

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin,
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser
und dem
Department für Klinische Chemie
Städtisches Klinikum München GmbH, Medizet
Leiter: Prof. Dr. med. Walter Hofmann

**Entwicklung und Prüfung eines LC-ESI/MS/TOF-Verfahrens
für die toxikologische Analytik im Akutkrankenhaus**

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

vorgelegt von

Birgit Henschel

aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sommerhoff

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Klaus Oliver Peschel

Priv. Doz. Dr. Harald Mückter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Jürgen Hallbach

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2013

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Toxikologische Analytik im Akutkrankenhaus	1
1.1.1 Systematische toxikologische Analyse (STA)	3
1.1.2 Gezielte Suchanalytik zum Nachweis 'neuer' Drogen	4
1.1.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	4
1.2 Analytische Verfahren in der Toxikologie	6
1.2.1 Chromatographie	6
1.2.2 Massenspektrometrie	8
2 Aufgabenstellung	16
3 Material & Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte und Software	18
3.1.2 Chemikalien	19
3.1.3 Lösungen	19
3.1.4 Verbrauchsmaterialen	20
3.1.5 Referenz-Standards	21
3.2 Methoden	21
3.2.1 Probenvorbereitung	21
3.2.2 Geräteaufbau	24
3.2.3 UPLC-Parameter	24
3.2.4 MS/TOF-Parameter	27
3.2.5 Validierung	31

4	Ergebnisse	35
4.1	Kalibrierung und Nachweis der Stabilität von UPLC und MS/TOF	35
4.2	Qualitativer Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen – Systematische toxikologische Analyse (STA)	37
4.2.1	Aufbau einer Spektren-Datenbank für die UPLC-MS/TOF	37
4.2.2	Entwicklung einer 'Targeted Datenbank' für die UPLC-MS/TOF	38
4.2.3	Toxikologisches Screening mit der 'Targeted Datenbank' bzw. der Spektrendatenbank im Routinebetrieb	40
4.2.4	Toxikologisches Screening mittels UPLC-MS/TOF im Vergleich zur Referenzmethode GC-MS	43
4.2.5	Teilnahme an Ringversuchen	44
4.2.6	Gezielte Suchanalytik zum Nachweis 'neuer' Drogen	46
4.2.7	Vergleich der Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig- und Festphasen-Extraktion	52
4.3	Quantitativer Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen – Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	54
4.3.1	Selektivität	55
4.3.2	Linearität	57
4.3.3	Genauigkeit	61
4.3.4	Stabilität	63
4.3.5	Analytische Grenzen	66
4.3.6	Vergleichsmessungen	67
4.4	Identifizierung und Quantifizierung von Pregabalin	69
5	Diskussion	72
5.1	Qualitativer Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen – Systematische toxikologische Analyse (STA)	72
5.1.1	Aufbau einer Spektrendatenbank für die UPLC-MS/TOF	72
5.1.2	Entwicklung einer 'Targeted Datenbank' für die UPLC-MS/TOF	73
5.1.3	Toxikologisches Screening mittels UPLC-MS/TOF im Vergleich zur Referenzmethode GC-MS	76

5.1.4	Gezielte Suchanalytik zum Nachweis 'neuer' Drogen	77
5.1.5	Bedeutung der UPLC-ESI/MS/TOF für die systematische toxikologische Analytik (STA)	78
5.2	Vergleich der Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig- und Festphasen-Extraktion	80
5.3	Quantitativer Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen – Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	81
5.3.1	Quantifizierung von Coffein, Lidocain und Antiepileptika	81
5.3.2	Nachweis und Quantifizierung von Pregabalin	82
5.3.3	Bedeutung der UPLC-ESI/MS/TOF für das therapeutische Drug Monitoring (TDM)	83
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	88
8	Anhang	96
	Danksagung	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
CID	Collision-Induced-Dissociation
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DGKL	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
ESI	Elektrospray-Ionisation
FWHM	Full width at half maximum
GC	Gaschromatographie
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
IA	Immunoassay
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LLE	Liquid-Liquid-Extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
MDPV	Methyldioxypyrovaleron
MeOH	Methanol
MEPS	Micro-Extraktion by Packed Sorbent (Festphasenextraktion)
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)

NWG	Nachweisgrenze
RfB	Referenzinstitut für Bioanalytik (DGKL)
RILIBÄK	Richtlinien der Bundesärztekammer
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPE	Solidphase-Extraction (Festphasen-Extraktion)
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Time-of-Flight (Massenanalysator)
UPLC	Ultra-Performance-Liquid-Chromatographie
VK	Variationskoeffizient

1 EINLEITUNG

1.1 TOXIKOLOGISCHE ANALYTIK IM AKUTKRANKENHAUS

Akute Intoxikationen bei Erwachsenen werden in Deutschland am häufigsten durch Alkohol und Medikamente (z.B. Hypnotika, Sedativa, Psychopharmaka, Analgetika), aber auch durch Drogen verursacht. Bei Kindern, insbesondere bei Kleinkindern, stehen dagegen akzidentelle Vergiftungen im Vordergrund. Neben der üblichen labormedizinischen Basisdiagnostik sollten in jedem Kliniklabor daher auch einfache Untersuchungen auf gängige Substanzen wie Drogen und Medikamente durchgeführt werden können [1 - 4]. Bei diesen einfachen Untersuchungen handelt es sich in erster Linie um Immunoassays, die nach dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion funktionieren. Doch gerade in der Toxikologie sind die erlangten Aussagen oft nicht ausreichend: Zum einen können nur Substanzen nachgewiesen werden, für die entsprechende Kits kommerziell erhältlich sind. Ein Screening auf unbekannte Stoffe ist auf diesem Wege nicht möglich. Zum anderen weisen viele Substanzen eine geringe Molekülgröße auf. Je kleiner das zu bestimmende Molekül, desto unspezifischer werden die eingesetzten Antikörper, so dass es zu Kreuzreaktionen mit anderen in der zu untersuchenden Probe ebenfalls vorliegenden Substanzen kommt. Die Ergebnisse solcher Immunoassays sind daher in der toxikologischen Analytik nur als erster Hinweis zu bewerten. Um jedoch eine Intoxikation mit unbekannten Substanzen bzw. ein falsch positives Ergebnis der Immunoassays ausschließen zu können oder auch um das erhaltene Ergebnis zu bestätigen, sind spezifischere Methoden unabdingbar.

Toxikologische Labore lassen sich in die Klassen A bis C einteilen [5]. Ein Basislabor der Klasse A führt hauptsächlich einfache Immunoassays durch. Ein regionales Schwerpunktllabor entspricht der Klasse B, dazu gehört z. B. das Department für Klinische Chemie der Städtischen Klinikum München GmbH. B-Labore bieten umfangreichere Untersuchungen an wie das Screening auf Fremdsubstanzen, die Bestätigung durch chromatographische Methoden und die Quantifizierung der meisten relevanten Substanzen. In hochspezialisierten Laboren (Klasse C), dazu

gehört z.B. der 'Berliner Betrieb für zentrale gesundheitliche Aufgaben' (BBGes), besteht die Möglichkeit, auf nahezu jede beliebige Substanz zu testen und diese gegebenenfalls zu quantifizieren [5]. In den Laborklassen B und C sollten die Untersuchungen zudem kurzfristig zu jeder Tageszeit möglich sein und die Ergebnisse innerhalb von drei Stunden vorliegen [5]. In vielen dieser Labore war bis 2009 das REMEDI HS Drug Profiling System (DPS) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eines der gebräuchlichsten Geräte für das Medikamentenscreening und das therapeutische Drug Monitoring. Dieses System kombiniert eine HPLC mit einem schnell-scannenden UV-Detektor; eine Säulenschaltung (Multicolumn) ermöglicht die online-Probenextraktion, Auftrennung und Identifizierung von basischen Substanzen und Metaboliten. Das REMEDI DPS konnte so weitgehend vollautomatisch ein breites Spektrum des Drug-Screenings für die klinische Toxikologie und das therapeutische Drug Monitoring übernehmen [6,7].

Die Ergebnisse der toxikologischen Analytik sind ein wesentlicher Baustein der Expositionsbewertung (Abb. 1-1), die die Basis für die spezifische Therapieentscheidung bei Vergiftungen ist [8,9]. Zur Beurteilung einer möglichen Exposition stehen in einem toxikologischen Labor verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: die systematische toxikologische Analyse (STA), die gezielte Suchanalytik auf angeforderte Substanzen sowie gegebenenfalls deren Quantifizierung (therapeutisches Drug Monitoring).

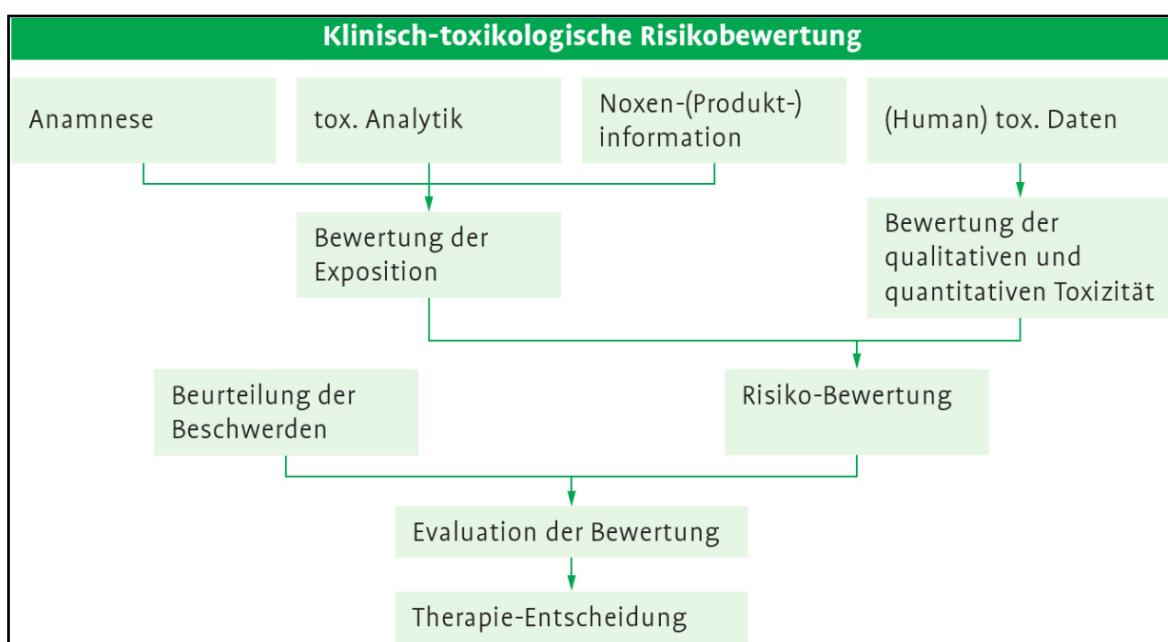


Abbildung 1-1 Toxikologische Expositionsbewertung (nach Desel) [10]

1.1.1 SYSTEMATISCHE TOXIKOLOGISCHE ANALYSE (STA)

Die 'systematische toxikologische Analyse' (STA) dient der Aufklärung akuter Vergiftungen ohne bekannte Ursache. In der Regel liegen keine Informationen über das Vorhandensein und die Art des Giftes vor. Die STA befasst sich deshalb mit dem Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen mit möglichst wenigen Einschränkungen, andererseits aber auch mit der gezielten Suche nach speziellen Substanzen oder Substanzklassen [11].

Das Screening auf möglichst viele toxikologisch relevante Substanzen in biologischen Proben ist eine der größten Herausforderungen im klinischen Labor. Durch das Screening kann das Vorhandensein toxischer Verbindungen bestätigt oder ausgeschlossen werden [12]. Meist wird das toxikologische Screening bei Patienten mit akuter Intoxikation unbekannter Ursache angefordert. Das Spektrum toxikologisch relevanter Substanzen ist dann umfangreich. Hierzu zählen neben Medikamenten illegale Drogen, Pestizide, chemische Reagenzien und Alkaloide. Das Probenmaterial besteht zumeist aus Urin oder Blut (Plasma, Serum); auch wenn Blutproben die akuten Effekte durch die Noxe besser widerspiegeln wird für das umfassende Screening Urin bevorzugt, da dieser ein längeres Zeitfenster für den Nachweis bietet und die Konzentrationen sowohl der Substanzen als auch deren Metabolite höher als in Blutproben sind.

Eine gute klinische Methode muss selektiv, genau, empfindlich und einfach in der Handhabung sein. Häufig werden als Erstes automatisierte Immunoassays eingesetzt, um rasch Hinweise auf Substanzgruppen wie z. B. Benzodiazepine, trizyklische Antidepressiva und Opate zu erhalten. Im zweiten Schritt sollten die Ergebnisse der Immunoassays wegen der möglichen Kreuzreaktivität einiger Substanzen chromatographisch überprüft werden [13].

Bei Intoxikationen mit Substanzen, für die keine automatisierten Immunoassays zur Verfügung stehen, können diese nur durch ein systematisches Screening mit Hilfe chromatographischer Methoden erfasst und identifiziert werden. Hierfür hat sich vor allem die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) in den klinisch-toxikologischen Routine-Laboratorien etabliert [14 - 19]. Dabei erfolgt die Identifizierung über den Vergleich mit kommerziell erhältlichen Datenbanken. GC-MS-Datenbanken sind sehr umfangreich und werden von vielen Laboratorien genutzt, da sie geräteunabhängig sind. In den letzten Jahren ist neben der GC-MS

die Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) immer mehr in den Vordergrund gerückt [9, 20 - 22]. Durch die LC-MS erhofft man sich, auch Substanzen, die von der GC-MS nicht erfasst werden können, nachweisen zu können. Allerdings sind LC-MS Datenbanken bisher meist hausinterne, selbsterstellte Bibliotheken, die gerätespezifisch sind [13, 23 – 25].

1.1.2 GEZIELTE SUCHANALYTIK ZUM NACHWEIS „NEUER“ DROGEN

Substanzen wie z. B. neue Designerdrogen oder Metabolite, die noch nicht in GC-MS- oder LC-MS-Datenbanken erfasst sind, können nur durch eine gezielte Suchanalytik erfasst werden. Diese kann z. B. mittels Massenspektrometrie/Time-of-Flight (MS/TOF) durchgeführt werden. Über die exakte Masse (Masse auf 4 Kommastellen) wird dann die Summenformel der fraglichen Substanz generiert und diese mit relevanten Analyten im toxikologischen Labor verglichen, um so schließlich die Fremdstoff identifizieren zu können [26]. Eine Alternative zu dieser 'gezielten Suchanalytik' ist die magnetische Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie). Mit dieser Methodik kann durch die Untersuchung der elektronischen Umgebung der einzelnen Atome und der Wechselwirkung mit den Nachbaratomen die Struktur einer Substanz analysiert werden. Allerdings ist die Anschaffung eines NMR-Geräts sehr kostenintensiv und die Auswertung der Daten aufgrund der Komplexität nicht für die toxikologische Analytik in einem Krankenhaus routinetauglich [27].

1.1.3 THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING (TDM)

Die Quantifizierung eines bestimmten Analyten ist im Rahmen des 'Therapeutischen Drug Monitoring' (TDM) im toxikologischen Labor bzw. für eine gezielte Arzneitherapie unabdingbar. Hierfür wird die Konzentration des Medikaments im Blut des Patienten bestimmt und mit dem bekannten therapeutischen Bereich abgeglichen. Die gewünschte Wirkung kann so in möglichst kurzer Zeit erreicht und gleichzeitig unerwünschte toxische Effekte vermieden werden [28].

Ein typisches Anwendungsgebiet für das TDM ist die prophylaktische Therapie, bei der eine zu geringe Dosierung eines Medikaments zum erneuten Auftreten der Erkrankung führt wie z. B. bei Antiepileptika [29 - 32]. Außerdem wird das TDM bei

Medikamenten mit engem therapeutischen Bereich eingesetzt wie z. B. Zytostatika, bei denen eine große Gefahr durch Über- oder Unterdosierung besteht [33]. Weitere Beispiele für die Anwendung sind die Bestimmung von Coffein zur Behandlung der primären Apnoe bei Frühgeborenen [34 - 36] sowie von Lidocain und dessen aktiven Metaboliten bei chronischen Schmerzpatienten [37 - 41]. Auch Pregabalin, ein Medikament, das seit 2009 verstärkt in der Suchttherapie eingesetzt wird, wird mittels TDM bestimmt, um einen Missbrauch der Substanz auszuschließen [42 - 45].

Tabelle 1-1 zeigt die therapeutischen Bereiche einiger Substanzen, für die im Rahmen dieser Arbeit Quantifizierungsmethoden entwickelt wurden. Im Gegensatz zu Referenzwerten in der Labormedizin sind therapeutische Bereiche lediglich Richtwerte für eine optimale Therapie; Abweichungen können sich abhängig vom Ziel der Therapie (z. B. bei den Antiepileptika) und vor allem bei Kombinationstherapien ergeben.

Substanz	Plasma-/Serumkonzentration [mg/L]
Lidocain	1 – 5
Coffein	8 – 20
10-OH-Carbazepin	11 – 24
Lamotrigin	11 – 19
Levetiracetam	10 – 37
Gabapentin	5.9 – 21
Pregabalin	0.5 – 16

Tabelle 1-1 Therapeutischer Bereich (Plasma- bzw. Serumkonzentration) ausgewählter Substanzen [8, 46]

1.2 ANALYTISCHE VERFAHREN IN DER TOXIKOLOGIE

1.2.1 CHROMATOGRAPHIE

In der toxikologischen Analytik ist die Effizienz der verwendeten chromatographischen Trennverfahren von großer Bedeutung. Dabei ist der Zeitbedarf einer Analyse von wesentlichem Interesse, vor allem für schnelle LC-MS-Analysen von Plasma- und Urinproben [47]. Kürzere Analysenzeiten ermöglichen die Erhöhung des Probendurchsatzes und dadurch auch eine Verringerung der Kosten. Dabei darf aber die Trennleistung und die Nachweisgrenze nicht beeinträchtigt werden. In vielen Fällen vereinfacht eine höhere chromatographische Trennleistung auch die Methodenentwicklung [48, 49]. Im Vergleich zur klassischen High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) verwendet die Ultra-Performance-Liquid-ChromatographieTM (UPLC) Hochdruckmodule und kürzere Säulen, die mit einer maximalen Partikelgröße von 1.8 µm statt der sonst üblichen 5 µm gepackt sind. Dadurch wird eine deutlich bessere Trennleistung erreicht [50, 51]. Die van-Deemter-Kurve, die den Zusammenhang zwischen Trennstufenhöhe und linearer Eluentenfließgeschwindigkeit beschreibt, zeigt, dass die beste Säulentrennung bei niedrigstmöglichen Druck am Minimum der Kurve erreicht wird (Abb. 1-2) [52, 53]. Durch die Reduzierung der Partikelgröße wird bei gleicher linearer Geschwindigkeit der Rückdruck umgekehrt proportional zum Quadrat der Teilchengröße erhöht. Insgesamt steigt der Druck bei optimaler Geschwindigkeit Δp_{opt} umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Teilchendurchmessers d_p :

$$\Delta p_{opt} \approx \frac{1}{d_p^3}$$

Durch die Verwendung von kleineren Teilchendurchmessern kann die Flussrate der mobilen Phase erhöht und somit die Analysenzeit verringert werden. Gleichzeitig erhöht sich die Auflösung umgekehrt proportional zur Partikelgröße. Somit wird eine höhere Auflösung in kürzerer Zeit ermöglicht [54].

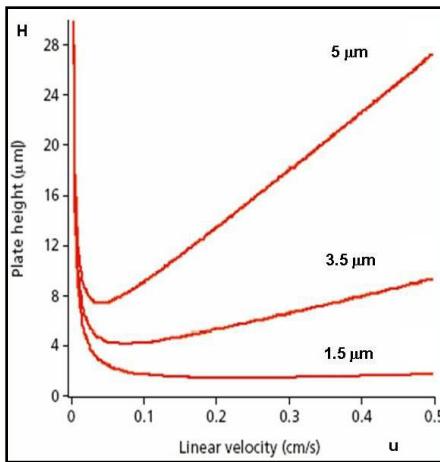


Abbildung 1-2 van Deemter Kurven für verschiedene Partikelgrößen in der HPLC [55]

Die gleichzeitige Reduzierung der Säulenlänge und der Partikelgröße lässt die maximale Säulentrennleistung konstant, führt aber zu einer Erhöhung der Analysengeschwindigkeit. Der ausschlaggebende Faktor für die Laufzeit ist somit der Druck. Bei der klassischen HPLC sind aufgrund der Beschaffenheit des Säulenmaterials und der Pumpen nur Drücke bis maximal 300 bar möglich. Durch die Entwicklung von UPLC-Systemen können nun auch Drücke bis 1000 bar verwendet werden [56].

Durch die Optimierung von Pumpe und Säule bei der UPLC wird somit eine höhere Analysengeschwindigkeit, Empfindlichkeit und Auflösung im Vergleich zur klassischen HPLC erzielt [49]. Dieser Vorteil wird vor allem im Bereich der Massenspektrometrie-Analytik genutzt, da hier coeluierende Substanzen oder verschiedene Matrices zu Ionensuppression führen können [56]. Dabei werden mehrere Analyten gleichzeitig in der Ionenquelle ionisiert, die Analyten konkurrieren also um die Ionisierungsenergie. Die Substanzen mit niedrigerem Ionisierungspotential werden bevorzugt ionisiert, während andere Analyten supprimiert werden [57, 58]. Zu hohe Analytkonzentrationen führen zu einer Abflachung der Kalibrierfunktion, da mit steigendem Analytgehalt nicht mehr ausreichend Moleküle ionisiert werden können. Durch die erhöhte chromatographische Trennleistung der UPLC können solche Effekte vermieden werden [59 – 62].

1.2.2 MASSENSPEKTROMETRIE

Neben der chromatographischen Trennung der Substanzen ist die Art der Detektion von großer Bedeutung. In der klinischen Analytik ist die Kopplung von Gaschromatographen mit Massenspektrometrie (GC-MS) seit langer Zeit der „Gold-Standard“ für die Identifizierung toxikologisch relevanter Substanzen. Der Erfassungsbereich der GC-MS wird jedoch durch die Polarität und das Molekulargewicht der Substanzen begrenzt. Diese Limitierung kann durch die Kombination einer Flüssigkeitschromatographie mit MS (LC-MS) zum Teil umgangen werden (Abb. 1-3).

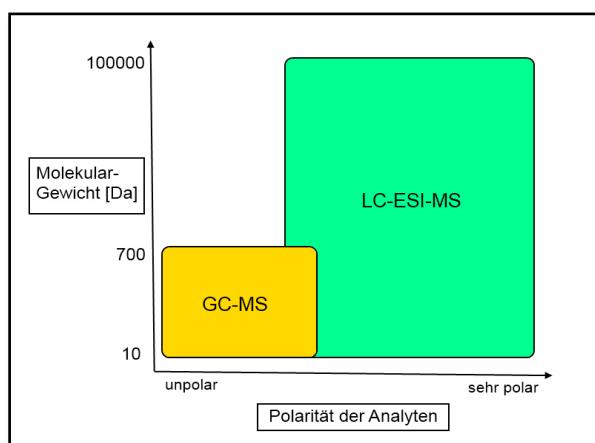


Abbildung 1-3 Vergleich der Erfassungsbereiche von GC-MS und LC-ESI-MS [63]

Neben den verschiedenen chromatographischen Trennverfahren, GC bzw. LC, werden Massenspektrometer mit unterschiedlichen Analysatoren eingesetzt. Im Massenanalysator werden die in der Ionenquelle erzeugten und beschleunigten Ionen getrennt und anschließend vom Detektor registriert. Die Trennung der Ionen beruht auf verschiedenen physikalischen Prinzipien: Ein Sektorfeld-Analysator lenkt die Ionenstrahlen in elektrischen oder magnetischen Feldern ab. Quadrupol-Geräte und Ionenfallen sind dagegen sogenannte Massenfilter, die nur Ionen bestimmter Masse durch elektrische Wechselfelder den Detektor erreichen lassen [64]. Time-of-Flight-Massenspektrometer hingegen erfassen alle Ionen im Flugrohr und trennen sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Flugzeit im feldfreien Raum auf [65]; dies ist in der klinischen Analytik vor allem bei der Identifizierung von unbekannten Substanzen wie z. B. neuen Designerdrogen interessant.

Um verschiedene MS-Geräte vergleichen zu können, werden vor allem das *Auflösungsvermögen* und die *Massengenauigkeit* der Geräte herangezogen. Die

Auflösung eines MS beschreibt die Fähigkeit, zwischen Massen zu differenzieren [66]. Das *Auflösungsvermögen* R gibt das Verhältnis einer Masse M zum Massenunterschied ΔM der nächsten noch getrennt erscheinenden Masse an:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

Dabei wird ΔM am häufigsten bei 50 % Höhe (Full width at half maximum, FWHM) gemessen (s. Abb. 1-4).

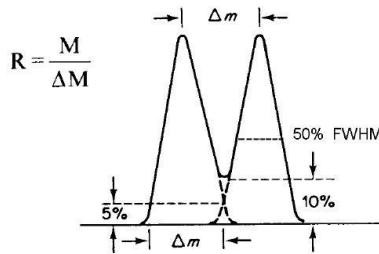


Abbildung 1-4 Verschiedene Definitionen der Auflösung in der MS [67]

Die *Massengenauigkeit* gibt an, auf wie viele Kommastellen genau die Masse des Teilchens bestimmt werden kann. Mit Hilfe der sogenannten hochauflösenden (high resolution, HR) Massenspektrometer können Gemische von Ionen gleicher Nominalmasse aufgrund ihrer unterschiedlichen exakten Massen getrennt werden. Mit hochauflösender Massenspektrometrie können die Molekülmassen bis zu 4 Stellen hinter dem Komma genau bestimmt und damit unterschieden werden [68]. Jedes Massenspektrometer besteht aus 3 Einheiten: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Nachfolgend wird das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer (LCT Premier XE, Waters) und seine Einheiten beschrieben.

1.2.2.1 IONENQUELLE - ELEKTROSPRAY-IONISATION

In der Massenspektrometrie werden nur geladene Moleküle erfasst. Hierfür müssen die Substanzen nach der zeitlichen Auftrennung durch die Chromatographie in einer Ionenquelle ionisiert werden. Neben dem Massenanalysator ist die Wahl der Ionenquelle für die Analytik der Substanzen von großer Bedeutung. Hierfür existieren verschiedene Ionisationstechniken. Die Signalintensität ist von der Analytkonzentration und dem Prozess des Flüssigkeitsverdampfens abhängig. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist eine der am häufigsten dafür genutzten Techniken

(Abb. 1-5). ESI-Quellen ermöglichen die Ionisierung in der flüssigen Phase. Die chromatographisch aufgetrennten Analyten werden mit Hilfe von Inertgasen (meist Stickstoff) fein versprüht. Hierbei entstehen aus polaren, basischen und geladenen Analyten kleine geladene (positiv oder negativ) Tröpfchen. In einem Hochspannungsfeld zerplatzen die kugelförmigen Lösungsmitteltropfen ('Coulomb-Explosion'), so dass nach Verdampfen und Absaugen des Lösungsmittels die geladenen Teilchen am Ende gasförmig in der Ionenquelle vorliegen [69 – 73]. Je nach angelegter Spannung im elektrischen Feld werden die Substanzen entweder protoniert (positive Ionisierung) oder deprotoniert (negative Ionisierung). Die meisten toxikologisch relevanten Substanzen lassen sich positiv ionisieren, einige Ausnahmen wie z. B. Ibuprofen dagegen nur im negativen Modus.

ESI ist eine sogenannte „sanfte“ Ionisierungstechnik, so dass eine Fragmentierung der Analyten erst gezielt im Anschluss z. B. über eine 'in-source collision dissociation' (CID) erzielt werden kann.

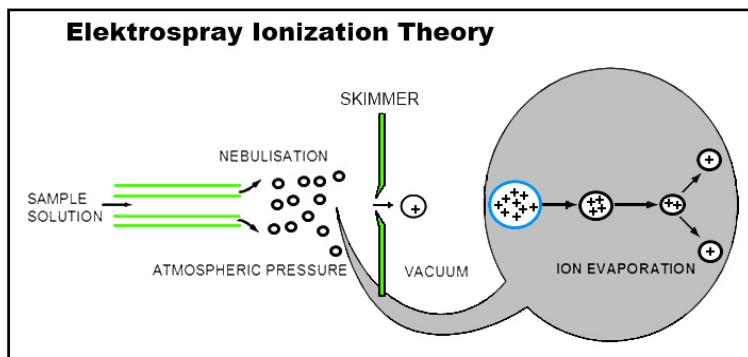


Abbildung 1-5 Theorie der Elektrospray-Ionisation [50]

1.2.2.2 TIME-OF-FLIGHT-MASSENANALYSATOR

Bei der Time-of-Flight-Massenspektrometrie werden alle Ionen im Flugrohr erfasst und aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen durch ihre unterschiedliche Flugzeit im feldfreien Raum aufgetrennt [65]. Einen Überblick über den Aufbau eines TOF-Massenanalysators zeigt Abbildung 1-6. Im Anschluss zur Ionenquelle werden die Substanzen mit Hilfe eines Linsensystems fokussiert und anschließend im Flugrohr im Hochvakuum aufgrund ihrer Flugzeit unterschieden (Abb. 1-6). Je höher die Masse ist, umso länger ist die Flugzeit für eine definierte Flugstrecke. Die Ionen werden aufgrund der Potentialdifferenz zwischen Ionenquelle und den

fokussierenden Linsen zum Flugrohr beschleunigt. Haben alle Ionen dieselbe kinetische Energie erreicht, werden sie durch ihre unterschiedliche Geschwindigkeit und aufgrund dessen durch ihre unterschiedlichen Massen voneinander unterschieden (Abb. 1-7).

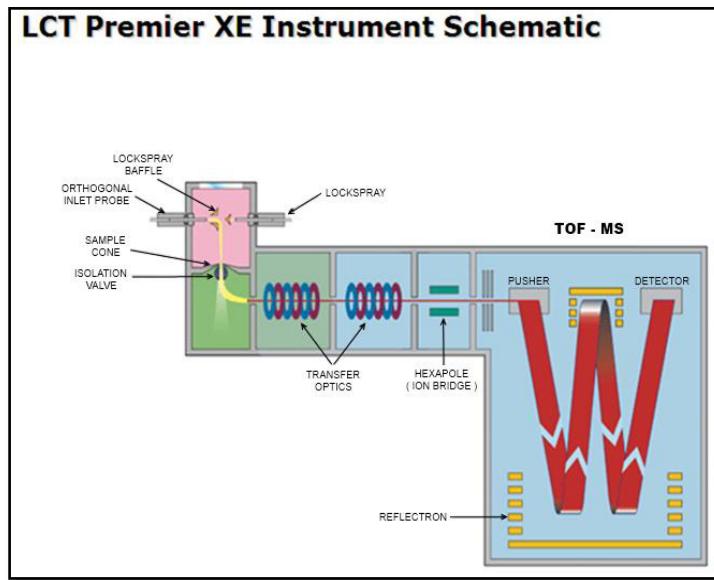


Abbildung 1-6 Aufbau eines MS/TOF-Analysators (LCT Premier XE, Waters) mit Ionenquelle, Linsensystem zur Ionenfokussierung und In-Source-Fragmentierung sowie dem Flugrohr [50]

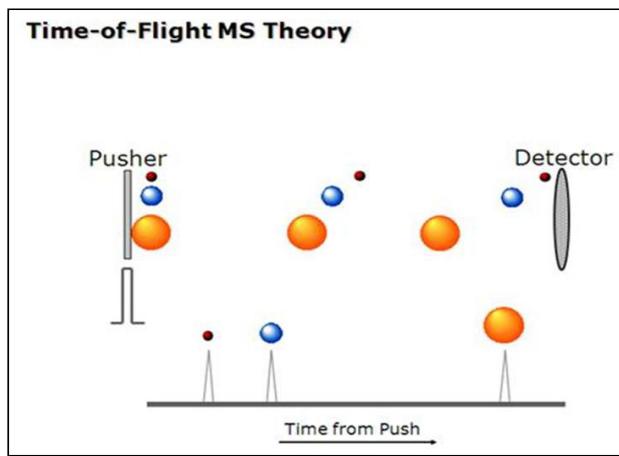


Abbildung 1-7 Time-of-Flight-Theorie, Auf trennung der Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen und damit unterschiedlichen Flugzeiten [50]

Ein Ion der Masse m und der Ladung $q = ze$ wird durch das Potential V_s beschleunigt und hat dann die kinetische Energie (Formel 1)

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV = zeV_s$$

Die Geschwindigkeit der Ionen beträgt somit (Formel 2)

$$v = \left(\frac{2zeV_s}{m} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Nach der initialen Beschleunigung fliegt das Ion im Flugrohr mit konstanter Geschwindigkeit zum Detektor. L ist die Distanz zum Detektor und t die Zeit, die benötigt wird, um die Flugstrecke zu bewältigen (Formel 3).

$$v = \frac{L}{t}$$

Durch die Kombination der Formeln 2 und 3 ist zu erkennen, dass das Masse-Ladungsverhältnis m/z durch die Messung der Flugzeit t bestimmt werden kann (Formel 4).

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eV_s}{L^2} \right) t^2$$

Der TOF-Analysator besitzt aufgrund der Technik keine obere Grenze zur Erfassung der Molekülmassen.

Mit einem TOF-System werden mehrere tausend Spektren pro Sekunde erzeugt. Die Anzahl der detektierten Ionen in jedem individuell aufgenommenen Spektrum ist allerdings noch nicht ausreichend, um eine hohe Massengenauigkeit zu erreichen. Deshalb besteht ein TOF-Spektrum aus der Addition von mehreren Einzelspektren [68].

Um das Auflösungsvermögen eines TOF-Analysers zu erhöhen, können elektrostatische Reflektoren, genannt Reflectrons, verwendet werden (Abb. 1-8). Hierbei gelangen die Ionen nicht direkt in den Detektor, sondern werden von einem elektrischen Potential, das höher ist als das Beschleunigungspotential der Ionenquelle reflektiert, bevor sie den Detektor erreichen. Dadurch wird die Flugstrecke der Ionen vergrößert. Gleichzeitig wird die Streuung der kinetischen Energie, die die Ionen bei Verlassen der Quelle besitzen, korrigiert: Ionen mit dem gleichen Masse/Ladungsverhältnis aber höherer Geschwindigkeit dringen tiefer in die Reflectrons ein und haben dadurch eine längere Flugstrecke als langsamere Ionen.

Durch ein zweistufiges Reflekttron wird das Massenspektrometer insgesamt kompakter, benötigt weniger Raum und durch die Verbesserung der Homogenität des elektrischen Feldes wird auch eine bessere Auflösung erreicht. Allerdings leidet die Empfindlichkeit im Vergleich zu einem einfachen Reflectron [50].

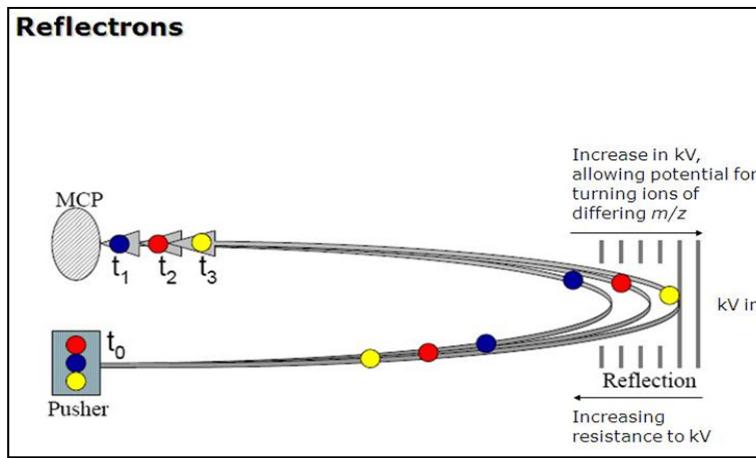


Abbildung 1-8 Reflectron-Theorie [50]

Das Auflösungsvermögen von High-end TOF Geräten beträgt zwischen 40000 und 50000 (basierend auf der FWHM-Definition, s. Kapitel 1.2.2). Routinegeräte bieten eine Auflösung bis zu 20000 und eine Genauigkeit kleiner als 5 ppm [68]. So können mit Hilfe von High-end TOF Geräten Substanzen gleicher nomineller Masse unterschieden werden. So haben z. B. Methadon und Fluoxetin die nominelle Masse 309 Dalton, Fluoxetin mit der Summenformel $C_{17}H_{18}NOF_3$ und Methadon $C_{21}H_{27}NO$. Mit einer niedrig auflösenden Massenspektrometrie sind diese beiden Substanzen nicht voneinander zu unterscheiden. Die hochauflösende MS/TOF erlaubt es dagegen, zwischen den Massen 309.1340 (Fluoxetin) und 309.2093 (Methadon) zu diskriminieren [1].

1.2.2.3 IN-SOURCE FRAGMENTIERUNG

Bei der Collision-Induced Dissociation (CID) handelt es sich um eine sogenannte In-Source-Fragmentierung. Hierbei werden Ionen durch ein elektrisches Potential auf eine hohe kinetische Energie beschleunigt, um dann mit neutralen Molekülen, meist Helium, Stickstoff oder Argon, zu kollidieren (Abb. 1-9). Dabei wird ein Teil der kinetischen Energie verwendet, um die Dissoziationsenergie zu überwinden und so die Moleküle in kleinere Fragmente aufzuspalten [74]. Durch diese Fragmentierung können Substanzen mit gleicher Molekülmasse (isobare Substanzen) aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur und somit über die entstehenden, spezifischen Fragmente unterschieden werden (Abb. 1-10).

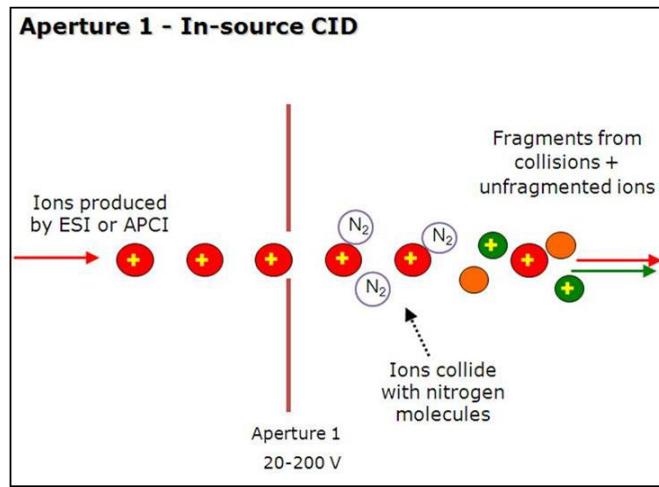


Abbildung 1-9 In-Source Fragmentierung [50]



Abbildung 1-10 Die unterschiedlichen Strukturen von Cocain (links) und Scopolamin (rechts)

Das MS/TOF System Premier XE von Waters ist in der Lage, Spektren bei niedriger und hoher Kollisionsenergie simultan zu messen, so dass für jede monoisotopische Molekülmasse auch die spezifischen Fragmentinformationen vorliegen. Diese Informationen können anschließend für die eindeutige Identifizierung von Substanzen genutzt werden.

1.2.2.4 DETEKTOR - MICRO-CHANNEL-PLATE

Um die Substanzen schließlich zu detektieren, werden häufig Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) verwendet. Sie basieren darauf, dass aus einer Konversionsdynode, die aus einem Halbleitermaterial besteht, durch den eintreffenden Ionenstrahl Elektronen freigesetzt werden. Diese Elektronen werden über ein elektrisches Feld zur nächsten Dynode hin beschleunigt, wo sie wiederum Elektronen freisetzen. Über 14 – 17 Stufen, an denen insgesamt 1 bis 3 kV anliegen, wird so eine Verstärkungskaskade ausgelöst (Faktor 10^6 – 10^8) (s. Abb. 1-11).

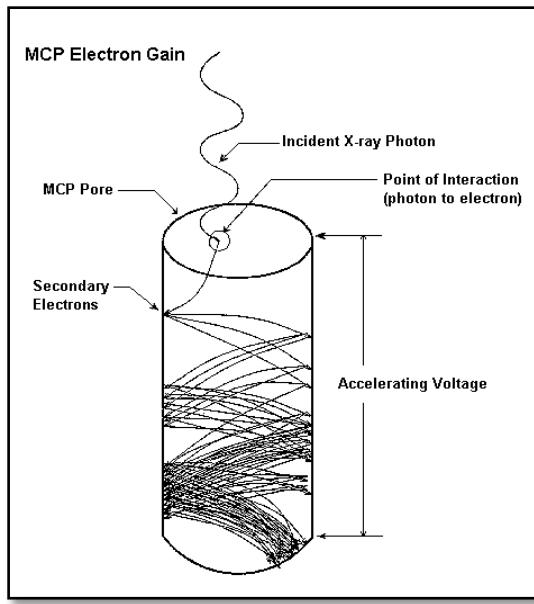


Abbildung 1-11 MCP Theorie des Elektronenvervielfachers [50]

Anstelle von einzelnen Dynoden wird bei einem kontinuierlichen SEV ein Channeltron verwendet, das wie ein kleines gebogenes Hörnchen geformt ist. Eine 'Microchannel Plate' (MCP) besteht aus einem Bündel von Tausenden zusammengefügter Glaskapillaren mit entsprechender Beschichtung der Innenwände, das in dünne Scheiben geschnitten wurde. So wirkt jede der einzelnen Glaskapillaren wie ein Channeltron (s. Abb. 1-12). Die große Oberfläche erlaubt eine sehr empfindliche Detektion eintreffender Ionen über einen großen Raumwinkel. Aus diesem Grund wird diese Technik auch häufig bei der TOF-MS angewendet [67].

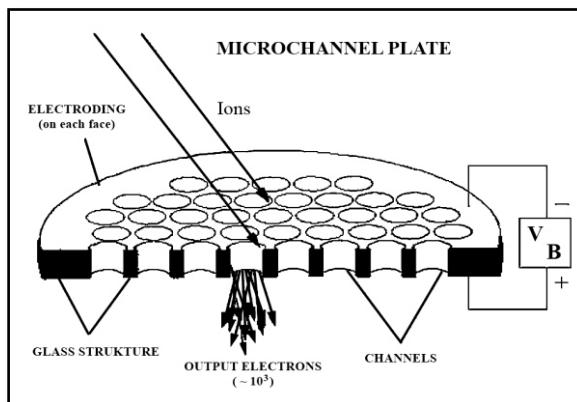


Abbildung 1-12 Aufbau einer 'Microchannel Plate' (MCP) [50]

2 AUFGABENSTELLUNG

Die kontinuierliche Entwicklung neuer Medikamente und die Verwendung neuer Missbrauchssubstanzen machen es erforderlich, dass im Kliniklabor breit angelegte Screeningverfahren für die systematische toxikologische Analyse (STA) zur Verfügung stehen. Diese Techniken sollten es auch ermöglichen, Quantifizierungen für das therapeutische Drug Monitoring (TDM) einfach und schnell durchführen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, den analytischen Nutzen eines UPLC-MS/TOF Systems für den Routinebetrieb im Krankenhauslabor zu überprüfen und Methoden sowohl für die STA als auch das TDM zu etablieren. Für die Identifizierung häufig verwendeter Medikamente und Drogen (STA) sollte eine LC-MS-Bibliothek aufgebaut werden, die auf der monoisotopischen exakten Masse der Substanz, der Retentionszeit und spezifischen Fragmentmassen basiert. Für Konformationsanalysen sollte auch eine Spektrenbibliothek angelegt werden, die für jede Substanz ein nichtfragmentiertes und ein fragmentiertes Spektrum enthält. Für das STA-Screening sollte zudem die Probenvorbereitung, insbesondere die Eignung einer automatisierten Festphasenextraktion (MEPS) getestet sowie die UPLC-Trennung und die MS-Detektion optimiert werden. Der Nutzen der Screening-Methode sollte letztendlich entsprechend den Richtlinien der Akkreditierung (DIN EN ISO 15189) [75] und der Bundesärztekammer (RILIBÄK) [76] anhand einer großen Zahl authentischer Urinproben evaluiert und mit einem konventionellen Screening mittels GC-MS verglichen werden.

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob das UPLC-MS/TOF System auch für den qualitativen Nachweis von Substanzen und Metaboliten verwendet werden kann, die noch nicht in den Screening-Datenbanken vorhanden sind. Da mit der TOF-Technologie alle Ionen aufgenommen und diese Rohdaten für jeden Lauf gespeichert werden, kann diese Technologie prinzipiell auch für den Nachweis solcher „neuer“ Substanzen verwendet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Quantifizierungsmethoden für Substanzen, die im Rahmen des TDM seltener bestimmt werden bzw. für die bisher keine MS-Methode existiert, zu entwickeln. Entsprechend den Vorgaben der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) [77] sollten die Methoden anschließend auf ihre Linearität, Selektivität, Genauigkeit, Präzision sowie Stabilität überprüft werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 GERÄTE UND SOFTWARE

Chromatographie:

- UPLC Acquity, Waters, Eschborn
- UPLC-Säule Acquity Ultra Performance LC ® HSS T3 1.8 µm, 2.1 x100mm, Waters, Eschborn
- REMEDI HS Drug Profiling System (DPS), Bio-Rad, Hercules, USA

Massenspektrometrie:

- LCT XE Premier, Waters, Eschborn
- GC-MS G7131A, Agilent, Böblingen

Laborgeräte:

- MEPS-SPE, C8/SCX>Ionexchange-RP-Mixed-Mode, SGE Analytical Science Pty Ltd, Victoria, Australien
- CTC CombiPAL System, Agilent, Böblingen
- Analysenwaage Mettler AE 160/9, WTM, Kirchseeon
- Zentrifuge Micro 200R, Hettich, Tuttlingen
- Zentrifuge Universal 320R, Hettich, Tuttlingen
- Rüttler MS3 Basic, IKA® Works, NC, USA

Software:

- Software MassLynx V4.1 SCN728, Waters
- Software MassLynx V4.1 SCN803, Waters
- MSD ChemStation D.03.00.611, Agilent
- Software VALISTAT 2.0
- B.E.N. Version 2.03 (zur statistischen Auswertung von Kalibrationsdaten nach DIN 32645)

3.1.2 CHEMIKALIEN

- Methanol, LC-MS Chromasolv[®] ≥ 99.9 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Wasser, steril und endotoxinfrei, Fresenius Kabi, Bad Homburg
- Ameisensäure, für Massenspektrometrie, ~ 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Ethylacetat, Optigrade[®] ≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Acetonitril, Picograde[®] ≥ 99.5 %, LGC-Standards, Wesel
- Ammoniak (wasserfrei), Sigma-Aldrich, Steinheim
- N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA), Macherey-Nagel, Düren
- β -Glucuronidase Typ H-1, G 0751, Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 LÖSUNGEN

Referenzlösung Lock MassTM

Eine Stammlösung von Leucin-Enkephalin (1 mg/ml in H₂O) wurde angesetzt und portionsweise bis zu einem Jahr bei -20 °C gelagert. Für die Arbeitslösung (300 ng/ml) wurde die Stammlösung mit Acetonitril:Wasser (50:50, v/v, unter Zusatz von 0.05 % Ameisensäure) weiter verdünnt.

UPLC Fließmittel A:

990 ml H₂O, 10 ml MeOH, 500 μ l Ameisensäure

UPLC Fließmittel B:

1 l MeOH, 500 μ l Ameisensäure

Referenzsubstanzlösungen für die Spektrenbibliothek und 'Targeted-Screening-Datenbank'

Für die Datenbanken wurden Stammlösungen aller Substanzen in Methanol zu je 1 mg/ml hergestellt und auf 1 μ g/ml verdünnt. Jeweils 2 μ l dieser Verdünnungen wurden an der UPLC-MS/TOF injiziert.

Drogen- und Medikamenten-freie Referenzmatrix

Für die Entwicklung, Optimierung und Validierung der Methoden wurden Serum- und Urinproben von Freiwilligen aus dem Labor verwendet, die keinerlei Medikamente und Drogen eingenommen hatten. Auch auf den Konsum von Coffein wurde für mindestens 2 Wochen verzichtet, um Selektivitätstestmessungen für die Quantifizierungsmethoden durchführen zu können.

Vergleichsproben

Soweit für die Validierungen Reste von Patientenproben verwendet wurden, geschah dies ausschließlich mit anonymisierten Proben ohne Anforderung zusätzlichen Untersuchungsmaterials. Für die entsprechenden Untersuchungen lag jeweils ein nicht methodenbezogener Untersuchungsauftrag vor.

3.1.4 VERBRAUCHSMATERIALEN

- Eppendorf Cups 1.5 ml, Eppendorf, Hamburg
- Spitzen für Varipipetten 10 µl, 100 µl, 1 ml, Eppendorf, Hamburg
- TOXI-TUBES® A, TOXI-LAB® Varian, Lake Forest, U.S.A.
- Einmalhandschuhe Peha-soft nitrile, Hartmann AG, Heidenheim
- Vials, Flasche R11-1.5fl 1.5 ml 32X12mm farbl, Art.-Nr. 610002, Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Inlets für Vials, Limited Volume Inserts 0.3 ml; 6 x 30 mm, Chromsystems, München

3.1.5 REFERENZ-STANDARDS

- Referenz-Standards (freundlicherweise von Prof. Dr. Pragst, Berlin, zur Verfügung gestellt)
- Coffein, Referenz-Standard, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Lidocain, Referenz-Standard, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Procain, Referenz-Standard, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Antiepileptika-Standard, ClinCal Kalibrator Antiepileptika 2, Recipe, München
- Antiepileptika-Kontrollen 1 und 2, ClinCheck Kontrollen Antiepileptika 2, Recipe, München
- TOX.I.S.™ Testlösung (basische Drogen im Urin) für HPLC-DAD-Systeme, ClinTest®-Standard, Recipe, München

3.2 METHODEN

3.2.1 PROBENVORBEREITUNG

3.2.1.1 PROBENVORBEREITUNG FÜR DAS TOXIKOLOGISCHE SCREENING

Flüssigextraktion mit TOXI-TUBES® A für UPLC-MS/TOF

2 ml nativer Urin und 3 ml H₂O wurden in ein TOXI-TUBES® A gegeben, 10 s mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen und mit Stickstoff abgedampft. Der Extrakt wurde in 100 µl MeOH aufgenommen und mit 200 µl H₂O verdünnt. 3 µl der Lösung wurden an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

Festphasenextraktion für UPLC-MS/TOF

Für die Extraktion wurde eine MEPS-SPE Säule verwendet. 300 µl Urin wurden mit 600 µl 2 % Ameisensäure verdünnt. Die Säule wurde dreimal mit je 100 µl Methanol und danach dreimal mit je 100 µl 2 % Ameisensäure konditioniert. Anschließend wurde die verdünnte Probe auf die Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 50 µl Ameisensäure (2 %) und anschließend zweimal mit 50 µl Methanol gespült. Die Probe wurde mit zweimal 50 µl Elutionslösung (2% Ameisensäure in MeOH), die jeden Tag frisch hergestellt wurde, eluiert. Davon wurden 3 µl an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

Flüssigextraktion mit TOXI-TUBES® A für GC-MS

3 ml Urin wurden mit 300 µl β -Glucuronidase versetzt und 30 min bei 56 °C inkubiert. Der hydrolisierte Urin wurde zusammen mit 2 ml nativen Urin in ein TOXI-TUBES® A gegeben, 10 s mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen und mit Stickstoff abgedampft. Der Extrakt wurde in 100 µl Ethylacetat aufgenommen. 50 µl des Extraktes wurden mit 20 µl MSTFA (1 g/ml) versetzt, 3 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur derivatisiert und anschließend mit dem restlichen Extrakt vermengt. 10 µl wurden an der GC-MS eingespritzt.

Flüssigextraktion mit TOXI-TUBES® A für Checkmix für UPLC-MS/TOF

500 µl TOX.I.S.™ Testlösung und 4.5 ml H₂O wurden in ein TOXI-TUBES® A gegeben, 10 s mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen und mit Stickstoff abgedampft. Der Extrakt wurde in 100 µl MeOH aufgenommen und mit 200 µl H₂O verdünnt. 3 µl der Lösung wurde an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

3.2.1.2 PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON COFFEIN, LIDOCAIN UND ANTIEPILEPTIKA

100 µl Serum wurden mit 100 µl des internen Standards (Procain 1 µg/ml in MeOH) versetzt. Anschließend folgte eine Proteinfällung mit 200 µl Acetonitril. Nach dem Zentrifugieren (5 min; 9500 x g) wurden 200 µl des Überstandes mit 400 µl einer Mischung aus Methanol und Wasser (1:2; v:v) verdünnt. 2 µl der Lösung wurden an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

3.2.1.3 PROBENVORBEREITUNG FÜR DEN NACHWEIS VON PREGABALIN

Flüssig-Flüssig-Extraktion

500 µl Serum bzw. 1 ml Urin wurden mit 1 ml Acetonitril und 1 ml Salzsäure (0.1 mol/l) versetzt und 20 s gemischt (Vortexmixer). Anschließend wurden 2 ml Ethylacetat zugegeben, 10 s mit Hilfe des Vortexmixers geschüttelt und 10 min bei 14000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und mit Stickstoff abgedampft. Der Extrakt wurde in 250 µl MeOH aufgenommen. 5 µl der Lösung wurden an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

Festphasen-Extraktion mit MEPS

Für die Identifizierung wurden 300 µl Urin bzw. 300 µl Serum mit 600 µl 2 % Ameisensäure verdünnt und anschließend mit einer MEPS-SPE Säule extrahiert. Die Extraktion erfolgte wie für die Probenvorbereitung für das Screening mittels Festphasenextraktion für UPLC-MS/TOF beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1.1). 3 µl der Lösung wurden an der UPLC-MS/TOF eingespritzt.

3.2.2 GERÄTEAUFBAU

In der vorliegenden Arbeit wurde eine UPLC gekoppelt mit einer ESI-MS-TOF (Waters) mit dem REMEDI HS System (Bio-Rad) und einer GC-MS (Agilent) verglichen. Eine UPLC-MS/TOF-Anlage wird bisher nicht in der klinischen Routineanalytik verwendet, diese Kombination einer UPLC mit einem MS/TOF-Systems ist jedoch eine interessante Alternative zu den bisher eingesetzten Geräten. Zum einen ermöglicht die UPLC verglichen mit der klassischen HPLC kürzere Analysenzeiten, zum anderen müssen im Gegensatz zur GC-MS die Substanzen nicht derivatisiert werden. Das MS/TOF System nutzt zudem die exakte Molekülmasse der Substanzen für ihre Identifizierung.

3.2.3 UPLC-PARAMETER

Die allgemeinen Einstellungen für die UPLC sind in Tab. 3-1 dargestellt. Sie gelten sowohl für die Screening- als auch für die Quantifizierungsmethoden.

Proben-Temperatur	10 °C
Säulen-Temperatur	35 °C
Flussrate	0.300 ml/min

Tabelle 3-1 Allgemeine UPLC-Parameter

Die verwendeten Gradientenkurven sind in Abb. 3-1 gezeigt. Die Linie 1 zeigt einen direkten Wechsel von Fließmittel A zu Fließmittel B. Bei Linie 6 hingegen steigt die Zusammensetzung linear über den angegebenen Zeitraum an. In den nachfolgend beschriebenen Methoden wurden die Gradienten 1 und 6 verwendet (siehe Tab. 3-2 bis 3-4).

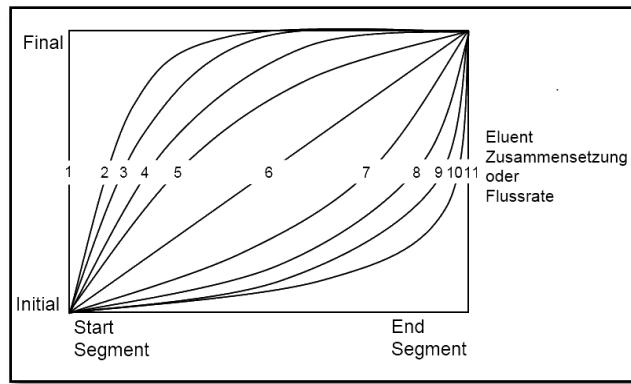


Abbildung 3-1 Theoretische UPLC-Gradienten-Kurven, verwendet wurden die Kurven 1 und 6 nach Waters [50]

3.2.3.1 UPLC-PARAMETER FÜR DAS TOXIKOLOGISCHE SCREENING

Für das Screening wurde das in Tab. 3-2 beschriebene Gradientenprogramm verwendet. Die Laufzeit beträgt 23 min.

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Gradient
Initial	90	10	
19.00	5	95	6
20.50	0	100	6
23.00	90	10	1

Tabelle 3-2 Gradientenprogramm für die UPLC bei der Screening-Methode

Die Anfangskonzentration beträgt 90 % des Fließmittels A und 10 % des Fließmittels B. Bis zum Zeitpunkt 19 min wird der Fließmittelanteil B linear auf 95 % erhöht. Anschließend wird die Säule 1.5 min lang mit 100 % Fließmittel B gespült. Im Anschluss werden die Anfangsverhältnisse wieder hergestellt.

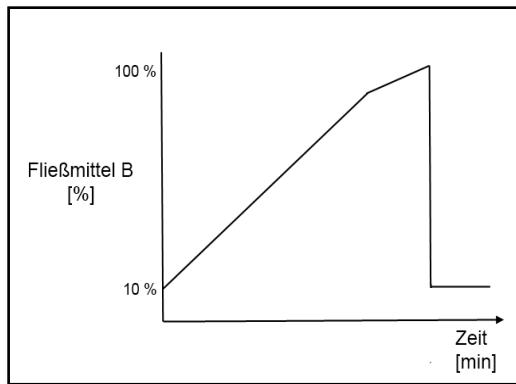


Abbildung 3-2 Graphische Darstellung der verwendeten Fließmittelzusammensetzung über die Laufzeit der Chromatographie der Screening-Methode

3.2.3.2 UPLC-PARAMETER FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG

Für die Quantifizierung von Lidocain, Coffein und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin und Levetiracetam wurden die Fließmittelkonzentrationen wie in Tab. 3-3 beschrieben verändert. Die Laufzeit beträgt 7 min.

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Gradient
Initial	90	10	
5.00	20	80	6
6.50	0	100	6
7.00	90	10	1

Tabelle 3-3 Gradientenprogramm für die UPLC bei den Quantifizierungs-Methoden

Die Anfangskonzentration beträgt 90 % des Fließmittels A und 10 % des Fließmittels B. Bis zum Zeitpunkt 5 min wird der Fließmittelanteil B linear auf 80 % erhöht. Anschließend wird die Säule 1.50 min lang mit 100 % Fließmittel B gespült, im Anschluss werden die Anfangsverhältnisse wieder hergestellt.

3.2.3.3 UPLC-PARAMETER FÜR DEN NACHWEIS VON PREGABALIN

Für das Screening zum Nachweis von Pregabalin wurde das in Tab. 3-4 beschriebene Gradientenprogramm verwendet. Die Laufzeit beträgt 13 min.

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Gradient
Initial	90	10	
1.00	90	10	6
12.00	5	95	6
12.50	0	100	6
13.00	90	10	1

Tabelle 3-4 Gradientenprogramm für die Quantifizierung von Pregabalin

Die Anfangskonzentration beträgt 90 % des Fließmittels A und 10 % des Fließmittels B. Bis zum Zeitpunkt 12 min wird der Fließmittelanteil B linear auf 95 % erhöht. Anschließend wird die Säule 0.50 min lang mit 100 % Fließmittel B gespült, im Anschluss werden die Anfangsverhältnisse wieder hergestellt.

3.2.4 MS/TOF-PARAMETER

Die Einstellungen für das Massenspektrometer MS/TOF sind in Tab. 3-5 dargestellt, sie gelten sowohl für die Screening- als auch die Quantifizierungs-Methoden. In allen Methoden wurde der W+ Modus verwendet, d. h. die Flugstrecke im Analysator entspricht einem W, sie wird durch drei Reflektoren verlängert. Dies führt zu einer höheren Auflösung des Gerätes im Vergleich zu einer nicht-reflektierten Flugstrecke.

Kapillarspannung	3000 V
Sample Cone Spannung	30 V
Ion Guide 1	5.0 V
Flight Tube Spannung	7200 V
MCP Spannung	2500 – 2800 V
Desolvation Temperatur	350 °C
Quellen Temperatur	120 °C
Flight Tube Temperatur	30 °C
Gas Fluss Cone	10 L/h
Gas Fluss Desolvation	700 L/h
Vacuum Pressure Backing	< 2 mBar
Vacuum Pressure Analyser	< 6e-007 mBar

Tabelle 3-5 Allgemeine Geräteparameter für das ESI/MS/TOF Massenspektrometer

Als Referenzmassen wurden die Isotope von Leucin-Enkephalin $[M+H]^+$ C12: 556.2771 (Attenuated Lock Mass) und $[M+H]^+$ C13: 557.2802 (Lock Mass) verwendet.

3.2.4.1 MS/TOF-PARAMETER FÜR DAS TOXIKOLOGISCHE SCREENING

Bei den Screeningmethoden im positiven Elektrospray-Ionisationsmodus (ESI +) wurden die Massen von 50 bis 1000 Da im W-Modus erfasst. Die Messdaten wurden über 20 min mit einer Scanzeit von 0.15 sec aufgenommen. Für die Funktion 1 (nicht-fragmentiert) wurden die Einstellungen aus Tab. 3-5 übernommen, für Funktion 2 (fragmentiertes Spektrum) wurden die Aperture 1 Spannung von 10 auf 50 V und die Cone Spannung von 30 auf 60 V erhöht. Für die Peakidentifizierung wurden die in Tab. 3-6 angegebenen Parameter verwendet.

Perform spectra deconvolution	Yes
Peak separation	0.050 Da
Peak Width at 5 % Height	90.00 seconds
Scans to combine either side of peak top scan	1 (hierbei werden insgesamt 3 Spektren im Peak an der Spitze und in den Flanken aufgezeichnet)
Threshold Absolut Area	100
Smoothing Method	Mean
Accurate Mass Scoring – Number of Ions	10

Tabelle 3-6 Allgemeine Parameter der MS/TOF für das toxikologische Screening

Für die Auswertung der Daten wurde die Software ChromaLynx XS verwendet. Für das Screening mithilfe einer Spektrendatenbank wurden die Spektren der Patientenprobe mit den Spektren der Datenbank verglichen (siehe Tab. 3-7). Hierfür wurde die Funktion 'Forward Basepeak Search' verwendet, die die acht intensivsten Peaks der Spektren miteinander vergleicht.

Spectra Match Factor (Forward Fit)	900
Scanbreite	2
Significant Ions	8

Tabelle 3-7 Parameter, die beim Vergleich von Patientenprobenspektren mit der Spektrendatenbank mithilfe der Software ChromaLynx (Waters) verwendet wurden

Für das 'Targeted Screening' wurden die Spektren der Patientenproben mit einer speziellen Datenbank (Targeted-Datenbank) verglichen. Diese enthält neben dem Substanznamen die Summenformel, aus der die exakte monoisotopische Molekülmasse abgeleitet werden kann, die Retentionszeit der chromatographischen Trennung mittels UPLC sowie die Masse eines ausgewählten spezifischen Fragments. Die maximale Abweichung der Retentionszeit für die nicht-fragmentierte Substanz (Target Retention Time Tolerance) wurde auf 0.3 min und für die fragmentierte Substanz (Fragment Retention Time Tolerance) auf 0.15 min festgelegt. Die maximale Massenabweichung für einen positiven Hit beträgt 10 mDa.

Bei einer Massenabweichung zwischen 10 und 20 mDa wurde die Identifizierung als nicht sicher eingestuft und die Substanz deshalb in der Auswertung mit einem Fragezeichen gekennzeichnet (siehe Tab. 3-8).

Analysis Type	Targeted – Fragment ion confirmation
Target mass file	Targeted_Screening.txt
Target Retention Time Tolerance	0.300 min
Fragment Retention Time Tolerance	0.150 min
Absolute mass tolerance	0.020 Da
Mass accuracy for positive ID	0.010 Da

Tabelle 3-8 Parameter, die beim Vergleich der Patientenprobenspektren mit der Targeted-Datenbank verwendet wurden

3.2.4.2 MS/TOF-PARAMETER FÜR DIE GEZIELTE SUCHANALYTIK

Für die gezielte Suchanalytik wurde zuerst das Chromatogramm mithilfe der exakten Masse der angefragten Substanz untersucht. Zeigte sich eindeutig für diese exakte Masse ein Peak im Chromatogramm, wurde das zugehörige fragmentierte Massenspektrum mit Hilfe der Software MassFragment (Waters) auf mögliche Fragmentmassen, die zu der angefragten Substanz passen, untersucht. Die notwendigen Strukturinformationen wurden der frei verfügbaren Datenbank „Chemspider“ [78] entnommen.

3.2.4.3 MS/TOF-PARAMETER FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON COFFEIN, LIDOCAIN UND VERSCHIEDENER ANTIEPILEPTIKA

Für die Quantifizierung von Coffein, Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin und Levetiracetam wurden die Massen von 50 bis 1000 Da im ESI+ Modus aufgezeichnet. Die Messdaten wurden über 7 min mit einer Scanzeit von 0.2 sec aufgenommen. Für die Quantifizierung wurde ausschließlich die Intensität der nicht-fragmentierten Massen (Funktion 1 bei der MS/TOF) verwendet (sonstige Einstellungen siehe Tab. 3-5).

3.2.4.4 MS/TOF-PARAMETER FÜR DEN NACHWEIS VON PREGABALIN

Bei der Identifizierung und Quantifizierung von Pregabalin wurden die Massen von 50 bis 1000 Da im ESI+ Modus aufgenommen. Die Messzeit betrug 12 min mit einer Scanzeit von 0.15 sec. Für das Screening wurden die Funktionen 1 und 2 verwendet, wobei für Funktion 2 die Aperture-1-Spannung von 10 auf 50 V und die Cone-Spannung von 30 auf 60 V erhöht wurde, um das spezifische Fragmentspektrum zu erhalten.

3.2.5 VALIDIERUNG

Die Methoden für die therapeutische Arzneimittelüberwachung an der UPLC-MS/TOF wurden entsprechend den Vorschriften und Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert [77]. Dabei wurden die Kriterien Selektivität, Linearität, Genauigkeit, Präzision und Stabilität sowie die analytischen Grenzen bestimmt bzw. beurteilt. Die Messdaten wurden dazu mithilfe der Software Valistat 2.0 analysiert.

3.2.5.1 SELEKTIVITÄT

Die Selektivität einer Methode beschreibt, dass verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyte ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen wie Metabolite, Verunreinigungen, Abbauprodukte oder die Matrix erfasst werden und somit eindeutig identifiziert werden.

Zur Untersuchung der Selektivität wurden sechs verschiedene Leerproben ohne internen Standard (IS) (Blindprobe) sowie zwei verschiedene Nullproben (Leermatrix mit IS) analysiert. Signale mit einer Fläche kleiner als 15 counts wurden als Grundrauschen definiert, damit nicht als Peak identifiziert und nicht berücksichtigt.

3.2.5.2 LINEARITÄT

Die Linearität beschreibt, dass das Ergebnis der Methode innerhalb eines gegebenen Bereichs direkt proportional zu der Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe ist. Um die Linearität im Kalibrationsbereich zu analysieren wurden sechs von Null verschiedene Konzentrationen des Kalibrators durch Aufstocken einer Leermatrix hergestellt. Die niedrigste Konzentration ist dabei größer oder gleich der Bestimmungsgrenze. Für die Wiederholbedingungen wurden zu jeder Konzentration sechs Bestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Test nach Mandel (Signifikanz 99 %) verwendet. Dazu wurde eine lineare und eine quadratische Funktion an die Kalibrierdaten angepasst und für beide Varianten die Summe der Abweichungssquarene berechnet. Anschließend wurde ein F-Test durchgeführt, indem die Differenz dieser Summen durch die Restvarianz aus der quadratischen Anpassung geteilt und der so erhaltene Wert mit dem Tabellenwert der F-Verteilung verglichen wurde. Ist der Wert kleiner als der Tabellenwert, so ist eine Linearität im gewählten Kalibrationsbereich anzunehmen [79].

Ausreißer wurden mittels des Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95 %) ermittelt und gegebenenfalls eliminiert. Entsprechend den Validierungsvorschriften der GTFCh für die Validierung von Analysenmethoden dürfen insgesamt nicht mehr als zwei Ausreißer und diese nicht bei der gleichen Konzentration auftreten [77].

Für jeden ausreißerverdächtigen Meßwert wurde die Prüfgröße G nach folgender Formel berechnet.

$$G = \frac{|Y_i - \bar{Y}|}{s}$$

Y_i : ausreißerverdächtiger Wert

\bar{Y} : arithmetisches Mittel

s : Standardabweichung

Ist der Prüfwert G größer als die Vergleichsgröße VG, wurde dieser Punkt als Ausreißer betrachtet und nicht mehr in die weitere Auswertung einbezogen, blieb aber als eliminiertes Wert sichtbar. Die Vergleichsgröße VG (gewähltes Signifikanzniveau, Umfang n der Stichprobe) wurde aus den Tabellen von Grubbs et

al. [80] entnommen. Der Cochran-Test prüft die Gleichheit mehrerer Varianzen: Geprüft wird die größte Varianz, ob sie signifikant größer ist als die anderen. Dabei werden die Stichprobenvarianzen berechnet und der größte Wert davon ermittelt. Der Prüfwert P ist die maximale Varianz im Quadrat (s_{max}^2) geteilt durch die Summe aller Varianzen [80].

$$P = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2}$$

3.2.5.3 GENAUIGKEIT

Als Maß für die Genauigkeit wurde der Abstand des Mittelwertes einer ausreichend großen Anzahl von Messwerten zum Sollwert berechnet. Das Ausmaß wird gewöhnlich in Form eines systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt. Hierzu wurden homogene Pools von Qualitätskontrollproben (QC-Proben) bei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch relativ zum Kalibrationsbereich) durch Aufstockung von Leermatrixproben hergestellt. Die QC-Proben wurden zu je 150 µl aliquotiert und im Gefrierschrank (-20 ° C) gelagert. Jeweils 100 µl QC-Proben jeder Konzentration wurden an acht verschiedenen Tagen analysiert und miteinander verglichen. Der Bias gibt die Richtigkeit im unteren und hohen Messbereich sowie im Entscheidungsbereich an. Der Bias-Wert errechnet sich aus dem Mittelwert aller Bestimmungen und dem Sollwert bei jeder Konzentration nach der Formel

$$Bias[\%] = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100\%$$

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

μ Sollwert

Bias-Werte innerhalb eines Intervalls von $\pm 15\%$ gelten als akzeptabel.

3.2.5.4 PRÄZISION

Unter Präzision versteht man den Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Sie ist ein Maß für die zufällige Fehlerkomponente eines quantitativen Analysenverfahrens. Die Präzision wird gewöhnlich in Form der 'Impräzision' ausgedrückt und als Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Eine höhere Impräzision entspricht also einer höheren Standardabweichung.

3.2.5.5 STABILITÄT

Die Stabilität eines Analyten sollte vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abschluss der Analyse gewährleistet sein. Deshalb wurde die Stabilität der aufgearbeiteten Proben sowie die Einfrier- und Auftaustabilität bestimmt. Um die Prozessstabilität der Proben nachzuweisen, wurden sechs Kontrollproben-Proben (QC) bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich aufgearbeitet, gepoolt und die jeweilige Konzentration in sechs Aliquote zu je 150 µl aufgeteilt. Die Aliquote wurden in regelmäßigen Intervallen über einen Zeitraum, der der erwarteten Dauer einer regulären Analysenserie in der Routine entspricht, injiziert. Anschließend wurden die absoluten Peakflächen gegen die Zeitpunkte der Injektion aufgetragen und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Eine signifikant negative Steigung der Regressionsgerade weist auf eine Instabilität der Analyten in den aufgearbeiteten Proben hin. Laut GTFCh-Vorschriften dürfen die absoluten Peakflächen über den Testzeitraum maximal 15 % abnehmen.

3.2.5.6 ANALYTISCHE GRENZEN

Als Nachweigrenze wurde die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe definiert, die die Identifizierungskriterien erfüllt. Dafür wurden Proben mit fallender Analytkonzentration im Bereich der zu erwartenden Nachweigrenze durch Aufstockung von Leermatrix hergestellt. Die Nachweigrenze ist als die niedrigste Konzentration angegeben, für die noch ein eindeutiger Peak (Peakfläche über 15 counts) identifiziert werden konnte [77].

4 ERGEBNISSE

4.1 KALIBRIERUNG UND NACHWEIS DER STABILITÄT VON UPLC UND MS/TOF

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, in wie weit ein UPLC-MS/TOF-System für die klinisch-toxikologische Routineanalytik geeignet ist. Dazu wurden zunächst die Chromatographie-Bedingungen für die UPLC optimiert und die maximale Massenungenauigkeit des MS/TOF-Massenspektrometers bestimmt.

Für die Gewährleistung der Massengenauigkeit der TOF wurde die Massenachse des Gerätes kalibriert. Hierfür wurden Substanzen ausgewählt, die reproduzierbare Massencluster bilden wie z. B. Natriumformiat. Eine solche Massenachsenkalibration für das MS/TOF-Gerät LCT Premier XE von Waters zeigt Abbildung 4-1.

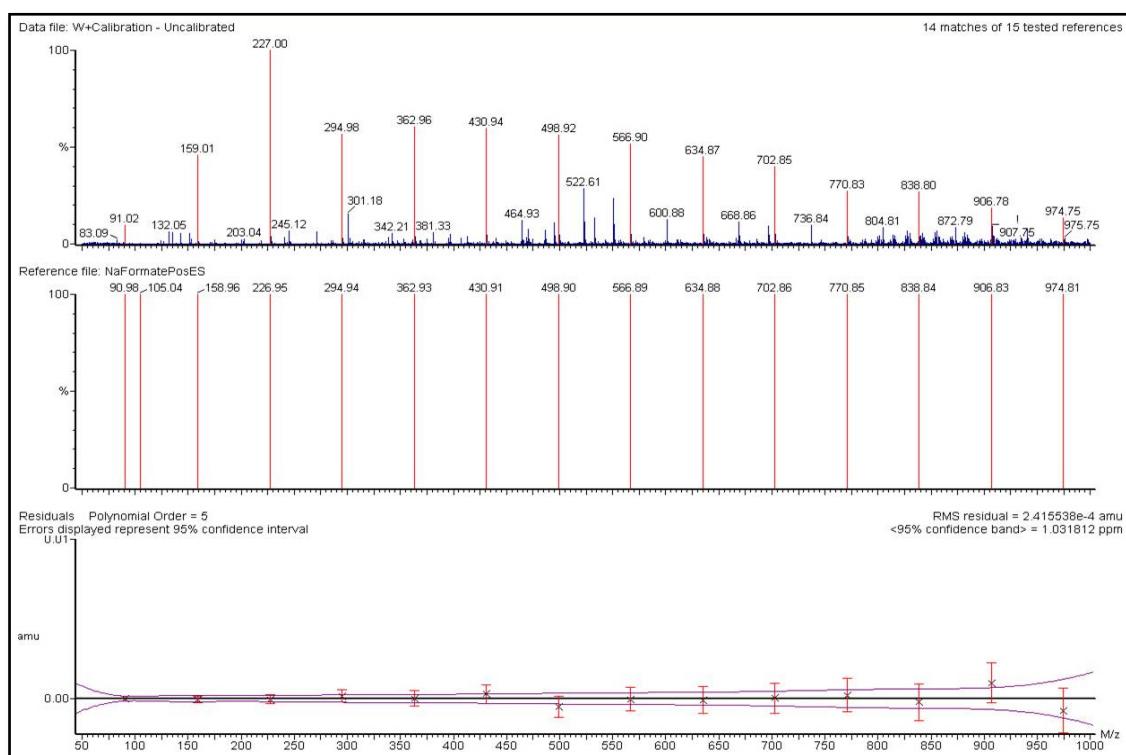


Abbildung 4-1 Kalibrierung eines MS/TOF Gerätes (LCT Premier XE, Waters) mit Natriumformiat

Kleinste Änderungen der Umgebungsbedingungen können zu einer Verschiebung dieser Massenachse und damit zu einem zunehmenden Massenfehler führen. Um dies zu vermeiden, wird parallel zur Probe eine Referenzsubstanz bekannter exakter Masse (z. B. Leucin-Enkephalin C₂₈H₃₇N₅O₇) analysiert und anhand dieser Messung die ursprüngliche Massenkalibrierung in einem geringen Rahmen angepasst bzw. nachgeführt.

Um die Stabilität der Massengenauigkeit zu überprüfen wurde ein Urin mit 19 verschiedenen toxikologisch relevanten Substanzen (Konzentration der Substanzen: jeweils 10 mg/l) über fünf Tage jeweils 3-mal über den Tag verteilt analysiert (Probenvolumen 3 µl). Für alle Substanzen wurde die maximale Massenabweichung errechnet (Abb. 4-2), sie betrug jeweils weniger als 10 mDa (Bereich 2 – 8 mDa). Außerdem wurden die maximalen Retentionszeitschwankungen der UPLC für die Substanzen ermittelt, die jeweils geringer als 0.3 min waren (Abb. 4-3).

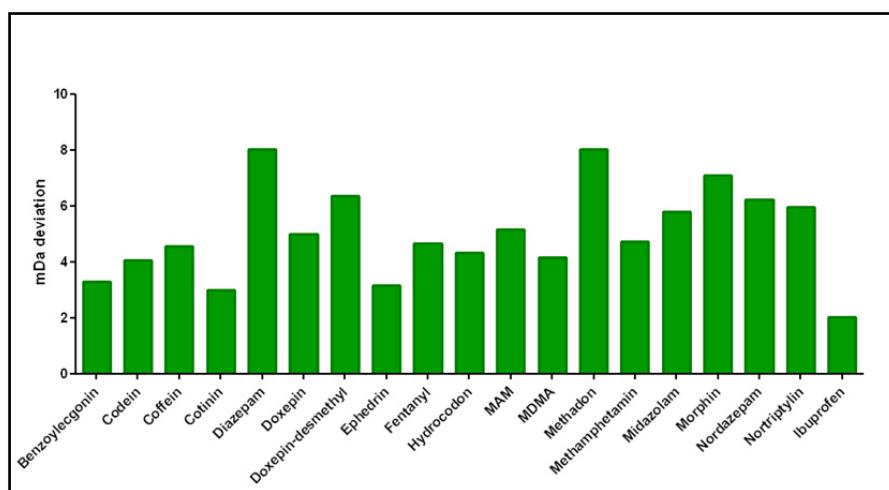


Abbildung 4-2 Maximale Massenabweichung bei der Bestimmung einer Testmischung 19 toxikologisch relevanter Substanzen mittels UPLC-MS/TOF über 5 Tage (jeweils 3 Analysen pro Tag)

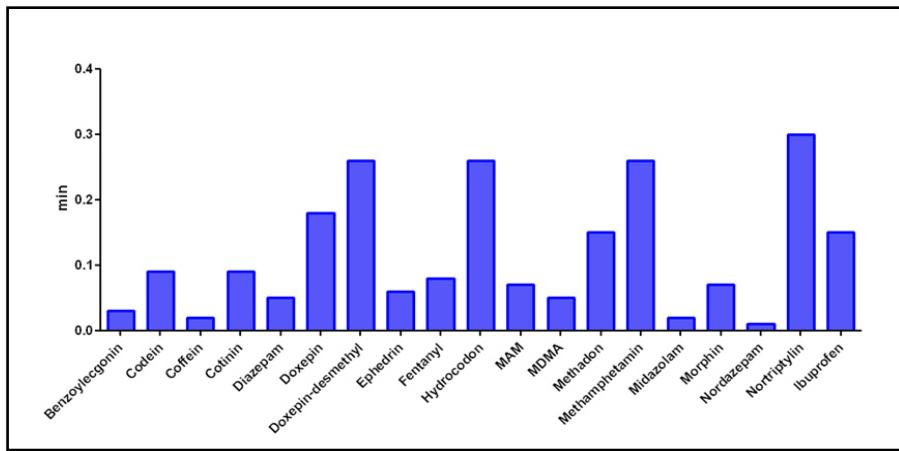


Abbildung 4-3 Maximale Retentionszeitabweichung bei der Bestimmung einer Testmischung 19 toxikologisch relevanter Substanzen mittels UPLC-MS/TOF über 5 Tage (jeweils 3 Analysen pro Tag)

4.2 QUALITATIVER NACHWEIS TOXIKOLOGISCH RELEVANTER SUBSTANZEN – SYSTEMATISCHE TOXIKOLOGISCHE ANALYSE (STA)

4.2.1 AUFBAU EINER SPEKTREN-DATENBANK FÜR DIE UPLC-MS/TOF

Für das klinisch-toxikologische Screening mit der UPLC-MS/TOF wurde eine Spektren-Datenbank relevanter Substanzen aufgebaut. In dieser Datenbank wurde die Retentionszeit der Substanzen in der UPLC, das gesamte Spektrum der Muttersubstanz und das gesamte Fragmentspektrum hinterlegt; im Gegensatz zu einer Quadrupol-MS, die nur bestimmte, vorher ausgewählte Massenübergänge misst, werden bei der verwendeten MS/TOF-Analytik alle 0.15 s jeweils zwei vollständige Massenspektren (nicht-fragmentiert und fragmentiert) aufgenommen und gespeichert. Zur Erstellung der Spektren-Datenbank wurde jede Substanz als Einzelstandard untersucht und die Spektren für jeweils niedrige und hohe Kollisionsenergien aufgenommen.

Aufgrund der anfallenden großen Datenmengen, die durch die Größe der Datenfiles und der großen Anzahl der Substanzen bedingt ist, ergab sich rasch die Notwendigkeit, eine effektivere Auswertetechnik zu erarbeiten. Je größer die Zahl der in der Spektren-Datenbank aufgenommenen Substanzen, desto länger benötigt die MassLynx-Software ChromaLynx (Waters GmbH) für den Datenabgleich mit den Patientenproben. Bei 402 verschiedenen Substanzen, die im Rahmen der Dissertation in die Spektren-Datenbank aufgenommen wurden, erwies sich die Datenprozessierung als für den Routinebetrieb zu langsam. Aus diesem Grund wurde eine alternative Vorgehensweise für das toxikologische Screening entwickelt und validiert.

4.2.2 ENTWICKLUNG EINER 'TARGETED-DATENBANK' FÜR DIE UPLC-MS/TOF

Als Alternative zur Spektrendatenbank wurde eine neue Vorgehensweise entwickelt, die auf einer 'Targeted-Datenbank' basiert. Sie nutzt als Identifizierungsparameter die Retentionszeit an der UPLC und - anstatt des gesamten Spektrums - nur jeweils die exakte Masse des Molekülions und ein spezifisches Fragment nach insource-Fragmentierung. Basierend auf diesen Parametern, die im Anhang 44 aufgeführt sind, wurde eine Vorabbewertung der Substanzvorschläge durch die 'Targeted-Datenbank' optimiert (siehe Abb. 4-4). Als erstes Kriterium für die Substanzerkennung wird die Abweichung der Retentionszeit des aktuellen Probenlaufs zum Bibliothekseintrag ausgewertet. Ist die Abweichung größer als 0.3 min wurde die Substanz als nicht gefunden bewertet und mit einem roten „X“ markiert. Bei einer geringeren Abweichung erscheint vor dem Substanznamen ein kleiner grüner Haken (Abb. 4-4). Als Zweites wird die Massenabweichung der Molekülmasse überprüft. Bei einer Massenabweichung von weniger als 10 mDa wird der Vorschlag mit einem zweiten (größeren) grünen Haken markiert. Ist die Abweichung hingegen größer als 20 mDa wird die Substanz wiederum mit einem roten „X“ markiert, bei einem Massenfehler zwischen 10 und 20 mDa wird ein gelbes Fragezeichen angezeigt. Wird zusätzlich zur richtigen Retentionszeit und exakten Molekülmasse eine in der 'Targeted-Datenbank' vorgegebene Fragmentmasse

gefunden, wird der Substanzvorschlag zusätzlich durch ein „e“ vor dem Namen markiert; dieses entspricht der höchsten Zuverlässigkeitssstufe für die Substanzidentifizierung anhand der ‘Targeted-Datenbank’.

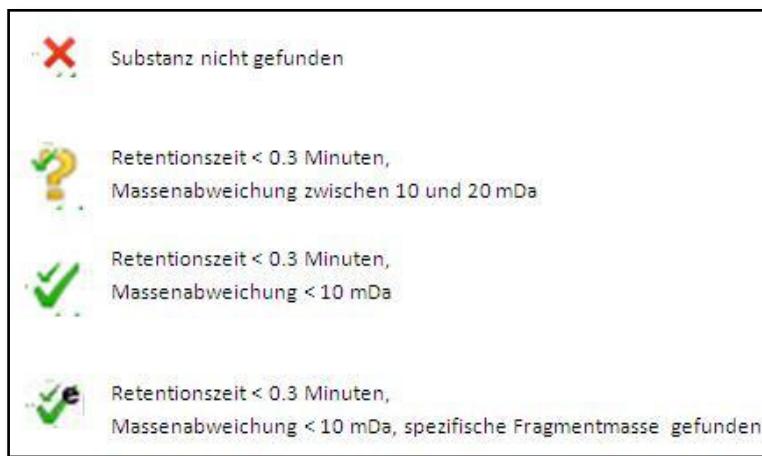


Abbildung 4-4 Darstellung der Substanzvorschläge der Targeted-Datenbank

Für das ‘Targeted-Screening’ mit der UPLC-MS/TOF wurden die häufigsten und für Vergiftungen relevanten Analyte im Bereich der klinischen Toxikologie in die Bibliothek ‘Targeted-Library-2011’ aufgenommen, derzeit 609 Substanzen (Stand 31.03.2012, Anhang 44). Aus der Untersuchung der entsprechenden Reinsubstanzen wurden die exakte Molekülmasse, die Retentionszeit und eine charakteristische Fragmentmasse extrahiert und gespeichert. Um Retentionszeitschwankungen durch Säulenalterung oder fehlerhafte Massenabweichungen durch Verschmutzung der Ionenquelle zu erkennen, wurde eine kommerziell erhältliche Kontrollprobe (TOX.IS) bei den Untersuchungen täglich mitgeführt. Um die Identifizierungsqualität weiter zu erhöhen, wurden zusätzliche Fragmentmassen ausgewählt; die Software ist bisher jedoch nicht in der Lage, mehr als eine Fragmentmasse zu berücksichtigen. Deshalb wurden die zusätzlichen Massen zum jeweiligen Substanznamen ergänzt, so dass sie in der Substanzliste eines Probenscreenings erscheinen. So kann der Benutzer eigenständig und einfach die Spektren auf das Vorhandensein dieser Fragmentmassen untersuchen. Für jede Substanz wurde zusätzlich zur Summenformel die zugehörige Struktur aus der Datenbank „Chemspider“ [78] für die spezifische Fragmentanalyse gespeichert.

4.2.3 TOXIKOLOGISCHES SCREENING MIT DER 'TARGETED DATENBANK' BZW. DER SPEKTRENDATENBANK IM ROUTINEBETRIEB

Um das toxikologische Screening mit Hilfe der 'Targeted-Datenbank' im Vergleich zum Screening mittels der Spektrendatenbank im Routinebetrieb eines Akut-Krankenhauses zu validieren wurden von Juni bis September 2011 329 authentische Urinproben aus dem Krankenhaus untersucht. Alle Proben wurden mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Toxi-Tubes® A (siehe Kapitel 3.2.1.1) aufgearbeitet und mit UPLC-MS/TOF (siehe Kapitel 3.2.3.1 und Kapitel 3.2.4.1) analysiert. Toxikologisch nicht relevante Substanzen wie Coffein, Theophyllin und Hydrocortison, die in der Datenbank hinterlegt sind, wurden bei der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt. Der Nachweis aller Substanzen, die durch die 'Targeted-Datenbank' als in der Probe enthalten gekennzeichnet wurden (Doppelhaken mit dazugehörigem Fragmention), wurde anschließend anhand der Spektren-Datenbank überprüft. Die Spektrendatenbank enthält jeweils das gesamte Spektrum der Muttersubstanz und ein zugehöriges vollständiges Fragmentspektrum. Zeigte der Vergleich des fragmentierten Substanzspektrums der Probe das gleiche Fragmentmuster wie die Datenbank der jeweiligen Reinsubstanzen, wurde die Identifizierung der 'Targeted-Datenbank' als richtig-positiv gewertet. Als falsch-positiv wurden Ergebnisse der 'Targeted-Datenbank' gewertet, bei denen zwar Retentionszeit, Masse der Muttersubstanz und Fragmentmasse zwischen Probe und Datenbankeintrag übereinstimmen, aber der direkte Vergleich des Fragmentmusters der Spektrendatenbank deutliche Abweichungen und damit Hinweise auf andere Substanzen ergaben. 86.5 % der Ergebnisse des 'Targeted Screenings' wurden nach Überprüfung mit der Spektrenbibliothek als richtig-positiv gewertet, als falsch-positiv 13.5 % der Identifizierungen (Tab. 4-1). Die Ergebnisse beider Nachweisverfahren für die einzelnen Substanzen sind im Anhang 1 aufgeführt.

Mittels 'Targeted Datenbank' nachgewiesene Substanzen	Übereinstimmung mit Spektren-Datenbank	Abweichung von Spektren-Datenbank
1044	881	163
100 %	86.5 %	13.5 %

Tabelle 4-1 Vergleich der Ergebnisse des 'Targeted Screenings' mit der Spektren-Datenbank

Die abweichenden Ergebnisse zwischen 'Targeted-' und Spektren-Datenbank kommen hauptsächlich durch hohe Konzentrationen einzelner Substanzen in den Proben zustande. Es zeigte sich, dass bei falsch-positiven Identifizierungen meistens die Massenabweichung größer als 10 mDa war; ein hinsichtlich der exakten Masse ähnliches Molekül mit einer Retentionszeit innerhalb der vorgegebenen Abweichungstoleranz wird ebenfalls als positiv angezeigt. War in einer Patientenprobe z. B. sehr viel EDDP vorhanden, wurde in 79 % der Fälle zusätzlich Doxepin als (falsch-)positiv angezeigt (Abb. 4-5). So zeigt z. B. das 'Targeted-Screening' der Probe Di5-110719 Doxepin und EDDP als mögliche Substanzen an (Abb. 4-5). Der Vergleich des Spektrums mit dem Spektren-Datenbankeintrag von Doxepin (Abb. 4-6) zeigt jedoch, dass mehrere Fragmentmassen mit zum Teil hoher Intensität (235, 220, 207 usw.) im Spektrum der Probe (Abb. 4-5) nicht vorhanden sind. Somit kann Doxepin in dieser Probe weitgehend ausgeschlossen werden. Durch den Abgleich der Substanzvorschläge aus der 'Targeted-Datenbank' mit den vollständigen Fragmentspektren der Reinsubstanzen in der Spektrenbibliothek können die Screening-Ergebnisse somit einfach bestätigt werden.

Target Compounds: 110719-19	
7 Positive; 0 Tentative; 589 Negative	
+	Cotinin (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O, m/z 177.1028, 2.26 min)
+	Doxepin (C ₁₉ H ₂₁ ON, m/z 280.1701, Fragment m/z 235.1123, 10.32 min)
+	878, (10.10 min), Area 737.2, 4.54 mDa, i-FIT Conf N/A
+	Isotope cluster: Mass Error 21.0 PPM, Ratio Error 40.1%
+	890, (10.36 min), Area 1054.8, 2.86 mDa, i-FIT Conf N/A
+	Dyclonin (C ₁₈ H ₂₇ NO ₂ , m/z 290.2120, 10.89 min)
+	EDDP (C ₂₀ H ₂₃ N, m/z 278.1909, Fragment m/z 249.1517, 10.09 min)
+	870, (10.02 min), Area 110.9, 7.46 mDa, i-FIT Conf N/A
+	Isotope cluster: Mass Error 758.0 PPM, Ratio Error 703176.8%
+	890, (10.36 min), Area 4679.3, 3.46 mDa, i-FIT Conf N/A
+	Isotope cluster: Mass Error 17.0 PPM, Ratio Error 7.6%
+	Maprotilin (C ₂₀ H ₂₃ N, m/z 278.1909, 11.70 min)
+	Methadone (C ₂₁ H ₂₇ NO, m/z 310.2171, Fragment m/z 265.1592, 11.89 min)
+	Theophyllin (C ₇ H ₈ O ₂ N ₄ , m/z 181.0726, Fragment m/z 124.0564, 5.07 min)

Abbildung 4-5 Beispiel eines falsch-positiven Screening-Ergebnisses (Patient Di5-110719) mittels UPLC-MS/TOF Waters Premier XE

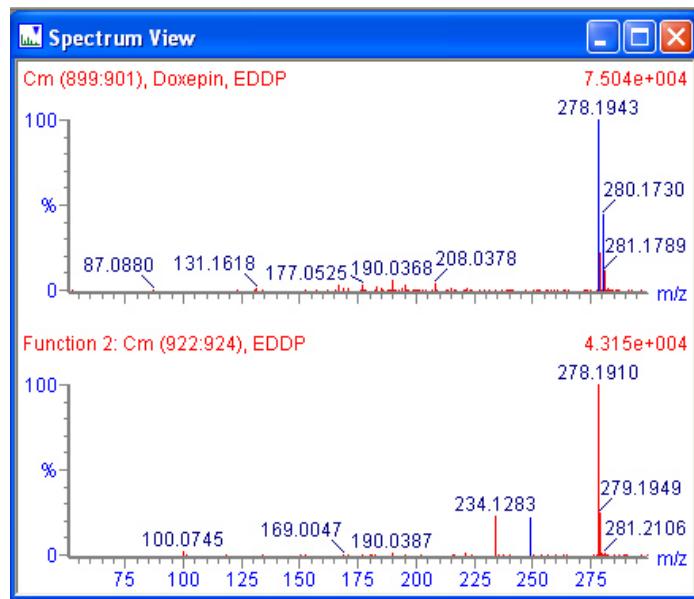


Abbildung 4-6 Spektrumansicht des extrahierten Massenspektrums der Patientenprobe (Patient Di5-110719) für die Substanzvorschläge Doxepin und EDDP

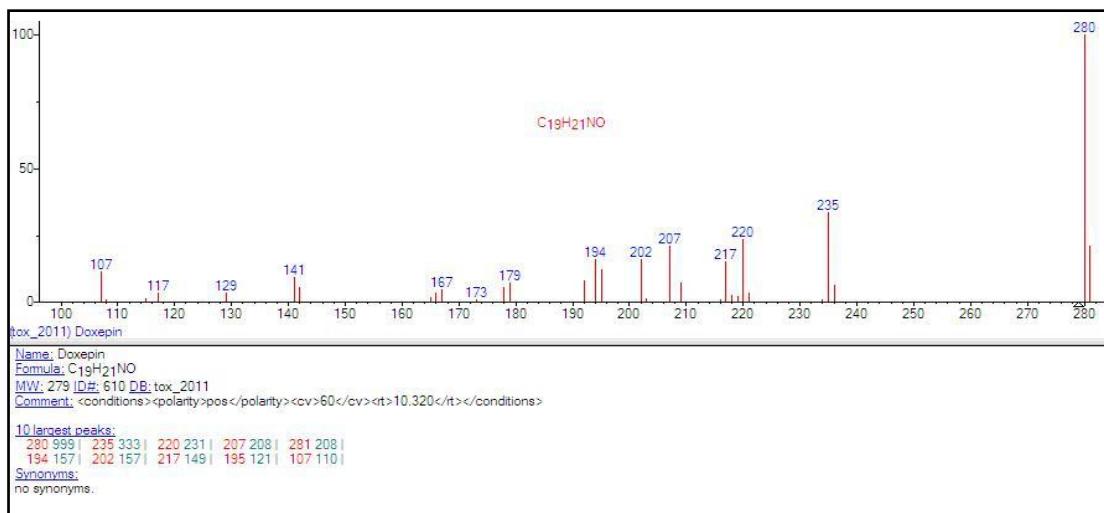


Abbildung 4-7 In der Spektrendatenbank hinterlegtes Spektrum von Doxepin

4.2.4 TOXIKOLOGISCHES SCREENING MITTELS UPLC-MS/TOF IM VERGLEICH ZUR REFERENZMETHODE GC-MS

Im klinischen Labor ist die GC-MS der Goldstandard für das toxikologische Screening. Um die Routinetauglichkeit des Screenings mittels UPLC-MS/TOF zu überprüfen, wurden die 329 authentische Patientenproben, die mittels UPLC-MS/TOF untersucht wurden, ebenfalls für die GC-MS (siehe Kapitel 3.2.1.1) aufgearbeitet und ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.4.1). Die Substanzvorschläge für die GC-MS-Analyse wurden mittels der kommerziell erhältlichen „Pfleger-Maurer-Weber“ [81] Bibliothek ermittelt. Die Ergebnisse des ‘Targeted-Screenings’ der UPLC-MS/TOF wurden nach Validierung mit der Spektren-Datenbank mit den Ergebnissen des GC-MS-Screenings verglichen (Tab. 4-2 und Anhang 2). 57.4 % der Substanzen konnten sowohl mittels UPLC-MS/TOF- als auch mittels GC-MS-Verfahrens eindeutig identifiziert werden. Zu den Substanzen, die nicht mittels MS/TOF identifiziert wurden, gehören vor allem Substanzen der Benzodiazepin-Gruppe. Als falsch-negativ wurde Oxazepam in 80 % und Temazepam in 74 % der Fälle nachgewiesen. Die Substanzen waren in den Patientenproben meist sehr hoch konzentriert, so dass es zu einer Ionensuppression kam und damit die Massengenauigkeit nicht mehr gegeben war. Durch nachträgliche Verdünnung der Extrakte und erneute Analyse mittels an der UPLC-MS/TOF konnten diese Substanzen meist ohne Probleme nachgewiesen werden. 20.5 % der Substanzen

konnten mittels GC-MS-Verfahrens nicht nachgewiesen wurden, da sie aufgrund ihrer Polarität und/oder ihrer thermischen Labilität nur durch die Methode der MS/TOF identifiziert werden. Patienten, die weder mittels GC-MS noch mit der MS/TOF ein Ergebnis zeigten, wurden als Patienten ohne Befund gewertet.

Substanzen	UPLC-MS/TOF positiv	UPLC-MS/TOF negativ
GC-MS positiv	778 (57.4 %)	300 (22.1 %)
GC-MS negativ	278 (20.5 %)	Patienten ohne Befund

Tabelle 4-2 Vergleich Ergebnisse 'Targeted-Screening' UPLC-MS/TOF mit GC-MS

4.2.5 TEILNAHME AN RINGVERSUCHEN

Seit 2011 wurden mit dem UPLC-MS/TOF-System 7 Ringversuchsproben der GTFCh und DGKL (RfB) untersucht [82]. Dabei konnten 47 von 56 Substanzen nachgewiesen werden (Tab. 4-3). Der fehlende Nachweis von 9 von 56 Substanzen ist methodisch bzw. experimentell bedingt. THC, Phenobarbital, Zolpidem und Pregabalin können aufgrund der basischen Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Toxi·Tube® A nicht mittels UPLC-MS/TOF nachgewiesen werden, hier müsste die Probenvorbereitung geändert werden. Pregabalin kann nur mit einer Festphasen-Extraktion in der Probe nachgewiesen werden, diese Methode war zum Zeitpunkt der Ringversuchsprobe QSA 3/11 A jedoch noch nicht im Labor etabliert. Ibuprofen kann in der UPLC-MS/TOF nur im negativen Ionisationsmodus identifiziert werden, der zum Zeitpunkt der Messungen durch technische Probleme nur eingeschränkt auswertbar war. Fluvoxamin und Sertalin waren zum Zeitpunkt der Ringversuche UF 3/11 A und STA B noch nicht in der Datenbank der UPLC-MS/TOF enthalten.

Ringversuch	QSA 3/11		UF 3/11	DS 4/11		STA	
Substanz	A	B	A	A	B	A	B
Amitriptylin						+	+
Benzoylecognin			+	+	+		
Bromazepam						+	
Buprenorphin				+			
Clozapin							+
Cocain					+		
Codein					+	+	+
Coffein							+
Diazepam	+					+	+
Diphenhydramin						+	
EDDP	+	+	+	+	+		+
Fluvoxamin			-				
Ibuprofen	-						
Lamotrigin						+	+
Methadon	+	+			+		
Methylphenidat			+				
Metoprolol						+	
Mirtazapin						+	
Morphin				+			
Nordazepam	+	+	+				

Tabelle 4-3 Ergebnisse der Analyse der Ringversuchsproben mit UPLC-MS/TOF.

Nachgewiesene Substanzen sind mit „+“ gekennzeichnet, nicht gefundene Substanzen mit „-“

Ringversuch	QSA 3/11		UF 3/11	DS 4/11		STA	
Substanz	A	B	A	A	B	A	B
Nortilidin							+
Nortriptylin			+	+			
Opipramol					+		
Oxazepam		+					
Nordazepam	+	+	+				
Pentobarbital				+			
Phenobarbital				-			
Pregabalin	-						
Sertralin							-
Temazepam	+	+					
THC-Metabolit			-	-	-		
Thiopental				+			
Zolpidem				-			

Fortsetzung Tabelle 4-3 Ergebnisse der Analyse der Ringversuchsproben mit UPLC-MS/TOF.

Nachgewiesene Substanzen sind mit „+“ gekennzeichnet, nicht gefundene Substanzen mit „-“

4.2.6 GEZIELTE SUCHANALYTIK ZUM NACHWEIS 'NEUER' DROGEN

Für den Nachweis von Substanzen, die noch nicht in den Datenbanken erfasst sind, wird eine 'gezielte Suchanalytik' verwendet. Da für jede Probe mit der UPLC-MS/TOF über die gesamte chromatographische Laufzeit vollständige Spektren ('full scan') aufgenommen werden, können Substanzen auch nach der Messung der Probe mit Hilfe ihrer exakten Molekülmasse identifiziert werden. Exemplarisch wurden fünf authentische Proben von Patienten mit dem Verdacht auf den Konsum von „Badesalz“ mit der UPLC-MS/TOF untersucht. Häufiger Bestandteil von „Badesalzen“ sind Mephedron (4-Methylmethcathinon), MDPV (Methylendioxypyrovaleron), Methcathinon (2-Methylamino-1-phenylpropanon),

Phenethylamin, Benzylpiperazin, Methylon (3,4-Methylendioxy-N-methylcathinon), Butylon (N-Methylbenzodioxolylol-proylamin) und Flephedron (4-Fluormethcathinon) [83]. Tabelle 4-4 fasst die Ergebnisse der untersuchten Patientenproben zusammen.

Substanz	Summenformel Exakte Masse	Patient 1 (25.07.11)	Patient 2 (02.11.11)	Patient 3 (16.11.11)	Patient 4 (18.11.11)	Patient 5 (28.12.11)
Mephedron	C11H15NO 177.1232 Da			+		
MDPV	C16H21NO3 275.1521 Da	+	+		+	+
Methcathinon	C10H13NO 163.0997 Da		+			
Phenethylamin	C8H11N 118.0657 Da					
Benzylpiperazin	C11H16N2 176.1313 Da					
Methylon	C11H13NO3 207.0895 Da		+			+
Butylon	C12H15NO3 221.1052 Da					
Flephedron	C10H12FNO 181.0903 Da					

Tabelle 4-4 Übersicht der identifizierten "Badesalz-Substanzen" mit Summenformel und nicht-protonierter, exakter Molekülmasse

Abb. 4-8 und 4-9 zeigen die Chromatogramme mit den Massenspektren einer Patientenprobe (Patient 5). In den Chromatogrammen dieses Patienten fanden sich eindeutige Peaks für die Massenspuren von Methylon (3,4-Methylendioxy-N-methylcathinon) und MDPV (Methylendioxypyrovaleron). Butylon zeigt bei einer Retentionszeit von 8.30 min ebenfalls einen Peak; allerdings beträgt die Massenabweichung zwischen der im Chromatogramm gemessenen Masse von 222.0746 Da und der exakten Masse von Butylon (222.1130 Da) 38 mDa. Da diese Massenabweichungen größer als 20 mDa ist wurde die Substanz als negativ gewertet. Die Substanzpeaks, die auf Methylon und MDPV in der Probe hinweisen, wurden mit Hilfe der im Methodenteil 3.2.3.2 beschriebener Vorgehensweise weiter untersucht. Dazu wurden die Fragmentspektren der Peaks mithilfe der Software MassFragment (Waters) auf mögliche Fragmentmassen von Methylon und MDPV analysiert. Abbildung 4-10 zeigt das Fragmentspektrum der Probe für die Molekülmasse 208.0974 Da und Abbildung 4-11 die Molekülstruktur und mögliche Fragmentierung von Methylon, aus der sich ein potentielles Fragment von Methylon mit der Masse 160.0762 Da ergibt. Eine Substanz dieser Masse wurde auch in der Patientenprobe mit einer Abweichung von 4.6 mDa als größtes Fragment (Abb. 4-9) nachgewiesen. Damit ist die Identifizierung von Methylon in der Probe auch ohne Verfügbarkeit einer Standardsubstanz mit hoher Zuverlässigkeit möglich.

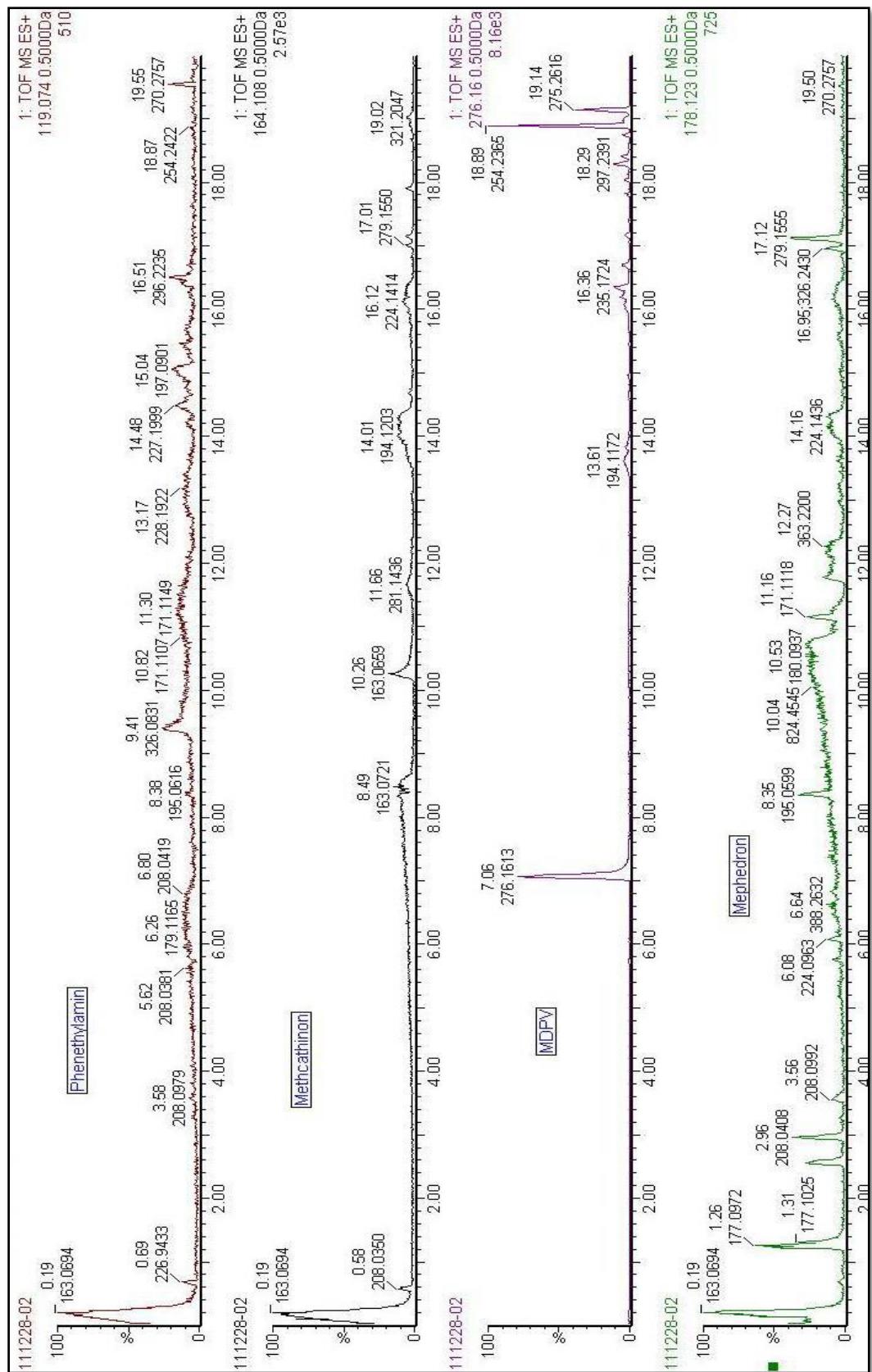


Abbildung 4-8 Chromatogramme der extrahierten Massenspektren für die exakten Massen von "Badesalzen" Teil 1 (Patient 5)

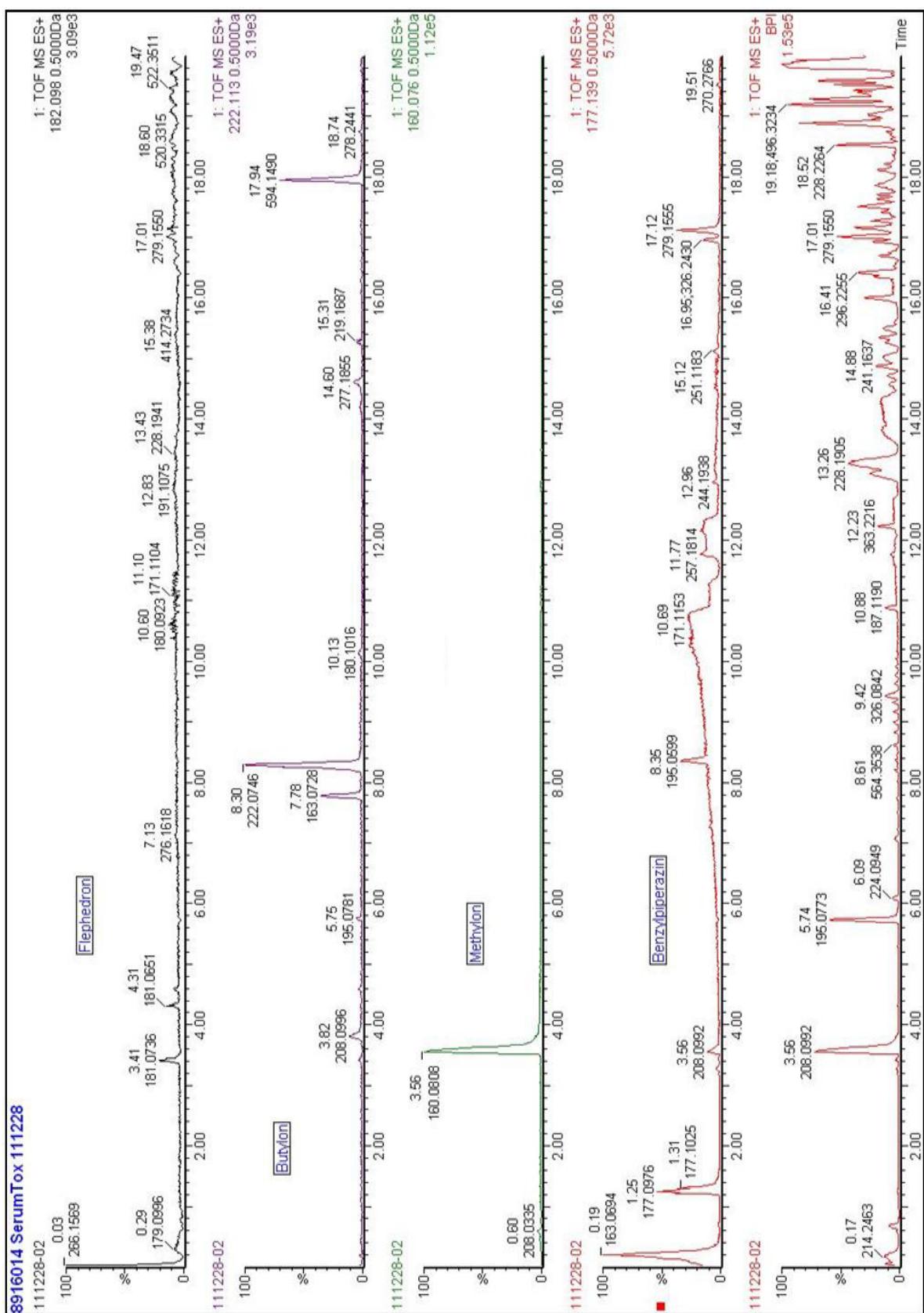


Abbildung 4-9 Chromatogramme der extrahierten Massenspektren für die exakten Massen von "Badesalzen" Teil 2 (Patient 5)

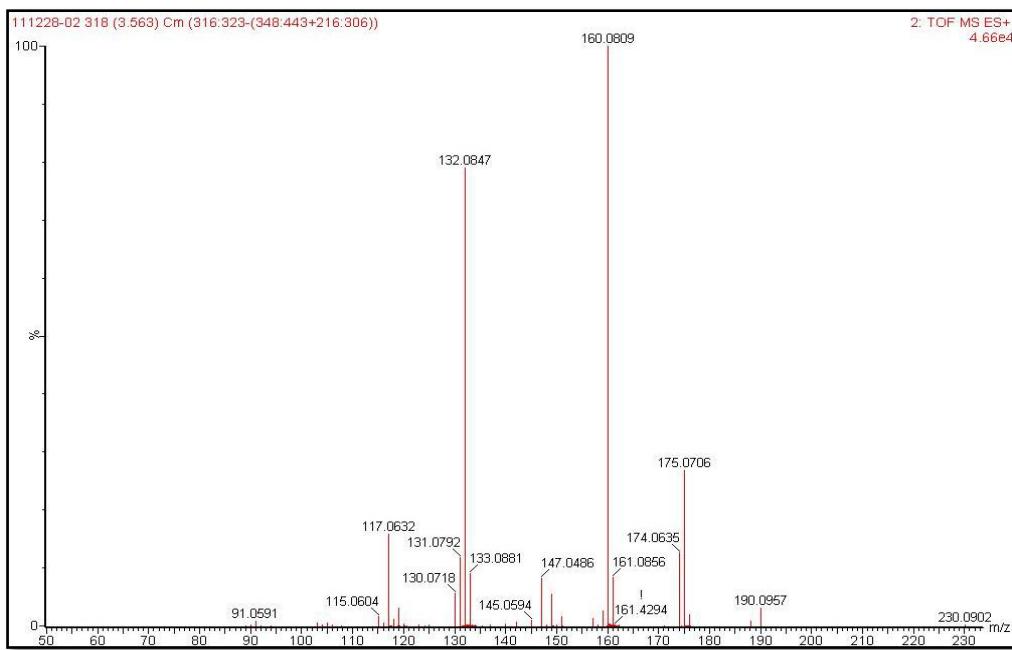


Abbildung 4-10 Fragmentspektrum der Patientenprobe, die möglicherweise Methylon enthält (Patient 5)

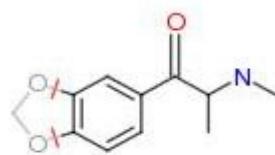


Abbildung 4-11 Methylon-Fragment mit der Masse 160.0762 Da

Die gleiche Vorgehensweise wurde auch für den Nachweis der Substanz MDPV verwendet. Abbildung 4-12 zeigt das Fragmentspektrum der Patientenprobe für die Massenspur 276.1613 Da und Abbildung 4-12 die Massen von zwei möglichen MDPV-Fragmenten. Die Massen 205.0899 Da und 126.1306 Da wurden auch im Patientenspektrum mit einer Massenabweichung von je 3.4 mDa und 2.3 mDa identifiziert. Basierend auf dem Nachweis der Muttersubstanz und zweier spezifischer Fragmente kann MDPV mit hoher Sicherheit in den Proben nachgewiesen werden.

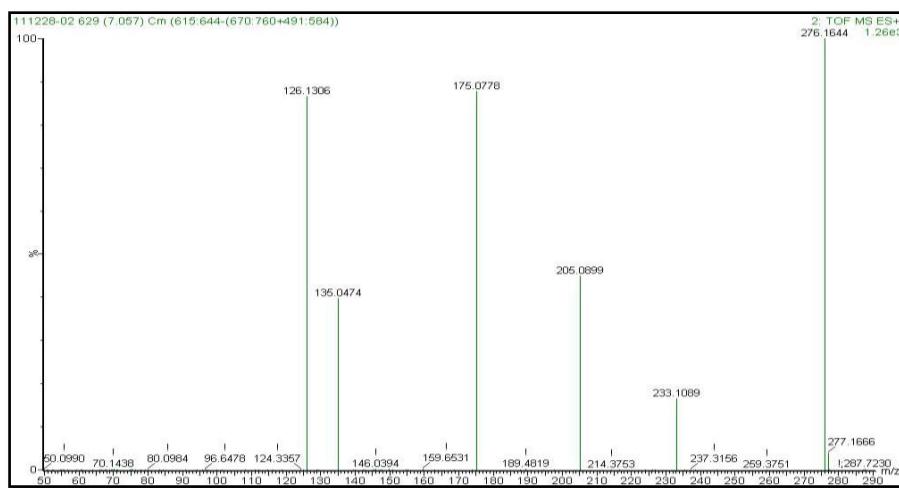


Abbildung 4-12 Fragmentspektrum der Patientenprobe mit Verdacht auf MDPV-Einnahme (Patient 5)

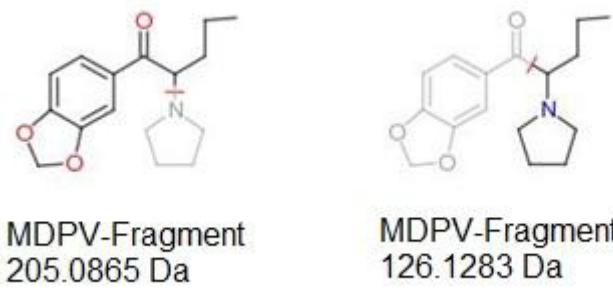


Abbildung 4-13 Strukturen und exakte Molekülmassen von zwei potentiellen MDPV-Fragmenten

4.2.7 VERGLEICH DER PROBENVORBEREITUNG MITTELS FLÜSSIG-FLÜSSIG- UND FESTPHASEN-EXTRAKTION

Für den Vergleich der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit der Festphasen-Extraktion (MEPS) wurden 30 authentische Urinproben nach beiden Verfahren aufgearbeitet und anschließend gemessen (siehe Kapitel 3.2.1.1). Insgesamt konnten in den Proben 111 (LLE) bzw. 105 (MEPS) toxikologisch relevante Substanzen nachgewiesen werden. Tabelle 4-5 zeigt eine Aufstellung aller gefundenen Substanzen in Abhängigkeit von der vorangegangenen Probenaufarbeitung. Eine deutliche Diskrepanz zeigte sich bei einzelnen Substanzen, so konnte z.B. EDDP, ein Methadonmetabolit, bei den mit MEPS aufgearbeiteten Proben in nur 6 von 12 Fällen nachgewiesen werden. Auch für den sicheren Nachweis von Substanzen, die in nur geringen Konzentrationen in den Proben enthalten sind, stellte sich die MEPS als problematisch heraus. Für die Extraktion einzelner Substanzklassen, wie z. B.

Benzodiazepine mit ihren Vertretern Oxazepam und Tetrazepam, schien die MEPS hingegen deutlich besser geeignet.

Substanz:	LLE MS-TOF	SPE (MEPS) MS-TOF	Substanz:	LLE MS-TOF	SPE (MEPS) MS- TOF
7-Aminodesmethyl-flunitrazepam	1	-			
7-Aminoflunitrazepam	2	2	Lorazepam	2	1
Amitriptylin	2	3	MAM	3	4
Amitriptylinoxid	2	3	Methadon	12	14
Benzoylecgonin	-	2	Methorphan	1	-
Bisoprolol	1	1	Midazolam	1	-
Bromazepam	2	2	Mirtazapin	-	1
Carbamazepin	1	1	Morphin	15	13
Carbamazepinoxid	1	1	Naloxon	1	-
Codein	8	9	Nordazepam	6	4
Diazepam	4	1	Nortriptylin	2	2
Dihydrocodein	1	1	Noscapin	6	5
Doxepin	1	-	Opipramol	1	1
EDDP	12	6	Oxazepam	5	8
Fentanyl	2	2	Paracetamol	5	6
Flunarizin	1	1	Promethazin	1	1
Flunitrazepam	1	-	Protriptylin	3	2
Fluoxetin	1	1	Temazepam	2	5
Heroin	1	2	Summe:	111	105
Lidocain	1	-	Prozent %:	100	94.59

Tabelle 4-5 Vergleich der Ergebnisse der Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und automatisierter Festphasenextraktion (MEPS) für die UPLC-MS/TOF-Analytik

4.3 QUANTITATIVER NACHWEIS TOXIKOLOGISCH RELEVANTER SUBSTANZEN - THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING (TDM)

Für die Quantifizierung von sechs klinisch relevanten Substanzen wurden Methoden entwickelt und entsprechend den Richtlinien der GTFCh validiert. Aufgrund der guten chromatographischen Trennung der Substanzen mittels UPLC und der Verwendung der exakten monoisotopischen Molekülmassen durch die MS/TOF-Technik konnte die Analysenzeit deutlich verkürzt und trotzdem eine eindeutige Peakidentifizierung gewährleistet werden. Ausgehend von der Screening-Methode (siehe Kapitel 3.2.3.1) wurde dazu die chromatographische Laufzeit für die Quantifizierungsmethoden von 20 auf 7 min verkürzt. Diese verkürzte Methode wurde zunächst durch den Vergleich der Analysen einer Kontrollprobe (TOX.I.S.) überprüft. Dazu wurden jeweils 3 µl der Kontrollprobe an der UPLC-MS/TOF eingespritzt und die Auf trennung bei einer UPLC-Laufzeit von 7 min und 20 min verglichen (Abb. 4-14). Die Peaks liegen bei einer Laufzeit von 7 min zwar näher zusammen, sind aber weiterhin eindeutig voneinander abgetrennt und identifizierbar. Letztendlich zeigen die Validierungsdaten für die Quantifizierung von Coffein, Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Gabapentin und Levetiracetam die ausreichende Selektivität der UPLC-MS/TOF-Analytik (siehe nachfolgendes Kapitel 4.3.1). Das Vorgehen bei der Validierung und die Ergebnisse werden im Folgenden im Detail anhand von Coffein beschrieben. Die detaillierten Messdaten der Validierungen von Lidocain und den Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin sind im Anhang 3 bis 42 aufgeführt. Bei allen Methoden wurden jeweils die Selektivität, Linearität, Genauigkeit, Präzision und Richtigkeit sowie die analytischen Grenzen bestimmt.

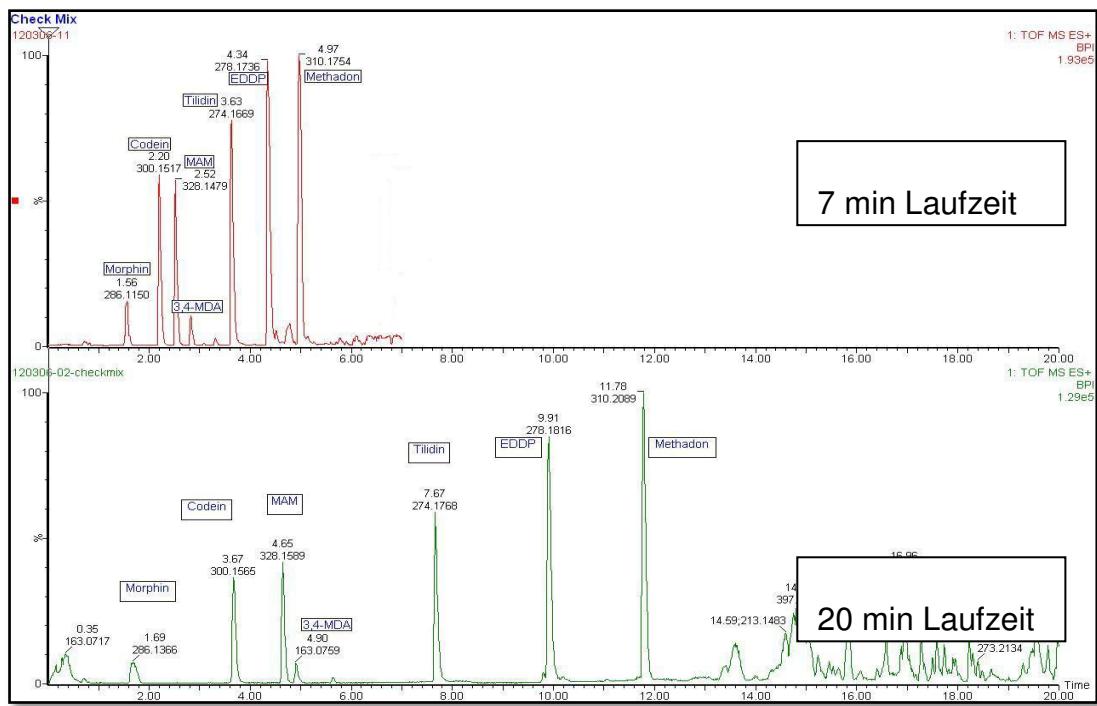


Abbildung 4-14 Vergleich der Peaktrennung anhand einer Kontrollprobe (TOX.I.S., Recipe) mit einer chromatographischen Laufzeit von 7 min bzw. 20 min. Oben: 7 min. Laufzeit; unten 20 min. Laufzeit.

4.3.1 SELEKTIVITÄT

Die Selektivität der Methode zur Quantifizierung von Coffein wurde anhand von sechs verschiedenen Leerseren und zwei Nullproben überprüft. In keinem der Leerseren zeigten sich bei der Retentionszeit (RT) von Coffein ein Peak (Tab 4-6), sondern es ist jeweils nur unspezifischer Background zu sehen (Abb. 4-15). Um falsch-positive Peaks auszuschließen wurde für die Peakerkennung einschließlich eines Sicherheitsaufschlags eine minimale Peakfläche von mindestens 15 counts festgelegt. In den Leerproben war wie erwartet weder der Analyt Coffein noch der interne Standard (IS) nachweisbar. In den Nullproben (Läufe 7 und 8) fand sich der IS als ein eindeutiger Peak mit ausreichend großer Fläche (Abb. 4-16). Somit konnte gezeigt werden, dass Matrixeffekte nicht zu einem falsch-positiven Nachweis von Coffein oder dem IS führen. Die Selektivitätsmessungen für den Nachweis von Lidocain und den Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin zeigten ebenfalls keine falsch-positiven Ergebnisse.

Lauf	Name	RT [min]	Fläche Coffein	Fläche IS
1	Leerserum 10	3.58	0.216	0
2	Leerserum 12	3.62	1.288	0
3	Leerserum 17	3.59	0.166	0
4	Leerserum 11	3.59	2.02	0
5	Leerserum 1	3.59	1.613	0
6	Leerserum 2	3.59	0.591	0
7	Nullprobe LS 10	3.64	0.969	411 898
8	Nullprobe LS 2	3.59	0.46	426 055

Tabelle 4-6 Selektivitätsmessungen für den Nachweis von Coffein im Serum

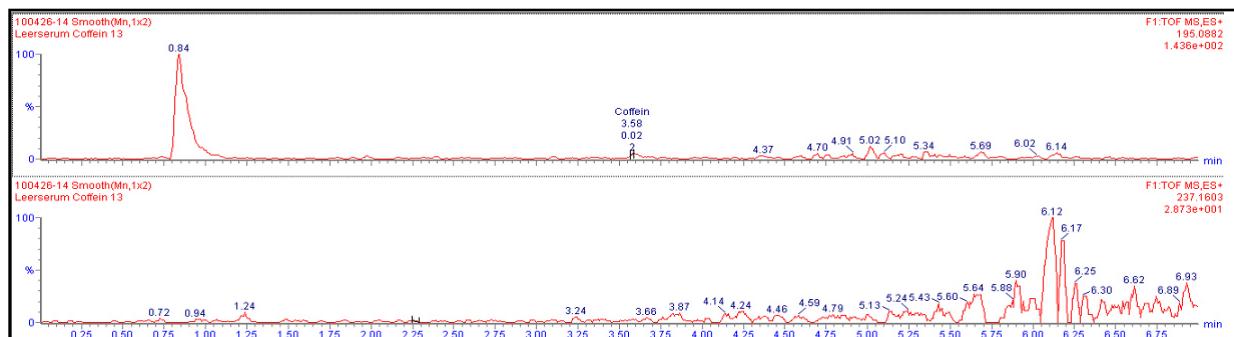


Abbildung 4-15 Analyse eines Coffein-Leerserums. Das obere Chromatogramm zeigt die extrahierte Massenspur von Coffein, das untere die des internen Standards (IS). Es sind keine Interferenzen bei den Retentionszeiten von Coffein bzw. IS zu sehen.

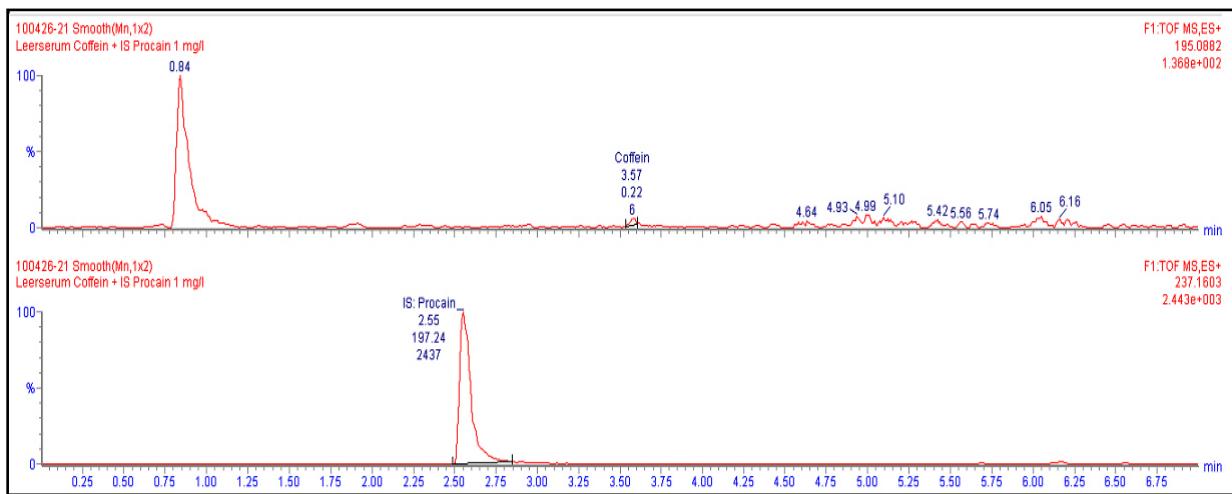


Abbildung 4-16 Analyse einer Coffein-Nullprobe. Das obere Chromatogramm zeigt die extrahierte Massenspur von Coffein, das untere die des internen Standards (IS), der als eindeutiger Peak zu erkennen ist.

4.3.2 LINEARITÄT

Um die Linearität der Methoden zu überprüfen, wurden an acht aufeinanderfolgenden Tagen jeweils sechsfach Bestimmungen von sechs Kalibratoren durchgeführt, die den für die Substanz relevanten Serum-Konzentrationsbereich abdecken. Tabelle 4-7 zeigt exemplarisch die detaillierten Ergebnisse der Bestimmung von Coffein eines Tages, Abbildung 4-17 fasst dann die Ergebnisse von acht Tagen zusammen.

Konzentration \ Messung	1 [mg/l]	2.5 [mg/l]	7.5 [mg/l]	12.5 [mg/l]	15 [mg/l]	25 [mg/l]	30 [mg/l]
1	0.997	2.453	7.505	12.318	14.881	25.112	29.269
2	1.000	2.519	7.418	12.340	15.416	23.576	31.290
3	0.977	2.460	7.466	12.678	15.375	24.430	29.949
4	0.953	2.471	7.420	12.704	15.669	23.432	31.211
5	1.030	2.566	7.602	12.491	14.991	24.273	30.116
6	0.998	2.542	7.701	12.754	15.046	24.571	31.030
Mittelwert	0.993	2.502	7.519	12.548	15.23	24.232	30.478
SD	0.0257	0.04714	0.11227	0.19135	0.30368	0.63254	0.82145
Varianz	0.00066	0.00222	0.01260	0.03662	0.09222	0.40011	0.67478
VK (%)	2.588	1.884	1.493	1.525	1.994	2.610	2.695

Tabelle 4-7 Überprüfung der Linearität der Bestimmung von Coffein. Ergebnisse der an einem Tag durchgeführten Analysen.

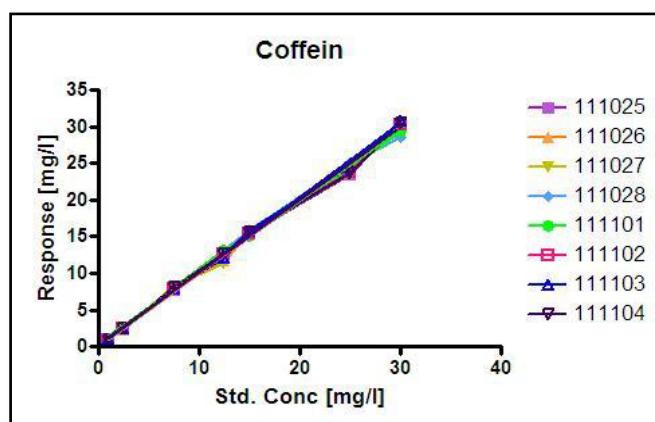


Abbildung 4-17 Überprüfung der Linearität der Bestimmung von Coffein. Die Abbildung zeigt die an acht konsekutiven Arbeitstagen (25.10. – 04.11.2011) erstellten Kalibriergeraden.

Die Messungen von Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin erfolgten analog. Die an acht konsekutiven Arbeitstagen ermittelten Kalibrationsgeraden sind in den Abbildungen 4-18 und 4-19 gezeigt, die Einzelwerte sind im Anhang 3 bis 7 aufgeführt.

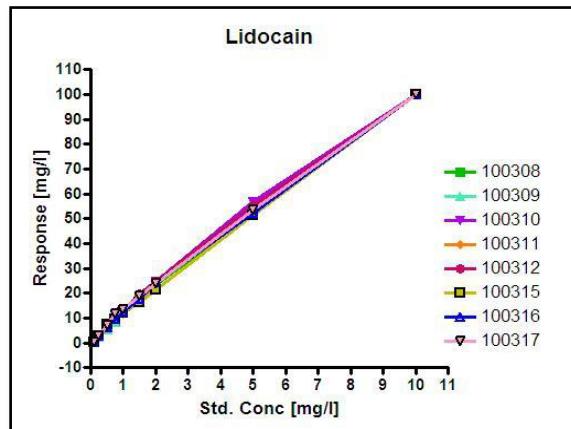


Abbildung 4-18 Überprüfung der Linearität der Bestimmung von Lidocain. Die Abbildung zeigt die an acht konsekutiven Arbeitstagen (08.03. – 17.03.2010) erstellten Kalibriergeraden.

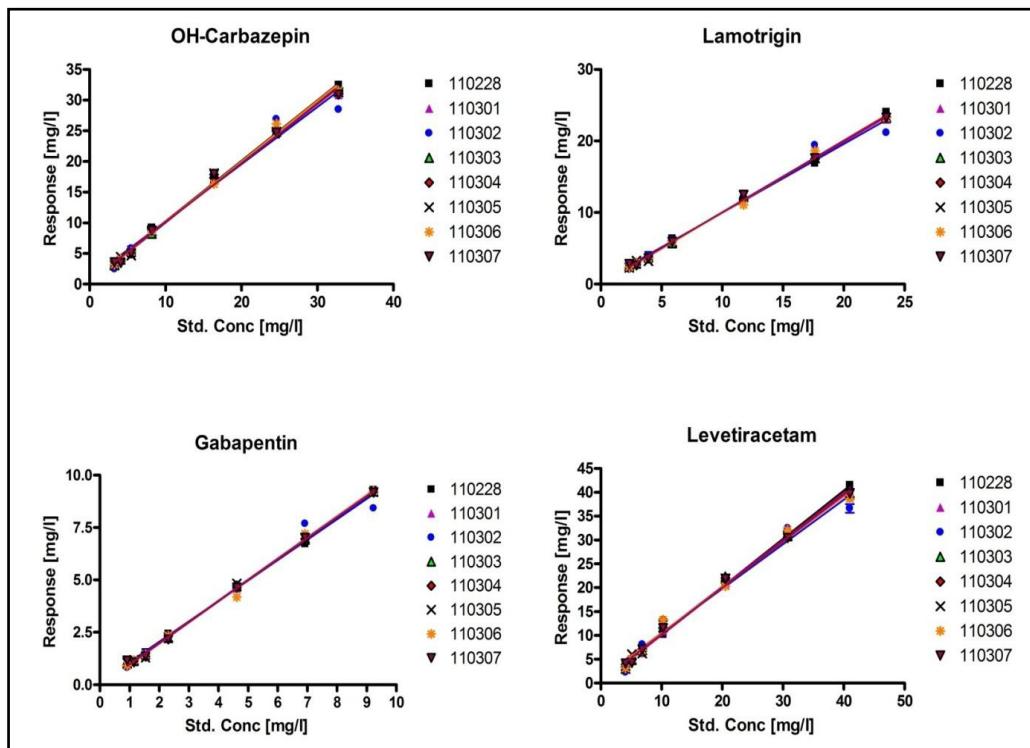


Abbildung 4-19 Überprüfung der Linearität der Bestimmung von 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin. Die Abbildung zeigt die an acht konsekutiven Arbeitstagen (28.02. – 07.03.2011) erstellten Kalibriergeraden.

Die anschließend mit den Daten durchgeführten Grubbs- und Mandel-F-Tests zeigten keine Ausreißer bei der Linearitätsmessung von Coffein (Tab 4-8, 4-9). Lidocain wurde im Kalibrationsbereich zwischen 0.25 bis 10 mg/l ebenfalls dem Grubbs-Test unterzogen und zeigte auch keine Ausreißer und der Mandel-F-Test zeigte die Homogenität der einzelnen Konzentrationswerte (Anhang 3). Der Grubbs-Test zeigte ebenfalls bei keinem der Antiepileptika Ausreißer. Auch der Mandel-F-Test zeigte wiederum die Homogenität im Kalibrationsbereich (Anhang 4 - 7). Somit konnte die Linearität im Kalibrationsbereich für alle Analyten nachgewiesen werden. Auch der Cochran-Test (Signifikanz 95%) auf Varianzhomogenität wurde für alle Analyten erfüllt (Tab. 4-9).

Konz.	1 mg/l	2.5 mg/l	7.5 mg/l	12.5 mg/l	15 mg/l	25 mg/l	30 mg/l
Extremwert	0.953	2.566	7.701	12.318	15.669	25.112	29.269
Prüfwert	1.53	1.36	1.62	1.20	1.45	1.39	1.47
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Tabelle 4-8 Grubbs-Test für die Linearitätsmessung von Coffein

	Coffein	Lidocain	10-OH-Carbazepin	Lamotrigin	Levetiracetam	Gabapentin
Prüfwert	-3.9900	-2.9900	-3.990	-3.990	-3.990	-3.990
Tabellenwert	21.19	34.11	21.19	21.19	21.19	21.19
Homogen?	ja	Ja	ja	ja	ja	ja

Tabelle 4-9 Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99 %) für die Bestimmung von Coffein und Lidocain

	Coffein	Lidocain	10-OH-Carbazepin	Lamotrigin	Levetiracetam	Gabapentin
Prüfwert	0.373663	0.006966	0.242378	0.110808	0.275592	0.005783
Tabellenwert	0.41840	0.44470	0.41840	0.41840	0.41840	0.41840
Homogen?	ja	ja	ja	ja	Ja	ja

Tabelle 4-10 Cochran-Test auf Varianzhomogenität (Signifikanz 95 %)

4.3.3 GENAUIGKEIT

Um die Genauigkeit der Analysenverfahren zu überprüfen, wurden jeweils Kontrollproben im unteren, mittleren und hohen Messbereich über acht Tage gemessen und anschließend die Präzision der Bestimmungen errechnet. Die Präzision (Variationskoeffizient VK%) der Coffein-Bestimmung betrug im unteren Messbereich (Kontrollprobe niedrig) 3.18 %, im Entscheidungsbereich (Kontrollprobe mittel) 2.86 % und im hohen Messbereich (Kontrollprobe hoch) 3.06 % (Abb. 4-20, Anhang 8 - 10). Die Richtigkeit wurde als Abweichung vom Zielwert (Bias in Prozent) ausgedrückt; für den unteren Messbereich betrug der Bias -1.41 %, für den Entscheidungsbereich 1.02 % und für den hohen Messbereich 1.17 %. Entsprechend den Validierungsvorschriften der GTFCh, die Bias-Werte kleiner als ± 15 % fordern, ist damit die Richtigkeit der Coffein-Bestimmung gezeigt.

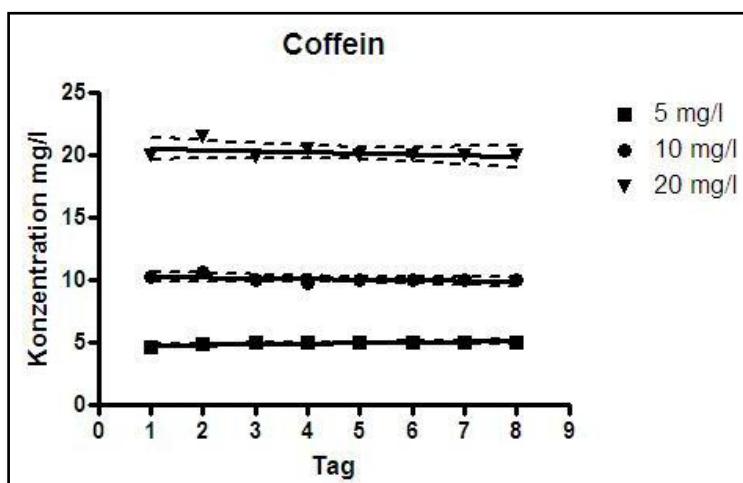


Abbildung 4-20 Wiederholungsmessungen von Coffein-Kontrollproben über acht Tage. Es sind die Mittelwerte und der jeweilige 95 % Konfidenzbereich angegeben

Die Genauigkeit der Bestimmung von Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin wurde analog untersucht. Die Messwerte der Kontrollproben für Lidocain ergaben jeweils eine Präzision zwischen 1.6 und 2.7 % und einen Bias von maximal 1.6 % (Tab. 4-11, Abb. 4-21, Anhang 11 - 13). Die Messwerte der Kontrollproben für die Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin ergaben jeweils Präzessionen zwischen 4.0 und 10.7 % und einem Bias von maximal 12.9 % (Tab. 4-12). Da sich die Bias-Werte für diese vier Antiepileptika alle im Akzeptansintervall

von $\pm 15\%$ befinden, konnte die Richtigkeit somit gezeigt werden (Abb. 4-22, Anhang 14 - 21).

	Unterer Messbereich (Kontrollprobe 0.5 mg/l)	Entscheidungs- bereich (Kontrollprobe 2.5 mg/l)	Hoher Messbereich (Kontrollprobe 5 mg/l)
Präzision	1.90 %	2.69 %	1.59 %
Bias	0.75 %	1.60 %	0.40 %

Tabelle 4-11 Bestimmung von Präzision und Bias der Lidocain-Methode über acht Tage

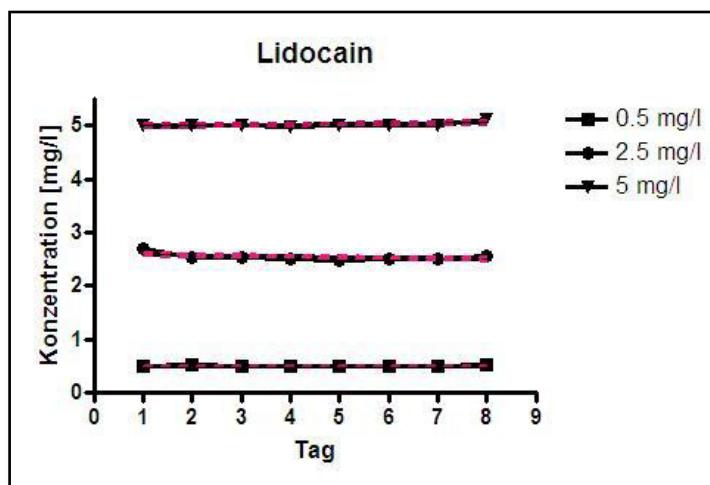


Abbildung 4-21 Wiederholungsmessungen von Lidocain-Kontrollproben über acht Tage. Es sind die Mittelwerte und der jeweilige 95 % Konfidenzbereich angegeben

Präzision	10-OH-Carbazepin	Lamotrigin	Levetiracetam	Gabapentin
Unterer Messbereich	6.96 %	6.52 %	10.72 %	8.90 %
Hoher Messbereich	4.36 %	4.0 %	8.34 %	5.95 %
Bias				
Unterer Messbereich	2.38 %	2.95 %	12.87 %	7.74 %
Hoher Messbereich	9.76 %	7.82 %	5.00 %	8.68 %

Tabelle 4-12 Bestimmung von Präzision und Bias der Antiepileptika-Methoden über acht Tage

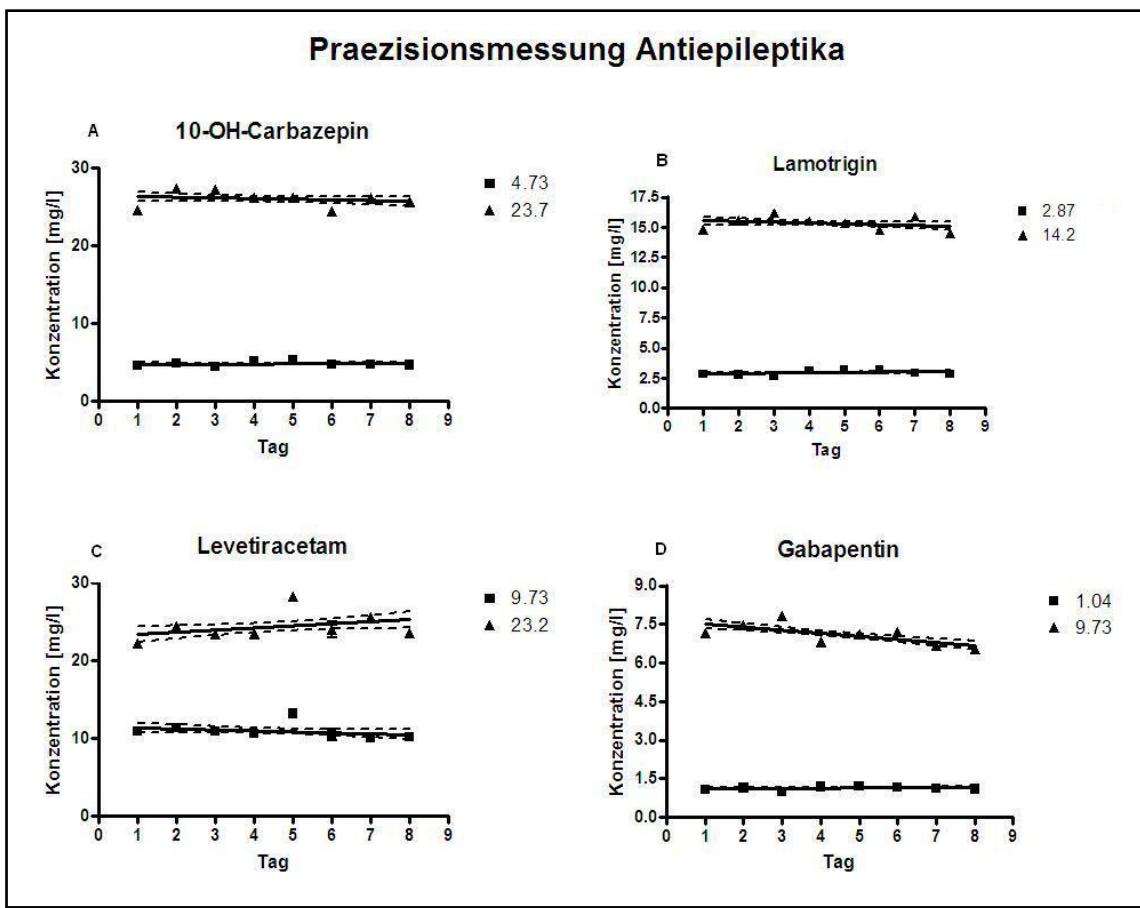


Abbildung 4-22 Wiederholungsmessungen von Antiepileptika-Kontrollproben (10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin) über acht Tage. Es sind die Mittelwerte und der jeweilige 95 % Konfidenzbereich angegeben

4.3.4 STABILITÄT

Um die Prozessstabilität zu prüfen, wurden Kontrollproben über die durchschnittliche Zeit einer Probenserie (rund 300 min) mehrfach wiederholt untersucht und die Abweichungen vom initial gemessenen Wert (hier als absolute Peakflächen angegeben) berechnet. Eine negative Steigung zeigt die Abnahme der Peakflächen über die Zeit, dies bedeutet eine fehlende Stabilität der Analyten über einen normal zu erwartenden Injektionszeitraum. Die absoluten Peakflächen der Kontrollproben von Coffein zeigten keine signifikante Abnahme über den Zeitraum (Tab. 4-13, Abb. 4-22). Allerdings war für jede Konzentration eine positive Steigung der Regressionsgeraden zu sehen (Abb. 4-22, Anhang 22 - 24). Dies weist auf eine Aufkonzentrierung des Analyten hin, die durch die mehrfache Injektion aus einem

Probenvial zu erklären ist. Da die Abweichung weniger als 10 % des Ausgangswerts ist, ist die Prozessstabilität formell gewährleistet.

Zeitpunkt der Injektion	15 min	63 min	126 min	189 min	252 min	315 min
Konzentration 5 mg/l						
Peakfläche absolut	259.48	272.74	272.31	274.63	275.59	280.36
Peakfläche %	100.00	105.11	104.95	105.84	106.21	108.05
Konzentration 10 mg/l						
Peakfläche absolut	535.19	537.95	544.49	543.88	542.14	543.13
Peakfläche %	100.00	100.52	101.74	101.62	101.30	101.48
Konzentration 20 mg/l						
Peakfläche absolut	1014.42	1037.21	1033.49	1034.14	1059.74	1068.80
Peakfläche %	100.00	102.25	101.88	101.94	104.47	105.36

Tabelle 4-13 Absolute Peakflächen von Coffein über den Zeitraum einer Analysenserie von 315 min

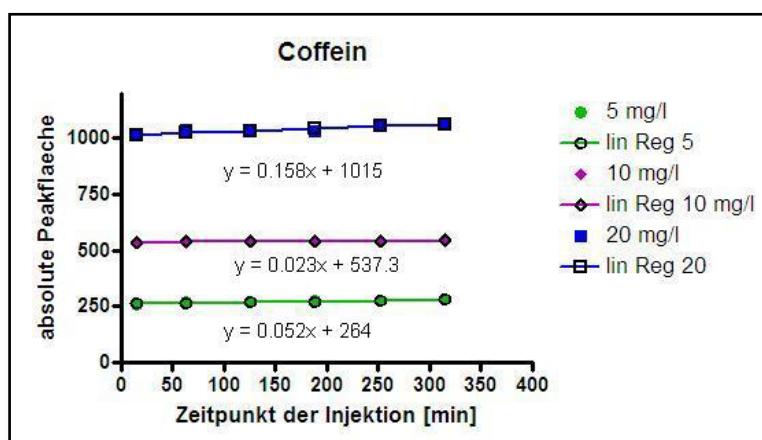


Abbildung 4-23 Nachweis der Prozessstabilität der Bestimmung von Coffein durch lineare Regressionsanalysen

Lidocain und die Antiepileptika zeigten ebenfalls keine signifikante Abnahme der Peakflächen (Abb. 4-23, Abb. 4-24, Anhang 25 - 26). Die Kontrollproben für Lidocain und die Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin zeigten alle positive Steigungen der linearen Regressionsgeraden mit weniger als 10 % Zunahme (Anhang 27 - 37). Somit ist die Prozessstabilität der Analyten jeweils gewährleistet.

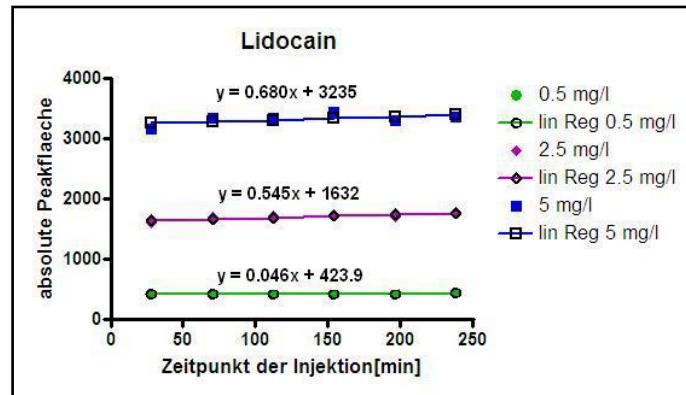


Abbildung 4-24 Nachweis der Prozessstabilität der Bestimmung von Lidocain durch lineare Regressionsanalysen

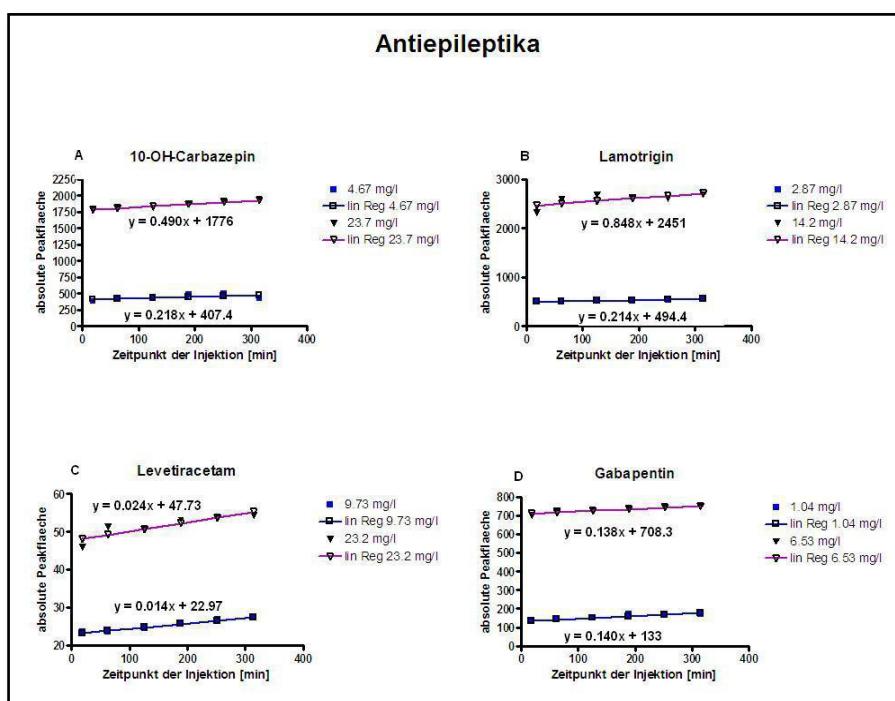


Abbildung 4-25 Nachweis der Prozessstabilität der Bestimmung der Antiepileptika durch lineare Regressionsanalyse

4.3.5 ANALYTISCHE GRENZEN

Die Nachweisgrenze ist als die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe definiert, die die Identifizierungskriterien erfüllt. Zur Bestimmung wurden Proben mit fallender Analytkonzentration im Bereich der zu erwartenden Nachweisgrenze durch Aufstockung einer Leermatrix hergestellt [47]. Da ein Peak mit symmetrischer Peakform erst bei Peakflächen über 15 counts zu erkennen und eindeutig vom Grundrauschen abzugrenzen ist, wurde die Nachweisgrenze gleich der Bestimmungsgrenze gesetzt. Die Nachweisgrenze für Coffein liegt bei rund 0.1 mg/l (siehe Tab. 4-14); bei dieser Konzentration ist ein Peak mit einer Fläche von rund 19 counts nachweisbar, der deutlich über dem Grundrauschen liegt.

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.05	6.723
2	0.05	8.981
3	0.1	18.499
4	0.1	19.836
5	0.5	45.522
6	0.5	48.016
7	1	99.202
8	1	101.666

Tabelle 4-14 Kalibriergerade für die Ermittlung der Nachweisgrenze von Coffein

Die Nachweisgrenze von Lidocain liegt ebenfalls bei 0.1 mg/l (s. Anhang 38), die der meisten Antiepileptika liegt in einem ähnlichen Bereich (10-OH-Carbazepin 0.16 mg/l, Lamotrigin 0.12 mg/l, Gabapentin 0.18 mg/l). Die Nachweisgrenze von Levetiracetam liegt mit 2.05 mg/l deutlich höher (s. Anhang 39 - 42); Levetiracetam ist eine deutlich polarere Substanz als die anderen Antiepileptika, um eine niedrigere Nachweisgrenze zu erzielen, müsste die Probenvorbereitung statt einer einfachen Proteinpräzipitation eine Aufkonzentrierung der Substanz beinhalten. Für das TDM

ist die Nachweisgrenze ausreichend, da sie unter 25 % der durchschnittlichen Serumkonzentration (10 - 37 mg/l) liegt [8, 47].

4.3.6 VERGLEICHSMESSUNGEN

Um die Richtigkeit einer Methode zu überprüfen und systematische Fehler auszuschließen müssen Vergleichsmessungen durchgeführt werden. Für Coffein war dies im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, da diese Substanz nur bei Frühgeborenen angefordert wurde und die Probenmenge insgesamt zu gering war, um weitere Messungen durchzuführen.

Für Vergleichsmessungen bei der Lidocain-Bestimmung wurden 22 authentische Patientenproben (Serum) jeweils parallel für die UPLC-MS/TOF und das Remedi HS System aufgearbeitet. Die so gemessenen Konzentrationen wurden mit Hilfe der Passing-Bablock Regressionsanalyse miteinander verglichen (Abb. 4-26) [84]. Die gestrichelten Linien geben den Toleranzbereich von 95 % an (Abb. 4-26). Alle gemessenen Werte von Lidocain befanden sich innerhalb dieses Toleranzbereiches.

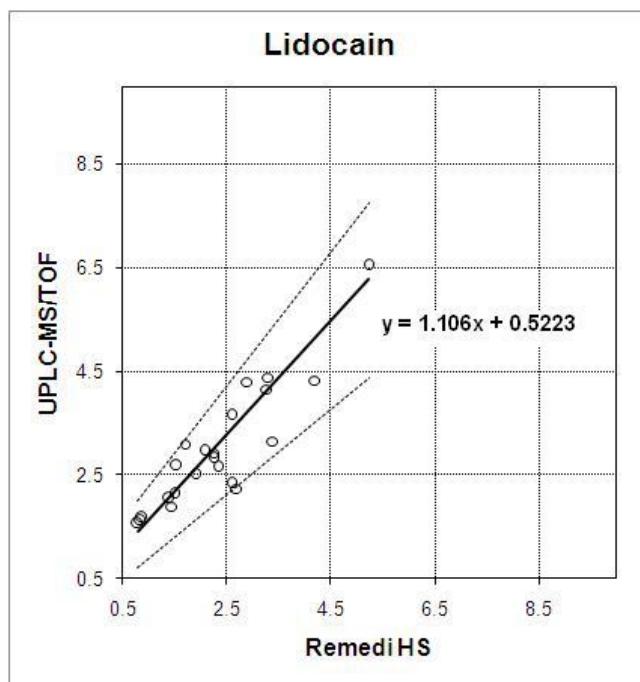


Abbildung 4-26 Methodenvergleich von UPLC-MS/TOF und Remedi HS zur Quantifizierung von Lidocain. Für den Vergleich wurden 22 Patientenproben mit beiden Methoden analysiert und die Messwerte mittels Passing-Bablock-Regressionsanalyse verglichen

Die Vergleichsbestimmungen für die Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin und Levetiracetam wurden durch ein externes Labor (Berliner Betrieb für zentrale Ergebnisse

gesundheitliche Aufgaben) mit authentischen Serumproben durchgeführt (Abb. 4-27). Alle gemessenen Werte befanden sich jeweils innerhalb des Toleranzbereiches. Für Gabapentin konnten keine Vergleichsmessungen durchgeführt werden, da 2010 und 2011 in der Städtischen Klinikum München GmbH keine Anforderungen für diese Substanz vorlagen.

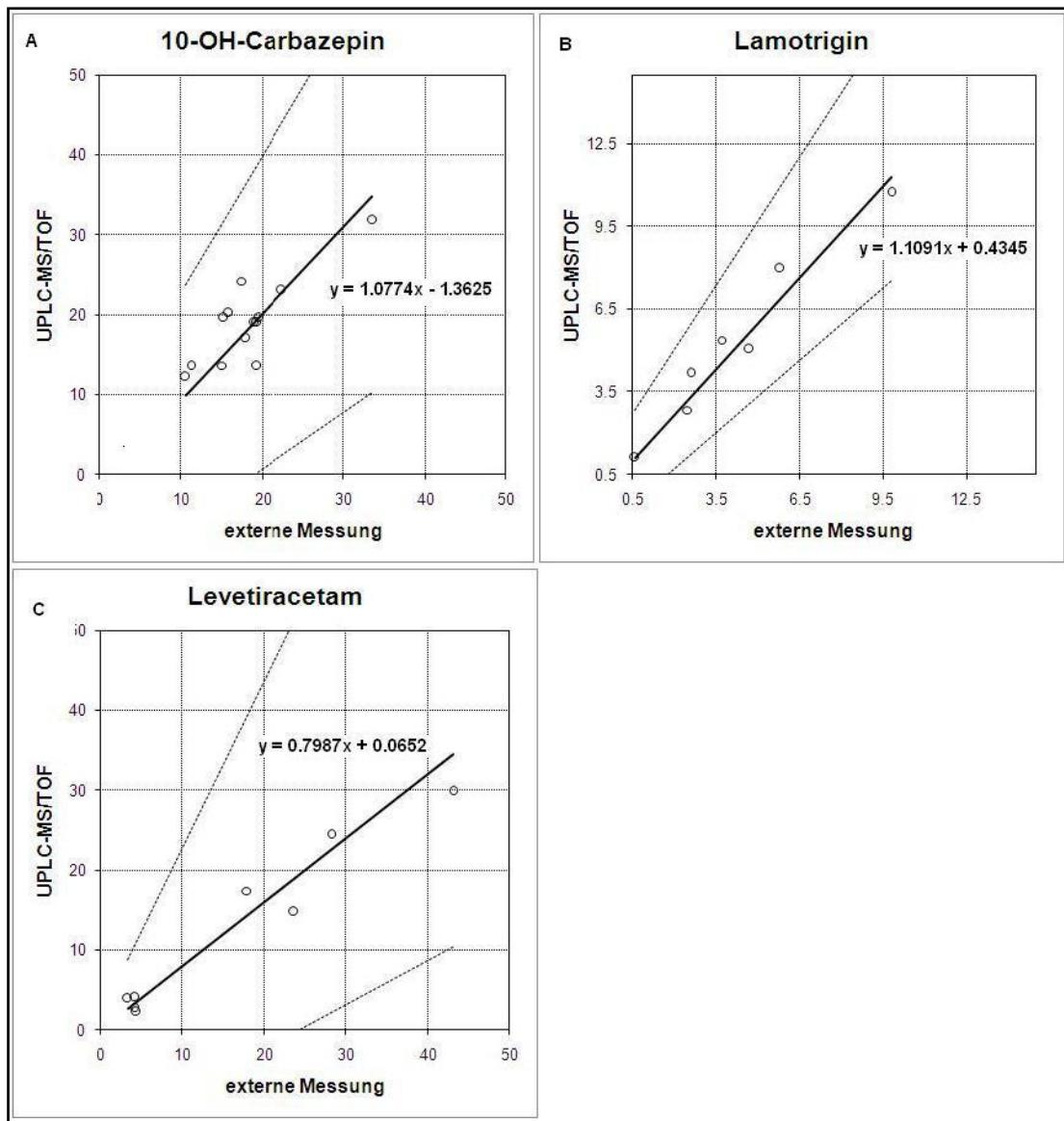


Abbildung 4-27 Methodenvergleich zum Nachweis von A: 10-OH-Carbazepin (n=13), B: Lamotrigin (n=7) und C: Levetiracetam (n=8) mittels UPLC-MS/TOF und externer Messung (akkreditiertes Labor). Es ist jeweils die Passing-Bablok Regressionsanalyse dargestellt.

4.4 NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG VON PREGABALIN

Pregabalin wird bei neuropathischen Schmerzen und generalisierten Angstzuständen verschrieben sowie in der Suchttherapie eingesetzt. Seit einiger Zeit steht die Substanz jedoch auch selbst im Verdacht, Abhängigkeiten hervorzurufen. Deshalb ist eine Quantifizierung im Rahmen des TDM wichtig geworden. Die Quantifizierung von Pregabalin konnte im Rahmen der Arbeit noch nicht vollständig validiert werden; bisher wurde lediglich geprüft, ob diese Substanz mittels UPLC-MS/TOF im klinisch relevanten Konzentrationsbereich messbar ist. Dazu wurden insbesondere verschiedene Probenvorbereitungsmethoden (siehe Kapitel 3.2.1.3) verglichen und die analytischen Grenzen sowie die Linearität der Methode geprüft.

Die Nachweisgrenze (NWG) für die Identifizierung von Pregabalin in Serum- und Urinproben wurden mithilfe einer absteigenden Kalibriergeraden ermittelt. Erst bei Peakflächen über 15 counts ist ein Peak mit symmetrischer Peakform zu erkennen und eine eindeutige Abgrenzung zum Grundrauschen möglich (siehe auch Kapitel 4.3.1). Für die Flüssig-Flüssigextraktion (LLE) zeigten sich schon bei 0.01 mg/l Pregabalin Signale, allerdings war die Flächengröße für eine eindeutige Identifizierung zu klein, auch bei der Konzentration 0.025 mg/l schwankten die gefundenen Flächen noch zu stark, so dass eine eindeutige Identifizierung erst bei 0.05 mg/l Pregabalin im Serum gegeben war. Die Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze beträgt sowohl mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion als auch mit der automatisierten Festphasen-Extraktion (MEPS) 0.05 mg/l (Tab. 4-15).

Da die Probenaufarbeitung mittels automatisierter Festphasen-Extraktion (MEPS) einfach, schnell und im Vergleich zur aufwendigeren Flüssig-Flüssig-Extraktion die gleiche Nachweisgrenze ergibt, wurde die Linearität mit dieser Methode untersucht. Dazu wurde Pregabalin im Bereich zwischen 0.05 mg/l und 10 mg/l mit einer 6fachen Bestimmung je Konzentrationsstufe gemessen (Abb. 4-28, Anhang 43). Der anschließend durchgeführte Grubbs-Test zeigt keine Ausreißer bei der Linearitätsmessung (Tab 4-16). Der Mandel-F-Test zeigte die Homogenität der einzelnen Konzentrationen und der Cochran-Test (Signifikanz 95%) auf Varianzhomogenität wurde für Pregabalin erfüllt (Tab. 4-17). Somit konnte die Linearität im Kalibrationsbereich für Pregabalin nachgewiesen werden.

Std. Conc [mg/l]	LLE Serum Peakfläche [counts]	MEPS Serum Peakfläche [counts]	MEPS Urin Peakfläche [counts]
0.010	6.085	-	-
0.010	4.405	-	-
0.025	15.390	-	-
0.025	11.391	-	-
0.050	21.273	16.441	15.291
0.050	21.830	15.737	15.963
0.100	63.575	41.832	49.221
0.100	61.237	37.172	43.105

Tabelle 4-15 Kalibriergeraden zur Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG) von Pregabalin mit Flüssig-Flüssigextraktion (LLE) und automatisierter Festphasen-Extraktion (MEPS)

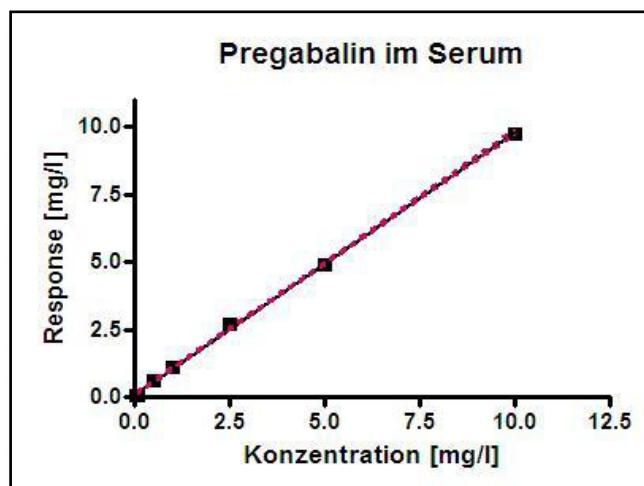


Abbildung 4-28 Überprüfung der Linearität von Pregabalin (N=6) im Serum (MEPS-Aufarbeitung) mit 95% Konfidenzbereich (gestrichelte Linie)

Konz.	0.05 mg/l	0.1 mg/l	0.5 mg/l	1.0 mg/l	2.5 mg/l	5.0 mg/l	10 mg/l
Extremwert	0.035	0.094	0.58	1.049	2.617	4.977	10.066
Prüfwert	1.65	1.25	1.27	1.26	1.44	1.26	1.43
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Tabelle 4-16 Grubbs-Test für die Linearitätsmessung von Pregabalin

	Mandel- F-Test	Cochran- Test
Prüfwert	-3.9900	0.038141
Tabellenwert	21.19	0.4184
Homogen?	ja	ja

Tabelle 4-17 Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99 %) und Cochran-Test auf Varianzhomogenität (Signifikanz 95 %) für die Bestimmung von Pregabalin im Serum

5 DISKUSSION

5.1 QUALITATIVER NACHWEIS TOXIKOLOGISCH RELEVANTER SUBSTANZEN - SYSTEMATISCHE TOXIKOLOGISCHE ANALYSE (STA)

Der besondere Vorteil der hochauflösenden Time-of-Flight Massenspektrometrie (TOF/MS) für die systematische toxikologische Analyse (STA) liegt in der Möglichkeit, die Summenformel einer unbekannten Substanz aus der akkuraten Ionenmasse und dem Isotopenmuster zu ermitteln [11]. Um die Verbindung allerdings eindeutig identifizieren zu können, muss die Anzahl der möglichen Isomere nach Kriterien der toxikologischen Relevanz einschränkt werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Datenbanken, eine Spektrendatenbank sowie eine 'Targeted Datenbank', erstellt und jeweils geeignete Auswahlkriterien für die Identifizierung von Substanzen festgelegt.

5.1.1 AUFBAU EINER SPEKTRENDATENBANK FÜR DIE UPLC-MS/TOF

Die Spektrendatenbank enthält pro Substanz jeweils 2 Einträge, das unfragmentierte Referenzspektrum sowie das Fragmentspektrum. Für die Substanzidentifizierung in einer Patientenprobe gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, die Spektren der Datenbank mit den Spektren des Patientenlaufes abzulegen. Eine Möglichkeit ist die 'umgekehrte Suche' (reversed search). Hierbei müssen für eine positive Substanzidentifizierung alle Peaks im Referenzspektrum auch im Spektrum der Probe gefunden werden. Mit Hilfe dieser Strategie können Substanzen trotz zusätzlicher Peaks, die von weiteren Substanzen oder Matrixeffekten stammen effektiv identifiziert werden. Allerdings ist die 'umgekehrte Suche' nur für kleinere Datenbanken mit wenigen Einträgen (bis etwa 400 Substanzen) nutzbar, da sie sehr rechenintensiv ist [85 – 87].

Da die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Datenbank über 400 Einträge zu Medikamentenwirkstoffen, illegalen Drogen, Designerdrogen und weiteren toxikolo-

gisch relevanten Substanzen enthält, wurde für den Abgleich von Patientenspektren mit der Datenbank die sogenannte 'forward basepeak search' genutzt. Bei dieser Methode werden die Peaks der Patientenprobe mit der Datenbank verglichen; eine Identifizierung erfolgt, wenn möglichst viele Peaks übereinstimmen, ein Prozentsatz gibt an, wie gut die Übereinstimmung der Spektren ist. Aufgrund des großen Informationsgehaltes eines TOF-Datenfiles berücksichtigt diese Methode nur die Peaks mit relativ großer Intensität (Basismassenpeaks). Schon Lee *et al.* und Polettini *et al.* [75, 88] zeigten, dass sich diese Strategie vor allem für größere Datenbanken empfiehlt.

Die Verwendung einer Spektrendatenbank zur Identifizierung der in der Patientenprobe enthaltenen Substanzen hat jedoch Nachteile, die im Wesentlichen durch die Software bedingt sind. So ist die Software beim verwendeten Analysengerät auf nominellen Massen aufgebaut; die Fähigkeit der MS/TOF, exakte Massen zu detektieren, wird nicht genutzt. Außerdem ist die Neuaufnahme von Spektren in die Datenbank umständlich und zeitintensiv, da für jede Substanz zwei Einträge hinterlegt werden müssen, das Spektrum des Mutterions und das entsprechende Spektrum nach Fragmentierung. Ein weiterer Nachteil ergibt sich durch die sehr lange dauernde Datenprozessierung pro Patientenprobe. Je mehr Substanzen in der Spektrendatenbank enthalten sind, umso länger dauert die Prozessierung. Bei aktuell über 400 Reinsubstanzen und somit 800 Einzelspektren kann die Auswertung einer einzelnen Patientenprobe bis zu 40 min dauern. Da die ständige Erweiterung der Datenbank und Erfassung neuer Substanzen eine wichtige Aufgabe der toxikologischen Analytik darstellt, ist diese Methode für das Screening von Patientenproben im Krankenhauslabor insgesamt zu zeitaufwendig. Deshalb wurde als Suchstrategie auf ein 'Targeted Screening' mit der UPLC-MS/TOF zurückgegriffen (s. u.). Die so gewonnenen Ergebnisse wurden dann mit den Daten der selbst erstellten Spektrenbibliothek sowie den Ergebnissen einer parallel durchgeföhrten GC-MS Analytik verglichen.

5.1.2 ENTWICKLUNG EINER 'TARGETED DATENBANK' FÜR DIE UPLC-MS/TOF

Erstmals entwickelten Gergov *et al.* 2001 eine Strategie, um die MS/TOF Technik für ein 'Targeted Screening' zu nutzen [89]. Für die Identifizierung von Drogen und

Medikamenten im Urin verwendete er die exakte Molekülmasse und, falls Reinsubstanz zur Verfügung stand, die zugehörige Retentionszeit. Dieser Ansatz wurde stetig weiterentwickelt. Pelander *et al.* [86] berücksichtigten zusätzlich zur exakten Masse und der Retentionszeit auch das Isotopenmuster der Substanzen. Dadurch konnte er bei einer durch die Molekülmasse resultierenden Summenformel zusätzlich zwischen strukturell verschiedenen, theoretisch denkbaren Substanzen (Isomeren) differenzieren und somit falsch-positive Ergebnisse minimieren. Allerdings ist dieses Verfahren immer noch nicht eindeutig. Es wurde deshalb hauptsächlich bei Fragestellungen angewendet, bei denen als Ergebnis nur definitive Substanzen in Betracht kamen. Typische Beispiele hierfür sind die Haaranalytik und die Dopinganalyse, bei denen nur auf eine sehr beschränkte Anzahl möglicher Analyte untersucht wird [90].

Bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode wurde für die Substanzidentifizierung die exakte Masse, die Retentionszeit und das Isotopenmuster sowie zusätzlich ein Fragmentspektrum (CID-Spektrum) genutzt (s. Anhang 44). Durch die Hinzunahme von spezifischen Fragmentmassen konnten Rückschlüsse auf die Struktur der nachgewiesenen Substanzen getroffen werden, so dass sicherer zwischen Strukturalternativen für die gefundene Substanz unterschieden werden konnte. Im Gegensatz zu einem Vorgehen, das eine Spektrendatenbank zum Vergleich mit den gesamten Spektren von Muttersubstanz und Fragmenten nutzt, war die Datenprozessierung beim 'Targeted-Screening' deutlich schneller, pro Patienten-probe werden unabhängig von der Zahl der Einträge in der Datenbank nur maximal 5 min benötigte.

Die Ergebnisse dieses 'Targeted-Screening' mit der UPLC-MS/TOF zeigten über 86 % Übereinstimmung zu der parallel durchgeführten Auswertung mit der Spektrendatenbank. Es kam jedoch immer wieder vor, dass einzelne Substanzen sehr hoch konzentriert in den Patientenproben vorlagen. Dadurch kam es zu Ionensuppression und Detektorüberladung, was zu Massenungenauigkeiten bei der Detektion führen kann und damit ggf. zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen im 'Targeted-Screening'. Vorab weniger Probenmaterial einzusetzen erschien jedoch nicht generell ratsam, da dann niedrig konzentrierte Substanzen nicht erfasst wurden. Für den Nachweis von Substanzen in überladenen Peaks sollte die Probe deshalb verdünnt und erneut gemessen werden. Bei einer

Detektorüberladung kann zusätzlich der Massenfehler so groß werden, dass Moleküle mit deutlich abweichender Masse, aber einer Retentionszeit innerhalb des gewählten Fensters als positiv angezeigt werden, da ihre scheinbare Masse durch den Massenfehler in den Toleranzbereich der Detektion rutscht. Ein erster Hinweis auf eine solche Überladung ist die Peakform mit Abflachung im Maximum oder ggf. Ausbildung eines Doppelpeaks. Glücklicherweise greift das 'Targeted-Screening' in solchen Fällen sehr häufig auf zwei oder mehr Substanzen gleichzeitig zurück; dies ist dann in den extrahierten Spektren erkennbar, da auch dort mehrere mögliche Substanzen angezeigt werden.

Eine Übereinstimmung von 86 %, d. h. 13.5 % falsch-positive Ergebnisse sind für die klinische Toxikologie jedoch nicht akzeptabel. Um diesen Anteil weiter zu reduzieren erscheint es nötig, dass das Datenbankprogramm auf mehrere Fragmentmassen, die zu einem Mutterion gehören, zugreifen kann. Da dies im Rahmen dieser Arbeit softwaremäßig nicht realisierbar war, wurden hilfsweise weitere spezifische exakte Fragmentmassen gestaffelt nach ihrer Intensität als Klartext hinterlegt. Die Software des 'Targeted-Screenings' kann zwar auf diese zusätzlichen Angaben nicht zugreifen, aber deren Anzeige erleichtert die manuelle Auswertung und die Eliminierung falsch-positiver Ergebnisse deutlich. Darüber hinaus kann bei der Auswertung beurteilt werden, ob alle spezifischen Fragmentmassen im richtigen Verhältnis ihrer Intensität vorhanden sind. Mit Hilfe einer überarbeiteten Software, die eine Verknüpfung zwischen den Ergebnissen des 'Targeted-Screenings' und der Spektrendatenbank zulassen würde, könnte die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse sicher noch weiter reduziert werden. Die Datenprozessierung wäre nicht aufwändiger, da nur positive Ergebnisse des 'Targeted-Screenings' mit der Spektrendatenbank abgeglichen werden müssten. Eine solche Verknüpfung der beiden Datenbanken war seitens des Gerätsherstellers trotz mehrfacher Diskussion jedoch leider nicht möglich.

Eine weitere Verbesserung der 'Targeted-Datenbank' wäre die Möglichkeit, die identifizierten Substanzen nicht nur alphabetisch nach Namen, sondern auch nach der Retentionszeit auflisten zu können. Dies hätte den Vorteil, dass mehrfache Substanzidentifizierungen pro Peak einfacher und schneller zu erkennen wären, so dass Fehlzuordnungen vermieden werden könnten.

5.1.3 TOXIKOLOGISCHES SCREENING MITTELS UPLC-MS/TOF IM VERGLEICH ZUR REFERENZMETHODE GC-MS

Um den analytischen Nutzen der UPLC-MS/TOF-Technik für die STA zu überprüfen, wurden die Ergebnisse mit denen der routinemäßig eingesetzten GC-MS-Methode verglichen. Für die UPLC-MS/TOF wurden CID-Spektren neben der Retentionszeit und der exakten Molekülmasse als weiteres Identifizierungskriterium genutzt. Kaufmann *et al.* zeigte, dass das Monitoring von klassenspezifischen In-Source-CID-Fragmentmassen auch den Nachweis von Analyten in einem ungerichteten Screening ermöglicht [20]. Im Vergleich zur LC-MS/MS, die spezifische Fragmentionen eines isolierten Mutterions erzeugen [91 – 97], hat die UPLC-MS/TOF-Technik jedoch den Nachteil, dass durch die 'In-Source-Fragmentierung' alle vorhandenen Ionen, die gleichzeitig aus der UPLC in die Ionenquelle gelangen, fragmentiert werden, so dass in der Regel Mischspektren erhalten werden. Nur wenn der zu identifizierende Analyt die Hauptkomponente im Peak ist, kann mit einem eindeutigen Ergebnis gerechnet werden. Dieses Problem erklärt, warum die UPLC-MS/TOF für das 'Targeted Screening' nicht die erwarteten Vorteile gegenüber dem herkömmlichen Screening mithilfe der GC-MS-Analytik zeigte. Dazu kommt, dass die vorhandene GC-MS-Analytik bereits über Jahre z. B. durch Optimierung der Extraktion und Derivatisierung (TMS-Derivate) weiterentwickelt worden ist. Kürzlich publizierte Studien unter Verwendung der wesentlich komplexeren und aufwändigeren MS/Q-TOF Technik zeigen jedoch, dass ein Screening für die systematische toxikologische Analyse durchaus möglich ist [98]. Der Einsatz von Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometern (LC-MS-QTOF) hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur In-Source-Fragmentierung die CID-Spektren nicht durch Matrix und koeluiierende Substanzen gestört sind [96]. Weitere Ansätze liegen in der Nutzung spezieller Software für die Vorhersage einer Fragmentierung, um zwischen Strukturisomeren einer Datenbank unter Verwendung von LC-MS-QTOF zu differenzieren [97]. Broecker *et al.* entwickelte für die LC-MS-QTOF einen datenabhängigen Akquisitionsmodus (Auto-MS/MS-Modus). Dieser Modus kombiniert den Vorteil einer TOF-MS Messung für eine umfassende Datenerfassung und die Messung akkurate CID-Spektren aller wesentlichen Komponenten der Probe durch Isolierung des entsprechenden Vorläuferions durch den Quadrupol (MS-QTOF) [98].

Die eigenen Daten zeigen trotz der Nachteile gegenüber der Verwendung einer LC-MS-QTOF, dass die UPLC-MS/TOF das etablierte GC-MS-Screening in Sonderfällen ergänzen kann, was insbesondere bei der gezielten Suchanalytik der Fall ist.

5.1.4 GEZIELTE SUCHANLYTIK ZUM NACHWEIS 'NEUER' DROGEN

Die 'gezielte Suchanalytik' oder das 'non-targeted Screening' auf bestimmte Substanzen wird verwendet, wenn sich toxikologische Fragestellungen ergeben, bei denen eine Substanz nachzuweisen ist, für die bis dahin keine etablierte Methode und keine Reinsubstanz vorhanden ist. Der Begriff 'non-targeted' Suchanalytik sollte streng genommen nur für folgende Vorgehensweise verwendet werden: Im Chromatogramm (total ion chromatogram) werden alle vorhandenen Peaks oberhalb eines Schwellenwertes isoliert, die exakte Molekülmasse extrahiert und daraus die Summenformel abgeleitet. Die so erhaltenen Ergebnisse erlauben in den meisten Fällen noch keine Substanzidentifizierung, da Strukturanaloga nicht unterscheidbar sind. In der Literatur wird der Begriff 'non-targeted' Analytik allerdings auch für die anschließende Verwendung von Datenbanken als Basis für die Substanzidentifizierung ausgedehnt. Dies ist insofern verwirrend, da hierbei prinzipiell eine Einschränkung der möglichen Ergebnisse durch die Anzahl der Datenbankeinträge gegeben ist. In dieser Arbeit wird der Begriff 'non-targeted Screening' deshalb nur für die gezielte Suchanalytik auf bestimmte, in der Probe möglicherweise vorhandene Substanzen verwendet. Basis des verwendeten Verfahrens ist die monoisotopische exakte Molekülmasse, die durch die Interpretation des Isotopenmusters und bestimmter theoretischer Fragmentmassen ergänzt wird.

Die besondere Stärke der UPLC-MS/TOF Analytik beruht darauf, dass alle vorhandenen Ionen im Flugrohr registriert und die Rohdaten gespeichert werden und so für spätere Auswertungen verfügbar bleiben. Toennes *et al.* [99] zeigte schon 2010 die Vorteile der TOF-Analytik, indem er die Bestimmung der exakten Molekülmasse nutzte, um in forensischen Proben bei Verdacht auf Substanzen, für die keine etablierte Methode und u. U. auch keine Vergleichssubstanz verfügbar war, eine hinweisende Untersuchung durchzuführen. So kann das Chromatogramm einer zurückliegenden Analyse mit Hilfe der bekannten exakten Molekülmasse auch

retrospektiv extrahiert werden. Bei der hier durchgeführten gezielten Suchanalytik wurde ebenfalls mithilfe der bekannten exakten monoisotopischen Molekülmasse auf einzelne Substanzen im ersten Schritt untersucht. War dabei ein eindeutiger Massenpeak zu erkennen, konnte dies als erster Hinweis auf diese Substanz gewertet werden. Um den Verdacht bestätigen zu können, muss die Molekülstruktur bekannt sein; die Software „Chemspider“ umfasst die Strukturformeln sehr vieler Medikamente, Drogen und deren Metaboliten [78]. Aus der Molekülstruktur können theoretische Fragmente abgeleitet werden, die mit den Massen im Fragmentenspektrum abgeglichen werden. Da dieses Vorgehen nicht auf einer bestehenden Spektrenbibliothek basiert, können z. B. auch Designerdrogen nachgewiesen werden, die aus immer wieder neuen, strukturell veränderten Psychostimulanzien bestehen. Dieses Vorgehen ist bisher in der Literatur kaum beschrieben, erhöht allerdings die analytische Sicherheit erheblich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels UPLC-MS/TOF in 5 verschiedenen Patientenproben sogenannte „Badesalze“ nachgewiesen. Bei diesen Substanzen handelt es sich hauptsächlich um Cathinonderivate wie z. B. MDPV. Zum Zeitpunkt der Analyse standen die Reinsubstanzen noch nicht zur Verfügung, so dass ein Nachweis mittels GC-MS-Screening nicht möglich war.

5.1.5 BEDEUTUNG DER UPLC-MS/TOF FÜR DIE SYSTEMATISCHE TOXIKOLOGISCHE ANALYTIK (STA)

In der systematischen toxikologischen Analyse (STA) eingesetzte Nachweismethoden müssen die Identifizierung möglichst vieler relevanter Medikamente, Gifte und ihrer Metaboliten gewährleisten. Durch die Kombination der hohen Selektivität der Massenspektrometrie und der Möglichkeit, mittels einfacher und schneller Probenvorbereitung hydrophile, thermolabile und nicht-flüchtige Substanzen zu analysieren, hat die LC-MS immer mehr Bedeutung in der STA erlangt. Durch die Verwendung einer UPLC konnten die Analysenzeiten im Vergleich zu normalen HPLC verkürzt werden. Der Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie, welche die Time-of-Flight-Technologie (TOF) nutzt, ermöglicht jetzt die Messung exakter monoisotopischer Massen. Zusätzlich werden alle erzeugten Ionen, die im Flugrohr registriert werden gespeichert, so dass auch eine nachträgliche Analyse von Substanzen, die noch nicht einer Datenbank enthalten sind, möglich ist.

Die Erwartungen für die systematische toxikologische Analyse wurden allerdings von der UPLC-MS/TOF nicht ganz erfüllt. Substanzen, die aufgrund ihrer Polarität, Thermolabilität und Flüchtigkeit nicht mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie gemessen werden können, werden auch mit diesem System nicht vollständig erfasst. Weitere Probleme bereiten ko-eluiierende Substanzen, die zu Mischspektren führen. Im Einzelfall können sowohl Analyte mit geringer Intensität als auch zu hoch konzentriert vorliegende Analyte aufgrund der resultierenden Massenungenauigkeiten nicht erfasst werden. Diese Probleme könnten teilweise durch Softwareverbesserungen, insbesondere die Verknüpfung verschiedener Datenbanken, kompensiert werden.

Alternative Systeme nutzen die Technik der Tandem-MS, um eindeutigere Spektren, also eine sicherere Zuordnung von Mutterion und Fragmentionen, zu erhalten. Dazu zählen LC-MS/MS [100 – 103], LC-MS-QTrap [104, 105] und aktuell auch LC-MS-QTOF [98]. Vor allem die LC-MS-QTOF hat in den letzten Jahren immer größere Bedeutung im Bereich der klinischen und forensischen Toxikologie erlangt [91, 98]. Ein großes Problem dieser Techniken ist jedoch, dass Referenzbibliotheken speziell für das jeweilige Instrument erstellt werden müssen und nicht universell genutzt werden können [91]. Müller *et al.* entwickelten schon 2005 ein Screening-Verfahren für 301 Substanzen mit einem LC-MS-QTrap-System [104]. Dresen *et al.* entwickelten ebenfalls für das QTrap eine Library mit 700 Substanzen [105]. Diese Bibliotheken sind jedoch nur bedingt auf Systeme anderer Hersteller oder andere Gerätetypen übertragbar. Um eine möglichst universelle Datenbank zu entwickeln, haben Hopley *et al.* erstmals die toxikologischen Screeningergebnisse von elf verschiedenen Massenspektrometern verglichen; allerdings wurde nur eine geringe Zahl von Substanzen ($n = 48$) analysiert [106]. Eine der ersten kommerziell erhältlichen, universell einsetzbaren Datenbanken wurde von Broecker *et al.* für die LC-MS-QTOF entwickelt. Durch einen neuartigen „Daten-dependend-Acquisition“-Modus werden neben einem akkurate Full-Scan-MS-Spektrum auch akkurate Full-Scan-CID-Spektren aufgenommen, um die Substanz anhand der „Broecker, Herre & Pragst Personal Compound Database and Library“ zu identifizieren [107]. Mit dieser Methodik werden, wie bei der UPLC-MS/TOF in dieser Arbeit, alle ionisierten Substanzen in der Probe ohne vorherige Beschränkung erfasst, können aber mit Hilfe der Datenbank eindeutiger identifiziert werden. Im Moment ist die LC-MS-QTOF

das aktuellste und hochwertigste massenspektrometrische Verfahren, das für die systematische toxikologische Analyse auf dem Markt ist.

Im Bereich der gezielten Suchanalytik liefert die UPLC-MS/TOF sehr gute Ergebnisse. Mit der gezielten Suchanalytik können auch Metaboliten nachgewiesen werden, die bisher nur in der Literatur beschrieben wurden [108] und für die keine Referenzsubstanzen erhältlich sind. Dies gilt ebenfalls für Hormone, veterinärmedizinisch eingesetzte Wirkstoffe oder neue Designerdrogen [86, 109, 110]. Mithilfe der Muttersubstanz können aufgrund der bekannten bzw. wahrscheinlichsten Metabolisierungsreaktionen der Phase I wie Hydroxylierungen, N-Demethylierungen, Oxidationen usw. Vorhersagen für die Existenz bestimmter Metaboliten getroffen werden [111]. Anhand der Summenformel dieser Metabolite kann die Probe auf entsprechende extrahierte Massen untersucht werden und ihr Vorliegen bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

5.2 VERGLEICH DER PROBENAUFARBEITUNG MITTELS FLÜSSIG-FLÜSSIG- UND FESTPHASEN-EXTRAKTION

In der toxikologischen Analytik ist die Probenvorbereitung weiterhin der aufwändigste Arbeitsschritt. Durch eine Automatisierung könnten der Zeitaufwand, die Menge des Probenmaterials und ggf. die Kosten reduziert sowie die Extraktion hinsichtlich der Reproduzierbarkeit verbessert werden [112 – 117]. Seit 2011 steht eine automatisierte Festphasen-Extraktion (MEPS) im Department für Klinische Chemie des Städtischen Klinikums München GmbH zur Verfügung. Diese MEPS bietet gegenüber der bisher angewandten Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) den Vorteil, dass durch die Automatisierung die Fehlerquellen minimiert werden und der personelle sowie zeitliche Aufwand deutlich reduziert ist. Für den Vergleich beider Extraktionsmethoden wurden 30 Proben sowohl mittels MEPS und LLE aufgearbeitet und anschließend mittels UPLC-MS/TOF analysiert. Die Screeningergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung von 95%. Eine MEPS-SPE Säule kann für bis zu 100 Proben verwendet werden, diese Probenaufarbeitung ist damit deutlich kostengünstiger als der Einsatz eines ToxiTubes pro Patientenprobe für die LLE. Der Zeitaufwand pro Probe ist zwar mit je 20 min ähnlich, doch verringert sich der Personalaufwand durch die Automatisierung deutlich. Das verringerte Probenvolumen mit MEPS könnte

insbesondere für das toxikologische Screening bei Proben von Säuglingen und Kleinkindern von besonderem Interesse sein. Der Vergleich von MEPS und LLE zeigt deutliche Vorteile der MEPS; bevor dieses Verfahren jedoch in der klinischen Routine eingesetzt werden kann, muss noch eine wesentlich größere Anzahl authentischer Proben untersucht werden.

5.3 QUANTITATIVER NACHWEIS TOXIKOLOGISCH RELEVANTER SUBSTANZEN – THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING (TDM)

5.3.1 QUANTIFIZIERUNG VON COFFEIN, LIDOCAIN UND VON ANTIEPILEPTIKA

Bei vielen LC-MS-Verfahren, vor allem der LC-MS/MS, ist eine einfache Proteinpräzipitation ausreichend und die am häufigsten verwendete Probenvorbereitung [123 – 125]. Da beim UPLC-MS/TOF-Verfahren die vorgeschaltete hochauflösende UPLC besonders reine Peaks liefert, wurde diese Art der Probenvorbereitung auch im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt. Insbesondere für die neu entwickelten Quantifizierungsmethoden im Serum hat sich dieses Verfahren im Rahmen der Validierung (Nachweisgrenzen, Präzision, Linearität, s. u.) bewährt.

Die UPLC-MS/TOF-Technik bestimmt die exakten Molekülmassen von Substanzen auf bis zu vier Kommastellen genau. Dies ermöglicht eine hohe Selektivität der Methoden. Andere endogene oder exogene Substanzen, die ebenfalls in der Patientenprobe enthalten sein können und gegebenenfalls mit dem Zielanalyten koinzidieren, beeinflussen die Detektion zumindest theoretisch nicht. Dies konnte bei der Bestimmung von Coffein, Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin bestätigt werden. Die Bestimmung der Linearität erfolgte mittels des Mandel-F-Tests und des Grubbs-Tests auf Ausreißer. Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis von Coffein, Lidocain und der Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin innerhalb des therapeutischen Bereiches mittels UPLC-ESI/MS/TOF direkt proportional zu der Konzentration der Analyten in der Probe ist. Ausreißer traten bei keiner der Bestimmungen auf, somit wurde die Linearität der Methoden bewiesen. Durch die Verwendung von Kontrollproben konnte der systematische Fehler (Bias)

der Methoden und somit die Genauigkeit bestimmt werden. Der Bias der Coffein- und Lidocainbestimmungen lag mit durchschnittlich 2 % sehr niedrig. Die Bias der Antiepileptika lagen ebenfalls im zulässigen Akzeptanzintervall von \pm 15 % gemäß der Richlinien der GTFCh [77]. Die Stabilität der Substanzen in aufgearbeiteten Proben (Prozessstabilität) wurde einschließlich längerer Probenserien mit Hilfe der linearen Regression ausgewertet. Keine der Methoden zeigte eine negative Steigung der Regressionsgeraden oder eine Abnahme der absoluten Peakflächen, was auf eine Instabilität deuten würde. Die Prozessstabilität war somit formell gegeben.

Die Nachweisgrenzen der Analyten lagen alle mindestens 25 % unterhalb des jeweiligen therapeutischen Bereiches. Durch die Proteinpräzipitation werden die Analyten in den Proben verdünnt; die angegebene Nachweisgrenze der Substanzen ist somit nicht die niedrigste Konzentration, die mittels der UPLC-MS/TOF gemessen werden könnte. Mittels einer anderen Probenvorbereitung, die eine Aufkonzentrierung der Substanzen beinhaltet (z. B. Extraktion) wären deutlich niedrigere Nachweisgrenzen möglich. Die ermittelten Nachweisgrenzen waren für die Aufgabenstellung jedoch ausreichend, so dass darauf verzichtet wurde, niedrigere analytische Grenzen durch eine Anpassung der Probenvorbereitung zu erzielen.

5.3.2 NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG VON PREGABALIN

Pregabalin wird zur Behandlung neuropathischer Schmerzen eingesetzt, findet aber auch im Drogenentzug zur Linderung von Entzugserscheinungen nach Benzodiazepin-Missbrauch Verwendung [119 – 122]. Seit 2 Jahren steht die Substanz jedoch im Verdacht, selbst potentielle Abhängigkeiten hervorzurufen [122 - 124]. Der qualitative Nachweis von Pregabalin im Urin hat z. B. Bedeutung, wenn Patienten in der Drogenentzugsbehandlung angeben, diese Substanz schon länger einzunehmen und den dringenden Wunsch haben, weiterhin mit dieser u. a. recht teuren Substanz weiter versorgt zu werden. Mit dem herkömmlichen Routinescreening mittels GC-MS als auch mittels UPLC-MS/TOF konnte Pregabalin bisher nicht erfasst werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit speziellere Extraktionsmethoden getestet. Nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) konnte die Substanz in Urin zwar nachgewiesen werden, jedoch erwies sich diese Methode als sehr zeit- und arbeitsintensiv. Die automatisierte Festphasenextraktion mit MEPS

benötigt im Vergleich zur GC-MS-Analytik weniger Probenmaterial (nur 300 µl anstatt 1 ml Urin) und ist bei vergleichbarer Sensitivität schneller und einfacher als die LLE. Für die ersten Quantifizierungsversuche im Serum wurde Gabapentin als interner Standard verwendet. In Zukunft soll hierfür jedoch ¹³C-markiertes Pregabalin zur Verfügung stehen, um mögliche Interferenzen zu vermeiden, falls z. B. Gabapentin auch in der Patientenprobe vorliegen sollte.

5.3.3 BEDEUTUNG DER UPLC-MS/TOF FÜR DAS THERAPEUTISCHE DRUG MONITORING (TDM)

Steigende Kosten sind zu einem zentralen Problem nicht nur in unserem Gesundheitssystem geworden. Bei der Einführung neuer Technologien und Verfahren in der Medizin ist es daher erforderlich, die effektiven Kosten neuer und alter Techniken im Verhältnis zu ihrem Nutzen abzuwegen. Gleichzeitig muss bei der Arzneimittel-therapie alles unternommen werden, um unter Einbeziehung aller technischen Möglichkeiten maximale Effektivität bei möglichst geringen Kosten zu erreichen. Dies gilt insbesondere für das Therapeutische Drug Monitoring im Grenzgebiet zwischen Technologie und Arzneimitteltherapie [125]. Neue Verfahren wie die LC-MS/MS werden für Dopinganalysen in Haaren [126] und den Drogennachweis in „oral fluid“ [127] verwendet oder für die Quantifizierung von Sedativa, Analgetika, Nicotin und Metaboliten bei Neugeborenen und Kindern eingesetzt, wo nur geringe Proben-volumina zur Verfügung stehen [128 – 131]. Für manche Substanzen sind dagegen klinische Verfahren wie die single-stage MS insbesondere für die Quantifizierung besser geeignet, z. B. bei der Analyse von Carnitinen und Acylcarnitinen können mit der HPLC-MS im Vergleich zur LC-MS/MS deutlich bessere Ergebnisse und niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden. Auch Isomere von Acylcarnitinen können nur mit der HPLC-MS voneinander unterschieden werden [132].

Bis 2009 war das Remedi HS System [7, 133] eine adäquate und häufig verwendete Methode, um viele Arzneistoffe relativ einfach und effizient nachzuweisen und zumindest semiquantitativ zu bestimmen. Seitdem dieses System nicht mehr unterstützt wird, wird nach Alternativen gesucht, die gleichzeitig eine Weiterentwicklung und eine größere Variabilität der zu untersuchenden Substanzen

bieten. Initial wurden HPLC-DAD-Systeme favorisiert [134 – 136], jedoch bietet die LC-MS deutlich mehr Vorteile. Mittels UPLC-MS/TOF können neue Quantifizierungsmethoden einfach und schnell etabliert werden. Die Kopplung der MS/TOF mit einer UPLC ermöglicht zudem kurze Analysenzeiten von maximal 10 min. Ein quantitatives Ergebnis kann somit nach Eingang der Probe innerhalb von kürzester Zeit vorliegen. Außerdem können mithilfe der UPLC- MS/TOF einfach und schnell neue In-House-Methoden entwickelt werden, um auf neue Anforderungen im TDM, wie z. B. für Pregabalin zu reagieren. Dies zeigt, dass die UPLC-MS/TOF Technik neben dem toxikologischen Screening auch für Quantifizierungen verwendet werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Gebiet der Arzneimitteltherapie ist geprägt durch seine stetige Weiterentwicklung. Für die Überwachung des Arzneimittelspiegels (therapeutisches Drug Monitoring) sowie den Nachweis der missbräuchlichen Anwendung psychoaktiver Substanzen ist es deshalb erforderlich, neue Therapeutika rasch nachweisen zu können. Auch auf dem Gebiet der reinen Missbrauchssubstanzen kommt es seit einigen Jahren zu einem immer rascheren Wechsel der verfügbaren Substanzen. Die Herausforderung für Kliniklabore besteht somit darin, ein immer breiter werdendes Spektrum an Substanzen möglichst schnell nachweisen zu können, um eine optimale Patientenversorgung zu gewährleisten. Bis vor wenigen Jahren lag dabei der Fokus auf der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Dieses Verfahren wird jedoch zunehmend von der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) abgelöst. Unter den verschiedenen MS-Analysatoren, die mit der LC gekoppelt werden können, bietet der Time-of-flight-Analysator (TOF) den Vorteil, die exakte monoisotopische Molekülmasse aller erzeugten Ionen zu bestimmen, was die Identifizierung auch unbekannter Substanzen ermöglicht. Die zusätzliche Weiterentwicklung der Chromatographie von der High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) hin zur Ultra-Performance-Liquid-ChromatographieTM (UPLC) ermöglicht durch eine höhere Effizienz der Trennung kürzere Analysenzeiten. Somit vereint die Kombination der UPLC mit der MS/TOF wesentliche Vorteile für die klinische Analytik.

Ziel dieser Arbeit war es, den analytischen Nutzen eines UPLC-MS/TOF Systems im Krankenhauslabor für den qualitativen Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen (‘systematische toxikologische Analytik’, STA) und den quantitativen Nachweis von Pharmaka (‘Therapeutisches Drug Monitoring’, TDM) zu etablieren. Für beide Anwendungsgebiete wurde in einem ersten Schritt die MS-Detektion optimiert, um die Robustheit und Empfindlichkeit des Systems zu gewährleisten. Für die MS-Detektion wurden die Massenspektren der Mutterionen und durch eine gezielte In-Source-Fragmentierung das dazugehörige Fragmentspektrum erzeugt. In einem

zweiten Schritt wurden die Probenvorbereitung und die chromatographische Trennung entsprechend den Fragestellungen angepasst.

Für den qualitativen Substanznachweis im Rahmen der STA wurde mittels UPLC-MS/TOF eine Spektrendatenbank toxikologisch relevanter Reinsubstanzen erstellt, die das jeweilige Spektrum des Mutterions sowie das gesamte zugehörige Fragmentspektrum enthält. Mit steigender Anzahl von Substanzen, die im Rahmen der Arbeit hinterlegt wurden (insg. n = 609), stieg der Datenumfang jedoch soweit, dass die verfügbare Rechenleistung für eine rasche Auswertung im Routinebetrieb nicht mehr ausreichend war. Deshalb wurde zusätzlich eine weitere Datenbank (‘Targeted Datenbank’) etabliert, die nur ausgewählte Parameter der Spektrendatenbank wie den Substanznamen, die Retentionszeit, die Masse des Mutterions und eines spezifischen Fragments beinhaltet. Um die Praktikabilität dieser ‘Targeted Datenbank’ in der Routine zu ermitteln wurden 330 authentische Urinproben untersucht. Die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse wurde zunächst durch den Vergleich mit den Einträgen, die in der Spektrendatenbank hinterlegt sind, überprüft; die Ergebnisse zeigten 86.5 % Übereinstimmung nach Auswertung mit beiden Datenbanken. Falsch-positive Ergebnisse der ‘Targeted Datenbank’ waren hauptsächlich durch zu hohe Konzentrationen einzelner Substanzen in der Probe bedingt. Der anschließende Vergleich der richtig-positiven Ergebnisse der UPLC-MS/TOF mit den Ergebnissen des Standard-GC-MS-Verfahrens zeigt insgesamt eine Übereinstimmung von 60%, wobei durch das UPLC-MS/TOF System jedoch auch Substanzen nachgewiesen werden konnten, die mittels GC-MS nicht erfasst werden. Die UPLC-MS/TOF Screening-Methode wurde abschließend nach den Vorschriften und Richtlinien der Bundesärztekammer (RILIBÄK) überprüft. Seit 2011 werden durch die Teilnahme an externen Ringversuchen die Anforderungen an labormedizinische Untersuchungen mittels der UPLC-MS/TOF erfüllt.

Um die Eignung einer automatisierten Probenvorbereitung für das Screening mittels UPLC-MS/TOF zu erproben, wurden 30 Proben sowohl mit der bisher für das Screening etablierten Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) als auch mit einer automatisierten Festphasen-Extraktion (MEPS) aufgearbeitet und analysiert. Die Screening-ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung von 95%, eine Automatisierung der Probenvorbereitung erscheint somit möglich. Die Vorteile liegen

vor allem in einer Reduzierung der Fehler, einer Verkürzung der Analysenzeiten und somit insgesamt in einer Senkung der Kosten. Ob der Einsatz von MEPS alle erwarteten Vorteile erfüllen wird, muss jedoch erst noch durch Versuche mit einer größeren Anzahl authentischer Proben gezeigt werden.

Um die Verwendung der UPLC-MS/TOF im Rahmen des TDM zu überprüfen, wurden exemplarisch Methoden für die Quantifizierung von Coffein bei Neugeborenen, Lidocain bei chronischen Schmerzpatienten sowie für die Antiepileptika 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin entwickelt. Als Proben-vorbereitung erwies sich eine einfache Proteinpräzipitation als ausreichend. Die erstellten Analysenmethoden wurden nach den Richtlinien der GTFCh bezüglich Linearität, Genauigkeit und Stabilität validiert und somit die Eignung für die klinische Diagnostik nachgewiesen. Als weitere Substanz wurde Pregabalin für das TDM mittels UPLC-MS/TOF aufgenommen. Diese Substanz, die auch im Drogenentzug verwendet wird, steht seit 2 Jahren selbst im Verdacht Abhängigkeiten hervorzu-rufen. Für den Nachweis klinisch relevanter Konzentrationen in Urin und Serum wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet. Eine einfache Proteinpräzipitation erwies sich für diese Substanz als nicht ausreichend, eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) als zu zeit- und arbeitsintensiv. Mittels automatisierter Festphasenextraktion (MEPS) konnte Pregabalin hingegen in geringer Probenmenge schnell und einfach nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das verwendete UPLC-MS/TOF-System für die gezielte Suchanalytik im Rahmen der systematischen toxikologischen Analyse (STA) sowie für die Quantifizierung im therapeutischen Drug Monitoring (TDM) geeignet ist. Um für die STA das etablierte GC-MS Screening Verfahren durch das UPLC-MS/TOF Screening Verfahren ersetzen zu können, müssten jedoch Software-Verbesserungen wie z. B. die Verknüpfung der 'Targeted Datenbank' mit der Spektrendatenbank ermöglicht werden. Hinweise auf die missbräuchlichen Verwendung von neuen, noch unbekannten Substanzen wie z. B. Designerdrogen lassen sich hingegen mittels UPLC-MS/TOF System einfach und schnell erlangen. Für das TDM kann das System für eine schnelle und einfache Etablierung von Quantifizierungsmethoden genutzt werden, da in den meisten Fällen eine einfache Proteinpräzipitation für die Probenvorbereitung als ausreichend erwiesen hat.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Henschel B., Entwicklung und Prüfung eines LC-ESI/MS/TOF-Verfahrens für die toxikologische Analytik im Akutkrankenhaus, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e. V., DGKL Mitteilungen, 2011
- [2] Wu AH., McKay C., Broussard LA., Hoffmann RS., Kwong TC., Meyer TP., National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Recommendations for the use of laboratory test to support poisoned patients who present to the emergency department, *Clin Chem* 49 (2003) 357-379
- [3] Hepler BR., Sutheimer CA., Sunshine I., The role of the toxicology laboratory in emergency medicine, *Clin Toxicol* 19 (1982) 353-365
- [4] Hepler BR., Sutheimer CA., Sunshine I., Role of the toxicology laboratory in suspected ingestions, *Pediatr Clin North Am* 33 (1986) 245-260
- [5] Gibitz HJ., Schütz H., Einfache toxikologische Laboratoriumsuntersuchungen bei akuten Vergiftungen, DFG Mitteilung XXIII der Senatskommission für Klinisch-toxikologische Analytik, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995
- [6] Ohtsuji, Use of REMEDI HS in emergency toxicology for a rapid estimate of drug concentrations in urine, serum, and gastric samples, *J Forensic Sci* 41 (1996) 881-886
- [7] Pragst F., Herzler M., Erxleben T., Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), *Clin Chem Lab Med* 42 (2004) 1325-1340
- [8] Külpmann WR., Clinical Toxicological Analysis, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2009
- [9] Marquet P., Is LC-MS suitable for a comprehensive screening of drugs and poisons in clinical toxicology?, *Therapeutic Drug Monitoring* 24 (2002) 125-133
- [10] Hofmann W., Hoffmann G., Aufenanger J., Klinikhandbuch Labordiagnostische Pfade, De Gruyter Verlag, 2012
- [11] Broecker S., Aufbau und Anwendung einer Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Giften und deren Metaboliten in Blut und Haaren in der Systematischen Toxikologischen Analyse mittels Flüssigchromatographie-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie-Kopplung (LC-QTOF-MS), Dissertation 2012 Humboldt-Universität zu Berlin
- [12] Kraemer T., Paul LD., Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood, *Anal Bioanal Chem*, 388 (2007) 1415-1435
- [13] Viette V., Fathi M., Rudaz S., Hochstrasser D., Veuthey JL., Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods; *Clin Chem Lab Med* 49 (2011) 1091-1103
- [14] Maurer HH., Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control, *J Chromatogr B, Biomed Sci Appl* 733 (1999) 3-25
- [15] Maurer HH., Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analysis and doping control, *Com Chem High Throughput Screen* 3 (2000) 467-480
- [16] Hallbach J., A fast and sensitive method for GC-MS screening in acute poisoning, *Clin Tox* 41 (2003) 558
- [17] Maurer HH., Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control, *Mass Spectrum* 41 (2006) 1399-1413
- [18] Valli A., Polettini A., Papa P., Montagna M., Comprehensive drug screening by integrated use of gas chromatography/mass spectrometry and Remedi HS, *Ther Drug Monit* 23 (2001) 287-294

- [19] Hallbach J., Guder WG., Fast diagnosis of acute intoxications by a combined laboratory strategy of HPLC and GC-MS after ultrasonic derivatisation, The Alps-Adria Congress, Regensburg 108 (2002)
- [20] Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): a novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, *Anal Chim Acta*, 586 (2007) 13-21
- [21] Marquet P., Progress of LC-MS in clinical and forensic toxicology, *Ther Drug Monit* 24 (2002) 255-276
- [22] Gallardo E., Queiroz JA., The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed Chromatogr* 22 (2008) 795-821
- [23] Lips A., Lameijer W., Fokkens R., Nibbering N., Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples, *J Chromatogr B*, 759 (2001) 191-207
- [24] Weinmann W., Wiedemann A., Eppinger B., Renz M., Screening for Drugs in Serum by Electrospray Ionization/Collision-Induced Dissociation and Library Searching, *Am Soc Mass Spectrom* 10 (1999) 1028-1037
- [25] Vernisse N., Marquet P., Duchoslav E., Dupuy JL., Lachâtre G., A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 27 (2003) 7-14
- [26] Hayashida M., Takino M., Terada M., Kurisaki E., Kudo K., Ohno Y., Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening, *Legal Medicine* 11 (2009) 423-425
- [27] www.chemgapedia.de/nmr-spektroskopie
- [28] Hallbach J., *Klinische Chemie und Hämatologie*, Thieme Verlag (2011) S. 513, 567
- [29] Maurer HH., Kratzsch C., Weber A., Peters F., Kraemer T., Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry, *J Mass Spectrom* 37 (2002) 687-692
- [30] Beck O., Öhman I., Nordgren H., Determination of Lamotrigine and its Metabolites in Human Plasma by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Therapeutic Drug Monitoring* 5 (2006) 603-607
- [31] Striano S., Striano P., Capone D., Pisani F., Limited place for plasma monitoring of new antiepileptic drugs in clinical practice, *Med Sci Monit*, 14 (2008) RA173-178
- [32] Juenke J., Brown P., Johnson-Davis K., McMillin G., Simultaneous Quantification of Levetiracetam and Gabapentin in Plasma by Ultra-Pressure Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry Detection, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2 (2011) 209-213
- [33] Rentsch K., Schwendener R., Schott., Hänseler E., Sensitivie high-performance liquid chromatographic method for the determination of N⁴-hexadecyl- and N⁴-octadecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine in plasma and erythrocytes, *J Chromatogr B*, 673 (1995) 259-266
- [34] Comer AM., Perry CM., Figgitt DP., Caffeine citrate: a review of its use in apnoea of prematurity, *Peadiatr Drug*, 3 (2001) 61-79
- [35] D'Urzo AD., Jhirad R., Jenne H., Avendano MA., Rubenstein I., D'Costa M., Goldstein RS., Effect of caffeine on ventilator responses to hypercapnia, hypoxia, and exercise in humans, *J Appl Physiol*, 68 (1990) 322 - 328
- [36] Aranda JV., Gorman W., Bergsteinsson H., Gunn T., Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant, *Journal of Pediatrics*, 3 (1977) 467-472
- [37] Tremont-Lukats IW., Hutson PR., Backonja MM., A randomized, double-masked, placebo-controlled pilot trial of extended IV lidocaine infusion for relief of ongoing neuropathic pain, *Clin J Pain*, 22 (2006) 266-271
- [38] Petersen P., Kastrup J., Zeeberg I., Boysen G., Chronic pain treatment with intravenous lidocaine, *Neurol Res*, 8 (1986) 189-190

- [39] Chen Y., Potter JM., Ravenscroft PJ., High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of monoethylglycinexylidide and lignocaine, *J Chromatogr*, 574 (1992) 361-364
- [40] Kushida K., Oka K., Suganuma T., Ishizaki T., Simultaneous determination of lidocaine and its principal metabolites by liquid chromatography on silica gel, with aqueous eluent, *Clin Chem* 30 (1984) 637-640
- [41] Barat S., Kardos S., Abdel-Rahman M., Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and lidocaine, *J Appl Toxicol*, 16 (1996) 215-219
- [42] Grosshans M., Mutschler J., Hermann D. et al. Pregabalin abuse, dependence, and withdrawal: a case report; *American Journal of Psychiatry* 167 (2010) 869
- [43] Schwan S., Sundstrom A., Stjernberg E. et al., A signal for an abuse liability for pregabalin results from the Swedish spontaneous adverse drug reaction reporting system, *European Journal of Clinical Pharmacology* 66 (2010) 947-953
- [44] Biermann T., Bleich S., Kornhuber J., Hillemacher T., Pregabalin in benzodiazepine withdrawal, *Pharmacopsych* 40 (2007) 291-292
- [45] Dahl S., Olsen K., Strand D., Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS, *J Chromatogr B*, 885-886 (2012) 37-42
- [46] Medizinisches Versorgungszentrum Dortmund,
http://www.labmed.de/de/untersuchungsprogramm_print.php?abteilung=43&kapitel=3000
- [47] Tiller PR., Romanishyn LA., Neue U., Fast LC/MS in the analysis of small molecules, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003), 788-802
- [48] Neue U., Grumbach ES., Kele M., Mazzeo JR., D. Sievers, UPLC: Ultra-Performance-Liquid-Chromatography, HPLC richtig optimiert, S. Kromidas (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2011
- [49] Maurer HH., Posititon of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and /or doping control, *ClinChemLabMed* 42 (2004) 1310-1324
- [50] WATERS GmbH, LCT-P XE_RevC Training (715001022), 2009
- [51] Wood M., Laloup M., Samyn N., Ramirez-Fernandez M., Bruijn E., Maes R., Boeck G., Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science, *J of Chromatography A*, 1130 (2006) 3-15
- [52] Martin M., Eon C., Guichon G., Study of the pertineny of pressure in liquid chromatography, 1. Theroretical analysis, *Journal of Chromatogr.* 99 (1974) 357-376
- [53] van Deemter JJ., Zuiderweg FJ., Klinkenberg A., Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography, *Chem.Eng.Sci* 5 (1956) 271-289
- [54] Neue U, Alden BA., Iraneta PC., Méndez A., Grumbach ES., Tran K., Diehl D., HPLC Columns for Pharmaceutical Analysis in: *Handbook of HPLC in Pharmaceutical Analysis*, M. Dong, S. Ahuja (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005
- [55] <http://www.axel-semrau.de/Chromatographie+Massenspektrometrie.html>
- [56] Matuszewski M.K., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003),3019-3030
- [57] Cech NB., Enke CG., Effect of affinity for droplet surfaces on the fraction of analyte molecules charged during electrospray droplet fission, *Anal Chem.*, 73 (2001) 4632-4639
- [58] Enke CG., A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of single-charged ionic analytes, *Anal Chem* 69 (1997) 4885-4893
- [59] Y.-F. Cheng, Z. Lu, U. D. Neue, Ultra-Fast LC and LC/MS/MS Analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 141-151
- [60] Liang H., Foltz R., Meng M., Bennett P., Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Comm Mass Spectrom* 17 (2003) 2815-2821

- [61] Remane D., Wissenbach D., Meyer M., Maurer H., Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-analyte liquid chromatographic/mass spectrometric procedures, *Rapid Comm Mass Spectrom* 24 (2010) 859-867
- [62] Remane D., Meyer M., Wissenbach D., Maurer H., Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization, *Rapid Comm Mass Spectrom* 24 (2010) 3103-3108
- [63] Seiwert B., Leeuwen S., Hayen H., Vogel M., Karst U., HIGHCHEM – hautnah – Aktuelles aus der Analytischen Chemie; „Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie für die Analytik unpolarer Verbindungen“; Universität Twente, Abteilung Analytische Chemie und MESA⁺, Institut für Nanotechnologie, Niederlande, Juni2005
- [64] Chernushevich I., Loboda A., Thomson B., An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 36 (2001) 849-865
- [65] FIZ Chemie Berlin, Fachinformationszentrum Chemie GmbH, ChemgaPedia, Lerneinheit Massenspektrometrie, www.chemistry.de
- [66] Hesse M., Meier H., Zeeh B.; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; 6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, S. 303, 2002
- [67] Gross J.H., Skript Massenspektrometrie zum Kurs Spektroskopische Methoden in der Anorganischen und Organischen Chemie, 4. Auflage, MS-Abt. im OCI, INF 270, Uni Heidelberg; 1999, <http://rzuser.uni-heidelberg.de/~b15/ms-ocidh.html>
- [68] Jiwan JL., Wallmacq P., Hérent MF., HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory, *Clin Biochem.* 44 (2011)136-147
- [69] LCI Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e.V., Ionisierungstechniken in der Massenspektrometrie – von der ESI bis zur APPI, 2002, <http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/ionisierungstechniken-in-der-massenspektrometrie-von-der-esi-bis-zur-appi>
- [70] Kebarle P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J Mass Spectrom* 35 (2000) 804-817
- [71] Ahmad MH., Cech NB., Jackson GS., Enke CG., Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents, *J Mass Spectrom* 35 (2000) 784-789
- [72] Gaskell S., Electrospray: Principles and Practice, *J Mass Spectrom* 32 (1997) 677-688
- [73] Kebarle P., Verkerk U., Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now, *Mass Spectrom Review* 28 (2009) 898-917
- [74] University of Bristol, School of Chemistry, Mass Spectrometry Resource, CID, www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/cid-fragmentation.html
- [75] Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH, DIN EN ISO 15189, DAkkS-BA_CH-ML-15189/Rev.0.9, 2011, Berlin
- [76] Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen RiliBÄK, http://www.udh-bundesverband.de/content/e361/e1628/RILI-BAEK_ger.pdf
- [77] Peters F., Paul L., Anhang B zur Richtlinie der GTFCCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden, Gesellschaft für forensische und toxikologische Chemie, Arbeitskreis Qualitätssicherung, 2009
- [78] Chemspider, The free chemical database, www.chemspider.com
- [79] Neitzel V., Lineare Kalibrationsfunktionen, CLB Chemie in Labor und Biothechnik, 53. Jahrgang, Heft 1/2002
- [80] Grubbs F E, Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, *Technometrics*. 11, Nr. 1, 1. Januar 1969, S. 1–21

- [81] Pfleger K., Maurer H. H., Weber A., Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites I / II / III, XVIII, Wiley-VCH, Weinheim 2011
- [82] Refereninstitut für Bioanalytik – Ringversuche – Referenzlaboratorien, www.dgkl-rfb.de
- [83] Kyle PB., Iverson RB., Gajagowni RG., Spencer L., Illicit bath salts: not for bathing; J Miss State Med Assoc. 2011 Dec; 52 (12): 357-7
- [84] Passing H, Bablok W, A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods, Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part 1, J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 709-720
- [85] Öjanpera S., Pelander A., Laks S., Rasanen I., Vuori E., Witt M., Application of accurate mass measurement to urine drug screening, J Anal Toxicol, 29 (2005) 34-40
- [86] Pelander A., Ojanpera I., Laks S., Rasanen I., Vuori E., Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, Anal Chem, 75 (2003) 5710-5718
- [87] Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): a novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, Anal Chim Acta, 586 (2007) 13-21
- [88] Polettini A, Gottardo R, Pascali J, Tagliaro F, Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, Anal. Chem 80 (2008) 3050-3057
- [89] Gergov M., Boucher B., Öjanpera I., Vuori E., Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated targeted library search based on elemental formulas, Rapid Commun Mass Spektrom, 15 (2001) 521-526
- [90] Kolmonen M., Leinonen A., Pelander A., Ojanpera I., A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, Anal Chim Acta, 585 (2007) 94-102
- [91] Peters FT., Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, Clinical Biochemistry 44 (2011) 54-65
- [92] Bristow T., Webb K., Lubben A., Halket J., Reproducible product-ion tandem mass spectra on various liuid chromatography/mass spectrometry instruments for the development of spectral libraries, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 1447-1454
- [93] Liotta E., Gottardo R., Bertaso A., Polettini A., Screening for pharmaco-toxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a 'metabolomic' approach to the discrimination between isomers, J Mass Spectrom 45 (2010) 261-271
- [94] Maurer HH., Multi-analyte procedures for screening and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology, Clinical Biochemistry 38 (2005) 310-318
- [95] Diaz R., Ibanez M., Sancho JV., Hernandez F., Building an empirical mass spectra library for screening of organic pollutants by ultra-high-pressure liuid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 25 (2011) 355-369
- [96] Pavlic M., Libiseller K., Oberacher H., Combined use of ESI-QqTOF-MS and ESI-QqTOF-MS/MS with mass-spectral library search for qualitative analysis of drugs, Anal Bioanal Chem, 386 (2006) 69-82
- [97] Tyrkko E., Pelander A., Ojanpera I., Differentiation of structural isomers in a target drug database by LC/Q-TOFMS using fragmentation prediction, Drug Test Anal, 2 (2010) 259-270
- [98] Broecker S, Pragst F, Bakdash A, Herre S, Tsokos M, Combined use of liuid chromatography-hybrid quadrupol time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis, Forensic Science International 212 (2011) 215-226
- [99] Toennes SW, Wagner MG, Kauert GF, Application of LC-TOF MS to analysis of hemoglobin acetaldehyde adducts in alcohol detoxification patients, Anal Bioanal Chem, 398 (2010): 769-777

- [100] Andersson M., Gustavsson E., Stephanson N., Beck O., Direct injection LC-MS/MS method for identification and quantification of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine drug testing, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 861 (2008) 22-28
- [101] Fritsch D., Blum K., Nonnemacher S., Haggerty BJ., Sullivan MP., Cone E.J., Identification and quantification of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol* 33 (2009) 569-577
- [102] Avery MJ., Fouda, Development of a high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometric assay for β -tigogenin cellobioside in human serum, *J Chromatogr B* 689 (1997) 365-370
- [103] Decaestecker T., Castele S., Wallemacq P., Peteghem C., Defore D., van Bocxlaer J., Information-dependent acquisition-mediated LC-MS/MS screening procedure with semiquantitative potential, *Anal Chem* 76 (2004) 6365-6373
- [104] Mueller CA., Weinmann W., Desen S., Schreiber A., Gergov M., Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a qtrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching, *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 1332-1338
- [105] Dresen S., Ferreiros N., Gnann H., Zimmermann R., Weinmann W., Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q-Trap LC-MS/MS system and library searching, *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 2425-2434
- [106] Hopley C., Bristow T., Lubben A., Simpson A., Bull E., Klagkou K., Herniman J., Langley J., Towards a universal product ion mass spectral library – reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1779-1786
- [107] Broecker S., Herre S., Wüst B., Zweigenbaum J., Pragst F., Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, *Anal Bioanal Chem* 400 (2011) 101-117
- [108] Paglia G., Hrafnssdottir S., Magnusdottir M., Fleming R., Thorlacius S., Palsson B., Thiele I., Monitoring metabolites consumption and secretion in cultured cells using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), *Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 1183-1198
- [109] Nielen MWF., van Engelen MC., Zuiderent R., Ramaker R., Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques, *Anal Chim Acta* 586 (2007) 122-129
- [110] Jankovics P., Váradi A., Tölgysi L., Lohner S., Németh-Palotás J., Köszei-Szalai H., Identification and characterization of the new designer drug 4'-methylethcathionone (4-MEC) and elaboration of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) screening method for seven different methcathinone analogs, *Forensic Science International* 210 (2011) 213-220
- [111] Lüllmann H., Mohr K., Hein L., *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme Verlag KG, Stuttgart, (2006) 30-32
- [112] Rossi D., Integrating automation and LC/MS for drug discovery bioanalysis, *J of Automated Methods&Management in Chemistry* 24 (2002) 1-7
- [113] Musteata M., Musteata F., Analytical methods used in conjunction with solid-phase microextraction: a review of recent bioanalytical applications, *Bioanalysis* 1 (2009) 1081-1102
- [114] Said R., Pohanka A., Andersson M., Beck O., Mohamed AR., Determination of remifentanil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing micro extraction in packed syringe (MEPS) as sample preparation, *J Chromatogr B* 879 (2011) 815-818
- [115] Wyne P., With HJ., Gooley A., The determination of urinary metabolites of dextromethorphan by MEPSTM-ESI-LCMS, http://www.sge.com/root/pdfs_local/posters/tp-0195-m.pdf

- [116] Wyne P., Feo D., Dawes P., GC-MS in forensic drug analysis: application to opium contaminated animal feeds, http://www.sge.com/root/pdfs_local/posters/tp-0142-c.pdf, (2007)
- [117] Dawes P., Hibberl R., With HJ., Gooley A, The extraction of saliva for the analysis of basic drugs residues using MEPS™-GC/MS, http://www.sge.com/root/pdfs_local/posters/tp-0204-h.pdf
- [118] Musshoff F, Junker H, Lachenmeier D, Kroener L, Madea B, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatographic Science*, 40 (2002) 359-364
- [119] Marks D., Patkar A., Masand P., Pae C-U., Does Pregabalin have neuropsychotropic effects?: a short perspective, *Psychiatry Invest*, 6 (2009) 55-58
- [120] Rubio G., Bobes J., Cervera G., Terán A., Pérez M., López-Gómez V., Rejas J., Effects of pregabalin on subjective sleep disturbance symptoms during withdrawal from long-term benzodiazepine use, *Eur Addict Res*, 17 (2011) 262-270
- [121] Berry D, Millington C, Analysis of Pregabalin at Therapeutic Concentrations in Human Plasma/Serum by Reversed-Phase HPLC, *Therapeutic Drug Monitoring*, 27 (2005) 451-456
- [122] Filippetto F., Zipp C., Coren J., Potential for pregabalin abuse or diversion after past drug-seeking behavior, *JAOA* 110 (2010) 605-607
- [123] Grosshans M., Mutschler J., Hermann D., Klein O., Dressing H., Kiefer F., Mann K., Pregabalin abuse, dependence, and withdrawal: a case report, *Am J Psychiatry* 167 (2010) 869
- [124] Schwan S., Sundström A., Stjernberg E., Hallberg E., Hallber P., A signal for an abuse liability for pregabalin-results from the Swedish spontaneous adverse drug reaction reporting system, *Eur J Clin Pharmacol*. 66 (2010) 947-53
- [125] Vogel H., Entwicklung von GC-MS Bestimmungsmethoden für das Therapeutische Drug Monitoring von Antiepileptika, Sedativa, Tranquillizern und Antidepressiva, Dissertation, 1998
- [126] Bucelli F., Fratini A., Bavazzona P., Comodo N., Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (2009) 3931-3936
- [127] Simones SS., Ajenjo AC., Franco JM., Vieira DN., Dias MJ., Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of illicit drugs and medicines in preserved oral fluid, *Rapid Commun Mass Spectrom* 23 (2009) 1451-1460
- [128] Ahsman MJ., van der Nagel BC., Mathot RA., Quantification of midazolam, morphine and metabolites in plasma using 96-well solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr* 24 (2010) 969-976
- [129] Gray TR., Shakleya DM., Huestis MA., A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium, *Anal Bioanal Chem* 393 (2009) 1977-1990
- [130] Shakleya DM., Huestis MA., Simultaneous quantification of nicotine, opioids, cocaine, and metabolites in human fetal postmortem brain by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 393 (2009) 1957-1965
- [131] Saint-Marcoux F., Sauvage FL., Marquet P., Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring, *Anal Bioanal Chem* 388 (2007) 1327-1349
- [132] Minkler P., Stoll M., Ingalls S., Yang S., Kerner J., Hoppel., Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry, *Clin Chem* 54 (2008) 1451-1462
- [133] Schönberg L., Grobosch T., Lampe D., Kloft C., New screening method for basic compounds in urine by on-line extraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *J Chromatogr A* 1134 (2006) 177-185
- [134] Lambert W., van Bocxlaer J., Leenheer A., Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology, *J Chromatogr B* 689 (1997) 45-53

[135] Herzler M., Herre S., Pragst F., Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds, *J Anal Toxicol* 27 (2003) 233-242

[136] Schönberg L., Grobosch T., Lampe D., Kloft C., Toxikological screening in urine: comparison of two automated HPLC Screening systems, Toxicological Identification System (TOX.I.S) versus REMEDITM-HS, *J Anal Toxicol* 31 (2007) 321-327

8 ANHANG

Anhang 1 Ergebnisse des toxikologischen Screenings mittels 'Targeted Datenbank' und der Spektrendatenbank der UPLC-MS/TOF

MS-TOF – targeted-Screening	richtig- positiv	falsch- positiv	MS-TOF – targeted- Screening	richtig- positiv	falsch- positiv
7-Aminodesmethyl- flunitrazepam	-	1	Fluoxetin	1	3
7-Aminoflunitrazepam	3	2	Heroin	4	-
Alloxydim	-	1	Hydrocodon	7	-
Amezinium	1	-	Hydromorphon	2	-
Amitriptylin	6	4	Ibuprofen	50	-
Amitriptylinoxid	16	-	Ketamin	2	-
Amphetamin	1	-	Lamotrigin	2	-
Anastrazol	-	1	Lidocain	1	-
Atropin	1	-	Lorazepam	2	-
Azithromycin	1	-	MAM	15	-
Benzoylecgonin	2	-	MDMA	1	-
Bisoprolol	1	-	Mepivacain	2	-
Buprenorphin	3	-	Methadon	233	-
Butamirat	-	1	Methylphenidat	5	-
Butinolin	-	18	Metoclopramid	17	-
Cafaminol	-	1	Metoprolol	1	-
Cafedrin	2	-	Midazolam	2	-
Carazolol	-	1	Mirtazapin	14	-
Carbamazepin-epoxid	24	-	Morphin	31	-
Carbamazepin	26	-	Nordazepam	64	1
Chinidin	1	-	Nortriptylin	12	2
Cinchocain	1	-	Noscapin	21	-
Cinchonidin	7	2	Olanzapin	9	-
Citalopram	22	3	Oipramol	2	-
Clarithromycin	1	-	Oxazepam	28	1
Clindamycin	2	-	Paracetamol	11	-
Clomethiazol	1	-	Phenprocoumen	2	-
Clonidin	1	-	Promethiazin	1	-
Cocain	3	-	Propanolol	6	1

Fortsetzung Anhang 1 Ergebnisse des toxikologischen Screenings mittels 'Targeted Datenbank' und der Spektrendatenbank der UPLC-MS/TOF

MS-TOF - targeted- Screening	richtig- positiv	falsch- positiv	MS-TOF - targeted- Screening	richtig- positiv	falsch- positiv
Codein	24	-	Quetiapin	1	-
Cyclicin	1	-	Temazepam	12	1
Desipramin	-	1	Tetracain	1	2
Dextromethorphan	4	-	Thiopental	2	-
Diazepam	39	4	Tiapride	4	-
Dibenzepin	4	5	Tramadol	8	2
Diphenhydramin	1	1	Tramadol- desmethyl	4	-
Doxepin	23	85	Trimipramin	-	1
Doxepin-desmethyl	23	14	Summe:	1044	163
EDDP	217	5	Prozent %:	86.5	13.5

Anhang 2 Vergleich des Nachweises verschiedener Substanzen mittels UPLC-MS/TOF und GC-MS bzw. beider Methoden

Substanz	MS-TOF/ GC-MS	nur MS/TOF	nur GC-MS
7-Aminodesmethyl- flunitrazepam	-	1	-
7-Aminoflunitrazepam	-	3	-
Amezinium	-	1	-
Amitriptylin	2	5	1
Amitriptylinoxid	9	7	-
Amphetamin	1	-	-
Atropin	1	-	-
Azithromycin	-	1	-
Benzoyleccgonin	1	1	-
Bisoprolol	1	-	-
Buprenorphin	2	1	3
Cafedrin	1	1	-
Carbamazepinepoxid	14	10	2
Carbamazepin	16	10	-
Chinidin	-	1	-
Cinchocain	-	1	-
Cinchonidin	-	8	-
Citalopram	22	-	-
Clarithromycin	-	1	-

Fortsetzung Anhang 2 Vergleich des Nachweises verschiedener Substanzen mittels UPLC-MS/TOF und GC-MS bzw. beider Methoden

Substanz	MS-TOF/GC	nur MS-TOF	nur GC-MS
Clindamycin	-	2	-
Clomethiazol	-	1	3
Clonidin	1	-	-
Cocain	1	2	-
Codein	21	3	3
Cyclicin	1	-	-
Dextromethorphan.	-	4	-
Diazepam	3	36	-
Dibenzepin	1	3	-
Diphenhydramin	1	-	3
Doxepin	14	9	-
Doxepin-desmethyl	11	13	-
Doxylamin	-	1	-
EDDP	196	20	7
Fentanyl	1	2	5
Fluoxetin	-	1	-
Heroin	-	4	-
Hydrocodon	-	7	-
Hydromorphon	-	1	-
Ibuprofen	51	1	67
Ketamin	2	-	-
Lamotrigin	2	-	-
Lidocain	1	1	-
Lorazepam	2	-	3
MAM	13	2	1
MDMA	1	-	-
Mepivacain	1	1	-
Methadon	216	17	5
Methylphenidat	5	-	-
Metoclopramid	9	8	-
Metoprolol	1	-	-
Midazolam	2	-	-
Mirtazapin	14	-	1
Morphin	30	1	14
Nordazepam	26	38	17
Nortriptylin	2	11	-

Fortsetzung Anhang 2 Vergleich des Nachweises verschiedener Substanzen mittels UPLC-MS/TOF und GC-MS bzw. beider Methoden

Substanz	MS-TOF/ GC-MS	nur MS-TOF	nur GC-MS
Noscapin	14	8	-
Olanzapin	-	9	-
Opipramol	2	-	-
Oxazepam	26	-	105
Paracetamol	13	-	20
Pentobarbital	-	1	-
Phenprocoumen	-	2	-
Promethazin	1	-	-
Propanolol	-	6	-
Quetiapin	1	-	-
Temazepam	14	-	40
Tetracain	-	1	-
Tetrazepam	-	1	-
Thiopental	-	2	-
Tiapride	1	3	-
Tramadol	7	1	-
Tramadol-desmethyl	-	3	-
Summe:	778	278	300
Prozent:	57.4	20.5	22.1

Anhang 3 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von Lidocain im Kalibrationsbereich 0.25 - 10 mg/l einschließlich Ausreißer-Test nach Grubbs

Messung	0.25 mg/L	0.75 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	7.5 mg/L	10 mg/L
1	0.464	0.975	1.227	2.17	6.552	8.534
2	0.459	0.963	1.245	2.181	6.41	8.574
3	0.463	0.963	1.25	2.13	6.501	8.491
4	0.457	0.98	1.238	2.192	6.499	8.561
5	0.455	0.959	1.255	2.06	6.562	8.655
6	0.452	0.974	1.257	2.124	6.569	8.344
Mittelwert	0.458	0.969	1.245	2.143	6.516	8.527
SD	0.00463	0.00841	0.01133	0.04898	0.05995	0.10448
Varianz	0.00002	0.00007	0.00013	0.0024	0.00359	0.01092
VK %	1.011	0.868	0.91	2.286	0.92	1.225
Extremwert	0.452	0.98	1.227	2.06	6.41	8.344
Prüfwert	1.37	1.31	1.62	1.69	1.76	1.75
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Anhang 4 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von 10-OH-Carbazepin im Kalibrationsbereich von 3.28 – 32.8 mg/l einschließlich Ausreißer-Test nach Grubbs

Messung	3.28 mg/l	4.1 mg/l	5.47 mg/l	8.2 mg/l	16.4 mg/l	24.6 mg/l	32.8 mg/l
1	3.109	4.112	5.476	9.036	16.959	24.842	32.094
2	3.3048	3.773	5.747	9.301	16.456	24.541	32.305
3	2.923	3.753	5.777	9.378	16.842	24.356	33.263
4	3.109	3.971	5.462	9.015	17.178	23.158	31.804
5	2.951	3.797	5.609	9.279	16.977	25.093	33.124
6	2.833	3.995	5.513	9.185	16.872	23.955	32.157
Mittelwert	2.996	3.9	5.597	9.199	16.881	24.324	32.458
SD	0.112	0.147	0.138	0.148	0.239	0.693	0.594
Varianz	0.012	0.021	0.019	0.022	0.057	0.481	0.353
VK %	3.738	3.769	2.466	1.609	1.416	2.849	1.83
Extremwert	2.833	4.112	5.777	9.015	16.456	23.158	33.263
Prüfwert	1.46	1.45	1.3	1.24	1.78	1.68	1.35
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Anhang 5 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von Lamotrigin im Kalibrationsbereich von 2.35 – 23.5 mg/l einschließlich Ausreißer-Test nach Grubbs

Messung	2.35 mg/l	2.94 mg/l	3.92 mg/l	5.88 mg/l	11.75 mg/l	17.63 mg/l	23.5 mg/l
1	2.274	2.966	3.913	6.291	11.544	16.901	24.23
2	2.278	2.819	4.008	6.487	11.333	16.985	24.094
3	2.325	2.82	3.976	6.312	12.159	17.066	23.92
4	2.34	2.953	4.047	6.41	11.995	17.635	24.129
5	2.293	2.849	4.047	6.293	12.17	16.535	24.029
6	2.326	2.916	4.034	6.397	11.602	16.325	24.52
Mittelwert	2.306	2.887	4.004	6.365	11.801	16.907	24.154
SD	0.028	0.066	0.052	0.079	0.354	0.456	0.208
Varianz	0.001	0.004	0.003	0.006	0.125	0.208	0.043
VK %	1.214	2.286	1.299	1.241	3	2.697	0.861
Extremwert	2.34	2.966	3.913	6.487	11.333	17.635	24.52
Prüfwert	1.22	1.19	1.74	1.54	1.32	1.6	1.77
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Anhang 6 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von Levetiracetam im Kalibrationsbereich von 4.1 – 41 mg/l einschließlich Ausreißer-Test nach Grubbs

Messung	4.1 mg/l	5.13 mg/l	6.83 mg/l	10.25 mg/l	20.5 mg/l	30.75 mg/l	41 mg/l
1	3.367	4.792	7.281	10.661	21.275	30.682	42.196
2	4.127	4.826	7.657	10.225	20.961	30.287	41.758
3	3.929	4.989	7.631	10.092	20.765	31.02	42.077
4	3.711	5	7.369	9.707	21.445	29.443	41.026
5	3.546	5.093	7.269	10.475	21.615	31.422	40.703
6	3.246	5.196	7.587	10.177	21.139	29.709	41.066
Mittelwert	3.654	4.983	7.466	10.223	21.2	30.427	41.471
SD	0.336	0.154	0.179	0.329	0.312	0.763	0.621
Varianz	0.113	0.024	0.032	0.108	0.098	0.582	0.385
VK %	9.195	3.091	2.398	3.218	1.472	2.508	1.497
Extremwert	4.127	5.196	7.269	9.707	20.765	31.422	40.703
Prüfwert	1.41	1.38	1.1	1.57	1.39	1.3	1.24
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Anhang 7 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von Gabapentin im Kalibrationsbereich von 0.92 – 9.23 mg/l einschließlich Ausreißer-Test nach Grubbs

Messung	0.92 mg/l	1.15 mg/l	1.54 mg/l	2.31 mg/l	4.62 mg/l	6.92 mg/l	9.23 mg/l
1	0.898	1.158	1.563	2.421	4.742	6.646	9.389
2	0.882	1.134	1.599	2.399	4.566	6.68	9.385
3	0.879	1.128	1.476	2.482	4.493	6.802	9.311
4	0.885	1.134	1.577	2.454	4.69	6.908	9.274
5	0.924	1.157	1.571	2.442	4.604	6.678	9.33
6	0.908	1.146	1.524	2.451	4.691	6.68	9.36
Mittelwert	0.896	1.143	1.552	2.442	4.631	6.732	9.342
SD	0.018	0.013	0.044	0.029	0.093	0.102	0.045
Varianz	0	0	0.002	0.001	0.009	0.1	0.002
VK %	2.009	1.137	2.835	1.188	2.008	1.515	0.482
Extremwert	0.924	1.158	1.476	2.399	4.493	6.908	9.274
Prüfwert	1.6	1.19	1.7	1.48	1.48	1.73	1.5
Ausreißer?	nein						

Anhang 8 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 5 mg/l Coffein

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	4.640	4.804	5.073	4.965	4.999	4.991	5.039	5.040
2	4.460	4.806	5.057	4.985	4.991	4.960	4.971	5.039
3	4.510	4.767	4.806	4.967	4.997	4.963	5.037	4.987
4	4.460	4.927	4.958	4.961	5.023	4.994	5.090	5.028
5	4.880	4.908	4.958	4.994	4.985	4.983	4.984	5.012
6	4.560	5.037	4.991	4.995	5.000	5.007	5.001	5.040
Mittelwert	4.580	4.870	4.970	4.980	5.000	4.980	5.020	5.020
BIAS %	-8.340	-2.503	-0.523	-0.443	-0.017	-0.340	0.407	0.487
SD	0.162	0.101	0.096	0.015	0.013	0.018	0.044	0.021
VK %	3.534	2.082	1.922	0.308	0.259	0.369	0.873	0.424

Anhang 9 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 10 mg/l Coffein

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	10.420	10.656	9.859	9.526	10.070	9.971	9.998	9.900
2	10.140	10.705	10.277	9.578	10.035	10.025	10.054	10.069
3	10.400	10.635	9.999	9.870	10.049	9.993	10.025	9.911
4	10.340	10.524	9.870	9.999	10.015	10.007	9.994	10.208
5	10.550	10.684	10.096	9.493	10.019	10.009	10.035	10.105
6	9.910	10.795	9.982	9.926	10.039	10.057	9.948	10.101
Mittelwert	10.290	10.670	10.010	9.730	10.040	10.010	10.010	10.050
BIAS %	2.938	6.665	0.138	-2.680	0.378	0.103	0.090	0.490
SD	0.231	0.089	0.156	0.224	0.020	0.029	0.037	0.121
VK %	2.247	0.835	1.559	2.303	0.201	0.291	0.374	1.200

Anhang 10 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 20 mg/l Coffein

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	20.46	22.023	19.484	19.51	19.962	19.935	20.025	19.959
2	20.21	21.017	19.601	20.511	20.02	20.008	20.008	20.014
3	20.16	22.024	19.846	20.766	19.98	19.855	20.055	19.929
4	20.07	21.531	20.475	20.616	19.933	20.059	20.002	20.037
5	19.68	21.857	19.461	20.71	19.995	19.993	20.018	19.888
6	19.37	20.935	20.251	20.93	19.991	20.035	20.065	19.997
Mittelwert	19.991	21.564	19.853	20.507	19.98	19.981	20.029	19.971
BIAS %	-0.043	7.823	-0.735	2.536	-0.099	-0.096	0.144	-0.147
SD	0.395	0.491	0.424	0.509	0.03	0.075	0.026	0.056
VK %	1.978	2.276	2.135	2.48	0.15	0.373	0.128	0.28

Anhang 11 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 0.5 mg/l Lidocain

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	0.51	0.511	0.499	0.497	0.499	0.497	0.5	0.514
2	0.499	0.521	0.496	0.501	0.497	0.499	0.496	0.519
3	0.517	0.516	0.5	0.504	0.502	0.494	0.498	0.535
4	0.503	0.502	0.5	0.496	0.496	0.495	0.5	0.51
5	0.507	0.519	0.503	0.496	0.499	0.497	0.496	0.505
6	0.498	0.531	0.497	0.498	0.498	0.5	0.498	0.515
Mittelwert	0.51	0.52	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.52
BIAS %	1.133	3.333	-0.167	-0.267	-0.3	-0.6	-0.4	3.267
SD	0.007	0.01	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.01
VK %	1.424	1.891	0.497	0.643	0.416	0.459	0.359	1.996

Anhang 12 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 2.5 mg/l Lidocain

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	2.661	2.554	2.572	2.511	2.499	2.503	2.518	2.504
2	2.675	2.515	2.492	2.515	2.481	2.488	2.502	2.623
3	2.636	2.498	2.508	2.482	2.481	2.521	2.518	2.53
4	2.769	2.541	2.492	2.488	2.492	2.521	2.514	2.538
5	2.633	2.522	2.527	2.51	2.527	2.519	2.522	2.622
6	2.769	2.549	2.561	2.492	2.477	2.494	2.502	2.553
Mittelwert	2.691	2.53	2.525	2.5	2.493	2.508	2.513	2.562
BIAS %	7.62	1.193	1.013	-0.013	-0.287	0.307	0.507	2.467
SD	0.063	0.022	0.035	0.014	0.019	0.015	0.009	0.05
VK %	2.334	0.861	1.369	0.559	0.748	0.586	0.344	1.941

Anhang 13 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 5 mg/l Lidocain

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	4.791	4.971	4.936	4.97	5.028	4.989	4.991	5.109
2	5.217	4.969	5.078	4.987	5.005	5.023	5.019	5.307
3	5.019	5.05	5.102	4.993	5.015	5	4.986	5.171
4	4.902	5.062	5.091	5.009	5.037	5.003	5.006	5.096
5	4.959	5.013	4.968	4.966	4.99	5.015	4.988	4.983
6	5.132	5.006	4.94	4.976	5.01	5.022	5.013	5.05
Mittelwert	5.003	5.012	5.019	4.984	5.014	5.009	5.001	5.119
BIAS %	0.067	0.237	0.383	-0.33	0.283	0.173	0.01	2.387
SD	0.155	0.039	0.079	0.016	0.017	0.014	0.014	0.111
VK %	3.093	0.773	1.576	0.323	0.334	0.27	0.281	2.174

Anhang 14 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 4.73 mg/l 10-OH-Carbazepin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	4.39	4.847	4.170	4.673	5.421	4.805	4.359	4.453
2	4.53	4.901	4.368	5.231	5.511	5.024	4.804	4.599
3	4.75	4.972	4.778	5.298	5.049	4.453	4.857	4.732
4	4.83	4.659	4.356	5.161	5.266	4.659	4.799	4.932
5	4.70	4.984	4.282	5.223	5.477	4.585	5.009	4.750
6	4.79	5.004	4.785	5.127	5.668	4.954	4.606	4.879
Mittelwert	4.66	4.89	4.46	5.12	5.40	4.75	4.74	4.72
BIAS %	-1.402	3.478	-5.782	8.221	14.137	0.352	0.190	-0.123
SD	0.171	0.129	0.261	0.226	0.215	0.221	0.227	0.177
VK %	3.668	2.644	5.866	4.422	3.987	4.648	4.782	3.752

Anhang 15 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 23.7 mg/l 10-OH-Carbazepin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	24.40	27.572	27.517	26.102	25.719	23.745	26.436	25.704
2	24.58	26.872	27.491	26.725	26.852	23.508	26.361	26.445
3	24.49	26.994	26.271	26.705	25.984	25.105	24.833	25.606
4	24.65	27.981	27.062	25.013	26.539	24.245	26.263	24.789
5	25.28	27.018	27.791	26.557	25.886	25.319	26.443	25.840
6	24.41	28.007	27.488	26.443	26.207	25.050	26.559	25.812
Mittelwert	24.635	27.407	27.27	26.258	26.198	24.495	26.149	25.699
BIAS %	3.947	15.643	15.063	10.791	10.539	3.356	10.334	8.436
SD	0.332	0.515	0.542	0.651	0.428	0.769	0.652	0.534
VK %	1.347	1.878	1.988	2.477	1.634	3.140	2.494	2.077

Anhang 16 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 2.87 mg/l Lamotrigin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	24.40	27.572	27.517	26.102	25.719	23.745	26.436	25.704
2	24.58	26.872	27.491	26.725	26.852	23.508	26.361	26.445
3	24.49	26.994	26.271	26.705	25.984	25.105	24.833	25.606
4	24.65	27.981	27.062	25.013	26.539	24.245	26.263	24.789
5	25.28	27.018	27.791	26.557	25.886	25.319	26.443	25.840
6	24.41	28.007	27.488	26.443	26.207	25.050	26.559	25.812
Mittelwert	24.635	27.407	27.27	26.258	26.198	24.495	26.149	25.699
BIAS %	3.947	15.643	15.063	10.791	10.539	3.356	10.334	8.436
SD	0.332	0.515	0.542	0.651	0.428	0.769	0.652	0.534
VK %	1.347	1.878	1.988	2.477	1.634	3.140	2.494	2.077

Anhang 17 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 14.2 mg/l Lamotrigin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	14.94	15.370	15.772	15.758	15.294	14.057	15.912	14.490
2	14.83	15.804	16.076	15.723	15.204	14.534	16.526	14.538
3	14.53	15.391	16.281	15.221	15.441	15.357	15.660	14.249
4	14.75	15.393	16.245	15.474	15.411	14.753	15.387	14.419
5	14.77	15.631	16.162	15.284	15.432	14.922	15.717	14.434
6	14.90	15.707	16.442	15.458	15.260	15.207	16.239	14.524
Mittelwert	14.786	15.549	16.163	15.486	15.340	14.805	15.907	14.442
BIAS %	4.126	9.502	13.824	9.059	8.031	4.261	12.020	1.707
SD	0.144	0.189	0.228	0.220	0.101	0.472	0.415	0.106
VK %	0.972	1.214	1.408	1.421	0.657	3.191	2.609	0.733

Anhang 18 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 9.73 mg/l Levetiracetam

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	10.94	10.754	11.060	9.836	13.474	11.412	10.288	9.885
2	10.86	11.532	10.833	11.173	12.504	12.148	9.783	10.403
3	11.18	11.307	11.402	11.270	13.545	8.403	10.278	9.851
4	11.11	11.490	11.413	10.276	13.548	10.366	10.241	9.838
5	10.36	11.454	11.424	10.152	13.138	12.190	10.221	10.532
6	10.95	11.866	9.611	10.958	13.286	8.434	9.774	10.417
Mittelwert	10.90	11.40	10.96	10.61	13.25	10.49	10.10	10.15
BIAS %	12.013	17.169	12.612	9.053	36.168	7.833	3.777	4.361
SD	0.289	0.366	0.702	0.599	0.399	1.737	0.248	0.328
VK %	2.656	3.215	6.404	5.645	3.012	16.556	2.459	3.231

Anhang 19 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 23.2 mg/l Levetiracetam

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	22.00	23.981	23.539	23.667	27.869	21.990	26.509	24.148
2	22.07	23.997	24.556	23.144	28.051	24.661	25.078	23.590
3	22.26	24.543	22.206	23.029	28.500	26.981	25.866	23.400
4	22.48	24.681	23.226	21.333	27.410	26.004	25.312	23.535
5	22.13	24.633	23.575	24.583	28.552	24.553	25.272	23.720
6	22.16	24.425	23.198	25.228	29.155	20.110	25.633	22.705
Mittelwert	22.185	24.377	23.383	23.4997	23.256	24.050	25.612	23.516
BIAS %	-4.376	5.072	0.790	1.281	1.794	3.663	10.395	1.364
SD	0.169	0.313	0.759	1.359	0.610	2.561	0.522	0.473
VK %	0.760	1.283	3.246	5.783	2.160	10.650	2.037	2.011

Anhang 20 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 1.04 mg/l Gabapentin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	1.11	1.107	1.024	1.104	1.211	1.091	1.111	1.100
2	1.08	1.188	0.987	1.228	1.191	0.964	1.115	1.112
3	1.13	1.120	0.965	1.159	1.222	1.042	1.134	0.995
4	1.09	1.099	0.966	1.178	1.238	1.073	1.136	1.084
5	1.08	1.141	1.013	1.134	1.222	1.560	1.138	1.137
6	1.01	1.166	1.008	1.263	1.109	1.234	1.106	1.103
Mittelwert	1.084	1.137	0.994	1.178	1.199	1.161	1.123	1.089
BIAS %	4.231	9.311	-4.439	13.237	15.272	11.603	8.013	4.663
SD	0.040	0.035	0.025	0.059	0.047	0.215	0.014	0.049
VK %	3.702	3.070	2.518	5.023	3.892	18.484	1.266	4.502

Anhang 21 Bestimmung der Genauigkeit über 8 Tage: Kontrollprobe 9.73 mg/l Gabapentin

Messung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	7.07	7.373	7.887	6.935	6.849	7.389	6.674	6.617
2	7.19	7.581	7.868	7.040	7.127	7.150	6.814	6.452
3	7.22	7.504	7.678	6.730	7.036	7.085	6.770	6.515
4	7.09	7.326	7.918	6.521	7.086	7.001	6.171	6.528
5	7.28	7.441	7.867	6.756	7.238	7.282	6.877	6.656
6	7.18	7.540	7.771	6.965	7.233	7.195	6.677	6.495
Mittelwert	7.171	7.461	7.832	6.825	7.095	7.184	6.755	6.544
BIAS %	9.809	14.255	19.931	4.510	8.650	10.010	3.443	0.212
SD	0.080	0.099	0.090	0.192	0.145	0.139	0.254	0.077
VK %	1.121	1.325	1.147	2.812	2.039	1.931	3.811	1.180

Anhang 22 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Coffein (QC 5 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
15	259,475	264,8446	225	3892,125	28,8326	67327,28	21025	170,1242	1891,259
63	272,744	267,3848	3969	17182,87	28,72086	74389,29	9409	0,051001	-21,9058
126	272,314	270,7188	15876	34311,56	2,544511	74154,91	1156	0,041684	6,941667
189	274,626	274,0529	35721	51904,31	0,328467	75419,44	841	4,442961	61,12717
252	275,588	277,3869	63504	69448,18	3,236086	75948,75	8464	9,423877	282,4247
315	280,362	280,7209	99225	88314,03	0,128841	78602,85	24025	61,52572	1215,794
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
15	259,475	18,1942	225	3892,125	58216,43	67327,28	21025	170,1242	1891,259
63	272,744	76,41563	3969	17182,87	38544,83	74389,29	9409	0,051001	-21,9058
126	272,314	152,8313	15876	34311,56	14276,12	74154,91	1156	0,041684	6,941667
189	274,626	229,2469	35721	51904,31	2059,263	75419,44	841	4,442961	61,12717
252	275,588	305,6625	63504	69448,18	904,4775	75948,75	8464	9,423877	282,4247
315	280,362	382,0782	99225	88314,03	10346,18	78602,85	24025	61,52572	1215,794

Anhang 23 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Coffein (QC 10 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
15	535,186	537,6945	225	8027,79	6,29255	286424,1	21025	35,32717	861,8317
63	537,954	538,8317	3969	33891,1	0,770279	289394,5	9409	10,08486	308,0397
126	544,489	540,3242	15876	68605,61	17,34574	296468,3	1156	11,28512	-114,217
189	543,881	541,8167	35721	102793,5	4,261331	295806,5	841	7,569835	79,78867
252	542,142	543,3092	63504	136619,8	1,362411	293917,9	8464	1,024819	93,13467
315	543,126	544,8017	99225	171084,7	2,808125	294985,9	24025	3,985347	309,4317
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)2$	$(y-Y)2$	$(x-X)(y-Y)$
15	535,186	35,76486	225	8027,79	249421,5	286424,1	21025	35,32717	861,8317
63	537,954	150,2124	3969	33891,1	150343,5	289394,5	9409	10,08486	308,0397
126	544,489	300,4248	15876	68605,61	59567,32	296468,3	1156	11,28512	-114,217
189	543,881	450,6372	35721	102793,5	8694,398	295806,5	841	7,569835	79,78867
252	542,142	600,8497	63504	136619,8	3446,589	293917,9	8464	1,024819	93,13467
315	543,126	751,0621	99225	171084,7	43237,41	294985,9	24025	3,985347	309,4317

Anhang 24 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Coffein (QC 20 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
15	1014,421	1018,27	225	15216,32	14,81519	1029050	21025	722,4627	3897,407
63	1037,211	1025,894	3969	65344,29	128,0825	1075807	9409	16,7172	396,6007
126	1033,488	1035,9	15876	130219,5	5,815905	1068097	1156	61,02214	265,5967
189	1034,139	1045,906	35721	195452,3	138,4526	1069443	841	51,27515	-207,659
252	1059,739	1055,912	63504	267054,2	14,64929	1123047	8464	340,009	1696,419
315	1068,8	1065,918	99225	336672	8,308621	1142333	24025	756,2683	4262,552
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)2$	$(y-Y)2$	$(x-X)(y-Y)$
15	1014,421	69,3272	225	15216,32	893202,3	1029050	21025	722,4627	3897,407
63	1037,211	291,1742	3969	65344,29	556570,9	1075807	9409	16,7172	396,6007
126	1033,488	582,3484	15876	130219,5	203526,9	1068097	1156	61,02214	265,5967
189	1034,139	873,5227	35721	195452,3	25797,6	1069443	841	51,27515	-207,659
252	1059,739	1164,697	63504	267054,2	11016,16	1123047	8464	340,009	1696,419
315	1068,8	1455,871	99225	336672	149824,1	1142333	24025	756,2683	4262,552

Anhang 25 Nachweis der Prozessstabilität über die absoluten Peakflächenverhältnisse bei der Bestimmung von Lidocain

Zeitpunkt der Injektion	28 min	70 min	112 min	154 min	196 min	238 min
Konzentration 0,5 mg/l						
Peakfläche	421,08	429,96	435,76	425,33	434,20	434,20
Peakfläche %	100,00	102,11	103,49	101,01	103,12	103,12
Konzentration 2,5 mg/l						
Peakfläche	1604,47	1695,77	1731,01	1736,16	1706,42	1757,38
Peakfläche %	100,00	105,69	107,89	108,21	106,35	109,53
Konzentration 5 mg/l						
Peakfläche	3168,78	3338,66	3338,33	3433,53	3307,86	3368,24
Peakfläche %	100,00	105,36	105,35	108,35	104,39	106,29

Anhang 26 Nachweis der Prozessstabilität über die absoluten Peakflächenverhältnisse bei der Bestimmung von 10-OH-Carbazepin, Lamotrigin, Levetiracetam und Gabapentin

10-OH-Carbazepin

Zeitpunkt der Injektion	19 min	63 min	126 min	189 min	252 min	315 min
Konzentration 4,69 mg/l						
Peakfläche absolut	385,675	425,119	434,661	485,347	496,612	427,962
Peakfläche %	100,00	110,23	112,70	125,84	128,76	110,96
Konzentration 23,7 mg/l						
Peakfläche absolut	1793,996	1807,875	1815,708	1879,569	1901,966	1930,567
Peakfläche %	100,00	100,77	101,21	104,77	106,02	107,61

Lamotrigin

Zeitpunkt der Injektion	19 min	63 min	126 min	189 min	252 min	315 min
Konzentration 2,87 mg/l						
Peakfläche absolut	505,323	511,307	519,999	517,755	541,359	577,293
Peakfläche %	100,00	101,18	102,90	102,46	107,13	114,24
Konzentration 14,2 mg/l						
Peakfläche absolut	2318,077	2587,594	2689,591	2623,774	2617,285	2689,591
Peakfläche %	100,00	111,63	116,03	113,19	112,91	116,03

Levetiracetam

Zeitpunkt der Injektion	19 min	63 min	126 min	189 min	252 min	315 min
Konzentration 9,73 mg/l						
Peakfläche absolut	23,578	23,677	24,457	25,925	26,872	27,553
Peakfläche %	100,00	100,42	103,73	109,95	113,97	116,86
Konzentration 23,2 mg/l						
Peakfläche absolut	46,08	51,291	50,568	53,454	53,67	54,449
Peakfläche %	100,00	111,31	109,74	116,00	116,47	118,16

Gabapentin

Zeitpunkt der Injektion	19 min	63 min	126 min	189 min	252 min	315 min
Konzentration 1,04 mg/l						
Peakfläche absolut	133,001	140,767	150,459	169,64	166,673	173,259
Peakfläche %	100,00	105,84	113,13	127,55	125,32	130,27
Konzentration 6,53 mg/l						
Peakfläche absolut	703,21	724,823	726,501	735,489	744,916	748,872
Peakfläche %	100,00	103,07	103,31	104,59	105,93	106,49

Anhang 27 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Lidocain (QC 0.5 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	421,075	425,2348	784	11790,1	17,30402	177304,2	11025	81,1831	946,0675
70	429,957	427,175	4900	30096,99	7,739789	184863	3969	0,016427	8,0745
112	435,756	429,1151	12544	48804,67	44,10162	189883,3	441	32,15835	-119,087
154	425,327	431,0552	23716	65500,36	32,81271	180903,1	441	22,64015	-99,9215
196	434,2	432,9954	38416	85103,2	1,451107	188529,6	3969	16,93185	259,2345
238	434,196	434,9355	56644	103338,6	0,546895	188526,2	11025	16,89895	431,6375
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	421,075	70,43408	784	11790,1	122949,1	177304,2	11025	81,1831	946,0675
70	429,957	176,0852	4900	30096,99	64450,89	184863	3969	0,016427	8,0745
112	435,756	281,7363	12544	48804,67	23722,06	189883,3	441	32,15835	-119,087
154	425,327	387,3875	23716	65500,36	1439,409	180903,1	441	22,64015	-99,9215
196	434,2	493,0386	38416	85103,2	3461,979	188529,6	3969	16,93185	259,2345
238	434,196	598,6897	56644	103338,6	27058,18	188526,2	11025	16,89895	431,6375

Anhang 28 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Lidocain (QC 2.5 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	1604,467	1647,938	784	44925,08	1889,686	2574314	11025	10146,97	10576,88
70	1695,766	1670,842	4900	118703,6	621,1968	2875622	3969	88,98463	594,2895
112	1731,005	1693,747	12544	193872,6	1388,171	2996378	441	665,941	-541,923
154	1736,16	1716,651	23716	267368,6	380,5818	3014252	441	958,5732	650,1775
196	1706,422	1739,556	38416	334458,7	1097,872	2911876	3969	1,495321	77,0385
238	1757,375	1762,461	56644	418255,3	25,86546	3088367	11025	2722,318	5478,463
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	1604,467	281,5418	784	44925,08	1750131	2574314	11025	10146,97	10576,88
70	1695,766	703,8544	4900	118703,6	983888,6	2875622	3969	88,98463	594,2895
112	1731,005	1126,167	12544	193872,6	365828,9	2996378	441	665,941	-541,923
154	1736,16	1548,48	23716	267368,6	35223,89	3014252	441	958,5732	650,1775
196	1706,422	1970,792	38416	334458,7	69891,69	2911876	3969	1,495321	77,0385
238	1757,375	2393,105	56644	418255,3	404152,6	3088367	11025	2722,318	5478,463

Anhang 29 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Lidocain (QC 5 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	3168,784	3254,466	784	88725,95	7341,356	10041192	11025	24685,59	16497,23
70	3338,656	3283,04	4900	233705,9	3093,181	11146624	3969	162,7028	-803,596
112	3338,332	3311,614	12544	373893,2	713,876	11144461	441	154,5422	-261,061
154	3433,531	3340,187	23716	528763,8	8713,017	11789135	441	11584,32	2260,24
196	3307,862	3368,761	38416	648341	3708,733	10941951	3969	325,3875	-1136,43
238	3368,238	3397,335	56644	801640,6	846,652	11345027	11025	1792,464	4445,437
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
28	3168,784	546,7138	784	88725,95	6875252	10041192	11025	24685,59	16497,23
70	3338,656	1366,784	4900	233705,9	3888278	11146624	3969	162,7028	-803,596
112	3338,332	2186,855	12544	373893,2	1325899	11144461	441	154,5422	-261,061
154	3433,531	3006,926	23716	528763,8	181992,1	11789135	441	11584,32	2260,24
196	3307,862	3826,996	38416	648341	269500,4	10941951	3969	325,3875	-1136,43
238	3368,238	4647,067	56644	801640,6	1635404	11345027	11025	1792,464	4445,437

Anhang 30 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von 10-OH-Carbazepin (QC 4.67 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	385.675	411.6139	361	7327.825	672.8275	148745.2	20069.44	3236.207	8059.086
63	425.119	421.2262	3969	26782.5	15.15362	180726.2	9538.778	304.2815	1703.665
126	434.661	434.9893	15876	54767.29	0.107798	188930.2	1201.778	62.43634	273.9244
189	485.347	448.7524	35721	91730.58	1339.164	235561.7	802.7778	1830.499	1212.223
252	496.612	462.5155	63504	125146.2	1162.571	246623.5	8341.778	2921.33	4936.506
315	427.962	476.2786	99225	134808	2334.494	183151.5	23818.78	213.1795	-2253.37
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	385.675	38.28245	361	7327.825	120681.6	148745.2	20069.44	3236.207	8059.086
63	425.119	126.9365	3969	26782.5	88912.79	180726.2	9538.778	304.2815	1703.665
126	434.661	253.8731	15876	54767.29	32684.28	188930.2	1201.778	62.43634	273.9244
189	485.347	380.8096	35721	91730.58	10928.07	235561.7	802.7778	1830.499	1212.223
252	496.612	507.7461	63504	125146.2	123.9687	246623.5	8341.778	2921.33	4936.506
315	427.962	634.6827	99225	134808	42733.43	183151.5	23818.78	213.1795	-2253.37

Anhang 31 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von 10-OH-Carbazepin (QC 23.2 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	1793.996	1785.516	361	34085.92	71.902	3218422	20069.44	3715.004	8634.701
63	1807.875	1807.081	3969	113896.1	0.630847	3268412	9538.778	2215.757	4597.349
126	1815.708	1837.957	15876	228779.2	495.01	3296796	1201.778	1539.686	1360.28
189	1879.569	1868.833	35721	355238.5	115.2638	3532780	802.7778	606.2511	697.6281
252	1901.966	1899.709	63504	479295.4	5.094136	3617475	8341.778	2210.802	4294.417
315	1930.567	1930.585	99225	608128.6	0.000326	3727089	23818.78	5718.41	11670.71
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	1793.996	158.0979	361	34085.92	2676163	3218422	20069.44	3715.004	8634.701
63	1807.875	524.2193	3969	113896.1	1647772	3268412	9538.778	2215.757	4597.349
126	1815.708	1048.439	15876	228779.2	588702.2	3296796	1201.778	1539.686	1360.28
189	1879.569	1572.658	35721	355238.5	94194.37	3532780	802.7778	606.2511	697.6281
252	1901.966	2096.877	63504	479295.4	37990.42	3617475	8341.778	2210.802	4294.417
315	1930.567	2621.097	99225	608128.6	476831.2	3727089	23818.78	5718.41	11670.71

Anhang 32 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Lamotrigin (QC 2.87 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	505.323	498.5	361	9601.137	46.5532	255351.3	20069.44	553.0179	3331.481
63	511.307	507.923	3969	32212.34	11.45114	261434.8	9538.778	307.3827	1712.325
126	519.999	521.4151	15876	65519.87	2.005403	270399	1201.778	78.15149	306.4649
189	517.755	534.9072	35721	97855.7	294.1979	268070.2	802.7778	122.8624	-314.056
252	541.359	548.3993	63504	136422.5	49.56545	293069.6	8341.778	156.7421	1143.463
315	577.293	561.8913	99225	181847.3	237.2108	333267.2	23818.78	2347.758	7478.016
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	505.323	45.48568	361	9601.137	211450.4	255351.3	20069.44	553.0179	3331.481
63	511.307	150.8209	3969	32212.34	129950.2	261434.8	9538.778	307.3827	1712.325
126	519.999	301.6419	15876	65519.87	47679.83	270399	1201.778	78.15149	306.4649
189	517.755	452.4628	35721	97855.7	4263.066	268070.2	802.7778	122.8624	-314.056
252	541.359	603.2838	63504	136422.5	3834.679	293069.6	8341.778	156.7421	1143.463
315	577.293	754.1047	99225	181847.3	31262.39	333267.2	23818.78	2347.758	7478.016

Anhang 33 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Lamotrigin (QC 14.2 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	2318.077	2467.42	361	44043.46	22303.4	5373481	20069.44	72670.68	38189.79
63	2587.594	2504.763	3969	163018.4	6861.006	6695643	9538.778	0.003364	5.664667
126	2689.591	2558.231	15876	338888.5	17255.56	7233900	1201.778	10391.56	-3533.89
189	2623.774	2611.698	35721	495893.3	145.8213	6884190	802.7778	1304.799	1023.457
252	2617.285	2665.166	63504	659555.8	2292.602	6850181	8341.778	878.1147	2706.481
315	2689.591	2718.634	99225	847221.2	843.4896	7233900	23818.78	10391.56	15732.59
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	2318.077	221.4611	361	44043.46	4395798	5373481	20069.44	72670.68	38189.79
63	2587.594	734.3183	3969	163018.4	3434631	6695643	9538.778	0.003364	5.664667
126	2689.591	1468.637	15876	338888.5	1490730	7233900	1201.778	10391.56	-3533.89
189	2623.774	2202.955	35721	495893.3	177088.7	6884190	802.7778	1304.799	1023.457
252	2617.285	2937.273	63504	659555.8	102392.4	6850181	8341.778	878.1147	2706.481
315	2689.591	3671.591	99225	847221.2	964324.8	7233900	23818.78	10391.56	15732.59

Anhang 34 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Levetiracetam (QC 9.73 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	23.578	23.25402	361	447.982	0.104962	555.9221	20069.44	3.117579	250.1361
63	23.677	23.90304	3969	1491.651	0.051095	560.6003	9538.778	2.777778	162.7778
126	24.457	24.83232	15876	3081.582	0.140864	598.1448	1201.778	0.786178	30.73778
189	25.925	25.7616	35721	4899.825	0.026701	672.1056	802.7778	0.337948	16.47111
252	26.872	26.69087	63504	6771.744	0.032807	722.1044	8341.778	2.335803	139.5878
315	27.553	27.62015	99225	8679.195	0.004509	759.1678	23818.78	4.881154	340.9738
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	23.578	2.204685	361	447.982	456.8186	555.9221	20069.44	3.117579	250.1361
63	23.677	7.310271	3969	1491.651	267.8698	560.6003	9538.778	2.777778	162.7778
126	24.457	14.62054	15876	3081.582	96.75589	598.1448	1201.778	0.786178	30.73778
189	25.925	21.93081	35721	4899.825	15.95352	672.1056	802.7778	0.337948	16.47111
252	26.872	29.24109	63504	6771.744	5.612564	722.1044	8341.778	2.335803	139.5878
315	27.553	36.55136	99225	8679.195	80.97042	759.1678	23818.78	4.881154	340.9738

Anhang 35 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Levetiracetam (QC 23.2 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	46.08	48.18826	361	875.52	4.444778	2123.366	20069.44	30.3087	779.9222
63	51.291	49.24335	3969	3231.333	4.192855	2630.767	9538.778	0.086632	28.74656
126	50.568	50.75405	15876	6371.568	0.034615	2557.123	1201.778	1.034967	35.26756
189	53.454	52.26475	35721	10102.81	1.414322	2857.33	802.7778	3.491915	52.94556
252	53.67	53.77544	63504	13524.84	0.011118	2880.469	8341.778	4.345835	190.3996
315	54.449	55.28614	99225	17151.44	0.700804	2964.694	23818.78	8.200587	441.9592
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	46.08	4.453994	361	875.52	1732.724	2123.366	20069.44	30.3087	779.9222
63	51.291	14.76851	3969	3231.333	1333.893	2630.767	9538.778	0.086632	28.74656
126	50.568	29.53701	15876	6371.568	442.3024	2557.123	1201.778	1.034967	35.26756
189	53.454	44.30552	35721	10102.81	83.69468	2857.33	802.7778	3.491915	52.94556
252	53.67	59.07403	63504	13524.84	29.20351	2880.469	8341.778	4.345835	190.3996
315	54.449	73.84253	99225	17151.44	376.1092	2964.694	23818.78	8.200587	441.9592

Anhang 36 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Gabapentin (QC 1.04 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	133.001	135.7228	361	2527.019	7.40822	17689.27	20069.44	512.215	3206.224
63	140.767	141.9067	3969	8868.321	1.298982	19815.35	9538.778	221.0029	1451.929
126	150.459	150.761	15876	18957.83	0.091194	22637.91	1201.778	26.772	179.3711
189	169.64	159.6152	35721	32061.96	100.4958	28777.73	802.7778	196.1914	396.8603
252	166.673	168.4695	63504	42001.6	3.227392	27779.89	8341.778	121.8779	1008.305
315	173.259	177.3237	99225	54576.59	16.52219	30018.68	23818.78	310.67	2720.254
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	133.001	13.81564	361	2527.019	14205.15	17689.27	20069.44	512.215	3206.224
63	140.767	45.80976	3969	8868.321	9016.877	19815.35	9538.778	221.0029	1451.929
126	150.459	91.61952	15876	18957.83	3462.084	22637.91	1201.778	26.772	179.3711
189	169.64	137.4293	35721	32061.96	1037.531	28777.73	802.7778	196.1914	396.8603
252	166.673	183.239	63504	42001.6	274.4337	27779.89	8341.778	121.8779	1008.305
315	173.259	229.0488	99225	54576.59	3112.502	30018.68	23818.78	310.67	2720.254

Anhang 37 Lineare Regressionsanalyse zum Nachweis der Prozessstabilität von Gabapentin (QC 6.53 mg/l)

Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = a + bx$	x^2	$x \cdot y$	Δy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	703.21	710.9699	361	13360.99	60.21645	494504.3	20069.44	752.1398	3885.232
63	724.823	717.0777	3969	45663.85	59.98939	525368.4	9538.778	33.78128	567.6549
126	726.501	725.823	15876	91539.13	0.459729	527803.7	1201.778	17.09133	143.3178
189	735.489	734.5682	35721	139007.4	0.847845	540944.1	802.7778	23.5597	137.5253
252	744.916	743.3135	63504	187718.8	2.568125	554899.8	8341.778	203.9422	1304.316
315	748.872	752.0587	99225	235894.7	10.15513	560809.3	23818.78	332.5821	2814.551
Zeit (min)	Peakfläche absolut	$y^* = cx$	x^2	$x \cdot y$	Dy^2	y^2	$(x-X)^2$	$(y-Y)^2$	$(x-X)(y-Y)$
19	703.21	61.97183	361	13360.99	411186.4	494504.3	20069.44	752.1398	3885.232
63	724.823	205.4856	3969	45663.85	269711.4	525368.4	9538.778	33.78128	567.6549
126	726.501	410.9711	15876	91539.13	99559.12	527803.7	1201.778	17.09133	143.3178
189	735.489	616.4567	35721	139007.4	14168.7	540944.1	802.7778	23.5597	137.5253
252	744.916	821.9422	63504	187718.8	5933.036	554899.8	8341.778	203.9422	1304.316
315	748.872	1027.428	99225	235894.7	77593.31	560809.3	23818.78	332.5821	2814.551

Anhang 38 Kalibriergerade für die Bestimmung der Nachweisgrenze von Lidocain

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.05	13.241
2	0.05	12.741
3	0.1	19.565
4	0.1	20.821
5	0.5	80.826
6	0.5	81.432
7	1	145.768
8	1	146.843

Anhang 39 Kalibriergerade für die Bestimmung der Nachweisgrenze von 10-OH-Carbazepin

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.033	8.456
2	0.033	8.160
3	0.066	11.057
4	0.066	12.008
5	0.164	19.624
6	0.164	19.602
7	0.328	21.428
8	0.328	22.994

Anhang 40 Kalibriergerade für die Bestimmung der Nachweisgrenze von Lamotrigin

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.024	2.628
2	0.024	2.483
3	0.047	5.771
4	0.047	5.807
5	0.118	17.933
6	0.118	18.391
7	0.235	23.825
8	0.235	23.621

Anhang 41 Kalibriergerade für die Bestimmung der Nachweisgrenze von Levetiracetam

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.205	2.550
2	0.205	2.812
3	0.410	3.370
4	0.410	3.001
5	0.820	8.578
6	0.820	8.449
7	2.050	24.941
8	2.050	20.721

Anhang 42 Kalibriergerade für die Bestimmung der Nachweisgrenze von Gabapentin

	Standard Konzentration [mg/l]	Absolute Peakfläche
1	0.046	6.872
2	0.046	7.101
3	0.092	9.493
4	0.092	8.876
5	0.184	23.818
6	0.184	24.201
7	0.460	57.850
8	0.460	57.833

Anhang 43 Nachweis der Linearität der Quantifizierung von Pregabalin im Serum

Messung	0.05 mg/l	0.1 mg/l	0.5 mg/l	1 mg/l	2.5 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
1	0.035	0.087	0.58	1.089	2.8	4.888	9.818
2	0.037	0.094	0.584	1.109	2.727	4.887	9.744
3	0.039	0.09	0.592	1.049	2.651	4.896	10.066
4	0.039	0.093	0.593	1.113	2.774	4.965	9.508
5	0.038	0.087	0.583	1.05	2.779	4.977	9.894
6	0.037	0.091	0.594	1.107	2.617	4.942	9.544
Mittelwert	0.0375	0.0903	0.5877	1.0862	2.7247	4.9258	9.7623
SD	0.0015	0.0029	0.0060	0.0296	0.0750	0.0406	0.2123
Varianz	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0056	0.0017	0.0451
VK %	4.0533	3.2546	1.0244	2.7224	2.7508	0.8242	2.1746

Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
2-Amino-5-chlorbenzophenon	C13H10ClNO	15,47	
2-Amino-5-Chlorpyridin	C5H5N2Cl	2,53	
4-Aminobenzoic acid	C7H7O2N	3,79	
4-Aminosalicylohydrazid	C7H9N3O2	2,14	f:110.0606
4-Fluormethcathinon	C10H12FNO	4,38	f:148.0533
5-Bromsalicylisopropylamid	C10H12O2NBr	13,95	
5-Carboxybutupranol	C14H20O4NCI	8,83	f:131.0946
7-amino desmethylflunitrazepam,121.0850	C15H12ON3F	5,01	f:226.0781
7-Amino-Flunitrazepam,227.1040	C16H14ON3F	8,04	f:227.0985
8-Hydroxychinolin	C9H7NO	2,47	
3.4-MDA,135.0446	C10H13NO2	5,07	f:163.0759
3.4-MDE (3,4-Methylendioxy-N-ethylamphetamin),163.0759	C12H17NO2	5,58	f:135.0446
3.4-MDMA,163.0446	C11H15NO2	5,13	f:135.0446
Abacavir	C14H18ON6	5,85	f:191.1045
Acarbose	C25H43NO18	0,94	f:304.1396
Acebutolol	C18H28N2O4	7,35	f:319.2022
Aceclidin	C9H15NO2	2,33	
Aceprometazine,282.0953	C19H22N2OS	11,00	f:240.0483
Acetiamin	C16H22N4O4S	5,63	
Acetopromazine	C19H22ON2S	11,35	
Acetylmethionin	C7H13O3NS	4,33	
Acetylsulfametoxyypyridazin	C13H14N4O4S	8,37	
Acipimox	C6H6N2O3	2,20	f:110.0468
Aclarubicin	C42H53NO15	14,57	f:570.2339
Acetylmethionin	C7H13O3NS	4,33	
Acetylsulfametoxyypyridazin	C13H14N4O4S	8,37	
Acipimox	C6H6N2O3	2,20	f:110.0468
Aclarubicin	C42H53NO15	14,57	f:570.2339
Aconitine	C34H47O11N	11,25	
Actinoquinol	C11H11NO4S	3,37	f:226.0174
Acyclovir	C8H11N5O3	2,51	f:152.0586
Adeptolon	C17H22N3Br	15,90	
Adrenalon	C9H11O3N	1,83	f:164.0712
Aesculin	C15H16O9	5,00	f:179.0344

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Ajmaline	C20H26N2O2	7,72	f:309.1967
Alachlor,162.1283	C14H20NO2Cl	15,74	f:238.0999
Alfaxalone	C21H32O3	15,72	f:279.2324
Alfuzosin	C19H27N5O4	8,69	f:156.1025
Alimemazine	C18H22N2S	11,65	f:212.0534
Alizapride,124.1126	C16H21N5O2	4,90	f:176.0460
Alloxydim	C17H25NO5	16,18	f:206.1181
Allelestrenol - NEG	C21H32O	19,08	
Almitrine	C26H29N7F2	16,21	f:276.1937
Aloin,257.0814	C21H22O9	11,66	f:239.0708
Alprazolam	C17H13N4Cl	13,07	f:282.0741
Alprenolol	C15H23NO2	9,97	f:232.1701
Alverine	C20H27N	11,46	f:164.1439
Alypin	C16H26O2N2	8,17	f:112.1126
Amantadin	C10H17N	6,50	f:135.1174
Ambazon	C8H11N7S	4,74	f:221.0609
Ambroxol	C13H18ON2Br2	8,67	f:261.8867
Ambucetamide	C17H28N2O2	8,59	
Amcinonide,465.2231	C28H35O7F	16,81	f:339.1579
Ametryne	C9H17N5S	12,19	f:186.0813
Amezinium	C11H12N3O	5,49	f:186.0667
Amfepramon	C13H19NO	5,14	f:100.1126
Amidithion	C7H16NO4PS2	9,37	f:170.9703
Amidosulfuron,154.0617	C9H15N5O7S2	12,38	f:182.0566
Amiloride	C6H8N7OCl	4,44	f:161.0230
Aminocarb	C11H16N2O2	3,47	f:152.1075
Aminoglutethimid,188.1075	C13H16O2N2	5,13	f:203.0821
Aminophenazone	C13H17N3O	4,19	f:117.0578
Amiphenazol	C9H9N3S	4,15	f:116.0500
Amisulpride	C17H27N3O4S	5,42	f:242.0487
Amitriptyline	C20H23N	11,99	f:205.1017
Amitriptylinoxide	C20H23NO	12,41	f:233.1330
Amitrole	C2H4N4	0,85	
Amlodipin	C20H25N2O5Cl	12,27	f:377.1268
Ammoidin	C12H8O4	11,21	f:202.0266
Amorolfine,130.1232	C21H35NO	13,80	f:161.1330

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Amoxapin	C17H16N3OCl	11,28	f:271.0638
Amphetamin	C9H13N	4,79	f:119.0861
Amphotericin B	C47H73NO17	15,78	f:419.2434
Amprenavir	C25H35O6N3S	13,06	f:245.1639
Amrinone	C10H9N3O	2,16	
Amsacrine	C21H19N3O3S	9,40	f:315.1372
Amylocain	C14H21NO2	8,49	f:114.1283
Anastrazol;266.1531;226.1344;225.1392	C17H19N5	10,61	f:267.1735
Anetholtrithion	C10H8OS3	15,68	
Anilofos,170.9703	C13H19NO3PS2Cl	16,41	f:198.9652
Antazoline,174.1031	C17H19N3	9,62	f:196.1126
Antu	C11H10N2S	8,94	f:127.0548
Apomorphine	C17H17NO2	5,82	f:237.0916
Apovincamine	C21H24N2O2	10,12	f:308.1525
Apraclonidin	C9H10N4Cl2	3,22	f:209.0594
Aprinidin,114.1283	C22H30N2	11,77	f:222.1283
Aripiprazol	C23H27N3O2Cl2	11,83	f:285.0925
Articaine	C13H20N2O3S	6,82	
Astemizole,325.1828	C28H31N4OF	8,85	f:218.1545
Asulam	C8H10N2O4S	4,18	f:156.0119
Atenolol	C14H22O3N2	3,55	f:190.0868
Atorvastatin	C33H35N2O5F	15,61	f:466.2030
Atraton	C9H17N5O	9,41	f:170.1042
Atrazindesethyl	C6H10N5Cl	8,71	f:146.0233
Atrazine	C8H14N5Cl	12,80	
Atropin;260.1651;142.1232	C17H23NO3	5,91	f:124.1126
Azaperone	C19H22N3OF	6,94	f:165.0716
Azapropazone	C16H20N4O2	10,90	f:189.1140
Azatadine	C20H22N2	6,71	f:260.1439
Azelastine	C22H24N3OCl	11,56	f:112.1126
Azintamid,186.9733	C10H14N3OSCl	10,18	f:158.9784
Aziprotryne	C7H11N7S	14,78	f:156.0344
Azithromycin,416.3012	C38H72N2O12	8,87	f:158.1181
Azoluron	C12H14N4O	10,37	f:138.0667
Azopropazon	C16H20N4O2	10,54	
Bacampicillin,186.0589,202.0980	C21H27O7N3S	11,39	f:276.0906

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Baclofen	C10H12NO2Cl	5,22	f:154.0424
Bambuterol	C18H29O5N3	8,56	f:312.1559
Bamethan,192.1388	C12H19NO2	4,27	f:136.0762
Bamifylline,368.2073	C20H27N5O3	7,58	f:297.1393
Bamipin	C19H24N2	11,10	f:210.1283
Barverin,174.1283	C29H43O3N5	8,26	f:112.1126
BDB	C11H15NO2	6,35	f:135.0446
Befunolol	C16H21NO4	7,46	f:177.0552
Benactyzin	C20H25NO3	9,26	
Benazepril,190.0868	C24H28O5N2	12,30	f:351.1709
Bencyclan	C19H31ON	13,19	f:104.1075
Bendamustine	C16H21N3O2Cl2	9,48	f:322.1322
Bendroflumethiazid	C15H14N3O4S2F3	11,07	f:270.9785
Benerazid	C10H15N3O5	0,92	
Benfluorex	C19H20NO2F3	11,87	f:230.1157
Benfotiamin	C19H23N4O6PS	7,04	f:220.0783
Benorylate BP	C17H15O5N	12,25	f:121.0290
Benoxacor	C11H11NO2Cl2	13,78	f:149.0841
Benoxyprofen	C16H12NO3Cl	16,76	f:256.0529
Benoxyprofen	C16H12NO3Cl	16,76	f:256.0529
Benperidol	C22H24N3O2F	9,25	f:165.0716
Benproperine.183.0810	C21H27NO	12,35	f:126.1283
Bensultap.150.0411	C17H21NO4S4	12,84	f:290.0343
Bentazon	C10H12N2O3S	12,61	
Bentiramid	C23H20N2O5	11,91	f:240.1025
Bezafibrat.276.0791	C19H20O4NCI	14,56	f:138.9951
Benzarone.121.0290	C17H14O3	15,81	f:173.0603
Benzatropine,140.1075	C21H25NO	11,73	f:167.0861
Benzobarbital	C19H16O4N2	19,43	
Benzocain	C9H11NO2	9,70	f:120.0449
Benzocetamin	C18H19N	9,93	f:191.0861
Benzoximate	C18H18O5NCI	16,85	f:242.0584
Benzoylecgonin,105.0340,272.1287	C16H19NO4	6,83	f:168.1025
Benzquinamid	C22H32N2O5	6,90	f:272.1287
Benzydamine	C19H23N3O	11,11	f:265.1341

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Benzylhydrochlorothiazide,252.9508	C14H14N3O4S2Cl	10,09	f:370.9927
Benzylnicotinate	C13H11O2N	13,37	f:170.0970
Berberine	C20H18NO4	9,18	f:322.1079
Betahistine	C8H12N2	0,93	
Betamethason-17-valerat	C27H37O6F	16,31	
Betamethasone-17,21-dipropiona	C28H37O7F	17,03	
Betanidin	C10H15N3	4,97	
Betaxolol,116.1075	C18H29NO3	10,12	f:266.1756
Betazole	C5H9N3	0,95	
Bevonium	C22H28O3N	8,99	f:144.1388
Bicyclophenamin	C20H27NO2	12,14	f:171.1174
Bifonazole	C22H18N2	12,93	f:243.1174
Bioallethrin	C19H26O3	18,18	f:135.0810
Biperiden	C21H29NO	11,32	
Bisacodyl	C22H19NO4	13,00	f:226.0888
Bisbentiamin,235.1017,124.0875	C38H42O6N8S2	10,57	f:357.1385
Bisoprolol,222.1494	C18H31NO4	9,22	f:116.1075
Boldine	C19H21NO4	5,92	f:297.1127
Bornaprin,257.1542	C21H31O2N	12,53	f:114.1283
Brimonidine	C11H10N5Br	3,24	
Brinzolamid	C12H21O5N3S3	5,66	f:282.9881
Bromazepam	C14H10N3OBr	11,37	f:261.0027
Bromazine	C17H20ONBr	11,95	f:244.9966
Bromhexin,261.8867	C14H20N2Br2	11,26	f:114.1283
Bromocriptin	C32H40N5O5Br	12,56	f:346.0555
Bromopride	C14H22N3O2Br	6,63	f:227.9604
Bromopyramin	C16H20N3Br	10,62	f:168.9653
Bromperidol	C21H23NO2Br	10,92	
Brompheniramin,245.9918	C16H19N2Br	9,31	f:274.0231
Brucine	C23H26N2O4	6,18	f:367.1658
Buclosamid	C11H14NO2Cl	15,57	f:154.9900
Budesonid,323.1647	C25H34O6	15,69	f:227.1480
Budipin	C21H27N	10,34	f:160.1126
Bufexamac	C12H17NO3	12,27	f:107.0497
Buflomedil,195.0657	C17H25NO4	7,09	f:237.1127

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Bufofenine	C12H16ON2	2,82	f:160.0762
Bumetanid,242.0817	C17H20O5N2S	13,76	f:284.1287
Bunazosin	C19H27O3N5	8,69	f:304.1773
Bunitrolol,120.0449	C14H20O2N2	7,00	f:164.0712
Buphenine	C19H25NO2	9,00	f:150.0898
Bupirimate, 208.14503	C13H24O3N4S	14,97	f:166.0980
Bupivacaine	C18H28N2O	9,19	f:140.1426
Bupranolol,216.0791	C14H22NO2Cl	10,47	f:155.0274
Buprenorphine	C29H41NO4	10,76	
Buprofezin,106.0657	C16H23ON3S	17,78	f:208.0545
Buspirone	C21H31N5O2	8,82	f:222.1481
Butaclamol	C25H31ON	12,11	f:344.2378
Butalamine	C18H28N4O	11,00	f:188.0780
Butamirat	C18H29NO3	10,38	f:191.1069
Butanilicaine	C13H19N2OCl	7,79	
Butaperazine	C24H31ON3S	14,03	f:141.1392
Butetamat,119.0861	C16H25NO2	9,48	f:191.1072
Butinolin	C20H21ON	9,84	f:205.1017
Butizid	C11H16N3O4S2Cl	10,12	f:337.0084
Butoxycain,177.0916	C17H27O3N	11,42	f:221.1170
Butoxycarboxim	C7H14N2O4S	4,65	
Buturon	C12H13ON2Cl	13,13	f:128.0267
Butylbiguanid	C6H15N5	2,60	
Cabral,103.0548	C13H14N2O	5,14	f:119.0609
Cafaminol-	C11H17N5O3	8,04	f:222.0991
Cafedrin	C18H23O3N5	7,24	f:207.0882
Camylofin	C19H32O2N2	11,88	f:100.1126
Candesartan,207.0770	C24H20O3N6	13,73	f:267.1134
Cannabidiol	C21H30O2	18,22	f:259.1698
Capecitabin,174.0315	C15H22O6N3F	12,06	f:244.1097
Captodiam	C21H29NS2	14,74	
Captopril	C9H15NO3S	7,52	f:116.0712
Carazolol,116.1075	C18H22O2N2	8,47	f:184.0762
Carbamazepine	C15H12N2O	12,06	f:194.0970
Carbamazepinepoxid	C15H12N2O2	10,01	f:210.0919

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Carbaryl	C12H11NO2	11,74	f:145.0694
Carbendazim	C9H9N3O2	5,29	f:132.0562
Carbinoxamin	C16H19ON2Cl	8,80	f:202.0424
Carbocromen	C20H27O5N	8,83	f:289.1076
Carbromid	C6H12NOBr	10,33	
Carbuterol	C13H21O3N3	3,20	f:177.0664
Carteolol	C16H24O3N2	5,53	f:164.0712
Carvedilol,184.0762	C24H26O4N2	10,91	f:224.1287
Cathin	C9H13NO	3,77	
Cefetamet	C14H15O5N5S2	6,41	f:227.0127
Cefotaxim	C16H17N5O7S2	6,50	f:324.0589
Celiprolol,277.1552	C20H33N3O4	8,41	f:307.2465
Cephalexin	C16H17N3O4S	6,18	f:158.0272
Cephradin	C16H19N3O4S	6,87	f:158.0276
Cerivastatin	C26H34O5NF	16,75	f:356.2026
Chelidonin	C20H19NO5	8,01	f:295.0970
Chinin	C20H24N2O2	7,04	
Chinidin	C20H24N2O2	6,44	f:160.0762
Chinophen	C16H11O2N	12,52	
Chlorbenzoxamin,233.1654	C27H31N2OCl	14,43	f:201.0476
Chlorcyclizin	C18H21N2Cl	11,99	f:201.0471
Chlordiazepoxide	C16H14N3OCl	10,04	
Chlordimeform	C10H13N2Cl	5,75	f:152.0267
Chlorhexidin,170.0485,336.1703	C22H30N10Cl2	10,34	f:153.0220
Chlormezanon	C11H12NO3SCl	9,57	
Chlormidazol	C15H13N2Cl	9,95	f:125.0158
Chlorochin (Chloroquin),179.0376	C18H26N3Cl	4,61	f:247.1002
Chloropyramine,125.0158	C16H20N3Cl	10,18	f:245.0846
Chlorphenamin,202.0404	C16H19N2Cl	8,80	f:230.0737
Chlorphencyclan	C18H28ONCl	13,08	f:193.0784
Chlorphenethazin	C16H17N2CIS	12,10	f:232.0008
Chlorphenoxamin	C18H22ONCl	12,33	
Chlorphentermin	C10H14NCI	8,30	f:125.0158
Chlorpromazin	C17H19N2CIS	12,77	f:246.0165
Chlorprothixen	C18H18NCIS	12,91	f:245.0192

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Chlorquinaldol	C10H7ONCl2	16,47	f:193.0294
Chlortoluron	C10H13ON2Cl	12,50	
Ciclacillin	C15H23O4N3S	9,51	f:160.0432
Cicletanin	C14H12O2NCI	9,26	f:232.0529
Cimetidine,95.0609	C10H16N6S	3,68	f:159.0704
Cinchocain,172.0399	C20H29O2N3	12,18	f:271.1447
Cinchonidin	C19H22ON2	6,15	f:277.1705
Cinchonin	C19H22ON2	5,74	
Cinnarizin	C26H28N2	13,38	f:167.0861
Cisapride,234.1294	C23H29O4N3ClF	10,54	f:184.0165
Citalopram,109.0454	C20H21ON2F	9,92	f:238.0668
Citalopram	C20H21N2OF	9,98	f:238.0668
Clarithromycin,158.1181	C38H69O13N	13,40	f:590.3904
Clemastin	C21H26ONCl	13,36	f:215.0628
Clemizol	C19H20N3Cl	11,12	f:255.0689
Clenbuterol	C12H18ON2Cl2	6,89	f:167.0372
Clibucain	C15H20ON2Cl2	9,07	f:112.1134
Clidinium	C22H26O3N	8,94	f:142.1232
Climbazol	C15H17O2N2Cl	12,24	f:128.0029
Clindamycin	C18H33O5N2ClS	10,20	f:126.1283
Clobazam	C16H13N2O2Cl	12,69	f:259.0592
Clofazimin	C27H22N4Cl2	14,90	f:431.0830
Clofenciclan	C18H28NOCl	13,04	f:151.0315
Clofenetamin	C20H26ONCl	12,81	f:215.0628
Clofexamid,118.1232	C14H21O2N2Cl	7,69	f:193.0784
Clofibrate	C12H15O3Cl	16,35	
Clomethiazol,112.0221	C6H8NSCl	9,73	f:126.0377
Clomipramine	C19H23N2Cl	12,94	f:242.0706
Clonazepam,270.0560	C15H10N3O3Cl	12,16	f:303.0536
Clonidin	C9H9N3Cl2	4,45	f:194.0485
Clopamid	C14H20N3O3SCl	9,71	f:217.9679
Clopenthixol	C22H25N2OSCl	13,74	f:273.0505
Clopidogrel	C16H16O2NCIS	15,63	f:185.0369
Clorexolon	C14H17O3N2ClS	11,69	f:247.9944
Clotiapin	C18H18N3ClS	12,05	f:287.0410

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Clotiazepam	C16H15N2OSCl	14,69	f:275.0410
Clozapine	C18H19N4Cl	9,84	f:270.0798
Clozapin-N-Oxid	C18H19N4OCl	10,67	f:244.0642
Cocaine,243.1259	C17H21NO4	7,15	f:182.1181
Codeine	C18H21NO3	3,97	f:241.0865
Coffein	C8H10O2N4	6,18	f:138.0667
Cotinin	C10H12N2O	2,26	
Crimidin	C7H10N3Cl	8,22	f:136.0875
Crotamiton	C13H17NO	14,21	f:106.0657
Cyamemazine	C19H21N3S	11,38	f:237.0486
Cyanazin	C9H13N6Cl	10,65	f:214.0859
Cyclizin	C18H22N2	10,38	f:167.0861
Cyclobenzaprin,205.1017	C20H21N	11,64	f:231.1174
Cyclodrin,236.1651	C19H29O3N	9,73	f:163.1651
Cyclopentolat	C17H25O3N	9,15	f:157.1017
Cycluron	C11H22ON2	13,26	
Cyproheptadin,245.1330	C21H21N	11,72	f:191.0861
Cyromazin	C6H10N6	2,48	
Cytarabin	C9H13N3O5	1,83	f:112.0511
Cytidin	C9H13O5N3	0,96	f:112.0511
Dacarbazine	C6H10N6O	3,00	
Daphnetin	C9H6O4	6,75	f:133.0290
Dapiprazole	C19H27N5	6,68	f:189.1392
Daunorubicin	C27H29NO10	13,11	f:363.0869
Deferoxamine,319.23453	C25H48N6O8	6,99	f:443.2506
Demelverin	C17H21N	9,29	f:105.0704
Demeton-O-methyl	C6H15O3S2P	0,94	
Denaverine,239.1072	C24H33NO3	15,16	f:282.1494
Depropine	C23H27NO	12,73	
Desipramin	C18H22N2	11,85	f:208.1126
Dexamethasone trimethylacetate	C27H37O6F	17,24	
Dexfenfluramine	C12H16NF3	8,75	f:159.0422
Dexketoprofen,105.0340	Dexketoprofen	13,74	f:209.0966
Dexpanthenol	C9H19NO4	3,91	f:188.1287
Dextromethorphan,213.1279	C18H25NO	9,94	f:215.1436

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Dextromoramid	C25H32O2N2	11,68	f:306.1858
Dextropropoxyphen	C22H29O2N	11,58	f:266.1909
Diaveridin	C13H16N4O2	5,03	f:245.1039
Diazepam,228.0656	C16H13N2OCl	14,30	f:257.0846
Dibenzepin	C18H21ON3	8,59	f:251.1184
Dicyclanil	C8H10N6	3,48	f:151.0732
Dicycloverine,165.1643	C19H35NO2	13,85	f:237.1855
Dienogest	C20H25NO2	12,80	f:161.0966
Diethazin,100.1126,226.0690	C18H22N2S	11,50	f:198.0377
Difenidol,207.1174	C21H27NO	10,06	f:292.2065
Difenofoxuron	C16H18N2O3	13,19	f:214.0868
Difenzozate	C17H17N2	8,25	
Dihexyverine,155.1072	C20H35NO2	14,00	f:165.1643
Dihydrocodeine	C18H23NO3	3,93	
Dihydroergocristine	C35H41N5O5	11,57	f:270.1606
Dihydroergotamin	C33H37O5N5	10,73	f:270.1606
Dihyprylon	C9H15O2N	6,67	
Diisopromine,167.0861	C21H29N	11,27	f:254.1909
Dilazep	C31H44N2O10	9,82	f:310.1654
Diltiazem,370.1113	C22H26O4N2S	11,01	f:178.0327
Dimefuron	C15H19N4O3Cl	13,82	
Dimetacrine	C20H26N2	12,56	
Dimethylamphetamine	C11H17N	4,90	f:132.0813
Dimethachlor	C13H18NO2Cl	13,54	f:148.1126
Dimethametryn	C11H21N5S	14,81	f:186.0813
Dimethirimol	C11H19N3O	8,31	f:152.0824
Dimetinden,222.1283	C20H24N2	7,85	f:248.1439
Dimetotiazine	C19H25N3O2S2	10,79	f:305.0418
Dimetridazole	C5H7N3O2	3,92	
Diniconazole	C15H17N3OCl2	17,00	f:239.0394
Dioxopromethazin	C17H20O2N2S	7,60	f:272.0745
Dipevefrin x HCl	C19H29NO5	12,34	
Diphenhydramin	C17H21NO	9,99	f:167.0861
Diphenoxylate	C30H32N2O2	13,06	f:379.2174
Diphenylpyraline,116.1075	C19H23NO	10,81	f:167.0861

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Dipivefrin	C19H29O5N	12,36	f:250.1443
Diponiumbromid	C20H38NO2Br	13,07	
Diprafenone,282.1494	C23H31NO3	12,57	f:300.1600
Dipropetryn,172.0657,186.0813	C11H21N5S	14,78	f:214.1126
Diprophylline	C10H14N4O4	5,13	f:181.0726
Dipyridamol	C24H40N8O4	11,82	
Disopyramide,196.1126	C21H29N3O	7,27	f:239.1184
Dixyrazine,187.1447	C24H33N3O2S	12,74	f:229.1916
Dodin	C15H33N3O2	17,01	
Domperidone	C22H24N5O2Cl	9,26	f:175.0871
Donepezil	C24H29NO3	9,67	f:288.1600
Dosulepin	C19H21NS	11,14	f:223.0581
Doxapram	C24H30N2O2	8,14	f:292.1701
Doxazosin	C23H25O5N5	11,27	f:344.1723
Doxepin	C19H21ON	10,32	f:235.1123
Doxepine-desmethyl	C18H19NO	10,30	f:235.1123
Doxylamin	C17H22N2O	5,77	f:182.0970
Doxorubicin	C27H29NO11	11,73	f:397.0923
Drofenin,173.1330	C20H31NO2	13,08	f:245.1542
Droperidol	C22H22N3O2F	9,28	f:165.0716
Dropropizin	C13H20N2O2	3,88	f:120.0813
Dubutamin	C18H23O3N	5,90	
Dyclonin	C18H27NO2	11,09	f:98.0970
EDDP,201.1517	C20H23N	10,09	f:249.1517
Eldoral "Heyden",195.1134	C11H17O3N3	5,40	f:154.1232
Embutramide	C17H27NO3	14,07	f:191.1436
Enalapril	C20H28O5N2	10,39	f:234.1494
Enoximone	C12H12N2O2S	10,22	
Ephedrin	C10H15ON	4,05	f:132.0813
Epinephrine	C9H13O3N	0,92	f:166.0868
Ergometrine	C19H23N3O2	5,05	f:223.1235
Ergotamine	C33H35N5O5	10,68	f:223.1235
Erythromycin,558.3642	C37H67O13N	12,09	f:576.3748
Esmolol	C16H25NO4	7,84	f:193.0865
Etafedrine	C12H19NO	4,58	

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Etafenone	C21H27NO2	11,00	f:100.1126
Etamivan	C12H17NO3	9,54	f:151.0395
Ethacridine	C15H15ON3	9,98	f:226.0980
Ethambutol	C10H24N2O2	0,79	f:116.1075
Ethenzamide	C9H11NO2	8,95	
Ethidimuron	C7H12N4O3S2	7,28	f:114.0126
Ethirimol,165.1028	C11H19N3O	8,28	f:182.1293
Ethoprophos	C8H19O2PS2	15,43	
Ethopropazine	C19H24N2S	11,66	f:114.1283
Ethylmorphine	C19H23NO3	5,17	f:257.1178
Etodroxizine,217.1552	C23H31N2O3Cl	12,07	f:201.0471
Etozolin	C13H20N2O3S	13,77	
Etryptamine	C12H16N2	7,27	f:130.0657
Famotidine	C8H15O2N7S3	3,36	f:189.0269
Famprofazone	C24H31ON3	13,64	f:162.1283
Felbamat	C11H14N2O4	7,66	
Fenamiphos	C13H22O3NSP	15,91	f:217.0088
Fenbutrazate,191.1072	C23H29O3N	13,07	f:204.1388
Fencamfamin	C15H21N	9,02	f:171.1174
Fencarbamide	C19H24ON2S	10,47	f:196.0762
Fendiline,105.0704	C23H25N	12,50	f:212.1439
Fenfluramin	C12H16NF3	8,54	f:159.0422
Fenoterol	C17H21O4N	4,33	f:135.0810
Phenoxazoline	C13H18ON2	8,86	f:177.1028
Fenpipramide	C21H26ON2	8,10	
Fenpropidin;189.1609;161.1330	C19H31N	12,29	f:147.1174
Fenproporex	C12H16N2	4,63	f:132.0813
Fentanyl	C22H28N2O	9,49	f:189.1392
Fexofenadine	C32H39O4N	11,75	
Flamprop-isopropyl	C19H19O3NCIF	16,33	
Flamprop-methyl	C17H15O3NCIF	14,83	
Flecainid	C17H20N2O3F6	9,93	f:301.0299
Fleroxacin	C17H18O3N3F3	5,46	f:326.1480
Fluanisone	C21H25O2N2F	9,82	
Fludrocortisone	C21H29O5F	11,93	

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Flumazenil,258.0679	C15H14O3N3F	10,17	f:276.0784
Flumetasone	C22H28O5F2	12,78	
Flunarizine	C26H26N2F2	13,43	f:203.0672
Flunisolide	C24H31O6F	13,87	f:225.1291
Flunitrazepam	C16H12N3O3F	12,21	f:268.1012
Flunitrazepam-desmethyl	C15H10N3O3F	11,32	f:258.0679
Fluocinolone acetonide	C24H30O6F2	13,58	f:357.1502
Fluorescin	C20H12O5	12,15	
Fluorouracil	C4H3O2N2F	1,17	
Fluoxetine	C17H18ONF3	12,28	f:163.0997
Fluoxymesterone	C20H29O3F	14,15	f:299.2011
Flupentixol	C23H25ON2F3S	13,96	f:305.0612
Fluphenazin	C22H26ON3F3S	13,73	
Flupirtine,109.0454	C15H17O2N4F	8,82	f:197.1039
Flurazepam; 289.0544	C21H23N3OC1F	9,73	f:315.0700
Fluridone	C19H14F3NO	13,76	f:310.1043
Fluspirilene	C29H31ON3F2	13,01	f:371.1935
Flutriafol	C16H13N3OF2	12,56	
Fluvoxamin	C15H21N2O3F3	12,08	
Fomocain	C20H25O2N	10,58	f:218.1545
Formoterol,121.0653, 327.1709,179.0821	C19H24N2O4	6,56	f:149.0966
Fuberidazole	C11H8ON2	6,43	
Furaltadone	C13H16O6N4	3,36	f:100.0762
Furathiocarb	C18H26N2O5S	17,88	
Gabapentin	C9H17NO2	4,61	
Galantamine,231.1021	C17H21NO3	3,11	f:213.0916
Gallopamil,165.0916	C28H40N2O5	11,04	f:333.2178
Gepefrine	C9H13NO	3,22	
Glafenin	C19H17N2O4Cl	7,97	f:283.0638
Gliclazide	C15H21N3O3S	13,56	f:153.1028
Granisetron	C18H24N4O	7,53	f:138.1283
Guanethidine	C10H22N4	0,92	
Guanfacine	C9H9N3OCl2	7,49	
Guanoxan	C10H13N3O2	5,69	f:149.0603
Halcinonide	C24H32O5ClF	16,21	
Haloperidol,123.0246	C21H23NO2ClF	10,04	f:165.0716

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Heptenophos	C9H12O4PCI	13,08	
Heroin,310.1443	C21H23NO5	7,12	f:328.1549
Hesperidin	C28H34O15	9,33	
Hexazinone	C12H20N4O2	11,06	f:171.0882
Hexobarbital	C12H16N2O3	11,51	
Hexobendine	C30H44N2O10	10,62	f:311.1607
Histamine	C5H9N3	0,64	
Histapyrrodine	C19H24N2	10,71	f:210.1283
Homatropin	C16H21NO3	4,31	f:124.1126
Hordenine	C10H15NO	2,31	f:121.0653
Hydralazin	C8H8N4	2,62	
Hydrocodon	C18H21O3N	4,36	f:241.0865
Hydrocortisone	C21H30O5	12,53	f:241.1440
Hydrocortisone acetate	C23H32O6	13,72	
Hydromorphon	C17H19O3N	2,21	f:227.0708
Hydroxyzine	C21H27N2O2Cl	11,78	f:201.0471
Hymecromone	C10H8O3	8,98	
Hyoscyamine	C17H23NO3	5,79	
Ibuprofen (negativ)	C13H18O2	16,18	
Imipramin,236.1420,194.0908	C19H24N2	11,46	f:208.1126
Ketamin,220.0893,152.0267	C13H16ONCl	6,48	f:166.0424
Ketazolam	C20H17N2O3Cl	14,55	
Ketoconazole	C26H28N4O4Cl2	12,28	
Lamotrigine	C9H7N5Cl2	7,48	f:229.0048
Levomepromazin,100.1126	C19H24ON2S	12,01	f:242.0640
Levorphanol	C17H23NO	4,93	
Lidocain	C14H22ON2	5,76	
Lofepramine,196.0529	C26H27N2OCl	14,48	f:224.0842
Loperamid	C29H33N2O2Cl	12,83	f:266.1545
Loprazolam	C23H21O3N6Cl	9,87	
Lorazepam, 303.0092, 229.0533	C15H10N2O2Cl2	12,87	f:265.0299
Lyserg acid	C16H16O2N2	4,93	
Mafenide	C7H10N2O2S	9,93	
MAM-Heroin metabolite,268.1338	C19H21NO4	4,83	f:211.0759
Maprotilin	C20H23N	11,70	
MBDB	C12H17O2N	6,26	f:135.0446

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
MDPV,205.0865	C16H21NO3	7,78	f:149.0239
MDPV (Pat),261.1729	C16H21NO3	4,07	f:205.0865
Medazepam	C16H15N2Cl	10,03	
Mefenorex	C12H18NCI	7,68	
Mefexamide	C15H24N2O3	5,73	f:137.0603
Mepacrine	C23H30N3OCl	1,73	
Mephedron	C11H15NO	5,41	f:144.0813
Mephentermine	C11H17N	5,89	f:133.1017
Mepindolol,160.0762	C15H22N2O2	5,91	f:148.0762
Mepivacaine	C15H22N2O	6,24	f:150.0919
Mescalin	C11H17O3N	4,82	
Metaclazepam	C18H18ON2ClBr	12,29	f:361.0107
Metamfepramon,105.0340	C11H15ON	4,19	f:133.0653
Metamizol	C13H17N3O4S	4,82	
Metformin	C4H11N5	0,89	
Methadone	C21H27NO	11,89	f:265.1592
Methamidophos	C2H8NO2PS	2,60	f:223.1123
Methamphetamine	C10H15N	4,82	f:91.0548
Methaqualon	C16H14N2O	4,89	
Methylergometrin	C20H25O2N3	5,82	f:223.1235
Methylphenidat	C14H19O2N	7,37	f:174.1283
Metoclopramid, 184.0165	C14H22ClN3O2	6,21	f:227.0587
Metoprolol,133.0653	C15H25NO3	7,14	f:165.0916
Mianserin	C18H20N2	10,04	f:208.1126
Miconazol	C18H14ON2Cl4	15,01	
Midazolam,290.1094	C18H13N3ClF	9,99	f:244.0329
Midazolam,10-OH	C18H13N3ClFO	10,55	
Mirtazapin, 195.0922, 235.1235	C17H19N3	7,08	f:209.1079
Mitomycine	C15H18N4O5	3,95	
Morphine,268.1338	C17H19NO3	1,61	f:229.0865
N,N-Diethyl-m-toluamid	C12H17ON	13,02	f:119.0497
N,N-Diethyltryptamine	C14H20N2	5,92	
N-Acetyl-L-Cystein	C5H9NO3S	1,94	
Nadolol	C17H27NO4	5,95	f:236.1287
Naftifine	C21H21N	11,55	f:141.0704
Naloxone	C19H21O4N	3,78	f:310.1443

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Naltrexone	C20H23NO4	4,34	
N-Ethylnordazepam	C17H15N2OCl	12,25	
Nicotin	C10H14N2	1,07	
Nifedipin	C17H18N2O6	12,95	
Nitrazepam	C15H11O3N3	11,70	
Nitrendipin	C18H20N2O6	14,91	f:329.1137
Nitrofen	C12H7NO3Cl2	11,71	
Nordiazepam,140.0267	C15H11N2OCl	13,78	f:243.0689
Norfloxacin	C16H18N3O3F	6,04	
Nortilidin	C16H21O2N	7,85	f:155.0861
Nortriptylin	C19H21N	12,09	f:233.1330
Noscapin	C22H23NO7	8,36	f:220.0974
Noxiptilin	C19H22ON2	11,23	f:206.0970
Nystatin	C47H75NO17	14,61	f:727.4057
Ofloxacin	C18H20O4N3F	5,79	
Olanzapin,213.0486	C17H20N4S	4,57	f:256.0908
Omeprazol	C17H11N3O3Cl	10,52	
Opipramol,234.1283	C23H29ON3	11,10	f:171.1497
Oxazepam,269.0482	C15H11N2O2Cl	12,97	f:231.0689
Oxazolam	C18H17N2O2Cl	11,06	
Oxybutynin	C22H31NO3	12,29	f:124.1126
Oxycodon,242.1181	C18H21O4N	4,35	f:256.13338
Paracetamol	C8H9NO2	3,93	f:110.0606
Paroxetin	C19H20NO3F	11,36	f:192.1189
Pemolin	C9H8O2N2	5,77	
Pentachlorphenol	C6HOCl5	11,65	
Pentamidine	C19H24N4O2	5,47	
Pentazocin	C19H27ON	8,68	
Perazin,113.1079	C20H25N3S	11,87	f:141.1392
Petoxiphilin	C13H18O3N4	8,59	
Phenacetin	C10H13O2N	9,35	f:110.0606
Phendimetrazin	C12H17ON	4,63	f:146.0970
Pheniramin,168.0813	C16H20N2	5,88	f:196.1126
Phenmedipham	C16H16N2O4	4,90	
Phenprocoumen	C18H16O3	15,25	f:203.0708
Phentermine	C10H15N	6,02	f:133.1017

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Phenylbutazon	C19H20O2N2	15,28	f:211.0871
Phosalone	C12H15NO4PS2Cl	6,03	
Pindolol,116.1075	C14H20O2N2	4,99	f:146.0606
Pipamperon	C21H30N3O2F	6,18	f:209.1528
Pipradrol	C18H21ON	8,84	f:172.1126
Pirazetam	C6H10O2N2	1,36	
Pirenzepin,113.1079	C19H21O2N5	5,80	f:252.0773
Piroxicam	C15H13N3O4S	12,21	f:121.0402
Practolol,122.0606	C14H22N2O3	4,02	f:152.0712
Prilocain,177.1028	C13H20ON2	6,26	f:162.0919
Primidon	C12H14N2O2	7,97	f:117.0704
Procain,120.0449	C13H20N2O2	3,63	f:164.0712
Procarbazin	C12H19N3O	4,26	f:191.1184
Prolintan	C15H23N	8,30	f:126.1283
Promethazin,240.0847	C17H20N2S	11,09	f:198.0377
Propanolol,183.0810,116.1075	C16H21NO2	9,74	f:157.0653
Propoxyphen	C22H29O2N	11,65	
Propranolol,116.1075	C16H21O2N	9,62	f:157.0653
Prothipendyl,213.0486	C16H19N3S	10,57	f:241.0799
Protriptylin, 205.1017, 233.1330, (218.1096 Radikal)	C19H21N	11,83	f:191.0861
Psilocin	C12H16N2O	3,07	
Pyrantel	C11H14N2S	5,20	
Pyritinol	C16H20N2O4S2	8,77	
Quetiapine	C21H25N3O2S	10,26	f:253.0799
Ranitidine,130.0617	C13H22N4O3S	3,60	f:176.0494
Reserpin	C33H40O9N2	12,24	f:397.2127
Risperidon	C23H27O2N4F	8,73	f:191.1184
Scopolamin	C17H21NO4	4,52	f:138.0919
Selegilin	C13H17N	5,84	f:132.0813
Sildenafil	C22H30O4N6S	11,10	
Sotalol	C12H20N2O3S	2,58	
Sufentanyl	C22H30O2N2S	10,81	
Sulpiride	C15H23N3O4S	3,38	f:112.1126
Temazepam,228.0580	C16H13CIN2O2	13,53	f:255.0689
Tetracain	C15H24N2O2	9,65	f:176.1075
Tetrazepam, 253.1341, 232.0893	C16H17ON2Cl	14,70	f:253.1341

Fortsetzung Anhang 44 Einträge in der UPLC-MS-TOF 'Targeted Screening Datenbank', die Angaben für die spezifischen Fragmentmassen sind soweit vorhanden eingetragen

Substanz	Summenformel	RT	Fragment 1
Thebain	C19H21O3N	6,67	
Theophyllin	C7H8O2N4	5,07	f:124.0564
Thiopental - NEG	C11H18N2O2S	13,26	
Tiapride,213.0222	C15H24N2O4S	4,02	f:256.0644
Tilidin	C17H23O2N	7,76	f:155.0861
Tramadol	C16H25NO2	7,07	f:246.1858
Tramadol-O-demethyl (PAT)	C15H23O2N	5,72	f:236.1651
Trazodon	C19H22N5OCl	8,51	
Trimethoprim	C14H18O3N4	5,33	f:261.0988
Trimipramin	C20H26N2	12,07	f:208.1126
Tripelenamine,119.0609	C16H21N3	7,83	f:211.1235
Urapidil	C20H29N5O3	6,72	
Venlafaxin	C17H27O2N	9,23	f:260.2014

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zuerst der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums und die wohlwollende Unterstützung dieses Projekts.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Christian Sommerhoff, der mit der Überlassung des Themas und seiner Schirmherrschaft darüber erst die Grundlage für die vorliegende Arbeit legte. Ich danke ihm für seine Geduld und Hilfe bei der richtigen Zusammensetzung meiner Puzzleteile, und für sein Engagement und Interesse für diese Arbeit.

Auch möchte ich Herrn Dr. Jürgen Hallbach, leitender klinischer Chemiker im Klinikum Schwabing, für seine jederzeit bereitwillige und hilfreiche Betreuung sowie seine fachkompetente Unterstützung danken. Mit seinem Engagement und seiner Begeisterung hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mein Interesse für dieses Gebiet geweckt.

Dem gesamten Tox-Labor im Klinikum Schwabing danke ich für die allseits vorhandene Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im Alltag.

Dank meinen Eltern habe ich das alles erreicht. Durch ihre Liebe und Unterstützung habe ich meinen Weg gefunden.

Für die persönliche Unterstützung möchte ich mich zuletzt noch bei Irene bedanken, die mir bei meinen Phasen der Wortfindungsstörung mit Kreativität, Geduld und sehr viel Humor weitergeholfen hat.