems GG, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*3., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 440-487, 3-8047-1739-X
- 43 **Spark Holland B.V.** *Symbiosis Product Family* Hrsg.: Spark Holland B.V., Emmen/NL, 2004
- 44 **Boos KS, Fleischer CT** Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius J Anal Chem* 2001; **371**:16-20
- 45 **Morello R** Probenaufbereitung für die HPLC. *Standardisierung der klinisch-chemischen Präanalytik von harngängigen Markermolekülen und Bestimmung von Katecholaminen mittels on-line SPE-HPLC-ECD*. München, Hieronymos Verlag, 2007; 83-85,
- 46 **Schütze D et al.** Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the analysis of neurokinin-1 antagonist and its metabolite using automated solid-phase sample preparation and automated data handling and reporting. *J. Chromatogr. B* 2000; **748**: 55-64
- 47 **Harrison AC, Walker DK** Automated 96-well solid phase extraction for the determination of doramectin in cattle plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; **16**: 777-783
- 48 **Tong XS et al.** High-throughput pharmacokinetics screen of VLA-4 antagonists by LC/MS/MS coupled with automated solid-phase extraction sample preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; **35**: 867-877
- 49 **SPARK Holland B.V.** *On-line SPE-LC-MS/MS Symbiosis Training from Spark Holland*. Hrsg.: Spark Holland B.V., 2005; Emmen/NL
- 50 **Koal et al.** Direct and fast determination of antiretroviral drugs by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 299-305
- 51 **Alnouti Y et al.** Development and application of new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. *J. Chromatogr. A* 2005; **1080**: S.99-106
- 52 **Huber JFK, van der Linden R** Column switching in high-pressure liquid chromatography *Journal of Chromatography* 1973; **83**: 267-277
- 53 **Oertel R et al.** Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing. *J. Chromatogr. A* 1998; **797**: 203-209
- 54 **Panholzer et al.** Coupled-Column Liquid Chromatographic Analysis of Catecholamines, Serotonin, and Metabolites in Human Urine. *Clinical Chemistry* 1999; **45**: 262-268
- 55 **Web of Science** Stand: 22.05.2008

-
- 56 **Kirschbaum KM et al.** LC with Column-Switching and Spectrophotometric Detection for Determination of Risperidone and 9-Hydroxyrisperidone in Human Serum. *Chromatographia* 2008; **67**: 321-324
- 57 **Schettgen T et al.** Fast determination of urinary S-phenylmercapturic acid (S-PMA) and S-benzylmercapturic acid (S-BMA) by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2008; **863**: 283-292
- 58 **Wang Q et al.** Quantification of puerarin in plasma by on-line solid-phase extraction column switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its applications to pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* 2008; **863**: 55-63
- 59 **Santos-Neto AJ et al.** Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in column switching liquid chromatographic system. *J. Sep. Sci* 2008; **31**: 78-85
- 60 **Mullett WM** Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007; **70**: 263-273
- 61 **Desilets CP et al.** Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1991; **544**: 25-39
- 62 **Boos KS, 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
- 63 **Cassiano NM et al.** Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2006; **384**: 1462-1469
- 64 **Boos KS, Grimm KH** High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. *trends in analytical chemistry* 1999; **18**: 175-180
- 65 **Chiap P et al.** Use of novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2002; **975**: 145-155
- 66 **Satinsky D et al.** On-line coupling of sequential injection extraction with restricted access materials for sample clean-up and analysis of drugs in biological fluids. *Analyst* 2003; **128**: 351-356
- 67 **Morello R** Probenaufbereitung für die HPLC. *Standardisierung der klinisch-chemischen Präanalytik von harngängigen Markermolekülen und Bestimmung von Katecholaminen mittels on-line SPE-HPLC-ECD* Hieronymos Verlag München 2007; 91
- 68 **Dooley KC** Tandem mass spectrometry in clinical chemistry laboratory. *Clinical Biochemistry* 2003; **36**: 471-481
- 69 **Fiedler GM et al.** Anwendungen der Massenspektrometrie in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin *J Lab Med* 2004; **28**: 185-194

-
- 70 **Annesley TM** Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2003; **49**: 1041-1044
- 71 **Syage JA et al.** Atmospheric Pressure Photoionization-The Second Source for LC-MS? *LCGC North America* 2008; **26**: 286-296
- 72 **Herderich M et al.** Application of Atmospheric Pressure Ionization HPLC-MS-MS for the Analysis of Natural Products. *Chromatographia* 1997; **45**: 127-132
- 73 **Bruins AP** Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry- I. Instrumentation and ionization techniques. *Trends in Analytical Chemistry* 1994; **13**: 37-43
- 74 **Gross JH** *Mass Spectrometry A Textbook* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 2004
- 75 **Schneider H, Steimer W** Tandem-Massenspektrometrie in der therapeutischen Arzneimittel-Bestimmung: Praxis und Tücken der Anwendung. *J Lab Med* 2006; **30**: 428-437
- 76 <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.gif>, Stand: 14.7.2008
- 77 http://www.separationsnow.com/.../mallet_nov06_fig4.jpg, Stand: 14.7.2008
- 78 **Waters** *micromass user's guide*, 2000
- 79 **Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K** The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1999; **13**: 1175-1185
- 80 **Streit F et al.** Mass interferences in quantification of Cyclosporine using tandem mass spectrometry without chromatography. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 506
- 81 **Peng L, McGinley M** "Dilute-and-Shoot" Analysis of Urine Samples by LC-MS-MS Using Onyx 3 mm Monolith Columns. *LCGC Europe* 2007; 25
- 82 **McCauley-Myers DL 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; **23**: 825-835
- 83 **King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T** Mechanic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000; **11**: 942-950
- 84 **Georgi K, Boos KS** Multidimensional On-Line SPE for Undisturbed LC-MS-MS Analysis of Basic Drugs in Biofluids. *Chromatographia* 2006; **63**: 523-531
- 85 **Kloepfer A et al.** Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 2005; **1067**: 153-160
- 86 **Taylor PJ** Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2005; **38**: 328-334

-
- 87 **Kruve A et al.** Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 2008; **1187**: 58-66
- 88 **FDA** Ion Suppression and Matrix Effects. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* 2001
- 89 **Annesley TM** Methanol-Associated Matrix Effects in Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2007; **53**: 1827-1834
- 90 **Cech NB, Enke CG** Relating Electrospray Ionization Response to Nonpolar Character of Small Peptides. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 2717-2723
- 91 **Niessen WMA, Manini P, Andreoli R** Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 2006; **25**: 881-899
- 92 **Georgi K** Massenspektrometrie in der Bioanalytik. *Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS* München 2007; 35
- 93 **O'Halloran S, Ilett KF** Evaluation of a Deuterium-Labeled Internal Standard for the Measurement of Sirolimus by High-Throughput HPLC Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2008; **54**: 1386-1389
- 94 **Choi BK, Gusev AI, Hercules DM** Postcolumn Introduction of an Internal Standard for Quantitative LC-MS Analysis. *Anal. Chem.* 1999; **71**: 4107-4110
- 95 **Kirchner GI et al.** Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1999; **721**: 285-294
- 96 **Taylor PJ et al.** A HPLC-mass spectrometric method suitable for the therapeutic drug monitoring of everolimus. *J. Chromatogr. B* 2007; **848**: 208-214
- 97 **Mutschler E et al.** Immunsystem und immunologisch wirksame Stoffe Antimykotika Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 909-938, 3-8047-1763-2
- 98 **Christians U et al.** Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J. Chromatogr. B* 2000; **748**: 41-53
- 99 **Deters M et al.** Liquid chromatography/mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Analytica Chimica Acta* 2003; **492**: 133-145
- 100 **Sehgal SN** Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. *Clinical Biochemistry* 1998; **31**: 335-340
- 101 **Novartis** *Fachinformation Certican Tabletten* Hrsg.: Novartis Pharma, Wien, 2004
- 102 **Steinhilber D** Pharmakologie der Immunsuppressiva. *Pharm. Unserer Zeit* 2005; **4**: 276-281

-
- 103 **Mutschler E et al.** Pharmakodynamik Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 60-86
- 104 **Soldin SJ** Role of Immunophilins in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs, *Clinical Biochemistry* 1998; **31**: 381-384
- 105 **Armstrong VW** Principles and Practice of Monitoring Immunosuppressive Drugs. *J Lab Med* 2002; **26**: 27-36
- 106 **Wyeth** Fachinformation Rapamune 1mg/-2mg überzogene Tabletten Hrsg.: Wyeth, Münster, 2007
- 107 **Kaever V, Resch K** Prinzipien der Immunsuppression. *Pharmazie unserer Zeit* 2005; **4**: 1386-1389
- 108 **Astellas Pharma** Fachinformation Prograf Hartkapseln Hrsg.: Astellas Pharma GmbH, München, 2006
- 109 **Novartis** Sandimmun Optoral Produktmonographie Hrsg.: Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, 2001
- 110 **Lewis R et al.** Stability of renal allograft glomerular filtration ratio associated with long term use of Cyclosporine A. *Transplantation* 1993; **55**: 1014-1017
- 111 **Lewis RM et al.** Impact of long-term cyclosporine immunosuppressive therapy on native kidneys versus renal allografts: serial renal function in heart and renal transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant* 1991; **10**: 63-70
- 112 **Dressman J** *Biopharmazeutische Prinzipien* Frankfurt, 2002
- 113 **Mancinelli LM et al.** The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: A comparison across ethnic groups. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**: 24-31
- 114 **Mutschler E et al.** Pharmakokinetik Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 5-59
- 115 **Holt DW, Johnston A** Monitoring Immunosuppressive Drugs. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 244-247
- 116 **Kahan BD et al.** Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs in Clinical Practice. *Clinical Therapeutics* 2002; **24**: 330-350
- 117 **Dörner K et al.** Therapeutisches Drugmonitoring Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie*, 6. Stuttgart, New York, Thieme Verlag, 2006; 483-488, 3-13-129716-6
- 118 **Taylor PJ** Immunosuppressant Drug Monitoring by High-performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry - A Case Study. *Labtech* 2004; 1-6
- 119 **Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R et al.** Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 642-654
- 120 **Johnston A, Holt DW** Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1998; **47**: 339-350

-
- 121 **Bebnet LZ** Relevance of Pharmacokinetics in Narrow Therapeutic Index Drugs. *Transplantation Proceedings* 1999; **31**: 1642-1644
- 122 **Taylor PJ** Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 215-219
- 123 **Shaw LM et al.** Current Opinions on Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. *Clinical Therapeutics* 1999; **21**: 1632-1652
- 124 **Amini H, Ahmadiani A** Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2003; **795**: 209-214
- 125 **Simpson J et al.** A Specific Method for the Measurement of Cyclosporin A in Human Whole Blood by Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 294-300
- 126 **Salm P et al.** A rapid HPLC-mass spectrometry cyclosporin method suitable for current monitoring practices. *Clinical Biochemistry* 2005; **38**: 667-673
- 127 **Taylor PJ, Jones A et al.** Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK 506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 1996; **42**: 279-285
- 128 **Jimenez O et al.** Defining the Initial Doses of Sirolimus and Tacrolimus in the Period Immediately After Renal Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2003; **35**: 1686-1688
- 129 **Kahan BD et al.** Therapeutic drug Monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity. *Clin Transplantation* 2000; **14**: 97-109
- 130 **Kirchner GI et al.** Fast quantification Method for Sirolimus and its Major Metabolites. *Transplantation Proceedings* 2001; **33**: 1091-1092
- 131 **Baldelli S et al.** High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of Everolimus. *J. Chromatogr. B* 2005; **816**: 99-105
- 132 **Streit F et al.** Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 1996; **42**: 1417-1425
- 133 **Khoschorur GA** Simultaneous Measurement of Sirolimus and Everolimus in Whole Blood by HPLC with Ultraviolet Detection. *Clinical Chemistry* 2005; **51**: 1721-1724
- 134 **SPARK Holland B.V.** Automated HPLC analysis of Cyclosporin A/D in whole blood samples using On-line solid phase extraction. *Application info 32* Hrsg.: Spark Holland B.V., Emmen/NL, 1997
- 135 **Moyano MA et al.** Validation of a liquid chromatographic method for determination of tacrolimus in pharmaceutical dosage forms. *Journal of AOAC International* 2006; **89**: 1547-1551
- 136 **Oellerich M et al.** The Role of Therapeutic Drug Monitoring in Individualizing Immunosuppressive Drug Therapy: Recent Developments. *Ther Drug Monit* 2006; **28**: 720-725

-
- 137 **Applied Biosystems** A new LC/MS/MS Research Method for Rapid Quantification of Five Immunosuppressant Drugs, including Mycophenolic Acid (MPA). *Application Note-Clinical Research* Hrsg.: Applied Biosystems, 2005
- 138 **Koster E et al.** On-line SPE-LC-MS as a platform for the fast determination of immunosuppressants in biological samples. Hrsg.: Spark Holland, 2002; 1-12
- 139 **Zeile G, Baake M, Henrici G, Zeile G, Baake M, Henrici G** *Kompendium der praktischen Hämatologie* Darmstadt
- 140 **Merck KGaA** Trypanblau (C.I. 23850) für die Mikroskopie Hrsg.: Merck KGaA, Darmstadt, 2004
- 141 **Sigma-Aldrich** Drabkin's Reagent Hrsg.: Sigma-Aldrich, Saint Louis/USA
- 142 **Mutschler E et al.** Arzneimittelentwicklung und -prüfung Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 120-131, 3-8047-1763-2
- 143 **Dörner K et al.** Hämatologie Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie* 6., Stuttgart, New York Thieme-Verlag, 2006; 232-279, 3-13-129716-6
- 144 **Schmidt RH** Gelation and Coagulation. *American Chemical Society* 1981; 131-147
- 145 **Totosaus A et al.** A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology* 2002; **37**: 589-601
- 146 **Graham SJ et al.** Analysis of Changes in MR Properties of Tissues After Heat Treatment. *Magnetic Resonance in Medicine* 1999; **42**: 1061-1071
- 147 **Mordon S et al.** Dynamics of Temperature Dependent Modifications of Blood in the Near-Infrared. *Lasers in Surgery and Medicine* 2005; **37**: 301-307
- 148 **Abela GS et al.** In vitro Effects of Argon Laser Radiation on Blood: Quantitative and Morphologic Analysis. *JACC* 1985; **5**: 1061-1071
- 149 **Wood BR et al.** Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes. *Journal of Biomedical Optics* 2005; **10**: 231-237
- 150 **Petraschek E** *Nobelpreis Ausstellung Abu Dhabi*, 2007
- 151 **Baxter** *Fachinformation Tutofusin* Hrsg.: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, 2003
- 152 **B. Braun** *Nutriflex* Hrsg.: B.Braun Petzhold GmbH, Melsungen
- 153 **Sigma-Aldrich** *Laborchemikalien und analytische Reagenzien* Hrsg.: Sigma-Aldrich, 2007/2008
- 154 **Dominik A, Steinhilber D** Teil 2: Chromatographische Methoden. Hrsg.: Dominik A, Steinhilber D *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten* 1., Ulm, Stuttgart, Jena, Lübeck, GIT Verlag Ernst Giebler, 1996; 150-158, 3-8243-1811-3

-
- 155 **Rakow AL, Hochmuth RM** Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocyte membrane. *Biophysical Journal* 1975; **15**: 1095-1100
- 156 **Dörner K et al.** Hämostaseologie Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie* 6., Stuttgart, New York Thieme-Verlag, 2006; 280-314, 3-13-129716-6
- 157 **Koch J** Einleitung *Synaptobrevin-beladene ghosts: Aufbau eines Modellsystems zur Untersuchung des Translokationsschrittes von Tetanustoxin* Hannover, 2006; 9-10
- 158 **Dodge JT et al.** The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; **100**: 119-130
- 159 **Bodemann H, Passow H** Factors Controlling the Resealing of the Membrane of Human Erythrocyte Ghosts after Hypotonic Hemolysis. *J. Membrane Biol.* 1972; **8**: 1-26
- 160 **Lieber MR, Steck TL** Dynamics of the Holes in Human Erythrocyte Membrane Ghosts. *The Journal of Biological Chemistry* 1982; **19**: 11660-11666
- 161 **Lieber MR, Steck TL** A Description of the Holes in Human Erythrocytes Membrane Ghosts. *The Journal of Biological Chemistry* 1982; **257**: 11651-11659
- 162 **Zimmermann U et al.** Enzyme loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; **436**: 460-474
- 163 **Dale GL et al.** High-Yield Entrapment of Proteins into Erythrocytes. *Biochemical Medicine* 1977; **18**: 220-225
- 164 **Gershfeld NL, Murayama M** Thermal Instability of Red Blood Cell Membrane Layers: Temperature Dependence of Hemolysis. *J. Membrane Biol.* 1988; **101**: 67-72
- 165 **Ham TH et al.** Studies on the destruction of red blood cells. *Blood* 1948; **3**: 373-403
- 166 **Coakley WT et al.** Morphological changes, haemolysis and microvesicularization of heated human erythrocytes. *J. therm. Biol.* 1979; **4**: 85-93
- 167 **Lepock JR et al.** Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins *Biochimica et Biophysica Acta* 1989; **980**: 191-201
- 168 **Zarkowsky HS** Heat-induced Erythrocyte Fragmentation in Neonatal Elliptocytosis. *British Journal of Haematology* 1979; **41**: 515-518
- 169 **Ponder E** Shape and shape transformations of heated human red cells. *J. exp. Biol.* 1949; **26**: 35-45
- 170 **Coakley WT, Deedley JWT** Effects of ionic strength, serum protein and surface charge on membrane movements and vesicle production of heated erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; **602**: 355-375

-
- 171 **Lerche D, Bäuml H** Moderate heat treatment of only red blood cells (RBC) slows down the rate of RBC-RBC aggregation in plasma. *Biorheology* 1984; **21**: 393-403
- 172 **Nilsson AMK et al.** Changes in Optical Properties of Human Whole Blood in vitro Due to Slow Heating. *Photochemistry and Photobiology* 1997; **65**: 366-373
- 173 **PIERCE** *Instructions: BCA Protein Assay Kit* Hrsg.: PIERCE, Rockford/USA, 1-6
- 174 **Dominik A, Steinhilber D** Grundlagen der Chromatographie Hrsg.: Dominik A, Steinhilber D, *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten*. 1., Ulm, Stuttgart, Jena, Lübeck; Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer, 1996, 138-149, 3-8243-1811-3
- 175 **Spark Holland B.V.** Email, 25.7.2005
- 176 **Majors RE, Boos KS, Grimm CH, Lubga D, Wieland G** Practical Guidelines for HPLC-Integrated Sample Preparation Using Column Switching. *LCGC* 1996; **14**: 554-560
- 177 **Georgi K** Multidimensionale (MD)-Festphasenextraktion. *Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS* München 2007; 45-64
- 178 **Kuettermann** Hrsg.: Universität Saarland,
http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum_Bioinf/VZ_huettermann_skript_2006.pdf
Stand: 10.8.2008
- 179 **Phenomenex** Luna Hrsg.: Phenomenex *Produktinformation*. Aschaffenburg, 1-28
- 180 **Niessen WM** A State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1999; **856**: 179-197
- 181 **Spark Holland B.V.** *Spark Holland HySphere phases* <http://www.sparkholland.com>, Stand: 15.5.2008
- 182 **Waters** *Oasis Sample Extraction-Chemistry*
<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6D6PXM>, Stand: 30.7.2007
- 183 **Vogeser M** *Immunsuppressiva: LC-TMS-Arbeitsanleitung* Hrsg.: Vogeser M, München, 1-2, Stand: 9.6.2005
- 184 **Shen JX et al.** 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
- 185 **Dörner K et al.** Fettstoffwechsel Hrsg.: Dörner K, *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie* 6., Stuttgart, New York Thieme-Verlag, 2006; 151-168, 3-13-129716-6
- 186 **Mutschler E et al.** Antimykotika Hrsg.: Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8., Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2001; 831-839, 3-8047-1763-2

187 **Vogeser M, Spöhrer U, Schiel X** Determination of Itraconazole and Hydroxyconazole in Plasma by Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with On-line Solid-Phase Extraction. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 915-920

188 **Koal T et al.** Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; **19**: 2995-3001

14 Verzeichnis: Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Manuelle und mit einem Pipettierroboter durchzuführende Methoden zur Aufbereitung von Vollblutproben für die LC-MS/MS-Analyse.....	16
Abb. 2: On-line Methode zur Aufbereitung von proteinhaltigen Sekundärproben	18
Abb. 3: Gewinnung von CDB durch in-line / integrale Prozessierung von Vollblut und anschließender on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse der Analyten.....	20
Abb. 4: Aufnahme von Blutzellen mit einem Rasterelektronenmikroskop ¹⁹	24
Abb. 5: Zusammensetzung von Vollblut.....	25
Abb. 6: Schematische Darstellung der Hämatopoese ¹⁸	26
Abb. 7: Schematische Darstellung der Größenausschlusschromatographie (engl.: Size-Exclusion-Chromatography; SEC) ⁴²	40
Abb. 8: Modus operandus der Festphasenextraktion: off-line ⁴⁵	44
Abb. 9: Modus operandus der Festphasenextraktion: at-line ⁴⁵	45
Abb. 10: Symbiosis™ Pharma System (Spark Holland B.V., Emmen, Niederlande) ⁴⁹	46
Abb. 11: Schematische Darstellung eines SPE-LC-MS/MS-Verfahrens mit dem Symbiosis™ Pharma System... ..	48
Abb. 12: Modus operandus der Festphasenextraktion: on-line ⁴⁵	49
Abb. 13: Schematische Darstellung von LiChrospher® ADS ⁶⁷	53
Abb. 14: Unterteilung der RA-Materialien (nach Boos) ⁶⁴	54
Abb. 15: Einsatzgebiete von ESI, APPI, APCI ⁷¹	59
Abb. 16: Schematische Darstellung einer ESI-Quelle ⁷⁶	60
Abb. 17: Schematische Darstellung einer APCI-Quelle [in Anlehnung an ⁷⁷].....	61
Abb. 18: Schematischer Aufbau eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS) ⁷⁸	63
Abb. 19: Schematische Darstellung der Modi operandi eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS) [in Anlehnung an ⁷⁸]	64
Abb. 20: Schematische Darstellung der Nachsäulen-Infusionstechnik zur Bestimmung von Matrixeffekten [in Anlehnung an ⁹²]	70
Abb. 21: Strukturformeln der Immunsuppressiva und ihrer Internen Standards ⁹⁸	75
Abb. 22: Schematische Darstellung des zellulären Wirkmechanismus von Ciclosporin A und Tacrolimus ⁹⁷ ..	79
Abb. 23: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von Calcineurin- und mTOR-Inhibitoren ¹⁰⁷	80
Abb. 24: Schematische Darstellung der Verteilung von Ciclosporin A in Vollblut.....	90
Abb. 25: Aufbau der Neubauer-Zählkammer ¹³⁹	103
Abb. 26: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung von t_G	107
Abb. 27: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung von t_{min}	108
Abb. 28: Gelbildungsgrenze von Vollblut bei unterschiedlichen Temperaturen	109
Abb. 29: Ermittelte Werte für t_G in Abhängigkeit vom Hämatokrit; Prozessierungstemperatur: 75°C.....	116

Abb. 30: Schematische Darstellung eines Hämoglobin-Moleküls ¹⁵⁰	119
Abb. 31: Gelbildungsgrenze von Vollblut 1:1 mit AB-HP verdünnt bei verschiedenen Temperaturen	126
Abb. 32: Gelbildungsgrenze von Vollblut mit unterschiedlichen Anteilen an Methanol bei verschiedenen Temperaturen.....	130
Abb. 33: Gelbildungsgrenze (t_G) von Vollblut mit unterschiedlichen Anteilen an Acetonitril bei verschiedenen Temperaturen.....	135
Abb. 34: Einfluss von DMSO auf die Erythrozyten bei Raumtemperatur	142
Abb. 35: links: Behandelte Vollblutprobe (VB:DMSO (90/10, v/v)) nach Vitalfärbung mit Trypanblau (100-fache Vergrößerung); rechts: Behandelte Vollblutprobe (VB:DMSO (90/10, v/v)) nach 4-maligem Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung nach Vitalfärbung mit Trypanblau (100-fache Vergrößerung).....	143
Abb. 36: Bei 75°C ermittelte t_G -Werte verschiedener Vollblutansätze	145
Abb. 37: Neubauer-Zählkammer: Großquadrate zur Auszählung von Leukozyten [in Anlehnung an ¹³⁹]	151
Abb. 38: Neubauer-Zählkammer: Kleinquadrate zur Auszählung von Thrombozyten [in Anlehnung an ¹³⁹]	156
Abb. 39: Einfluss des organischen Modifiers, der Vorinkubationszeit und der Prozessierungstemperatur auf die Desintegration von Thrombozyten in Vollblut; Prozessierungstemperatur: 65 bis 85°C.....	162
Abb. 40: Gesamtproteingehalt einer prozessierten und unprozessierten VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe	170
Abb. 41: Schematischer Aufbau eines Totalen Analysesystems (TAS).....	180
Abb. 42: Schematische Darstellung des modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems; HC: beheizte Edelstahlkapillare (engl.: Heated Capillary); HPD: Kolbenpumpe (engl.: High Pressure Dispenser); MS/MS: Tandemmassenspektrometer	182
Abb. 43: Schematische Darstellung der Spitze der verwendeten Injektionsnadeln; LD.: Innendurchmesser; A.D.: Aussendurchmesser	183
Abb. 44: Schematische Darstellung des Mischvorgangs einer sedimentierten Vollblutprobe unter Anwendung des Probengebers.....	184
Abb. 45: Schematische Darstellung der beheizten Edelstahlkapillare ¹⁷⁵	188
Abb. 46: Volumen und Verdünnungsfaktoren (F_V) von injizierten Proben nach der Passage eines Totvolumens von 262 μ L; Flussrate: 270 μ L/min	191
Abb. 47: Volumen und Verdünnungsfaktoren (F_V) von injizierten Proben nach der Passage eines Totvolumens von 262 μ L; Flussrate: 590 μ L/min	192
Abb. 48: Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus zur Bestimmung von V_F und V_B	198
Abb. 49: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_F	199
Abb. 50: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_B	200
Abb. 51: Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus zur Bestimmung von V_E	201
Abb. 52: Schematisches Elutionsprofil zur Bestimmung von V_E	202
Abb. 53: Schematische Darstellung des parallelen Ablaufs der Fraktionierung (purpur) und Elution (grün) im modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems [in Anlehnung an ⁴⁹]	205
Abb. 54: Repräsentatives Chromatogramm eines MRM-Laufs einer methanolischen Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva und deren Internen Standards; $c(\text{Analyt}) = 10 \text{ ng/mL}$; Injektionsvolumen: 50 μ L	210

Abb. 55: Schematische Darstellung der zum Tuning verwendeten Systemkonfiguration	211
Abb. 56: Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Materialien und einer Detektion bei 428 nm. a: Hysphere C2-SE, b: Hysphere C2, c: Hysphere C8, d: Hysphere C8-SE, e: Hysphere Resin SH, f: Hysphere Resin GP, g: C8, h: Oasis HLB	219
Abb. 57: Elutionsprofile einer CDB-Matrix bei Verwendung verschiedener SPE-Materialien und einer Detektion bei 280 nm. a: Hysphere C2-SE, b: Hysphere C2, c: Hysphere C8, d: Hysphere C8-SE, e: Hysphere Resin SH, f: Hysphere Resin GP, g: C8, h: Oasis HLB	221
Abb. 58: Erforderliches Volumen an mobiler Phase für die Fraktionierung bei Verwendung verschiedener SPE-Adsorbentien. Hy: Hysphere.....	224
Abb. 59: Durchbruchprofile von MeOH (grün) und Tacrolimus (pink, $c = 100 \mu\text{g/mL}$) von einer Oasis HLB-Kartusche (10 x 2 mm I.D.); Injektionsvolumen: 10 μL ; Fluss: 270 $\mu\text{L/min}$ (0.00-1.85 min) und 2000 $\mu\text{L/min}$ (1.86-10.00 min), Detektion: UV bei 210 nm	226
Abb. 60: Elutionsprofile von Tacrolimus während zwei hintereinander durchgeführter Waschgänge (grün = 1. Waschgang, pink = 2. Waschgang) einer Oasis HLB-Kartusche (10 x 2 mm I.D.); Detektion: UV bei 210 nm.....	227
Abb. 61: Elutionsprofile von MeOH (pink) und Tacrolimus (grün, $c = 100 \mu\text{g/mL}$) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche (10 x 2 mm I.D.); Injektionsvolumen: 10 μL ; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: UV bei 210 nm	231
Abb. 62: Elutionsprofile für MeOH (grün) und Tacrolimus (rot, $c = 100 \text{ ng/mL}$) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche; Injektionsvolumen: 25 μL ; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang).....	234
Abb. 63: Elutionsprofile für MeOH (grün) und Ciclosporin D ($c = 500 \text{ ng/mL}$; rot) von einer Hysphere C8-SE-Kartusche; Injektionsvolumen: 25 μL ; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang).....	234
Abb. 64: Vergleich der Elutionsvolumina (V_E) für Tacrolimus bei Verwendung unterschiedlicher SPE-Adsorbentien und Detektoren	237
Abb. 65: Repräsentatives Chromatogramm einer Standardlösung aller untersuchten Immunsuppressiva; Injektionsvolumen: 10 μL ; Konzentration je Analyt: 10 ng/mL ; Analytische Trennsäule: LiChrospher [®] 100 RP 18-EC, 125 x 2 mm I.D., dp 5 μm ; SPE: Oasis HLB, 10 x 2 mm I.D., dp 30 μm , Detektion: MS/MS. Farbliche Darstellung der Teilschritte des Analysezyklus	247
Abb. 66: Chromatogramme von Ciclosporin D aus CDB nach Analyse im TAS. Injektionsvolumen: 25 μL ; $c(\text{Ciclosporin D}) = 500 \text{ ng/mL}$; Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektor: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang).....	253
Abb. 67: Strukturformeln der untersuchten Antimykotika	263
Abb. 68: Unterschiedliche Probenaufbereitungsarten (1-4) für die Analyse von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol	264
Abb. 69: LC-MS/MS-Chromatogramme von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol: ■ Plasmaprobe und ■ CDB-Probe; Eluent: MeOH/1% FA (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$	267
Abb. 70: Manuelle (off-line), integrierte (on-line) und integrale (in-line) Verfahren der Aufbereitung von Vollblut.....	270

Abb. 71: Beispiel für ein Entnahmegefäß, das im Anschluss als Probengefäß genutzt wird (Microvette®; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)	271
Abb. 72: Manuelle / mit dem Pipettierroboter durchzuführende und integrierte Verfahren der Aufbereitung von Vollblutproben für die LC-MS/MS-Analyse	278
Abb. 73: Einfluss des Hämatokrit-Wertes auf die Prozessparameter; Prozessierungstemperatur: 75°C	282
Abb. 74: Modifiziertes Symbiosis™ Pharma System mit integrierter HC	284

Tab. 1: Gesamtproteinkonzentration im Plasma in Abhängigkeit vom Alter ²⁰	27
Tab. 2: Zusammensetzung der Plasmaproteinfraktionen eines Erwachsenen ²⁰	27
Tab. 3: Häufig verwendete Antikoagulanzen und ihre Einsatzgebiete [in Anlehnung an ²¹]	28
Tab. 4: Charakteristika von Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus und Ciclosporin A	76
Tab. 5: Dosierung und Talspiegelkonzentrationen verschiedener Immunsuppressiva ^{101,106,108,109}	82
Tab. 6: Pharmakokinetische Daten für Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus ^{2,8,106,108,109}	89
Tab. 7: Prozentuale Verteilung der Immunsuppressiva im Vollblut ^{2,3,4,101}	91
Tab. 8: Therapeutische Bereiche für das Monitoring von Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus	94
Tab. 9: Ermittelte t_G -Werte für Vollblut für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C	110
Tab. 10: Ermittelte Werte für t_{max} , t_{min} und t_{heat} einer Vollblutprobe für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C	111
Tab. 11: Ermittelte Prozessparameter für Vollblut verschiedener Spezies; Prozessierungstemperatur: 75°C ..	113
Tab. 12: Referenzwerte der Retikulozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen ¹⁴³	114
Tab. 13: Referenz-Hämatokrit-Werte in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen ¹⁴³	115
Tab. 14: Physikalische und chemische Faktoren zur Induktion der Gelbildung bei Proteinen ¹⁴⁵	117
Tab. 15: Bestimmung der Gelbildungsgrenze für Plasmaproben inklusive und exklusive Hämoglobin	118
Tab. 16: Einfluss von AB-HP auf die Gelbildungsgrenze; Prozessierungstemperatur: 85°C	121
Tab. 17: Ermittelte Prozessparameter für verschiedene Hämatokrit-Werte (Hct); Prozessierungstemperatur: 75°C	122
Tab. 18: Ermittelte Prozessparameter von Vollblut inkl. verschiedener Infusionslösungen; Prozessierungstemperatur: 75°C	124
Tab. 19: Ermittelte t_G -Werte für Vollblut : AB-HP (1:1) für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C	127
Tab. 20: Ermittelte Werte für t_{max} , t_{min} und t_{heat} einer 1:1 mit AB-HP verdünnten Vollblutprobe im Temperaturbereich von 60 bis 95°C	128
Tab. 21: Ermittelte t_G -Werte für Vollblut mit verschiedenen Anteilen an Methanol für einen Temperaturbereich von 60 bis 95°C	131
Tab. 22: Ermittelte Werte für t_{max} , t_{min} und t_{heat} für methanolische Vollblutproben im Temperaturbereich von 60 bis 95°C	133
Tab. 23: Ermittelte t_G -Werte für Vollblut mit verschiedenen Anteilen an Acetonitril für einen Temperaturbereich von 65 bis 95°C	136

Tab. 24: <i>Ermittelte Werte für t_{max}, t_{min} und t_{heat} für Acetonitril-haltige Vollblutproben im Temperaturbereich von 60 bis 95°C.....</i>	137
Tab. 25: <i>Prozessparameter einer VB:AB-HP:ACN (50/45/5, v/v/v)-Probe mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten; Prozessierungstemperatur: 75°C.....</i>	138
Tab. 26: <i>Ermittelte Prozessparameter für Ethanol-haltige Vollblutproben; Prozessierungstemperatur: 75°C.</i>	140
Tab. 27: <i>Ermittelte Prozessparameter für DMSO-haltige Vollblutproben; Prozessierungstemperatur: 75°C..</i>	141
Tab. 28: <i>Mit Drabkin's Reagenz ermittelte t_{min}-Werte für verschiedene Vollblut : DMSO-Ansätze; Prozessierungstemperatur: 75°C.....</i>	144
Tab. 29: <i>Optimale Temperaturen für die Prozessierung von Vollblut nach Zusatz verschiedener Additive.....</i>	148
Tab. 30: <i>Referenzwerte der Leukozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien des Menschen¹⁴³.....</i>	149
Tab. 31: <i>Referenzwerte für das Vorkommen verschiedener Leukozytenarten im Differentialblutbild¹⁴³.....</i>	150
Tab. 32: <i>Desintegrationseffizienz von Leukozyten in verschiedenen Ansätzen.....</i>	153
Tab. 33: <i>Referenzwerte der Thrombozyten in verschiedenen menschlichen Entwicklungsstadien¹⁵⁶.....</i>	154
Tab. 34: <i>Temperaturabhängigkeit der Desintegration von Thrombozyten nach Zusatz verschiedener organischer Lösemittel.....</i>	158
Tab. 35: <i>Einfluss der Vorinkubationszeit mit verschiedenen organischen Modifiern auf die Desintegration von Thrombozyten in Vollblutproben; Prozessierungstemperatur: 65 bis 85°C.....</i>	161
Tab. 36: <i>Effizienz der Hitzeschockbehandlung einer nativen Vollblutprobe; Prozessierungstemperatur: 75°C, Heizdauer: 16 Sekunden.....</i>	163
Tab. 37: <i>Einfluss des Volumenanteils an DMSO auf die Bildung von Vesikeln.....</i>	171
Tab. 38: <i>Vergleich der Bildung von Vesikeln unterschiedlicher Vollblutansätze mittels differentieller Zentrifugation; Prozessierungstemperatur: 75°C.....</i>	172
Tab. 39: <i>Bildung von Vesikeln nach Zusatz verschiedener Lösemittel im Temperaturbereich zwischen 75 und 85°C.....</i>	174
Tab. 40: <i>Effizienz der Desintegration unterschiedlicher Vollblutansätze im Temperaturbereich zwischen 75 und 85°C.....</i>	175
Tab. 41: <i>Bildung von Vesikeln in Abhängigkeit vom Hämatokrit; Prozessierungstemperatur: 75°C.....</i>	177
Tab. 42: <i>Ursprüngliche und adaptierte Bezeichnungen der Parameter zur Methodenentwicklung.....</i>	195
Tab. 43: <i>Zusammenstellung der variablen Tuning-Parameter, Precursor- und Produkt-ionen der untersuchten Immunsuppressiva und deren Internen Standards.....</i>	213
Tab. 44: <i>Berechnete Flussraten für verschiedene Proben und deren Hitzeschock-induzierte Desintegration; CDB: zell-desintegriertes Blut (engl.: cell-disintegrated blood).....</i>	215
Tab. 45: <i>Eigenschaften der verwendeten SPE-Materialien bzw. -Kartuschen^{181,182}.....</i>	218
Tab. 46: <i>Ermittelte Prozessparameter (t_M und V_F) für die SPE einer Vollblutprobe [25 μL VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)] bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen. Detektion bei 428 nm.</i>	220
Tab. 47: <i>Ermittelte Prozessparameter (t_M und V_F) für die SPE einer Vollblutprobe [25 μL VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)] bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen. Detektion bei 280 nm.</i>	222

Tab. 48: Zusammenfassung der ermittelten t_M - und V_F -Werte einer VB:DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe (25 μ L) bei Verwendung verschiedener SPE-Kartuschen	223
Tab. 49: Indirekte Ermittlung des Durchbruchverhaltens von Tacrolimus bei Verwendung von SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Packungsmaterialien.....	228
Tab. 50: Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 10 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \mu\text{g/mL}$) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: UV bei 210 nm	232
Tab. 51: Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 25 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \text{ ng/mL}$) bzw. methanolischen Ciclosporin D-Lösung ($c = 500 \text{ ng/mL}$) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)	235
Tab. 52: Ermittelte Werte für t_E und V_E nach Injektion von 10 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \mu\text{g/mL}$; UV) bzw. 25 μ L einer methanolischen Tacrolimus-Lösung ($c = 100 \text{ ng/mL}$; MS/MS) auf verschiedene SPE-Kartuschen (10 x 2 mm I.D.); Eluent: MeOH/2 mM NH_4Ac (90/10, v/v); Fluss: 250 $\mu\text{L/min}$; Detektion: UV (210 nm) und MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)	236
Tab. 53: Zusammenfassung der ermittelten Werte für die Parameter V_F , V_B und V_E bei Verwendung verschiedener SPE-Adsorbentien.....	238
Tab. 54: Zusammenfassung der ermittelten Werte für t_M , t_A und t_T für zwei verschiedene SPE-Adsorbentien .	240
Tab. 55: Berechnete Volumina für $V_{F(P)}$ und $V_{E(P)}$ bei Verwendung von zwei verschiedenen SPE-Adsorbentien	243
Tab. 56: Tabellarische Darstellung der parallel ablaufenden Schritte während einer in-line Prozessierung und on-line SPE-LC-Analyse von Vollblut	245
Tab. 57: Rezeptur zur Herstellung des Reagenzes zur Fällung von Vollblutproben ¹⁸⁴	249
Tab. 58: Thermostabilität der untersuchten Immunsuppressiva; Prozessierung: Temperatur: 80°C, Heizdauer: 11 Sekunden	250
Tab. 59: Reproduzierbarkeit der Signalintensität von Ciclosporin D aus CDB- und PP-Proben nach Analyse im TAS; Detektion: MS/MS (Bedingungen: siehe Anhang)	254
Tab. 60: Vergleich verschiedener Aufbereitungsverfahren zur Analyse von Immunsuppressiva aus Patientenproben	257
Tab. 61: Ergebnisse des Methodenvergleichs: Analyse von Sirolimus, Everolimus, Ciclosporin A und Tacrolimus aus dem Überstand einer gefällten Vollblutprobe (Methode A) und CDB (Methode B) mit dem TAS	259
Tab. 62: Analyse von Antimykotika aus Patientenproben: Hämatokrit und Korrekturfaktoren	265
Tab. 63: Vergleich der ermittelten Konzentrationen von Itraconazol und 1-OH- Itraconazol nach der on-line SPE-LC-MS/MS-Analyse vier verschiedener Matrices	267
Tab. 64: Versuchsbedingungen im TAS zur Bestimmung der Wirkstoffverteilung in Vollblut; + = ja, - = nein	274
Tab. 65: Bedingungen für die in-line Prozessierung (VB:DMSO (97,5/2,5, v/v))-SPE-LC; Prozessierungstemperatur: 75°C.....	300

Tab. 66: <i>Bedingungen für die Bestimmung des Fraktionierungs- und Durchbruchsvolumens (V_F und V_B); Prozessierungstemperatur: 75°C</i>	301
Tab. 67: <i>Bedingungen für die Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E); Prozessierungstemperatur: 75°</i>	302
Tab. 68: <i>MS-Parameter für die Analyse der Immunsuppressiva</i>	303
Tab. 69: <i>Precursor- und Produktionen der untersuchten Immunsuppressiva</i>	304
Tab. 70: <i>MS-Parameter für die Analyse der Antimykotika</i>	305
Tab. 71: <i>Precursor- und Produktionen der untersuchten Antimykotika</i>	305



15 Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Arbeit

Poster

- 1 J. Milojković, R. Morello, K.-S. Boos
“Cell-disintegrated blood (CDB): A novel matrix for direct SPE-LC analysis of drugs”
2. Workshop “Klinische Anwendung des Massenspektrometrie in der Diagnostik und Prävention, Leipzig, 2006

Vorträge

- 1 J. Milojković, R. Morello, K.-S. Boos, D. Seidel
“BloodLyser[®]: Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben im Rahmen der bionalytischen LC-MS“
Seminar, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, München, 11.10.2006
- 2 J. Milojković, R. Morello, K.-S. Boos
“Cell-disintegrated blood (CDB): A novel matrix for direct and on-line SPE-LC analysis of drugs”
17. Doktorandenseminar des Arbeitskreises “Separation Science” der Fachgruppe “Analytische Chemie” der DGCh, Hohenroda, 8.1.2007
- 3 J. Milojković, R. Morello, K.-S. Boos
“In-line Processing of Whole Blood coupled to on-line SPE-LC”
9th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech[®]), Ålesund, Norwegen, 6.6.2007

-
- 4 J. Milojković, R. Morello, I. Berger, K.-S. Boos
“BloodLyser[®]: Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben im Rahmen der bioanalytischen LC-MS/MS”
5. LC-MS/MS Anwendertreffen, Heidelberg, 1.10.2007
- 5 J. Milojković, R. Morello, I. Berger, K.-S. Boos
„Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben im Rahmen der bioanalytischen LC-MS/MS“
Seminar, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, München, 24.10.2007
- 6 J. Milojković, I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
„Methoden zur Aufbereitung von Vollblut für die LC-MS/MS Analyse von Arzneistoffen“
6. LC-MS/MS Anwendertreffen, Tutzing, 24.9.2008
- 7 J. Milojković, I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
“In-line processing of whole blood for on-line SPE-LC analysis”
6th Symbiosis[™] User Group Meeting, Rotterdam, NL, 26.9.2008
- 8 J. Milojković, I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
„Methoden zur Aufbereitung von Vollblut für die LC-MS/MS Analyse von Arzneistoffen”
Seminar, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, München, 22.10.2008

Publikationen

- 1 R. Morello, J. Milojković, K.-S. Boos
“SPE-LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants Directly in Whole Blood using a Unique in-line Processing Procedure”
Ther Drug Monit 29 (2007): 505
- 2 K.-S. Boos, R. Morello, J. Milojković, I. Berger
“Durchbruch in der Analytik von Vollblut – Hitzeschock-induzierte Aufbereitung von Vollblut für die automatisierte Analytik“
GIT Labor-Fachzeitschrift, 01 (2008): 19-21
- 3 R. Morello, J. Milojković, I. Berger, K.-S. Boos
“A Unique SPE-LC-MS/MS Plattform For Fully Automated Analysis Of Drugs In Native Whole Blood”
EHRlich II-2nd World Conference on Magic Bullets
Abstractbook (2008): A-219
- 4 J. Milojković, I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
„Ein neuartiges Verfahren für die direkte Applikation von Vollblut in Trenn- bzw. Detektionssysteme“
LC-GC deutschsprachige Ausgabe, Juli (2009): 5-8



16 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jelena Milojković
Anschrift	Taubenstr. 6 81541 München
Geburtsdatum /-ort	15. August 1978 / Hanau

Schule / Ausbildung

08/1985-07/1989	Grundschule in Erlensee
08/1989-06/1998	Hohe Landesschule Hanau Abschluss: Abitur
02/1999-03/1999	Lufthansa AG in Frankfurt/Main Ausbildung zur Flugbegleiterin
10/1999-10/2003	Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt
03/2002	1. Staatsexamen
10/2003	2. Staatsexamen (Note: 1,5)
02/2005	Approbation (Gesamtnote: 1,92)

Seit 04/2005

Doktorandin im Laboratorium für BioSeparation,
Institut für Klinische Chemie, Klinikum der
Universität München (LMU)

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Serbokroatisch	Muttersprache
Englisch	Fließend
Französisch	Grundkenntnisse
Italienisch	Grundkenntnisse

Berufserfahrung und Praktika

09/1998-10/1998	Versandhaus Schwab in Hanau Tätigkeit: Kundenbetreuung im Warenrücklauf
11/1998-12/1998	AstraZeneca in Frankfurt/Main Tätigkeit: Praktikum im Bereich Galenik und Qualitätskontrolle
03/1999-09/1999	Lufthansa AG in Frankfurt/Main Tätigkeit: Flugbegleiterin auf Interkontinentalflügen (Südamerika und USA)

02/2000-03/2000	Sonnen-Apotheke in Erlensee Tätigkeit: Famulatur
07/2001-09/2001	Lufthansa AG in Frankfurt/Main Tätigkeit: Flugbegleiterin auf Interkontinentalflügen (Afrika und USA)
08/2002-08/2002	Sonnen-Apotheke in Erlensee Tätigkeit: Praktikum
12/2003-06/2004	Bristol-Myers Squibb in New Brunswick, NJ, USA Tätigkeit: Praktisches Jahr im Bereich Forschung und Entwicklung
06/2004-12/2004	Gisela-Apotheke in München Tätigkeit: Praktisches Jahr
11/2005-01/2007	Barbara-Apotheke in München Tätigkeit: Chefvertretung (stundenweise)
Seit 03/2007	Blumen-Apotheke in München Tätigkeit: Chefvertretung (stundenweise)