

# Festphasenmikroextraktion für die Arzneimittelbestimmung in Blutplasma

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Silvia Kruggel  
geb. am: 06.02.1972 in: Merseburg (Saale)

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Müller
2. MR Prof. em. Dr. med. F.P. Meyer
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. W.G. Lorenz

Halle (Saale), 28.10.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004538**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004538>]

# **Festphasenmikroextraktion für die Arzneimittelbestimmung in Blutplasma**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

angefertigt am

Institut für Klinische Pharmakologie  
Direktor: MR Prof. Dr. med. F.P. Meyer  
Medizinische Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Frau Silvia Kruggel  
geb. am: 06.02.1972 in: Merseburg (Saale)

Meinen Eltern gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
<b>1. Einleitung und Ziel der Arbeit</b>	1
<b>2. Plasmaspiegelüberwachung von Arzneimitteln</b>	3
2.1. Gründe der Plasmaspiegelüberwachung von Arzneimitteln	3
2.2. Methoden zur Bestimmung und zum Nachweis von Arzneimitteln im Blut	4
<b>3. Grundlagen der Festphasenmikroextraktion</b>	6
3.1. Funktionsprinzip	6
3.2. Anwendung	7
3.3. Thermodynamik	8
3.3.1. Gleichgewichtsbetrachtungen bei direkter SPME	8
3.3.2. Gleichgewichtsbetrachtungen bei Headspace-SPME	10
3.3.3. Temperatureinfluss	13
3.3.4. Aussalzeffekt	14
3.3.5. Effekt des pH-Wertes der Probe	14
3.3.6. Effekt des Gehaltes an organischen Lösungsmitteln in der Probe	14
3.4. Kinetik	15
3.4.1. Direkte Extraktion	17
3.4.2. Headspace Extraktion	19
3.5. Matrix Serum und Plasma	19
<b>4. Geräte und Materialien</b>	24
4.1. SPME-Fasern und Halter	24
4.2. Apparate	24
4.3. Referenzsubstanzen, Chemikalien und biologisches Material	27
<b>5. Vorversuche zur Methodenentwicklung</b>	30
5.1. Optimierung der Extraktionsbedingungen	31
5.1.1. Extraktionszeit	31
5.1.2. Extraktionstemperatur	32
5.1.3. Extraktionsverfahren	33
5.1.4. Weitere Extraktionsparameter	36

5.2.	Matrixeffekte	39
5.2.1.	Proteingehalt	39
5.2.2.	Fettgehalt	41
5.2.3.	Elektrolytgehalt	42
5.3.	Entwicklung der chromatographischen Methode	44
5.3.1.	Säule	45
5.3.2.	Injektor	47
5.3.3.	Detektion	48
5.3.4.	Desorption	48
5.4.	Faserbeständigkeit	50
<b>6.</b>	<b>Methodenvalidierung zur Bestimmung von Arzneimitteln</b>	<b>53</b>
6.1.	Quantitative Bestimmung von Clozapin	53
6.1.1.	Extraktion, Wiederfindungsraten, Chromatographiebedingungen und Photosensitivität	54
6.1.2.	Bestimmung der Extraktionsenthalpie und des freien Anteils	58
6.1.3.	Test auf mit der Clozapinbestimmung interferierende Substanzen	62
6.1.4.	Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	63
6.1.5.	Bestimmung der Richtigkeit über externe Kontrollen	65
6.1.6.	Analyse von Patientenplasma	66
6.2.	Quantitative Bestimmung von Levomepromazin	69
6.2.1.	Extraktion, Wiederfindungsraten und Chromatographiebedingungen	70
6.2.2.	Test auf mit der Levomepromazinbestimmung interferierende Substanzen	72
6.2.3.	Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	73
6.2.4.	Bestimmung der Richtigkeit über interne Kontrollen	75
6.2.5.	Analyse von Patientenplasma	76
6.3.	Quantitative Bestimmung von Clomipramin und Desmethyloclomipramin	80
6.3.1.	Extraktion, Wiederfindungsraten und Chromatographiebedingungen	80
6.3.2.	Bestimmung der Extraktionsenthalpie	82
6.3.3.	Test auf mit der Clomipraminbestimmung interferierende Substanzen	84
6.3.4.	Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	85
6.3.5.	Bestimmung der Richtigkeit über externe Kontrollen	86
6.4.	Quantitative Bestimmung von Olanzapin	89

6.4.1. Extraktion, Wiederfindungsraten und Chromatographiebedingungen	89
6.4.2. Test auf mit der Olanzapinbestimmung interferierende Substanzen	92
6.4.3. Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	93
6.4.4. Bestimmung der Richtigkeit über interne Kontrollen	94
6.5. Quantitative Bestimmung von Clomethiazol	96
6.5.1. Extraktion, Wiederfindungsraten und Chromatographiebedingungen	96
6.5.2. Test auf mit der Clomethiazolbestimmung interferierende Substanzen	98
6.5.3. Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	99
6.6. Quantitative Bestimmung von Amitriptylin und Nortriptylin	100
6.6.1. Extraktion, Wiederfindungsraten und Chromatographiebedingungen	100
6.6.2. Bestimmung der Extraktionsenthalpie	102
6.6.3. Test auf mit der Amitriptylinbestimmung interferierende Substanzen	104
6.6.4. Linearität, Nachweisgrenze und Präzision	106
6.6.5. Analyse von Patientenplasma	108
6.7. Weitere Arzneistoffe	110
6.7.1. Diazepam und Nordazepam	110
6.7.2. Venlafaxin	112
6.7.3. Haloperidol und reduziertes Haloperidol	114
6.7.4. Mirtazapin	115
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>133</b>

## **Anhang**

## **1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT**

Die Festphasenmikroextraktion (engl.: solid-phase microextraction, SPME) ist eine neue Technik für die Probenaufarbeitung in der gaschromatographischen Analytik, die 1989 von PAWLISZYN entwickelt wurde [1]. Eine Quarzfaser, die mit einem extraktionsaktiven Polymer beschichtet ist, wird für die Extraktion genutzt. Der hervorragende Vorteil dieses Prinzips gegenüber der vorhergehenden Festphasenextraktion (SPE) mit gepackten Säulen ist die integrierte Verwendung von einem Gerät für alle benötigten Schritte der Probenaufarbeitung, d.h. Extraktion, Konzentration, Transfer zum Gaschromatographen und Injektion in den Gaschromatographen. Durch die Kombination der bekannten Extraktionsmittel aus der klassischen SPE mit einer besonderen geometrischen Anordnung in Form einer Faser lassen sich zeit- und materialaufwendige Arbeitsschritte einsparen. Deshalb ist die Bezeichnung Festphasenmikroextraktion für die Beschreibung der Methode etwas irreführend, und könnte in der Tat zu einer Fehlinterpretation führen. Die Vorteile sollten höher beurteilt werden als bei andere Extraktionsmethoden mit einer sehr geringen Menge („Mikro“) des extrahierenden Agens, z.B. SPE mit Disc-Technologie. Diese erheblichen Vorteile wurden bisher vorwiegend im Bereich der Umwelt- [2-27] und Lebensmittelanalytik [28-40] exploriert. Demzufolge sollten die Vorteile der SPME (lösungsmittelfrei, leichte Handhabung, geringer Gerätebedarf, schnelle Methode, leichte Automatisierung, gute Linearität) in der Probenaufarbeitung auch in der Arzneistoffanalytik aus Humanplasma genutzt werden. Es gibt bisher nur wenige Publikationen, die die SPME für die Bestimmung von Arzneistoffen in Körperflüssigkeiten, wie Urin, Serum oder Plasma zum Anliegen hatten [41-65]. Ein erster Versuch zur Bestimmung von psychotropen Arzneistoffen im Humanserum oder –plasma wurde vor kurzem beschrieben [64]. Basierend auf den Ergebnissen dieser Publikationen könnte die SPME eine geeignete Methode für die Arzneistoffanalytik im Therapeutischen Drug-Monitoring (TDM) und in der klinischen Toxikologie werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Grundlagen der SPME zur Analytik von Arzneimitteln in Blutplasma. Als problematisch sind die Eiweißbindung der Analyten sowie eine erhöhte Viskosität der Matrix im Vergleich zu den bisher häufig untersuchten Umweltproben anzusehen. Der Einfluss der Matrix sollte bei einer Methodvalidierung im Detail untersucht werden. Es wurde zuvor bei Untersuchungen von trizyklischen Antidepressiva gezeigt, dass Änderungen von Matrixkomponenten (Plasmaproteine) die Methode nicht beeinträchtigen müssen [64]. Auch Änderungen des Albumingehaltes sollten für den Fall von z.B. Proben mit gleichzeitigen Lebererkrankungen untersucht werden. Im Gegensatz dazu kann aber auch, trotz der zu erwartenden Schwierigkeit aufgrund der besonderen Matrix in klinischen Proben, das Plasma, auf der anderen Seite, gegenüber Proben z.B. aus einigen Bereichen der Umweltanalytik als Matrix mit relativ konstanter chemischer Zusammensetzung angesehen werden. Damit könnten sich auch Vorteile für die Anwendung der SPME in klinischen Proben ergeben. Auf bisherigen Ergebnissen aufbauend sollten validierte Routinemethoden für das TDM und die klinische Toxikologie erarbeitet werden. Da die SPME hauptsächlich zusammen mit der Gaschromatographie (GC) genutzt wird, sollten SPME-GC-Methoden mit einem Stickstoff-Phosphor-selektiven Detektor (NPD) für die Bestimmung von Antidepressiva, Neuroleptika und anderer Arzneistoffe in Humanplasma entwickelt und untersucht werden. Dabei konnte von einer Pilotarbeit von ULRICH und MARTENS zur klinischen Toxikologie von trizyklischen Antidepressiva ausgegangen werden [64].

## **2. PLASMASPIEGELÜBERWACHUNG VON ARZNEIMITTELN**

### **2.1. GRÜNDE DER PLASMASPIEGELÜBERWACHUNG VON ARZNEIMITTELN**

Die Gründe, die für ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Arzneistoffen sprechen, können wie folgt aufgelistet werden [66]: Als allgemeine Indikation werden eine große pharmakokinetische Variabilität (bei gleicher Dosis kommt es bei verschiedenen Patienten zu sehr unterschiedlichen Serumspiegeln) und eine kleine pharmakodynamische Variabilität (geringer Einfluss pharmakodynamischer Variablen auf den therapeutischen Effekt) genannt. Des weiteren sprechen bestimmte Indikationsgruppen von Arzneistoffen (Dosis nicht oder schlecht aus klinischem Bild oder medizinischen Parametern abzuleiten, geringe therapeutische Breite) für ein TDM. Dies trifft z.B. für trizyklische Antidepressiva zu, wo ein therapeutischer Effekt oft erst nach zwei bis drei Wochen zu beobachten ist und der Quotient aus oberer und unterer Konzentrationsgrenze des Arzneistoffes im therapeutischen Bereich oft  $< 3$  ist [67]. Auch erfordern bestimmte Therapiesituationen, z.B. Nonresponder bei Normdosis und das Auftreten von konzentrationsabhängigen Nebenwirkungen oder Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen, eine Serumspiegelüberwachung. Ein TDM von Arzneistoffen empfiehlt sich auch bei Risikopatienten, zu denen Frühgeborene, Neugeborene und Kinder; ältere Patienten ( $> 65$  Jahre); Patienten mit Nieren-, Leber-, Herz- und Schilddrüsenfunktionsstörungen; Patienten mit Fett- und Magersucht sowie Schwangere zählen. Hier kommt aus den verschiedensten Gründen zu Abweichungen in der Metabolisierung und Ausscheidung der Arzneistoffe.

Das TDM kann das therapeutische Ansprechen verbessern, einer arzneimittelbedingten Morbidität vorbeugen und Kosten sparen. Das TDM wird in einigen Fachgebieten der Medizin genutzt, um die Dosierung von verschiedenen Arzneistoffen zu optimieren und toxische Arzneistoffreaktionen zu reduzieren. Aus diesem Grund wird das TDM als „Sicherheitsstandard“ auch in der Psychiatrie diskutiert [68].

## **2.2. METHODEN ZUR BESTIMMUNG UND ZUM NACHWEIS VON ARZNEIMITTELN IM BLUT**

Bevor die eigentliche Bestimmung von Arzneistoffspiegeln in Serum- bzw. Plasmaproben erfolgen kann, müssen die Proben meist einer Probenaufarbeitung unterzogen werden. Häufig werden dafür die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Diese Verfahren erlauben die Herstellung angereicherter und sehr reiner Extrakte. Sie bewirken eine hohe Empfindlichkeit für die nachfolgende chromatographische Trennung und Bestimmung. Störungen durch endogene Substanzen werden weitgehend vermieden. Dafür werden meist die Gaschromatographie (GC) und die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt, die mit den unterschiedlichsten Detektoren gekoppelt werden können [67, 69-92]. Nachteile sind ein hoher Zeit- und manueller Arbeitsaufwand und der Einsatz von zum Teil größeren Mengen an organischen Lösungsmitteln. Auch die Automatisierung der beiden Verfahren ist oft noch recht unbefriedigend, da sie sich nur bei hohem Probenaufkommen rentiert. Die vorgenommenen Aussagen über LLE und SPE treffen ebenso für die Supercritical Fluid Extraction (SFE) zu.

Weitere, noch wenig untersuchte Verfahren der Probenaufarbeitung sind die Dialyse, Elektrodialyse und Ultrafiltration [93-98]. Diese Membrantechniken sind gut automatisierbar.

Um die Probenaufarbeitung weniger aufwendig zu gestalten, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden zur Arzneimittelanalytik in Plasmaproben entwickelt. Dazu zählt die Direkteinspritzung des Plasmawassers in die HPLC nach erfolgter Eiweißfällung. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Direkteinspritzung von Plasma. Diese kann mit on-line-Eiweißfällung mit Filterung und Säulenschalttechnik [99], mit selektiver Abtrennung der Proteine durch eine Vorsäule und nachgeschalteter analytischer Säule (Säulenumschaltung) oder mit vorhergehender Abtrennung der Eiweiße an RAM-Phasen (Restricted Access Materials) und nachfolgender Analyse an RP-Phasen (Reversed Phase) nach Säulenschaltung [100-103] gekoppelt werden. Die fehlende Anreicherung, die schlechte Abtrennung von endogenen Substanzen sowie die chromatographische Auflösung sind oft nicht befriedigend, so dass diese Methoden nur für einige Analyten eingesetzt werden können.

Immunologische Verfahren (Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay, FPIA; Enzyme-Multiplied Immunoassay, EMIT; Radioimmunoassay, RIA) können gegebenenfalls auch ohne Probenaufarbeitung auskommen und sind relativ schnell [67, 72, 76, 104-106]. Mängel dieser Verfahren sind jedoch die Beschränkung auf wenige Arzneimittel, die oft geringe Selektivität (Kreuzreaktivität) sowie in einigen Fällen eine ungenügende Sensitivität.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass aufgrund mangelnder Alternativen in bestehenden Probenaufarbeitungsmethoden die LLE und SPE trotz ihres hohen materiellen und finanziellen Aufwandes die am häufigsten genutzten Verfahren in der Arzneimittelanalytik sind [107].

### 3. GRUNDLAGEN DER FESTPHASENMIKROEXTRAKTION

#### 3.1. FUNKTIONSPRINZIP

Ziel der Entwicklung einer neuen Methode zur Probenaufarbeitung war es, die einzelnen, teils zeitaufwendigen Schritte bisheriger Probenaufbereitungsmethoden, wie Extraktion, Konzentration, Transfer zum Gaschromatographen und Injektion, zusammenzufassen und zu vereinfachen. Zu diesem Zweck wurde von PAWLISZYN [1, 108] die Festphasenmikroextraktion entwickelt. Die Extraktion erfolgt durch eine Polymerschicht, die auf einer Glasfaser aufgebracht ist. Diese Glasfaser ist in der Kanüle einer modifizierten Spritze untergebracht. Die Wirkungsweise der Festphasenmikroextraktion ist in Abbildung 1 dargestellt:

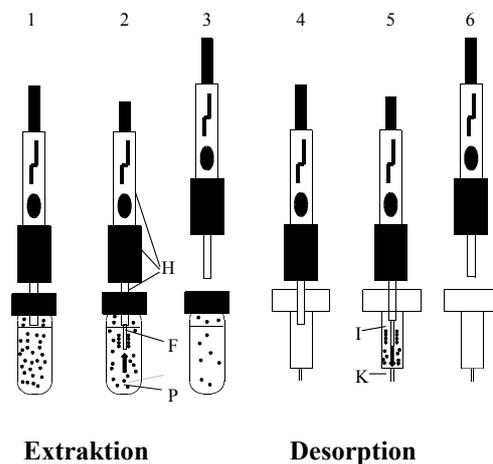


Abb.1 Funktionsprinzip der SPME

- 1) Einführen der Halterung in das Probengläschen
- 2) Einführen der Faser in die Probe oder deren Dampfraum durch Niederdrücken des Stempels; Extraktion des Analyten im Temperaturbereich von 25 °C bis 100 °C, unterstützt durch Rühren, Schütteln oder Ultraschall
- 3) Rückführung der Faser nach erfolgter Extraktion in die Halterung
- 4) Überführung der Faser zum Gaschromatographen
- 5) Injektion durch Niederdrücken des Stempels in den Injektor des Gaschromatographen; Thermodesorption der Faser bei Temperaturen von 200 °C bis 300 °C Separation der Analyten auf der Kapillarsäule
- 6) Rückführung der Faser nach vollständiger Desorption in die Halterung  
Möglichkeit zum Einsatz für weitere Extraktionen

### 3.2. ANWENDUNG

Mit der SPME können Analyten aus einer Flüssigkeit (durch Eintauchen oder über den Dampfraum/Headspace) oder aus Feststoffen (über den Dampfraum) auf eine beschichtete Fused-Silica-Faser extrahieren. Für die GC-Analyse wird die Faser in den GC-Injektor eingeführt, für die HPLC-Analyse in die Desorptionskammer des SPME-HPLC-Interface.

Typische Anwendungen der SPME sind:

- Wasserproben in der Umweltanalytik
- industrielle Applikationen, z.B. Tenside
- Headspace-Analyse von Spuren von Verunreinigungen in Polymeren und festen Proben
- Nahrungsmittelanalytik, z.B. Aromastoffe
- Forensische Analysen
- Toxikologische Analysen: Blutalkohol oder Drogen im Urin/Serum
- Geruchsstoffe im ppt-Bereich

Anwendungsgebiet	Beschichtungsart
für Gase und niedermolekulare Verbindungen	75 µm Carboxen/Polydimethylsiloxan 85 µm Carboxen/Polydimethylsiloxan
für flüchtige Verbindungen	100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)
für flüchtige Verbindungen, Amine und Nitroaromaten	65 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen
für polare halbflüchtige Verbindungen	85 µm Polyacrylat (PA)
für unpolare hochmolekulare Verbindungen	7 µm Polydimethylsiloxan
für unpolare halbflüchtige Verbindungen	30 µm Polydimethylsiloxan
für Alkohole und polare Verbindungen	65 µm Carbowax/Divinylbenzen (CW-DVB) 70 µm Carbowax/Divinylbenzen
für Aromen (flüchtig und halbflüchtig), Geruchsstoffe	50 µm Divinylbenzen/Carboxen auf 30 µm Polydimethylsiloxan
für Amine und polare Verbindungen (HPLC)	60 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen
für oberflächenaktive Stoffe (HPLC)	50 µm Carbowax/matrizierter Harz

Tab. 1. Übersicht über Faserbeschichtungen und ihren Einsatz in der Analytik

### 3.3. THERMODYNAMIK

#### 3.3.1. GLEICHGEWICHTSBETRACHTUNGEN BEI DIREKTER SPME

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften des Polymers (PDMS: Schmelzpunkt = -50 °C; Glasübergangstemperatur = -126 °C) folgt die Extraktion den Gesetzen der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion [109]. Es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen zwei Lösungen des Analyten in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten ein:



( $K_{fs}$  = Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten)

Für das chemische Potenzial des Analyten in beiden Lösungen gilt:

$$\mu_s = \mu_s^\ominus + RT \cdot \ln a_s \quad \mu_f = \mu_f^\ominus + RT \cdot \ln a_f \quad (2)$$

( $\mu_s$  = chemisches Potenzial des Analyten in der Lösung,  $\mu_s^\ominus$  = chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Lösung,  $R$  = Gas-konstante = 8.314510 J/(K•mol),  $T$  = Temperatur,  $a_s$  = Aktivität des Analyten in der Lösung,  $\mu_f$  = chemisches Potenzial des Analyten in der Faser,  $\mu_f^\ominus$  = chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Faser,  $a_f$  = Aktivität des Analyten in der Faser)

Im Gleichgewicht gilt  $\mu_s = \mu_f$ . Daraus folgt:

$$\ln \frac{a_f}{a_s} = \frac{\mu_s^\theta - \mu_f^\theta}{RT} \quad (3)$$

da die chemischen Standardpotenziale des Analyten von der Temperatur und nur wenig vom Druck abhängig sind. Das NERNST'sche Verteilungsgesetz gilt bei Konstanz beider Variablen und mit  $a = f \cdot c$  ( $f$  = Aktivitätskoeffizient = 1 bei unendlich verdünnten Lösungen,  $c$  = Konzentration) ergibt sich:

$$K_{fs} = \frac{c_f^\infty}{c_s^\infty} \quad (4)$$

( $c_f^\infty$  = Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Faser ( $t = \infty$ ),  
 $c_s^\infty$  = Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Lösung)

und daraus folgt:

$$n_f = K_{fs} V_f c^0 \quad (5)$$

( $n_f$  = Stoffmenge des Analyten auf der Faser,  $V_f$  = Volumen der Faserbeschichtung,  $c^0$  = Ausgangskonzentration des Analyten)

Gleichung (5) gilt allerdings nur für große Probenvolumina mit der Annahme, dass sich die Ausgangskonzentration aufgrund eines kleinen Verteilungskoeffizienten nur geringfügig ändert.

Bei kleinen Probenvolumina (ca. 2 ml) und einem großen Verteilungskoeffizienten kann die Extraktion jedoch nahezu erschöpfend sein. Aufgrund der Verringerung der Analytkonzentration in der Probe während des Extraktionsvorganges kann Gleichung (5) nicht mehr genutzt werden. Die modifizierte Gleichung lautet:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f n^0}{K_{fs} V_f + V_s} = f(n^0) \quad (6)$$

( $n^0$  = Ausgangsstoffmenge des Analyten,  $V_s$  = Volumen der Lösung)

Entsprechend Gleichung (6) ist ersichtlich, dass die Stoffmenge in der Faser,  $n_f$ , linear abhängig von der Ausgangsstoffmenge des Analyten in der Probe,  $n^0$  (der Zielgröße), ist. Damit ist die Grundlage für eine quantitative Methode gegeben.

### 3.3.2. GLEICHGEWICHTSBETRACHTUNGEN BEI HEADSPACE-SPME

Die Stoffmenge des Analyten, die von der polymeren Beschichtung extrahiert wird, bezieht sich auf das Gesamtgleichgewicht des Analyten in dem Drei-Phasen-System. Nur die Absolutmenge des Analyten bleibt während der gesamten Extraktion konstant, bekannt als die eingesetzte Ausgangsstoffmenge:

$$c^0 V_s = c_f^\infty V_f + c_h^\infty V_h + c_s^\infty V_s \quad (7)$$

( $c_h^\infty$  = Gleichgewichtskonzentration des Analyten im Gasraum,  $V_h$  = Volumen des Gasraumes)

Wenn die Faser-Gasraum-Verteilungskonstante mit  $K_{fh} = c_f^\infty / c_h^\infty$  und die Faser-Lösung-Verteilungskonstante mit  $K_{fs} = c_f^\infty / c_s^\infty$  definiert ist, kann die auf der Faser extrahierte Stoffmenge des Analyten,  $n_f = c_f^\infty \cdot V_f$ , als

$$n_f = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f c^0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (8)$$

( $K_{hs}$  = Gasraum-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten)

beschrieben werden. Die treibende Kraft im Multiphasengleichgewicht ist die Differenz zwischen den chemische Potenzialen des Analyten in den drei Phasen. In den folgenden Gleichgewichtsbetrachtungen befindet sich ein Analyt in einem Multiphasensystem, das aus einem flüssiges Polymer, einem Headspace- und einer wässrigen Phase besteht.

Die chemischen Potenziale eines Analyten in diesem System können als

$$\mu_h = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_h/p^0) \quad (9)$$

$$\mu_f = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_f/p^0) \quad (10)$$

$$\mu_s = \mu^0(T) + RT \cdot \ln(p_s/p^0) \quad (11)$$

( $\mu_h$  = chemisches Potenzial des Analyten im Gasraum,  $\mu^0$  = chemisches Ausgangspotenzial des Analyten,  $p_h$  = Dampfdruck des Analyten im Gasraum,  $p^0$  = Tabellierungsdruck = 101.325 kPa,  $p_f$  = Dampfdruck des Analyten in der Faser,  $p_s$  = Dampfdruck des Analyten in der Lösung)

ausgedrückt werden [109]. Wenn das Drei-Phasen-System im Gleichgewicht ist, müssen die chemischen Potenziale der Analyten in allen drei Phasen gleich sein

$$\mu_f = \mu_h = \mu_s \quad (12)$$

Aus Gleichungen (9) bis (12) kann geschlussfolgert werden:

$$p_f = p_h = p_s \quad (13)$$

Die Dampfdrücke in der Faserbeschichtung und der wässrigen Phase können mit dem HENRY'schen Gesetz als

$$p_f = K_f c_f^\infty \quad (14)$$

$$p_s = K_s c_s^\infty \quad (15)$$

( $K_f$  = HENRY-Konstante des Analyten in der Faser,  $K_s$  = HENRY-Konstante des Analyten in der Lösung)

beschrieben werden. Unter der Voraussetzung, dass das Gesetz des idealen Gases  $p_h V_h = n_h RT$  ( $n_h$  = Stoffmenge des Analyten im Gasraum) für den Analytendampf im Headspace gilt, ergibt sich für den Dampfdruck im Dampfraum

$$p_h = c_h^\infty \cdot RT \quad (16)$$

Aus Gleichungen (13) bis (16) können die Verteilungskonstanten mit der HENRY-Konstante verbunden werden

$$K_{fh} = c_f^\infty / c_h^\infty = RT / K_f \quad (17)$$

$$K_{hs} = c_h^\infty / c_s^\infty = K_s / RT \quad (18)$$

Wenn Gl. (13) bis (15) gelten, kann im Gleichgewicht die Verteilungskonstante des Analyten als  $K_{fs} = c_f^\infty / c_s^\infty = K_s / K_f$  beschrieben werden. Daraus und aus Gleichungen (17) und (18) folgt ein einfacher Zusammenhang der drei Verteilungskoeffizienten:

$$K_{fs} = K_s / K_f = K_{fh} K_{hs} \quad (19)$$

Gleichung (8) kann deshalb auch geschrieben werden als

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f c^0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (20)$$

Mit der Thermodynamik können die Auswirkungen von Änderungen bestimmter Extraktionsbedingungen auf die Verteilung vorhergesagt werden. Parameter, die die Verteilungskonstante möglicherweise beeinflussen, sind die Temperatur, der Salzgehalt, der pH-Wert und organische Lösungsmittel, die in der Matrix enthalten sein können.

### 3.3.3. TEMPERATUREINFLUSS

Wenn sich die Temperatur in der Lösung und Faser von  $T_0$  nach  $T$  ändert, ändert sich die Verteilungskonstante nach

$$K_{fs} = K_0 e^{-\frac{\Delta H}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad (21)$$

( $K_0$  = Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten bei  $T_0$ ,  $\Delta H$  = Änderung der molaren Enthalpie,  $T_0$  = beim Experiment festgelegte Ausgangstemperatur)

Die Enthalpieänderung bleibt, typisch für SPME-Experimente, bei Temperaturänderungen konstant. Sie kann durch die Bestimmung von  $K_{fs}$  bei zwei verschiedene Temperaturen berechnet werden. Die möglichen Temperatureffekte müssen bei der Variation Extraktionstemperatur berücksichtigt werden, z.B. externe Probenahme, beabsichtigte Beschleunigung der Extraktion durch Heizen oder beabsichtigte Erhöhung des Dampfdruckes bei Headspace-SPME.

Gleichung (21) bezieht sich nur auf die Verteilung zwischen zwei homogenen Phasen. Die Gleichung darf nicht für die Verteilung zwischen der Faser und einer Multikomponentenprobe angewendet werden. Sie kann jedoch für die Abschätzung eines Temperatureffektes genutzt werden.

### **3.3.4. AUSSALZEFFEKT**

Durch die Änderung des Salzgehaltes der Matrix kann die Extraktion von Analyten durch SPME beeinflusst werden. Eine Erhöhung des Salzgehaltes verbessert die Extraktion unpolarer Analyte, allerdings nur im Bereich von 0 bis 10 % Salzgehalt. Es empfiehlt sich für praktische Anwendungen, den Aussalzeffekt für die jeweilige Methode experimentell zu untersuchen.

### **3.3.5. EFFEKT DES pH-WERTES DER PROBE**

Bei Änderung des pH-Wertes einer wässrigen Lösung ändert sich  $K_{fs}$  für dissoziationsfähige Analyten, vorausgesetzt, dass nur die undissoziierte Form der Säure oder Base durch die Faserbeschichtung extrahiert werden kann.

### **3.3.6. EFFEKT DES GEHALTES AN ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN IN DER PROBE**

Die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels in Wasser ändert  $K_{fs}$ . Es besteht die Möglichkeit, die Änderung der Verteilungskonstante vorherzusagen. Es ist aus der Literatur [108] bekannt, dass die Lösungsmittelkonzentration größer als 1 % sein muss, um die Eigenschaften der wässrigen Lösung und der Verteilungskonstante maßgeblich zu verändern. Störungen der quantitativen Bestimmung durch die Veränderung der organischen Zusammensetzung der Matrix können durch eine Kalibrierung mittels internen Standard kompensiert werden.

### 3.4. KINETIK

Die Kinetik des Extraktionsprozesses bestimmt die Geschwindigkeit der Extraktion. Die meisten der Theorien des Massentransportes basieren auf dem zweiten FICK'schen Diffusionsgesetz, das die Massenbalance in einem dynamischen und eindimensionalen System als

$$\left(\frac{\delta c}{\delta t}\right)_x = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2}\right)_t \quad (22)$$

(t = Zeit, x = Koordinate eines eindimensionalen Raumes, D = Diffusionskoeffizient)

beschreibt. Für den dreidimensionalen Raum gilt demzufolge:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left( \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta y^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} \right) \quad (23)$$

(x, y, z = Koordinaten eines dreidimensionalen Raumes)

Wird die zylindrische Geometrie der Faser und des Probensystems berücksichtigt, wandelt sich Gleichung (23) in

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left( \frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} r \frac{\delta c}{\delta r} + \frac{1}{r^2} \frac{\delta^2 c}{\delta \theta^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} \right) \quad (24)$$

(r,  $\theta$ , z = Koordinaten eines dreidimensionalen und zylindrischen Raumes)

um.

Unter Berücksichtigung der zylindrische Geometrie der Faser und des Diffusionsprozesses ändert sich das Konzentrationsprofil in dem Polymer nicht entlang der Achse der Faser (Variable  $z$ ) und es hängt nicht vom Radialwinkel vom Faserzentrum ab (Variable  $\theta$ ). Somit gehen die Terme, die diese Differentialquotienten enthalten, gegen Null und können vernachlässigt werden:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left( \frac{\delta^2 c}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta c}{\delta r} \right) \quad (25)$$

Die Lösung der Gleichung (25) beschreibt das Konzentrationsprofil des Analyten im System als eine Funktion des Radius. Somit kann die Stoffmenge, die durch die Beschichtung extrahiert wird, als eine Funktion der Zeit durch Integration des Konzentrationsprofils entlang dem Radius berechnet werden:

$$n_f = 2\pi L_f \int_{r_a}^{r_i} c_1(r, t) r \cdot dr \quad (26)$$

( $L_f$  = Länge der Faser,  $r_a$  = äußerer Radius,  $r_i$  = innerer Radius)

Anhand kinetischer Betrachtungen können Möglichkeiten zur Erhöhung der Extraktionsgeschwindigkeit aufgezeigt werden. Entsprechend der Vereinfachungen des FICK'schen Gesetzes sind folgende Annahmen zu berücksichtigen: Es werden keine Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Gefäßoberfläche oder dem Faserkern angenommen. Faktoren, wie thermische Ausdehnung, Schwellung, und Analyt-Analyt-Wechselwirkungen, werden vernachlässigt.

### 3.4.1. DIREKTE EXTRAKTION

Der Extraktionsprozess in der SPME wurde detailliert unter Verwendung zweier Grenzmodelle mathematisch beschrieben, die unter verschiedenen Randbedingungen (Geometrie der Probe, Probengröße und Zugang der Analytmoleküle zu der Faser) entwickelt wurden [108, 110]. Das erste Modell beschreibt die Diffusion des Analyten aus einer optimal gerührten Lösung von unendlichem Volumen in die Faserbeschichtung. Als zweites Modell wird die Extraktion einer ungerührten Lösung von endlichem Volumen betrachtet.

Im optimal gerührten Prozess haben alle Analytmoleküle Zugang zu der Beschichtung, und die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts  $t_e$  kann durch

$$t_e = \frac{(r_a - r_i)^2}{2D_f} = t_{95\%} \quad (27)$$

( $t_e$  = Gleichgewichtszeit,  $D_f$  = Diffusionskoeffizient in der Faser,  $t_{95\%}$  = Zeit nach Extraktion von 95 % der möglichen Maximalmenge)

beschrieben werden. Da in der analytischen Statistik meist mit einem experimentellen Fehler von 5 % gerechnet wird [111], kann  $t_e$  der Zeit gleichgesetzt werden, die zur Extraktion von 95 % der möglichen Maximalmenge benötigt wird ( $t_{95\%}$ ). Die Einstellung des Gleichgewichts wäre sonst aufgrund der Vereinfachung des Modells ein unendlich langer Prozess.

Im realen Extraktionsprozess haben nicht alle Analytmoleküle gleichzeitig Zugang zur Faser. Deshalb wird in einem Modell eine PRANDTL-Grenzschicht mit einem Radius  $\alpha$  definiert, eine dünne Schicht um die Faser ohne Vermischung, angenommen. Die Größe des Radius ist von der Rührgeschwindigkeit und der Viskosität der Lösung abhängig. Die Zeit, die für eine maximale Extraktion benötigt wird, kann nun mit Hilfe von Gleichung (28) berechnet werden, wenn die Extraktion durch die Diffusion in der Grenzschicht kontrolliert wird:

$$t_e = t_{95\%} = 3 \frac{\alpha K_{fs} (r_a - r_i)^2}{D_s} \quad (28)$$

( $D_s$  = Diffusionskoeffizient in der Lösung)

Aus Gleichung (28) ist ersichtlich, dass die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts nun von den  $K_{fs}$ -Werten, von der Schichtdicke, von dem Diffusionskoeffizienten in der Lösung und von der Dicke der statischen Grenzschicht abhängig ist. Im Fall der perfekt gerührten Probenlösung ist die minimale Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts erreicht, und  $t_e$  hängt nur von der Geometrie der Faser und den Diffusionskoeffizienten der Analyten in der Faser ab (Gl. (27)). Im Fall des Modells der ungerührten Lösung kann zur Berechnung von  $t_e$  der Innenradius des Proben-Vials dem Radius  $\alpha$  der Grenzschicht in Gleichung (28) gleichgesetzt werden.

Von LOUCH [110] wurde eine lineare Proportionalität zwischen extrahierter und Ausgangsstoffmenge und unabhängig vom Erreichen von  $t_e$  gefunden. Dies wurde auch von AI [112] für die praktische Anwendung der SPME formuliert. Dieses Ergebnis vereinfacht die Anwendung der SPME entscheidend. Es muss für eine quantitative Analyse nicht bis zum Gleichgewicht extrahiert werden, sondern die Extraktionszeit kann den individuellen Anforderungen der jeweiligen Analyse angepasst werden.

### 3.4.2. HEADSPACE EXTRAKTION

Unter der Voraussetzung, dass sowohl die wässrige Phase als auch der Headspace perfekt gerührt werden, kann Gleichung (27) auch für die Headspace-SPME angewendet werden. Von PAWLISZYN [108] wurden ein einfaches, eindimensionales Diffusionsmodell für den Fall der praktischen Anwendung entwickelt. Unter der Voraussetzung, dass  $V_h > 10K_{fh}V_f$  ist, gilt für  $t_e$ :

$$t_e = t_{95\%} = 100 \frac{(K_{fh} V_f)^2}{D_h} \quad (29)$$

( $D_h$  = Diffusionskoeffizient im Gasraum)

Gleichung (29) kann für alle statischen Headspace-Extraktionen, die perfekt gerührte Probenlösung eingeschlossen, angewandt werden, vorausgesetzt, dass die Extraktion nur aus dem Headspace stattfindet.

### 3.5. MATRIX SERUM UND PLASMA

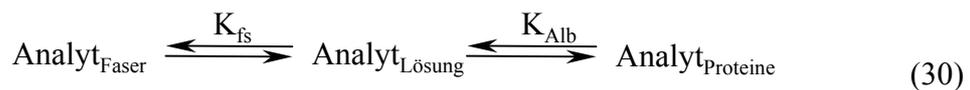
Die Analyse von Arzneistoffen in Serum und Plasma erweist sich aufgrund der Zusammensetzung der Matrix und deren möglichen Schwankungen als problematisch, da die Arzneistoffe in Wechselwirkung mit den Bestandteilen der Matrix stehen.

Serum ist der flüssige, nach erfolgter Blutgerinnung verbleibende Teil des Blutes (enthält kein Fibrinogen). Plasma ist der flüssige, nach Entfernen der Blutkörperchen verbleibende Anteil des ungerinnbar gemachten Blutes (enthält Fibrinogen). Der Anteil der Proteine im Serum und im Plasma beträgt ca. 7.5 %. Davon entfallen auf das Albumin 55 %, auf die Immunoglobuline 20 %, auf die Lipoproteine 11 % und auf das Fibrinogen 3.5 %. Weitere wichtige Bestandteile der Matrix im Bezug auf die SPME sind Fette (Triglyceride, Cholesterin, Lipoproteine, Phospholipide) mit einem physiologischen Gehalt zwischen 0.36 % und 0.82 % und Elektrolyte (z.B.  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ) mit einem Gesamtgehalt von ca. 300 mmol/l. In der Zusammensetzung des Plasmas kann sich

z.B. der Albumingehalt im Fall von Lebererkrankungen oder der Fettgehalt in Abhängigkeit vom Ernährungszustand ändern. Im Vergleich zu einigen Bereichen der Umweltanalytik besitzt diese Matrix jedoch aufgrund der physiologischen Grenzen eine relativ konstante und gut analysierte chemische Zusammensetzung.

Die verschiedenen Bindungsverhältnisse von Arzneistoffen an die Plasmaproteine wurden von LINDUP [113] und GUTHRIE [77] ausführlich diskutiert. Der Einfluss der Plasmaproteine auf die Analytik durch SPME wurde von ULRICH [63, 64] beschrieben. Während der Extraktion kommt es in der Probe zur Einstellung zweier Gleichgewichte:

- 1) das chemische Reaktionsgleichgewicht zwischen dem an die Proteine gebundenen und dem freien, in der Lösung vorliegenden Arzneistoff sowie
- 2) das Verteilungsgleichgewicht zwischen dem freien, in der Lösung vorliegenden Arzneistoff und dem bereits durch die Faser extrahierten Arzneistoff (Gl. (30)):



( $K_{\text{Alb}}$  = Gleichgewichtskonstante)

In der Literatur wird die Möglichkeit zur Bestimmung des freien Anteils von Phenolen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Wasser, das reich an gelösten polymeren organischen Stoffen (DOM) ist, mittels SPME und einer externen Kalibrierung beschrieben [114, 115]. Daraus folgend sollte untersucht werden, ob dies auch für die Bestimmung des freien Anteils an Arzneistoffen (wirksamer Anteil des Arzneistoffes) im Serum möglich ist. Da es sich beim Serum um eine sehr komplexe Matrix handelt (siehe oben), wurden diese Untersuchungen an Humanalbumin-Lösung als Modellsubstanz durchgeführt. Diese Modellmatrix erweist sich als sinnvoll, da die meisten Arzneistoffe im Körper zu einem großen Teil am Albumin gebunden sind [113].

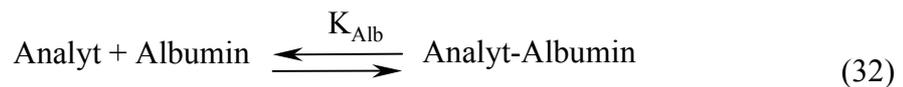
In einer heterogenen Matrix mit verschiedenen Phasen kann die Stoffmenge eines Analyten (m) in einer Phase (i) als

$$n_{i,m} = \frac{n_m^0 V_i}{V_i + \sum_{j \neq i} V_j K_{i,j,m}} \quad (31)$$

( $n_{i,m}$  = Stoffmenge des Analyten (m) in der Phase (i),  $n_m^0$  = Ausgangsstoffmenge des Analyten m,  $V_i$  = Volumen der Phase i,  $V_j$  = Volumen weiterer von i verschiedener Phasen,  $K_{i,j,m}$  = Gleichgewichtskonstante des Analyten zwischen den Phasen)

beschrieben werden.

In Albuminlösung stellt sich für den Arzneistoff folgendes Gleichgewicht ein:



das durch die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{Alb}}$  bestimmt wird (Gl. (33)):

$$K_{\text{Alb}} = \frac{c_{\text{geb}}}{c_{\text{frei}} c_{\text{Alb}}} \quad (33)$$

( $c_{\text{geb}}$  = Konzentration des an Albumin gebundenen Analyten,  $c_{\text{frei}}$  = Konzentration des freien Analyten (freier Anteil),  $c_{\text{Alb}}$  = Konzentration der Bindungsstellen des Albumins)

Mit  $c_{\text{Alb}} = c_{\text{Alb}}^0 - c_{\text{geb}}$  ( $c_{\text{Alb}}^0$  = Konzentration der Bindungsstellen des Albumins vor dem Gleichgewicht) und der Annahme  $c_{\text{geb}} \ll c_{\text{Alb}}^0$ , die für Spurenanalytik gültig ist, folgt  $c_{\text{Alb}} \cong c_{\text{Alb}}^0$  und man erhält durch Substitution der Konzentrationen und durch Umformen von Gleichung (33):

$$K_{\text{Alb}} = \frac{n_{\text{geb}} V_s}{n_{\text{frei}} n_{\text{Alb}}^0} \quad (34)$$

( $n_{\text{geb}}$  = Stoffmenge des an Albumin gebundenen Analyten,  $n_{\text{frei}}$  = Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil),  $n_{\text{Alb}}^0$  = Stoffmenge der Bindungsstellen des Albumins)

Somit erhält man für die freien Anteil des Analyten vor der Extraktion mit  $n^0 = n_{\text{geb}} + n_{\text{frei}}$ :

$$n_{\text{frei}} = \frac{n^0 V_s}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} \quad (35)$$

Für die Gleichgewichtseinstellung nach der Extraktion wird Gleichung (35) mit  $n^0 = n_{\text{geb}} + n_{\text{frei}} + n_f$  um den Term für die Faser erweitert:

$$n'_{\text{frei}} = \frac{n^0 V_s}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}} + V_f K_{\text{fs}}} \quad (36)$$

( $n'_{\text{frei}}$  = Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil) nach Gleichgewichtseinstellung)

Das Verhältnis des freien Anteils des Analyten vor und nach der Extraktion wird somit durch Gleichung (37) bestimmt:

$$\frac{n_{\text{frei}}}{n'_{\text{frei}}} = 1 + \frac{V_f K_{fs}}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} \quad (37)$$

Wird der freie Anteil des Analyten um weniger als 10 % durch die Extraktion verändert, gilt:

$$\frac{V_f K_{fs}}{V_s + n_{\text{Alb}}^0 K_{\text{Alb}}} < 0.111 \quad (38)$$

Ist Gleichung (38) für den zu untersuchenden Analyten erfüllt, kann der freie Anteil des Analyten direkt durch eine externe Kalibrierung bestimmt werden [115].

## **4. GERÄTE UND MATERIALEN**

### **4.1. SPME-FASERN UND HALTER**

Für die Methodenvalidierungen kamen die kommerziell im Handel erhältlichen SPME-Fasern sowie die manuellen Faserhalterungen von der Firma Supelco (Deisenhofen) zum Einsatz (siehe auch Abb. 2). Als Faserbeschichtungen zur Extraktion wurden PDMS in verschiedenen Schichtdicken (100  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ ), PA sowie CW-DVB verwendet. Vor der Erstbenutzung wurden die Fasern nach Herstellerempfehlung konditioniert.

### **4.2. APPARATE**

Zur Extraktion wird eine Apparatur verwendet, die simultan die Bearbeitung von bis zu 24 Proben zulässt (Abb. 2). Zunächst wurden jeweils sechs Proben gleichzeitig extrahiert. Dieser einfache Aufbau erlaubt eine wesentliche Erhöhung des Probendurchsatzes der SPME und damit der Wirtschaftlichkeit der Probenaufarbeitung und wurde in dieser oder einer ähnlichen Form bisher noch nicht beschrieben.

Sechs Fasern wurden jedes Mal parallel für 6 Messungen benutzt. Eine spezielle Ausrüstung wurde für dieses Ziel entwickelt. Diese Ausrüstung besteht aus einem einfachen Plastikbrett mit 24 Bohrungen, das zwischen zwei Stativstäben über dem Schüttler gehalten wird. Maximal 24 Fasern können simultan extrahieren, da der Schüttler 24 Plätze hat und die Bohrungen diesen angepasst sind. Die Durchmesser der Bohrungen wurden durch die Durchmesser der manuellen Faserhalter (Supelco) bestimmt.



Abb. 2 SPME-Apparatur zur simultanen Probenextraktion.

Ein Hewlett-Packard (HP) 5890 *series II* Gaschromatograph mit einem NPD und einem split-splitless Injektor wurde für die Analysen genutzt. Die chromatographischen Bedingungen werden in den einzelnen Kapiteln zur Methodvalidierung detailliert beschrieben (Kap. 6). Die HP-GC-Chemstation-Software wurde für die Berechnung der Retentionszeiten, Peak-Breiten und –Flächen genutzt.

Für die Vergleichsmessung mittels der Kombination GC-MS wurden mit folgenden Geräten unter den angegebenen Bedingungen gearbeitet: Für Amitriptylin wurde ein Hewlett-Packard 5890 *series II* Gaschromatograph mit einem Massenselektiven Detektor (5972 MSD) und einem split-splitless Injektor für die Analysen genutzt. Der Injektor arbeitete während der Desorption im splitless Modus bei 260 °C. Für den Ofen wurde ein Temperaturprogramm genutzt ( $T_1 = 140\text{ °C}$ ,  $\text{Rate}_1 = 30\text{ °C/min}$ ,  $T_2 = 230\text{ °C}$ ,  $\text{Rate}_2 = 4\text{ °C/min}$ ,  $T_3 = 260\text{ °C}$ ). Als Trennsäule wurde eine HP-5-Kapillarsäule (25 m • 0.22 mm I.D.; 0.33  $\mu\text{m}$  Film) genutzt. Das Trägergas war Helium mit einem Fluss von 1.0 ml /min. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß mit 70 eV. Der Detektor arbeitete im SIM (selective ion monitoring)-Modus ( $m/z = 202$  und 217).

Für Venlafaxin wurde ein Hewlett-Packard 5890 *series* II Gaschromatograph mit einem Massenselektiven Detektor (5989A MS) und einem split-splitless Injektor für die Analysen genutzt. Der Injektor arbeitete während der Desorption im splitless Modus bei 270 °C. Für den Ofen wurde ein Temperaturprogramm genutzt ( $T_1 = 160$  °C,  $Rate_1 = 35$  °C/min,  $T_2 = 230$  °C,  $Rate_2 = 4$  °C/min,  $T_3 = 258$  °C). Als Trennsäule wurde eine HP-5-Kapillarsäule (25 m • 0.22 mm I.D.; 0.33 µm Film) genutzt. Das Trägergas war Helium mit einem Fluss von 1.4 ml /min. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß mit 70 eV. Der Detektor arbeitete im SIM-Modus ( $m/z = 134$  und 58). Die Temperatur der Quelle betrug 220 °C und die des Quadrupols 100 °C.

#### 4.3. REFERENZSUBSTANZEN, CHEMIKALIEN UND BIOLOGISCHES MATERIAL

Eine Übersicht der verwendeten Referenzsubstanzen für die untersuchten Arzneistoffe, ihrer Metabolite und der eingesetzten internen Standards ist in Tabelle 2 enthalten.

Arzneistoff/Metabolit Innerer Standard	Herkunft
Clozapin	Sandoz AG, Schweiz
Clozapin-N-oxid*	RBI Research Biochemicals International, USA
Desmethylclozapin*	RBI Research Biochemicals International, USA
Loxapin*	RBI Research Biochemicals International, USA
Levomepromazin*	Egyt Budapest, Ungarn
Chloramitriptylin*	Lundbeck Laboratorien, Dänemark
Clomipramin*	RBI Research Biochemicals Incorporated
Desmethylclomipramin*	Ciba Geigy, Schweiz
Olanzapin	Eli Lilly and Company
Ethylolanzapin	Eli Lilly and Company
Clomethiazol*	Astra GmbH
5-Methylthiazol	Fluka, Deisenhofen
Amitriptylin*	RBI Research Biochemicals International
Nortriptylin*	RBI Research Biochemicals Incorporated
Desipramin*	RBI Research Biochemicals International
Diazepam	Arzneimittelwerk Dresden
Desmethyldiazepam	Arzneimittelwerk Dresden
Prazepam	Gödecke AG Freiburg
Venlafaxin*	Lederle Laboratories, USA
E-10-Hydroxyamitriptylin	Lundbeck Laboratorien, Dänemark
Haloperidol	RBI Köln
reduziertes Haloperidol	RBI Köln
Chlorhaloperidol	RBI Köln
Mirtazapin	Thiemann Arzneimittelwerk GmbH

Tab. 2 Übersicht der untersuchten Arzneistoffe, ihrer Metabolite sowie interner Standards

\*lagen als Hydrochloride oder Salze vor

Eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien gibt die Tabelle 3.

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>
i-Amylalkohol p.a.	Merck Darmstadt
n-Hexan p.a.	Merck Darmstadt
Methanol p.a.	Merck Darmstadt
Natriumcarbonat-10-Hydrat reinst	Riedel de Haen Deisenhofen
Natriumchlorid p.a.	Laborchemie Apolda
Natriumhydroxid p.a.	Merck Darmstadt
Salzsäure, rauchend p.a.	Merck Darmstadt
Trichloressigsäure p.a.	Merck Darmstadt
Albumin-Infusionslösung (5 Ma-% Albumin)	Bayer AG Leverkusen
Triglyceride (Palmitin-, Linol-, Stearin-)	Sigma Deisenhofen

Tab. 3 Übersicht der genutzten Chemikalien

Das verwendete Reinstwasser wurde durch eine „Milli-Q“-Apparatur von Millipore Eschborn sowie durch eine „EASY pure UV“-Apparatur von Werner Reinstwassersysteme Leverkusen hergestellt. Leerplasma sowie Leerserum wurden von gesunden Probanden gewonnen.

Es wurde von jedem Arzneistoff, Metaboliten und internen Standard eine Stammlösung hergestellt. In der Regel enthielten diese Stammlösungen 100 µg/ml Referenzsubstanz. Die Einwaagen und die verwendeten Lösungsmittel sind im Anhang (I) zusammengefasst.

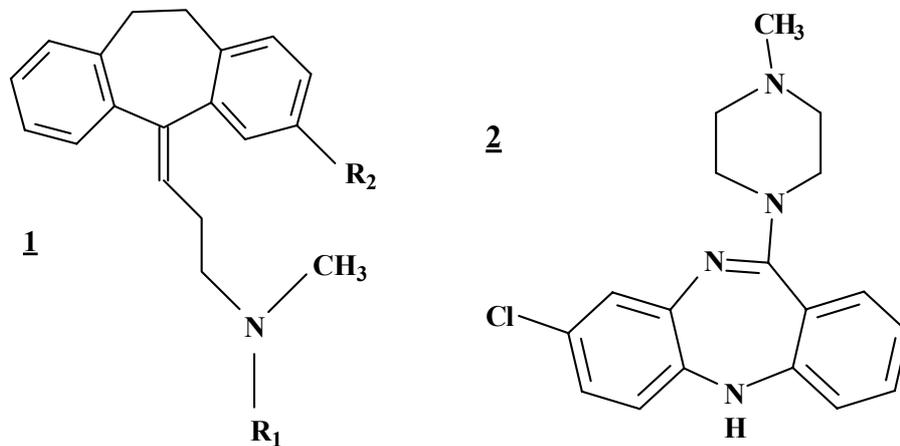
Die Referenzlösungen für die Herstellung von Kalibrierseren und Präzisionskontrollen wurden durch Verdünnen der Stammlösung (100 µg/ml) mit Wasser hergestellt. Die Referenzlösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Lösung von 1 M NaOH mit 6 % NaCl wurde durch Lösen von 4 g NaOH und 6 g NaCl in 100 ml Wasser erhalten. Gesättigte Dinatriumcarbonatlösung wurde durch Lösen von 22 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> • 10H<sub>2</sub>O in 100 ml Wasser hergestellt. Die Lösungen von 0.1 M und 6 M Trichloressigsäure wurden durch Lösen von 0.4 g sowie 24.5 g in 25 ml Wasser zubereitet. Eine Mischung von 50 %igen Methanol wurde durch Zugabe von 50 ml Methanol zu 50 ml Wasser hergestellt. Die n-Hexan/i-Amylalkohol-Gemische wurden durch anteilige Zugabe von i-Amylalkohol zu n-Hexan erhalten.

Plasma wurde mit den jeweiligen wässrigen Referenzlösungen zur Herstellung von Kalibrierserien und Präzisionskontrollen versetzt. Es wurde dabei beachtet, dass das Volumen des zugegebenen Wassers immer konstant 5 % des Plasmavolumens betrug, um mögliche Messfehler durch unterschiedliche Wasseranteile auszuschließen.

## 5. VORVERSUCHE ZUR METHODENVALIDIERUNG

Als Modellarzneistoffe wurden zunächst Vertreter der trizyklischen Antidepressiva (TZA) und das Neuroleptikum Clozapin ausgewählt (Abb. 3).



	<i>R</i> <sub>1</sub>	<i>R</i> <sub>2</sub>
Amitriptylin	CH <sub>3</sub>	H
Nortriptylin	H	H

Abb. 3 Chemische Struktur von trizyklischen Antidepressiva (1) und Clozapin (2).

Im Unterschied zur vorangegangenen Arbeit [64] wurde aber von vorn herein auf für das TDM relevante, niedrigere Konzentrationen orientiert. Der Einfluss folgender Parameter auf die Methode wurden untersucht:

- Extraktionsparameter (Zeit, Temperatur, Verfahren u.a.)
- Matrixeffekte (Proteine, Fette, Elektrolyte)
- chromatographische Bedingungen (Injektor, Säule, Desorption u.a.)
- Faserbeständigkeit

## 5.1. OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

### 5.1.1. EXTRAKTIONSZEIT

Die Extraktionskinetik wurde mittels Variation der Extraktionszeit von 5 min bis 24 h in Wasser und in Plasma (drei Messungen pro Zeit) untersucht.

Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der Peakflächen von Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit. Das Gleichgewicht wurde nach ca. 720 min Extraktion einer Plasma-Wasser-Mischung (1 : 7 Volumenanteile) mit einer 100- $\mu$ m-PDMS-Faser erreicht. Als ein Kompromiss zum Zeitaufwand der Methode wurde eine Extraktionszeit von 30 min in weiteren Experimenten genutzt. Der Extraktionsgraph in Wasser ist äquivalent. Allerdings wurde das Gleichgewicht bereits nach 180 min erreicht (Abb. 5).

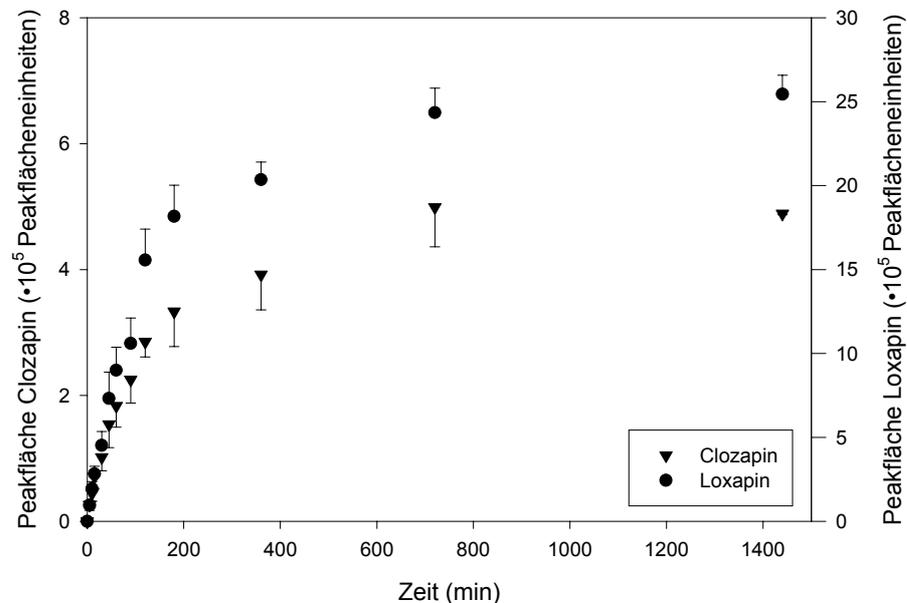


Abb. 4 Abhängigkeit der Peakflächen von Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit in Plasma (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SA), drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 50 ng/ml Analyt im Extraktions-Vial und einem Volumen von 1.5 ml

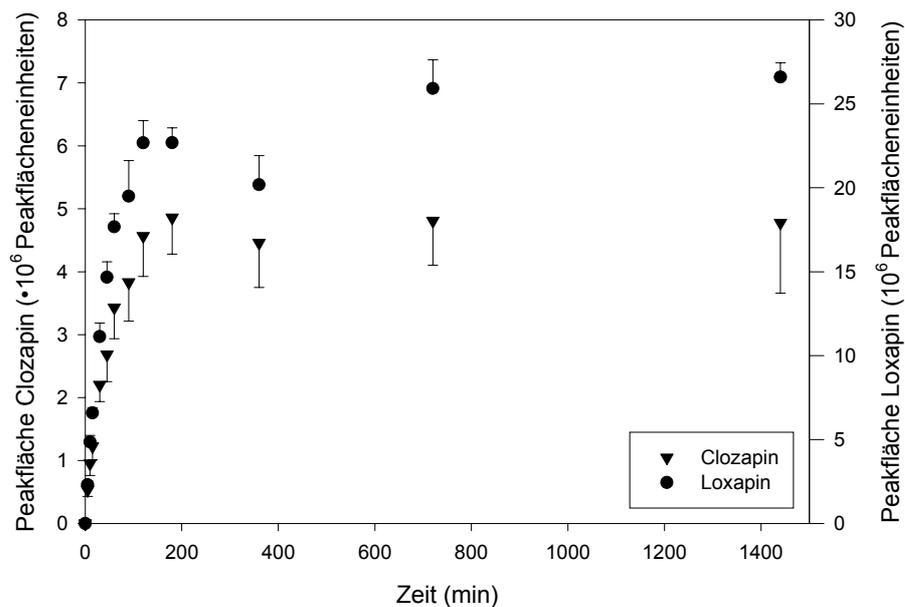


Abb. 5 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit in Wasser ( $MW \pm SA$ , drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 400 ng/ml Analyt im Extraktions-Vial und einem Volumen von 1.5 ml

### 5.1.2. EXTRAKTIONSTEMPERATUR

Eine eindeutige Temperaturabhängigkeit der Extraktion (niedrigere Verteilungskonstanten bei höheren Temperaturen) wurde nur für Clozapin und die TZA mit tertiärer (Amitriptylin, Clomipramin), nicht aber sekundärer (Nortriptylin, Desipramin) Aminstruktur gefunden (Abb. 6). Mögliche Ursachen sind sekundäre Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen der  $NR_2H$ -Moleküle.

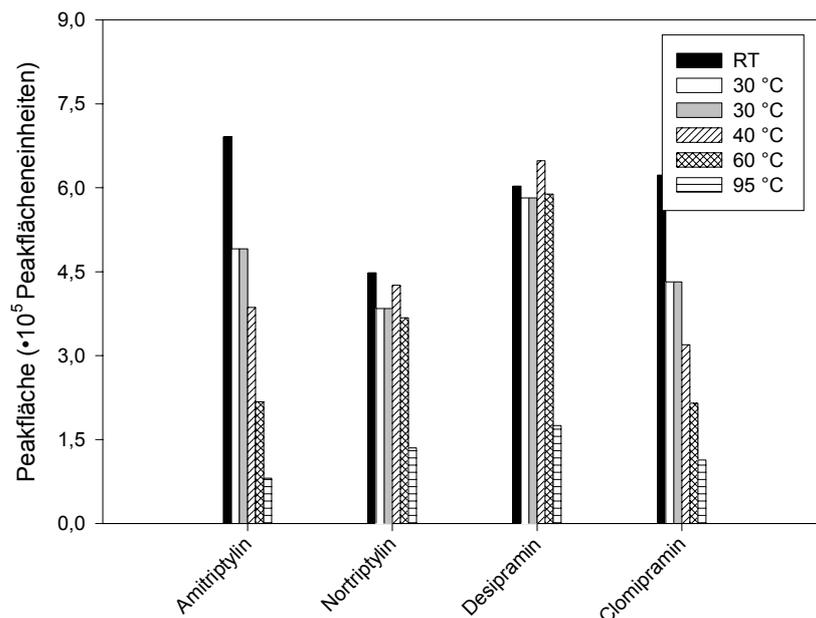


Abb. 6 Abhängigkeit der Peakfläche (im Gleichgewicht) von der Extraktionstemperatur für TZA

Äquivalente Untersuchungen für die Extraktion aus Plasmaproben konnten nicht durchgeführt werden, da die Matrix Proteine enthält, welche bei höheren Temperaturen denaturieren und an der Faser haften bleiben. Die direkte SPME von Plasmaproben wurden bei einer Temperatur von 30 °C und Headspace-Untersuchungen bei Raumtemperatur (RT = 24°C) durchgeführt.

### 5.1.3. EXTRAKTIONSVERFAHREN

#### Direkt- / Headspace-SPME

Für die Extraktion mittels SPME-Fasern bieten sich zwei Verfahren an: die direkte SPME und die SPME aus dem Dampfraum über der Probe (Headspace). Die Headspace-SPME ist gegenüber der direkten Methode schonender und sauberer. Die Faser wird dabei nicht direkt dem zu extrahierenden Medium ausgesetzt, und Kontaminationen und Interferenzen, die aus der Matrix stammen, werden vermieden. Aufgrund der sehr geringen Flüchtigkeit der zu untersuchenden Arzneistoffe scheint der Einsatz der Headspace-Technik ausgeschlossen. Beim Versuch, Clozapin mittels Headspace-SPME aus Wasser zu

extrahieren, konnte auch nach 3 h Extraktionszeit der Analyt auf der Faser nicht nachgewiesen werden. Eine Ausnahme ist das Clomethiazol aufgrund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften. Als lipophiler, leicht flüchtiger und in relativ hohen Konzentrationen im Blut vorliegender Arzneistoff ist es eine optimale Verbindung zur Anwendung der Headspace-SPME. Bisher ist in der Literatur nur wenig über dieses mögliche Verfahren der Arzneimittelanalytik beschrieben [45, 46, 56, 58, 65]. Auf die Untersuchungsergebnisse dazu wird im Kapitel 6.4. der Arbeit eingegangen werden.

#### Agitationsart

Da in der Literatur zur SPME verschiedene Methoden der Probenagitation (Rühren oder Schütteln der Probe, Bewegen der Faser durch Drehen oder Vibration, Ultraschall) beschrieben werden, sollte im Rahmen der Untersuchungen auch die Möglichkeit des Ultraschalls zur Unterstützung der Extraktion getestet werden [5, 34]. Dazu wurden die Probenbehältnisse in ein Ultraschallbad gegeben und über verschiedene Zeiten bei Raumtemperatur extrahiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Plasmaproben auch auf diese Weise extrahiert werden können (Abb. 7). Allerdings ist die Extraktionsausbeute bei Clozapin etwas geringer als bei den geschüttelten Proben. Bei Loxapin fallen die Unterschiede weitaus höher aus. Untersuchungen zur Extraktionskinetik zeigen, dass sich die Einstellung des Gleichgewichts verzögert.

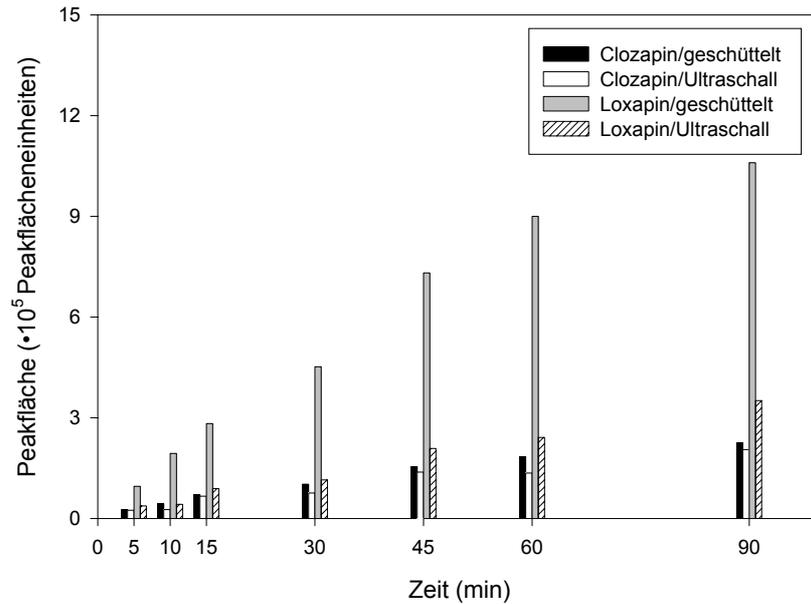


Abb. 7 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Probenagitation

#### Schüttelgeschwindigkeit

In der Literatur werden zur Beschreibung der Kinetik zwei Grenzmodelle beschrieben: die statische und die optimal gerührte Lösung (siehe auch Kapitel 3.4.) [110]. Deshalb wurde auch der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Extraktionsausbeute untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Wie erwartet, nehmen die extrahierten Mengen mit steigender Geschwindigkeit zu. Bei einer Geschwindigkeit von 1000 U/min trat jedoch Probenmaterial aus den Gefäßen aus. Deshalb wurde bei weiteren Untersuchungen mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min gearbeitet.

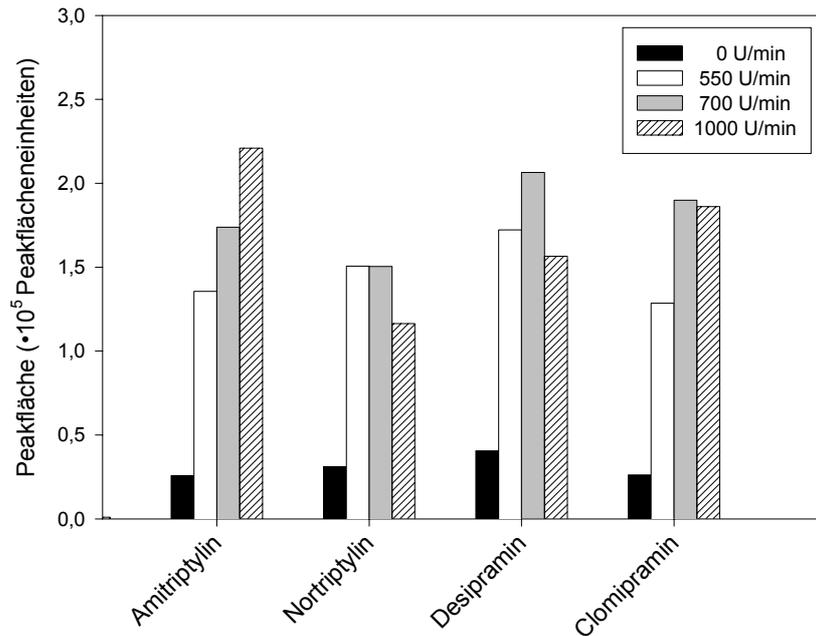


Abb. 8 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Schüttelgeschwindigkeit

#### 5.1.4. WEITERE EXTRAKTIONSPARAMETER

##### Extraktionsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit sollten insbesondere ZNS-wirksame Pharmaka, die stark lipophil sind, untersucht werden. Bei der Auswahl der SPME-Fasern schien die PDMS-Faser besonders geeignet für lipophile Substanzen. Auch ihre Robustheit gegenüber chemischen Einflüssen zeichnet sie gegenüber anderen Fasertypen aus. Zur Untersuchung dieser Aussage wurden wässrige Proben mit PDMS-Faser unterschiedlicher Beschichtungsdicke und mit PA-Faser extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Extraktionsausbeute der TZA aus der Extraktion mit der 100- $\mu$ m-PDMS-Faser liegt deutlich höher als die mit der PA-Faser. Da die PA-Faser hauptsächlich für die Extraktion polarer Substanzen empfohlen wird (siehe Kap. 3.2.), entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Bei verschiedenen Methodenvalidierungen wurden die PA- und die neueren CW-DVB-Fasern jedoch wiederholt getestet. Die Ergebnisse werden im Kapitel 6. der Arbeit diskutiert.

Die PDMS-Fasern werden vom Hersteller mit unterschiedlichen Beschichtungsdicken für verschiedene Anwendungsgebiete angeboten. In den Vorversuchen sollten diese

Faservarianten auf eine mögliche Nutzung in der Arzneimittelanalytik getestet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Die 100- $\mu\text{m}$ -Fasern ergaben die bessere Sensitivität (Messung im Nichtgleichgewicht bei einer Extraktionszeit von 30 min aus Wasser). Sie wurden, mit Ausnahmen, für weitere Untersuchungen eingesetzt, zumal die Extraktionsausbeute bei Serumproben noch stark zurückgeht.

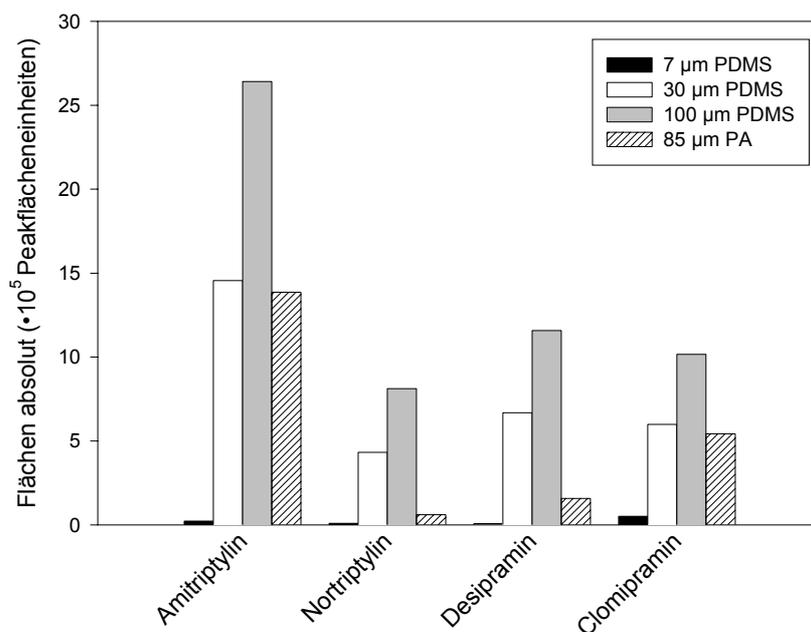


Abb. 9 Abhängigkeit der Peakflächen vom Extraktionsmittel und der Beschichtungsdicke

### Einfluss des pH-Wertes

Es ist aus der Literatur bekannt, dass der pH-Wert der zu extrahierenden Lösung den  $K_{fs}$ -Wert des Analyten beeinflussen kann [108]. Zur Untersuchung dieses Parameters wurden als Modellsubstanz das Benzodiazepin Diazepam und sein Metabolit Nordazepam ausgewählt (siehe Kap. 6.6.). Der Grund für diese Auswahl sind die zwei  $pK_a$ -Werte für das Nordazepam (3.5 und 12.0). Der  $pK_a$ -Wert für Diazepam liegt bei 3.3. Für die Untersuchung wurden Leerplasma und mit den Analyten versetztes Plasma bei verschiedenen pH-Werten mittels PDMS-Faser extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Für Nordazepam entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen. Die beste Extraktionsergebnisse werden bei  $\text{pH} = 8$  erreicht. Für Diazepam liegen die optimalen Extraktionsbedingungen entgegen den Erwartungen bei  $\text{pH} = 13$ . Als Ursache hierfür können die schlechte Löslichkeit in wässrigen und die sehr gute Löslichkeit in

organischen Lösemitteln genannt werden. Dieser Löslichkeitseffekt überlagert vermutlich den Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktion. Interessant ist, dass die Extraktion der matrixbedingten Verunreinigungen (Interferenzen Diazepam) stark vom pH-Wert beeinflusst wird. Die hier dargestellten Ergebnisse sind nur Vorversuche für eine Methodvalidierung. Im Kapitel 6.6. werden die zu diesem Problem weiterführenden Untersuchungen und ihre Ergebnisse diskutiert.

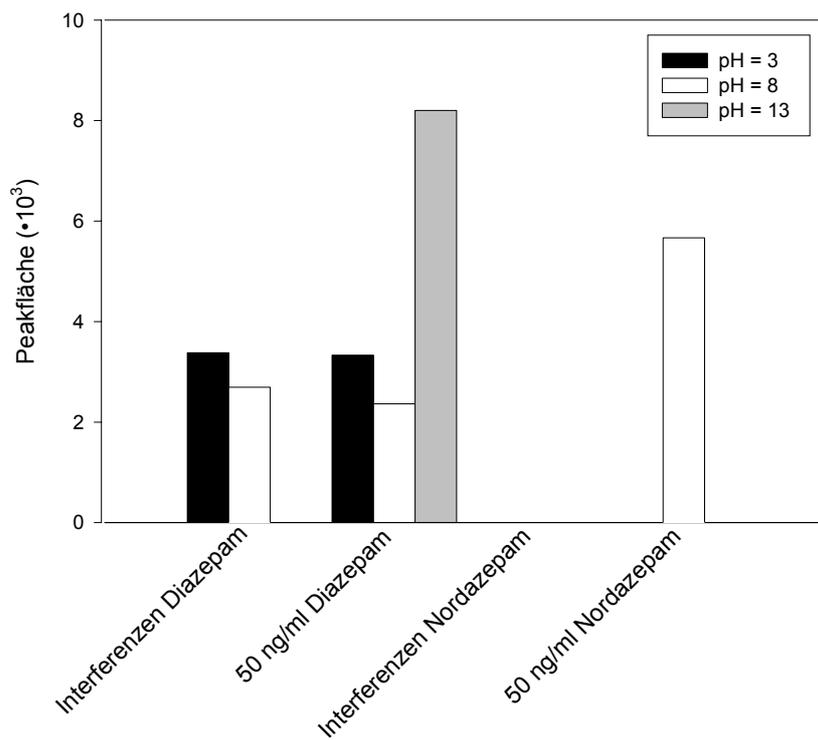


Abb. 10 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute und matrixbedingter Interferenzen vom pH-Wert der Probe (Extraktion aus Plasma mittels PDMS-Faser)

### Extraktionsgefäß

Für die Arzneimittelanalytik in Plasma wird in der Literatur oft die Verwendung von silanisierten Glasgeräten beschrieben [76, 89, 90]. Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses wurden Extraktionen von wässrigen Lösungen aus silanisierten und nicht silanisierten Glas-Vials sowie *ependorf*-Vials aus Polyethylen durchgeführt. Es wurde kein Einfluss des verwendeten Extraktionsgefäßes gefunden (Abb. 11). Zu weiteren Untersuchungen wurden aus praktischen Überlegungen die *ependorf*-Vials

(medizinisches Einwegmaterial) verwendet. Alle weiteren verwendeten Glasgeräte wurden allerdings einer besonderen Reinigung unterzogen [76, 89, 90].

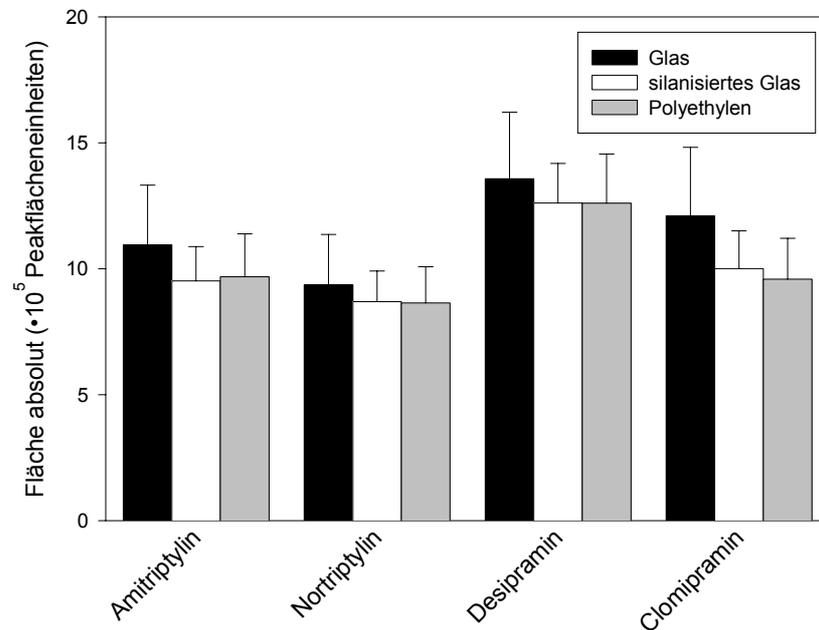


Abb. 11 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von Material des Extraktionsgefäßes (MW  $\pm$  SA, zehn Bestimmungen pro Messpunkt)

## 5.2. MATRIXEFFEKTE

Es wurde der Einfluss von Änderungen der Matrix untersucht. In Erweiterung zu den entsprechenden Arbeiten bei TZA (Gesamtproteinkonzentration, Konzentration von saurem  $\alpha$ -Glykoprotein) [64] wurden dabei auch Änderungen der Triglycerid- und der Elektrolytkonzentration im Plasma untersucht.

### 5.2.1. PROTEINGEHALT

Mit Clozapin und Loxapin versetztes Humanplasma wurde mit 0 bis 9 Volumenanteilen Wasser verdünnt, um den Einfluss der Plasmaproteine zu untersuchen.

Abbildung 12 zeigt den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Extraktion. Die Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung der Proben mit Wasser geändert. Trotz der sinkenden Analytkonzentration in den verdünnten Proben bleiben die Peakflächen von Clozapin und Loxapin über den untersuchten Messbereich relativ konstant. Das trifft insbesondere auch für die Peakflächenverhältnisse zu. Dagegen steigen die Peakflächen an, wenn die Konzentration der Analyten bei sinkender Proteinkonzentration konstant gehalten wird. Dieser Effekt der Plasmaproteine wurde bereits detailliert in einer früheren Publikation beschrieben [64]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Plasmaproben in weiteren Experimenten 1:7 mit Wasser verdünnt. Somit sollte der Einfluss von Änderungen der Proteinkonzentration auf die Methode verringert werden. Außerdem wurde die Anwendungsdauer der Fasern erhöht, da die Verunreinigung der Faser durch anhaftende Proteine, die während der Desorption bei Temperaturen von 200 °C bis 300 °C in dem Faserfilm fixiert werden, ebenfalls verringert wird.

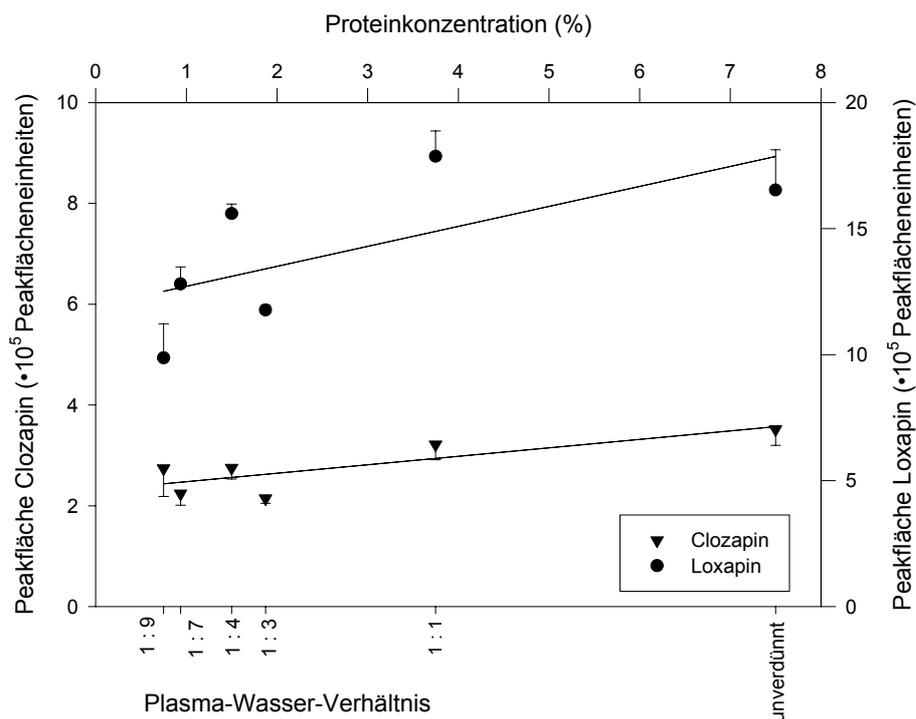


Abb. 12 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Verdünnung der Proben mit Wasser (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 500 ng/ml Analyt in der Probe ohne Verdünnung

### 5.2.2. FETTGEHALT

Ein Einfluss der Triglyceridkonzentration auf die Extraktion wurde angenommen, da die untersuchten Arzneistoffe stark lipophil sind. Es wurde eine Mischung aus wässriger Albuminlösung (5 Ma-% Albumin) mit drei verschiedenen Triglyceriden (Palmitin-, Linol-, Stearintriglycerid) in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0 bis 5 mg/ml Triglyceride) für die Untersuchungen hergestellt. Diese Untersuchungen wurden bei zwei Clozapinkonzentrationen (500 ng/ml und 1 µg/ml) durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt den Zusammenhang zwischen Fettgehalt und den Peakflächen von Clozapin und Loxapin. Trotz einer z.T. großen experimentell bedingten Streuung konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Fettgehalt die Peakflächen von Clozapin und Loxapin sinken (Cloz:  $r = 0.411$ ,  $p = 0.09$ ; Lox:  $r = 0.612$ ,  $p = 0.007$ ; lineares Modell, Software SPSS). Dies lässt sich mit der steigenden Lipophilie der Matrix erklären, die die Extraktion der lipophilen Arzneistoffe senkt. Einschränkend ist aber festzustellen, dass die ansteigende Viskosität der Matrix diesen Effekt ebenfalls erklären könnte, da die Diffusion der Analyten abnimmt und nicht im Gleichgewicht gemessen wurde.

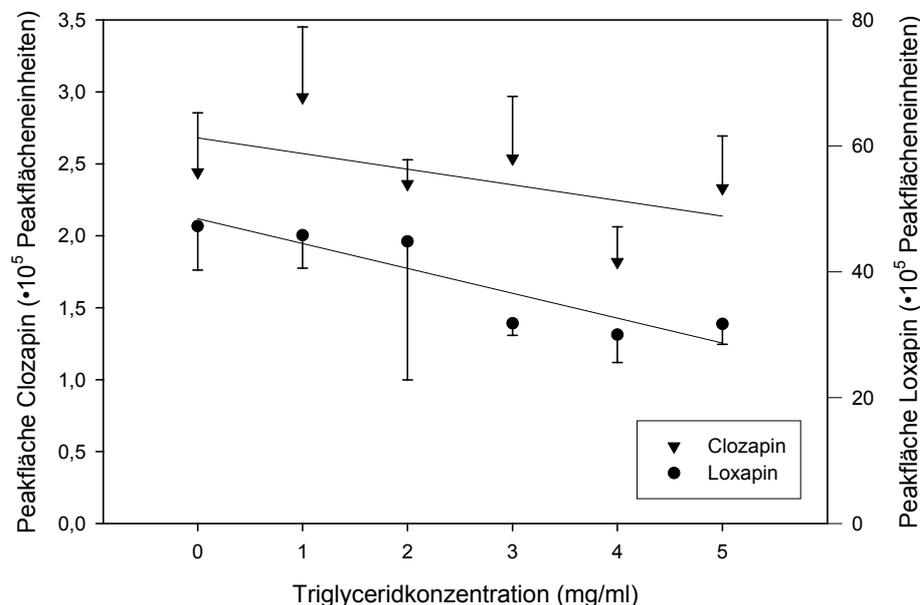


Abb. 13 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Triglyceridkonzentration (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) unter Nutzung der SPME-Standardmethode mit je 500 ng/ml Cloz in der Probe

Die Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  bleiben mit steigendem Fettgehalt insgesamt gleich (Abb. 14). Außerdem muss beachtet werden, dass die physiologische Konzentration von Fetten im Humanplasma sich zwischen 2.4 mg/ml und 4.2 mg/ml bewegt. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die physiologische Variabilität der Matrix (hochlipemisches Plasma eingeschlossen) die Methode nicht beeinflusst, da die Änderungen von  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  innerhalb der Präzision der Methode liegen (siehe Kap. 6.1.).

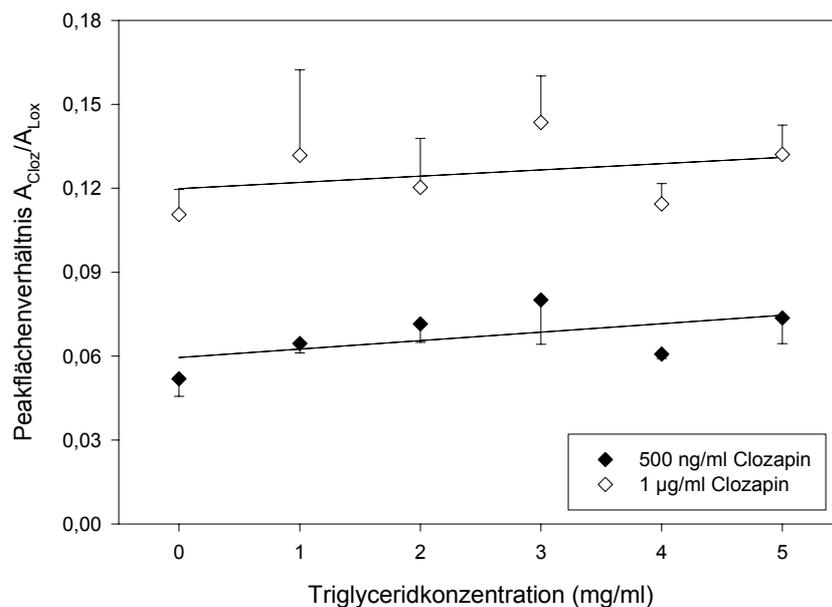


Abb. 14 Abhängigkeit der Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  bei zwei Clozapinkonzentrationen (500 ng/ml und 1 µg/ml) von der Triglyceridkonzentration (MW ± SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) unter Nutzung der SPME-Standardmethode

### 5.2.3. ELEKTROLYTGEHALT

Die NaCl-Konzentration wurde von 0 bis 20 % variiert, um den Aussalzeffekt zu untersuchen.

Abbildung 15 zeigt den Einfluss der Zugabe von NaCl zur Matrix. Die Peakflächen von Clozapin und Loxapin ändern sich im Bereich von 0 bis 8 % NaCl-Gehalt nicht. Bei

höheren Konzentrationen von NaCl (8 % bis 20 %) sinken die Peakflächen. Ein empirisches Modell

$$y = (-b_0x/(b_1-x)) + b_2 \quad (39)$$

(y = Peakflächen, x = Salzkonzentration) wurde an die Daten angepasst und es wurde eine ausreichende Übereinstimmung gefunden (Cloz: r = 0.990, p = 0.029; Lox: r = 0.981, p = 0.057; Software SPSS). Die sinkenden Peakflächen können durch die ansteigende Viskosität der Proben mit steigenden Salzgehalt erklärt werden. Dieser Effekt überlagert das Ansteigen der Peakflächen aufgrund der steigenden Polarität, wie es für lipophile Arzneistoffe bereits untersucht wurde. Die Peakflächenverhältnisse ändern sich mit steigendem Salzgehalt nicht.

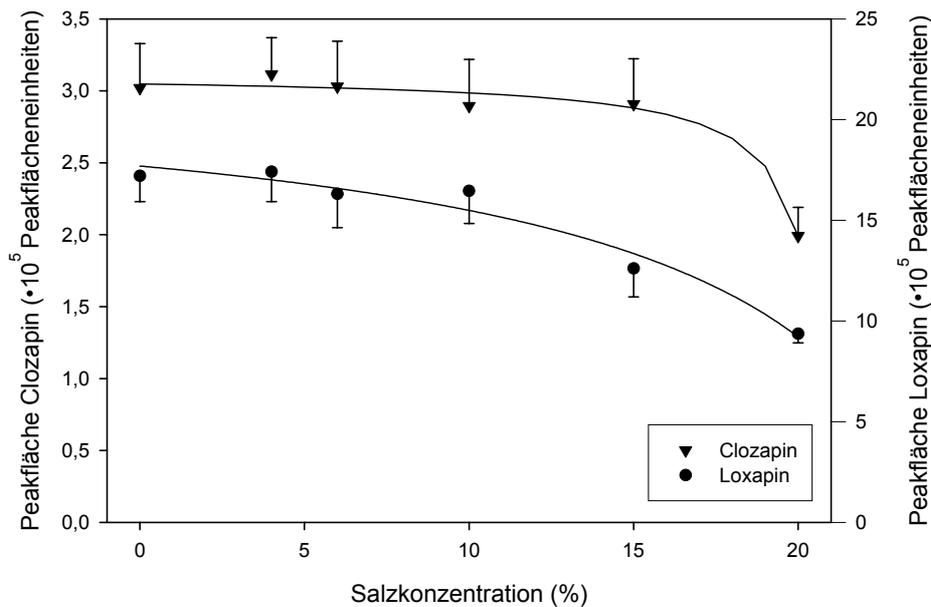


Abb. 15 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Salzkonzentration (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 500 ng/ml Analyt in der Probe

Im wesentlichen entspricht der Einfluss der untersuchten Extraktionsparameter den theoretischen Erwartungen und den experimentell aus der Umweltanalytik bekannten Ergebnissen. Einige Besonderheiten ergeben sich aber aus den speziellen chemischen und

physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe. Es wurde gezeigt, dass die (insgesamt geringfügigen) Schwankungen der Zusammensetzung von Plasma keinen Einfluss auf das Analysenergebnis haben. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Matrixänderungen die Peakflächen der Analyten und internen Standards teilweise beeinflussen. Das trifft auch auf die alternative Verwendung von Serum zu, was ebenfalls eine geringfügige Änderung der Matrix darstellt. Die Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Analyt}}/A_{\text{I.S.}}$  bleiben jedoch konstant innerhalb der Präzision der Methode. Aufgrund der niedrigen Wiederfindungsrate der Methode ist es wichtig, diese Matrixeinflüsse auf die Ergebnisse auszuschließen. Die Auswahl des internen Standards ist entscheidend für die Entwicklung einer SPME-Methode in Humanplasma. Im Vergleich zu anderen Gebieten der chemischen Analytik ist es oft einfacher, geeignete interne Standards für die Arzneistoffanalytik zu finden, da bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe eine Vielzahl von ähnlichen Substanzen synthetisiert werden. Da diese dann aber nicht allgemein verfügbar sind, ist ein Auftreten als Verunreinigung in der Matrix ausgeschlossen. Trotzdem kann im Einzelfall auch in der Arzneistoffanalytik die Auswahl eines guten inneren Standards Probleme bereiten.

### **5.3. ENTWICKLUNG DER CHROMATOGRAPHISCHEN METHODE**

Da die SPME ohne notwendige Zusätze mit der Gaschromatographie zusammen genutzt werden kann, sollten SPME-GC-NPD-Methoden für die Bestimmung von Arzneistoffen in Humanplasma entwickelt und untersucht werden. Dazu wurden in verschiedenen Vorversuchen die chromatographischen Bedingungen optimiert.

### 5.3.1. SÄULE

Fünf Kapillarsäulen wurden getestet, um die Trennung und die Sensitivität der Methoden zu optimieren. Eine Übersicht ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Säule	Beschreibung	Maße	Hersteller	Analyten
HP-5	5 % Diphenyl-Dimethyl-polysiloxan	25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film	HP Deutschland	Amitriptylin Clomethiazol Clomipramin Diazepam Mirtazapin Venlafaxin <i>Clozapin</i> <i>Olanzapin</i>
BPX-5	5 % Phenyl (äquivalent) Polysilphenylsiloxan	30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film	SGE Deutschland	Clozapin Haloperidol Levomepromazin Olanzapin <i>Diazepam</i>
DB-35ms	(35 %-Phenyl)-methylpoly-siloxan	25 m • 0.2 mm I.D. 0.3 µm Film	J&W Scientific Deutschland	Amitriptylin
DB-17	(50 %-Phenyl)-methylpoly-siloxan	30 m • 0.25 mm I.D. 0.25 µm Film	J&W Scientific Deutschland	<i>Amitriptylin</i>
HP-1	100 % Polydimethylsiloxan	25 m • 0.32 mm I.D. 0.52 µm Film	HP Deutschland	<i>Amitriptylin</i>

Tab. 4 Übersicht der getesteten Säulen und gemessenen Analyte (*nur getestet*)

Der Versuch, die beim Amitriptylin auftretenden matrixbedingten Interferenzen (siehe Kap. 6.5.) durch eine andere Säule chromatographisch vom Analyten zu trennen, misslang. In Abbildungen 16 ist ein Chromatogramm einer PDMS-Fasern dargestellt, die nach der Konditionierung vor einer ersten Extraktion aufgenommen wurde. Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) und N<sub>2</sub> (0.7 ml/min, 190 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfsgas N<sub>2</sub> 28 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 300 °C im splitless Modus während der Desorption. Die Messung erfolgte nach der Desorption, und der Split wurde geöffnet. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min auf 260 °C, 4 °C/min auf 280 °C (1 min)).

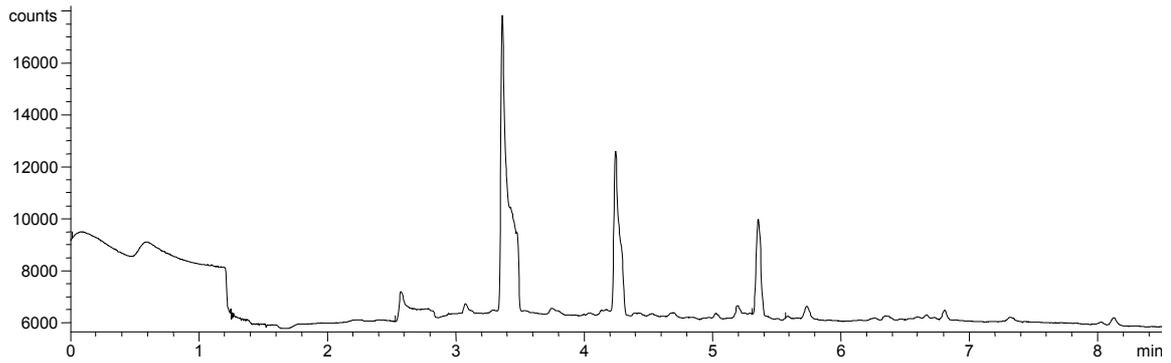


Abb. 16 Leerlauf PDMS-Faser, HP-5

In den Abbildungen 17 und 18 sind Chromatogramme von PDMS- und PA-Fasern dargestellt, die nach der Konditionierung vor einer ersten Extraktion aufgenommen wurden. Die Trennung erfolgte mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film) und N<sub>2</sub> (20 ml/min, 150 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfgas N<sub>2</sub> 6 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 260 °C im splitless Modus während der Desorption. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min bis 260 °C, 4 °C/min bis 284 °C (1 min)).

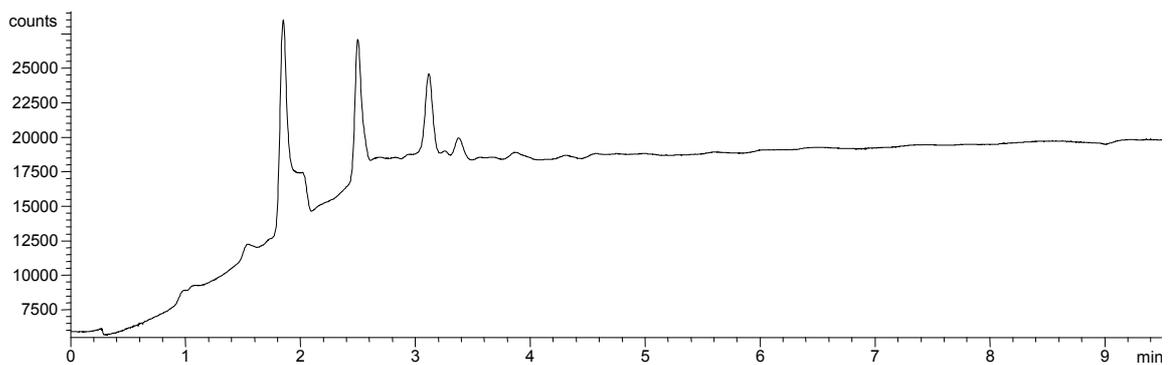


Abb. 17 Leerlauf PDMS-Faser, BPX-5

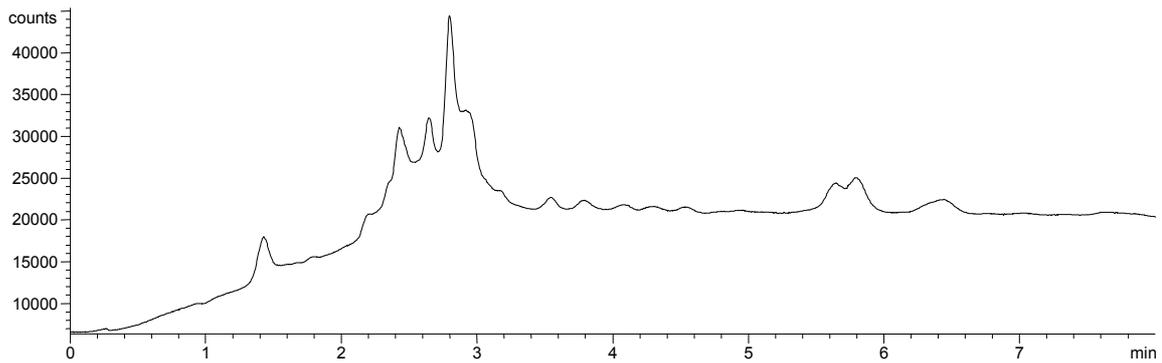


Abb. 18 Leerlauf PA-Faser, BPX-5

Es wurden Peaks, die aus dem Polymer der SPME-Faser stammen, gefunden. Diese Störungen begrenzen die Einsetzbarkeit der SPME, da von nicht zu vernachlässigenden Interferenzen bei der Spurenanalytik ausgegangen werden muss. Somit konzentrierte sich die Auswahl der Säule bei weiteren Methodvalidierungen oft auf die vorausgesetzte Empfindlichkeit der Methoden. Die HP-5- und die BPX-5-Säulen erwiesen sich als am ehesten geeignet, die chromatographischen Ansprüchen zu erfüllen.

### 5.3.2. INJEKTOR

Zur Optimierung der chromatographischen Methode wurden drei Liner und die Injektionstiefe der Faser getestet. Die Liner können wie folgt kurz charakterisiert werden:

- 1) 4 mm I.D., einseitig zulaufend (0.8 mm)
- 2) 2 mm I.D., splitless
- 3) 4 mm I.D., beidseitig zulaufend (0.8 mm)

Für die Untersuchungen wurden wässrige, mit TZA versetzte Proben mittels einer 100- $\mu$ m-PDMS-Faser extrahiert. Die Injektionstiefen wurden an der Faserhalterung eingestellt und arretiert. Die Ergebnisse sind am Beispiel des Amitriptylins in Abbildung 19 dargestellt. schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen wurde für weitere Untersuchungen der Splitless-Liner mit 2 mm Innendurchmesser verwendet.

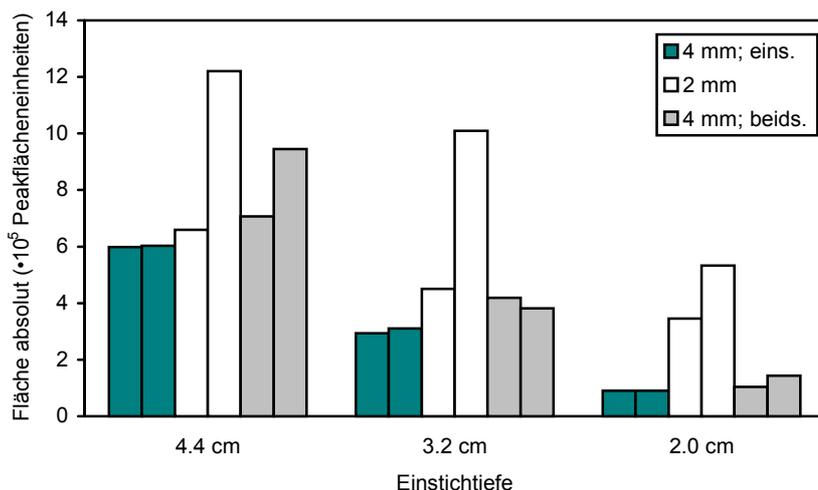


Abb. 19 Abhängigkeit der Peakflächen von der Injektionstiefe der Faser und dem eingesetzten Liner (zwei Parallelbestimmungen pro Messpunkt)

### 5.3.3. DETEKTION

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Arzneimittelbestimmung mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Stickstoff-Phosphor-selektiven Detektor (NPD) beschrieben [46, 57, 64, 70, 86, 89, 90]. Deshalb wurde als Detektor für die zu entwickelnden Methoden ebenfalls der NPD ausgewählt. Zusätzlich wurde zum Vergleich bei einigen Methoden auch das Massenspektrometer, an einen Gaschromatographen gekoppelt, als Detektor herangezogen (siehe Kap. 4.2.). Diese Ergebnisse werden im Kapitel 6 der Arbeit diskutiert.

### 5.3.4. DESORPTION

Verschiedene Vorversuche wurden durchgeführt, um optimale Bedingungen für die Desorption zu finden. Aufgrund der sehr geringen Flüchtigkeit der Arzneistoffe sind hohe Desorptionstemperaturen und relativ lange Desorptionszeiten notwendig (30 s bis 90 s). Der Vorteil besteht aber darin, dass die Fasern nach der Extraktion bis zur Desorption

längere Zeit gelagert werden können. Das ermöglicht auch eine simultane Extraktion (bisher sechs Proben) mit nachfolgender schrittweiser chromatographischer Analyse.

#### Desorptionszeit

Die Desorptionszeit wurde für jeden Analyten bestimmt, um Akkumulationen auf der Faser zu verhindern. Dazu wurde die Desorptionszeit von 10 s bis 90 s variiert. Die Faser wurde danach ein zweites Mal 90 s desorbiert (Postdesorption). Somit konnte der auf der Faser verbleibende Rest nach der ersten Desorption analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Tests sind in den einzelnen Kapiteln zu den Methodenentwicklungen (Kap. 6) dargestellt.

#### Desorptionstemperatur

Die Auswahl der Desorptionstemperatur lehnte sich an die Empfehlungen des Herstellers der Fasern (Tab. 5). Aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Arzneistoffe wurde meist bei der angegebenen höchsten Betriebstemperatur gearbeitet, um die Desorptionszeiten so kurz wie möglich zu halten. Eine Ausnahme stellte das leicht flüchtige Clomethiazol dar (siehe Kap. 6.4.). Einzelne Untersuchungsergebnisse zur Desorptionstemperatur werden in den nachfolgenden Kapiteln zur Methodvalidierung diskutiert.

<b>Fasertyp</b>	<b>Maximaltemperatur</b>	<b>Betriebstemperatur</b>
PDMS 100 $\mu\text{m}$	280 °C	200 °C-270 °C
PDMS 30 $\mu\text{m}$	280 °C	200 °C-270 °C
PDMS 7 $\mu\text{m}$	340 °C	220 °C-320 °C
PA 85 $\mu\text{m}$	320 °C	220 °C-310 °C
CW-DVB 65 $\mu\text{m}$	265 °C	200 °C-260 °C

Tab. 5 Empfehlungen des Herstellers über die Betriebstemperaturen der einzelnen Fasertypen

#### 5.4. FASERBESTÄNDIGKEIT

Die Fasern wurden wiederholt genutzt. Die einzelnen Anwendungen fanden aufgrund von Methodvalidierung (Salzkonzentration, Fett, Temperaturen, Extraktionszeiten, Nutzung für andere Methoden) nicht unter gleichbleibenden Bedingungen für die Fasern statt. Die Anzahl der Desorptionen war höher als die der Extraktionen aufgrund von Postdesorptionsuntersuchungen und Faserkonditionierungen. Es wurde von jeder Faser ein „Lebenslauf“ erstellt (Anhang II).

##### Polydimethylsiloxan (PDMS)

Die PDMS-Fasern mit 100 µm Schichtdicke waren die am häufigsten benutzten Fasern im Rahmen dieser Arbeit. Gründe dafür sind die universelle Einsetzbarkeit für verschiedene Analyte sowie ihre Robustheit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Insgesamt wurden 30 Fasern bei den Untersuchungen verbraucht (Anhang II). Die Anzahl der Desorptionen schwankt zwischen 27 und 158 pro Faser (Mittelwert 75 Desorptionen bei 28 Fasern). Der große Unterschied der Anwendungsdauer der Fasern ist damit zu erklären, dass die Fasern bei den Methodvalidierungen häufig sehr unterschiedlichen und zum Teil extremen Einflüssen (Temperatur, pH-Wert u.s.w.) ausgesetzt waren. Der Waschschrift ist bedeutend für die Lebensdauer der Fasern. Zur Untersuchung der „Lebenserwartung“ der Fasern unter Routinebedingungen wurde eine Faser (Faser-Nr. 14) nur unter konstanten Bedingungen (Säule, Detektor, innerer Standard) benutzt. Als Maß der Alterung der Faser wurde die Absolutfläche des inneren Standards Chloramitriptylin gewählt (Abb. 20).

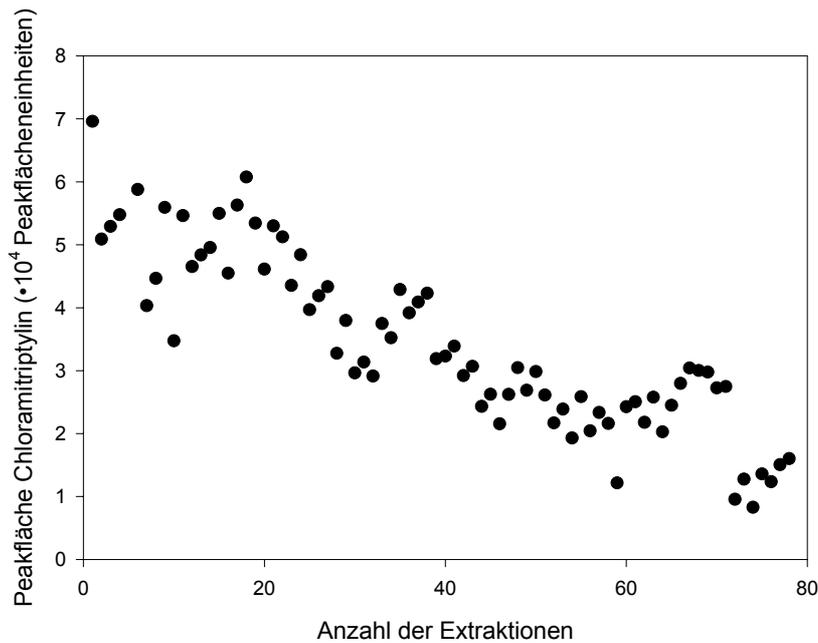


Abb. 20 Verlauf der Peakflächen des inneren Standards von Faser 14 unter konstanten Bedingungen

Nach 116 Extraktionen/Injektionen war bei der Faser Ermüdung erkennbar. Die Leistung der Faser sinkt nach über 50 Extraktionen, das heißt die Peakflächen sinken um den Faktor 2. Darum sinkt die Wiederfindungsrate und die Sensitivität von alten Fasern (siehe 6.1.). Die Verringerung der Peakfläche des internen Standards um die Hälfte kann als Zeichen für den Verbrauch der Faser angesehen werden. Es ist auch möglich, die Extraktionszeit bei älteren Fasern zu erhöhen, um die Sensitivität konstant zu halten. Es muss auch beachtet werden, dass die Präzision einer Methode verbessert werden kann, wenn nur mit einer Faser gemessen wird und nicht mehr als 50 Extraktionen durchgeführt werden. Allerdings können zur Verringerung der Kosten der SPME die Fasern noch häufiger zur Extraktion genutzt werden.

### Polyacrylat (PA)

Im Rahmen der Untersuchungen wurden bisher nur sieben Polyacrylat-Fasern benutzt. Die PA-Fasern eignen sich besonders zur Extraktion polarer Substanzen. Als Nachteil dieser Fasern sind jedoch verstärkt auftretende Interferenzen durch faserinherente Kontaminationen zu nennen (Abb. 18). Nach 21 bis 78 Extraktionen/Desorptionen sind noch keine Ermüdungserscheinungen der Fasern zu erkennen.

### Carbowax-Divinylbenzen (CW-DVB)

Der Einsatz der Carbowax-Divinylbenzen-Fasern erwies sich als äußerst schwierig. Bisher wurden 13 CW-DVB-Fasern benutzt. Die maximale Injektionsanzahl betrug 28. Nach relativ kurzer Zeit kommt es zu Rissen in der Beschichtung, die sich dann nach wenigen weiteren Injektionen vollständig von der Faser löst. Als mögliche Ursachen dieser relativ schnellen Alterung wurden Wasser in der Extraktionslösung und der hohe pH-Wert der Extraktionslösung vermutet. Allerdings wird in der Literatur die Benutzung dieser Fasern in Wasser bei extremen pH-Werten ohne besondere Auffälligkeiten beschrieben [8, 16, 19]. Von HERNANDEZ [33] wurde diese schnelle Alterung der Fasern ebenfalls beschrieben. Untersuchungen dazu zeigten, dass ein hoher Salzgehalt für die geringe Stabilität der Faser verantwortlich ist. Dies könnte auch die Ursache für die schnelle Alterung der hier verwendeten Fasern sein, da die Salzkonzentrationen in der Probe sehr hoch waren.

## 6. METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE BESTIMMUNG VON ARZNEISTOFFEN

### 6.1. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON CLOZAPIN

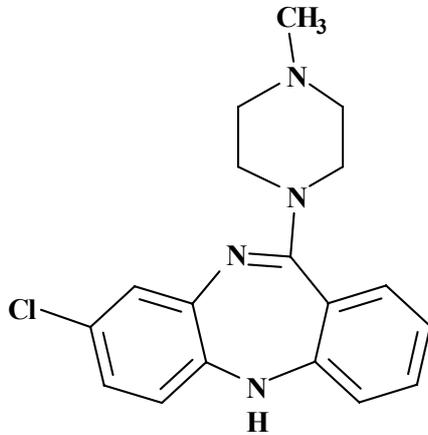


Abb. 21 Chemische Struktur von Clozapin

Clozapin (Cloz), 8-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-5*H*-dibenzo-*[b,e]*[1,4]diazepin, ist ein atypisches Neuroleptikum und wird zur Behandlung von Schizophrenien verwendet. Im Unterschied zu den klassischen Neuroleptika verursacht Clozapin bei guter antipsychotischer Wirkung keine extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen. Weiterhin wirkt es bei therapieresistenten Psychosen. Aufgrund dieses verbesserten therapeutischen Spektrums nimmt die Verwendung von Clozapin in der Psychiatrie stark zu. Im Rahmen des TDM werden Serumspiegel von Clozapin ebenfalls zunehmend bestimmt. Der therapeutische Bereich von Clozapin liegt zwischen 350 ng/ml und 600 ng/ml [116, 117]. Plasmaspiegel mit weniger als 350 ng/ml sind verantwortlich für ein suboptimales therapeutisches Ergebnis oder keinen therapeutischen Effekt (Nonresponder). Plasmaspiegel über 600 ng/ml erhöhen das Risiko von Nebenwirkungen, z.B. Anfälle. Deshalb sollte die Clozapintherapie durch Plasmaspiegelbestimmung optimiert werden. Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche kann eingeschätzt werden, dass die SPME zur Bestimmung von Clozapin im TDM geeignet ist.

### 6.1.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATEN, CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN UND PHOTOSENSITIVITÄT

#### Extraktion

Für die Probenaufarbeitung und Extraktion der Clozapinproben wurde anhand der Ergebnisse der Vorversuche (siehe Kap. 5.1. und 5.2.) folgende SPME-Standardmethode entwickelt: 250 µl Plasma wurden mit 50 µl internem Standard (8 µg/ml Loxapin), 1700 µl Wasser und 500 µl wässriger 1 M Natronlauge, die 6 % NaCl enthält, gemischt. Davon wurden 1500 µl in ein *ependorf*-Vial abgenommen. Die Extraktion fand bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min über 30 min mittels einer 100-µm-PDMS-Faser statt. Nach der Extraktion wurde die Faser jeweils 20 s in Wasser und in einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1 Volumenanteile) gewaschen und anschließend 2 min bei Raumtemperatur getrocknet.

#### Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsrate wurde durch Vergleich der Peakflächen der SPME-Extraktion von Clozapin und Loxapin mit definierten Gehalten von Clozapin und Loxapin nach der Injektion von flüssigen Lösungen bestimmt. Der injizierte Gehalt war vergleichbar mit dem Gehalt der Analyten in den SPME-Proben nach der Verdünnung mit Wasser und der Zugabe von Natronlauge.

Die Wiederfindungsraten sind niedrig, 3.2 % für Clozapin und 19.4 % für Loxapin nach 30 min Extraktionszeit bei Benutzung relativ neuer Fasern (Anzahl der Injektionen < 25). Bei der Benutzung alter Fasern (Anzahl der Injektionen > 50) gehen die Wiederfindungsraten weiter zurück, die Werte lagen dann bei 1.4 % für Clozapin und 7.6 % für Loxapin (30 min Extraktion) sowie 7.1 % für Clozapin und 40.7 % für Loxapin (Gleichgewicht). Wichtig ist jedoch, dass das Verhältnis der Wiederfindungsraten unabhängig von der Nutzungshäufigkeit der Fasern konstant bleibt. Die Wiederfindungsraten aus Wasser waren nach 30 min Extraktion 4.1 % für Clozapin und 26.4 % für Loxapin sowie im Gleichgewicht (nach ca. 3 h; siehe Abb. 5, S. 31) 9.1 % für Clozapin und 54.0 % für Loxapin (Fasern mit Zahl der Injektionen > 50). Die hohe Proteinbindung der beiden Arzneistoffe scheint die Wiederfindungsrate im Plasma zu verringern. Dies wurde auch für die trizyklischen Antidepressiva gefunden [64]. Ob die

niedrige Wiederfindungsrate die Qualität und Anwendbarkeit der Methode beeinflusst, wurde in den Vorversuchen zur Variabilität der Matrix untersucht. Es konnte keine signifikante Beeinträchtigung festgestellt werden (siehe Kapitel 5.2.). Außerdem beeinflusst eine niedrige Wiederfindungsrate nicht maßgeblich die Präzision einer Methode, wenn sie, wie im vorliegenden Fall, mit einem gut ausgewählten internen Standard ausgestattet ist. Loxapin hat sich aufgrund seiner dem Clozapin ähnlichen chemische Struktur und physikochemischen Eigenschaften als geeigneter Standard erwiesen (Abb. 22). Änderungen der Wiederfindungsrate aufgrund von Änderungen der Matrix, Fasern oder kleinen Abweichungen von der Standardprozedur (Extraktionszeit, Eigenschaften der Fasern usw.) werden durch Loxapin kompensiert. Das sehr ähnliche Verhalten von Clozapin und Loxapin während der Extraktion und das konstante Verhältnis der Wiederfindungsraten in neuen und alten Fasern sind zwei Beispiele für die Fähigkeit von Loxapin, Unterschiede in den Wiederfindungsraten von Clozapin zu kompensieren. Aufgrund dieses gleichen Verhaltens während der Probenaufarbeitung, Extraktion und Desorption fallen Unterschiede der Wiederfindungsrate zwischen Clozapin und Loxapin nicht ins Gewicht. Auf die Präzision wird im Kapitel 6.1.4. detaillierter eingegangen.

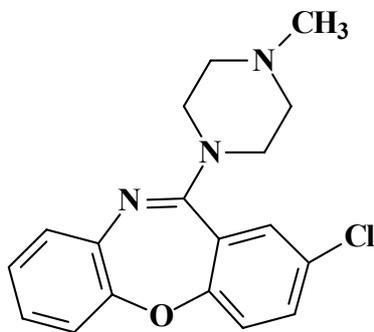


Abb. 22 Chemische Struktur von Loxapin (I.S.)

Es ist bekannt, dass die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels in Wasser die Verteilungskonstante  $K_{fs}$  beeinflusst (siehe Kap. 3.3.6.). Die Veränderung der organischen Zusammensetzung der Matrix kann jedoch ebenfalls durch die Kalibrierung mit einem internen Standard kompensiert werden. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass der Zusatz organischer Lösungsmittel die Protein-Arzneimittel-Bindung lockert, die Konzentration des freien Anteils erhöht und somit zu einer verbesserten Extraktion führt [95, 97]. Bei der beschriebenen Methode sollte der Zusatz von 10  $\mu$ l verschiedener

organischer Additiva als Konkurrent zur Eiweißbindung der Analyten zu einer Verbesserung der Extraktionsausbeute führen (Anhang VII). Es konnte jedoch keine signifikante Verbesserung gemessen werden. Eine Ausnahme bildete das 1-Chlor-n-butan. Hier erhöhte sich die Extraktionsausbeute geringfügig.

#### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film) und N<sub>2</sub> (20 ml/min, 150 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfgas N<sub>2</sub> 6 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 260 °C im splitless Modus während der Desorption. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min bis 260 °C, 4 °C/min bis 284 °C (1 min)).

Bei einer Temperatur von 260 °C wurde die optimale Desorptionszeit für Clozapin bei 60 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % des Analyten desorbiert und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden. Abbildung 23 zeigt die Desorptions- und Postdesorptionskurve von Clozapin. Die Kurve von Loxapin ist ähnlich.

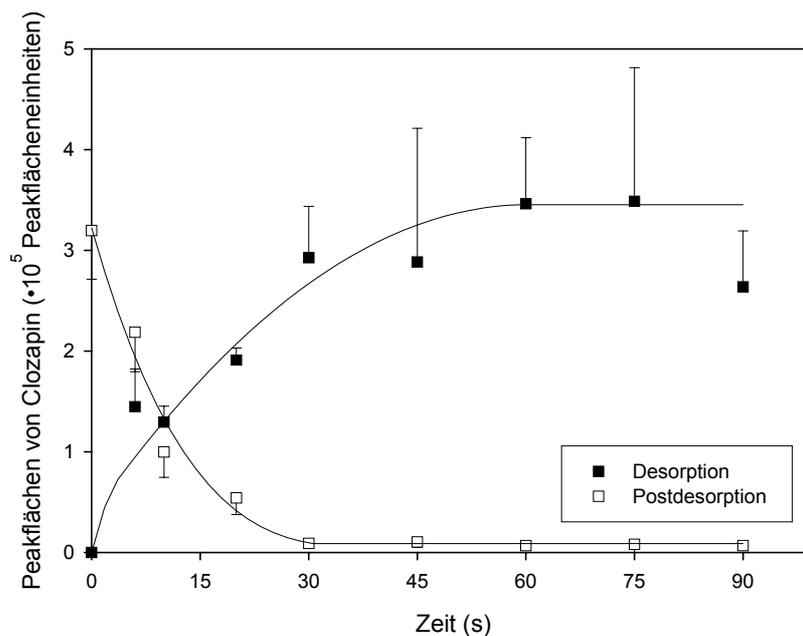


Abb. 23 Abhängigkeit der Peakflächen von Clozapin von der Desorptionszeit (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt), mit T = 260 °C und 500 ng/ml Clozapin in der Probe

#### Untersuchung der Photosensitivität

Die Lichtempfindlichkeit von Clozapin wurde getestet, indem die Plasmaproben dem Sonnenlicht ausgesetzt wurden. Sie wurden dazu für 0 bis 5 h ins geschlossene Fenster gestellt und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet, extrahiert und gemessen.

Es wurden keine Änderungen der Signalflächen von Clozapin im Rahmen der Präzision gemessen. Das Signalflächenverhältnis ( $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$ ) blieb ebenfalls konstant. Somit beeinflusst die Lichtempfindlichkeit, wie sie für verschiedene trizyklische Neuroleptika beschrieben wird [74], nicht die Anwendbarkeit der Methode.

### 6.1.2. BESTIMMUNG DER EXTRAKTIONSENTHALPIE UND DES FREIEN ANTEILS

#### Bestimmung der Extraktionsenthalpie

Die Verteilungskonstante  $K_{fs}$  von Clozapin und Loxapin zwischen der Faser (Beschichtung/PDMS) und Wasser wurde durch Benutzung des ermittelten Gehalts des extrahierten Arzneistoffs im Gleichgewicht ( $m_{Cloz} = 54.6 \text{ ng}$ ,  $m_{Lox} = 324.4 \text{ ng}$ ), des Probenvolumens (1.5 ml), des Schichtvolumens ( $6.6 \cdot 10^{-4} \text{ ml}$  [64]) sowie der bekannten Ausgangsmasse berechnet. Die Werte  $K_{fs} = 227$  für Clozapin und  $K_{fs} = 2671$  für Loxapin wurden erhalten. Beide Werte deuten auf eine Verteilung hin, welche stark auf der Seite der Faserbeschichtung liegt. Dies wurde aufgrund der Lipophilie der psychotropen Arzneistoffe erwartet. Die beträchtliche Differenz zwischen Clozapin und Loxapin (Faktor 10) wurde nicht erwartet. Diese Differenz wird vermutlich durch das protische N-H-Wasserstoffatom, das in Clozapin, jedoch nicht in Loxapin vorkommt, hervorgerufen. Trotz der prinzipiellen Lipophilie beider Komponenten ist der Unterschied in der chemischen Struktur für eine höhere Hydrophilie von Clozapin verantwortlich. Obwohl Loxapin als ein guter interner Standard für Clozapin eingeschätzt wird, würde N-Propylnorclozapin [71] den Ansprüchen wesentlich besser entsprechen. Allerdings ist N-Propylnorclozapin nicht kommerziell erhältlich.

Für die Berechnung der molaren Enthalpie des Phasenüberganges wurde die validierte Methode für die Bestimmung von Clozapin etwas variiert. Es wurde bei fünf verschiedenen Temperaturen (30 °C, 40 °C, 50 °C, 70 °C und 90 °C) jeweils aus wässriger Lösung bis zum Gleichgewicht extrahiert. Die Extraktionsenthalpie wurde aus der graphischen Darstellung der Messergebnisse (Abb. 24) mit Hilfe der Gleichung (21) (S. 13)

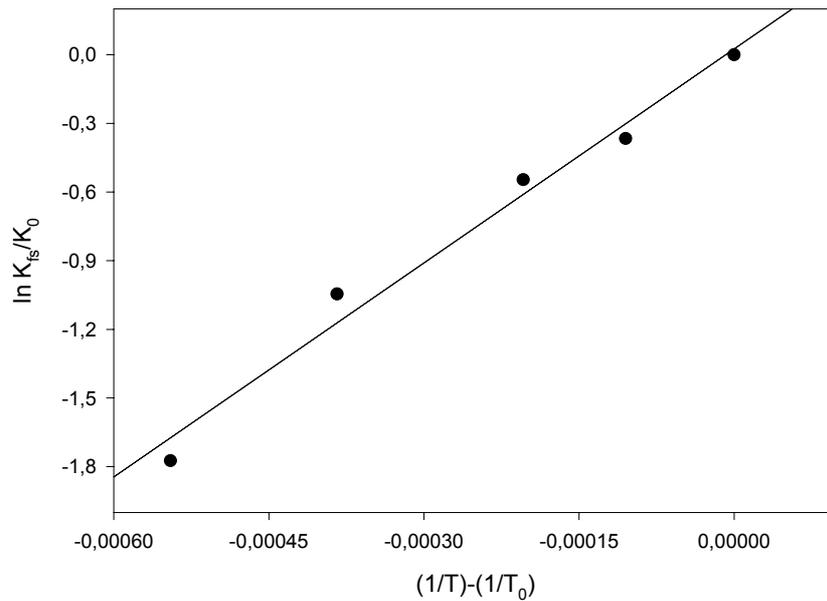


Abb. 24 Graphische Darstellung zur Bestimmung von  $\Delta H$  für Clozapin aus dem Anstieg der Regressionsgeraden

zu  $\Delta H = -26 \text{ kJ/mol}$  bestimmt. Wie erwartet, wurde eine negative Extraktionsenthalpie für eine freiwillig verlaufende Extraktion erhalten. Dieses wurde aufgrund der Lipophilie des psychotropen Arzneistoffes erwartet. Zusätzlich wurde das Extraktionsgleichgewicht durch die Zugabe einer Base (1 M NaOH) zugunsten der Faser verschoben.

Die Bestimmung von thermodynamischen Parametern des Phasenüberganges durch SPME könnte in vielen Bereichen eine einfache und interessante Alternative darstellen.

#### Bestimmung des freien Anteils

In Serumproben mit Arzneistoffen stellt sich das chemische Reaktionsgleichgewicht zwischen dem an die Proteine gebundenen und dem freien, in der Lösung vorliegenden Arzneistoff (freier Anteil) ein.

In der Literatur wird die Möglichkeit zur direkten Bestimmung des freien Anteils von Phenolen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Wasser, das reich an gelösten polymeren organischen Stoffen (DOM) ist, mittels SPME und einer externen Kalibrierung durch SPME aus wässriger Lösung beschrieben [114, 115]. Daraus folgend sollte untersucht werden, ob dies auch für die Bestimmung des freien Anteils an Arzneistoffen in Serum möglich ist. Da es sich bei Serum um eine sehr komplexe Matrix

handelt, wurden diese Untersuchungen in Humanalbumin-Lösung als Modellsubstanz durchgeführt. Das Albumin entspricht also dem DOM im Modell von PÖRSCHMANN [114, 115]. Dieser Ersatz scheint sinnvoll, da die meisten Arzneistoffe im Serum am Albumin gebunden sind [77, 113].

Für diese Untersuchungen wurde die Probenaufarbeitung etwas variiert: Für die indirekte Bestimmung des freien Anteils wurden zu 950 µl Albumin bzw. Albumin-Ultrafiltrat 50 µl I.S. und 50 µl 1 N NaOH (6 % NaCl) gegeben. Diese beiden Mischungen wurden unter üblichen Bedingungen extrahiert (100-µm-PDMS-Faser, 30 °C, 30 min im *Eppendorf*-Thermomixer mit 700 U/min) und aus den bestimmten Konzentrationen die freien Anteile berechnet. Die Albumin-Filtrate zur indirekten Bestimmung der freien Anteile wurden durch Ultrafiltration wie folgt gewonnen: 1 ml Albumin wurde in die *Centrifree*-Ultrafilter (AMICON) pipettiert und in einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor erst 2 min bei 2800 U/min und dann 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde dann wie oben beschrieben weiterbearbeitet.

Als Voraussetzung für die direkte Bestimmung des freien Anteils durch SPME wurde von PÖRSCHMANN [115] die Bedingung

$$\frac{V_f K_{fs}}{V_s + n_{Alb}^0 K_{Alb}} < 0.111 \quad (38)$$

hergeleitet (siehe Kap. 3.5.). Es konnte festgestellt werden, dass diese Bedingung für die eigenen Messdaten mit  $0.054 < 0.111$  erfüllt ist ( $V_f = 0.00066$  ml,  $K_{fs} = 323.11$ ,  $V_s = 1.05$  ml,  $n_{Alb}^0 K_{Alb} = 2.9$  ml). Daraufhin wurde versucht, von einer mit 1 µg/ml Clozapin versetzten Albuminprobe mittels SPME die Gesamtkonzentration (Standardmethode) und den freien Anteil (externe Kalibrierung durch Proben aus Wasser) direkt zu bestimmen. Es konnte jedoch keine Übereinstimmung der gemessenen freien Anteile durch indirekte und direkte Bestimmung festgestellt werden (indirekt:  $c_{Ultrafiltrat} = 274$  ng/ml und freier Anteil 27.4 %; direkt:  $c_{externe\ Kalibrierung} = 57$  ng/ml und freier Anteil 5.7 %). Der Wert von 27.4 % freier Anteil der indirekten Methode durch Ultrafiltration (herkömmliches Verfahren) erscheint eher plausibel, da die Eiweißbindung von Clozapin in Plasma mit 95 % angegeben wird. Die Eiweißbindung in 5 %iger Albuminlösung muss also wesentlich geringer sein, da der Eiweißanteil in Plasma 7.5 %

beträgt und vor allem auch eine Bindung am sauren  $\alpha$ -Glykoprotein vorliegt. Das Ergebnis der neuen direkten SPME-Bestimmung des freien Anteils erscheint dagegen als zu niedrig. Ursachen der Differenz könnten sekundäre Effekte des Albumins (Eiweißes) auf die SPME bei der direkten Methode sein wie z.B. Änderungen der Eigenschaften der Faser und damit von  $K_{fs}$ .

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des freien Anteils des Arzneistoffes vom Albumingehalt der Probe untersucht. Dazu wurde der Albumingehalt durch Zugabe von Wasser von 5 % bis 1 % variiert und die Proben mit jeweils 500 ng/ml und 1  $\mu$ g/ml Clozapin versetzt. Die Bestimmung des freien Anteils erfolgte sowohl über die Ultrafiltration (indirekte Methode) als auch durch eine externe Kalibrierung (direkte Methode). Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Wie erwartet sinkt der freie Anteil mit steigendem Albumingehalt. Es konnte jedoch auch bei niedrigeren Albuminkonzentrationen keine Übereinstimmung der Ergebnisse aus indirekter (Ultrafiltration) und direkter (externe Kalibrierung) Bestimmung der freien Anteile gefunden werden.

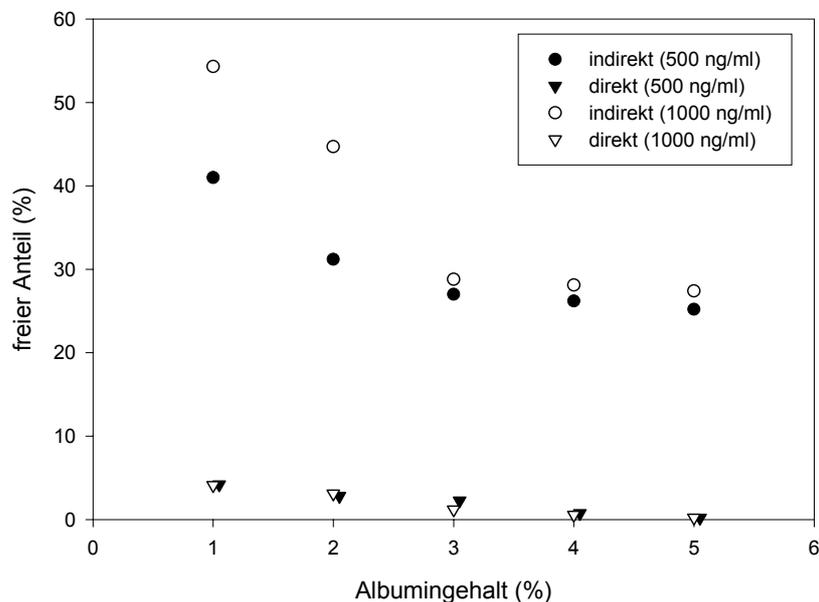


Abb. 25 Bestimmung des freien Anteils durch direkte und indirekte Methode in Abhängigkeit vom Albumingehalt bei unterschiedlichen Konzentrationen

### 6.1.3. TEST AUF MIT DER CLOZAPINBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Zwei Kapillarsäulen wurden für die Optimierung der Trennung und der Empfindlichkeit der Methode getestet (siehe Kap. 5.3.1.). Die Peakflächen der HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) waren zu klein für die gewünschte Empfindlichkeit. Deshalb wurde die BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film) auf eine ausreichende Empfindlichkeit untersucht. Die Peakflächen stiegen beträchtlich an und wurden als ausreichend angesehen, um die geforderte Nachweisgrenze zu erreichen. Abbildung 26 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma und von mit 500 ng/ml Clozapin versetztem Plasma. Keine interferierenden Signale zeigen sich im Plasma von gesunden Probanden. Signale der Matrix befinden sich hauptsächlich im Bereich  $t_R < 4$  min. Ein sehr kleines Signal bei einer Retentionszeit von  $t_R = 5.1$  min wurde aufgezeichnet und interferiert mit Loxapin (I.S.). Dieses Signal beeinflusste jedoch nicht die Identifikation der Peaks und die Quantifizierung, da die Signalflächen von Loxapin sehr groß im Vergleich mit dieser Interferenz waren.

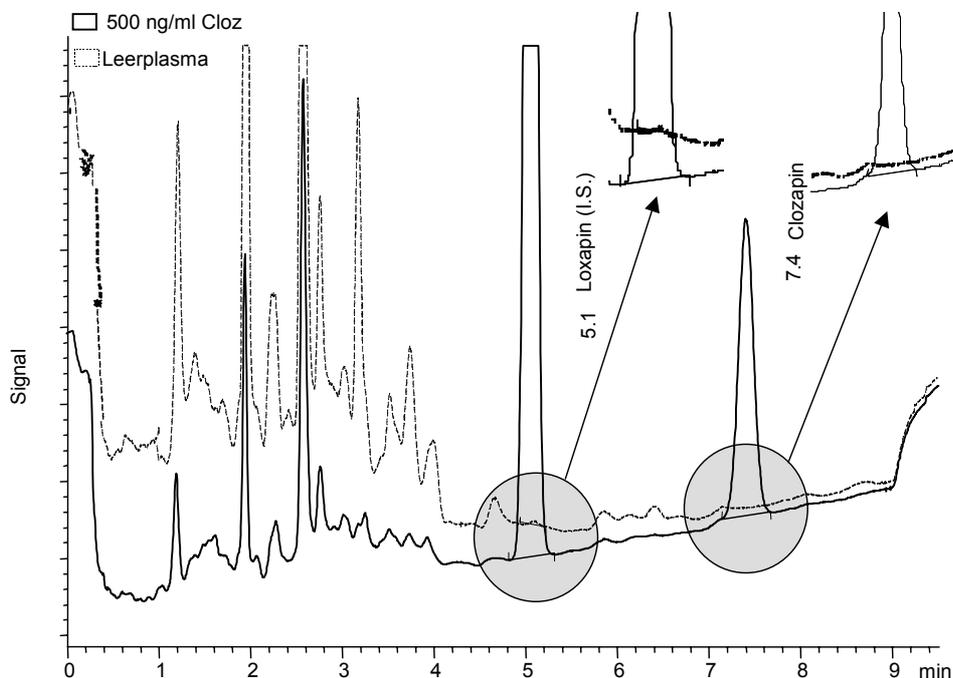


Abb. 26 Typische Chromatogramme von Leerplasma und mit 500 ng/ml Clozapin versetztem Plasma (Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.1.1.)

Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber mögliche Interferenzen durch verschiedene psychotrope Arzneistoffe, durch Metabolite von Clozapin, durch die Matrix (Plasma) und durch Faserkontaminationen (Abb. 17) getestet. Arzneimittel, die häufig als Komedikation zu Clozapin gegeben werden und damit potentielle Störungen der Methode darstellen, ergaben bei entsprechenden Tests keine Interferenzen (Anhang V). Interferenzen mit dem Metaboliten Desmethylclozapin, der Matrix und Faserkontaminationen wurden nicht gefunden. Ein spezielles Problem der Bestimmung von Clozapin ist die thermische Rückreaktion von Clozapin-N-oxid zu Clozapin während der Injektion in den Gaschromatographen. Dies könnte zu einer Mehrbestimmung von Clozapin in Patientenproben führen [118]. Durch Injektion einer Lösung von Clozapin-N-oxid (3 µl einer 25 ng/µl Lösung) sowie durch SPME von Clozapin-N-oxid wurde diese potenzielle Interferenz untersucht. Jedoch war der Gehalt an gebildetem Clozapin in der injizierten Lösung gering, und es konnte kein Clozapin in den Chromatogrammen nachgewiesen werden, die von SPME-Extraktionen von 500 ng/ml Clozapin-N-oxid aus Plasma aufgenommen wurden. Somit ist die Methode selektiv für das TDM in Plasma.

#### 6.1.4. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION

##### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden typisch durch die Formel

$$y = Bx + A \quad (40)$$

beschrieben, wobei  $y$  das Signalflächenverhältnis  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$ ,  $x$  die Clozapinkonzentration und  $A$  und  $B$  jeweils das Absolutglied und den Anstieg darstellen. Die 10-Punkt-Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 1000 ng/ml in äquidistanten Konzentrationen.

Die Kalibrierung ergab zwischen 100 ng/ml und 1000 ng/ml eine lineare Beziehung entsprechend der Gleichung (40) mit  $A = 0.0000682$ ,  $B = 0.00116$  ml/ng und einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0.981$ .

### Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze wurde abgeschätzt mit dem Signal-Rausch-Verhältnis von drei. Die Bestimmungsgrenze wurde bei dreifacher Nachweisgrenze festgelegt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze waren demzufolge 30 ng/ml und 100 ng/ml. Die Methode ist somit für den Einsatz im TDM geeignet, da der therapeutische Bereich von Clozapin zwischen 350 ng/ml und 600 ng/ml liegt.

### Präzision

Die Präzision wurde durch die Berechnung der relativen Standardabweichung der Signalflächenverhältnisse bei vier Clozapinkonzentrationen (100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml) bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine größere Menge von mit Clozapin versetzter Probe von jeder Konzentration hergestellt und für die einzelnen Messungen geteilt. Sechs Messungen wurden für die Präzision in Serie und acht für die zwischentägliche Präzision durchgeführt.

	100 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml
Serielle Präzision	10.0 %	7.9 %	9.7 %	14.5 %
Zwischentägliche Präzision	22.6 %	12.7 %	7.9 %	10.6 %

Tab. 6 Präzision der Bestimmung von Clozapin mit SPME-GC-NPD bei vier Konzentrationen (RSA,  $N_{\text{seriell}} = 6$ ,  $N_{\text{zwischen}} = 8$ )

Die zwischentägliche Präzision von 22.6 % bei 100 ng/ml ist eine weitere Bewertungsmöglichkeit für die Bestimmungsgrenze von 100 ng/ml. Es muss hervorgehoben werden, dass die Präzision durch Benutzung unterschiedlicher Fasern innerhalb einer Serie bestimmt wurde und somit eine „Inter-Faser“-Präzision ist. Zwischen den Fasern ist eine Variation der absoluten Signalflächen zu verzeichnen, was hauptsächlich von der Anzahl früherer Nutzungen der Faser (bis zu 100) abhängt. Je älter die Fasern, umso kleiner werden die absoluten Signalflächen. Die Signalflächenverhältnisse bleiben zwar relativ konstant, trotz der entscheidenden Kompensation von Faserunterschieden durch den internen Standard muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Präzision etwas besser wäre, wenn nur eine Faser für die Analysen genutzt würde („Intra-Faser“-Präzision). Die Präzisionen der bisheriger Methoden zur Bestimmung von Clozapin in Serum werden in der Literatur im Bereich von

50 ng/ml bis 1000 ng/ml mit  $< 6\%$  [71], von  $1.7\%$  bis  $6.3\%$  [92], von  $1.5\%$  bis  $4.5\%$  (serielle Präzision) und von  $1.3\%$  bis  $9.4\%$  (zwischen-tägliche Präzision) [75], von  $2.9\%$  bis  $8.9\%$  (serielle Präzision) und von  $6.3\%$  bis  $7.5\%$  (zwischen-tägliche Präzision) [103] sowie von  $1\%$  bis  $3.8\%$  [86] beschrieben. Somit gehen die Vorteile der SPME als Probenaufarbeitung auf Kosten einer schlechteren Präzision. Dennoch erscheint die Präzision ausreichend für eine Verwendung im TDM.

#### **6.1.5. BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT ÜBER EXTERNE KONTROLLEN**

Die Methode wurde mit einer Standardmethode desselben Labors verglichen, die auf einer traditionellen LLE und GC-NPD-Analyse basiert. Diese Standardmethode ist einer Methode zur Bestimmung von Haloperidol sehr ähnlich [90]. Jedoch beträgt die Konzentration der Lösung des internen Standards (Chlorhaloperidol)  $10\ \mu\text{g/ml}$  und der Extrakt von  $100\ \mu\text{l}$  wird nicht eingengt. Acht identische Proben zwischen  $100\ \text{ng/ml}$  und  $1000\ \text{ng/ml}$  wurden mit beiden Methoden gemessen, und die Ergebnisse wurden mit linearer Korrelation (Gl. (40),  $x$  = Ergebnisse der Standardmethode,  $y$  = Ergebnisse der SPME-Methode) analysiert. Eine sehr gute Übereinstimmung wurde gefunden, was durch einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0.981$ , einem Anstieg  $B = 0.962$  und einem Absolutglied  $A = 14.4\ \text{ng/ml}$  gekennzeichnet ist.

Zusätzlich wurde die SPME-Methode mit einer Routine-HPLC-Methode [103] verglichen, die in einem externen Labor genutzt wird. Eine sehr gute Übereinstimmung beider Methoden wurde beim Vergleich von 16 Proben ebenfalls gefunden:  $r = 0.976$ ,  $B = 1.00$ ,  $A = 18.2\ \text{ng/ml}$  (Anhang VIII, Abb. 27).

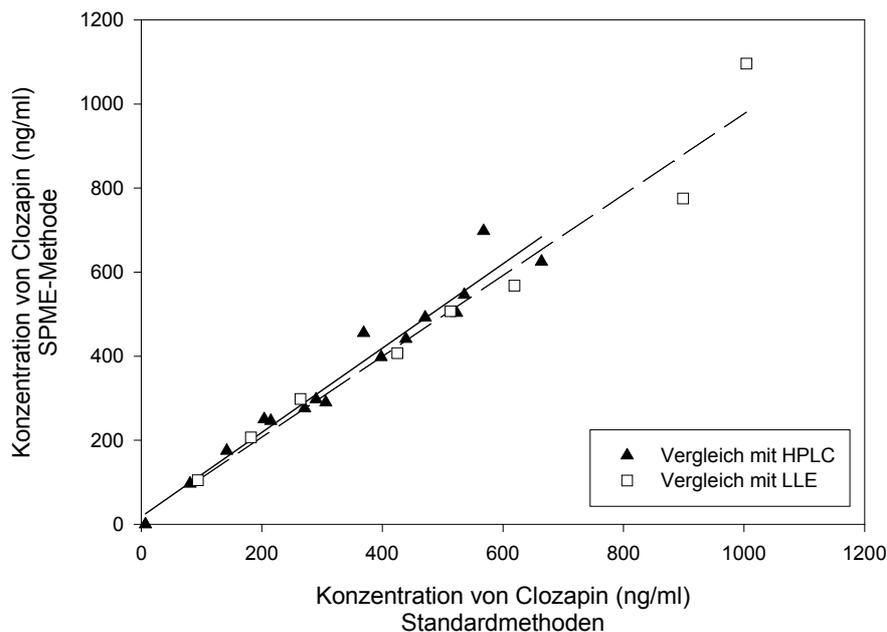


Abb. 27 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer HPLC- und einer LLE-Standardmethode (versetzte Proben)

#### 6.1.6. ANALYSE VON PATIENTENPLASMA

Schließlich wurden verschiedene Patientenproben der Universitätsklinik für Psychiatrie Magdeburg (N = 26) simultan mit SPME-GC-NPD und LLE-GC-NPD (Anhang IX, Abb. 28) analysiert. Es wurde eine sehr gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden gefunden, die durch  $r = 0.979$ ,  $B = 0.879$  und  $A = 90.1$  ng/ml gekennzeichnet ist (Gl. (40)). Dies bezieht sich auch auf die Datenanalyse ohne den Wert  $> 2000$  ng/ml, der wesentlich über dem Kalibrierbereich beider Methoden liegt:  $r = 0.923$ ,  $B = 1.03$  und  $A = 26.2$  ng/ml.

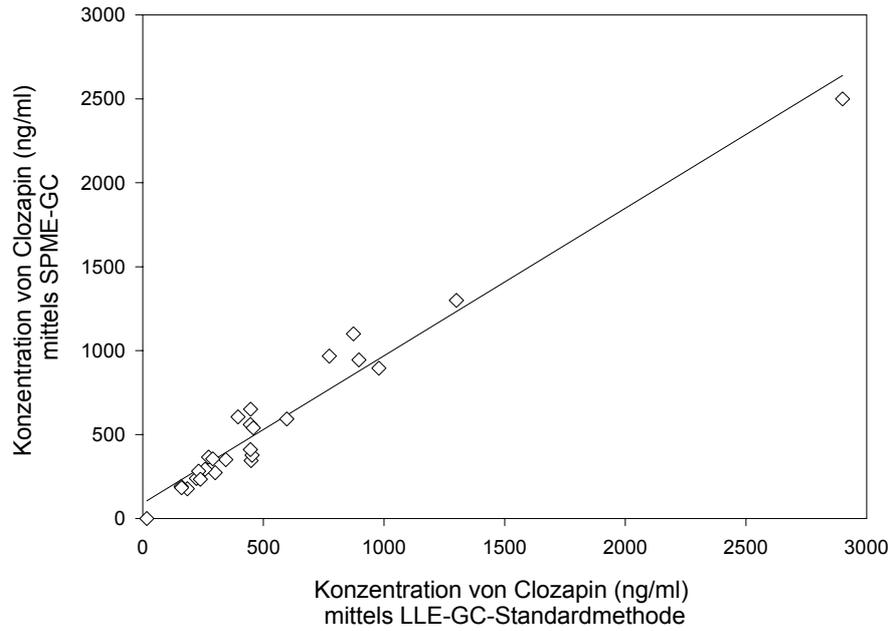


Abb. 28 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer LLE-GC-Standardmethode (Patientenproben)

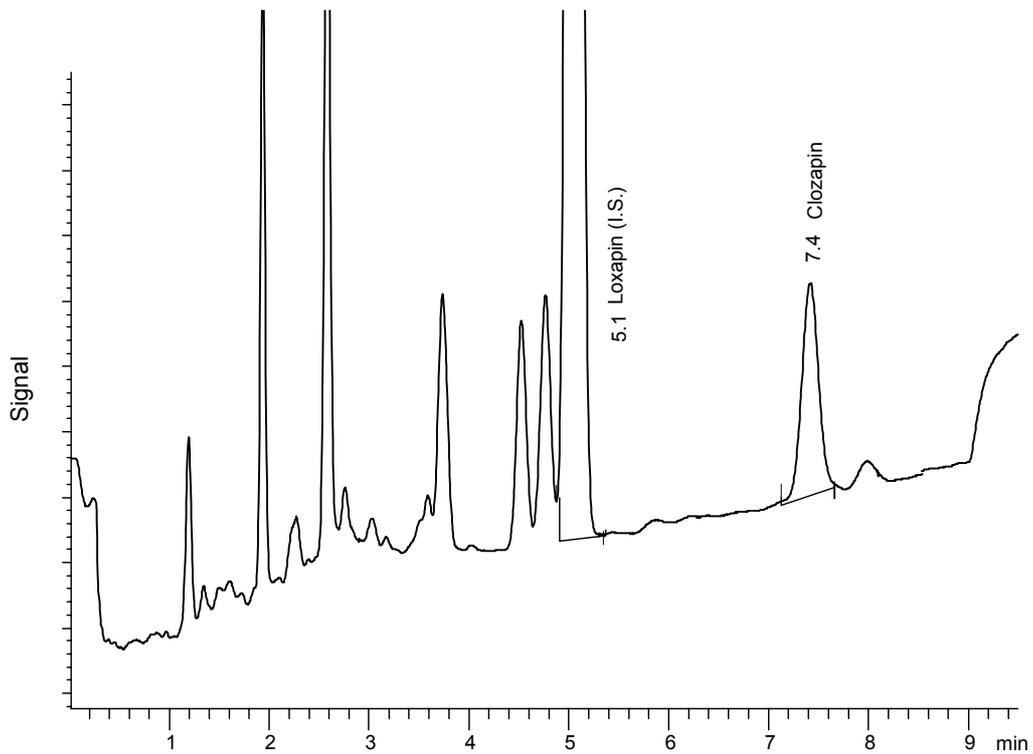


Abb. 29 Chromatogramm des SPME-Extraktes eines Patienten mit 593 ng/ml Clozapin (Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.1.1.)

Es wurde eine vollständig für das TDM von Clozapin validierte Methode entwickelt und die Ergebnisse in [119, 120] publiziert.

## 6.2. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON LEVOMEPRMAZIN

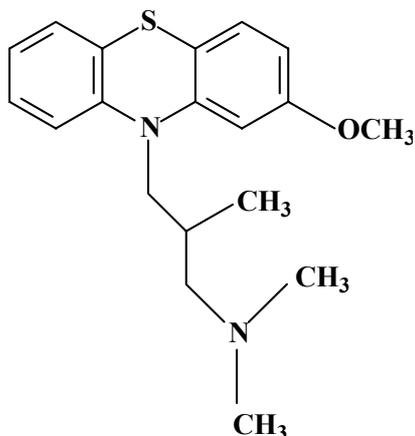


Abb. 30 Chemische Struktur von Levomepromazin

Levomepromazin (Levo), (*R*)-2-Methoxy-*N,N*, $\beta$ -trimethyl-10*H*-phenothiazin-10-propanamin, ist ein mittelpotentes Neuroleptikum aus der Gruppe der Phenothiazine mit zusätzlich stark sedierendem Effekt. Serumkonzentrationen wurden bei therapeutischen Dosen zwischen 5 ng/ml und 150 ng/ml gefunden [121-123]. Einen etablierten therapeutischen Bereich, wie er z.B. für hochpotente Neuroleptika bekannt ist, gibt es nicht [124]. Es war das Ziel dieser Untersuchung, die SPME als eine potentielle Probenaufarbeitung für die Bestimmung von Phenothiazin-Neuroleptika in Humanplasma oder -serum zu untersuchen. Die chemische Struktur und die physikochemischen Eigenschaften der Phenothiazin-Neuroleptika sind den TZA ähnlich. Da die Voruntersuchungen zu den TZA ergaben, dass der NPD eine Nachweisgrenze von etwa 5 ng/ml ermöglichen würde und diese nur durch das chemische Rauschen der Interferenzen verschlechtert wurde, sollte zunächst die Bestimmung von Phenothiazin-Neuroleptika durch SPME denkbar sein. Insbesondere wurde eine SPME-GC-NPD-Methode für die Bestimmung von Levomepromazin entwickelt.

## 6.2.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATEN UND CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

### Extraktion

Für die Probenaufarbeitung und Extraktion der Levomepromazinproben wurde in Anlehnung an die Clozapin-Vorschrift (siehe Kap. 6.1.1.) folgende SPME-Standardmethode entwickelt: 250 µl Plasma wurden mit 50 µl internem Standard (4 µg/ml Chloramitriptylin), 1700 µl Wasser und 500 µl wässriger 1 M Natronlauge, die 6 % NaCl enthält, gemischt. Davon wurden 1500 µl in ein *ependorf*-Vial abgenommen. Die Extraktion fand bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min über 30 min mittels einer 100-µm-PDMS-Faser statt. Nach der Extraktion wurde die Faser jeweils 20 s in Wasser und in einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1 Volumenanteile) gewaschen und anschließend 2 min bei Raumtemperatur getrocknet.

### Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsraten wurden durch Vergleich der Signalflächen von Levomepromazin und Chloramitriptylin nach SPME mit definierten Gehalten von Levomepromazin und Chloramitriptylin nach Direktinjektion einer flüssigen Lösung (n-Hexan/i-Amylalkohol = 98.5/1.5 (V/V)) in den Gaschromatographen bestimmt. Der injizierte Gehalt entsprach annähernd dem Analytengehalt im Vial nach der Verdünnung mit Wasser und Natronlauge. Die Wiederfindungsraten waren niedrig, 6.5 % für Levomepromazin und 4.6 % für Chloramitriptylin. Die Wiederfindungsraten nach einer 30-min-Extraktion aus Wasser waren wesentlich höher, 15.4 % für Levomepromazin und 13.2 % für Chloramitriptylin. Diese Wiederfindungsraten wurden vor Erreichen des Gleichgewichts gefunden. Es muss beachtet werden, dass die Wiederfindungsraten aus Wasser im Gleichgewicht noch höher sind. Die hohe Proteinbindung der beiden Arzneistoffe scheint ein wesentlicher hemmender Mechanismus der Extraktion in Plasma zu sein. Dieser Effekt wurde auch für die Analyse von Psychopharmaka in Plasma durch SPME in früheren Arbeiten, z.B. trizyklische antidepressive Arzneistoffe und Clozapin [64, 119, 120] beschrieben. Diese extrem niedrigen Wiederfindungsraten in Plasmaproben können auch durch die höhere Viskosität der Plasmamatrix erklärt werden, die die Diffusion der

Analyten zur Faser verringert. Eine dritte Erklärung für die niedrigen Wiederfindungsraten wäre die Bildung einer Diffusionsbarriere um die Oberfläche der Faser, d.h. Anlagerung von polymeren Komponenten der Matrix an der Faser während der Extraktion. Allerdings konnte trotz der schlechten Wiederfindungsrate eine gute Qualität der Methode demonstriert werden, wie sie durch Präzision, Richtigkeit, Linearität und Selektivität beschrieben wird.

### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film). Die chromatographischen Bedingungen entsprechen der Clozapin-Methode. Allerdings wird bei der letzten Heizrate des Ofentemperaturprogramms nur bis 274 °C geheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Die optimale Desorptionszeit für Levomepromazin wurde bei einer Temperatur von 260 °C bei 30 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % des Analyten desorbiert und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden. Abbildung 31 zeigt die Desorptions- und Postdesorptionsgraphen von Levomepromazin. Die Graphen von Chloramitriptylin sind ähnlich.

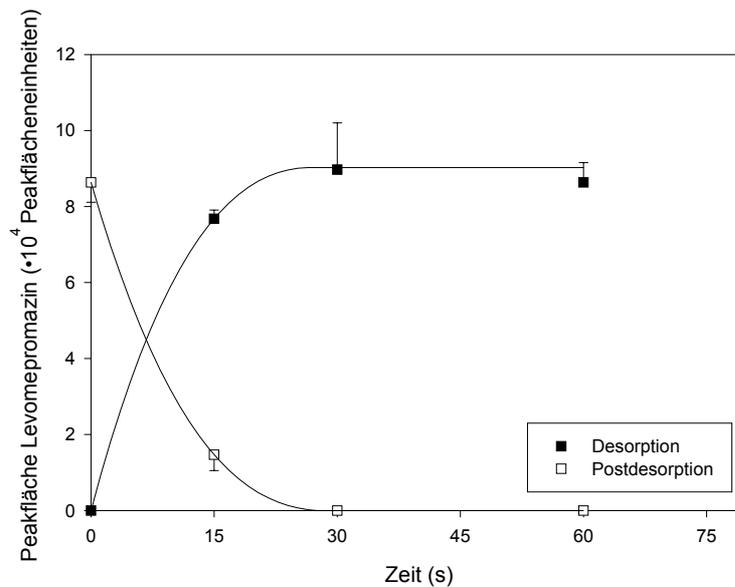


Abb. 31 Abhängigkeit der Peakflächen von Levomepromazin von der Desorptionszeit (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt), mit T = 260 °C und 150 ng/ml Levomepromazin in der Probe

### 6.2.2. TEST AUF MIT DER LEVOMEPRIMAZINBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

In Anlehnung an die Ergebnisse der Methodenentwicklung für Clozapin wurde für diese Methode die BPX-5-Säule ausgewählt. Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber möglichen Interferenzen durch verschiedene Gruppen von psychotropen Pharmaka, durch die Matrix (Plasma) und Kontaminationen der Faser getestet (Abb. 17). Für Levomepromazin wurde aufgrund eines höheren Retentionsindexes eine gute Abtrennung der Störpeaks, die von der Matrix bzw. Kontaminationen der Faser stammen, gefunden. Abbildung 32 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma und mit 75 ng/ml Levomepromazin versetztem Plasma. Keine interferierenden Signale zeigen sich im Chromatogramm Leerplasma gesunder Probanden. Signale der Matrix befinden sich hauptsächlich im Bereich  $t_R < 4$  min. Ein sehr kleines Signal bei  $t_R = 3.9$  min interferiert geringfügig mit Chloramitriptylin (I.S.). Aber dieses Signal beeinflusst nicht die Identifikation und Quantifizierung, da das Signal von Chloramitriptylin sehr groß im Vergleich mit dieser Interferenz ist.

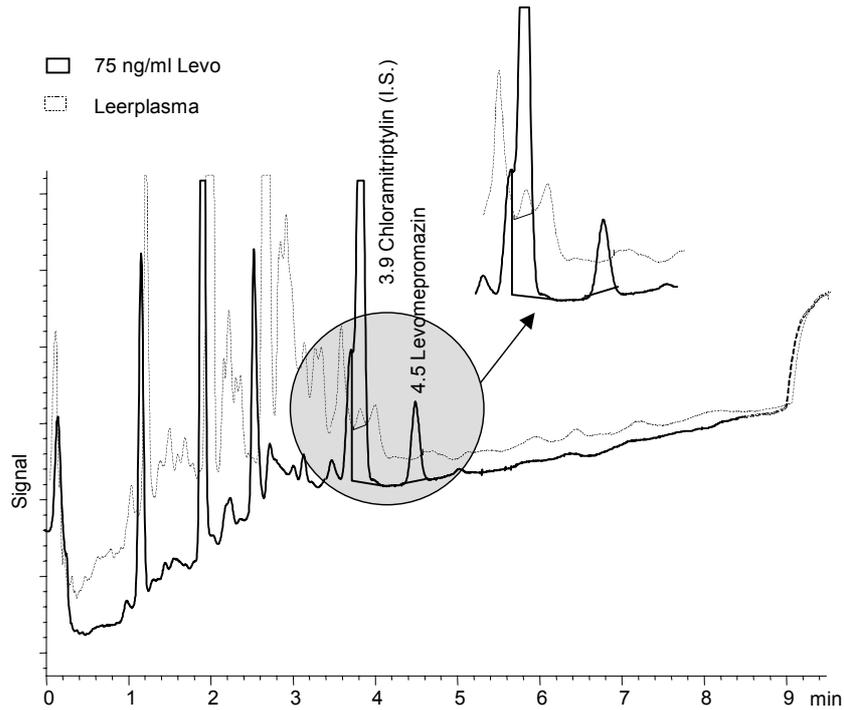


Abb. 32 Typische SPME-GC-NPD-Chromatogramme der Extrakte eines Leerwertes und einer gespickten Probe (75 ng/ml Levomepromazin; Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.2.1.)

Es wurden keine Interferenzen mit anderen Arzneistoffen gefunden, die mittels SPME extrahiert werden können (Anhang V). Somit ist die Methode für TDM und toxikologische Analysen selektiv genug.

### 6.2.3. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION

#### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden durch lineare Regression der Flächenverhältnisse  $A_{\text{Levo}}/A_{\text{Cl-Ami}}$  mit dem bekannten Gehalt des Analyten im Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 180 ng/ml berechnet. Trotz der abweichenden chemischen Struktur wurde Chloramitriptylin als interner Standard ausgewählt, da es ebenfalls als interner Standard in einer Standardmethode genutzt wird und lineare Kalibrierkurven ergibt (Abb. 33).

Außerdem wird Chloramitriptylin nicht als Arzneistoff genutzt und Interferenzen mit der Methode sind demzufolge bei Patientenproben mit Komedikation ausgeschlossen.

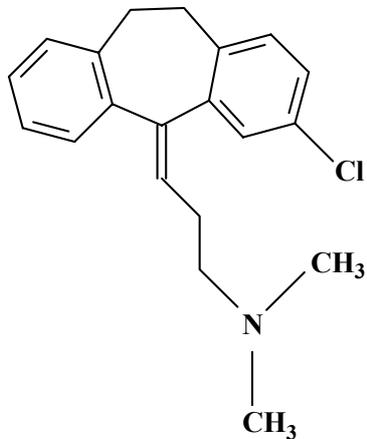


Abb. 33 Chemische Struktur von Chloramitriptylin (I.S.)

Die Kalibrierung ergab zwischen 5 ng/ml und 180 ng/ml eine lineare Beziehung entsprechend der Gleichung (40) mit  $A = -0.00221$ ,  $B = 0.00204$  ml/ng und einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0.996$ .

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde abgeschätzt mit dem Signal-Rausch-Verhältnis von drei. Die Bestimmungsgrenze wurde bei dreifacher Nachweisgrenze festgelegt.

Die Nachweisgrenze beträgt 2 ng/ml. Die Bestimmungsgrenze wird mit 6 ng/ml berechnet. Da die Plasmakonzentrationen von Levomepromazin zwischen 5 ng/ml und 150 ng/ml bei therapeutischer Dosierung liegen, ist die Methode zum Einsatz im TDM und klinischer Toxikologie geeignet. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen deutlichen Anstieg in der Empfindlichkeit der Bestimmung von Psychopharmaka durch SPME im Vergleich zu einer früheren Methode, die von ULRICH und MARTENS publiziert wurde [64].

## Präzision

Die Präzision wurde durch die Standardabweichung bei drei Konzentrationen (5 ng/ml, 80 ng/ml und 160 ng/ml Levomepromazin) bestimmt. Sechs Messungen wurden je Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

	5 ng/ml	80 ng/ml	160 ng/ml
Serielle Präzision	19.0 %	3.7 %	2.1 %
Zwischentägliche Präzision	18.6 %	6.7 %	3.2 %

Tab. 7 Präzision der Bestimmung von Levomepromazin mit SPME-GC-NPD bei 3 Konzentrationen (RSA, N = 6)

Die Präzision entspricht weitgehend den Anforderungen des TDM (Anhang III). Werte der Präzision um 18 % bei einer Konzentration von 5 ng/ml sind jedoch ein Hinweis auf die Bestimmungsgrenze der Methode.

### **6.2.4. BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT ÜBER INTERNE KONTROLLEN**

Die Methode wurde mit einer Standardmethode verglichen: Diese Methode basiert auf einer 3-Schritt-(basisch-sauer-basisch)-Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Chloramitriptylin als internem Standard. Ein Hewlett-Packard 5890 *series II plus* Gaschromatograph mit NPD und einem split-splitless Injektor wurde für die Analyse genutzt. Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) und N<sub>2</sub> (0.7 ml/min, 187 kPa) als Trägergas. Der NPD-Detektor wurde bei 300 °C gehalten. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 25 pA bis 30 pA. Der Injektor arbeitete bei 290 °C. Für den Ofen wurde ein Temperaturprogramm genutzt (265 °C (0 min), 2 °C/min bis 289 °C). Die HP-GC-Chemstation Software wurde für die Kalkulation der Retentionszeiten, Peak-Weiten und -Flächen genutzt. Die Kalibrierung war linear zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml (Korrelationskoeffizient  $r = 0.996$ ). Die Nachweisgrenze war 1 ng/ml für Levomepromazin. Die serielle Präzision (N = 10) wurde mit 8 %, 14 % und 5 % bei jeweils 3 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml bestimmt. Der Vergleich beider Methoden wurde für die Abschätzung der Richtigkeit der SPME-Methode genutzt. Dazu wurden die Ergebnisse der SPME-Methode und der Standardmethode

mittels linearer Regression (Gl. (40),  $x$  = Ergebnisse der Standardmethode,  $y$  = Ergebnisse der SPME-Methode) analysiert.

Zwölf identische Proben zwischen 0 und 250 ng/ml wurden mit beiden Methoden gemessen und die Ergebnisse analysiert. Eine sehr gute Übereinstimmung wurde gefunden, die sich durch einen Korrelationskoeffizienten  $r = 0.990$ , einen Anstieg  $B = 1.16$  und ein Absolutglied  $A = -0.34$  ng/ml auszeichnet (Anhang X, Abb. 34). In nahezu allen Parametern (Ausnahmen Desorptionszeit und innerer Standard) ist die Methode für Levomepromazin gleich der Methode für Clozapin. Dadurch ist in der Praxis eine flexible Anwendung beider Methoden möglich.

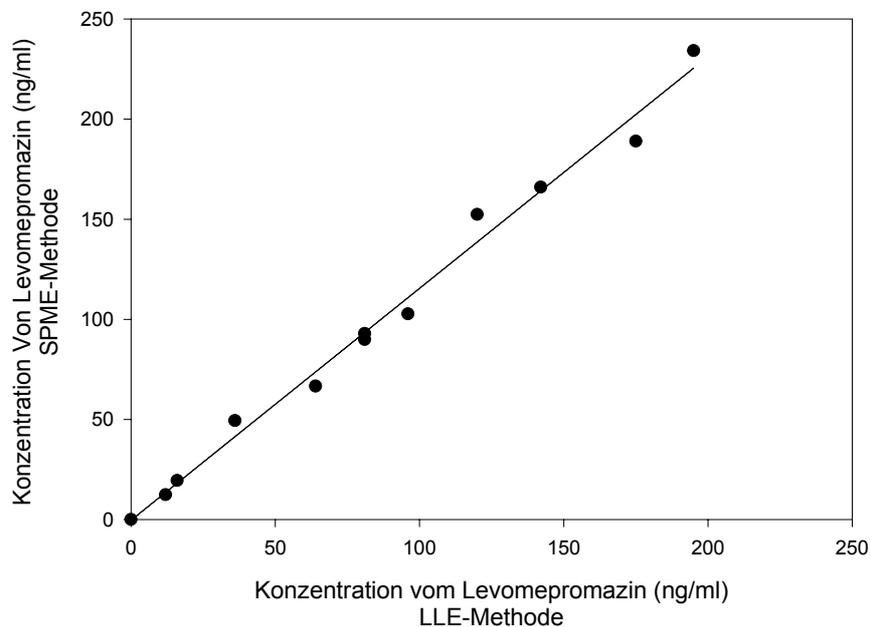


Abb. 34 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer LLE-GC-Standardmethode

### 6.2.5. ANALYSE VON PATIENTENPLASMA

Es wurden sieben Patientenproben (Tab. 8) mit beiden Methoden vermessen, und die Ergebnisse mit Gl. (40) analysiert. Wie für die gespikten Plasmaproben wurde auch hier eine gute Übereinstimmung der SPME-Ergebnisse und der Ergebnisse der Standardmethode gefunden ( $r = 0.998$ ,  $B = 1.00$ ,  $A = -3.29$  ng/ml; Anhang XI, Abb. 35).

Es ist zu beachten, dass diese gute Übereinstimmung beider Methoden trotz der niedrigen Wiederfindungsraten für Levomepromazin der SPME gefunden wurde.

Patient-Nummer	Proben-Nummer	Levomepromazin	Komedikation
<b>1</b>	1	unbekannt	Lorazepam
<b>2</b>	2	125 mg/Tag	Biperiden Fluphenazin
	3	125 mg/Tag	Biperiden Fluphenazin
	4	125 mg/Tag	Biperiden Fluphenazin
<b>3</b>	5	300 mg/Tag	Simethicon Lactulose Levothyroxin Clozapin Valproat
	6	150 mg/Tag	Citalopram Levothyroxin Valproat Clozapin
<b>4</b>	7	150 mg/Tag	Flupenthixol Valproat

Tab. 8 Dosis und Komedikation bei den Patientenproben

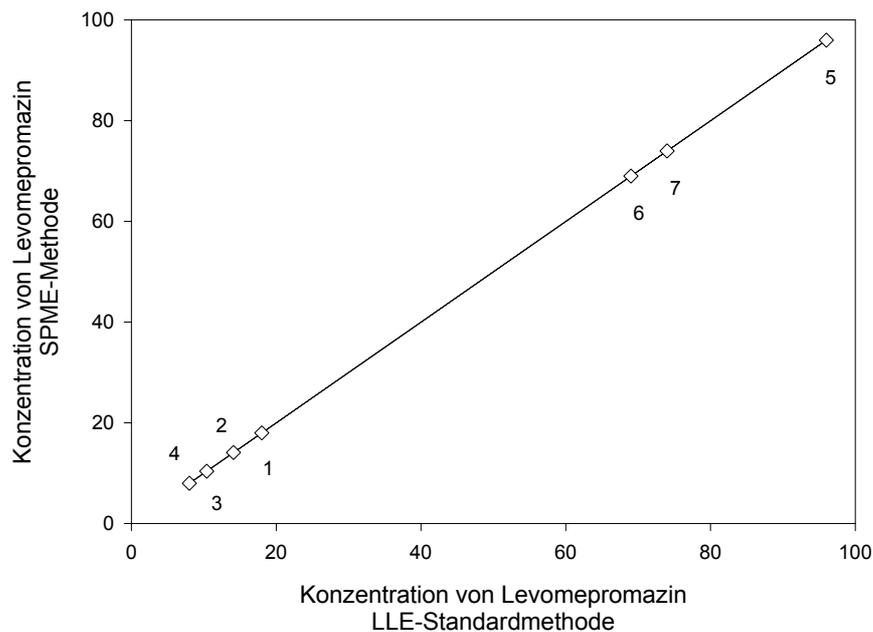


Abb. 35 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer LLE-Standardmethode (Patientenproben), Probennummern entsprechen den Nummern in Tabelle 8

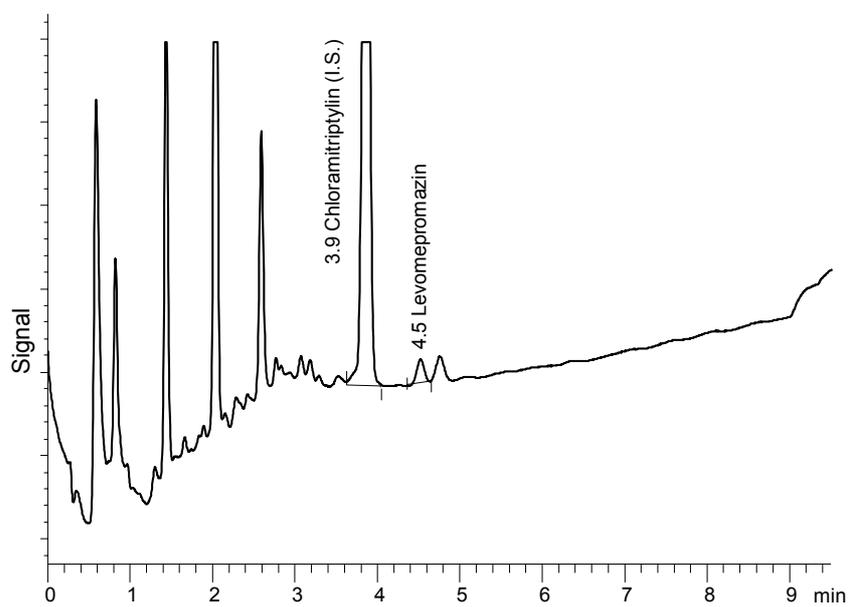


Abb. 36 Chromatogramm von Patient-Nr. 1 mit 16 ng/ml Levomepromazin (Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.2.1.)

Es wurde eine vollständig für das TDM von Levomepromazin validierte Methode entwickelt und die Ergebnisse in [125] publiziert.

### 6.3. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON CLOMIPRAMIN UND DESMETHYLCLOMIPRAMIN

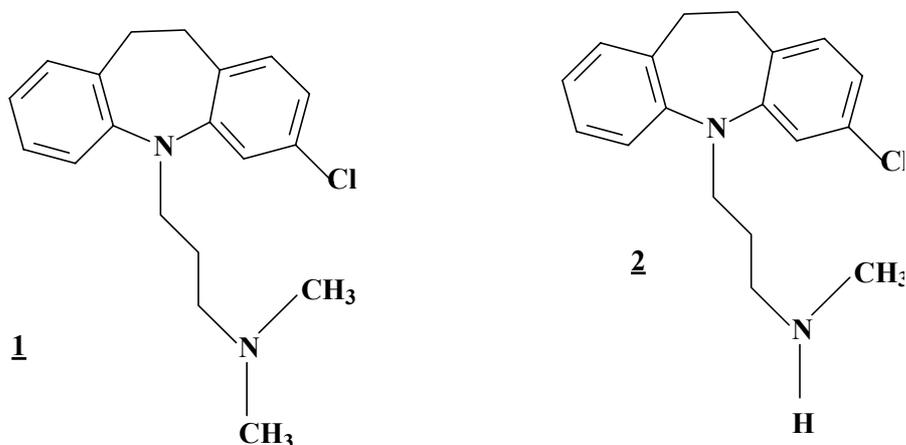


Abb. 37 Chemische Struktur von 1 Clomipramin und 2 Desmethylclomipramin

Clomipramin (Clomi), 3-Chlor-10,11-dihydro-*N,N*-dimethyl-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-5-propanamin, ist ein Vertreter der trizyklischen Antidepressiva. Es wird zur Behandlung von endogenen, psychogenen und organischen Depressionen, Zwangspänomenen, Phobien, dem narkoleptischen Syndrom sowie chronischen Schmerzzuständen eingesetzt. Der therapeutische Bereich von Clomipramin und seinem Hauptmetaboliten Desmethylclomipramin (DM-Clomi) liegt zwischen 200 ng/ml und 350 ng/ml.

#### 6.3.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATEN UND CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

##### Extraktion

Für die Probenaufarbeitung und Extraktion der mit Clomipramin und Desmethylclomipramin versetzten Proben wurde in Anlehnung an die Clozapin-Vorschrift (siehe Kap. 6.1.1.) folgende SPME-Standardmethode entwickelt: 250 µl Plasma wurden mit 50 µl internem Standard (4 µg/ml Chloramitriptylin), 1700 µl Wasser und 500 µl wässriger 1 M Natronlauge, die 6 % NaCl enthält, gemischt. Davon wurden 1500 µl in ein *ependorf*-Vial abgenommen. Die Extraktion fand bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min über 30 min mittels einer 100-µm-PDMS-Faser

statt. Nach der Extraktion wurde die Faser jeweils 20 s in Wasser und in einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1 Volumenanteile) gewaschen und anschließend 2 min bei Raumtemperatur getrocknet.

#### Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsraten wurden durch Vergleich der Signalflächen von Clomipramin, Desmethylclomipramin und Chloramitriptylin nach SPME mit definierten Gehalten der Analyten nach Direktinjektion einer flüssigen Lösung (n-Hexan/i-Amylalkohol = 98.5/1.5 (V/V)) in den Gaschromatographen bestimmt. Der injizierte Gehalt entsprach annähernd dem Analytengehalt im Vial nach der Verdünnung mit Wasser und Natronlauge. Die Wiederfindungsrate war niedrig, 4.4 % für Clomipramin, 3.9 % für Desmethylclomipramin und 2.6 % für Chloramitriptylin. Diese Wiederfindungsraten wurden vor Erreichen des Gleichgewichts gefunden. Wie auch für die bisher untersuchten Psychopharmaka scheint die hohe Proteinbindung von Clomipramin und Desmethylclomipramin der hemmende Mechanismus der Extraktion in Plasma zu sein [64, 119, 120, 125].

Ähnlich zu den Untersuchungen zu Clozapin sollte durch Zugabe eines hochkonzentrierten (ca. 10fache maximale Analytkonzentration) Konkurrenten für die Eiweißbindung die Extraktionsausbeute von Clomipramin und seinem Metaboliten erhöht werden [95, 97]. Aufgrund seiner ähnlichen Struktur wurde Imipramin ausgewählt. Als Ergebnis musste jedoch eine Verschlechterung der Wiederfindungsrate festgestellt werden. Vermutlich ist die Affinität des Imipramins zur Faserbeschichtung (PDMS) höher als die des Clomipramins, und es agiert als Konkurrent bei der Extraktion. In einem weiteren Versuch wurde zur Lösung der Eiweißbindung 0.1 M Trichloressigsäure (TCA) der zu extrahierenden Lösung zugegeben [97]. Dadurch konnte die Extraktionsausbeute jedoch nur geringfügig verbessert werden.

#### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) und N<sub>2</sub> (0.7 ml/min, 190 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfsgas N<sub>2</sub> 28 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 300 °C im splitless Modus während der Desorption. Die Messung erfolgte nach der

Desorption, und der Split wurde geöffnet. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min auf 260 °C, 4 °C/min auf 280 °C (1 min)).

Die optimale Desorptionszeit für Clomipramin und seinen Metaboliten wurde bei einer Temperatur 300 °C bei 90 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % der Analyten desorbiert, und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden. Die empfohlene Betriebstemperatur für die 100- $\mu$ m-PDMS-Faser von maximal 280 °C (siehe Tab. 5) wurde zwar um 20 °C überschritten, es konnten jedoch keine Nachteile für die benutzten Fasern festgestellt werden. Bei niedrigeren Desorptionstemperaturen konnte selbst nach einer Desorptionszeit von 2 min keine vollständige Desorption erreicht werden.

Als wichtiges Ergebnis wurden am Beispiel des Desmethylclomipramins weiterhin gefunden, dass Interferenzen aus der Matrix in der Faser bei wiederholter Anwendung akkumulieren können. Demzufolge ist es Aufgabe der Methodenentwicklung in der SPME, nicht nur die Desorptionskinetik der Analyten, sondern auch die der Interferenzen zu untersuchen. Diese akkumulierten Interferenzen konnten jedoch durch wiederholte Postdesorption entfernt werden.

### **6.3.2. BESTIMMUNG DER EXTRAKTIONSENTHALPIE**

Die Verteilungskonstante  $K_{fs}$  von Clomipramin zwischen der Faser (Beschichtung/PDMS) und Wasser wurde durch Benutzung des bekannten Gehalts des extrahierten Arzneistoffs im Gleichgewicht ( $m_{Clomi} = 48.0$  ng), des Probenvolumens (1.5 ml) und des Schichtvolumens ( $6.6 \cdot 10^{-4}$  ml [64]) berechnet. Es wurde für  $K_{fs}$  ein Wert von 9181 erhalten. Dieser Wert deutet auf eine Verteilung hin, welche stark auf der Seite der Faserbeschichtung liegt. Dies wurde aufgrund der Lipophilie der psychotropen Arzneistoffe erwartet.

Für die Berechnung der molaren Enthalpie des Phasenüberganges wurde bei fünf verschiedenen Temperaturen (22 °C, 30 °C, 40 °C, 60 °C und 90 °C) jeweils aus wässriger Lösung bis zum Gleichgewicht extrahiert (Abb. 38).

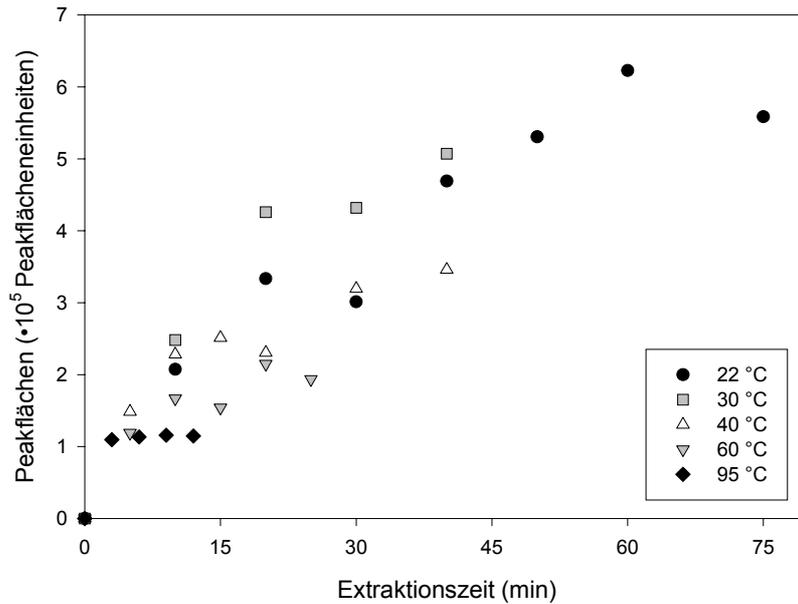


Abb. 38 Einfluss der Temperatur auf den Extraktionsverlauf (Clomipramin)

Die Extraktionsenthalpie wurde aus der graphischen Darstellung der Messergebnisse (Abb. 39) mit Hilfe der Gleichung (21) (S. 13)

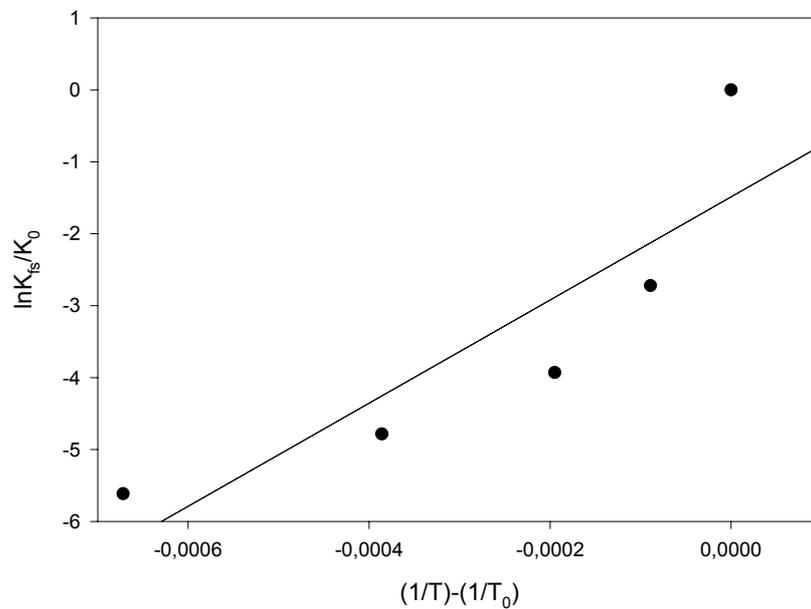


Abb. 39 Graphische Darstellung zur Bestimmung von  $\Delta H$  für Clomipramin aus dem Anstieg der Regressionsgeraden

zu  $\Delta H = -60$  kJ/mol abgeschätzt. Wie erwartet, wurde eine negative Extraktionsenthalpie für eine freiwillig verlaufende Extraktion erhalten. Dieses wurde aufgrund der Lipophilie des psychotropen Arzneistoffes erwartet. Zusätzlich wurde das Extraktionsgleichgewicht durch die Zugabe einer Base (1 M NaOH) zugunsten der Faser verschoben. Da die berechneten Werte für das logarithmische Verhältnis der Verteilungskonstanten stark von der Regressionsgeraden abweichen ( $r = 0.877$ ), ist zu vermuten, dass das Gleichgewicht bei der Untersuchung noch nicht bei allen Temperaturen erreicht war.

Die Bestimmung von thermodynamischen Parametern des Phasenüberganges durch SPME könnte in vielen Bereichen eine einfache und interessante Alternative darstellen.

### **6.3.3. TEST AUF MIT DER CLOMIPRAMINBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN**

In Anlehnung an validierte Methoden für die Bestimmung von trizyklischen Antidepressiva wurde für diese Methode eine HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33  $\mu$ m Film) ausgewählt [89]. Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber möglichen Interferenzen durch die Matrix (Plasma) und Kontaminationen der Faser getestet (Abb. 16). Da Clomipramin und Desmethyloclopramin wesentlich höhere Retentionsindizes als andere trizyklische Antidepressiva haben, ist hier die Situation wegen einer besseren Separierung der Interferenzen, die von der Matrix bzw. Kontaminationen der Faser stammen, günstiger. Abbildung 40 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma und mit jeweils 250 ng/ml Clomipramin und Desmethyloclopramin versetztem Plasma. Keine interferierenden Signale zeigen sich in Chromatogrammen von Leerplasma gesunder Probanden. Signale der Matrix befinden sich hauptsächlich im Bereich  $t_R \leq 6.5$  min. Ein sehr kleines Signal bei  $t_R = 6.7$  min interferiert etwas mit Chloramitriptylin (I.S.). Aber dieses Signal beeinflusst nicht die Identifikation und Quantifizierung, da das Signal von Chloramitriptylin sehr groß im Vergleich zu dieser Interferenz ist.

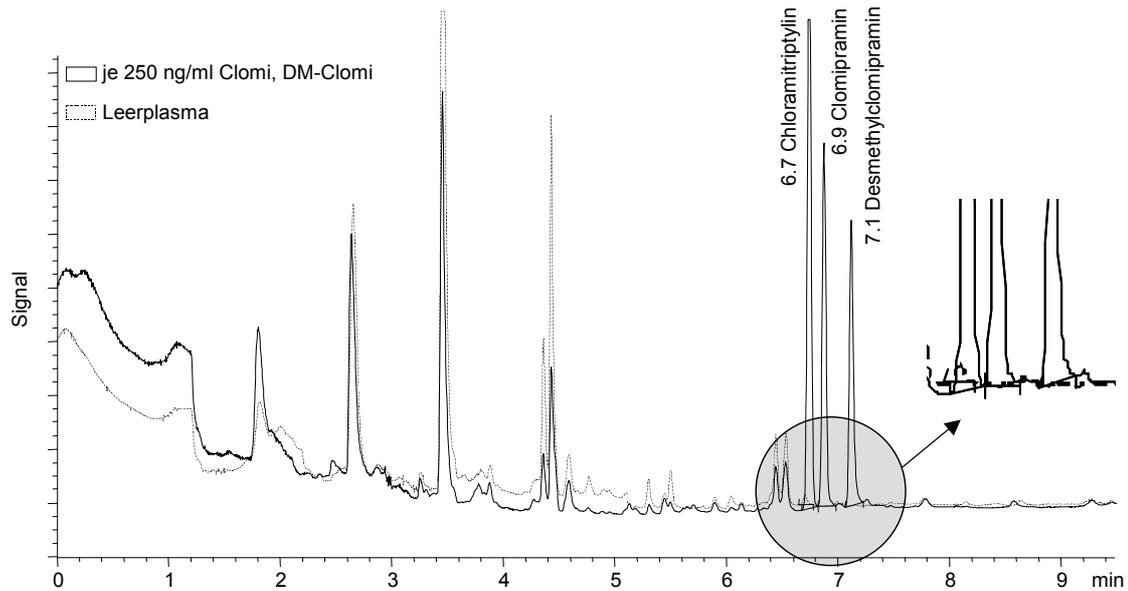


Abb. 40 Typische SPME-GC-NPD-Chromatogramme der Extrakte eines Leerwertes und einer gespiketen Probe (je 250 ng/ml Clomipramin und Desmethyldomipramin; Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.3.1.)

Es wurden keine Interferenzen mit anderen Arzneistoffen gefunden, die mittels SPME extrahiert werden können (Anhang VI). Somit ist die Methode für das TDM und für toxikologische Analysen selektiv genug.

#### 6.3.4. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION

##### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden durch lineare Regression der Flächenverhältnisse  $A_{\text{Clomi}}/A_{\text{Cl-Ami}}$  und  $A_{\text{DM-Clomi}}/A_{\text{Cl-Ami}}$  mit dem bekannten Gehalt des Analyten im Konzentrationsbereich von jeweils 25 ng/ml bis 250 ng/ml berechnet.

Die Kalibrierung im angegebenen Konzentrationsbereich ergab für eine Auswertung entsprechend Gleichung (40) ( $x$  = Konzentration des Analyten,  $y$  = Peakflächenverhältnisse zum inneren Standard) lineare Beziehungen, die den Koordinatenursprung kreuzen:  $A_{\text{Clomi}} = -0.0208$ ,  $B_{\text{Clomi}} = 0.00224 \text{ ml/ng}$ ,  $r_{\text{Clomi}} = 0.998$ ;  $A_{\text{DM-Clomi}} = -0.0710$ ,  $B_{\text{DM-Clomi}} = 0.00272 \text{ ml/ng}$ ,  $r_{\text{DM-Clomi}} = 0.987$ .

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen (Signal-Rausch-Verhältnis = 3) und Bestimmungsgrenzen wurden zu je 8 ng/ml und je 25 ng/ml Clomipramin und Desmethylclomipramin abgeschätzt. Bei einem therapeutischen Bereich für die Summe von Clomipramin und Desmethylclomipramin von 200 ng/ml bis 350 ng/ml ist die Methode somit empfindlich genug für das TDM.

### Präzision

Die Präzision wurde durch die relative Standardabweichung bei drei Konzentrationen (jeweils 25 ng/ml, 100 ng/ml und 250 ng/ml Clomipramin und Desmethylclomipramin) bestimmt. Sechs Messungen wurden je Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Clomipramin	25 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml
Serielle Präzision	12.2 %	3.7 %	2.0 %
Zwischentägliche Präzision	7.3 %	4.0 %	2.6 %
Desmethylclomipramin	25 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml
Serielle Präzision	4.5 %	7.0 %	3.2 %
Zwischentägliche Präzision	26.6 %	8.9 %	7.4 %

Tab. 9 Präzision der Bestimmung von Clomi und DM-Clomi mit SPME-GC-NPD bei 3 Konzentrationen (RSA, N = 6) RSA: relative Standardabweichung

Die Präzision entspricht weitgehend den Anforderungen des TDM (Anhang III). Der Wert der zwischentäglichen Präzision von 27 % bei einer Konzentration von 25 ng/ml Desmethylclomipramin ist jedoch ein Hinweis auf die Bestimmungsgrenze der Methode.

### **6.3.5. BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT ÜBER EXTERNE KONTROLLEN**

Die Methode wurde mit einer Standardmethode desselben Labors verglichen, die auf einer traditionellen LLE und GC-NPD-Analyse basiert. Diese Standardmethode entspricht einer Methode zur Bestimmung von Amitriptylin [89]. Zwölf identische Proben mit Gehalten an Clomipramin und Desmethylclomipramin von 0 bis je 325 ng/ml wurden mit beiden

Methoden gemessen, und die Ergebnisse wurden mit linearer Regression analysiert (Gl. (40),  $x$  = Ergebnisse der Standardmethode,  $y$  = Ergebnisse der SPME-Methode). Der Vergleich ergab eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse (Anhang XII, Tab. 10, Abb. 41).

	A	B	r
Clomipramin	6.4 ng/ml	1.04	0.972
Desmethylclomipramin	13.6 ng/ml	0.98	0.989

Tab. 10 Ergebnisse des Methodenvergleichs von SPME-GC-NPD und LLE-GC-NPD mittels linearer Korrelation

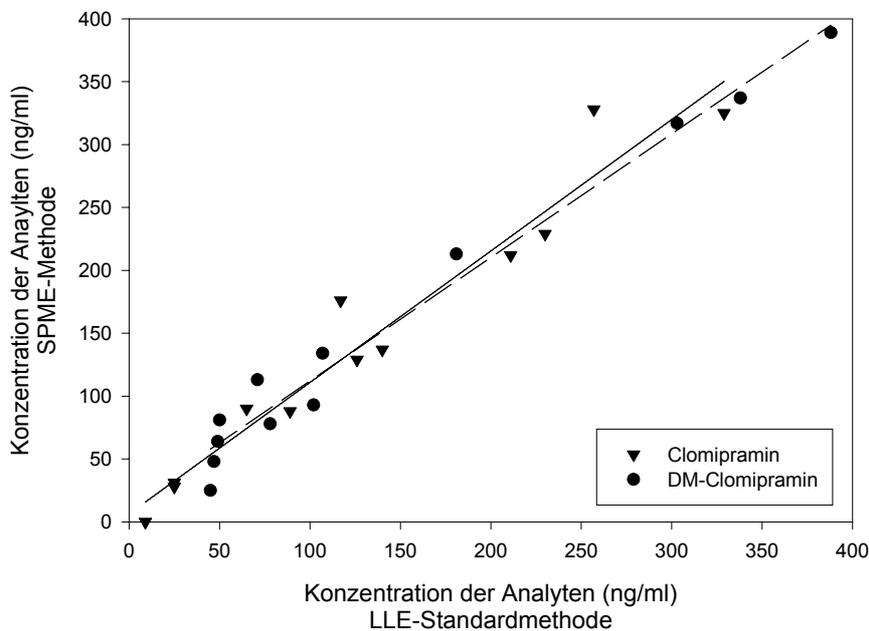


Abb. 41 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer LLE-GC-Standardmethode

Zusätzlich wurde die SPME-Methode mit einer Routine-HPLC-Methode verglichen, die in einem externen Labor genutzt wird. Eine sehr gute Übereinstimmung beider Methoden wurde beim Vergleich (Gl. (40)) von 12 Proben ebenfalls gefunden. Jedoch weicht der Anstieg stark von  $B = 1$  ab. Das deutet auf einen systematischen Fehler hin. Als Grund wurden vom externen Labor mögliche Verschleppungen bei der online-HPLC-Probenaufarbeitung durch RAM-Säulen mit Säulenschaltung genannt (Anhang XII, Tab. 11, Abb. 42).

	A	B	r
Clomipramin	-6.5 ng/ml	0.70	0.966
Desmethyloclomipramin	11.0 ng/ml	0.80	0.978

Tab. 11 Ergebnisse des Methodenvergleichs von SPME-GC-NPD und HPLC-online-Säulenschaltung mittels linearer Regression

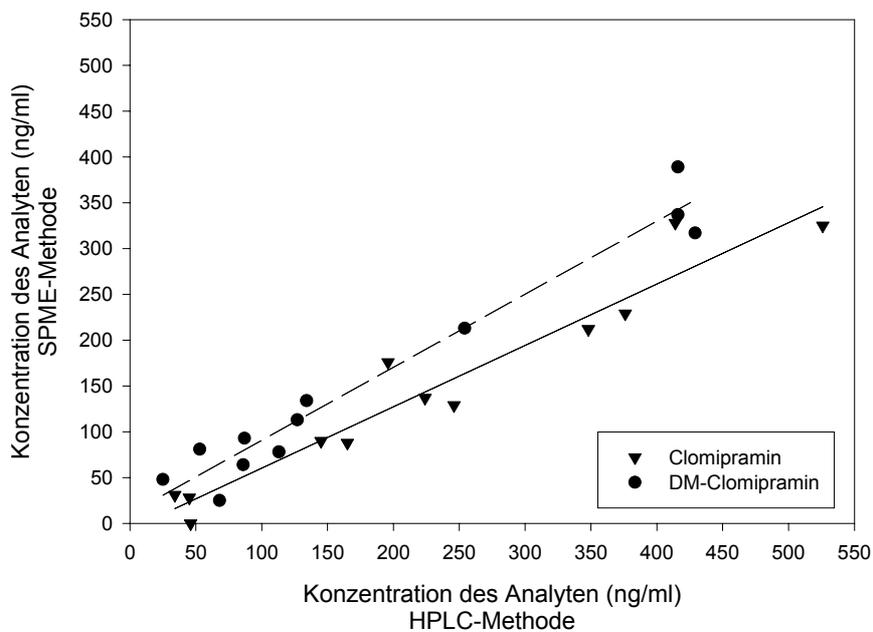


Abb. 42 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer HPLC-online-Säulenschaltung-Methode

Es wurde eine vollständig für das TDM von Clomipramin und Desmethyloclomipramin validierte Methode entwickelt.

## 6.4. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON OLANZAPIN

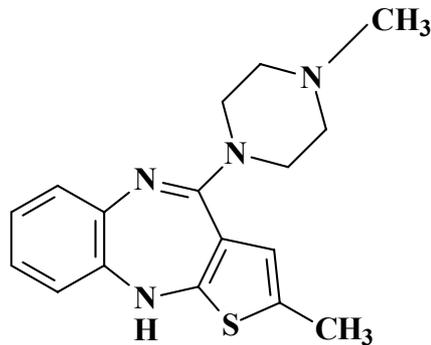


Abb. 43 Chemische Struktur von Olanzapin

Olanzapin (Ola), ein Thienobenzodiazepin (2-Methyl-4-(4-Methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno[2,3-*b*][1,5]benzodiazepin), ist ein potentes neues „atypisches“ Neuroleptikum ähnlich dem Clozapin, dem Prototyp der neuen atypischen Neuroleptika. Der therapeutische Bereich wird für Olanzapin mit > 9 ng/ml angegeben.

### 6.4.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATE UND CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

#### Extraktion

Da eine Extraktion der Olanzapin-Proben mittels der hier entwickelten SPME-Standard-Methoden nicht möglich war, sollte zur Verbesserung der Extraktionsausbeute die Eiweißbindung der Analyten durch Deproteinierung gelöst werden, wobei jedoch beachtet werden musste, dass die Analyten bei der Deproteinierung nicht mitgefällt werden [47]. Dazu wurden 1300 µl Serum mit 100 µl internem Standard (2 µg/ml Ethylolanzapin in 10 % MeOH) versetzt und mit 32.5 µl 36 %iger HCl angesäuert, um die Bindung von Protein und Analyten zu lösen. Anschließend wurde zur Eiweißfällung 100 µl 6 M TCA zugegeben, und die Proben in einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor 5 min bei 5600 U/min zentrifugiert.

Zur Extraktion wurden 1000 µl Überstand in einem *ependorf*-Vial abgenommen, und 500 µl wässriger 1 M Natronlauge, die 6 % NaCl enthält, zugegeben. Die Extraktion fand

bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min über 30 min mittels einer 85- $\mu$ m-PA-Faser statt.

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Extraktionskinetik dargestellt. Das Gleichgewicht der Extraktion wurde bereits nach ca. 3 h erreicht.

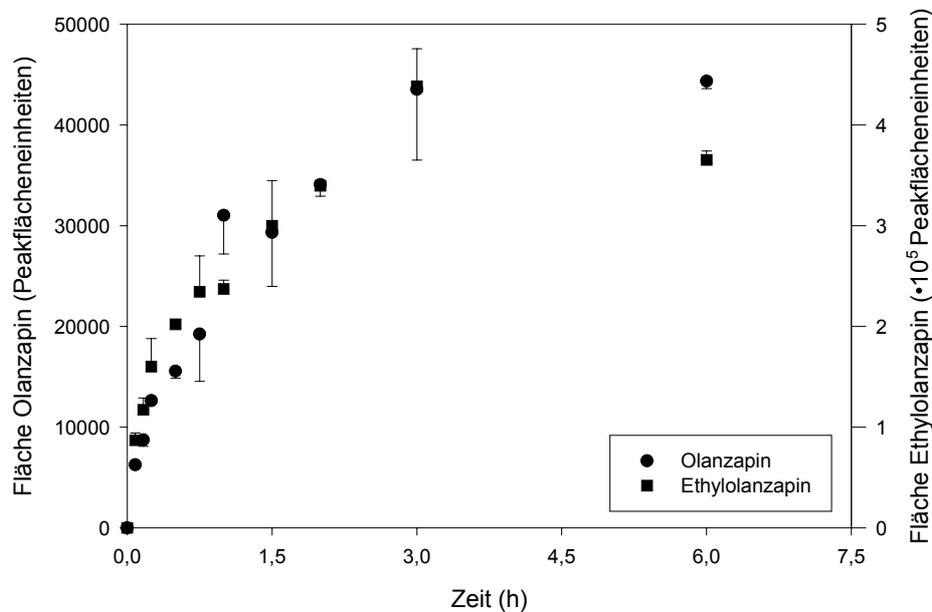


Abb. 44 Abhängigkeit der Peakflächen von Olanzapin und Ethylolanzapin von der Extraktionszeit (MW  $\pm$  SA, zwei Bestimmungen pro Messpunkt)

### Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate wurde durch Vergleich der Peakflächen der SPME-Extraktion von Olanzapin und Ethylolanzapin mit definierten Gehalten der Analyten nach der Injektion von flüssigen Lösungen bestimmt. Der injizierte Gehalt war vergleichbar mit dem Gehalt der Analyten in den SPME-Proben nach der Deproteinierung und der Zugabe von Natronlauge.

Die Wiederfindungsrate war niedrig, 5,5 % für Olanzapin und 6,4 % für Ethylolanzapin. Diese Wiederfindungsraten wurden vor Erreichen des Gleichgewichts gefunden. Es muss beachtet werden, dass sich die Wiederfindungsraten im Gleichgewicht (6 h) verdoppeln: 9,6 % für Olanzapin, 12,3 % Ethylolanzapin. Allerdings konnte trotz der schlechten Wiederfindungsrate eine gute Qualität der Methode demonstriert werden.

Auch die Variation des pH-Wertes der Extraktionslösung führte zu keiner Verbesserung der Extraktionsausbeute; sie nimmt mit sinkendem pH-Wert ab (Abb. 45). Es konnte auch kein Einfluss des pH-Wertes auf möglich Interferenzen (siehe Kap. 5.1.4.) festgestellt werden.

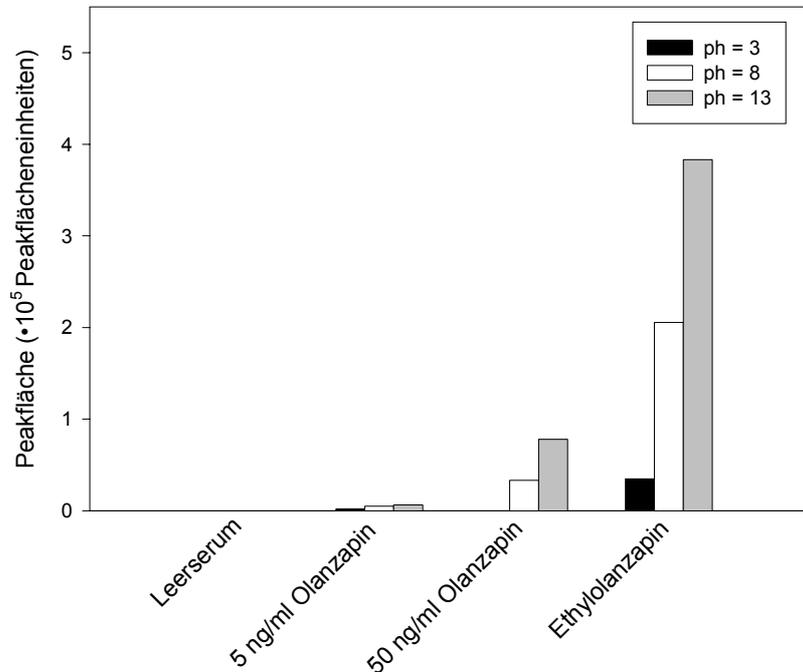


Abb. 45 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute vom pH-Wert der Extraktionslösung

### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film). Die chromatographischen Bedingungen entsprechen denen der Clozapin-Methode. Allerdings arbeitete der Injektor bei einer Temperatur von 310 °C, und bei der letzten Heizrate des Ofentemperaturprogramms wird nur bis 278 °C geheizt, und diese Temperatur 1 min gehalten. Die optimale Desorptionszeit für Olanzapin wurde bei einer Temperatur von 310 °C bei 90 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % des Analyten desorbiert und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden.

#### 6.4.2. TEST AUF MIT DER OLANZAPINBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber möglichen Interferenzen durch verschiedene Gruppen von Psychopharmaka, durch die Matrix (Plasma) und Kontaminationen der Faser (Abb. 18) getestet. Für Olanzapin wurde aufgrund eines höheren Retentionsindexes eine gute Abtrennung der Störpeaks, die von der Matrix bzw. Kontaminationen der Faser stammen, gefunden. Abbildung 46 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma mit Ethylolanzapin (I.S.) und Plasma, das mit 25 ng/ml Olanzapin versetzt wurde. Keine interferierenden Signale zeigen sich im Chromatogramm von Leerplasma gesunder Probanden. Signale von der Matrix befinden sich hauptsächlich im Bereich  $t_R < 4$  min.

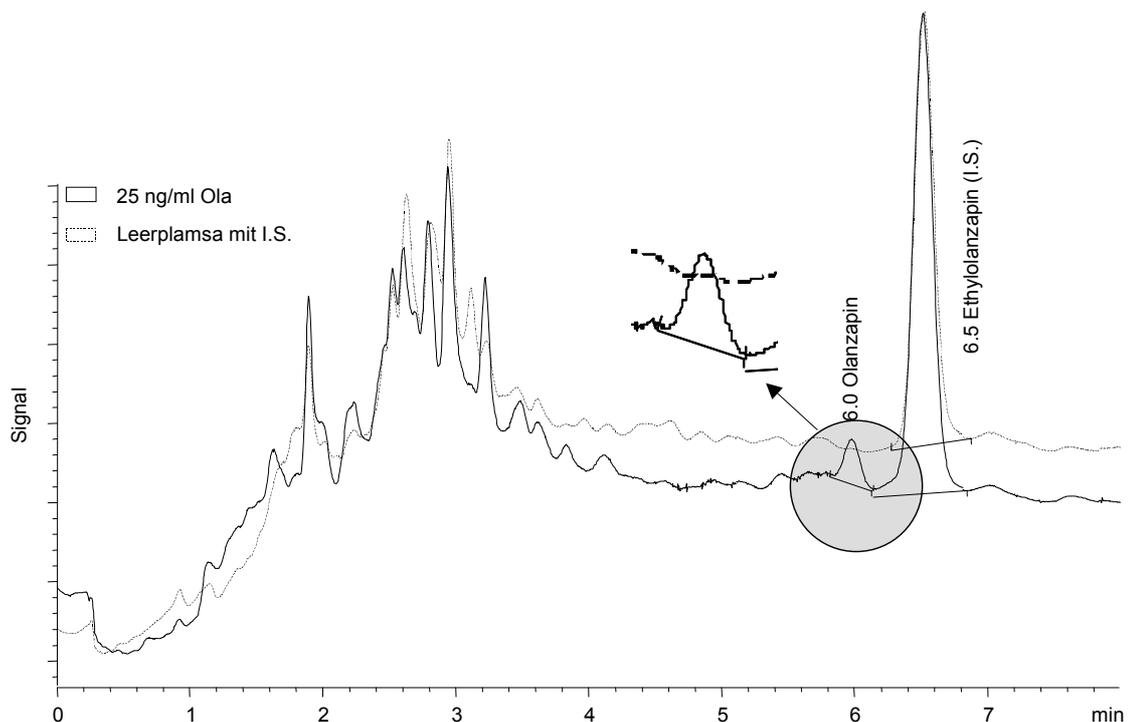


Abb. 46 Typische SPME-GC-NPD-Chromatogramme der Extrakte eines Leerwertes und einer gespikten Probe (25 ng/ml Olanzapin; Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.4.1.)

Es wurden keine Interferenzen mit anderen Arzneistoffen gefunden, die mittels SPME extrahiert werden können (Anhang V). Somit ist die Methode für das TDM und für toxikologische Analysen selektiv genug.

### **6.4.3. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION**

#### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden typisch durch die Gleichung (40) beschrieben, wobei  $y$  das Signalflächenverhältnis  $A_{Ola}/A_{E-Ola}$ ,  $x$  die Olanzapin-Konzentration und  $A$  und  $B$  jeweils das Absolutglied und den Anstieg darstellen. Die 10-Punkt-Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 50 ng/ml bei äquidistanten Konzentrationen.

Die Kalibrierkurve für Olanzapin ist in diesem Bereich linear und durchschneidet den Nullpunkt. Typische Lösungen für  $A$ ,  $B$  und  $r$  der linearen Regression waren jeweils -0.00501, 0.00410 ml/ng und 0.983.

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde mit dem Signal-Rausch-Verhältnis von drei abgeschätzt. Die Bestimmungsgrenze wurde mit dreifacher Nachweisgrenze festgelegt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze waren 1.8 ng/ml (gerundet 2 ng/ml) und 5 ng/ml. Die Methode scheint somit für den Einsatz im TDM geeignet, da der therapeutische Bereich von Olanzapin mit  $> 9$  ng/ml angegeben wird.

#### Präzision

Die Präzision in Serie wurde durch die Berechnung der relativen Standardabweichung der Signalflächenverhältnisse bei zwei Olanzapin-Konzentrationen (5 ng/ml und 50 ng/ml) bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine größere Menge von versetzter Probe von jeder Konzentration hergestellt und für die einzelnen Messungen geteilt. Zehn Messungen wurden je Konzentration durchgeführt.

Die Ergebnisse für die serielle Präzision waren 14.8 % für 5 ng/ml und 5.6 % für 50 ng/ml. Die Präzision entspricht weitgehend den Anforderungen des TDM (Anhang III). Werte der

Präzision um 15 % bei einer Konzentration von 5 ng/ml sind jedoch ein Hinweis auf die Bestimmungsgrenze der Methode.

#### **6.4.4. BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT ÜBER INTERNE KONTROLLEN**

Die Methode wurde mit einer Standardmethode verglichen: Diese Methode basiert auf einer Ein-Schritt-LLE-HPLC. Die chromatographischen Bedingungen sind aus der Literatur übernommen worden [73]. Die Kalibrierung war linear zwischen 5 ng/ml und 50 ng/ml (Korrelationskoeffizient  $r = 0.998$ ). Die Nachweisgrenze war 0.15 ng/ml für Olanzapin. Die serielle Präzision ( $N = 10$ ) wurde mit 15.4 %, 4.0 % und 5.5 % bei 0.5 ng/ml, 5 ng/ml und 50 ng/ml bestimmt. Der Vergleich beider Methoden wurde für die Bestimmung der Genauigkeit der SPME-Methode genutzt. Dazu wurden die Ergebnisse der SPME-Methode und der Standardmethode mittels linearer Korrelation (Gl. (40),  $x =$  Ergebnisse der Standardmethode,  $y =$  Ergebnisse der SPME-Methode) analysiert.

Zehn Proben zwischen 0 und 100 ng/ml wurden mit beiden Methoden gemessen, und die Ergebnisse analysiert. Eine gute Übereinstimmung wurde gefunden, die sich durch einen Korrelationskoeffizienten  $r = 0.973$ , einen Anstieg  $B = 0.84$  und ein Absolutglied  $A = 4.4$  ng/ml auszeichnet (Anhang XIII, Abb. 47). Die etwas geringeren Konzentrationen durch die SPME-Bestimmung könnte auf einen systematischen Fehler durch die Eiweißfällung zurückzuführen sein.

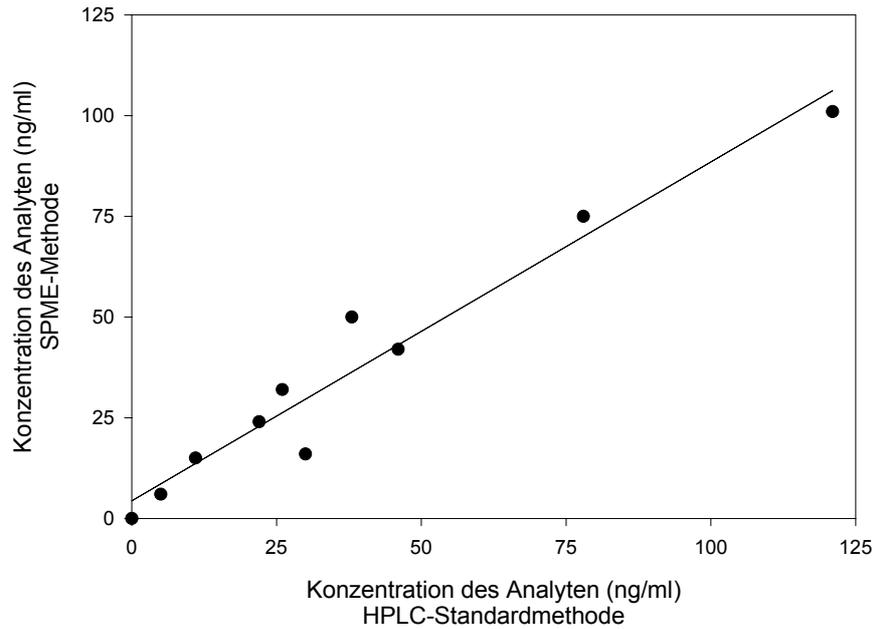


Abb. 47 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer HPLC-Standardmethode

Trotz der Deproteinierung vor der Extraktion ähnelt die beschriebene Methode für Olanzapin den Methoden für Clozapin und Levomepromazin, was eine flexible Anwendung aller 3 Methoden in der Praxis ermöglichen sollte. Die Deproteinierung mit zusätzlichen Arbeitsschritten wie Pipettieren und Zentrifugieren schränkt aber den Wert der SPME-Methode für Olanzapin als einfache Probenaufarbeitung nicht unwesentlich ein.

## 6.5. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON CLOMETHIAZOL

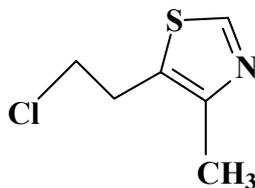


Abb. 48 Chemische Struktur von Clomethiazol.

Clomethiazol (ClMeth), 5-(2-Chlorethyl)-4-methylthiazol, wird am häufigsten zur Behandlung des Alkoholentzugssyndroms einschließlich Delirium tremens eingesetzt. Es wirkt sedierend, hypnotisch und antikonvulsiv. Clomethiazol besitzt aber selbst ein hohes Abhängigkeitspotential, weshalb nur eine zeitlich begrenzte Therapie empfohlen wird. Risiken während der Therapie entstehen durch eine stark erhöhte Bioverfügbarkeit bei Leberzirrhose mit erhöhten Serumspiegeln, was zu zentraler Atemdepression führen kann. Deshalb wird bei Patienten mit Leberzirrhose eine Kontrolle der Serumspiegel von Clomethiazol empfohlen. Clomethiazol erscheint als optimale Verbindung zur Anwendung der Headspace-SPME. Es ist lipophil, leicht flüchtig und kommt in relativ hohen Konzentrationen (0.3 µg/ml bis 5 µg/ml) im Blut vor. Bisher ist in der Literatur nur wenig zu diesem möglichen Verfahren der Arzneimittelanalytik beschrieben worden [45, 46, 56, 58, 65].

### 6.5.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATEN UND CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

#### Extraktion

Die Extraktion des Clomethiazols aus dem Serum erfolgte mittels Headspace-SPME. Dazu wurden 250 µl Serum mit 1700 µl Wasser verdünnt und unter Zusatz von 50 µl internem Standard (0.1 µl/ml 5-Methylthiazol) und 500 µl gesättigter Natriumcarbonatlösung (22 g in 100 ml Wasser) unter Rühren (Magnetrührer) bei Raumtemperatur mit einer 100-µm-PDMS-Faser 30 min extrahiert. Aufgrund der geänderten Probenagitation konnten nicht

mehrere Proben simultan extrahiert werden, so dass sich der Zeitaufwand erhöhte. Bei Übernahme dieser Methode in Routineuntersuchungen wäre jedoch die Anwendung eines Headspace-SPME-Autosamplers möglich.

#### Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsraten wurden durch Vergleich der Signalflächen von Clomethiazol und 5-Methylthiazol nach Headspace-SPME mit definierten Gehalten der Analyten nach Direktinjektion einer flüssigen Lösung (n-Hexan/i-Amylalkohol = 98.5/1.5 (V/V)) in den Gaschromatographen bestimmt. Der injizierte Gehalt entsprach annähernd dem Analytengehalt im Vial nach der Verdünnung mit Wasser und Zugabe von Natriumcarbonatlösung. Die Wiederfindungsrate war extrem niedrig, 0.15 % für Clomethiazol und 0.28 % für 5-Methylthiazol. Diese Wiederfindungsraten wurden vor Erreichen des Gleichgewichts, nach 30 min Extraktion, gefunden. Die hohe Proteinbindung der beiden Arzneistoffe scheint der extraktionshemmende Schritt der Extraktion aus Plasma zu sein. Dieser Effekt wurde auch für die Analyse von Psychopharmaka in Plasma durch SPME in früheren Arbeiten, z.B. für TZA und Neuroleptika [64, 119, 120, 125], beschrieben.

#### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film). Die chromatographischen Bedingungen entsprechen im wesentlichen der Clomipramin-Methode (Kap. 6.3.1.). Allerdings mussten aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Clomethiazol und 5-Methylthiazol das Temperaturprogramm des Ofens und die Temperatur des Injektors wie folgt geändert werden: Der Injektor arbeitete bei 250 °C im splitless Modus während der Desorption; der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (60 °C (0 min), 5 °C/min auf 75 °C, 40 °C/min auf 235 °C (1 min)). Bei nicht optimal gewählten Bedingungen wurde eine Spaltung des Peaks von Clomethiazol beobachtet. Peakspaltung in der Headspace-SPME wird auch durch zu langsames Freisetzen der Analyten von der Faser im heißen Injektor (Abb. 1) beschrieben [108].

Die optimale Desorptionszeit für Clomethiazol wurde bei einer Temperatur 250 °C bei 90 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % des Analyten desorbiert und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden.

### 6.5.2. TEST AUF MIT DER CLOMETHIAZOLBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber möglichen Interferenzen durch die Matrix (Plasma) und Kontaminationen der Faser getestet. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit von Clomethiazol könnte sich die Separierung dieser Interferenzen als schwierig erweisen. Abbildung 49 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma mit 5-Methylthiazol und Plasma, das mit 2 µg/ml Clomethiazol versetzt wurde. Keine interferierenden Signale zeigen sich im Chromatogramm vom Leerplasma gesunder Probanden.

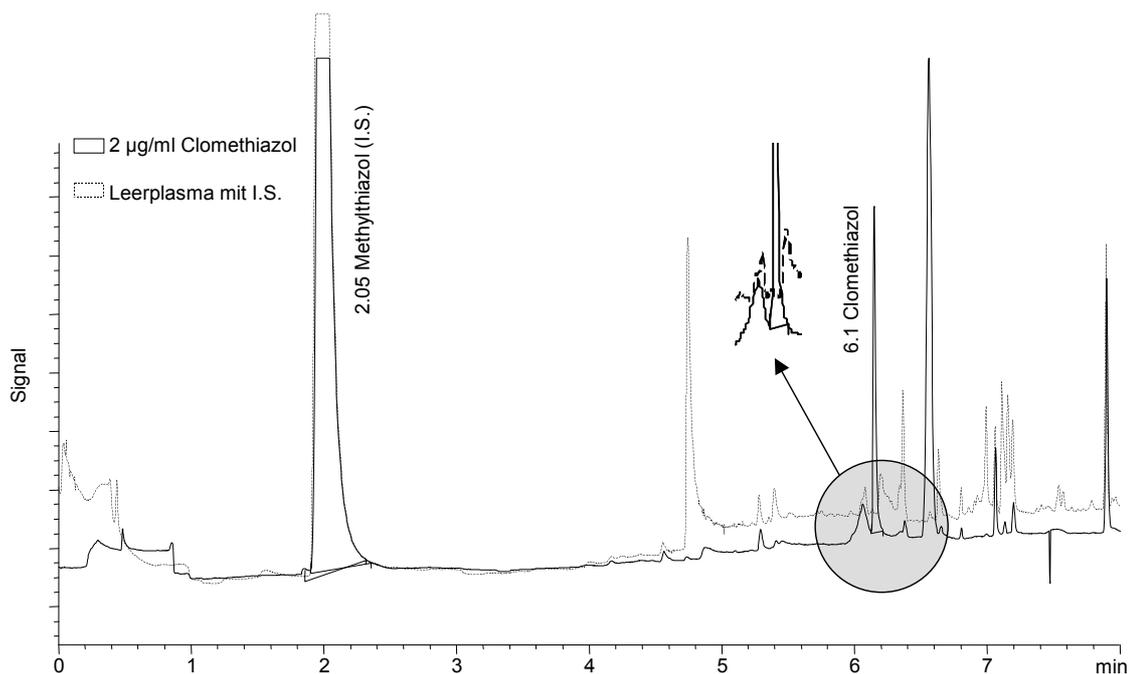


Abb. 49 Typische HS-SPME-GC-NPD-Chromatogramme der Extrakte eines Leerwertes und einer gespikten Probe (2 µg/ml Clomethiazol; Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.5.1.)

### 6.5.3. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION

#### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden durch lineare Regression der Flächenverhältnisse  $A_{\text{CIMeth}}/A_{\text{S-MTA}}$  mit bekanntem Gehalt des Analyten im Konzentrationsbereich von jeweils 0.1 µg/ml bis 4.5 µg/ml berechnet.

Die Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0.1 µg/ml bis 4.5 µg/ml ergab für eine Auswertung entsprechend Gleichung (40) ( $x$  = Konzentration des Analyten,  $y$  = Peakflächenverhältnisse zum innerem Standard) lineare Beziehungen, die den Koordinatenursprung kreuzen:  $A = - 0.00670$  ,  $B = 0.0323 \text{ ml}/\mu\text{g}$  und  $r = 0.990$ .

#### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Signal-Rausch-Verhältnis = 3) und Bestimmungsgrenze wurden zu 0.1 µg/ml und 0.3 µg/ml abgeschätzt. Bei zu erwartenden Serumkonzentration von 0.3 µg/ml bis 5 µg/ml Clomethiazol bei üblicher Dosis ist die Methode somit empfindlich genug für das TDM.

#### Präzision

Die Präzision wurde durch die relative Standardabweichung bei drei Konzentrationen (0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml und 4.5 µg/ml Clomethiazol) bestimmt. Zehn Messungen wurden je Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse waren 69 % für 0.1 µg/ml, 8.0 % für 0.5 µg/ml und 7.1 % für 4.5 µg/ml. Die Präzision entspricht weitgehend den Anforderungen des TDM (Anhang III). Der Wert von 69 % bei einer Konzentration von 0.1 µg/ml Clomethiazol ist jedoch ein Hinweis auf die Nachweisgrenze der Methode.

Eine Übernahme dieser Methode in die Routinebetrieb eines Labors würde sich aufgrund nicht simultaner manueller Probenaufarbeitung nur bei Einsatz eines Headspace-SPME-Autosamplers rentieren.

## 6.6. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN

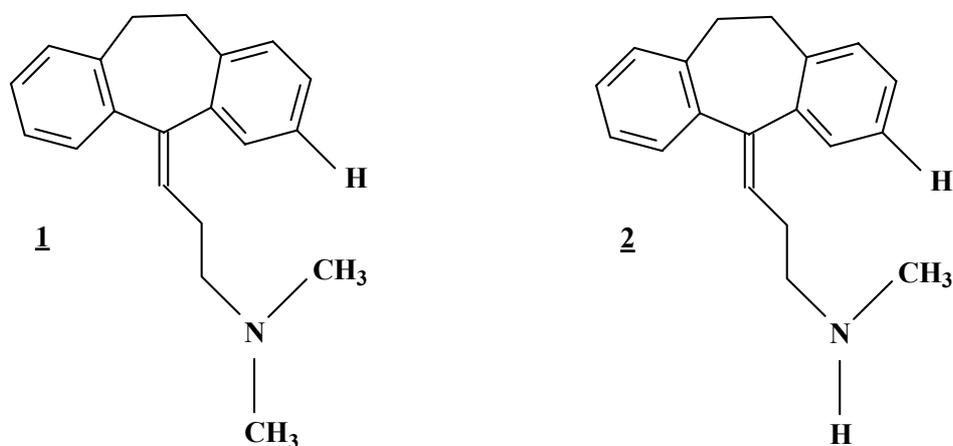


Abb. 50 Chemische Struktur von 1 Amitriptylin und 2 Nortriptylin

Amitriptylin (Ami), 3-(10,11-Dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5-yliden)-*N,N*-dimethyl-1-propanamin, und Nortriptylin (Nor), ebenfalls typische Vertreter der Arzneimittelgruppe der trizyklischen Antidepressiva, werden zur Therapie von allen Formen des depressiven Syndroms, insbesondere des ängstlich-agitierten Typs, eingesetzt. Nortriptylin ist Hauptmetabolit von Amitriptylin aber auch ein selbstständiges verwendetes trizyklisches Antidepressivum. Der therapeutische Bereich von Amitriptylin und Nortriptylin (Summe) liegt zwischen 80 ng/ml und 250 ng/ml.

### 6.6.1. EXTRAKTION, WIEDERFINDUNGSRATEN UND CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

#### Extraktion

Für die Probenaufarbeitung und Extraktion der mit Amitriptylin und Nortriptylin versetzten Proben wurde in Anlehnung an die Vorversuche (siehe Kap. 5.) folgende SPME-Standardmethode entwickelt: 250 µl Plasma wurden mit 50 µl internem Standard (je 2 µg/ml Desipramin und Clomipramin), 1700 µl Wasser und 500 µl wässriger 1 M Natronlauge, die 6 % NaCl enthält, gemischt. Davon wurden 1500 µl in ein *ependorf*-Vial abgenommen. Die Extraktion fand bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von

700 U/min über 30 min mittels einer 100- $\mu$ m-PDMS-Faser statt. Nach der Extraktion wurde die Faser jeweils 20 s in Wasser und in einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1 Volumenanteile) gewaschen und anschließend 2 min bei Raumtemperatur getrocknet.

#### Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsraten wurden durch Vergleich der Signalflächen von Amitriptylin, Nortriptylin, Desipramin und Clomipramin nach SPME mit definierten Gehalten der Analyten nach Direktinjektion einer flüssigen Lösung (n-Hexan/i-Amylalkohol = 97/3 (V/V)) in den Gaschromatographen bestimmt. Der injizierte Gehalt entsprach annähernd dem Analytengehalt im Vial nach der Verdünnung mit Wasser und der Zugabe von Natronlauge. Die Wiederfindungsraten waren im Vergleich zu den bisherigen Methoden höher, 11.6 % für Amitriptylin, 12.5 % für Nortriptylin, 11.4 % für Desipramin und 7.1 % für Clomipramin. Diese Wiederfindungsraten wurden vor Erreichen des Gleichgewichts gefunden. Die Verbesserung gegenüber der früheren Arbeit [64] ist mit der Verdünnung des Serums mit Wasser und mit den längeren Extraktionszeiten zu erklären.

In der Literatur wird der Zusatz von organischen Lösungsmitteln zur Verbesserung des Peak-Rausch-Verhältnisses beschrieben [95, 97]. Ähnlich den Untersuchungen zu Clomipramin sollte durch Zugabe eines hoch konzentrierten (ca. 10fache maximale Analytkonzentration) Konkurrenten für die Eiweißbindung die Extraktionsausbeute von Amitriptylin und seinem Metaboliten erhöht werden. Aufgrund der ähnlichen Struktur wurde Chloramitriptylin ausgewählt. Dadurch konnte die Extraktionsausbeute jedoch nicht signifikant verbessert werden.

#### Chromatographiebedingungen

Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33  $\mu$ m Film). Die chromatographischen Bedingungen entsprachen der Clomipramin-Methode (siehe Kap. 6.3.1.). Allerdings arbeitete der Injektor bei einer Temperatur von 280 °C und bei der letzten Heizrate des Ofentemperaturprogramms wurde nur bis 278 °C geheizt, und diese Temperatur 1 min gehalten.

Die optimale Desorptionszeit für Amitriptylin und seinen Metaboliten wurde bei einer Temperatur von 280 °C zu 90 s gefunden. Innerhalb dieser Zeit sind fast 100 % der Analyten desorbiert und die Faser kann für weitere Extraktionen genutzt werden (Abb. 51). Die Graphen von Nortriptylin, Desipramin und Clomipramin sind äquivalent.

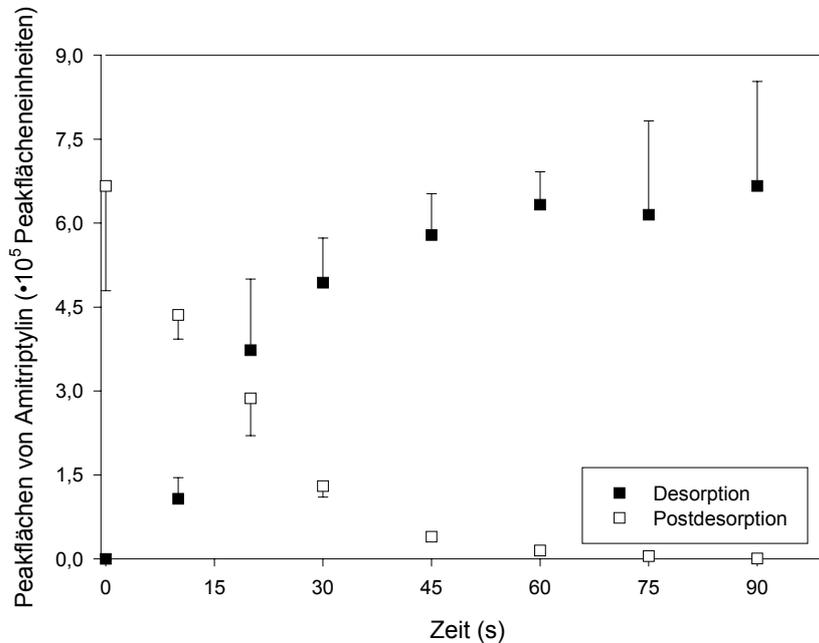


Abb. 51 Abhängigkeit der Peakflächen von Amitriptylin von der Desorptionszeit (MW ± SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt), 200 ng/ml Amitriptylin

### 6.6.2. BESTIMMUNG DER EXTRAKTIONSENTHALPIE

Die Verteilungskonstante  $K_{fs}$  von Amitriptylin und Nortriptylin zwischen der Faser (Beschichtung/PDMS) und Wasser wurde durch Benutzung des bekannten Gehalts des extrahierten Arzneistoffs im Gleichgewicht auf der Faser ( $m_{Ami} = 58.8$  ng,  $m_{Nor} = 53$  ng), des Probenvolumens (1.5 ml) und des Schichtvolumens ( $6.6 \cdot 10^{-4}$  ml [64]) berechnet. Die Werte von  $K_{fs} = 106825$  für Amitriptylin und  $K_{fs} = 17215$  für Nortriptylin wurden erhalten. Beide Werte deuten auf eine Verteilung hin, welche sehr stark auf der Seite der Faserbeschichtung liegt. Dies wurde aufgrund der Lipophilie der psychotropen Arzneistoffe erwartet. Die beträchtliche Differenz zwischen Amitriptylin und Nortriptylin wird vermutlich durch das protische N-H-Wasserstoffatom, das in Nortriptylin, jedoch

nicht in Amitriptylin vorkommt, hervorgerufen. Trotz der prinzipiellen Lipophilie beider Komponenten ist der geringe Unterschied in der chemischen Struktur für eine höhere Hydrophilie von Nortriptylin verantwortlich.

Für die Berechnung der molaren Enthalpie des Phasenüberganges wurde bei vier verschiedenen Temperaturen (30 °C, 40 °C, 60 °C und 90 °C) jeweils aus wässriger Lösung bis zum Gleichgewicht extrahiert (Abb. 52).

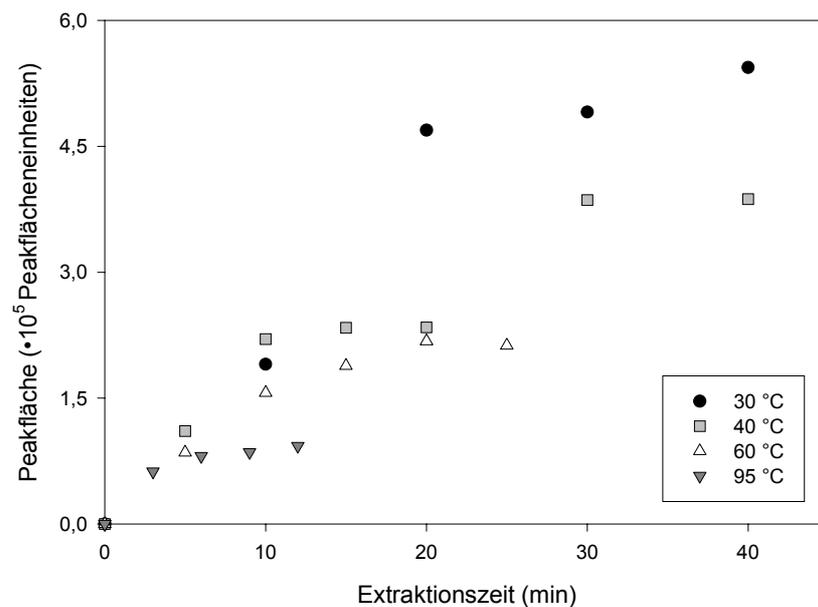


Abb. 52 Einfluss der Temperatur auf den Extraktionsverlauf (Amitriptylin)

Die Extraktionsenthalpie wurde aus der graphischen Darstellung der Messergebnisse (Abb. 53) mit Hilfe von Gleichung (21) (S. 13)

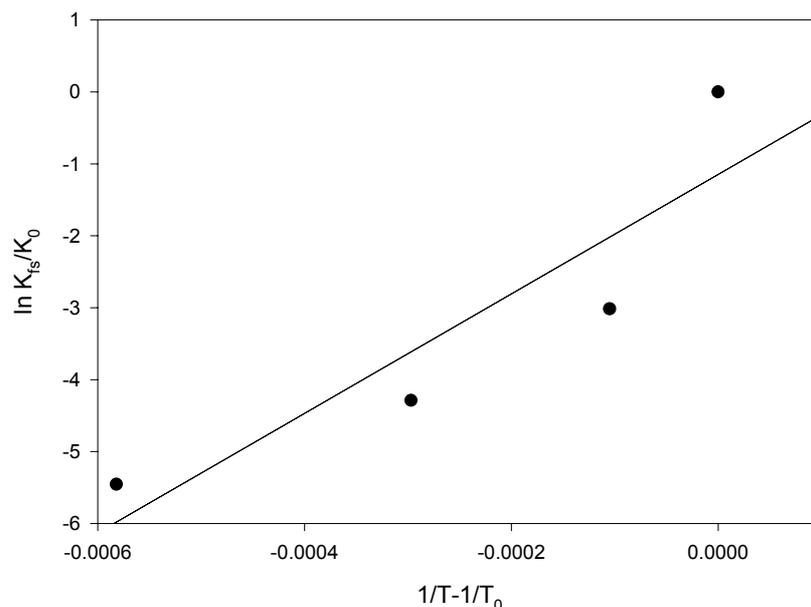


Abb. 53 Graphische Darstellung zur Bestimmung von  $\Delta H$  für Amitriptylin aus dem Anstieg der Regressionsgeraden

zu  $\Delta H = -69$  kJ/mol abgeschätzt. Wie erwartet, wurde eine negative Extraktionsenthalpie für eine freiwillig verlaufende Extraktion erhalten. Dieses wurde aufgrund der Lipophilie des psychotropen Arzneistoffes erwartet. Zusätzlich wurde das Extraktionsgleichgewicht durch die Zugabe einer Base (1 M NaOH) zugunsten der Faser verschoben. Da die berechneten Werte stark von der Regressionsgeraden abweichen ( $r = 0.903$ ), ist zu vermuten, dass während der Extraktionszeit das Gleichgewicht noch nicht bei jeder Temperatur erreicht war.

Die Bestimmung von thermodynamischen Parametern des Phasenüberganges durch SPME könnte in vielen Bereichen eine einfache und interessante Alternative darstellen.

### 6.6.3. TEST AUF MIT DER AMITRIPTYLINBESTIMMUNG INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

In Anlehnung an validierte Methoden für die Bestimmung von TZA wurde für diese Methode eine HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33  $\mu$ m Film) ausgewählt [89]. Die Methode wurde auf Selektivität gegenüber möglichen Interferenzen durch andere

Arzneistoffe (Anhang VI), durch die Matrix (Plasma) und Kontaminationen der Faser getestet (Abb. 16). Abbildung 54 zeigt typische Chromatogramme von Leerplasma und mit jeweils 125 ng/ml Amitriptylin und Nortriptylin versetztem Plasma. Problematisch für die Entwicklung einer Routinemethode im TDM war jedoch, dass Interferenzen sowohl durch Störpeaks aus der Faser (Kontaminationen aus dem Herstellungsprozess), aber auch aus der Matrix (Plasma) auftraten [45].

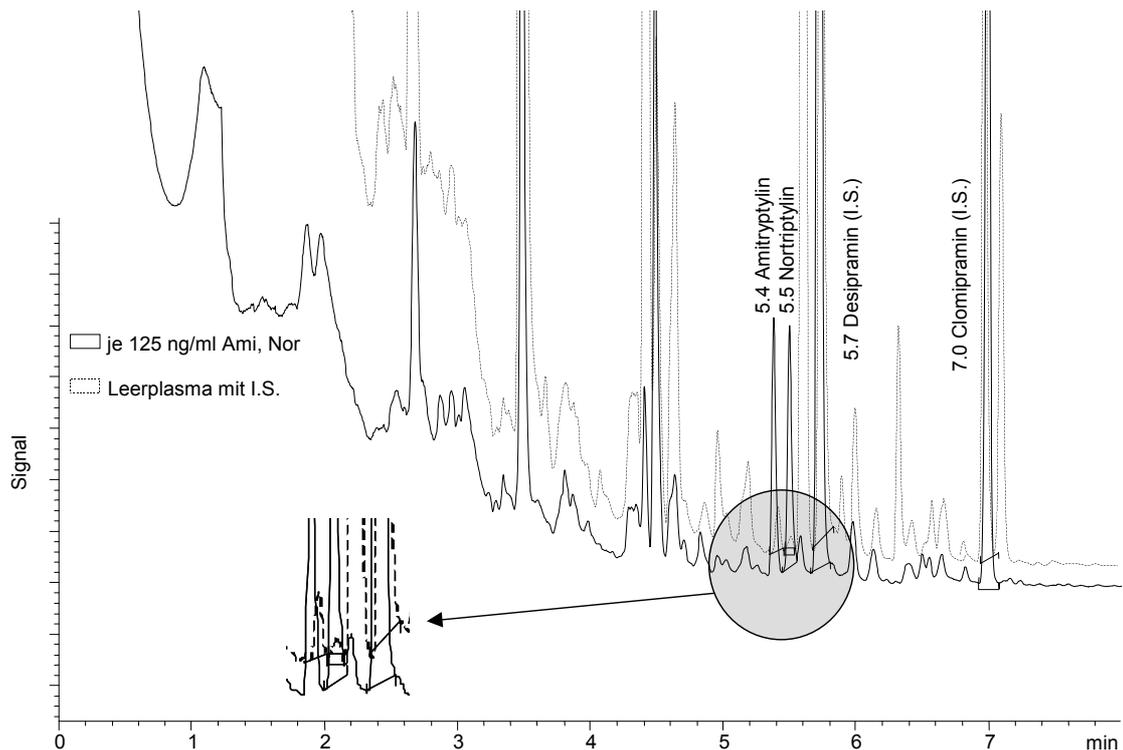


Abb. 54 Typische SPME-GC-NPD-Chromatogramme der Extrakte eines Leerplasma und einer gespikten Probe (je 125 ng/ml Amitriptylin und Nortriptylin; Chromatographiebedingungen siehe Kap. 6.6.1.)

Eine zufriedenstellende Trennung der minimalen Interferenzen konnte aber auch durch die Variation der Trennphasen nicht erzielt werden (Kap. 5.3.1.). Auch die Kopplung des Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer brachte gegenüber dem NPD keine wesentlichen Vorteile (Kap. 4.2.). Die Auswertung der einzig relevanten Masse des Dimethylaminmethylenkations (Basispeak im Massenspektrum) ist zu wenig selektiv.

#### 6.6.4. LINEARITÄT, NACHWEISGRENZE UND PRÄZISION

##### Linearität

Die Kalibrierkurven wurden durch lineare Regression der Flächenverhältnisse  $A_{\text{Ami}}/A_{\text{Clomi}}$  und  $A_{\text{Nor}}/A_{\text{Desi}}$  bzw.  $A_{\text{Analyt}}/A_{\text{Cl-Ami}}$  mit dem bekannten Gehalt des Analyten im Konzentrationsbereich von jeweils 25 ng/ml bis 250 ng/ml berechnet. Dabei sollte der Einfluss des inneren Standards und der Matrix untersucht werden.

Die Kalibrierungen im angegebenen Kalibrierbereich ergab für eine Auswertung entsprechend Gleichung (40) ( $x$  = Konzentration des Analyten,  $y$  = Peakflächenverhältnisse zum inneren Standard) lineare Beziehungen, die den Koordinatenursprung kreuzen (Tab. 12 und 13):

<b>Matrix</b>	<b>Innerer Standard</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>r</b>
Plasma	Clomipramin	0.0366	0.00270 ml/ng	0.990
Serum	Clomipramin	0.0589	0.00235 ml/ng	0.986
Plasma	Chloramitriptylin	0.0340	0.00286 ml/ng	0.980
Serum	Chloramitriptylin	0.0724	0.00403 ml/ng	0.978

Tab. 12 Ergebnisse der linearen Regression für Amitriptylin bei Kalibrierungen mit unterschiedlichen inneren Standards und Matrices

<b>Matrix</b>	<b>Innerer Standard</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>r</b>
Plasma	Desipramin	-0.00745	0.00127 ml/ng	0.994
Serum	Desipramin	0.0138	0.00121 ml/ng	0.977
Plasma	Chloramitriptylin	0.0321	0.00366 ml/ng	0.959
Serum	Chloramitriptylin	-0.0391	0.00403 ml/ng	0.969

Tab. 13 Ergebnisse der linearen Regression für Nortriptylin bei Kalibrierungen mit unterschiedlichen inneren Standards und Matrices

Wie die Regressionsergebnisse zeigen, kann eine Kalibrierung in Plasma nicht immer zur Bestimmung von Serumproben genutzt werden. Der mögliche Einfluss der Matrix sollte bei Methodvalidierungen zur SPME aus Serum/Plasma untersucht werden.

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen (Signal-Rausch-Verhältnis = 3) und Bestimmungsgrenzen wurden zu je 8 ng/ml und je 25 ng/ml Amitriptylin und Nortriptylin abgeschätzt. Bei einem therapeutischen Bereich für die Summe von Amitriptylin und Nortriptylin von 80 ng/ml bis 250 ng/ml könnte die Methode somit gerade empfindlich genug für das TDM sein.

### Präzision

Die Präzision wurde durch die relative Standardabweichung bei drei Konzentrationen (jeweils 25 ng/ml, 75 ng/ml und 200 ng/ml Amitriptylin und Nortriptylin) bestimmt. Sechs Messungen wurden je Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Amitriptylin	25 ng/ml	75 ng/ml	200 ng/ml
Serielle Präzision	14.5 %	3.3 %	3.8 %
Zwischentägliche Präzision	36.1 %	15.0 %	13.7 %
Nortriptylin	25 ng/ml	75 ng/ml	200 ng/ml
Serielle Präzision	16.4 %	7.6 %	6.7 %
Zwischentägliche Präzision	19.1 %	6.2 %	9.8 %

Tab. 14 Präzision der Bestimmung von Amitriptylin und Nortriptylin mit SPME-GC-NPD bei drei Konzentrationen (RSA, N = 6). RSA: relative Standardabweichung

Die serielle Präzision entspricht weitgehend den Anforderungen des TDM (Anhang III). Der Wert der zwischentäglichen Präzision von 14 % bis 36 % bei einer Konzentration von 25 ng/ml bis 200 ng/ml Amitriptylin schränkt aber den Wert der Methode für das TDM wesentlich ein. Als Ursache ist vor allem der Störpeak unter dem Amitriptylin anzunehmen (Abb. 54).

### 6.6.5. ANALYSE VON PATIENTENPLASMA

Die Methode wurde mit einer Standardmethode desselben Labors verglichen, die auf einer traditionellen LLE und GC-NPD-Analyse basiert [89]. Fünf Patientenproben aus der psychiatrischen Universitätsklinik wurden mit beiden Methoden gemessen, und die Ergebnisse mit linearer Regression analysiert (Gl. (40),  $x$  = Ergebnisse der Standardmethode,  $y$  = Ergebnisse der SPME-Methode). Der Vergleich ergab keine Übereinstimmung der Ergebnisse für Amitriptylin ( $B = 1.44$ ) und Nortriptylin ( $B = 0.307$ ,  $r = 0.464$ ) (Anhang XIV, Tab. 15, Abb. 55). Aus formalen Gründen wurde trotz der schlechteren Übereinstimmung eine lineare Regression durchgeführt. Als Ursache könnten Störpeaks unter den Peaks von Amitriptylin und Nortriptylin im Chromatogramm vermutet werden (siehe Kap. 6.6.3), welche die Methode im angestrebten Konzentrationsbereich maßgeblich beeinflussen. Diese Störungen lassen sich wahrscheinlich unter idealen Bedingungen der Methodvalidierung noch kontrollieren (z.B. durch Verwendung immer des gleichen Leerplasmas zur Herstellung von Kontrollproben). Die Methode versagt unter praktischen Bedingungen. Das deutete sich bereits durch den großen Unterschied von serieller und zwischentäglicher Präzision an. Zusätzlich wurde die Interpretation der Ergebnisse stark erschwert, da sich die Ergebnisse der Patientenproben nicht gleichmäßig über einen weiten Konzentrationsbereich verteilen, sondern sich nur bei relativ niedrigen Konzentrationen in einem engen Konzentrationsbereich bewegten.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>r</b>
Amitriptylin	9.3 ng/ml	1.44	0.943
Nortriptylin	64.1 ng/ml	0.307	0.464

Tab. 15 Ergebnisse des Methodenvergleichs von SPME-GC-NPD und LLE-GC-NPD mittels linearer Regression

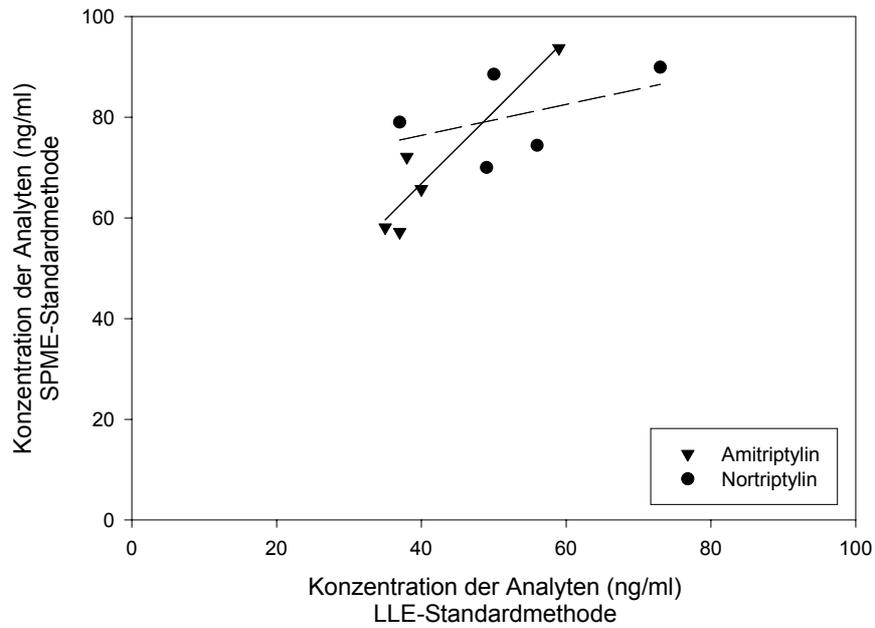


Abb. 55 Vergleich der SPME-GC-Methode mit einer LLE-GC-Standardmethode (Patientenproben)

Aufgrund der Probleme mit Interferenzen konnte für Amitriptylin keine Methode für das TDM entwickelt werden. Wie jedoch schon die Veröffentlichung von ULRICH [64] aufgezeigt hat, könnte sich die SPME gut für die Analyse im toxischen Konzentrationsbereich eignen.

## 6.7. WEITERE ARZNEISTOFFE

### 6.7.1. DIAZEPAM UND NORDAZEPAM

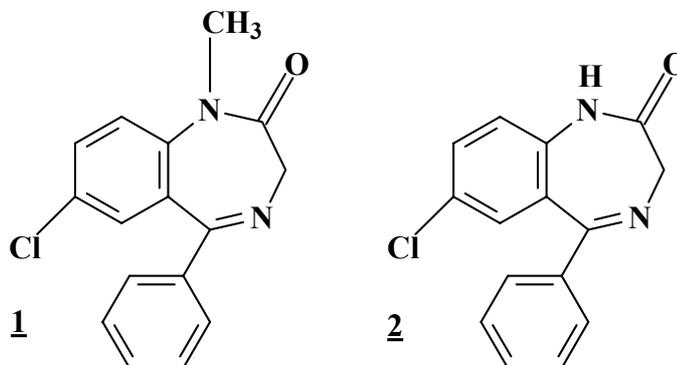


Abb. 56 Chemische Struktur von 1 Diazepam und 2 Nordazepam

Diazepam (Diaze), 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on, ist Leitsubstanz der Benzodiazepin-Tranquilizer. Es wird vorwiegend als Anxiolytikum, Antikonvulsivum und Muskelrelaxanz verwendet. Da die Benzodiazepine ein beträchtliches Abhängigkeitspotential besitzen, ist die Bestimmung von Plasmaspiegeln sowohl von klinisch-pharmakologischem als auch forensischem Interesse. Die therapeutischen Bereiche bewegen sich je nach Anwendung von 0.125 µg/ml bis 1.5 µg/ml.

Das Problem der Probenaufbereitung ist in der unterschiedlichen Polarität von Diazepam und seinem Metaboliten Nordazepam (Desmethyldiazepam, DM-Diaze) begründet. Da der Metabolit selbst als Benzodiazepin wirkt, ist seine Mitbestimmung unbedingt erforderlich. Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen Plasmaproben (Leerwert, je 0.05 µg/ml und je 0.5 µg/ml Diaze, DM-Diaze) bei verschiedenen pH-Werten (3, 8, 13) mit verschiedenen Faserbeschichtungen (PDMS, PA, CW-DVB) extrahiert. Als interner Standard wurde Prazepam (10 µg/ml) zugegeben. Die chromatographischen Ergebnisse mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film) mit NPD-Detektion waren jedoch nicht zufriedenstellend. Es traten Interferenzen aus der Matrix auf. Weiterhin wurden die Analyten teilweise nicht extrahiert (siehe Kapitel 5.1.4.).

Zur Verbesserung der Extraktion sollte die Eiweißbindung der Analyten durch Deproteinierung gelöst werden (siehe Kap. 6.4.1.). In Abweichung von der beschriebenen Olanzapin-Methode wurden die Proben jedoch mit einer CW-DVB-Faser extrahiert. Aber auch diese Möglichkeit der Probenaufbereitung brachte im erwünschten Kalibrierbereich von jeweils 0.05 µg/ml bis 0.5 µg/ml Diazepam und Nordazepam keine befriedigenden Ergebnisse ( $r_{\text{Diaze}} = 0.960$ ,  $r_{\text{DM-Diaze}} = 0.871$ ). Zusätzlich erwies sich der Einsatz von CW-DVB-Fasern als uneffektiv, da sie unter den Extraktionsbedingungen nur eine sehr kurze Lebensdauer haben [33].

Anschließend wurden noch Untersuchungen zur Validierung einer Messmethode durch Direkt-SPME aus Serum im Konzentrationsbereich von jeweils 0.5 µg/ml bis 5 µg/ml Diazepam und Nordazepam durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurden PA- und PDMS-Fasern getestet und zur chromatographischen Trennung eine HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) genutzt.

Die Ergebnisse der linearen Regression einer 10-Punkt-Kalibrierung nach der Extraktion mit PA-Fasern waren für Diazepam nicht zufriedenstellend ( $r_{\text{Diaze}} = 0.897$ ). Die Ergebnisse für Nordazepam fielen wesentlich besser aus ( $r_{\text{DM-Diaze}} = 0.981$ ). Als Grund für diese großen Unterschiede kann die bereits erwähnte unterschiedliche Polarität beider Analyten angeführt werden.

Mit einer PDMS-Faser konnte selbst im toxischen Bereich der Metabolit Nordazepam nicht extrahiert werden. Somit wurde die Möglichkeit einer Kalibrierung von 0.5 µg/ml bis 5 µg/ml Diazepam untersucht. Die Ergebnisse der linearen Regression waren zufriedenstellend ( $A_{\text{Diaze}} = 0.000167$ ,  $B_{\text{Diaze}} = 0.0399$ ,  $r_{\text{Diaze}} = 0.997$ ). Abschließend wurden noch Untersuchungen zur Präzision in diesem Kalibrierbereich durchgeführt. Die Ergebnisse der Präzisionsbestimmungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

	0.5 µg/ml Diazepam	5 µg/ml Diazepam
Präzision in Serie	9.1 %	16.1 %
zwischentägliche Präzision	18.9 %	9.0 %

Tab. 16 Präzision der Bestimmung von Diaze mit SPME-GC-NPD bei 2 Konzentrationen (in %, RSA, N = 10), PDMS, Direkt-SPME, HP-5

Trotz der erzielten Ergebnisse im toxischen Bereich konnte für Diazepam und seinen Metaboliten Nordazepam keine Methode zur gemeinsamen Bestimmung im TDM mit einer Faser entwickelt werden. Diese wichtigen Analyte scheinen also einer Bestimmung durch SPME nur sehr schwer zugänglich zu sein, was den Wert der Methode im TDM und in der klinischen Toxikologie wesentlich einschränkt.

### 6.7.2. VENLAFAXIN

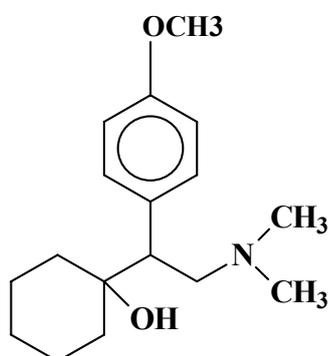


Abb. 57 Chemische Struktur von Venlafaxin

Venlafaxin (Venla), ( $\pm$ )-1-[2-(Dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]cyclohexanol, zählt zu einer neuen Gruppe von nicht-trizyklischen Antidepressiva, den selective serotonin noradrenalin reuptake inhibitors (SNARI) [126]. Es zeichnet sich gegenüber TZA durch ein verbessertes Nebenwirkungsprofil aus.

Aufgrund der relativ geringen Eiweißbindung von Venlafaxin (30 %) und des zu untersuchenden Konzentrationsbereiches von 20 ng/ml bis 200 ng/ml erschien dieses Antidepressivum als geeigneter Analyt zur Validierung einer SPME-GC-Methode. Beim Vergleich der Chromatogramme von Leerserum und kleinstem Kalibrierwert (20 ng/ml Venla), die mittels NPD aufgenommen wurden, wurden Interferenzen mit der Matrix mit einer Größe von ca. 50 % der Fläche des kleinsten Kalibrierwertes festgestellt. Der MSD brachte gegenüber dem NPD nur geringe Vorteile. Allerdings erwies sich die Auswahl des inneren Standards als schwierig. Die 10-Punkt-Kalibrierung sowohl mit Chloramitriptylin als auch mit E-10-Hydroxyamitriptylin als innerer Standard brachte keine

zufriedenstellende Ergebnisse ( $r_{\text{Cl-Ami}} = 0.954$ ,  $r_{\text{E-10-OH-Ami}} = 0.953$ ). Die Untersuchung der Extraktionskinetik zeigte, dass sich nach 6 h Extraktionszeit (bei 30 °C) das Gleichgewicht nahezu eingestellt hat (Abb. 58).

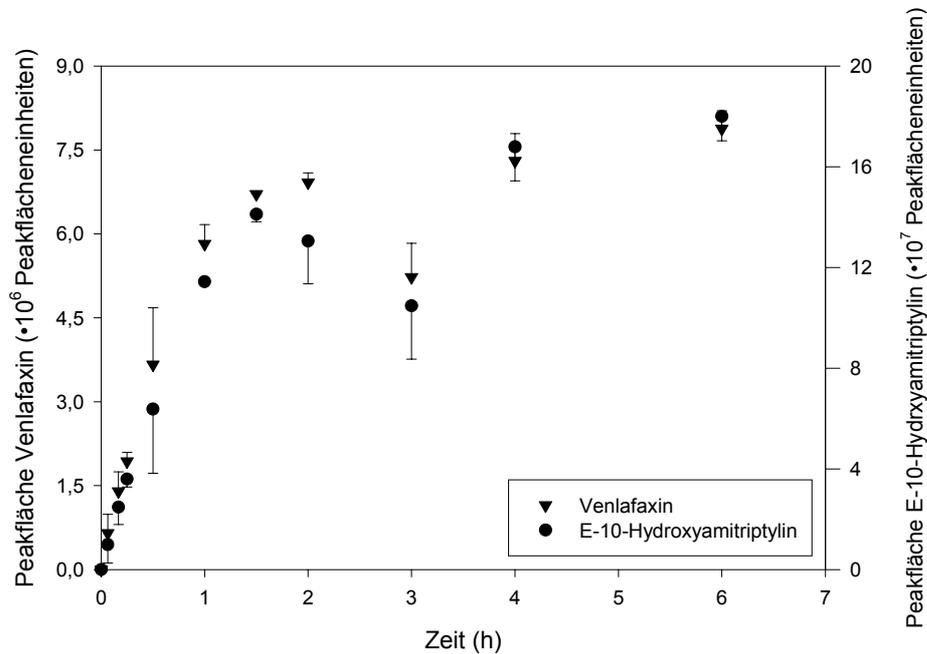


Abb. 58 Abhängigkeit der Peakflächen von Venlafaxin und E-10-Hydroxyamitriptylin von der Extraktionszeit in Plasma (MW  $\pm$  SA, zwei Bestimmungen pro Messpunkt) mit 100 ng/ml Venlafaxin, aufgenommen mit Massenspektrometer

Die Messwerte nach 3 h Extraktionszeit (Abb. 58) veranschaulichen die Probleme der SPME von Venlafaxin. Es wurden geringere Peakflächen gefunden als entsprechend dem Kurvenverlauf erwartet, wahrscheinlich aufgrund der Verwendung einer alten Faser. Allerdings bleiben die Flächenverhältnisse von Analyt und innerem Standard ( $A_{\text{Venla}}/A_{\text{I.S.}}$ ) bereits nach ca. 10 min Extraktionszeit und für den Wert nach 3 h relativ konstant. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate von Venlafaxin ergab für die SPME im Vergleich zu bisherigen Methoden sehr gute Werte. Sie lag bei einer Extraktionszeit von 6 h bei 48 % und nach 30 min bereits bei 23 %. Diese relativ hohen Wiederfindungsraten sind in Übereinstimmung mit der geringen Eiweißbindung von Venlafaxin.

### 6.7.3. HALOPERIDOL UND REDUZIERTES HALOPERIDOL

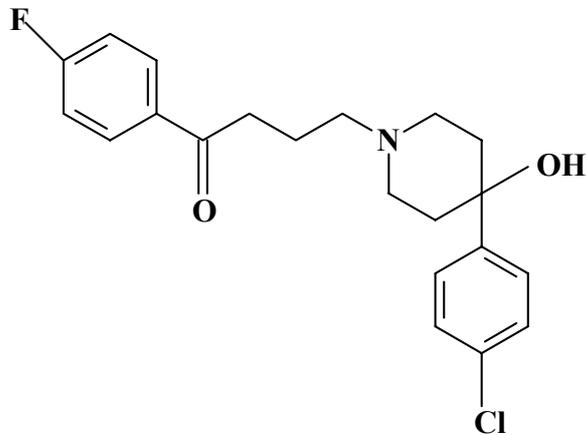


Abb. 59 Chemische Struktur von Haloperidol

Für Haloperidol (Halo), 4-[4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxy-1-piperidiny]-1-(4-fluorphenyl)-1-butanon, ist aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen im Plasma ( $< 20$  ng/ml) eine analytische Bestimmung sehr schwierig. Im Labor existiert eine 3-Schritt-LLE-GC-Methode, die aber insbesondere wegen der Probenaufarbeitung recht aufwendig ist [90]. Es lag nahe, die SPME als weit effektivere Probenaufarbeitung zu testen. Das Problem der Probenaufbereitung lag wiederum in der unterschiedlichen Polarität von Haloperidol und seinem Metaboliten, reduziertem Haloperidol (siehe Kapitel 6.7.1.). Allerdings ist im Gegensatz zum Nordazepam die Bestimmung von reduziertem Haloperidol nicht unbedingt erforderlich, da in der Akuttherapie kein Einfluss auf den therapeutischen Effekt nachgewiesen wurde [90]. Zur Langzeittherapie gibt es noch keine Erkenntnisse. Es zeigte sich aber, dass die Sensitivität der SPME-GC zur Bestimmung von Haloperidol in Plasma im therapeutischen Bereich von 5 ng/ml bis 17 ng/ml bei weitem nicht ausreichend ist. Es wurden verschiedene kommerziell angebotene SPME-Phasen (PDMS, PA, CW-DVB) getestet.

#### 6.7.4. MIRTAZAPIN

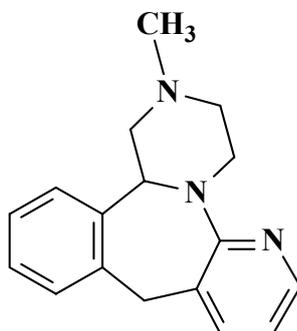


Abb. 60 Chemische Struktur von Mirtazapin

Mirtazapin (Mirta), 1,2,3,4,10,14b-Hexahydro-2-methylpyrazino[2,1-*a*]pyrido[2,3-*c*][2]benzazepin, gehört zur Gruppe der tetrazyklischen Antidepressiva, eine Weiterentwicklung der TZA. Es ist eine neue Substanz, welche zur Behandlung von Depressionen, die mit Angst und Schlafstörungen verbunden sind, getestet wird. Im Vergleich zu Amitriptylin zeigt es weniger anticholinerge Nebenwirkungen. Ein therapeutischer Bereich ist aufgrund mangelnder Daten noch nicht bekannt.

In ersten Untersuchungen zur Methodenentwicklung zeigte sich, dass wie bei Venlafaxin und Amitriptylin nicht zu vernachlässigende matrixbedingte Interferenzen mit dem Analyten in der chromatographischen Trennung auftraten. Aufgrund der Erfahrungen bei der Methodenentwicklung von Amitriptylin (siehe Kap. 6.6.) wurden somit die Untersuchungen abgebrochen. Es konnte keine Methode zur Bestimmung von Mirtazapin mittels SPME-GC-NPD validiert werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die SPME-GC ist als neue und effektive Methode zur Bestimmung von ausgewählten Arzneimitteln im Plasma im Rahmen des Therapeutischen Drug-Monitoring (TDM) prinzipiell geeignet. Das wurde anhand vollständig validierter Methoden zur Bestimmung von verschiedenen Arzneistoffen aus Plasma in dieser Arbeit gezeigt.

Ein wichtiges Kriterium, das Arzneistoffe für eine SPME-Analyse favorisiert, ist ein hoher Retentionsindex, um eine gute Abtrennung von Matrixsignalen zu erhalten. Des Weiteren sollten die Arzneistoffe für eine SPME-Analyse nicht in zu niedrigen Konzentrationen im Serum oder Plasma vorliegen. Anforderungen an das Nachweisvermögen ergeben sich vorrangig aus dem therapeutischen Bereich des Arzneimittels, werden aber auch durch seine chemischen Eigenschaften beeinflusst (z. B. Zahl der Stickstoffatome im Molekül bei NPD). Anforderungen der Selektivität folgen aus dem gaschromatographischen Retentionsindex im Verhältnis zu den unvermeidlichen Interferenzen aus der Extraktion. In Abbildung 61 ist die Einteilung der untersuchten Arzneimittel in einem empirischen Schema entsprechend diesen Anforderungen des Analyten an das Nachweisvermögen und die Selektivität der SPME-GC-Methode grob dargestellt. Wegen der insgesamt relativ vergleichbaren Trenneigenschaften der verwendeten GC-Systeme scheint diese globale Übersicht erlaubt.

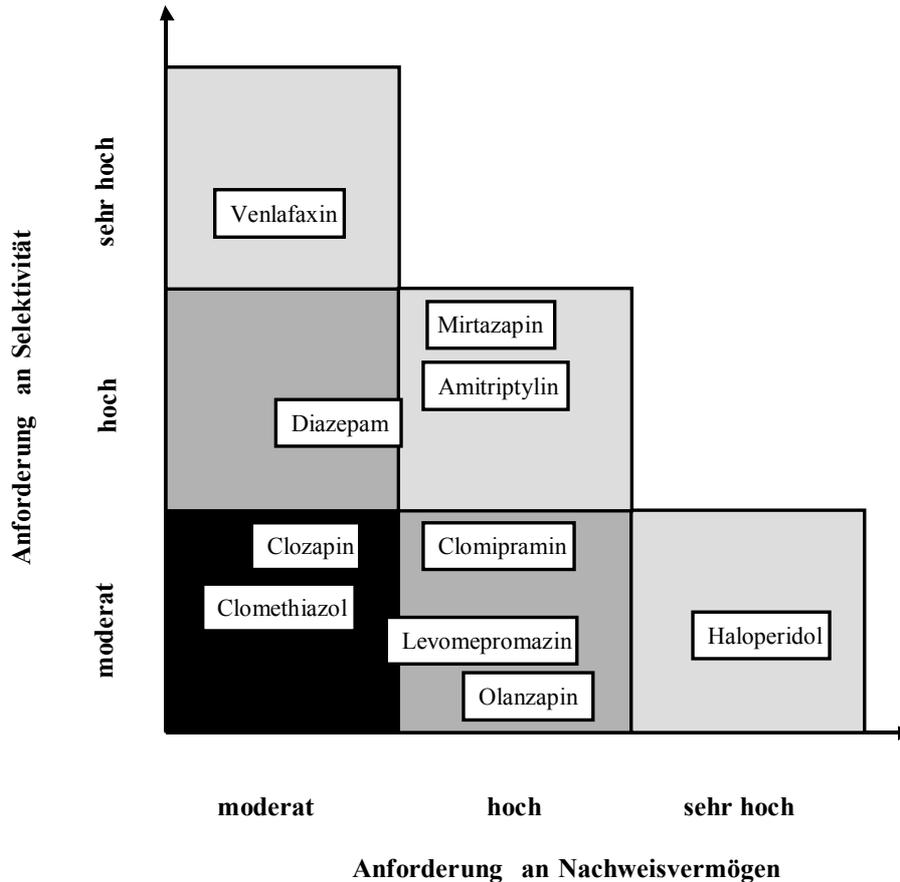


Abb. 61 Empirisches Schema zur Eignung der SPME-GC für die Bestimmung von Arzneimitteln im TDM in Abhängigkeit von den Anforderungen bezüglich Nachweisvermögen und Selektivität der Methode: schwarz: gut bis sehr gut geeignet, dunkelgrau: Übergangsbereich, hellgrau: nicht geeignet.

Clozapin erwies sich als idealer Analyt für die SPME. Da Clomipramin im Vergleich zu anderen TZA einen relativ hohen Retentionsindex hat, konnte eine TDM-Methode entwickelt werden. Die Bestimmung von Clomethiazol mittels Headspace-SPME stellt für die Methodenentwicklung in der SPME-Arzneimittelanalytik eine interessante Variante dar. Aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit und relativ hohen Konzentration im Serum konnte gezeigt werden, wie ein Headspace-SPME-Verfahren in Zukunft entwickelt werden könnte. Bei den Analyten Levomepromazin und Olanzapin wurden die Grenzen der Empfindlichkeit der Methode erreicht. Trotzdem konnten jedoch für beide Analyten Methoden entwickelt werden. Bei Olanzapin musste allerdings noch ein Deproteinierungsschritt vor die eigentliche SPME vorgeschaltet werden, was eine

Einschränkung der Vorteile der SPME mit sich bringt. Für Amitriptylin, Mirtazapin, Diazepam, Haloperidol sowie Venlafaxin konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Bereich therapeutisch relevanter Konzentrationen erzielt werden. Insgesamt scheint die SPME nur in einem bestimmten Fenster der nachzuweisenden und zu bestimmenden Konzentrationen sowie der chromatographischen Trennung möglich. Für die klinische Toxikologie verschieben sich die Anforderungen bezüglich des Nachweisvermögens zugunsten der SPME. Hier könnte für die SPME ein breites Anwendungsfeld entstehen.

Im Vergleich zu anderen Methoden der Probenaufarbeitung ist die niedrige Wiederfindungsrate der SPME von Arzneimitteln in Plasma kritisch zu sehen. Ursache dafür ist u.a. die Eiweißbindung der Analyten sowie eine erhöhte Viskosität der Matrix. Diese relativ niedrige Wiederfindungsrate führt zu einer Verringerung der Sensitivität und zu Problemen mit der Präzision im Vergleich zu bisherigen Verfahren der Probenaufarbeitung. Die Regressionskoeffizienten von Zehn-Punkt-Kalibrierungen waren im allgemeinen niedriger als bei vergleichbaren LLE- oder SPE-Verfahren. Trotz dieser Einschränkungen konnten geeignete Methoden für die quantitative Analyse von Arzneistoffen entwickelt werden. Die Eignung der Methoden für den Routine-Einsatz wurde geprüft. Sie ist prinzipiell gegeben. Eine Langzeituntersuchung steht bisher noch aus. Eine Ausdehnung der Extraktionszeit auf 60 min oder 90 min verbessert die Empfindlichkeit der Methode entscheidend. Aufgrund der geringen Wiederfindungsrate der SPME von Arzneistoffen in Plasma ist die Methode empfindlich für Einflüsse durch Matrixänderungen. Dieser Einfluss der Matrix wurde bei einer Methodvalidierung im Detail untersucht. Es wurde jedoch für TZA und Neuroleptika gezeigt, dass Änderungen der Salz-, Triglycerid-, und sauren  $\alpha$ -Glykoproteinkonzentrationen die Methode nicht beeinträchtigen [64, 119, 120, 125]. Änderungen des Albumingehaltes wurden für den Fall von z.B. Lebererkrankungen beachtet. Vor allem wurde durch den Einsatz von internen Standards die Variabilität durch Einflüsse der Matrix kompensiert.

Die Aufreinigung der Probe durch SPME ist insgesamt gering im Vergleich zu einer 3-Schritt-LLE. Die schlechte Abtrennung der Analyten von Matrixbestandteilen durch die SPME im Vergleich zur 3-Schritt-LLE oder zur SPE ist kritisch zu sehen. Die SPME kann grob einer 1-Schritt-LLE oder etwa einer Probenaufarbeitung durch HPLC (automatisierte zweidimensionale HPLC mit *online*-Säulenschaltung) gleichgestellt werden. Demnach ist

die SPME eine vergleichsweise „schmutzige“ Probenaufarbeitung. Ein Großteil der gesamten Trennungsaufgabe bleibt also noch der Chromatographie überlassen.

Hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit ergeben sich erhebliche Vorteile gegenüber bisheriger Methoden. Die Probenaufarbeitung mittels SPME stellt eine Kosteneinsparung im Vergleich zur 3-Schritt-LLE und SPE dar, da nur eine geringe Geräteausstattung, Glasgeräte, Chemikalien und Arbeitszeit benötigt werden. Die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens wird weiter durch das hier verfolgte Prinzip der simultanen SPME mehrerer Proben gesteigert. Insbesondere liegt das Potenzial der SPME aber in der Einfachheit der Automatisierung.

Als allgemeingültiges Ergebnis der Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die SPME keine universelle Methode für das TDM ist. Die beträchtlichen ökonomischen Vorteile der SPME sollten aber für eine Reihe von Arzneimitteln nutzbar sein. Dabei sind insbesondere im Zentralnervensystem (ZNS) wirksame Pharmaka zu nennen, da ihre physikochemischen Eigenschaften (hohe Lipophilie) den Eigenschaften der SPME-Fasern (PDMS besonders geeignet für lipophile Substanzen) entgegenkommen. In nachfolgenden Arbeiten sind daher nun die Möglichkeiten der SPME für das TDM umfangreicher zu explorieren. Dabei sollten weiterhin Psychopharmaka sowie andere ZNS-wirksame Pharmaka im Vordergrund stehen, z.B. Antiepileptika hätten den wichtigen Vorteil einer viel höheren Konzentration in Plasma bei therapeutischer Dosis.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R.P. Belardi, J. Pawliszyn, *The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns*, Water Pollut. Res. J. Can., **1989**, 24, 179.
- [2] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection*, Journal of Chromatography A, **1999**, 844, 425-432.
- [3] D. Andrzejewski, A. Weisz, *Rapid quantification of hexachlorobenzene in the color additives D&C Red Nos. 27 and 28 (phloxine B) using solid-phases microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **1999**, 863, 37-46.
- [4] J. Auger, S. Rousset, E. Thibout, B. Jaillais, *Solid-phase microextraction-gas chromatography-direct deposition infrared spectrometry as a convenient method for the determination of volatile compounds from living organisms*, Journal of Chromatography A, **1998**, 819, 45-50.
- [5] M.-I. Bao, F. Pantani, O. Griffini, D. Burrini, D. Santianni, K. Barbieri, *Determination of carbonyl compounds in water by derivatization-solid-phase microextraction and gas chromatography analysis*, Journal of Chromatography A, **1998**, 809, 75-87.
- [6] W. Bechmann, P. Volkmer, *Einsatz der Mikrofestphasenextraktion in der Triazinanalytik*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **1995**, 12, 1129-1133.
- [7] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, *Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples*, Journal of Chromatography A, **1998**, 808, 257-263.
- [8] H. v. Doorn, C. B. Grabanski, D. J. Miller, S.B. Hawthorne, *Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water*, Journal of Chromatography A, **1998**, 829, 223-233.
- [9] R. Eisert, K. Levsen, *Festphasenmikroextraktion organischer Spuren aus wäßrigen Umweltproben*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **1996**, 6, 581-588.

- [10] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Design of automatic solid-phase microextraction for trace analysis of organic compounds in aqueous samples*, Journal of Chromatography A, **1997**, 778, 293-303.
- [11] R. Ferrari, T. Nilson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. Del Carlo, P. Dellavedova, E. Fattore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, S. Morgillo, L. Müller, M. Volante, *Inter-laboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/ml level in water samples*, Journal of Chromatography A, **1998**, 795, 371-376.
- [12] C. Haberhauer-Troyer, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *Evaluation of solid-phase microextraction for sampling of volatile organic sulfur compounds in air for subsequent gas chromatographic analysis with atomic emission detection*, Journal of Chromatography A, **1999**, 848, 305-315.
- [13] W.J. Havenga, E.R. Rohwer, *Chemical characterization and screening of hydrocarbon pollution in industrial soils by headspace solid-phase microextraction*, Journal of Chromatography A, **1999**, 848, 279-295.
- [14] M. von der Heide, P.-H. Petry, *Anwendungsmethoden der Festphasenmikroextraktion (SPME) zur Bestimmung von BTX-Aromaten*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **1997**, 12, 1191-1195.
- [15] V. Janda, V. Linek, J. Sinkule, V. Vejrosta, *Solid-phase microextraction as a source of data for the design of stripping aeration towers*, Journal of Chromatography A, **1998**, 823, 523-525.
- [16] G. Lespes, V. Desauziers, C. Montigny, M. Potin-Gautier, *Optimization of solid-phase microextraction for the speciation of butyl- and phenyltins using experimental designs*, Journal of Chromatography A, **1998**, 826, 67-76.
- [17] M. Llompарт, K. Li, M. Fingas, *Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile and semi-volatiles pollutants in water and air*, Journal of Chromatography A, **1998**, 824, 53-61.
- [18] L. Müller, E. Fattore, E. Benfenati, *Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water sample*, Journal of Chromatography A, **1997**, 791, 221-230.

- [19] M. Natangelo, S. Tavazzi, R. Fanelli, E. Benfenati, *Analysis of some pesticides in water samples using solid-phase microextraction-gas chromatography with different mass spectrometric techniques*, Journal of Chromatography A, **1999**, 859, 193-201.
- [20] M.R. Negrão, M.F. Alpendurada, *Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*, Journal of Chromatography A, **1998**, 823, 211-218.
- [21] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Solid-phase microextraction of the antifouling Irgarol 1051 and the fungicides dichlorfluanid and 4-chloro-3-methylphenol in water samples*, Journal of Chromatography A, **1999**, 839, 253-260.
- [22] P. Pollien, D. Roberts; *Use of solid-phase microextraction for measuring oil-water partition coefficients and correlation with high-performance liquid chromatographic methods for lipophilicity*, Journal of Chromatography A, **1999**, 864, 183-189.
- [23] P. Popp, A. Kauert, K. Kalbitz, *Festphasenmikroextraktion (SPME)*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **1995**, 4, 325-331.
- [24] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galceran, *Solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-ion trap mass spectrometry for the analysis of haloacetic acids in water*, Journal of Chromatography A, **1999**, 859, 159-171.
- [25] B. Schäfer, *Zur Anwendung der Festphasenmikroextraktion (SPME) in der gaschromatographischen Analytik*, Dissertation, Universität Leipzig, **1998**.
- [26] Y. Yang, D. J. Miller, S.B. Hawthorne, *Solid-phase microextraction of polychlorinated biphenyls*, Journal of Chromatography A, **1998**, 800, 257-266.
- [27] P.T. Zenner, *Analyse von umweltrelevanten Schadstoffen in wässrigen Systemen mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion*, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **1997**.
- [28] C. Bartzsch, J. Weber, K.-H. Feller, *Study of aroma compounds in natural products by solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry*, 22<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography, **1998**, P101, 112.
- [29] R. Batlle, C. Sánchez, C. Nerín, *A systematic approach to optimize solid-phase microextraction. Determination of pesticides in ethanol/water mixtures used as food simulants*. Analytical Chemistry, **1999**, 71, 2417-2422.

- [30] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Eberle, *Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **1997**, 786, 293-298.
- [31] K. Friedrichs, H.-D. Winkeler, *Bestimmung von Fungiziden in Wein mittels Festphasenmikroextraktion (SPME)*, GIT Spezial Separation, **1999**, 2, 69-70.
- [32] S. Fuchs, T. Beck, A. Mosandl, *Biogeneseforschung ätherischer Öle mittels SPME-enantio-MDGC/MS*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **2000**, 4, 358-362.
- [33] F. Hernandez, J. Beltran, F.J. Lopez, J.V. Gaspar, *Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples*, Analytical Chemistry, **2000**, 72, 2313-2322.
- [34] J.J. Jimenez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martin, A.L. Mayorga, *Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection*, Journal of Chromatography A, **1998**, 829, 269-277.
- [35] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma*, Journal of Chromatography A, **1998**, 808, 211-218.
- [36] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma*, Journal of Chromatography A, **1999**, 835, 137-144.
- [37] J. Salafranca, R. Ramón, C. Nerín, *Use of solid-phase microextraction for the analysis of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether in food simulants*, Journal of Chromatography A, **1999**, 864, 137-144.
- [38] A.L. Simplicio, L.V. Boas, *Validation of solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice*, Journal of Chromatography A, **1999**, 833, 35-42.
- [39] S.B. Stanfill, D.L. Ashley, *Solid phase microextraction of alkenylbenzenes and other flavour-related compounds from tobacco for analysis by select ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **1999**, 858, 79-89.

- [40] J. Weber, M. Beeg, C. Bartzsch, K.H. Feller, D. De la Calle Garcia, M. Reichenbacher, K. Danzer, *Improvement of the chemometric variety characterization of wines by improving the detection limit for aroma compounds*, Journal of High Resolution Chromatography, **1999**, 22, 322-326.
- [41] A.M. Bermejo, R. Seara, A.C. dos Santos Lucas, M.J. Tabernero, P. Fernández, R. Marsili, *Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and its main metabolite, EDDP, in plasma by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Analytical Toxicology, **2000**, 24, 66-69.
- [42] F. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori, O. Suzuki, *Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water*, Journal of Chromatography B, **1998**, 714, 205-213.
- [43] B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **1997**, 777, 275-282.
- [44] H. Kataoka, S. Narimatsu, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Automated in-tub solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the determination of  $\beta$ -blockers and metabolites in urine and serum samples*, Analytical Chemistry, **1999**, 71, 4237-4244.
- [45] C. Kohlert, G. Abel, E. Schmid, M. Veit, *Determination of thymol in human plasma by automated headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis*, Journal of Chromatography B, **2002**, 767, 11-18.
- [46] I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, *Determination of amphetamine and metamphetamine in human plasma by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*, Journal of Chromatography B, **1998**, 707, 99-104.
- [47] E.H.M. Koster, C. Wemes, J.B. Morsink, G.J. de Jong, *Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography*, Journal of Chromatography B, **2000**, 739, 175-182.
- [48] M. Krogh, H. Grefslie, K. E. Rasmussen, *Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography B, **1997**, 689, 357-364.

- [49] M. Krogh, K. Johansen, F. Tønnesen, K.E. Rasmussen, *Solid-phase micro-extraction for the determination of the free concentration of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography B, **1995**, 673, 299-305.
- [50] C. Kroll, H.-H. Borchert, *Untersuchungen zum Einsatz der Festphasenmikroextraktion SPME bei der Probenvorbereitung aus einer komplexen biologischen Matrix im Rahmen von Biotransformationsstudien*, Pharmazie, **1998**, 53, 172-177.
- [51] M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, C.-C. Chen, *Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of chlorphenols in urine*, Journal of Chromatography B, **1998**, 707, 91-97.
- [52] X.-P. Lee, T. Kumazawa, K. Kondo, K. Sato, O. Suzuki, *Analysis of methanol or formic acid in body fluids by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography B, **1999**, 734, 155-162.
- [53] H.M. Liebich, E. Gesele J. Wöll, *Urinary organic acid screening by solid-phase microextraction of the methyl esters*, Journal of Chromatography B, **1998**, 713, 427-432.
- [54] A.C.S. Lucas, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, P. Fernández, S. Strano-Rossi, *Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS*, Forensic Science International, **2000**, 107, 225-232.
- [55] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, *Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids*, Journal of Chromatography B, **1999**, 730, 113-122.
- [56] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea, *Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, **1999**, 37(6), 639-642.
- [57] S.-W. Myung, S. Kim, J.-H. Park, M. Kim, J.-C. Lee, T.-J. Kim, *Solid-phase microextraction for the determination of pethidine and methadone in human urine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*, The Analyst, **1999**, 124, 1283-1286.

- [58] A. Namera, T. Watanabe, M. Yashiki, T. Kojima, *Simple and sensitive analysis of nereistoxin and its metabolites in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatographic Science, **1999**, 37, 77-82.
- [59] D. Poli, E. Bergamaschi, P. Manini, R. Andreoli, A. Mutti, *Solid-phase microextraction gas chromatographic-mass spectrometric for the determination of inhalation anesthetics in urine*, Journal of Chromatography B, **1999**, 732, 115-125.
- [60] K.J. Reubsæet, H.R. Norli, P. Hemmersbach, K.E. Rasmussen, *Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental design strategies*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1998**, 18, 667-680.
- [61] K. Singer, B. Wenz, V. Seefeld, U. Speer, *Drogenanalytik mit Festphasenmikroextraktion*, GIT Labor-Medizin, **1995**, 2, 112-118.
- [62] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, *Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: Determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography B, **1997**, 701, 29-38.
- [63] S. Ulrich, *Solid phase microextraction in biomedical analysis*, Journal of Chromatography A, **2000**, 902, 167-194.
- [64] S. Ulrich, J. Martens, *Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma*, Journal of Chromatography B, **1997**, 696, 217-234.
- [65] T. Watanabe, A. Namera, M. Yashiki, Y. Iwasaki, T. Kojima, *Simple analysis of local anesthetics in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry-electron impact ionization selected ion monitoring*, Journal of Chromatography B, **1998**, 709, 225-232.
- [66] S.H. Preskorn, M.J. Burke, G.A. Fast, *Therapeutic Drug Monitoring, Principles and Practice*, Psychopharmacology I, **1993**, 16, 611-641.
- [67] P.J. Orsulak, *Therapeutic monitoring of antidepressant drugs: Guidelines updated*, Therapeutic Drug Monitoring, **1989**, 11, 497-507.

- [68] S.H. Preskorn, G.A. Fast, *Therapeutic Drug Monitoring for Antidepressants: Efficacy, Safety, and Cost Effectiveness*, Journal of Clinical Psychiatry, **1991**, 52, 23-33.
- [69] M. Bagli, M.L. Rao, G. Höflich, *Quantification of chlorprothixene, levomepromazine and promethazine in human serum using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection*, Journal of Chromatography B, **1994**, 657, 141-148.
- [70] M. Bonati, D. Castelli, R. Latini, S. Garattini, *Comparison of gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection and high-performance liquid chromatography methods for caffeine determination in plasma and tissues*, Journal of Chromatography, **1979**, 164, 109-113.
- [71] U. Bondesson, L.H. Lindström, *Determination of clozapine and its N-demethylated metabolite in plasma by use of gas chromatography-mass spectrometry with single ion detection*, Psychopharmacology, **1988**, 95, 472-475.
- [72] G.D. Burrows, T.R. Norman, *Psychotropic drugs Plasma concentration and clinical response*, Marcel Dekker Inc. New York, **1981**.
- [73] J. Catlow, R. Barton, M. Clemens, T. Gillespie, M. Goodwin, S. Swanson, *Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*, Journal of Chromatography B, **1995**, 668, 85-90.
- [74] C.B. Eap, L. Koeb, P. Baumann, *Artifacts in the analysis of thioridazine and other neuroleptics*, Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1993**, 11, 451-457.
- [75] R.N. Gupta, *Column liquid chromatographic determination of clozapine and N-desmethylclozapine in human serum using solid-phase extraction*, Journal of Chromatography B, **1995**, 673, 311-315.
- [76] R.N. Gupta, *Drug level monitoring: antidepressants*, Journal of Chromatography B, **1992**, 576, 183-211.
- [77] S. Guthrie, E.A. Lane, M. Linnoila, *Monitoring of plasma drug concentrations in clinical psychopharmacology*, Psychopharmacology, **1987**, 1323-1338.
- [78] H. Hattori, S. Yamamoto, M. Iwata, E. Takashima, T. Yamada, O. Suzuki, *Sensitive determination of phenothiazines in body fluids by gas chromatography with surface ionisation detection*, Journal of Chromatography B, **1992**, 579, 247-252.

- [79] N.E. Larsen, J. Naestoft, *Determination of perphenazine and its sulphoxide metabolite in human plasma after therapeutic doses by gas chromatography*, Journal of Chromatography, **1975**, *109*, 259-264.
- [80] C. Long, J. Crisfasi, D. Maginn, M. Graham, S. Teas, *Comparison of analytical methods in the determination of two Venlafaxine fatalities*, Journal of Analytical Toxicology, **1997**, *21*, 166-169.
- [81] Machery-Nagel, *SPE Applikations-Handbuch, Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion*, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, **1997**.
- [82] R.K. Müller, *Toxicological Analysis*, Verlag Gesundheit Berlin, **1991**.
- [83] A. Namera, M. Yashiki, K. Okada, Y. Iwasaki, M. Ohtani, T. Kojima, *Automated preparation and analysis of barbiturates in human urine using the combined system of PrepStation and gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **1998**, *706*, 253-259.
- [84] W. Radeck, *Analysen physiologischer Flüssigkeiten-Festphasenextraktion und HPLC-Bestimmung*, GIT Labor-Medizin, **1993**, *16*, 97-103.
- [85] E. Reid, I.D. Wilson, *Analysis for drugs and metabolites including anti-infective agents, Proceedings of the Eighth International Bioanalytical Forum*, Bookcraft Ltd. Bath, **1990**.
- [86] K. Richter, *Determination of clozapine in human serum by capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography, **1988**, *434*, 465.
- [87] J. Scheurer, C.M. Moore, *Solid-Phase Extraction of drugs from biological tissues-a review*, Journal of Analytical Toxicology, **1992**, *16*, 264-269.
- [88] S. Süss, W. Seiler C. Hiemke, G. Schönhammer, H. Wetzel, A. Hillert, *Determination of benperidol and its reduced metabolite in human plasma by HPLC and electrochemical detection*, Journal of Chromatography B, **1991**, *565*, 363-373.
- [89] S. Ulrich, T. Isensee, U. Pester, *Simultaneous determination of amitriptyline, nortriptyline and 4 hydroxylated metabolites in serum by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection*, Journal of Chromatography B, **1996**, *685*, 81-89.

- [90] S. Ulrich, F.P. Meyer, S. Neuhof, W. Knorr, *Megabore capillary gas-liquid chromatographic method with nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of haloperidol and reduced haloperidol in serum: results of therapeutic drug-monitoring during acute therapy of eight schizophrenics*, Journal of Chromatography B, **1995**, 663, 289.
- [91] R.L. Vu, D. Helmeste, L. Albers, C. Reist, *Rapid determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*, Journal of Chromatography B, **1997**, 703, 195-201.
- [92] H. Weigmann, C. Hiemke, *Determination of clozapine and its major metabolites in human serum using automated solid-phase extraction and subsequent isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, Journal of Chromatography B, **1992**, 583, 209-216.
- [93] T. Agasøster, K.E. Rasmussen, *Automated analysis of oxolinic acid and flumequine in salmon whole blood and plasma using dialysis combined with trace enrichment as on-line sample preparation for high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography, **1991**, 564, 171-179.
- [94] J.D.H. Cooper, D.C. Turnell, B. Green, F. Verillon, *Automated sequential trace enrichment of dialysates and robotics A technique for the preparation of biological samples prior to high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography, **1988**, 456, 53-69.
- [95] R. Herráez-Hernández, N.C. van de Merbel, U.A.T. Brinkman, *Determination of the total concentration of highly protein-bound drugs in plasma by on-line dialysis and column liquid chromatography: application to non-steroidal anti-inflammatory drugs*, Journal of Chromatography B, **1995**, 666, 127-137.
- [96] N.C. van de Merbel, J.J. Hageman, U.A.T. Brinkman, *Membran-based sample preparation for chromatography*, Journal of Chromatography, **1993**, 634, 1-29.
- [97] N.C. van de Merbel, J.M. Teule, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, *Dialysis as an on-line sample-pretreatment technique for column liquid chromatography: influence of experimental variables upon the determination of benzodiazepines in human plasma*, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, **1992**, 10, 225-233.

- [98] D.C. Turnell, J.D.H. Cooper, *Automated sequential process for preparing samples for analysis by high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography, **1987**, 395, 613-621.
- [99] E.B. Asafu-Adjaye, S.Y. Su, G.K. Shiu, *Switching-valve-filter technique for the direct injection and analysis of drugs in plasma using HPLC*, Journal of Chromatography B, **1994**, 652, 35-42.
- [100] P. Campins-Falco, R. Herraez-Hernandez, A. Sevillano-Cabeza, *Column-switching techniques for HPLC of drugs in biological samples*, Journal of Chromatography B, **1993**, 619, 177-190.
- [101] S. Härtter, *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit Säulenschaltung zum quantitativen Nachweis von Antidepressiva und ihren Hauptmetaboliten in Plasma, Serum und Gewebe*, Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **1993**
- [102] S. Härtter, C. Hiemke, *Column switching and HPLC in the analysis of amitriptyline, nortriptyline and hydroxylated metabolites in human plasma or serum*, Journal of Chromatography B, **1992**, 578, 273-282.
- [103] H. Weigmann, J. Bierbrauer, S. Härtter, C. Hiemke, *Automated determination of clozapine and major metabolites in serum and urine*, Therapeutic Drug Monitoring, **1997**, 19, 480-488.
- [104] R.C. Dorey, S.H. Preskorn, P.K. Widener, *Results compared for tricyclic antidepressants as assayed by liquid chromatography and enzyme immunoassay*, Clinical Chemistry, **1988**, 34, 2348-2351.
- [105] M. Koel, A. Roth, P. Nebinger, *Zur Spezifität des Nachweises von trizyklischen Antidepressiva durch FPIA (TD<sub>x</sub>-System der Fa. Abbott)*, Ärztliches Labor, **1989**, 35, 57-59.
- [106] S. Pankey, C. Collins, A. Jaklitsch, A. Itzutso, M. Hu, M. Pirio, P. Singh, *Quantitative homogeneous immunoassays for amitriptyline, nortriptyline and desipramine*, Clinical Chemistry, **1986**, 32, 768-772.
- [107] K.-S. Boos, *Trends in der Probenaufarbeitung für die instrumentelle Bioanalytik*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **1997**, 2, 174-177.
- [108] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction theory and practice*, Wiley-VCH New York Chichester Weinheim Brisbane Singapore Toronto, **1997**.

- [109] H.-H. Möbius, W. Dürselen, *Chemische Thermodynamik Lehrwerk Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, **1988**, 207-208.
- [110] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn, *Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers*, *Analytical Chemistry*, **1992**, *64*, 1187-1199.
- [111] K. Doerffel, *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, **1966**.
- [112] J. Ai, *Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations*, *Analytical Chemistry*, **1997**, *69*, 1230-1236.
- [113] W.E. Lindup, *Plasma protein binding of drugs-some basic and clinical aspects*, *Progress in Drug Metabolism*, **1987**, *10*, 141-185.
- [114] J. Pörschmann, F.-D. Kopinke, J. Pawliszyn, *Solid-phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter*, *Journal of Chromatography A*, **1998**, *816*, 159-167.
- [115] J. Poerschmann, Z. Zhang, F.-D. Kopinke, J. Pawliszyn, *Solid-phase microextraction for determining the distribution of chemicals in aqueous matrices*, *Analytical Chemistry*, **1997**, *69*, 597-600.
- [116] T.B. Cooper, *Clozapine plasma level monitoring: Current status*, *Psychiatric Quarterly*, **1996**, *67*, 297-311.
- [117] M.H. Kronig, R.A. Munne, S. Szymanski, A.Z. Safferman, S. Pollack, T. Cooper, J.M. Kane, J.A. Lieberman, *Plasma clozapine levels and clinical response for treatment-refractory schizophrenic patients*, *American Journal of Psychiatry*, **1995**, *152*, 179-182.
- [118] J.S. Markowitz, K.S. Patrick, *Thermal degradation of clozapine-N-oxide to clozapine during gas chromatographic analysis*, *Journal of Chromatography B*, **1995**, *668*, 171.
- [119] S. Kruggel, S. Ulrich, *Solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma*, *Fresenius' Journal Analytical Chemistry*, **1999**, *364*; 654-655.
- [120] S. Ulrich, S. Kruggel, H. Weigmann, C. Hiemke, *Fishing for a drug: Solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma*, *Journal of Chromatography B*, **1999**, *731*, 231-240.

- [121] F.P. Meyer, *Indicative therapeutic and toxic drug concentrations in plasma: A tabulation*, International Journal Clinical Pharmacology and Therapeutics, **1994**, 32, 71-81.
- [122] M. Schulz, A. Schmoltdt, *Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs*, Pharmazie, **1997**, 52, 895-911.
- [123] D.R.A. Uges, *Mitteilung XV der Senatskommission für Klinisch-toxikologische Analytik der Deutschen Forschungsgemeinschaft*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, **1990**, 12-33.
- [124] S. Ulrich, C. Wurthmann, M. Brosz, F.P. Meyer, *The relationship between serum concentration and therapeutic effect of haloperidol in patients with acute schizophrenia*, Clinical Pharmacokinetic, **1998**, 34 (3), 227-263.
- [125] S. Kruggel, S. Ulrich, *Solid-phase microextraction for the assay of levomepromazine in human plasma*, Therapeutic Drug Monitoring, **2000**, 22, 723-728.
- [126] E. Mutschler, *Wie wirken Arzneimittel? Neue Erkenntnisse zu Wirkmechanismen*, Horizonte Wie weit reicht unsere Erkenntnis heute?, S. Hirzel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, **1993**, 231-240.
- [127] Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AChT) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., *DIN 32 645, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze*, **1994**, 1-10.
- [128] Vorstand der Bundesärztekammer, *Rilibäk, Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien*, Labormedizin, **1988**, 12.
- [129] G.L. Long, J.D. Wineforder, *Limit of detection a closer look at the IUPAC definition*, Analytical Chemistry, **1983**, 55, 712-724.

## 9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Abkürzungen

Ami	Amitriptylin
Cl-Ami	Chloramitriptylin
Cl-Halo	Chlorhaloperidol
ClMeth	Clomethiazol
Clomi	Clomipramin
Cloz	Clozapin
Cloz-NO	Clozapin-N-oxid
CW-DVB	Carbowax-Divinylbenzen
Desi	Desipramin
Diaze	Diazepam
DM-Cloz	Desmethylclozapin
DM-Diaze	Desmethyldiazepam, Nordazepam
DOM	(engl.: dissolved organic matter) gelöste polymere organische Stoffen
E-10-OH-Ami	E-10-Hydroxyamitriptylin
EMIT	enzyme-multiplied immunoassay (engl.)
E-Ola	Ethylolanzapin
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (engl.)
GC	Gaschromatographie, Gaschromatograph
Halo	Haloperidol
HP	Hewlett-Packard
HPLC	(engl.: high-pressure-liquid-chromatography) Hochdruckflüssigchromatographie
I.D.	Innendurchmesser
I.S.	interner/innerer Standard
Levo	Levomepromazin
LLE	engl.: liquid-liquid extraction) Flüssig-Flüssig-Extraktion
Lox	Loxapin
MeOH	Methanol
Mirta	Mirtazapin

MS	Massenspektrometer
5-MTA	5-Methylthiazol
Nor	Nortriptylin
NPD	Stickstoff-Phosphor-selektiver Detektor
Ola	Olanzapin
PA	Polyacrylat
PDMS	Polydimethylsiloxan
Praze	Prazepam
RAM	restricted access materials (engl.)
red. Halo	reduziertes Haloperidol
RIA	radioimmunoassay (engl.)
RP	reversed phase (engl.)
SFE	supercritical-fluid extraction (engl.)
SIM	select ion monitoring (engl.)
SNARI	selective serotonin noradrenalin reuptake inhibitors (engl.)
SPE	(engl.: solid-phase extraction) Festphasenextraktion
SPME	(engl.: solid-phase microextraction) Festphasenmikroextraktion
SPSS	Superior Performance Software System (alt: Statistical Package for the Social Science) (engl.)
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors (engl.)
TCA	Trichloressigsäure
TDM	(engl.: therapeutic drug monitoring) serumspiegel-assistierte Arzneimitteltherapie
TZA	Trizyklische Antidepressiva
UV	Ultraviolett
Venla	Venlafaxin
ZNS	Zentralnervensystem

## Symbole und ihre Bedeutung

$A_{\text{Analyt}}$	Peakfläche
$a_f$	Aktivität des Analyten in der Faser
$a_s$	Aktivität des Analyten in der Lösung
$\alpha$	Radius der statischen Grenzschicht
$c_{\text{Alb}}^0$	Konzentration der Bindungsstellen des Albumins vor dem Gleichgewicht
$c$	Konzentration
$c^0$	Ausgangskonzentration des Analyten
$c_{\text{Alb}}$	Konzentration der Bindungsstellen des Albumins im Gleichgewicht
$c_f^\infty$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Faser
$c_{\text{frei}}$	Konzentration des freien Analyten (freier Anteil)
$c_{\text{geb}}$	Konzentration des an Albumin gebundenen Analyten
$c_h^\infty$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten im Gasraum
$c_s^\infty$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der Lösung
$D$	Diffusionskoeffizient
$D_f$	Diffusionskoeffizient in der Faser
$D_h$	Diffusionskoeffizient im Gasraum
$D_s$	Diffusionskoeffizient in der Lösung
$\Delta H$	Änderung der molaren Enthalpie
$f$	Aktivitätskoeffizient
$K_0$	Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten bei $T_0$
$K_{\text{Alb}}$	Gleichgewichtskonstante
$K_f$	HENRY-Konstante des Analyten in der Faser
$K_{fh}$	Faser-Gasraum-Verteilungskonstante des Analyten
$K_{fs}$	Faser-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten
$K_h$	HENRY-Konstante des Analyten im Gasraum
$K_{hs}$	Gasraum-Lösung-Verteilungskonstante des Analyten
$K_{i,j,m}$	Gleichgewichtskonstante des Analyten zwischen den Phasen
$K_s$	HENRY-Konstante des Analyten in der Lösung
$L_f$	Länge der Faser
MW	Mittelwert
$m/z$	Massenzahl

$\mu^0$	chemisches Ausgangspotenzial des Analyten
$\mu_f$	chemisches Potenzial des Analyten in der Faser
$\mu_f^\theta$	chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Faser
$\mu_h$	chemisches Potenzial des Analyten im Gasraum
$\mu_s$	chemisches Potenzial des Analyten in der Lösung
$\mu_s^\theta$	chemisches Standardpotenzial des Analyten in der Lösung
N	Anzahl der Messungen
$n_{\text{Alb}}^0$	Stoffmenge der Bindungsstellen des Albumins
$n^0$	Ausgangsstoffmenge des Analyten
$n_f$	Stoffmenge des Analyten auf der Faser
$n_{\text{frei}}$	Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil)
$n'_{\text{frei}}$	Stoffmenge des freien Analyten (freier Anteil) nach Gleichgewichtseinstellung
$n_{\text{geb}}$	Stoffmenge des an Albumin gebundenen Analyten
$n_h$	Stoffmenge des Analyten im Gasraum
$n_{i,m}$	Stoffmenge des Analyten (m) in der Phase (i)
$n_m^0$	Ausgangsstoffmenge des Analyten m
$p^0$	Tabellierungsdruck = 101.325 kPa
$p_f$	Dampfdruck des Analyten in der Faser
$p_h$	Dampfdruck des Analyten im Gasraum
$pK_a$	Säurekonstante
$p_s$	Dampfdruck des Analyten in der Lösung
R	Gaskonstante = 8.314510 J/(K•mol)
RSA	relative Standardabweichung
$r, \theta, z$	Koordinaten eines dreidimensionalen und zylindrischen Raumes (Faserbeschichtung)
$r_a$	äußerer Radius
$r_{\text{Analyt}}$	Regressionskoeffizient nach linearer Regression
$r_i$	innerer Radius
SA	Standardabweichung
T	Temperatur

$t$	Zeit
$T_0$	beim Experiment festgelegte Ausgangstemperatur
$t_{95\%}$	Zeit nach Extraktion von 95 % der möglichen Maximalmenge
$t_e$	Gleichgewichtszeit
$V_f$	Volumen der Faserbeschichtung
$V_h$	Volumen des Gasraumes
$V_i$	Volumen der Phase i
$V_j$	Volumen weiterer von i verschiedener Phasen
$V_s$	Volumen der Lösung
$x, y, z$	Koordinaten eines dreidimensionalen Raumes

#### Einheiten

eV	Elektronenvolt
mmol	Millimol
Ma-%	Massenprozent

## ANHANG

### I Stammlösungen der Arzneistoffe, ihrer Metabolite und der internen Standards

Arzneistoff/Metabolit Innerer Standard	Einwaage	Lösungsmittel
Clozapin	10.00 mg	100 ml 0.001 N Salzsäure
Clozapin-N-oxid	10.93 mg	100 ml Reinstwasser
Desmethylclozapin	10.43 mg	100 ml 0.1 N Salzsäure
Loxapin	13.60 mg	100 ml Reinstwasser
Levomepromazin	13.53 mg	100 ml Reinstwasser
Chloramitriptylin	11.17 mg	100 ml Reinstwasser
Clomipramin	11.16 mg	100 ml Reinstwasser
Desmethylclomipramin	11.21 mg	100 ml Reinstwasser
Olanzapin	2.52 mg	25 ml Methanol
Ethylolanzapin	5.01 mg	50 ml Methanol
Clomethiazol	16.02 mg	100 ml Reinstwasser
5-Methylthiazol	50 µl	50 ml Methanol
Amitriptylin	11.31 mg	100 ml Reinstwasser
Nortriptylin	11.38 mg	100 ml Reinstwasser
Desipramin	11.37 mg	100 ml Reinstwasser
Diazepam	10.00 mg	100 ml Methanol
Desmethyldiazepam	10.00 mg	100 ml Methanol
Prazepam	10.03 mg	100 ml Methanol
Venlafaxin	11.28 mg	100 ml Reinstwasser
E-10-Hydroxyamitriptylin	1.5 mg	15 ml 0.01 N Salzsäure
Haloperidol	10.00 mg	100 ml 0.001 N Salzsäure
reduziertes Haloperidol	10.00 mg	100 ml 0.001 N Salzsäure
Chlorhaloperidol	2.5 mg	25 ml 0.001 N Salzsäure
Mirtazapin	30.00 mg	100 ml Methanol

## II Faserlebensläufe

### 1) PDMS-Fasern

Faser Nr.	Konditionierung Leerlauf	Anzahl der Extraktion		Anzahl der Injektionen
		von Plasma	von Wasser	
1	0	60	5	87
2*	6	27	3	58
3*	4	27	4	57
4	4	46	5	73
5	4	103	12	141
6**	4	20	5	39
7	3	71	5	88
8	1	84	4	99
9	1	43	0	49
10	1	114	23	158
11	1	101	1	114
12	4	63	21	104
13	4	69	2	84
14	2	95	0	116
15	1	49	18	80
16	1	46	0	51
17**	1	74	25	122
18	1	96	22	150
19**	1	25	0	28
20**	1	64	18	122
21	5	59	26	114
22	5	53	21	102
23	5	47	21	113
24*	2	22	0	33
25	2	26	42	90
26	2	18	38	80
27*	2	17	1	39
28*	2	15	0	27
29*	2	16	0	27
30*	4	27	3	37
31*	2	36	4	45
32	6	24	17	55
33	2	17	16	39
34	2	11	15	28
35	2	11	16	29
36	2	9	13	24
37	2	5	10	17

\* Fasern wurden unter extremen Extraktionsbedingungen getestet

\*\* Fasern sind abgebrochen

*Fasern noch in Benutzung*

2) PA-Fasern

Faser Nr.	Konditionierung Leerlauf	Anzahl der Extraktion		Anzahl der Injektionen
		von Plasma	von Wasser	
1	0	13	34	78
2	1	10	22	60
3	1	10	19	62
4	5	8	14	48
5**	6	6	1	43
6	8	5	12	44
7	8	1	11	21

\*\* Fasern sind abgebrochen

*Fasern noch in Benutzung*

3) CW-DVB-Fasern

Faser Nr.	Konditionierung Leerlauf	Anzahl der Extraktion		Anzahl der Injektionen
		von Plasma	von Wasser	
1*	2	3	1	8
2*	1	3	1	7
3*	1	6	2	13
4**	1	3	0	5
5*	1	5	6	24
6*	1	4	8	26
7*	3	1	11	25
8*	2	1	10	26
9*	2	0	8	28
10*	3	1	2	6
11*	2	1	1	4
12*	2	1	1	4
13*	2	1	0	3

\*\* Fasern sind abgebrochen

\* Beschichtung ganz bzw. teilweise ab

*Fasern noch in Benutzung*

### **III Validierung (Auszug aus „Erstellung von Laborvorschriften von Analysenverfahren für das Therapeutische Drug-Monitoring“; SOP 27)**

#### 1. Kalibrierung

Die Kalibrierung sollte mindestens den therapeutisch relevanten Bereich einschließen. Zur Validierung soll eine 10-Punkt-Kalibrierung mit äquidistanten Werten (Auswertung nach [127]) erfolgen, um eine vergleichende Wertung intern zu ermöglichen. Außerdem muss eine Kalibrierung (mindestens 5 Punkte) zur Messwertermittlung erstellt werden.

#### 2. Präzision in Serie

Die Präzision in Serie ist mindestens an zwei Messpunkten der unteren und der oberen Grenze des Kalibrierbereiches mit jeweils 10 Proben zu messen.

#### 3. Präzision von Tag zu Tag

Analyte nach [128] bedingen eine Präzisionskontrolle, d.h. die Präzision von Tag zu Tag muss in einer Vorperiode (N = 20) an der wichtigsten Entscheidungsgrenze (obere Grenze des therapeutischen Bereiches) ermittelt werden.

Die Präzision (Standardabweichung, SA) von Tag zu Tag darf in einer Vorperiode (N = 20) 8 % und während der Kontrolle 8 % nicht überschreiten. Jede Präzisionskontrollprobe muss innerhalb der Kontrollgrenzen ( $3 \cdot SA$  der Vorperiode) liegen. Zur Durchführung und Dokumentation der Präzisionskontrolle siehe [128].

#### 4. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze kann mittels direkter Methode (Signal/Rausch-Verhältnis) oder indirekter Methode (Kalibrierkurvenmethode) ermittelt werden [129].

#### 5. Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze muss mit einer Präzisionsmessung mindestens an der unteren Grenze des Kalibrierbereiches (Präzision in Serie) definiert werden.

## 6. Richtigkeit

Untersuchungen zur Richtigkeit (Methodenvergleich, externe Qualitätskontrollproben, Teilnahme am Ringversuch) sollten so früh wie möglich erfolgen. Die Richtigkeitskontrolle soll im gesamten medizinisch relevanten Messbereich erfolgen. Üblich sind 3 Proben im Bereich.

Richtigkeitskontrollen müssen nach [128] in jeder 4. Serie erfolgen. Bei seltenen Untersuchungen ist stets eine Richtigkeitskontrolle vorzunehmen. Als maximale Abweichung vom Sollwert sind 24 % zulässig. Zur Durchführung und Dokumentation siehe [128].

### Validierungsparameter – Verfahrenskontrolle

Für die Analyten gemäß [128] gelten die Bestimmungen der Richtlinien der Bundesärztekammer (RILIBÄK). Die übrigen Analyten sollten soweit möglich analog behandelt werden, d.h. die o.g. Validierungsparameter müssen gewährleisten, dass die Forderungen der [128] einzuhalten sind.

#### IV SPME-Kurzvorschriften

##### 1) Clozapin

Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. Cloz ng/ml	Referenzlsg. Cloz $\mu$ l	Wasser reinst $\mu$ l	Leerserum $\mu$ l
0	0	0	0	1000
1	100	10	40	950
2	200	20	30	950
3	300	30	20	950
4	400	40	10	950
5	500	50	0	950
6	600	30	20	950
7	700	35	15	950
8	800	40	10	950
9	900	45	5	950
10	1000	50	0	950

Referenzlösung R1: **R1 Cloz**; 10  $\mu$ g/ml Clozapin

Referenzlösung R2: **R2 Cloz**; 20  $\mu$ g/ml Clozapin

Extraktion

- 1) 250  $\mu$ l Serum + 50  $\mu$ l I.S. (**I.S. Lox**; 8  $\mu$ g/ml Loxapin); 10 s Vortex
- 2) + 1700  $\mu$ l Wasser; 10 s Vortex
- 3) +500  $\mu$ l 1 N NaOH (6 % NaCl); 10 s Vortex
- 4) 1.5 ml in *ependorfs* abnehmen
- 5) SPME; 100- $\mu$ m-PDMS-Faser; bei 30 °C 30 min im *Eppendorf*-Thermomixer mit 700 rpm schütteln
- 6) Faser 20 s in Wasser reinst waschen
- 7) Faser 20 s in 50 % Methanol waschen
- 8) Faser 2 min an der Luft trocknen
- 9) Faser 60 s bei 260 °C desorbieren

## 2) Levomepromazin

Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. Levo ng/ml	Referenzlsg. Levo $\mu$ l		Wasser reinst $\mu$ l	Leerserum $\mu$ l
0	0	0		0	1000
1	5	10		40	950
2	20	40	R1	10	950
3	40	20		30	950
4	60	30		20	950
5	80	40	R2	10	950
6	100	50		0	950
7	120	30		20	950
8	140	35		15	950
9	160	40	R3	10	950
10	180	45		5	950

Referenzlösung R1: **R1 Levo**; 500 ng/ml Levomepromazin

Referenzlösung R2: **R2 Levo**; 2  $\mu$ g/ml Levomepromazin

Referenzlösung R3: **R3 Levo**; 4  $\mu$ g/ml Levomepromazin

### Extraktion

- 1) 250  $\mu$ l Serum + 50  $\mu$ l I.S. (**I.S. Cl-Ami**; 4  $\mu$ g/ml Chloramitriptylin); 10 s Vortex
- 2) + 1700  $\mu$ l Wasser ; 10 s Vortex
- 3) +500  $\mu$ l 1 N NaOH (6 % NaCl); 10 s Vortex
- 4) 1.5 ml in *eppendorfs* abnehmen
- 5) SPME; 100- $\mu$ m-PDMS-Faser; bei 30 °C 30 min im *Eppendorf*-Thermomixer mit 700 rpm schütteln
- 6) Faser 20 s in Wasser reinst waschen
- 7) Faser 20 s in 50 % Methanol waschen
- 8) Faser 2 min an der Luft trocknen
- 9) Faser 30 s bei 260 °C desorbieren

### 3) Clomipramin und Desmethylclomipramin

Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. Clomi, DM-Clomi ng/ml	Referenzlsg. Clomi, DM-Clomi $\mu$ l		Wasser reinst $\mu$ l	Leerserum $\mu$ l
0	0	0		0	1000
1	25	10		40	950
2	50	20		30	950
3	75	30	R1	20	950
4	100	40		10	950
5	125	50		0	950
6	150	30		20	950
7	175	35		15	950
8	200	40	R2	10	950
9	225	45		5	950
10	250	50		0	950

Referenzlösung R1: **R1 Clomi/DM-Clomi**; je 2.5  $\mu$ g/ml Clomipramin und  
DM-Clomipramin

Referenzlösung R2: **R2 Clomi/DM-Clomi**; je 5  $\mu$ g/ml Clomipramin und  
DM-Clomipramin

Extraktion

- 1) 250  $\mu$ l Serum + 50  $\mu$ l I.S. (**I.S. Cl-Ami**; 4  $\mu$ g/ml Chloramitriptylin); 10 s Vortex
- 2) + 1700  $\mu$ l Wasser ; 10 s Vortex
- 3) +500  $\mu$ l 1 N NaOH (6 % NaCl); 10 s Vortex
- 4) 1.5 ml in *eppendorfs* abnehmen
- 5) SPME; 100- $\mu$ m-PDMS-Faser; bei 30 °C 30 min im *Eppendorf*-Thermomixer mit 700 rpm schütteln
- 6) Faser 20 s in Wasser reinst waschen
- 7) Faser 20 s in 50 % Methanol waschen
- 8) Faser 2 min an der Luft trocknen
- 9) Faser 90 s bei 300 °C desorbieren

#### 4) Olanzapin

Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. Ola ng/ml	Referenzlsg. Ola $\mu$ l	Wasser reinst $\mu$ l	Leerserum $\mu$ l
0	0	0	0	5000
1	5	50	200	4750
2	10	100	150	4750
3	15	150	100	4750
4	20	200	50	4750
5	25	250	0	4750
6	30	150	100	4750
7	35	175	75	4750
8	40	200	50	4750
9	45	225	25	4750
10	50	250	0	4750

Referenzlösung R1: **R1 Ola**; 500 ng/ml Olanzapin in 10 % MeOH

Referenzlösung R2: **R2 Ola**; 1  $\mu$ g/ml Olanzapin in 10 % MeOH

#### A Deproteinierung

- 1) 1300  $\mu$ l Serum + 100  $\mu$ l I.S. (**I.S. E-Ola**; 2  $\mu$ g/ml Ethylolanzapin in 10 % MeOH); 10 s Vortex
- 2) + 32.5  $\mu$ l HCl (conc.); 10 s Vortex
- 3) + 100  $\mu$ l TCA (6 M); 10 s Vortex
- 4) zentrifugieren bei 5600 rpm; 5 min

#### B Extraktion

- 1) 1000  $\mu$ l Überstand in eppendorfs abnehmen
- 2) + 500  $\mu$ l NaOH (1 M + 6 % NaCl); 10 s Vortex
- 3) SPME; 85- $\mu$ m-PA-Faser; bei 30 °C 30 min im Eppendorf-Thermomixer mit 700 rpm schütteln
- 4) Faser 90 s bei 300 °C desorbieren

## 5) Clomethiazol

Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. ClMeth µg/ml	Referenzlsg. ClMeth µl		Wasser reinst µl	Leerserum µl
0	0.0	0		0	1000
1	0.1	20	R1	30	950
2	0.5	10	R2	40	950
3	1.0	20		30	950
4	1.5	30		20	950
5	2.0	40		10	950
6	2.5	50		0	950
7	3.0	30	R3	20	950
8	3.5	35		15	950
9	4.0	40		10	950
10	4.5	45		5	950

Referenzlösung R1: **R1 ClMeth**; 5 µg/ml Clomethiazol

Referenzlösung R2: **R2 ClMeth**; 50 µg/ml Clomethiazol

Referenzlösung R3: **R3 ClMeth**; 100 µg/ml Clomethiazol (Stammlösung)

### Extraktion

- 1) 250 µl Serum + 50 µl I.S. (**I.S. 5-MTA**; 0.1 µl/ml 5-Methylthiazol)  
in 5-ml-Rollrandgläschen
- 2) +1700 µl Wasser
- 3) +500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22 g in 100 ml H<sub>2</sub>O); Teflon-Magnet-Rührer, Laborfolie
- 4) HS-SPME; 100-µm-PDMS-Faser; bei RT 30 min auf Magnetrührer mit Stufe 0.5  
rühren
- 5) Faser 90 s bei 250 °C desorbieren

## 6) Amitriptylin und Nortriptylin

### Herstellung der Kalibrierreihe

Nr.	Konz. Ami, Nor ng/ml	Referenzlsg. Ami, Nor $\mu\text{l}$	Wasser reinst $\mu\text{l}$	Leerserum $\mu\text{l}$
0	0	0	0	1000
1	25	10	40	950
2	50	20	30	950
3	75	30	20	950
4	100	40	10	950
5	125	50	0	950
6	150	30	20	950
7	175	35	15	950
8	200	40	10	950
9	225	45	5	950
10	250	50	0	950

Referenzlösung R1: **R1 Ami/Nor**; je 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Amitriptylin und Nortriptylin

Referenzlösung R2: **R2 Ami/Nor**; je 5  $\mu\text{g/ml}$  Amitriptylin und Nortriptylin

### Extraktion

- 1) 250  $\mu\text{l}$  Serum + 50  $\mu\text{l}$  I.S. (**I.S. Desi/Clomi**; je 2  $\mu\text{g/ml}$  Desipramin und Clomipramin); 10s Vortex
- 2) + 1700  $\mu\text{l}$  Wasser ; 10 s Vortex
- 3) +500  $\mu\text{l}$  1 N NaOH (6 % NaCl); 10 s Vortex
- 4) 1.5 ml in *eppendorfs* abnehmen
- 5) SPME; 100- $\mu\text{m}$ -PDMS-Faser; bei 30 °C 30 min im *Eppendorf*-Thermomixer mit 700 rpm schütteln
- 6) Faser 20 s in Wasser reinst waschen
- 7) Faser 20 s in 50 % Methanol waschen
- 8) Faser 2 min an der Luft trocknen
- 9) Faser 90 s bei 260 °C desorbieren

## V Retentionszeiten von möglichen interferierenden Arzneistoffen

Säule: BPX-5 (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film)

Trägergas: N<sub>2</sub> (20 ml/min, 150 kPa)

Detektorgase: Luft (100 ml/min), H<sub>2</sub> (3 ml/min), Hilfsgas N<sub>2</sub> (6 ml/min)

Detektor: NPD (300 °C, 20 pA bis 25 pA)

Injektor: 260 °C, im splitless

Ofen: 160 °C (0 min), 40 °C/min bis 260 °C, 4 °C/min bis 284 °C (1 min).

Arzneistoff	Retentionszeit (min)
Amitriptylin	3.1
Nortriptylin	3.1
Desipramin	3.3
Oxazepam	3.7
Chloramitriptylin	3.8
Clomipramin	3.9
Lorazepam	4.0
Diazepam	4.2
Chlorpromazin	4.4
Levomepromazin	4.5
Nordazepam	4.7
Loxapin	5.1
Prazepam	5.4
Olanzapin	6.0
Ethylolanzapin	6.5
Clozapin	7.3
Haloperidol	8.1
reduziertes Haloperidol	8.6
Perphenazin	13.2

## VI Retentionszeiten von möglichen interferierenden Arzneistoffen

Säule: HP-5 (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film)

Trägergas: N<sub>2</sub> (0.7 ml/min, 190 kPa)

Detektorgase: Luft (100 ml/min), H<sub>2</sub> (3 ml/min), Hilfgas N<sub>2</sub> (28 ml/min)

Detektor: NPD (300 °C, 20 pA bis 25 pA)

Injektor: 300 °C, im splitless

Ofen: 160 °C (0 min), 40 °C/min bis 260 °C, 4 °C/min bis 280 °C (1 min).

Arzneistoff	Retentionszeit (min)
Venlafaxin	4.5
Amitriptylin	5.3
Nortriptylin	5.4
Imipramin	5.5
Desipramin	5.6
Mirtazapin	5.7
Chloramitriptylin	6.7
Clomipramin	6.9
Desmethylclomipramin	7.1
Diazepam	7.2
Nordazepam	7.7
Clozapin	8.5
Prazepam	9.1
Loxapin	9.3
Olanzapin	9.8

VII Übersicht über die getesteten Additive zur SPME aus Plasma und gemessenen Peakflächen von Clozapin und Loxapin

Additiv	Clozapin	$\frac{\text{Clozapin}_{\text{mit}}}{\text{Clozapin}_{\text{ohne}}}$	Loxapin
<b>ohne</b>	<b>107646.2</b>	<b>1.00</b>	<b>1927004.9</b>
i-Amylalkohol	75732.1	0.70	1307180.9
Methanol	82547.0	0.77	1035482.4
Aceton	92103.1	0.86	1454854.3
Chloroform	118815.7	1.10	1541135.8
Eisessig	112904.7	1.05	1610330.0
Ethylacetat	111621.6	1.04	1618638.8
Tetrahydrofuran	66764.0	0.62	1211399.0
Toluen	136122.7	1.26	963613.7
n-Heptan	100260.4	0.93	1353142.0
Pyridin	57389.1	0.53	1053607.1
t-Butylether	89884.9	0.84	1531941.4
<b>1-Cl-Butan</b>	<b>203880.7</b>	<b>1.89</b>	<b>1214252.1</b>
Triethylamin	36799.8	0.34	667431.6
Nonylamin	19120.9	0.18	185369.0
Acetonitril	101138.1	0.94	1858626.0
Dimethylsulfoxid	87257.5	0.81	1446493.1
Dimethylpiperazin	79712.6	0.74	1591044.5
1,4-Dioxan	106199.6	0.99	1446373.4
Nitrobenzen	104840.4	0.97	1394961.4
Ethanolamin	113432.8	1.05	1110361.5
Dimethylformamid	79443.0	0.74	1489706.0
Ethylenglykol	83638.2	0.78	1413110.5
Diethylenglykol	104521.7	0.97	1687925.0
Tetramethylammoniumchlorid	105739.3	0.98	1598194.7
1-Brombutan	90415.2	0.84	1074243.9
1,2-Dichlorethan	103090.2	0.96	929356.9
Ethylbromid	93583.5	0.87	1223288.3
Propylbromid	114009.6	1.06	1357080.6
1,1,2,2-Tetrabromethan	103922.9	0.97	1542994.6
Methyliodid	66651.5	0.62	879618.8
Hexylbromid	70289.0	0.65	851945.0

$\frac{\text{Clozapin}_{\text{mit}}}{\text{Clozapin}_{\text{ohne}}}$  = Verhältnis der gemessenen Peakflächen

**VIII Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Clozapin-SPME-Methode anhand versetzter Proben**

Probe Nr.	Konzentration Clozapin [ng/ml]			
	LLE	SPME	HPLC	SPME
1	94	105	471	492
2	182	207	398	398
3	264	298	439	441
4	425	407	271	276
5	513	507	568	698
6	619	568	142	175
7	899	775	523	503
8	1004	1096	7	0
9			215	246
10			306	290
11			369	455
12			204	250
13			290	297
14			536	546
15			81	97
16			664	625
<b>A [ng/ml]</b>	14.4		18.2	
<b>B</b>	0.962		1.00	
<b>r</b>	0.981		0.976	

**IX Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Clozapin-SPME-Methode anhand von Patienten-Proben**

Probe Nr.	Konzentration Clozapin [ng/ml]	
	LLE	SPME
1	222	239
2	597	593
3	449	345
4	273	366
5	453	377
6	2900	2500
7	185	177
8	300	273
9	344	350
10	258	294
11	446	410
12	446	559
13	232	282
14	395	606
15	896	945
16	1300	1300
17	159	191
18	979	895
19	873	1100
20	447	651
21	290	355
22	17	0
23	458	540
24	161	183
25	239	234
26	773	967
<b>A [ng/ml]</b>	90.1	
<b>B</b>	0.879	
<b>r</b>	0.979	

**X Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Levomepromazin-SPME-Methode anhand versetzter Proben**

Probe Nr.	Konzentration Levomepromazin [ng/ml]	
	LLE	SPME
1	36	49.3
2	16	19.5
3	175	189
4	81	89.8
5	81	92.9
6	12	12.3
7	142	166
8	120	152.4
9	64	66.6
10	195	234.2
11	0	0
12	96	102.7
<b>A [ng/ml]</b>	-0.34	
<b>B</b>	1.16	
<b>r</b>	0.990	

**XI Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Levomepromazin-SPME-Methode anhand von Patienten-Proben**

Probe Nr.	Konzentration Levomepromazin [ng/ml]	
	LLE	SPME
1	18	15.9
2	14.1	9.3
3	8	8.2
4	10.4	3.5
5	96	91.4
6	69	65.2
7	74	73.7
<b>A [ng/ml]</b>	-3.29	
<b>B</b>	1.00	
<b>r</b>	0.998	

**XII Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Clomipramin-SPME-Methode anhand versetzter Proben**

Probe Nr.	Konzentration Clomipramin [ng/ml]			Konzentration Desmethylclomipramin [ng/ml]		
	LLE	HPLC	SPME	LLE	HPLC	SPME
1	65	145	90	181	254	213
2	25	34	31	338	416	337
3	257	414	328	50	53	81
4	117	196	176	71	127	113
5	126	246	129	102	87	93
6	25	45	28	388	416	389
7	230	376	229	49	86	64
8	211	348	212	47	25	48
9	89	165	88	107	134	134
10	329	526	325	45	68	25
11	9	46	0	303	429	317
12	140	224	137	78	113	78
<b>A [ng/ml]</b>	6.4	-6.5		13.6	11.0	
<b>B</b>	1.04	0.70		0.98	0.80	
<b>r</b>	0.972	0.966		0.989	0.978	

**XIII Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Olanzapin-SPME-Methode anhand versetzter Proben**

Probe Nr.	Konzentration Olanzapin [ng/ml]	
	LLE	SPME
1	11	15
2	5	6
3	38	50
4	22	24
5	121	101
6	0	0
7	26	32
8	46	42
9	30	16
10	78	75
<b>A [ng/ml]</b>	4.4	
<b>B</b>	0.84	
<b>r</b>	0.973	

**XIV Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Richtigkeit der Amitriptylin-SPME-Methode anhand von Patienten-Proben**

Probe Nr.	Konzentration Amitriptylin [ng/ml]		Konzentration Nortriptylin [ng/ml]	
	LLE	SPME	LLE	SPME
1	40	65.7	50	88.5
2	37	57.2	49	70.0
3	35	58.1	37	79.0
4	59	93.7	73	89.9
5	38	72.1	56	74.4
<b>A [ng/ml]</b>	9.3		64.1	
<b>B</b>	1.44		0.31	
<b>r</b>	0.943		0.464	

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Magdeburg, 14.06.2002

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn MR Prof. Dr. med. F.P. Meyer für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg anzufertigen, sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Müller für die anregenden Diskussionen und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit,

Herrn Dr. rer. nat. S. Ulrich für die jederzeit gewährte Unterstützung und Förderung der Arbeit sowie für die Durchführung der Auswertung der internen Vergleichsproben,

Frau Kühne für die Durchführung der Probenaufarbeitung der internen Vergleichsproben,

allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. C. Hiemke von der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der Analysen der externen Vergleichsproben.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mich stets unterstützte und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **LEBENS LAUF**

Name: Silvia Kruggel, geb. Schmuck

Anschrift: Försterstraße 15  
39112 Magdeburg  
Tel. 0391/6210076

Geburtsdatum: 06. Februar 1972

Familienstand: verheiratet; ein Kind

### Schulbildung

1978-1988 POS „Hermann Matern“ Merseburg  
1988-1990 EOS „Ernst Haeckel“ Merseburg  
1990 Abitur

### Studium

1990-1995 Chemie-Studium an der TH „Carl Schorlemmer“ Leuna-Merseburg  
und an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1995 Abschluss der Diplomarbeit zum Thema „Zu Mechanismen der  
Korrosion emailbildender Gläser in wäßriger Lösung“  
1995-1996 Lehrgang Betriebswirtschaft am Institut für Unternehmensführung  
e.V.  
1997-1998 Erziehungsurlaub

### Beruflicher Werdegang

1998-09.2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische  
Pharmakologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg;  
Hospitationsvertrag am Institut für Klinische Pharmakologie der  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Fertigstellung der  
Dissertation zum Thema „Festphasenmikroextraktion für die  
Arzneimittelbestimmung in Blutplasma“  
seit 10.2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich  
Chemie/Pharmatechnik der Hochschule Magdeburg-Stendal (FH)

Magdeburg, 14.06.2002

## PUBLIKATIONEN

- [1] S. Kruggel, S. Ulrich, *Solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma*, Fresenius' Journal Analytical Chemistry, 1999, 364; 654-655.
- [2] S. Ulrich, S. Kruggel, H. Weigmann, C. Hiemke, *Fishing for a drug: Solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma*, Journal of Chromatography B, 1999, 731, 231-240.
- [3] S. Kruggel, S. Ulrich, *Solid-phase microextraction for the assay of levomepromazine in human plasma*, Therapeutic Drug Monitoring, 2000, 22, 723-728.