

**Entwicklung eines automatisierten routinetauglichen
Bestimmungsverfahrens sowie Strukturaufklärung von
Stoffwechselprodukten für Makrolid-Immunsuppressiva
mit Hilfe von LC/Elektrospray-MS**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Christian Vidal

geboren am 29. Dezember 1968 in Ludwigshafen am Rhein

1998

Referent: Prof. Dr. G. Wunsch

Korreferent: Prof. Dr. K.-Fr. Sewing

Tag der Promotion: 25. Juni 1998

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines routinetauglichen, weitgehend automatisierten Bestimmungsverfahrens für drei Makrolid-Immunsuppressiva – Tacrolimus (FK-506), Sirolimus (Rapamycin) und SDZ RAD (40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin). Vorgestellt werden die Leistungsdaten des Verfahrens auf der Basis von LC/Elektrospray-MS, das sich durch hohe Präzision und Anwenderfreundlichkeit auszeichnet. Es eignet sich für große Probenreihen im kontinuierlichen Betrieb und erlaubt die simultane Bestimmung von Ciclosporin, das in Kombination mit den untersuchten Makroliden klinische Relevanz besitzt.

Außerdem wurde die Elektrospray-Technik zur Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten des neuentwickelten Immunsuppressivums SDZ RAD eingesetzt. Für den *in vitro*-Stoffwechsel von SDZ RAD wurden die Ringöffnung, Hydroxylierung und Demethylierung als wichtigste Transformationswege identifiziert. Die Strukturen von 16-O-Demethyl-SDZ RAD, der ring-geöffneten Form von SDZ RAD sowie des entsprechenden Dehydrates konnten aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurden mehrere demethylierte und hydroxylierte Stoffwechselprodukte charakterisiert.

Abstract

The current work describes the development of an automated routine method for the determination of three macrolide immunosuppressants – tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamycin) and SDZ RAD (40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin). The analytical process based on LC/electrospray-MS is characterized by high precision and selectivity. It is suitable for high sample turnover during continuous operation and allows the simultaneous determination of ciclosporin, another immunosuppressant given in combination with sirolimus and SDZ RAD.

The electrospray-technique was used for structural elucidation of *in vitro*-metabolites of the new immunosuppressant SDZ RAD. Ring-opening, hydroxylation and demethylation were found to be the most important metabolic pathways. The structures of 16-O-demethyl-SDZ RAD, the ring-opened form of SDZ RAD and the corresponding dehydrate were identified. In addition, several demethylated and hydroxylated metabolites were characterized.

Schlagworte/Keywords

HPLC/Elektrospray-Massenspektrometrie (LC/ESI-MS), Strukturaufklärung,
Immunsuppressiva

HPLC/electrospray-mass spectrometry (LC/ESI-MS), structural elucidation,
immunosuppressants

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	6
2 METHODENENTWICKLUNG.....	9
2.1 Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva	9
2.1.1 Probenvorbereitung und flüssigkeitschromatographische Trennung.....	10
2.1.2 Massenspektrometrische Bedingungen.....	13
2.1.3 Kalibrierung und Validierung	13
2.2 Strukturaufklärung von SDZ RAD-Metaboliten	14
2.2.1 in vitro-Verstoffwechslung von SDZ RAD.....	15
2.2.2 Instrumentierung.....	15
2.2.3 Massenspektrometrische Bedingungen.....	16
2.2.4 LC/MS-Messungen.....	16
2.3 Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik.....	16
2.3.1 Grundlagen der Elektrospray-Massenspektrometrie.....	17
2.3.1.1 Ionisierungsprozeß.....	17
2.3.1.2 Interfacetechnik und LC/MS-Kopplung.....	18
2.3.1.3 Anwendungsfelder	19
2.3.2 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface	20
2.3.3 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion.....	21
2.3.4 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion.....	22
2.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens.....	22
2.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe	22
2.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche	23
2.5 Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten.....	24
2.5.1 Eigenschaften und klinische Bedeutung der Makrolid-Immunsuppressiva.....	24
2.5.2 Stabilität von SDZ RAD	26
2.5.3 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion von Analyten	27
2.5.4 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren.....	27
3 ERGEBNISSE	29
3.1 Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva	29
3.2 Strukturaufklärung von Metaboliten von SDZ RAD	34
3.2.1 Ring-geöffnete Form von SDZ RAD	39
3.2.2 Dehydrat der ring-geöffneten Form von SDZ RAD	40
3.2.3 16-O-Demethyl-SDZ RAD	41
3.2.4 Mono-hydroxylierte Metabolite von SDZ RAD	44
3.2.5 Produkte mehrfacher Transformationen.....	47

3.3 Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik.....	49
3.3.1 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface	49
3.3.2 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion.....	53
3.3.3 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion.....	58
3.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens.....	61
3.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe	61
3.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche	63
3.5 Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten.....	64
3.5.1 Stabilität von SDZ RAD	64
3.5.2 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion koeluiender Substanzen.....	64
3.5.3 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren.....	66
4 DISKUSSION	68
4.1 Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva	68
4.2 Strukturaufklärung von Metaboliten von SDZ RAD	71
4.3 Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik.....	74
4.3.1 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface	74
4.3.2 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion.....	75
4.3.3 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion.....	77
4.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens.....	79
4.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe	79
4.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche	79
4.5 Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten.....	80
4.5.1 Stabilität von SDZ RAD	80
4.5.2 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion koeluiender Substanzen.....	80
4.5.3 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren.....	81
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	82
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	85
7 ANHANG	95
7.1 Maßnahmen der Qualitätssicherung.....	95
7.2 Verzeichnis der verwendeten Geräte.....	103
7.3 Liste der verwendeten Chemikalien	104
8 DANKSAGUNG	105

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

API	<i>atmospheric pressure ionization</i> , Ionisierung bei Atmosphärendruck
CI	<i>chemical ionization</i> , chemische Ionisierung
CID	<i>collision induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Dissoziation
Cs	Ciclosporin
EI	<i>electron impact ionization</i> , Elektronenstoß-Ionisierung
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
GC/MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie (hier als Kurzform für HPLC verwendet)
LC/MS	Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie
SDZ RAD	40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin
SEM	standard error of the mean
Si	Sirolimus
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
TIC	<i>total ion current</i> , Totalionenstrom

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Entwicklung der Elektrospray-Massenspektrometrie hat die Möglichkeiten der chemischen Analytik im Bereich der Biochemie, Pharmazie und Medizin im letzten Jahrzehnt grundlegend erweitert. Der analytische Zugang zu thermolabilen Substanzen hoher Polarität war bis vor wenigen Jahren auf Verfahren mit geringer Nachweisstärke und Selektivität beschränkt. Hierzu sind die Immunoassays, aber auch chemische Analyseverfahren wie z.B. die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Detektion der Absorption im Ultraviolettbereich, des Brechungsindex etc. zu zählen. Detektoren höherer Selektivität standen nur für Substanzen zur Verfügung, die gaschromatographisch bestimmt werden konnten [1]. Neben solchen, die selektiv auf elektronegative funktionelle Gruppen, auf Stickstoff- oder Phosphoratome in den Analytmolekülen ansprechen, waren für die Gaschromatographie (GC) bald auch massenspektrometrische Detektoren verschiedensten Leistungsumfangs verfügbar. Durch die technisch einfache Realisierung der Separation des Trägergasstroms von den zu bestimmenden Analyten wurde die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) schnell zu einer routinetauglichen, robusten und ökonomischen Analyseverfahren.

Die Überführung des Analyten aus der Flüssig- in die Gasphase und weiter ins Hochvakuum der Ionenquelle stellte bei der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (MS) ein technisch anspruchsvolleres Problem dar, das erst in jüngster Zeit befriedigend gelöst werden konnte. Erforderlich war hierbei die Abtrennung der großen Gasmengen, die bei der Verdampfung des aus der HPLC austretenden flüssigen Eluentenstroms anfallen. Es wurden verschiedenartige Verfahren - wie z.B. die *particle beam*-Technik - entwickelt. Dabei werden aus dem Eluentenstrom ein Aerosol erzeugt, nach dem Verdampfen das gasförmige Lösungsmittel abgetrennt und schließlich der Analyt in eine konventionelle MS-Quelle überführt, wo durch Beschuß mit Elektronen (*electron impact ionization*, EI) oder auf chemischem Wege (*chemical ionization*, CI) Ionen erzeugt werden, die dann massenspektrometrisch vermessen werden können [2].

Die Anwendung ist infolge des Verdampfungsprinzips limitiert. Hinzu kommt, daß labile

Analyten unter den drastischen Bedingungen der *electron impact*-Ionisierung fragmentiert werden, so daß Rückschlüsse auf das ursprüngliche Molekülion in vielen Fällen nicht mehr eindeutig zu ziehen sind.

Als Durchbruch kann hier die Entwicklung der Elektrospray-Ionisierung (ESI) gelten. Für Substanzen, die charakterisiert sind durch hohe Polarität und gleichzeitige thermische Labilität, steht nur der analytische Zugang über die HPLC offen. Durch Überführung des Eluats in ein Elektrospray-Interface wird einerseits der Analyt vom flüssigen Träger getrennt; andererseits sind die Ionisierungsbedingungen so schonend, daß die Molekülionen im allgemeinen problemlos ins Massenspektrometer überführt werden können [3, 4].

Für die LC/MS-Kopplung bieten sich zahlreiche Anwendungsfelder an, wie z.B. das *drug monitoring*, d.h. die therapiebegleitende Blutspiegelüberwachung [5] oder pharmakokinetische Studien [6].

Ziel der vorliegenden Arbeit sind die Entwicklung eines routinetauglichen, weitgehend automatisierten Bestimmungsverfahrens für Makrolid-Immunsuppressiva sowie die strukturelle Identifikation von Metaboliten. Eingesetzt wurden drei wichtige Vertreter der Substanzklasse – Tacrolimus (FK-506), Sirolimus (Rapamycin) und SDZ RAD (40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin) –, die in der Transplantationschirurgie verwendet werden und deren analytische Erfassung hohen Ansprüchen hinsichtlich Empfindlichkeit und Präzision gerecht werden muß, um eine exakte und individuelle Dosisanpassung zu ermöglichen und damit den Therapieerfolg zu sichern. Ausgedehnt werden sollte das Bestimmungsverfahren auf das Immunsuppressivum Ciclosporin, ein zyklisches Peptid, das sich in Kombination mit Sirolimus und SDZ RAD ebenfalls in der klinischen Erprobung befindet.

Die Elektrospray-Technik stellt eine geeignete Methodik als Basis für ein nachweisstarkes, selektives und robustes Bestimmungsverfahren dar. Auch für die Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten des neuentwickelten Immunsuppressivums SDZ RAD ist die Elektrospray-Massenspektrometrie die geeignete Meßtechnik. SDZ RAD befindet sich derzeit im Stadium der klinischen Erprobung, wobei über seine Metabolisierung bisher keine publizierten Daten vorliegen. Da Metabolite möglicherweise pharmakologisch und/oder toxiologisch wirksam sein können, ist die Aufklärung des Metabolismus ein notwendiger Beitrag zur Entwicklung erfolgreicher therapeutischer Strategien.

Zum Erreichen der beiden Ziele

- Entwicklung eines routinetauglichen Bestimmungsverfahrens für Makrolid-Immunsuppressiva und
- strukturelle Identifikation von Stoffwechselprodukten von SDZ RAD

mußten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Validierung methodisch wichtiger Variablen und apparativer Eigenschaften der ESI-Technik
- Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens
- Ermittlung der Eigenschaften und des Detektionsverhaltens der Analyten
- Validierung des Bestimmungsverfahrens
- Aufklärung der Verstoffwechslung von SDZ RAD und Identifikation von Metaboliten.

2 Methodenentwicklung

Im folgenden werden die experimentellen Parameter des routinetauglichen Bestimmungsverfahrens für Makrolid-Immunsuppressiva einschließlich seiner Validierung sowie der strukturellen Identifikation von Stoffwechselprodukten von SDZ RAD dargestellt. Im Anschluß daran werden die notwendigen Untersuchungen zu den methodisch wichtigen Variablen und apparativen Eigenschaften der ESI-Technik, der Ausarbeitung des Extraktionsverfahrens und der Eigenschaften und des Detektionsverhaltens der Analyten beschrieben.

Da es sich bei der Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) um eine vergleichsweise neue Technik handelt, werden zum besseren Verständnis der dargelegten experimentellen und methodischen Schritte auch die Grundlagen der Meßtechnik erläutert. Außerdem wird ein kurzer Überblick über Eigenschaften und klinische Bedeutung der wichtigsten Makrolid-Immunsuppressiva gegeben.

2.1 Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva

Zur quantitativen Messung von Makrolid-Immunsuppressiva wurde ein weitgehend automatisiertes, routinetaugliches Verfahren entwickelt. Es vereint einen Festphasenextraktions- und Probenvorbereitungsschritt, die flüssigkeitschromatographische Trennung der Analyten, die Detektion mit Elektrospray-Massenspektrometrie sowie die automatische Datenauswertung. Alle analytisch-instrumentellen Schritte innerhalb des Verfahrens wurden dabei *online* gekoppelt.

Im folgenden wird das erarbeitete Verfahren exemplarisch für die Simultanbestimmung von SDZ RAD und Ciclosporin beschrieben. Es ist jedoch ebenso auf die Bestimmung von Tacrolimus oder Sirolimus in Kombination mit Ciclosporin anwendbar. Im Ergebnisteil (Abschnitt 3.1) werden die Verfahrenskenndaten auch für diese Varianten angegeben.

2.1.1 Probenvorbereitung und flüssigkeitschromatographische Trennung

In 1 mL Blutprobe wurden durch Zusatz von 1 mL Methanol/0,4 mol/L Zinksulfat-Lösung (80/20, v/v) die Proteine gefällt. Nach 10 s maschinellm Schütteln (Vortex-Mixer) wurden die Proben 5 min bei 4900 upm zentrifugiert und der Überstand in ein 1,8 mL Autosampler-Vial überführt. Aliquote von 400 µL wurden direkt in das HPLC-System injiziert und auf der Vorsäulenkartusche extrahiert.

Die *online*-Probenvorbereitung und anschließende chromatographische Trennung wurden mit einem Flüssigchromatographen HP 1090 Series II durchgeführt, dessen Autoinjektor modifiziert wurde. Außerdem wurde zusätzlich ein Sechs-Wege-Hochdruck-Schaltventil mit einem pneumatischen Zwei-Positionen-Antrieb verwendet, welches über die HP ChemStation Software (s.u.) und einen externen Schaltkontakt der HPLC-Anlage angesteuert wurde. Die Probenanreicherung erfolgte über eine zusätzliche HPLC-Pumpe auf einer konventionellen (10 x 2) mm Vorsäulenkartusche, gepackt mit Nucleosil 100 C-18, Partikelgröße 10 µm. Durch die Verwendung zweier Quetschventile, ebenfalls über die Software angesteuert, konnte die Extraktionskartusche wahlweise mit Wasser (Beladen der Kartusche, Waschen) oder Methanol (Rekonditionierung) als Laufmittel versorgt werden.

Um die Injektion großer Volumina zu ermöglichen, wurden eine Spritze mit 500 µL Nennvolumen und eine 500 µL Probenschleife in den Autosampler eingebaut. Außerdem wurde für die Verbindung zwischen Spritze und Injektionsventil eine Kapillare mit 0,26 mm Innendurchmesser verwendet, um Probleme beim Ansaugen größerer Probenvolumina zu verhindern. Die für die *online*-Festphasenextraktion verwendete Kartusche wurde mit Kapillarverbindungen zwischen Anschluß eins und vier des zusätzlichen Schaltventils montiert.

Das Verfahren bestand, wie in Abbildung 1 dargestellt, aus drei aufeinanderfolgenden Schritten: 1.) in Position A des Schaltventils wurde die Probe ins HPLC-System injiziert und auf die Extraktionskartusche transportiert. Für einen Zeitraum von 4 min wurde hierzu von der zusätzlichen HPLC-Pumpe ein Fluß von 0,35 mL/min Wasser erzeugt. 2.) nach pneumatischer Schaltung in Position B konnte ein vom Laufmittelfördersystem der HP 1090 erzeugter Fluß von 0,2 mL/min (Methanol/Wasser 90/10, v/v) die auf der Vor-

säule angereicherten Komponenten im *backflush*-Modus auf die analytische Säule überführen. Die Trennung der Analyten wurde mit einer (250 x 2) mm Hypersil ODS Säule (Partikelgröße 5 µm) mit (10 x 2) mm Vorsäule (gleiches Füllmaterial) unter isokratischen Bedingungen erreicht. Die Säulentemperatur betrug 35 °C. Nach weiteren 4 min wurde 3.) in Position A zurückgeschaltet und während der chromatographischen Trennung der Komponenten gleichzeitig die Extraktionskartusche für jeweils 3 min mit Methanol und Wasser rekonditioniert. Die Lösemittelförderung erfolgte hierbei durch die zusätzliche HPLC-Pumpe mit einer Flußrate von 0,35 mL/min.

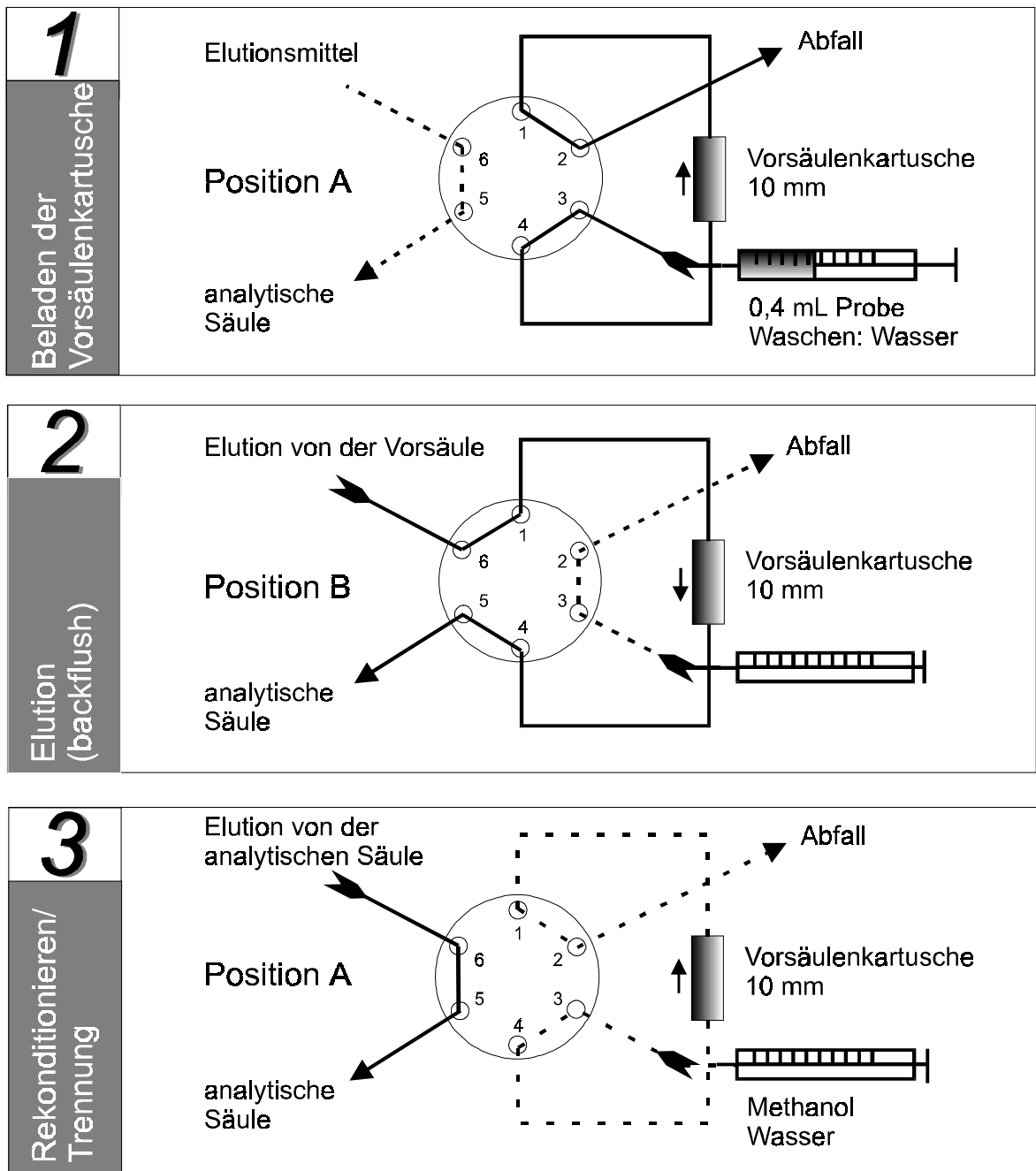


Abbildung 1: Schritte der online-Festphasenextraktion: 1.) Beladen der Vorsäulenkartusche durch Injektion der Probe und Waschen mit Wasser; 2.) Elution im backflush-Modus; 3.) Rekonditionieren der Vorsäule mit Methanol und Wasser, gleichzeitige chromatographische Trennung auf der analytischen Säule.

2.1.2 Massenspektrometrische Bedingungen

Die massenspektrometrischen Messungen wurden mit einem HP 5989 B MS-Engine Massenspektrometer mit API-Elektrospray Interface HP 59987 A durchgeführt.

Nach der wie oben beschriebenen Trennung der Analyten wurden die Substanzen mit pneumatischer Unterstützung durch Stickstoff (560 kPa) in das Elektrospray-Interface injiziert. Als Heizgas wurde Stickstoff mit einer Flußrate von 10 L/min bei einer Temperatur von 350 °C verwendet. Alle massenspektrometrischen Messungen wurden im positiv-Modus durchgeführt, die Nadelspannung lag bei - 4000 V, die Endplatte wurde auf ein Potential von - 3500 V und die Zylinderelektrode auf - 6000 V gesetzt. Die Komponenten wurden im *selected ion monitoring* (SIM) Modus detektiert. Der Massenanalysator wurde auf die Natriumaddukte $[M+Na]^+$ von SDZ RAD (m/z 980,6) und Ciclosporin (m/z 1223,8) mit einer Verweilzeit von 0,5 s je Masse eingestellt. Die Kapillarausgangsspannung wurde entsprechend Abschnitt 2.3.3 substanzabhängig optimiert, so daß für jede Komponente maximale Signalintensität erzielt wurde. Bei m/z 980,6 (SDZ RAD) lag diese Spannung bei 280 V, für m/z 1223,8 (Ciclosporin) ergaben sich 300 V. Der Sekundärelektronenvervielfacher wurde mit 1900 V betrieben.

Die Datenaufnahme sowie die Gerätesteuerung der HPLC- und MS-Geräte erfolgte über die HP LC/MS ChemStation bestehend aus der HP G1034C MS ChemStation und der G1047A LC/MS Software, die auf einem IBM-kompatiblen PC mit HP-IB Interface ausgeführt wurden. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des ChemStation Integrators der HP G1034C MS ChemStation.

2.1.3 Kalibrierung und Validierung

Das zur Kalibrierung des analytischen Systems verwendete gepoolte Blut stammte von gesunden, freiwilligen Spendern und wurde mit in Acetonitril gelöstem SDZ RAD und Ciclosporin versetzt. Die Kalibrierung erfolgte mit überlappenden Reihen von je zehn Konzentrationen: 0; 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9; 1,05; 1,2; 1,35; 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5; 9; 10,5; 12; 13,5; 15; 18; 21; 24; 27 und 30 µg/L für SDZ RAD und 0; 1,5; 3; ...; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 100; 105; 120; 135; 150; 180; 200; 210; 240; 270; 300; 400; 500; ...; 1000 µg/L für Ciclosporin. Für jeden Kalibrierpunkt wurden drei Proben von je 1 mL Blut angesetzt,

deproteiniert und für die Injektion vorbereitet. Alle Proben wurden doppelt vermessen.

Zur Validierung des Verfahrens wurden die intra-individuelle und die Tag-zu-Tag-Variabilität sowie die Wiederfindung von SDZ RAD und Ciclosporin aus Blut untersucht. Die intra-individuelle Variabilität wurde durch Vermessen von SDZ RAD- und Ciclosporin-haltigen Proben von gepooltem Blut ermittelt. Je sechs Proben von 1 mL Blut wurden mit einer kleinen (10 µg/L Ciclosporin, 1 µg/L SDZ RAD), einer mittleren (60 µg/L Ciclosporin, 6 µg/L SDZ RAD) und einer hohen (300 µg/L Ciclosporin, 30 µg/L SDZ RAD) Analytkonzentration versetzt und unmittelbar nacheinander vermessen. Zur Ermittlung der Tag-zu-Tag-Variabilität wurden sechs Proben von je 1 mL Blut mit kleinen, mittleren und hohen Konzentrationen (siehe oben) hergestellt und an sechs aufeinanderfolgenden Tagen vermessen. Die Wiederfindung bei kleinen, mittleren und hohen Konzentrationen (siehe oben) wurde aus jeweils sechs einzelnen Blutproben im Vergleich zu Proben, die mit physiologischer Kochsalzlösung statt Blut angesetzt waren, bestimmt. Die Proben wurden hintereinander vermessen. Die Variation der Retentionszeiten wurde in 24 Proben bestimmt, die während einer Kalibriersequenz vermessen wurden.

2.2 Strukturaufklärung von SDZ RAD-Metaboliten

Nach Metabolisierung von SDZ RAD durch menschliche Lebermikrosomen wurden Untersuchungen zur Strukturaufklärung der entstandenen Metabolite durchgeführt.

Da SDZ RAD unter den Bedingungen der *electron impact*-Ionisierung einer starken Fragmentierung unterliegt, aus der sich nur noch unzureichende strukturelle Informationen ableiten lassen (Vidal, C.; Scheeder, G.: unveröffentlichte Daten, Hannover (1997)), erfordert die Strukturaufklärung die Massenspektrometrie auf der Grundlage der schonenden Elektrospray-Ionisierung. Im Unterschied zu dem für die Routineanalytik beschriebenen Verfahren, bei der die Elektrospray-Ionisierung fast ausschließlich zum Quasi-Molekularion führte, wurde für die Strukturaufklärung die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID, *collision induced dissociation*) eingesetzt (vgl. hierzu Abschnitt 2.3.1.2). Auf diese Weise konnte Strukturinformation über entstandene Stoffwechselprodukte gewonnen werden.

2.2.1 in vitro-Verstoffwechslung von SDZ RAD

650 μL eines auf pH 7,4 eingestellten Phosphatpuffers und 300 μL Lösung eines NADPH generierenden Systems (siehe Abschnitt 7.3) wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 50 μL einer Suspension menschlicher Lebermikrosomen (3 g/L Protein) hinzugefügt und die Lösung mit 10 μL einer in Acetonitril angesetzten SDZ RAD-Lösung der Konzentration 10 mg/mL versetzt. Das Gemisch wurde 10 s manuell geschüttelt und 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Reaktion mit 500 μL Acetonitril abgestoppt und das Gemisch 5 min bei 8500 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine C-18 Festphasenextraktions-Kartusche überführt, die vorher mit 2 mL Wasser konditioniert worden war. Nach der Elution mit 1,6 mL Acetonitril wurden die Eluate von zehn Inkubationsansätzen vereinigt und im Stickstoffstrom auf ein Volumen von 0,3 mL eingeengt. Für die anschließende LC/MS-Messung wurde die Probe in ein Autosampler-Vial mit 350 μL Einsatz überführt.

Neben der oben beschriebenen Probe wurden außerdem eine Standardlösung von SDZ RAD in Acetonitril, eine Kontrollprobe (SDZ RAD in Inkubationspuffer ohne Zusatz von Mikrosomen) und eine Leerprobe (Inkubationspuffer mit Mikrosomen ohne Zusatz von SDZ RAD) angesetzt, gleichartig aufgearbeitet und ebenfalls massenspektrometrisch vermessen.

2.2.2 Instrumentierung

Für die chromatographische Trennung der Komponenten wurde ein HP Series 1100 Flüssigchromatograph verwendet, der mit einem Vakuum-Entgaser G 1322 A, einer binären Pumpe G 1312 A, einem automatischen Probengeber G 1313 A und einem Säulenofen G 1316 A ausgestattet war. Das HPLC-System wurde gesteuert über die HP ChemStation for LC Software (Rev. A.04.01) auf einem IBM-kompatiblen PC mit HP-IB Interface.

Die HPLC-Anlage wurde an ein Finnigan MAT 95 S Massenspektrometer mit API Elektrospray-Interface gekoppelt. Eine Spritzenpumpe Harvard Apparatus 22 und eine Hamilton 2,5 mL-Spritze wurden für die Bereitstellung eines sog. *sheath flow*, einem unterstützenden Flüssigkeitsstrom, der mit der Probe versprüht wird, verwendet. Gerätesteuerung und Datenaufnahme erfolgten mit der ICIS Software (Rev. 10.2) auf einer UNIX-Workstation.

2.2.3 Massenspektrometrische Bedingungen

Nach der chromatographischen Trennung der Analyten wurden die Komponenten mit pneumatischer Unterstützung durch einen Stickstoffstrom (540 kPa) in das Elektrospray-Interface überführt. Die Kapillare des API-Interface wurde auf 300 °C geheizt, die Nadelspannung betrug 3,5 kV. Ein *sheath flow* von 15 µL/min (Acetonitril/5 mmol/L Ammoniumacetat-Lösung 90/10, v/v) wurde über die Spritzenpumpe zugeführt. Alle massenspektrometrischen Messungen wurden im positiv-Ionen-Modus ausgeführt. Der Massenanalysator detektierte während der Messungen m/z-Verhältnisse zwischen 300 und 1100 mit einer Abtastrate von 20 s/Dekade, die Massenauflösung lag bei R=1500.

2.2.4 LC/MS-Messungen

Die chromatographische Trennung erfolgte bei einem Fluß von 0,2 mL/min auf einer (100 x 2,1) mm Hypersil ODS-Säule (Partikelgröße 3 µm) und einer (20 x 2,1) mm Vorsäule mit gleichem Füllmaterial. Komponente A der mobilen Phase war Wasser und Komponente B Methanol. Der folgende Gradient wurde verwendet: 0 min, 60% (v/v) B; 25-42 min, 70% (v/v) B; 50-70 min, 80% (v/v) B. Das Injektionsvolumen betrug 40 µL, die Säulentemperatur 30 °C. Nach jedem chromatographischen Lauf wurde die analytische Säule 5 min bei einem Fluß von 0,2 mL/min Methanol rekonditioniert und anschließend 20 min mit Methanol/Wasser (60/40, v/v) re-äquilibriert.

Jede Probe wurde in zwei LC/MS-Läufen vermessen, einmal ohne kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) im Skimmerbereich des API-Interface, einmal unter Verwendung einer CID-Spannung, die so gewählt wurde, daß für die Muttersubstanz SDZ RAD noch die Hälfte der Intensität erhalten wurde.

2.3 **Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik**

Die im folgenden beschriebenen massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit dem Hewlett-Packard-ESI-Massenspektrometer durchgeführt. Die Analyten wurden mit pneumatischer Unterstützung durch Stickstoff in das Elektrospray-Interface injiziert. Als Heizgas wurde ebenfalls Stickstoff verwendet. Alle massenspektrometrischen Messungen

wurden im positiv-Ionen-Modus durchgeführt. Die Komponenten wurden, sofern nicht anders angegeben, im *selected ion monitoring* (SIM) Modus detektiert: Der Massenanalysator wurde auf die Natriumaddukte $[M+Na]^+$ der Analyten mit einer Verweilzeit von 0,5 s je Masse eingestellt. Die Kapillarausgangsspannung wurde massenabhängig optimiert, so daß für jede Komponente die maximale Signalintensität erzielt wurde. Der Sekundärelektronenvervielfacher wurde mit 1900 V betrieben.

2.3.1 Grundlagen der Elektrospray-Massenspektrometrie

2.3.1.1 Ionisierungsprozeß

Der genaue Mechanismus des Ionisierungsprozesses in der Elektrospray-Massenspektrometrie ist noch nicht vollständig aufgeklärt [1, 7].

Der Ionisierungsprozeß läuft unter Atmosphärendruck ab und gliedert sich im wesentlichen in drei Phasen [1]: Zunächst wird die zu analysierende Lösung in einem starken elektrostatischen Feld, das durch Erzeugen einer Potentialdifferenz von 2-6 kV zwischen der Einlaßkapillare und einer Gegenelektrode erzeugt wird, versprüht. Dabei bildet sich ein Aerosol aus. Im folgenden Stadium findet die Desolvatisierung der gebildeten Tropfen statt, was zur sukzessiven Verringerung der Tropfengröße führt. Die Verdampfung des Lösungsmittels wird durch thermische Einwirkung, z.B. durch Zuführung heißen Inertgases, erreicht. Unterstützt wird der Prozeß durch ein Zusammenwirken mit den elektrostatischen Kräften: durch die Verringerung der Tropfengröße steigt die Ladungsdichte in den Tropfen an. Es kommt zu sogenannten Coulomb-Explosionen, d.h. die Tropfen zerplatzen und bilden immer feinere Tröpfchen. Aus diesen verdampfen wiederum Lösungsmittelmoleküle, bis schließlich – im Idealfall – freie Analytionen vorliegen, die aus der unter Atmosphärendruck stehenden Spraykammer ins eigentliche Massenspektrometer gelangen.

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisierung ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Umstritten ist im wesentlichen der letzte Schritt des Ionisierungsprozesses, der zur Bildung freier Ionen führt. Hier werden zwei konkurrierende Modellvorstellungen diskutiert: a) die feldinduzierte Ionenverdampfung, d.h. direkte Emission freier Ionen aus sehr kleinen Tröpfchen, und b) das *charged residue*-Modell, das davon ausgeht, daß die Tropfen so weit desolvatisiert werden, bis der Analyt nur noch von wenigen Lösemittelmolekülen

umgeben ist, die dann erst auf der Seite des MS-Analysators entfernt werden [1].

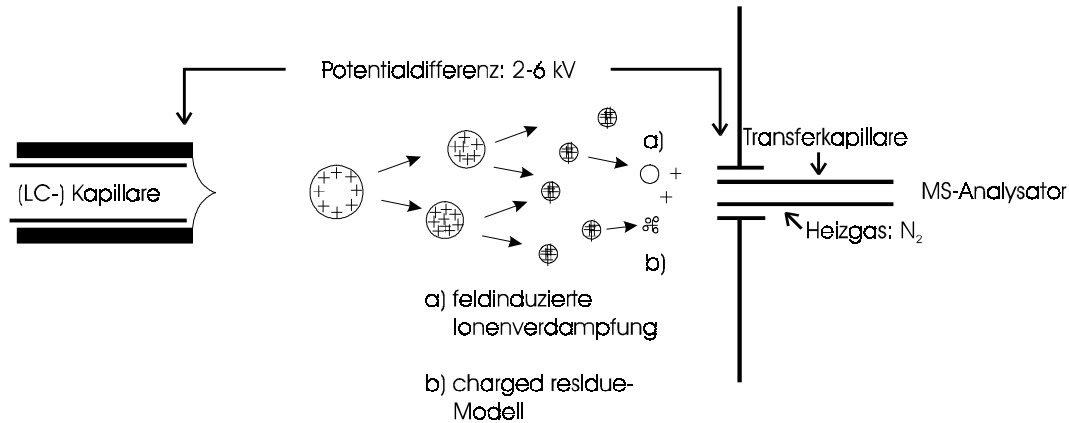


Abbildung 2: Prinzip der Elektrospray-Ionisierung nach LEHMANN [3]. Schematisch dargestellt sind die beiden Modellvorstellungen zum letzten Schritt des Ionisierungsprozesses: a) die feldinduzierte Ionenverdampfung, b) das charged residue-Modell.

2.3.1.2 Interfacetechnik und LC/MS-Kopplung

Inzwischen sind zwei Gruppen von Interface-Typen auf dem Markt, die sich vor allem in der Technik der thermischen Desolvatisierung unterscheiden (siehe Abbildung 3). Die ESI-Quelle der Fa. Hewlett-Packard (Waldbronn) arbeitet mit heißem Stickstoff als Trocknungs- bzw. Heizgas, das dem Spray entgegen geblasen wird, während Finnigan MAT (Bremen) den Ort der Desolvatisierung des Analyten in eine beheizbare Transferkapillare verlegt.

Die ESI-Technik erlaubt eine relativ problemlose Kopplung mit flüssigkeitschromatographischen Systemen aufgrund der Toleranz für hohe Flußraten von bis zu 2 mL/min [8]. Dabei wird das Versprühen des Eluenten pneumatisch durch ein sogenanntes Vernebelungsgas unterstützt. Hierzu wird Stickstoff unter hohem Druck aus einer Kapillare ausgeblasen, die die Einlaßkapillare konzentrisch umschließt.

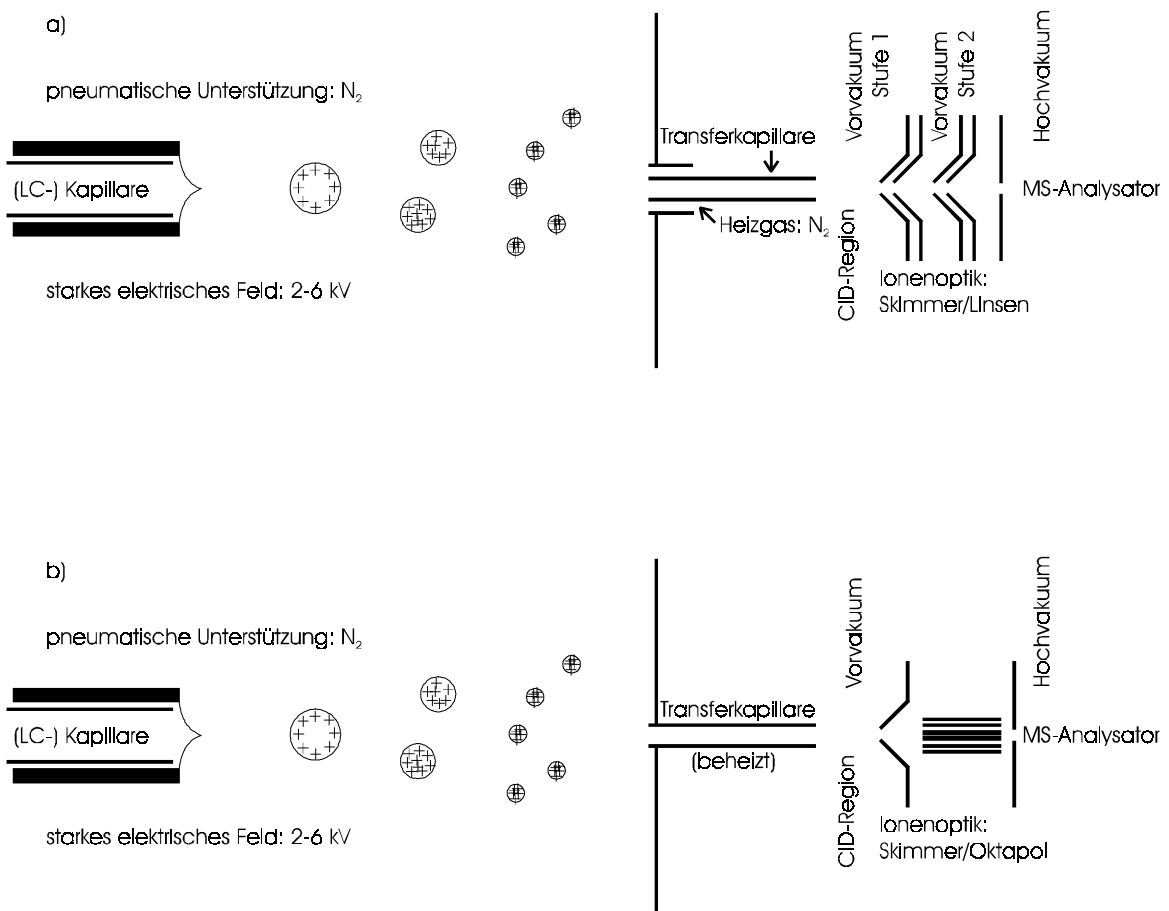


Abbildung 3: Zwei Typen von ESI-Quellen: a) Hewlett-Packard, b) Finnigan MAT

Unter Standardbedingungen führt die Elektrospray-Technik aufgrund der äußerst schonenden Ionisierung zum (Quasi-)Molekülion. Meist sind dies Addukte mit bereits in der Probenlösung vorhandenen Ionen (z.B. Protonen, Alkali-, oder Ammonium-Ionen). Es besteht jedoch die Möglichkeit, die ins Massenspektrometer überführten Ionen zur Fragmentierung anzuregen und so strukturelle Information zu gewinnen. Dies geschieht zwischen dem Ende der Transferkapillaren und dem ersten Skimmer in der sogenannten CID- (*collision induced dissociation*) Region (siehe Abbildung 3).

2.3.1.3 Anwendungsfelder

Die ersten Untersuchungen zur Elektrospray-Technik [9, 10] befaßten sich grundlegend mit an Polymeren auftretenden Effekten. Erst in jüngster Zeit fand die Technik in etablierte analytische Verfahren Eingang [11, 12]. Die Gerätetechnik wurde verbessert, so daß heute verschiedene Elektrospray-Massenspektrometer verfügbar sind. Die größte Bedeu-

tung haben Anwendungen im Bereich der Biochemie erlangt wie z.B. Peptidsequenzierungen sowie Untersuchungen nicht-kovalenter Wechselwirkungen (z.B. Rezeptor-Ligand-Interaktionen) [2, 3].

2.3.2 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface

Temperatur und Flußrate des Heizgasstroms sowie der Druck des Vernebelungsgases lassen sich am API-Elektrospray Interface HP 59987 A variabel einstellen. In mehreren Versuchsreihen wurde die Abhängigkeit der Signalintensität von diesen Parametern untersucht, um die für das Routineverfahren optimalen Einstellungen zu ermitteln. Hierzu wurden Proben mit 15 µg/L SDZ RAD in Acetonitril hergestellt. Per Fließinjektion wurden unter den jeweils eingestellten Bedingungen nacheinander je dreimal 10 µL der Lösung ins Elektrospray-Interface injiziert. Dabei wurden zwei Laufmittelsysteme untersucht: Im Hinblick auf das zu entwickelnde Routineverfahren wurde ein Fluß von 0,2 mL/min eines Methanol/Wasser-Gemischs (90/10, v/v) verwendet. Zur Untersuchung der Bedingungen der direkten Injektion einer Lösung mittels Spritzenpumpe, wie sie beispielsweise während des Tuning des Massenspektrometers eingesetzt wird, wurde als zweites System ein Fluß von 25 µL/min Acetonitril ausgewählt. Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 980,6; $[M+Na]^+$). Ausgewertet wurden die Signalhöhen bzw. die durch manuelle Integration erhaltenen Peakflächen.

Heizgastemperatur

In einer Versuchsreihe wurde der Einfluß der Heizgastemperatur von 50°C bis 350°C auf die Signalintensität untersucht. Zwischen den Injektionen wurde jeweils 2 min gewartet, um Temperaturkonstanz zu gewährleisten. Für das Laufmittelsystem mit hoher Flußrate wurden 10 L/min Stickstoff als Heizgas eingesetzt, die Substanzen wurden mit pneumatischer Unterstützung durch Stickstoff ($P=560$ kPa) in das Elektrospray-Interface injiziert. Bei der Anwendung kleiner LC-Flußraten wurden ein Heizgasfluß von 2,5 L/min und ein Vernebelungsgasdruck von 280 kPa eingestellt.

Flußrate des Heizgases

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der Signalintensität vom Heizgasfluß untersucht. Es wurden jeweils drei Injektionen bei 2,5; 5; 7,5 und 10 L/min für die beiden Laufmittelsysteme durchgeführt. Nach Änderung des Heizgasflusses wurde jeweils 2 min gewartet, um die Äquilibration des Systems zu gewährleisten. Die Temperatur des Heizgases Stickstoff betrug für alle Experimente 350 °C. Der Druck des Vernebelungsgases lag bei 280 kPa (kleine LC-Flußrate) bzw. 560 kPa (große LC-Flußrate).

Druck des Vernebelungsgases

Auch der Einfluß des Drucks des Vernebelungsgases auf die Signalintensität wurde für beide Laufmittelsysteme untersucht. Hierzu wurden je drei Injektionen bei einem Druck des Vernebelungsgases von 70, 140, ..., 560 kPa durchgeführt. Die Temperatur des Heizgases Stickstoff betrug 350 °C für alle Experimente. Der Heizgasfluß wurde auf 2,5 L/min (kleine LC-Flußrate) bzw. 10 L/min (große LC-Flußrate) eingestellt.

2.3.3 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion untersucht. Hierzu wurden Tacrolimus, Sirolimus und SDZ RAD jeweils separat in Acetonitril gelöst ($c=0,1$ mg/mL). Die Injektion erfolgte kontinuierlich mit der Spritzenpumpe bei einem Fluß von 25 μ L/min. Der Heizgasfluß betrug 2,5 L/min bei einer Temperatur von 350 °C, der Druck des Vernebelungsgases wurde auf 280 kPa eingestellt. Nacheinander wurden Massenspektren (Scanbereich m/z 250-1000) bei Applikation von 0, 25, 50, ..., 400 V Kapillarausgangsspannung aufgenommen. Ausgewertet wurden die Signalthöhen des jeweiligen (Quasi-)Molekularions $[M+Na]^+$ (Tacrolimus: m/z 826,5; Sirolimus: m/z 936,6; SDZ RAD: m/z 980,6) und des jeweils in größter Menge gebildeten Fragmentions. Im Bereich maximaler Signalintensität wurde zusätzlich in 5 V-Schritten eine exaktere Ermittlung der optimalen Kapillarausgangsspannung durchgeführt.

2.3.4 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion

Da die Detektorcharakteristik für die Beurteilung einer analytischen Methode wichtig ist, wurde in einer Versuchsreihe die Abhängigkeit der Signalintensität von Flußrate und Konzentration untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der Flußrate wurde für SDZ RAD ($c=10 \mu\text{g/L}$ in Acetonitril) die Flußrate des Trägerstroms zur Überführung der Probe ins ESI-Interface nach jeweils drei Injektionen variiert. Gemessen wurde mit Flußraten von 10, 20, ..., 100, 200, ..., 1000 $\mu\text{L/min}$.

Zur Prüfung der Konzentrationsabhängigkeit des Detektorsignals wurde ausgehend von einer Lösung von SDZ RAD (10 mg/mL in Acetonitril) schrittweise eine Verdünnungsreihe mit Acetonitril von $1, 10^{-1}, 10^{-2}, \dots, 10^{-8}$ mg/mL hergestellt.

Per Fließinjektion wurden nacheinander je dreimal 10 μL der Proben injiziert und mit einem Trägerfluß von Methanol/Wasser (90/10, v/v) ins Elektrospray-Interface überführt. Der Heizgasfluß betrug 10 L/min bei einer Temperatur von 350 °C, der Druck des Vernebelungsgases wurde auf 560 kPa einreguliert. Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 980,6; $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Ausgewertet wurden die durch manuelle Integration erhaltenen Peakflächen sowie die jeweiligen Signalhöhen.

2.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens

Bei der Ausarbeitung des Extraktionsverfahrens wurden die Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil der Proben sowie die Partikelgröße des Kartuschenmaterials untersucht. Die massenspektrometrischen Messungen wurden dabei mit den unter Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

2.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe

Die für die Bestimmung der Makrolid-Immunsuppressiva derzeit allgemein akzeptierte Matrix ist deproteiniertes Blut (vgl. Abschnitt 4.1). Durch Fällung der Proteine und anschließende Zentrifugation entsteht ein klarer Überstand. Vor der Entwicklung des

Routineverfahrens mußte geklärt werden, welchen Einfluß diese Matrix auf die Signalintensität bei der massenspektrometrischen Detektion hat und welche Reinigungsschritte für die Analytik geeignet sind.

Für die Experimente wurden durch Mischen von deproteiniertem Blutüberstand mit Wasser Lösungen mit 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% Volumenanteil Blutüberstand hergestellt. Die Lösungen wurden auf 40 µg/L SDZ RAD eingestellt. Nacheinander wurden per Fließinjektion bei einem Fluß von 0,2 mL/min eines Methanol/Wasser-Gemischs (90/10, v/v) je zweimal 10 µL jeder Lösung ins Elektrospray-Interface injiziert. Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 980,6; $[M+Na]^+$). Ausgewertet wurden die durch manuelle Integration erhaltenen Peakflächen.

2.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche

Nach der *online*-Probenvorbereitung entsprechend der Darstellung in Abschnitt 2.1.1 wurde zur Ermittlung der optimalen Partikelgröße des Kartuschenmaterials Vorsäulenkartuschen eingesetzt, die mit Nucleosil 100 C-18 mit Partikeln der Größen 10, 20 und 30 µm gefüllt waren.

Es wurden sechs Blutproben mit SDZ RAD ($c=10$ µg/L) und Ciclosporin ($c=100$ µg/L) entsprechend Abschnitt 2.1.1 hergestellt, deproteiniert, mit den verschiedenen Kartuschenmaterialien aufbereitet und massenspektrometrisch vermessen. Mit Kartuschen jeder der drei Partikelgrößen wurden je zwei Proben aufgearbeitet, gepoolt und dann jeweils viermal 400 µL injiziert. Die chromatographische Trennung wurde in Abweichung zur Darstellung in Abschnitt 2.1.1 mit einer (100 x 2) mm Hypersil ODS Säule (Partikelgröße 5 µm) erreicht. Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 980,6; 1223,8; $[M+Na]^+$ von SDZ RAD und Ciclosporin). Ausgewertet wurden die durch manuelle Integration erhaltenen Peakflächen der beiden Komponenten.

2.5 Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten

Für die Entwicklung des routinetauglichen Bestimmungsverfahrens mußte vorab das Detektionsverhalten der Analyten untersucht werden. Insbesondere waren auch die Notwendigkeit einer chromatographischen Trennung und mögliche Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Verfahren zu klären. Die massenspektrometrischen Messungen wurden dabei mit den unter Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

2.5.1 Eigenschaften und klinische Bedeutung der Makrolid-Immunsuppressiva

Als Makrolide werden nach WOODWARD [13] makrozyklische Verbindungen, die eine Lacton-Gruppierung enthalten, bezeichnet. Die hier behandelten Immunsuppressiva sind Vertreter der Polyen-Makrolide, die im Ring zusätzlich konjugierte Doppelbindungen besitzen. Die meisten Verbindungen dieser Substanzklasse besitzen antibiotische Eigenschaften [13].

Ziel einer immunsuppressiven Therapie ist es, nach Transplantationen die vom Immunsystem des Körpers ausgelöste Abstoßung des „fremden“ Organs möglichst selektiv zu unterdrücken. Das zyklische Peptid Ciclosporin ist bereits seit mehreren Jahren als Immunsuppressivum in Gebrauch. Allerdings sind mit der Therapie teils gravierende Nebenwirkungen an den Nieren und am Nervensystem [14, 15, 16, 17] und Erhöhung des Blutdrucks (Hypertonie) [18] verbunden, weshalb die Suche nach neuen Wirkstoffen Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Wirkstoffe aus der Gruppe der Makrolide erlangt [19].

Die derzeit wichtigsten Vertreter der hochpotenten Makrolid-Immunsuppressiva sind Tacrolimus (FK-506, Fujisawa, Osaka/Japan) und Sirolimus (Rapamycin, Wyeth-Ayerst, Princeton/NJ). Auch die Gabe dieser Wirkstoffe ist mit Nebenwirkungen verbunden [20, 21, 22]. Eine Weiterentwicklung, SDZ RAD (40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin, Novartis Pharma Inc., Basel), befindet sich z.Zt. in der Phase der klinischen Erprobung. Dabei soll es in Kombination mit Ciclosporin eingesetzt werden. Dies stellt einen neuen therapeutischen Ansatz dar, von dem transplantierte Patienten profitieren könnten. Sowohl die genannten Makrolide als auch Ciclosporin benötigen ein therapeutisches *drug monitoring*,

d.h. eine periodisch durchgeführte, die Therapie begleitende Überwachung der Blutspiegel.

Abbildung 4 zeigt die Strukturformeln der experimentell eingesetzten Makrolid-Immunsuppressiva. In Tabelle 1 sind die internationale IUPAC-Nomenklatur, die Summenformeln sowie die exakte Masse und das Molekulargewicht der drei Substanzen zusammengestellt.

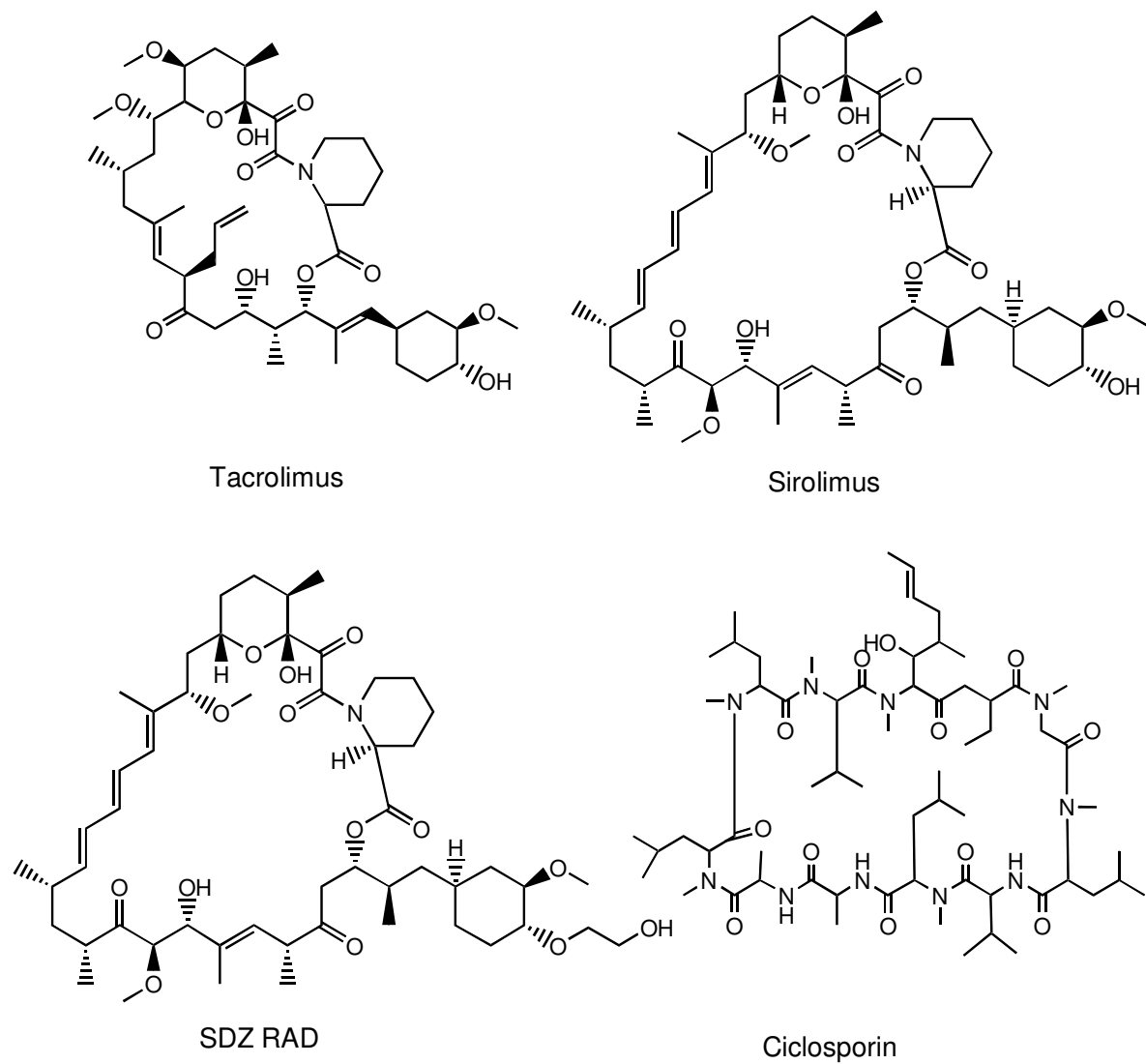


Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten Immunsuppressiva

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Daten zu den eingesetzten Makrolid-Immunsuppressiva

Substanz	IUPAC-Nomenklatur	Summenformel	exakte Masse (amu)	Molekulargewicht
Tacrolimus	1,14-dihydroxy-12-[2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylethene]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxa-4-azatricyclo[26.3.1.0 ^{4,9}]eicosin octo-18-ene-2,3,10,16-tetraone	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂	803,48	804,01
Sirolimus	1,18-dihydroxy-12-[2-[4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-19,30-dimethoxy-15,17,21,23,29,35-hexamethyl-11,36-dioxa-4-azatricyclo[30.3.1.0 ^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraene-2,3,10,14,20-pentaone	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃	913,56	914,17
SDZ RAD	1,18-dihydroxy-12-[2-[4-(2-hydroxyethoxy)-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-19,30-dimethoxy-15,17,21,23,29,35-hexamethyl-11,36-dioxa-4-azatricyclo[30.3.1.0 ^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraene-2,3,10,14,20-pentaone	C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄	957,58	958,22

2.5.2 Stabilität von SDZ RAD

Grundvoraussetzung für die Validität eines analytischen Verfahrens ist die Kenntnis der Stabilität der zu quantifizierenden Analyten. Tacrolimus, Sirolimus und Ciclosporin sind in Blut und unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen stabil [23, 24, 25, 26, 27, 28]. Zu SDZ RAD wurden bisher keine Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Über den Zeitraum einer Woche wurden daher täglich die Konzentrationen von SDZ RAD in Acetonitril, Blut und deproteiniertem Blut bestimmt. Dazu wurden je zwei Proben von SDZ RAD (c=40 µg/L) in den drei genannten Matrices hergestellt und bei 25 °C und 4 °C gelagert. Täglich wurden massenspektrometrisch die Konzentrationen von SDZ RAD bestimmt (SIM-Modus, m/z 980,6 [M+Na]⁺) und über LC/MS-Läufe im Scan-Modus (m/z 100-1000) kontrolliert, ob in den Proben qualitative Veränderungen stattgefunden hatten.

2.5.3 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion von Analyten

Eine der wesentlichen Anforderungen an das zu entwickelnde routinetaugliche Verfahren war ein möglichst hoher Probendurchsatz. Von daher erschien zunächst eine auf dem Prinzip der Fließinjektion beruhende Methodik unter Verzicht auf eine chromatographische Trennung attraktiv, da dies das Vermessen von Proben in Abfolgen von Minuten ermöglicht hätte. Hierzu mußte jedoch zunächst geklärt werden, ob eine zeitgleiche Detektion von Analyten beim Einsatz von ESI-MS eine störungsfreie Quantifizierung erlaubt.

Um dies zu untersuchen, wurden Kalibrierreihen von Sirolimus neben unterschiedlichen Konzentrationen von Ciclosporin vermessen.

Es wurden sieben Probenserien in Acetonitril angesetzt, die jeweils 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 µg/L Sirolimus sowie unterschiedliche Konzentrationen von Ciclosporin (0, 50, 100, ... 300 µg/L) enthielten. Diese Proben wurden jeweils auf zwei Arten vermessen: Per Fließinjektion wurden bei einem Fluß von 0,2 mL/min eines Methanol/Wasser-Gemischs (90/10, v/v) je zweimal 10 µL jeder Lösung in Abständen von ca. 1 min ins Elektrospray-Interface injiziert. Zum anderen wurden die beiden Komponenten chromatographisch getrennt. Injektion und Elution erfolgten unter den bei der Fließinjektion beschriebenen Bedingungen, jedoch in Abständen von 10 min. Die Analyten wurden auf einer (250 x 2) mm Hypersil ODS Säule (Partikelgröße 5 µm), ausgestattet mit einer (10 x 2) mm Vorsäule mit gleichem Füllmaterial bei einer Säulentemperatur von 35 °C getrennt. Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 936,6 und 1223,8; $[M+Na]^+$ von Sirolimus und Ciclosporin). Zur Auswertung wurden die Peakflächen der Komponenten manuell integriert.

2.5.4 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren

Patienten erhalten nach Transplantationen neben Immunsuppressiva weitere Medikamente. Daher war abzuklären, ob es bei der Bestimmung von Immunsuppressiva in Blut mit dem ausgearbeiteten Routineverfahren zu Interferenzen kommt.

Zu prüfen waren Wirkstoffklassen, die nach Transplantationen verwendet werden wie z.B.

Nifedipin, Diltiazem, Paracetamol, Prednisolon, Azathioprin, Omeprazol und Cotrimoxazol. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die eingesetzten Substanzen und die maximal zu erwartenden Konzentrationen c_{max} im Blut.

Tabelle 2: Zur Untersuchung möglicher Interferenzen mit dem Nachweisverfahren eingesetzte Wirkstoffe

Wirkstoff	maximaler Blutspiegel (c_{max})
Azathioprin	2 $\mu\text{g/mL}$ [29]
Diltiazem	200 ng/mL [30]
Nifedipin	70-120 ng/mL [30]
Omeprazol	0,5-1,7 $\mu\text{g/mL}$ [29]
Paracetamol	12 $\mu\text{g/mL}$ [29]
Prednisolon	1 $\mu\text{g/mL}$ [29]
Cotrimoxazol	1 $\mu\text{g/mL}$ Trimethoprim und 50 $\mu\text{g/mL}$ Sulfamethoxazol [29]

Für die Experimente wurden entsprechend Abschnitt 2.1.1 jeweils drei identische Proben 1.) mit SDZ RAD ($c=10 \mu\text{g/L}$) und Ciclosporin ($c=100 \mu\text{g/L}$), 2.) mit Sirolimus ($c=10 \mu\text{g/L}$) und Ciclosporin ($c=100 \mu\text{g/L}$) und 3.) mit Tacrolimus ($c=10 \mu\text{g/L}$) und jeweils einem der zusätzlichen Wirkstoffe mit der in Tabelle 2 angegebenen typischen Konzentration hergestellt. Zu jeder Probenserie wurden drei Referenzproben ohne zusätzliche Wirkstoffe angesetzt. Die deproteinierten Proben wurden massenspektrometrisch vermessen (Doppelbestimmung, je 400 μL). Die Detektion erfolgte im SIM-Modus (m/z 826,5; 936,6; 980,6 und 1223,8; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ von Tacrolimus, Sirolimus, SDZ RAD und Ciclosporin). Ausgewertet wurden die durch manuelle Integration erhaltenen Peakflächen der beiden Komponenten.

3 Ergebnisse

3.1 Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva

Die Wiederfindungsrate betrug im Mittel für SDZ RAD 94% und 90% für Ciclosporin (Tabelle 3). Sowohl von SDZ RAD als auch von Ciclosporin wurden die Natriumaddukt-Ionen $[M+Na]^+$ detektiert. Für beide Substanzen lagen dabei die Signalintensitäten um rund das Zwanzigfache höher als die der protonierten Form $[M+H]^+$. Die optimale Kapil-

Tabelle 3: Wiederfindungsraten von SDZ RAD und Ciclosporin in % \pm SEM nach online-SPE/LC/ESI-MS aus Blut (n=6)

	$\mu\text{g/L}$	% \pm SEM
SDZ RAD	1	84,3 \pm 9,8
	10	96,6 \pm 8,3
	30	102,3 \pm 3,4
Ciclosporin	10	81,7 \pm 2,2
	100	96,6 \pm 4,0
	300	92,2 \pm 3,0

larausgangsspannung im Elektrospray-Interface war für SDZ RAD 280 V (vgl. Abschnitt 2.3.3) und für Ciclosporin 300 V, ohne daß kollisionsinduzierte Fragmentierung zu beobachten war.

Bei Verwendung einer analytischen Säule mit 2 mm Innendurchmesser im Vergleich zu konventionellen 4,6 mm-Säulen konnte mit einer Flußrate von 0,2 mL/min gearbeitet werden, wodurch sich die Signalintensität gegenüber der sonst ver-

wendeten Flußrate von 0,8 mL/min bei merklich gesenktem Lösemittelverbrauch deutlich erhöhte (vgl. Abschnitt 3.3.3). Dabei wurden beide Komponenten vollständig chromatographisch getrennt (Abbildung 5). Die Retentionszeiten t_R betragen 5,02 min für SDZ RAD und 6,39 min für Ciclosporin. Die Retentionszeiten variierten um 0,75% bei SDZ RAD und um 0,96% bei Ciclosporin.

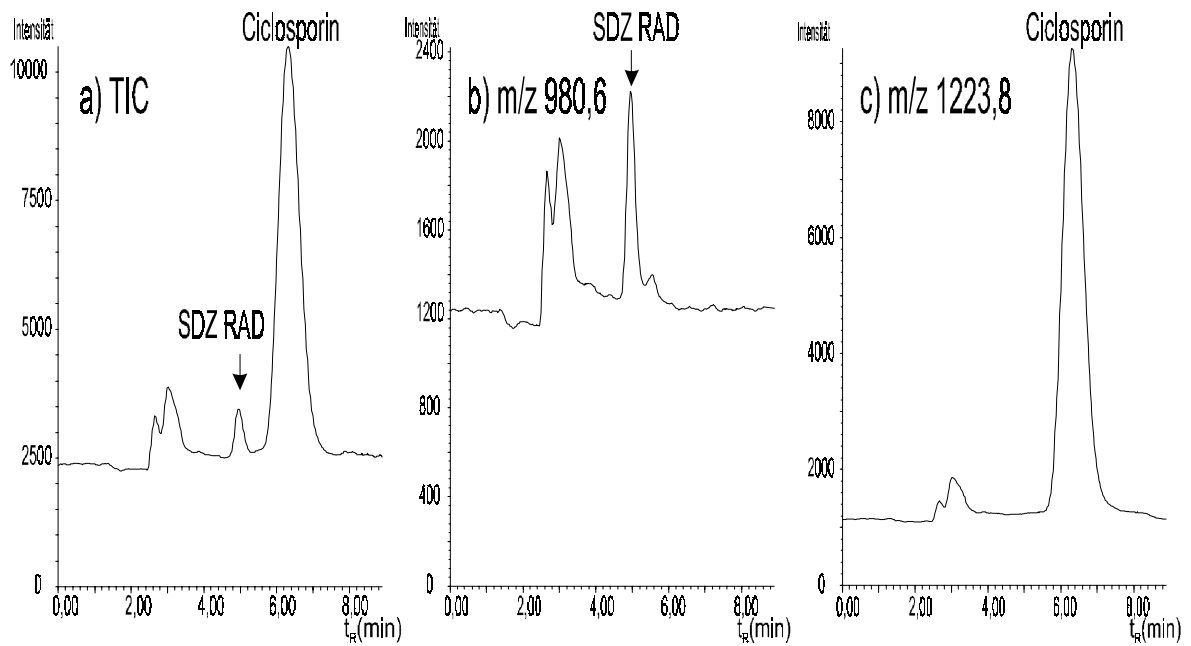


Abbildung 5: HPLC/ESI-MS Chromatogramme der Natriumaddukt-Ionen von SDZ RAD (0,6 $\mu\text{g/L}$) und Ciclosporin (6 $\mu\text{g/L}$): a) Totalionenstrom (TIC); b) Ionenspur m/z 980,6; c) Ionenspur m/z 1223,8.

Im Arbeitsbereich von 0,15 bis 30 $\mu\text{g/L}$ SDZ RAD und 1,5 bis 1000 $\mu\text{g/L}$ Ciclosporin waren die Kalibrierfunktionen linear (Abbildung 6, $r^2=0,9996$ für SDZ RAD, $r^2=0,9992$ für Ciclosporin). Ausgedrückt in willkürlichen Einheiten ergaben sich folgende Regressions-Geradengleichungen: $y=277(\pm 2)x+21(\pm 21)$ für SDZ RAD und $y=578(\pm 2)x+2723(\pm 732)$ für Ciclosporin. Bei der Mehrfachinjektion von Blutproben, die 1, 6 und 30 $\mu\text{g/L}$ SDZ RAD enthielten, ergab sich für die intraindividuelle Variabilität ein Variationskoeffizient von 5,7; 6,1 und 5,6% für die 1, 10 und 30 $\mu\text{g/L}$ SDZ RAD enthaltenden bzw. 5,1; 6,2 und 5,2% für die 10, 100 und 300 $\mu\text{g/L}$ Ciclosporin enthaltenden Proben (Tabelle 5).

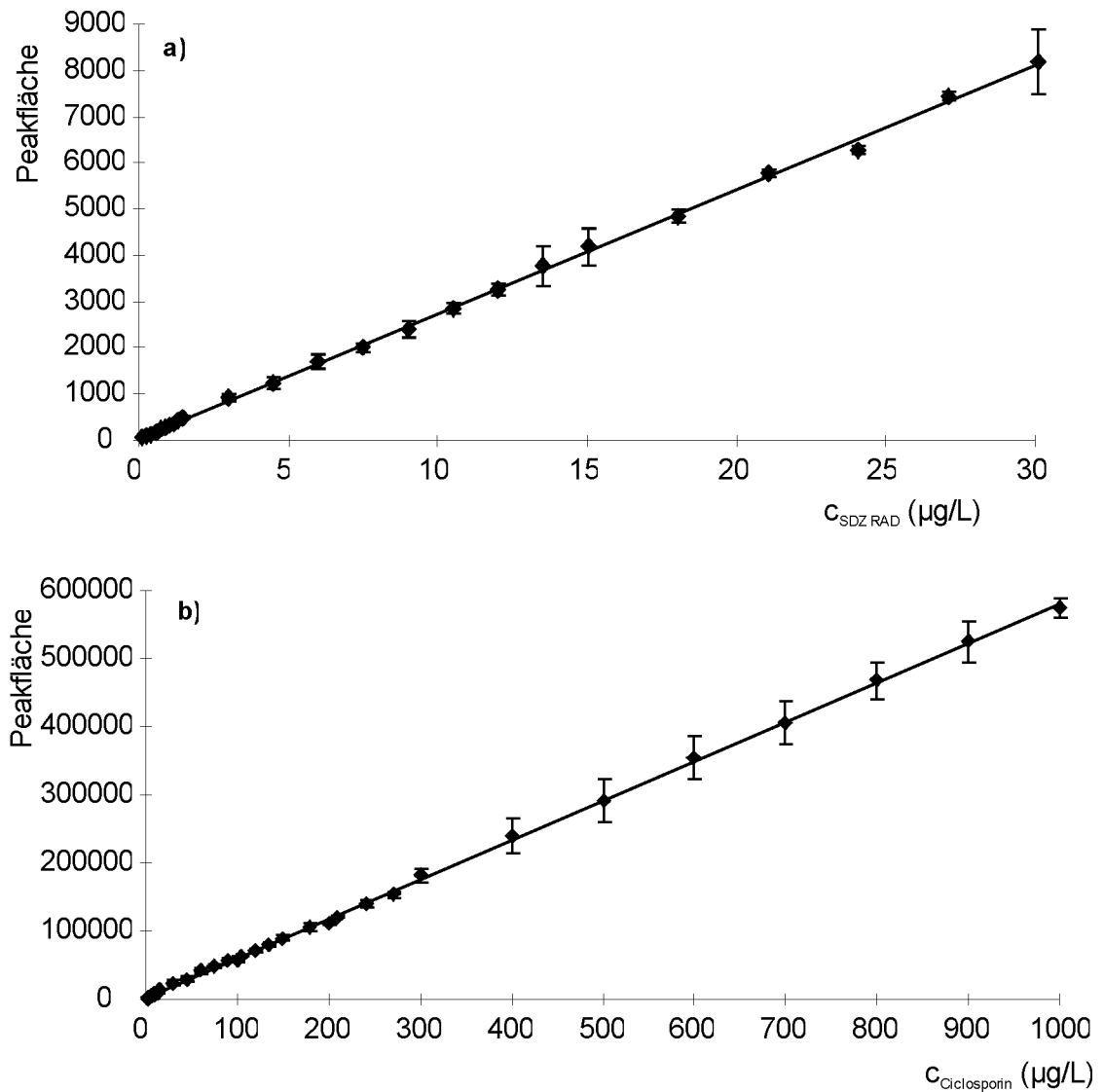


Abbildung 6: Kalibriergeraden für a) SDZ RAD und b) Ciclosporin aus Blut. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm SEM von je drei doppelt vermessenen Proben dar.

Die Tag-zu-Tag-Variabilität betrug für die 1, 10 und 30 µg/L enthaltenden SDZ RAD-Proben 6,9; 6,3 und 4,9%, für die 10, 100 und 300 µg/L enthaltenden Ciclosporin-Proben 6,3; 6,3 und 5,1% (Tabelle 6). Aus den Meßwerten der zehn kleinsten Kalibrierproben wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [31] berechnet. Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 µg/L für SDZ RAD und Ciclosporin, die Bestimmungsgrenze bei jeweils 0,17 µg/L (Tabelle 4).

3 Ergebnisse

Tabelle 4: Verfahrenskennndaten nach DIN 32 645: Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze für SDZ RAD, Tacrolimus, Sirolimus und Ciclosporin

$\alpha = \beta = 0,05$	SDZ RAD	Tacrolimus	Sirolimus	Ciclosporin
Nachweisgrenze	0,05 µg/L	0,04 µg/L	0,05 µg/L	0,05 µg/L
Erfassungsgrenze	0,10 µg/L	0,08 µg/L	0,11 µg/L	0,10 µg/L
Bestimmungsgrenze (33,3% relative Ergebnisunsicherheit)	0,17 µg/L	0,14 µg/L	0,19 µg/L	0,17 µg/L

Tabelle 5: Intraindividuelle Variabilität der Konzentration von SDZ RAD und Ciclosporin in Blutproben nach Mehrfachinjektion (n=6; Mittelwert ± SEM und Variationskoeffizient (VK%) in Klammern)

	µg/L	Mittelwert ± SEM (VK%)
SDZ	1	1,05 ± 0,06 (5,7)
RAD	10	10,17 ± 0,63 (6,2)
	30	29,62 ± 1,66 (5,6)
Cs	10	10,10 ± 0,52 (5,1)
	100	103,78 ± 6,43 (6,2)
	300	303,14 ± 15,76 (5,2)

Tabelle 6: Tag-zu-Tag-Variabilität der Konzentration von SDZ RAD und Ciclosporin in Blutproben an sechs aufeinanderfolgenden Tagen (Mittelwert ± SEM und Variationskoeffizient (VK%) in Klammern)

	µg/L	Mittelwert ± SEM (VK%)
SDZ	1	1,02 ± 0,07 (6,9)
RAD	10	10,28 ± 0,65 (6,3)
	30	29,48 ± 1,44 (4,9)
Cs	10	10,24 ± 0,65 (6,3)
	100	106,07 ± 6,67 (6,3)
	300	302,85 ± 15,41 (5,1)

Mit einer einzigen Extraktionskartusche und analytischen Säule konnten im kontinuierlichen Betrieb mehr als 500 Blutproben ohne Qualitätsverlust bearbeitet werden. Eine Probenanalyse dauerte neun Minuten für die Chromatographie plus vier Minuten für das Beladen der Vorsäulenkartusche plus ein bis zwei Minuten für die Initialisierung des Systems.

Die interne Qualitätskontrolle geschah wie folgt: Das System wurde täglich mit acht Blutproben unterschiedlicher Konzentrationen kalibriert. Nach jeweils 15 Patientenproben wurde eine Leerprobe gemessen, um mögliche *memory*- oder Matrixeffekte erkennen zu können. Desweiteren wurde zur Überprüfung der Kalibrierung nach jeweils zehn Proben eine Blutprobe einer Konzentration von 10 µg/L vermessen.

Das beschriebene Verfahren gilt auch für Tacrolimus und Sirolimus sowie deren Simultanbestimmung mit Ciclosporin. Die wichtigsten Verfahrenskennndaten der entsprechenden

3 Ergebnisse

Validierungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die nach DIN 32 645 berechneten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen enthält Tabelle 4. Exemplarisch sind drei Chromatogramme der Bestimmungen, die mit dem entwickelten Verfahren durchgeführt wurden, in Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 7: Wichtige Verfahrenskennndaten für die Bestimmung von Tacrolimus und Sirolimus

c=10 µg/L, n=6	Tacrolimus	Sirolimus
intraindividuelle Variabilität	VK%=5,5%	VK%=4,5%
Tag-zu-Tag-Variabilität	VK%=6,7%	VK%=4,8%
Wiederfindungsrate	98%	91%
Kalibrierung, linearer Arbeitsbereich	0,1-30 µg/L, R ² =0,9996	0,1-30 µg/L, R ² =0,9991

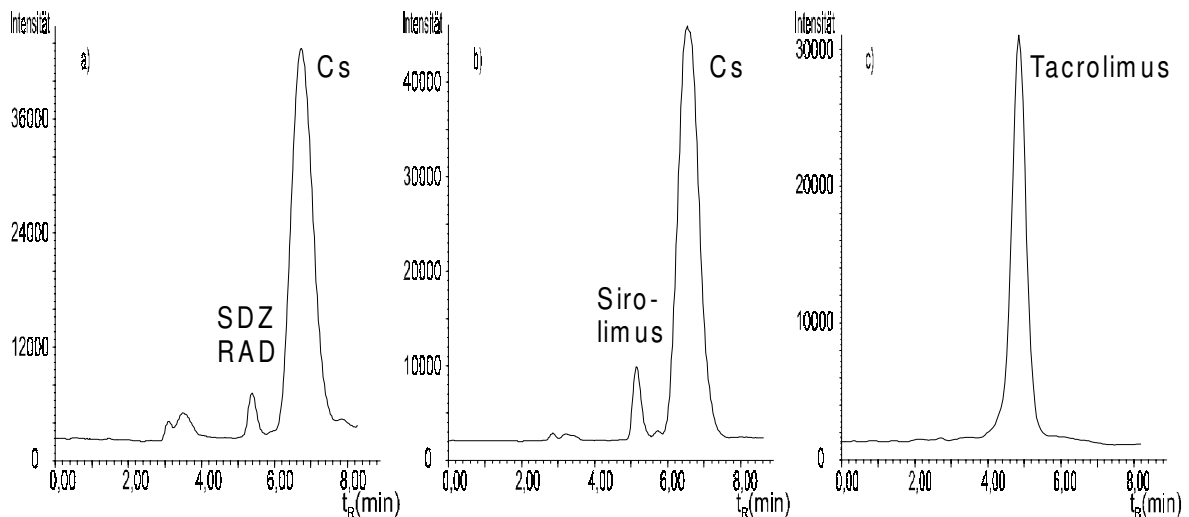


Abbildung 7: HPLC/ESI-MS Chromatogramme (Totalionenstrom (TIC)) der Natriumaddukt-Ionen von a) SDZ RAD (1,2 µg/L) und Ciclosporin (12 µg/L), b) Sirolimus (1,2 µg/L) und Ciclosporin (12 µg/L) und c) Tacrolimus (1,2 µg/L)

3.2 Strukturaufklärung von Metaboliten von SDZ RAD

LC/MS-Chromatogramme der Extrakte von Inkubationsansätzen enthielten mehrere Signale, die Stoffwechselprodukten von SDZ RAD zuzuordnen waren. Analytisch zugänglich waren dabei Addukte der entstandenen Metabolite mit Alkali-Ionen, von denen jedoch direkt auf die Struktur der Stoffwechselprodukte geschlossen werden konnte. Am intensivsten war jeweils das Signal des Natriumaddukt-Ions $[M+Na]^+$, während das entsprechende Kaliumaddukt-Ion $[M+K]^+$ nur mit geringer Intensität auftrat ($< 5\%$ des analogen $[M+Na]^+$). In allen Fällen wurden beide Addukt-Ionen zur gleichen Retentionszeit detektiert. Das Kaliumaddukt-Ion wurde wegen seiner geringen Intensität zur weiteren Interpretation nicht herangezogen.

In einem ersten Schritt wurden unter verschiedenen Bedingungen LC/MS-Läufe ohne Anwendung von CID aufgenommen, um die (Quasi-)Molekularionen der in den Proben vorhandenen Substanzen zu identifizieren (Abbildung 8). Tabelle 8 faßt die m/z -Werte der vorherrschenden Signale der jeweiligen chromatographischen Peaks zusammen und diente als Grundlage der Zuordnung der Signale zu den (Quasi-)Molekularionen der Metabolite. Nur die mit Pfeilen markierten Signale in Abbildung 8 d wurden zur weiteren Identifizierung von Metaboliten herangezogen. Neben der Muttersubstanz ($t_R=53,1$ min) tauchten als intensivste Signale m/z 996,5 – entsprechend mindestens fünf verschiedenen hydroxylierten Formen der Muttersubstanz – und m/z 966,5 – entsprechend einem demethylierten Metaboliten – auf.

3 Ergebnisse

Tabelle 8: Übersicht über die LC/MS-Daten aus Inkubationsexperimenten, aufgenommen ohne Anwendung von CID: die Tabelle zeigt die m/z-Werte und in Klammern die Retentionszeiten t_R der vorherrschenden Signale, die zur Strukturaufklärung herangezogen wurden. Alle Proben wurden 60 min bei 37 °C inkubiert.

Probe	m/z-Werte und Retentionszeiten der Signale
Standardlösung von SDZ RAD in Acetonitril (Abb. 8 b)	m/z 980,5 ($t_R=53,1$ min, 57,5 min)
Inkubationspuffer mit Mikrosomen ohne SDZ RAD (Abb. 8 a)	keine Signale beobachtet
SDZ RAD in Inkubationspuffer ohne Mikrosomen (Abb. 8 c)	m/z 980,5 ($t_R=53,1$ min, 57,5 min)
SDZ RAD mit Mikrosomen inkubiert (Abb. 8 d)	m/z 966,5 ($t_R=31,0$ min) m/z 980,5 ($t_R=53,1$ min, 57,5 min) m/z 996,5 ($t_R=24,0$ min, 30,0 min, 32,4 min, 35,1 min, 41,1 min) m/z 1002,5 ($t_R=8,5$ min) m/z 1004,5 ($t_R=11,0$ min) m/z 1012,5 ($t_R=12,4$ min, 19,4 min) m/z 1020,5 ($t_R=5,1$ min)

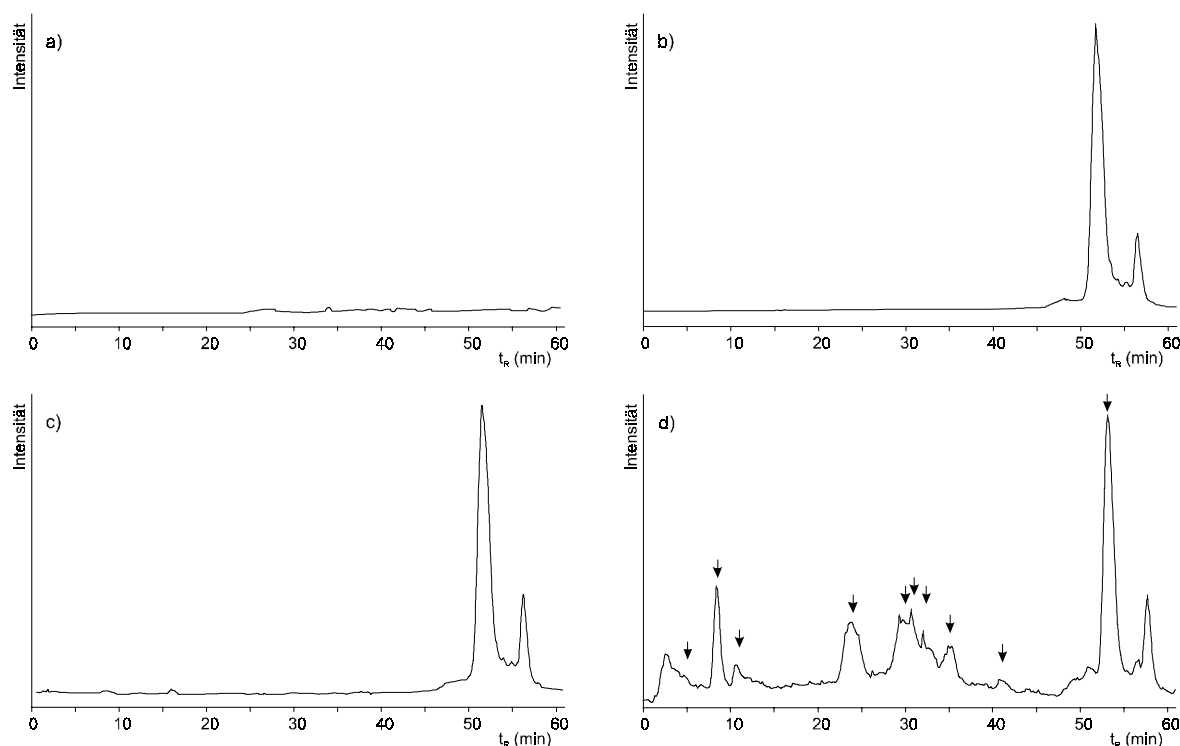


Abbildung 8: LC/ESI-MS-Chromatogramme von Extrakten nach 60 min Inkubation bei 37 °C unter verschiedenen Bedingungen: a) Inkubationspuffer mit Mikrosomen ohne SDZ RAD, b) Standardlösung von SDZ RAD in Acetonitril, c) SDZ RAD in Inkubationspuffer ohne Mikrosomen und d) Inkubation von SDZ RAD mit humanen Lebermikrosomen. Dargestellt ist jeweils der Totalionenstrom eines Laufs im Scan-Modus (m/z 300-1100); die Intensität ist in willkürlichen Einheiten angegeben, die Pfeile in d) markieren die zur Strukturaufklärung herangezogenen Signale.

LC/MS-Läufe mit CID lieferten Spektren mit Signalen von Fragmentionen. Das bei $t_R = 53,1$ min aufgenommene Spektrum (Abbildung 9) ist SDZ RAD zuzuordnen. Für die intensivsten Signale dieses Spektrums wurden Strukturfragmente postuliert. Durch Vergleichen beobachteter Massendifferenzen zum Ausgangsmolekül SDZ RAD und möglicher Bruchstellen im Molekülgerüst wurden korrespondierende Fragmentstrukturen gesucht und daraus ein Fragmentierungsschema für SDZ RAD erstellt (Abbildung 10). Auf dessen Grundlage wurden alle weiteren strukturellen Interpretationen durchgeführt.

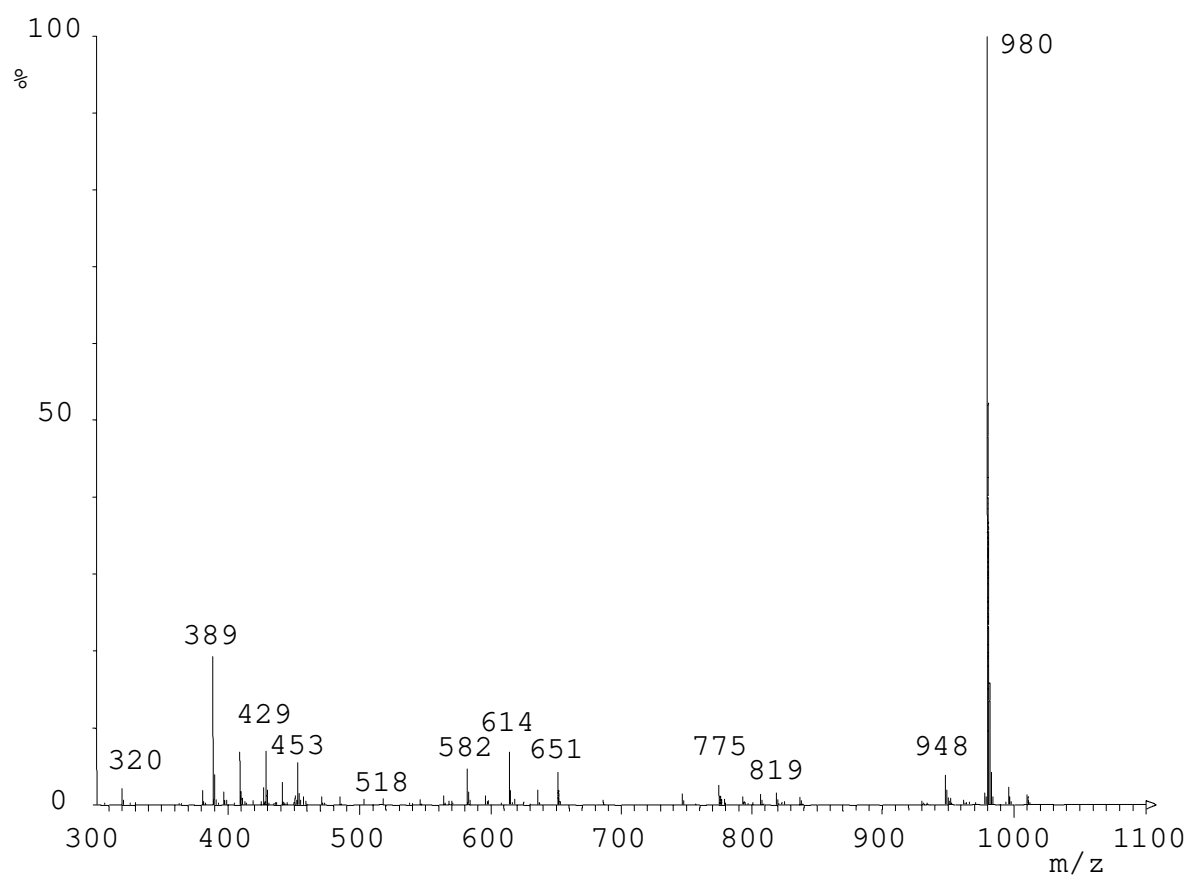


Abbildung 9: CID-Spektrum von SDZ RAD ($t_R=53,1$ min)

Obwohl nicht für alle Komponenten eine vollständige chromatographische Auflösung erzielt wurde, erlaubten die spektralen Daten die eindeutige strukturelle Identifikation von drei Metaboliten und eine ungefähre einiger weiterer. Weitere Substanzen koeluierten mit anderen Komponenten oder wurden mit nur geringer Intensität beobachtet, so daß für sie keine ausreichend abgesicherten spektralen Daten erhalten wurden und sie bei der weiteren Strukturaufklärung keine Berücksichtigung fanden. In allen SDZ RAD enthaltenden Proben wurde bei $t_R=57,5$ min (siehe Tabelle 8) ein weiteres Signal mit m/z 980,5 beobachtet, das einem Isomer der Muttersubstanz zuzuordnen ist (Hauck, C.; persönliche Mitteilung, Basel (1997)). Das Fragmentierungsmuster war dem der Muttersubstanz sehr ähnlich, eine weitere Identifizierung wurde nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

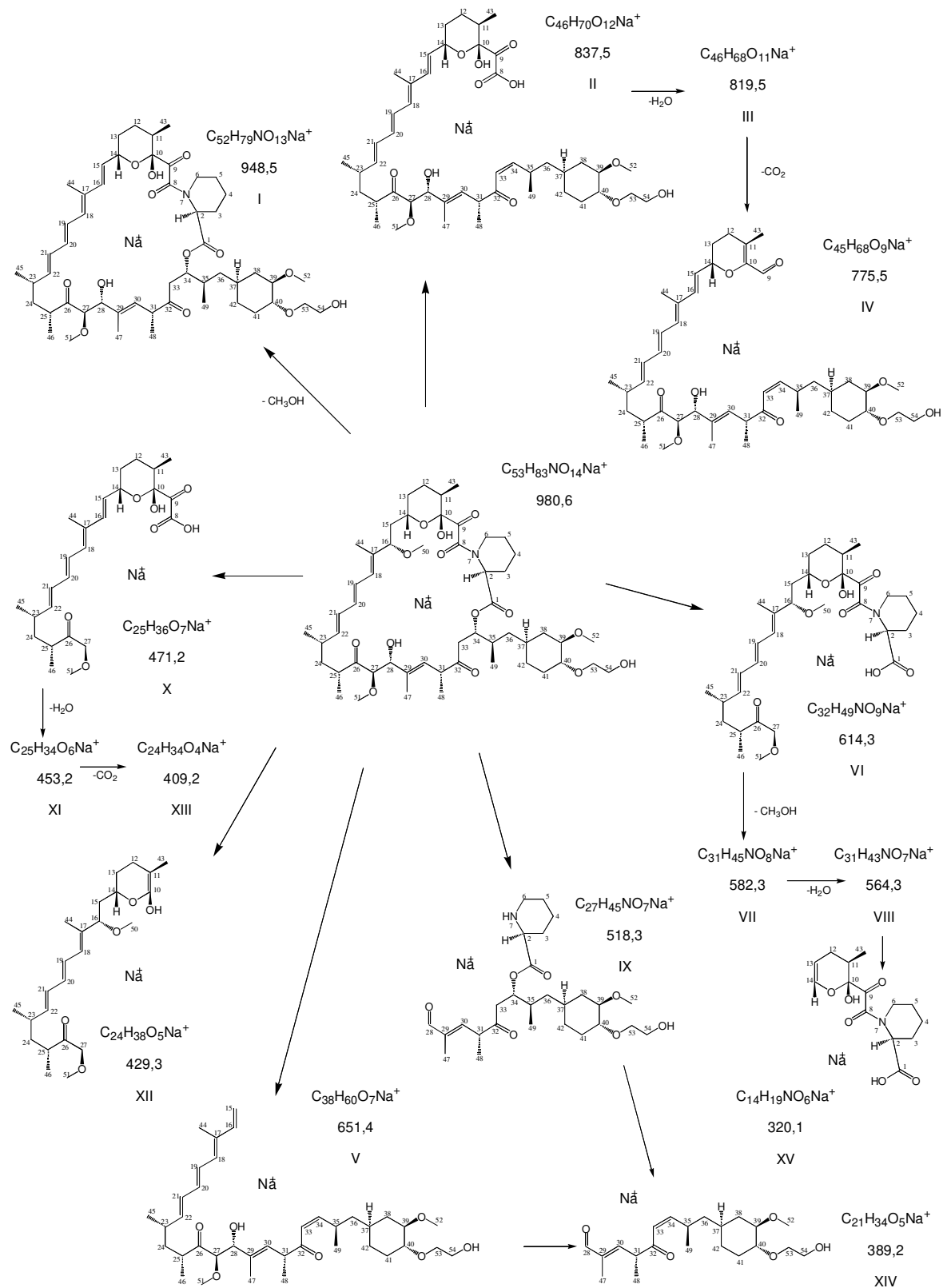


Abbildung 10: Aus dem ESI-CID-Spektrum (Abbildung 9) abgeleitetes Fragmentierungsschema von SDZ RAD; dargestellt sind die für die Strukturaufklärung der Stoffwechselprodukte relevanten Basisfragmente, nummeriert nach absteigender Masse

Die Abbildungen 11 bis 13 zeigen die CID-Spektren der identifizierten Metabolite bei den Retentionszeiten $t_R=5,1$ min (Abbildung 11), 8,5 min (Abbildung 12) und 31,0 min (Abbildung 13). Einen Überblick über die Strukturen der identifizierten Transformationsprodukte gibt Abbildung 14.

3.2.1 Ring-geöffnete Form von SDZ RAD

Im CID-Spektrum des bei $t_R=5,1$ min eluierenden Metaboliten (Abbildung 11) waren die intensivsten Signale m/z 389, 407, 429, 636, 998 und 1020. Dies deutet auf einen Metaboliten mit einem Molekularion von 998 amu hin, dessen Makrolidring geöffnet und dem ein Wassermolekül hinzugefügt wurde. Die für eine solche Transformation anfälligste Position von SDZ RAD ist die Lactongruppierung. Die aufgetretenen Signale bestätigen diesen Strukturvorschlag: m/z 407 korrespondiert mit Fragment XIV von SDZ RAD (Abbildung 10), das ein zusätzliches Wassermolekül enthält. Durch Eliminierung von Wasser wird unter ESI-Bedingungen m/z 389 (Fragment XIV) gebildet. Für das Signal m/z 429 sind sowohl die Struktur des Fragments XII von SDZ RAD als auch die des Fragments XIV mit einem zusätzlichen Wassermolekül als doppeltes Natriumaddukt $[\text{Fragment-H}+2\text{Na}]^+$ denkbar. Auf ein Fragment mit einer Carbonsäurefunktion (Fragment VI, Abbildung 10) deutet m/z 636 hin, das als doppeltes Natriumaddukt-Ion auftritt. Es wurden keine Fragmente gefunden, die auf eine Struktur mit erhaltenem Lactonring hindeuteten. Demnach weist das bevorzugte Auftreten von ring-geöffneten Fragmenten ohne Massenverschiebung im Vergleich zu den Basisfragmenten von SDZ RAD, das Fehlen von Fragmenten, die eine Esterfunktion enthalten und das Fragment XIV mit einer Massenverschiebung von +18 amu eindeutig auf die Struktur der ring-geöffneten Form von SDZ RAD hin.

Bei m/z 445 und 652 traten zwei zusätzliche Signale mit einer Massenverschiebung von +16 amu im Vergleich zu m/z 429 und 636 auf, was auf die Bildung gemischter Alkaliaddukt-Ionen $[\text{M-H}+\text{Na}+\text{K}]^+$ zurückzuführen ist.

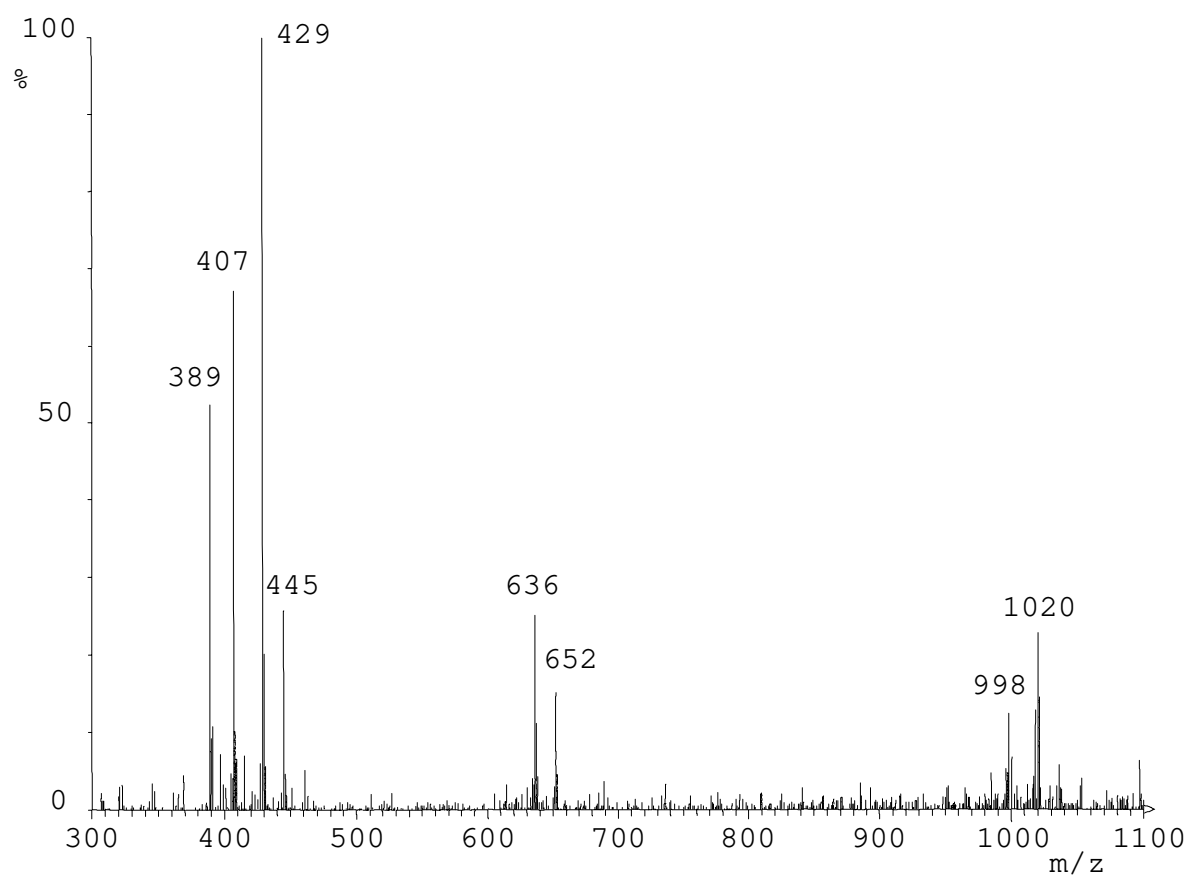


Abbildung 11: CID-Spektrum der ring-geöffneten Form von SDZ RAD ($t_R=5,1$ min)

3.2.2 Dehydrat der ring-geöffneten Form von SDZ RAD

Das bei $t_R=8,5$ min auftretende Signal zeigt ein CID-Spektrum, das dem der ring-geöffneten Form von SDZ RAD sehr ähnlich ist, mit dem Unterschied, daß m/z 1002 als größte Masse detektiert wurde, was im Vergleich zur ring-geöffneten Form von SDZ RAD eine Massenverschiebung von -18 amu bedeutet. Außerdem fehlt das Signal bei m/z 407 (Abbildung 12). Wie bereits diskutiert, deutet m/z 636 auf das Fragment VI als doppeltes Natriumaddukt ($+22$ amu) hin und zeigt, daß die Substanz nicht an der Kohlenstoffkette zwischen C(1) und C(27) modifiziert wurde. Die Signale bei m/z 389 und 429 konnten den Fragmenten XIV und XII von SDZ RAD zugeordnet werden. Das erhaltene Spektrum erlaubt die Identifizierung der Substanz als das Dehydrat der ring-geöffneten Form von SDZ RAD mit einer resultierenden Masse von 980 amu. Entsprechend der ring-geöffneten Struktur trat das Molekularion als doppeltes Natriumaddukt-Ion mit einer Massenverschiebung von $+22$ amu zum $[M+Na]^+$ auf.

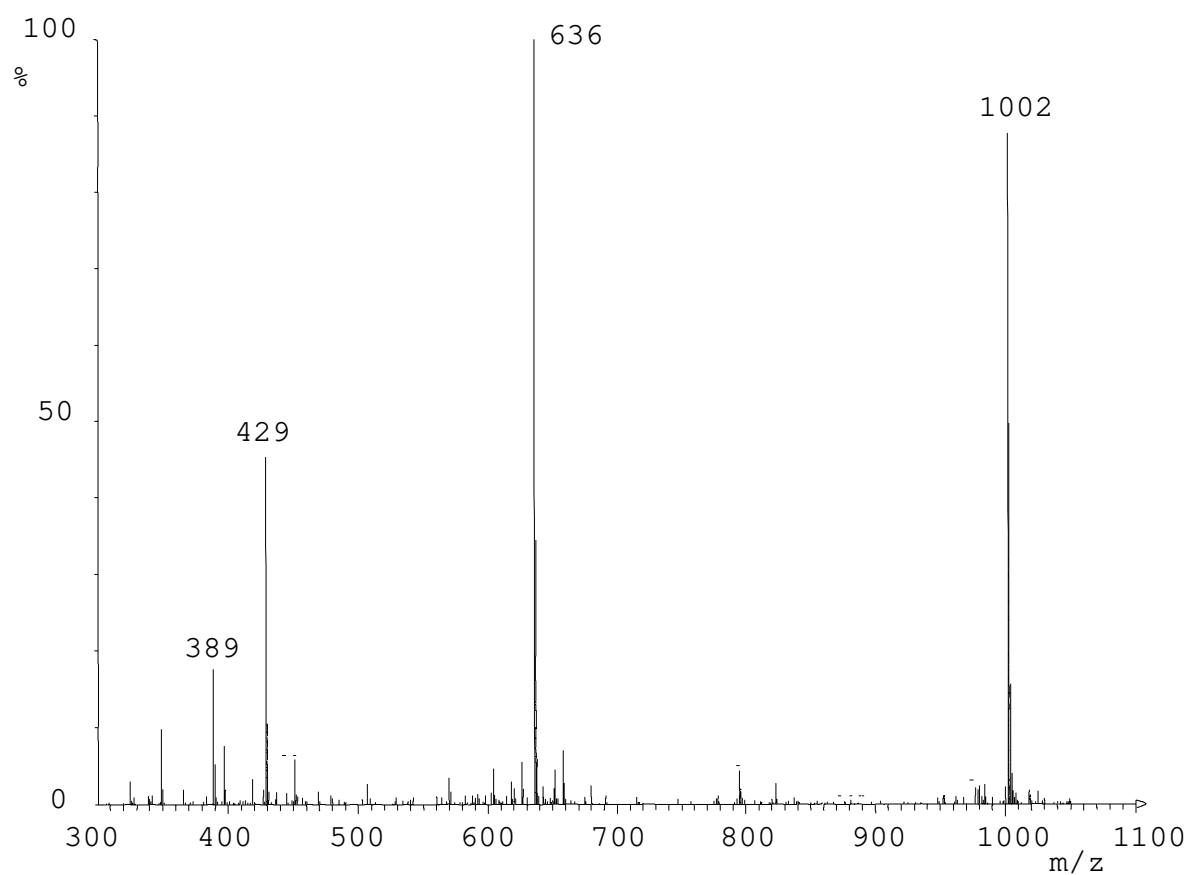


Abbildung 12: CID-Spektrum des Dehydrates der ring-geöffneten Form von SDZ RAD ($t_R=8,5$ min)

3.2.3 16-O-Demethyl-SDZ RAD

Auf der Basis des CID-Spektrums wurde die bei $t_R=31,0$ min eluierende Substanz (Abbildung 13) als 16-O-Demethyl-SDZ RAD identifiziert. Der *base peak* bei m/z 966 deutet auf das Natriumaddukt-Ion eines demethylierten Metaboliten von SDZ RAD hin. Die wichtigsten Fragmente traten bei m/z 320, 389, 409, 453, 471, 518, 582, 651, 837 und 948 auf und hatten die gleiche Masse wie die entsprechenden Fragmente XV, XIV, XIII, XI, X, IX, VII, V, II, I im CID-Spektrum von SDZ RAD (Abbildung 9). All diese Fragmente, die C(15) und C(16) enthalten, weisen eine Doppelbindung zwischen diesen beiden C-Atomen auf, die auf die Abspaltung eines Neutralteilchens zurückzuführen ist. Die einzige Ausnahme ist das Signal bei m/z 600, das einem Fragmentation mit einer Massenverschiebung von -14 amu zum analogen Fragment VI von SDZ RAD zuzuordnen ist. Die Demethylierung muß daher an der Methoxygruppe an C(16) stattgefunden haben.

3 Ergebnisse

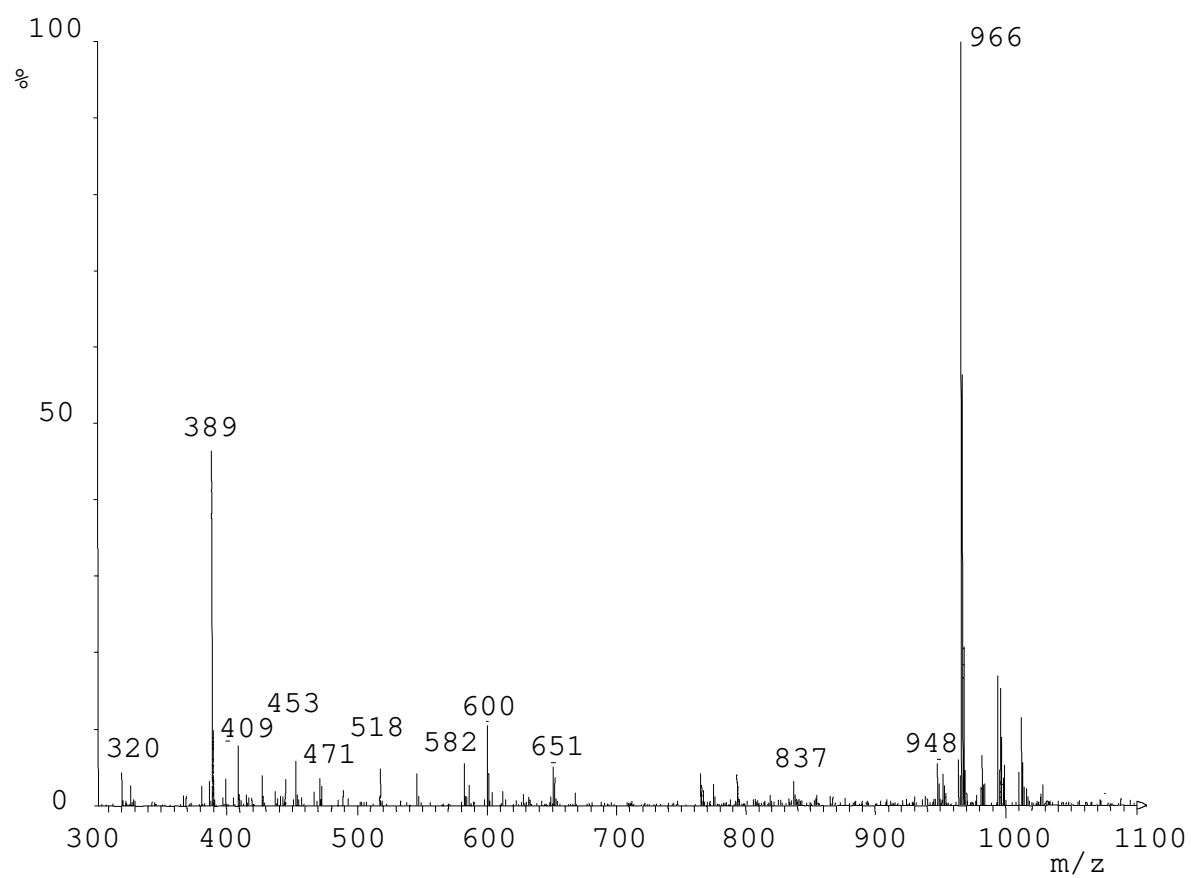
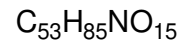
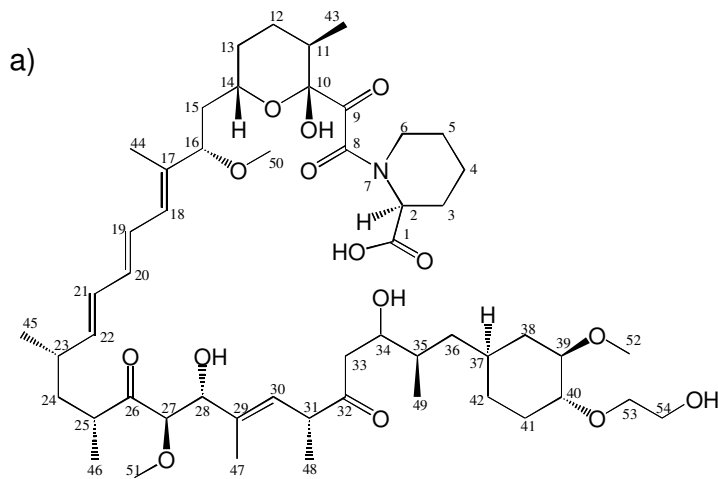
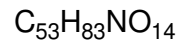
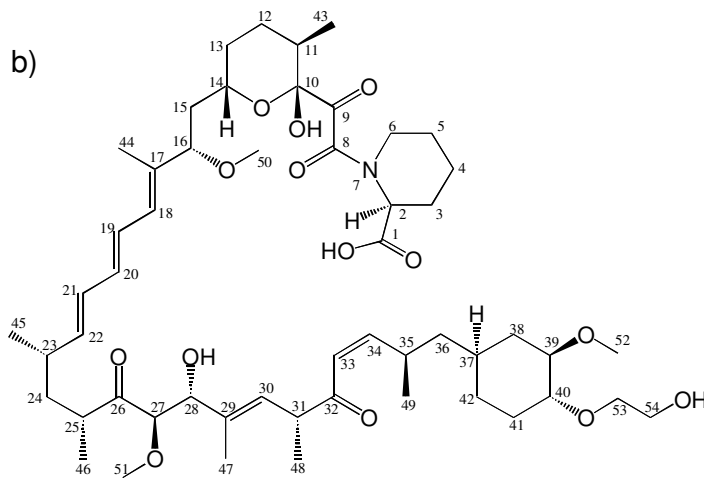


Abbildung 13: CID-Spektrum von 16-O-Demethyl-SDZ RAD ($t_R=31,0$ min)

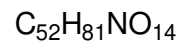
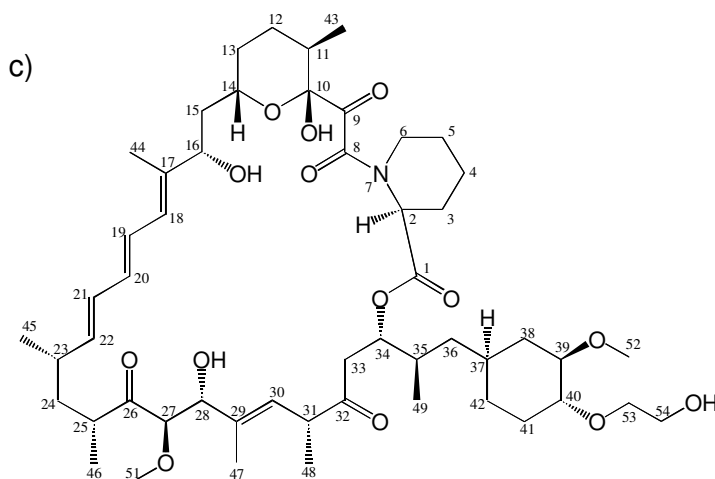
3 Ergebnisse



exakte Masse: 975,6 amu



exakte Masse: 957,6 amu



exakte Masse: 943,6 amu

Abbildung 14: Strukturvorschläge für die mit HPLC/ESI-MS identifizierte Metabolite von SDZ RAD:

a) ring-geöffnete Form von SDZ RAD, b) Dehydrat der ring-geöffneten Form von SDZ RAD,

c) 16-O-Demethyl-SDZ RAD

3.2.4 Mono-hydroxylierte Metabolite von SDZ RAD

Fünf auftretende Signale mit einer Massenverschiebung von +16 amu zu SDZ RAD ergaben deutlich unterscheidbare CID-Spektren (Abbildungen 15 bis 19). Diese Substanzen, die während der Inkubation hydroxyliert wurden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: vier ($t_R=24,0$ min, 30,0 min, 32,4 min und 35,1 min) zeigten Fragmentsignale mit einer Massenverschiebung von +16 amu im Vergleich zu den Fragmenten III, VI, VII, XI der Muttersubstanz sowie Signale mit gleicher Masse wie die Fragmente IX und XIV. Die fünfte hydroxylierte Spezies ($t_R=41,1$ min) zeigte Signale ohne Massenverschiebung im Vergleich zu den Fragmenten VI und XI von SDZ RAD. Die Fragmente III, IV und XIV hatten eine Massenverschiebung von +16 amu. Dies erlaubte die Schlußfolgerung, daß im Fall der vier Komponenten, die bei $t_R=24,0$ min, 30,0 min, 32,4 min und 35,1 min eluierten, die Hydroxylierung an der Hauptkette zwischen C(8) und C(27) stattgefunden haben mußte, während die Transformationsposition im Fall der fünften Substanz ($t_R=41,1$ min) zwischen C(28) und C(42) liegen mußte.

Die Transformationsposition der bei $t_R=24,0$ min detektierten mono-hydroxylierten Substanz konnte noch weiter eingegrenzt werden. Bei m/z 457 (Fragment XIII, hydroxyliert+CH₃OH) und m/z 425 – ein Hinweis auf die Abspaltung von Methanol – traten weitere Signale auf. Im Gegensatz zu den anderen hydroxylierten Substanzen der ersten Gruppe tauchten keine m/z -Werte von 407 und 439, die Wasserverlust anzeigen, auf. Somit muß die Hydroxylierung in einer Position stattgefunden haben, wo Wasser und Methanol nur alternativ eliminiert werden können, so daß nach der Abspaltung von Methanol die Wassereliminierung blockiert ist. Daher muß die Hydroxylierung an einer der Positionen C(15), C(16) oder C(44) stattgefunden haben.

3 Ergebnisse

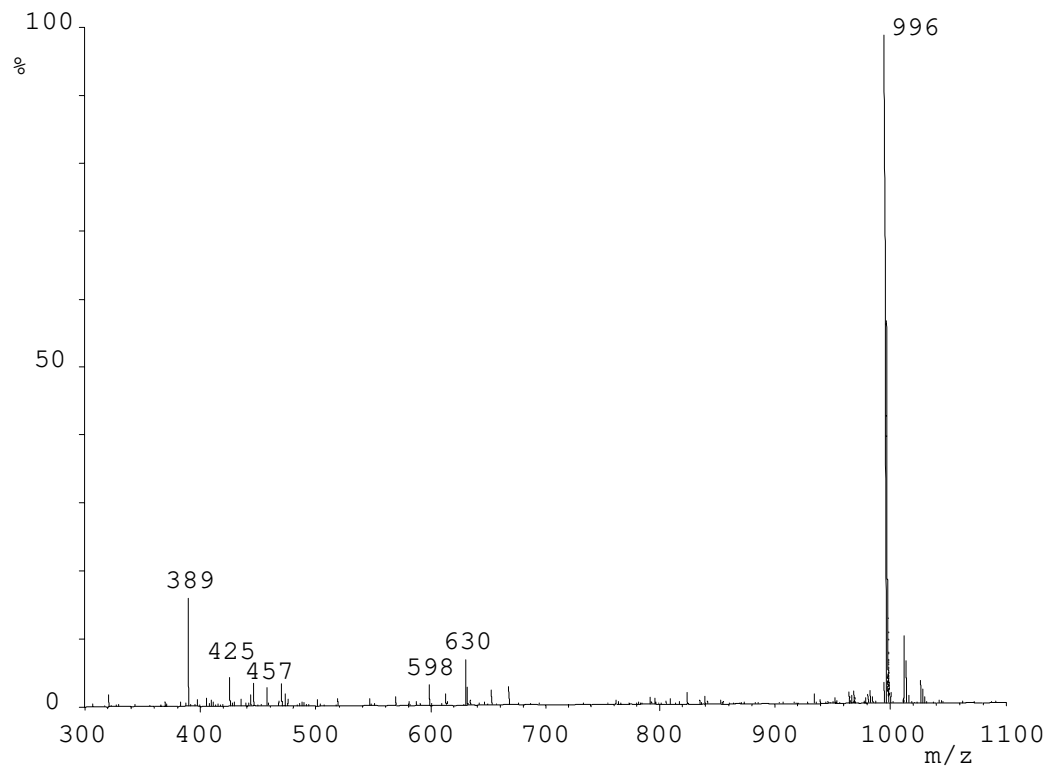


Abbildung 15: CID-Spektrum von Hydroxy-SDZ RAD ($t_R=24,0$ min)

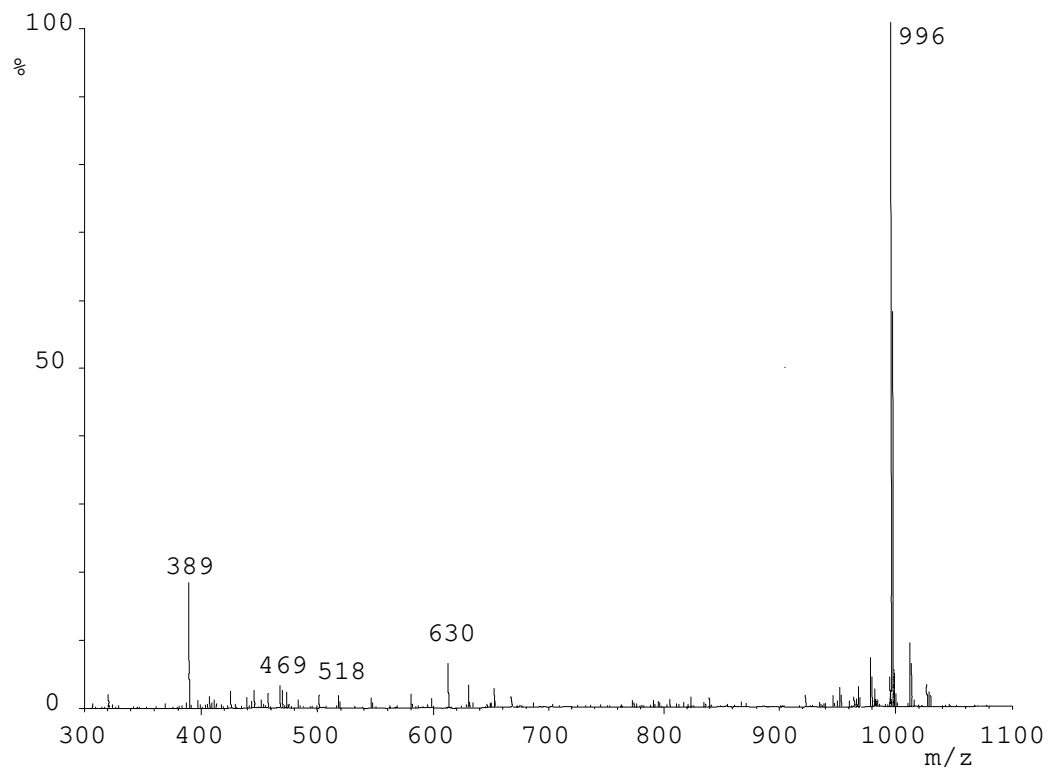


Abbildung 16: CID-Spektrum von Hydroxy-SDZ RAD ($t_R=30,0$ min)

3 Ergebnisse

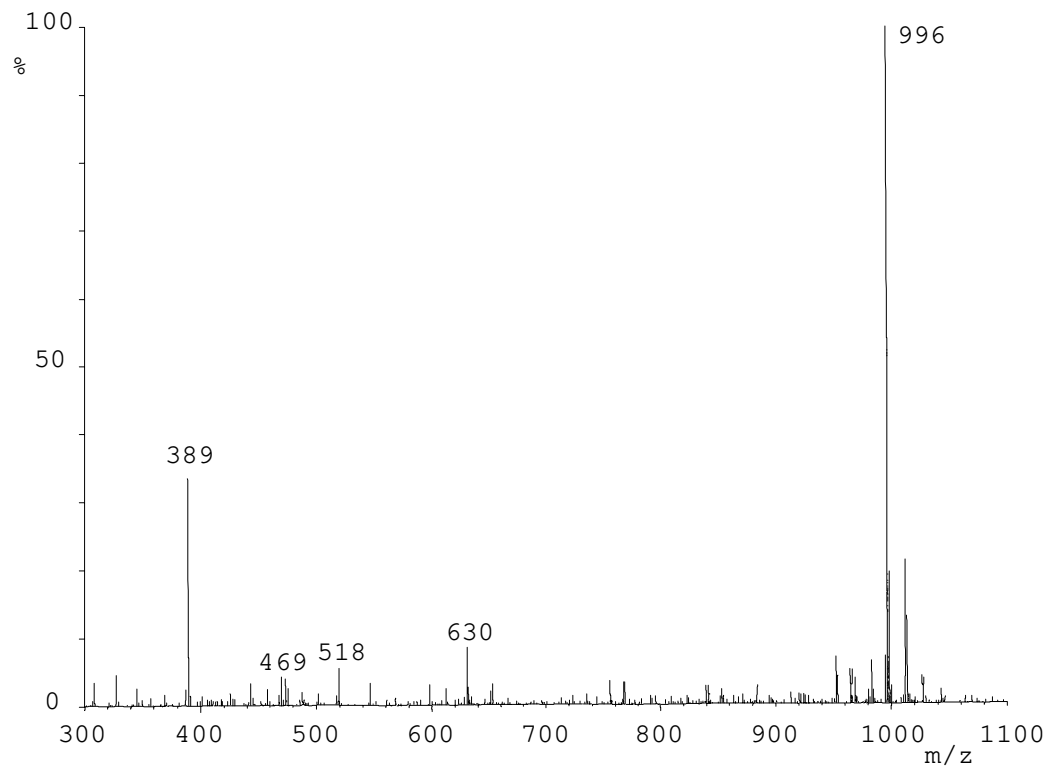


Abbildung 17: CID-Spektrum von Hydroxy-SDZ RAD ($t_R=32,4$ min)

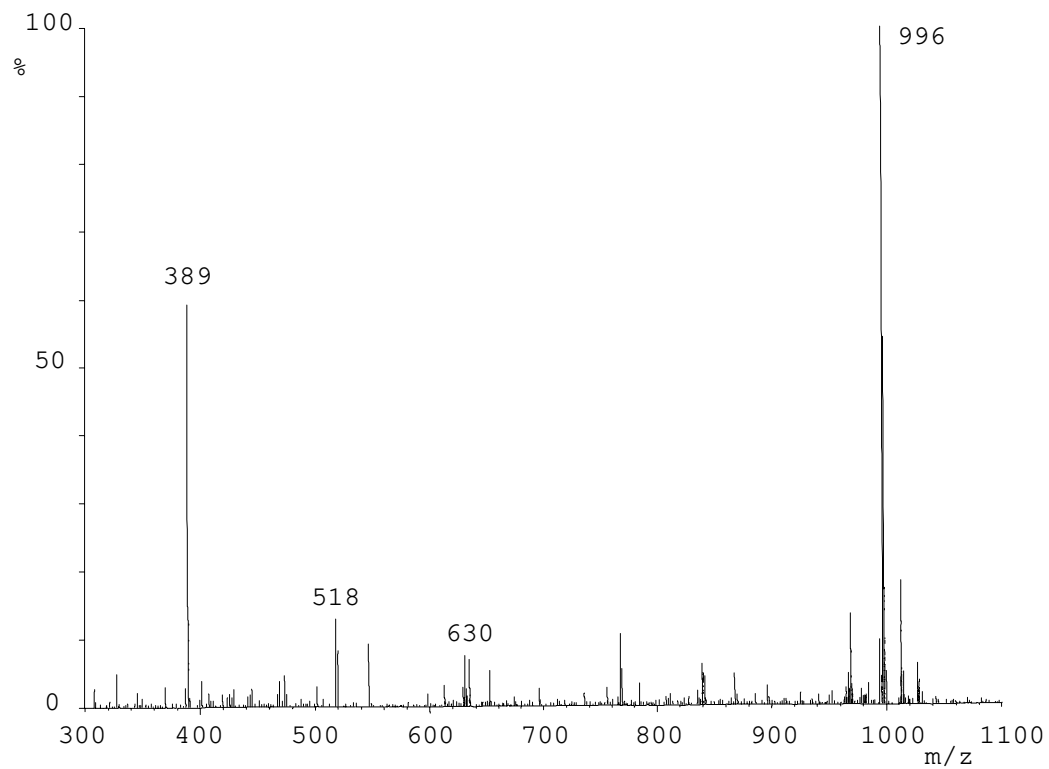


Abbildung 18: CID-Spektrum von Hydroxy-SDZ RAD ($t_R=35,1$ min)

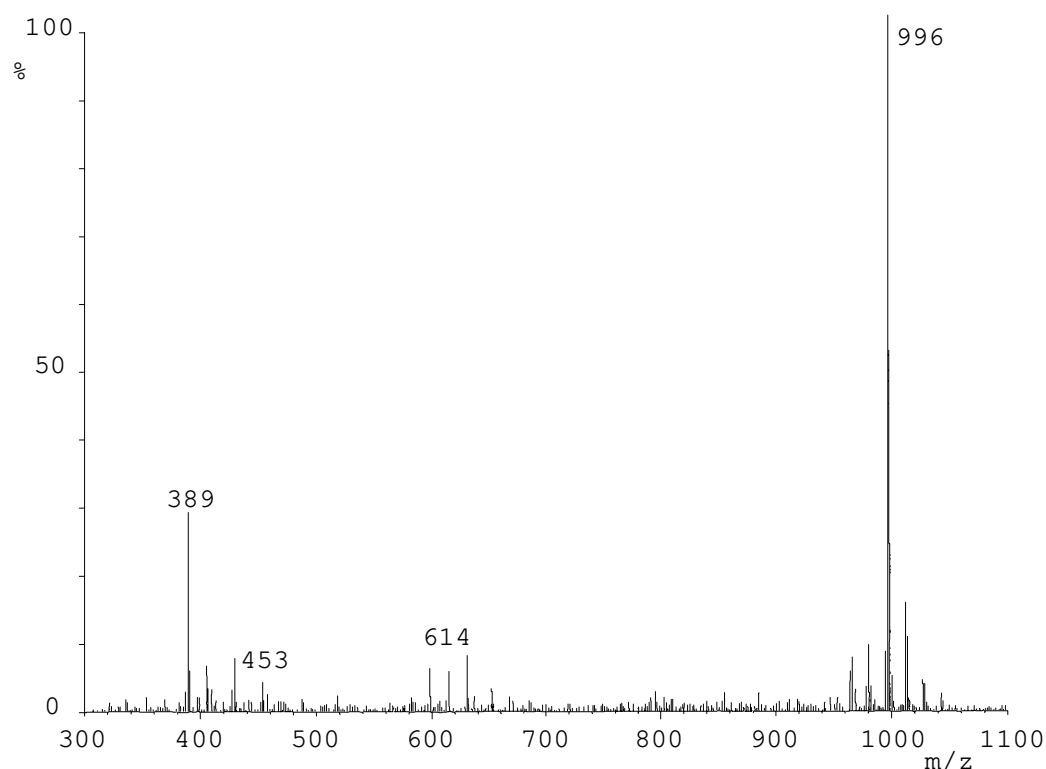


Abbildung 19: CID-Spektrum von Hydroxy-SDZ RAD ($t_R=41,1$ min)

3.2.5 Produkte mehrfacher Transformationen

Es wurden einige Metabolite nachgewiesen, die mehrfach modifiziert worden waren, darunter mindestens zwei dihydroxylierte Derivate (m/z 1012, $t_R=12,4$ min und 19,4 min, Tabelle 8 und Abbildungen 20 und 21), deren intensivste Signale mit einer Massenverschiebung von +32 amu im Vergleich zur Muttersubstanz auftraten. Desweiteren wurde der Metabolit 39-O-Demethyl-hydroxy-SDZ RAD ($t_R=11,0$ min, Abbildung 22) identifiziert, wobei die Hydroxylierungsposition im Molekülteil zwischen C(28) und C(54) lokalisiert sein muß. Im Gegensatz zu allen anderen Spezies, die bisher identifiziert wurden, war hier statt eines Signals bei m/z 389 (Fragment XIV) eines der vorherrschenden Signale m/z 391 entsprechend Fragment XIV, das durch Hydroxylierung und Demethylierung modifiziert worden war. Weitere intensive Signale waren m/z 429, 636 und 1004 entsprechend den Fragmenten XII und VI als doppelte Natriumaddukt-Ionen sowie dem doppelten Natriumaddukt-Ion von Demethyl-hydroxy-SDZ RAD.

3 Ergebnisse

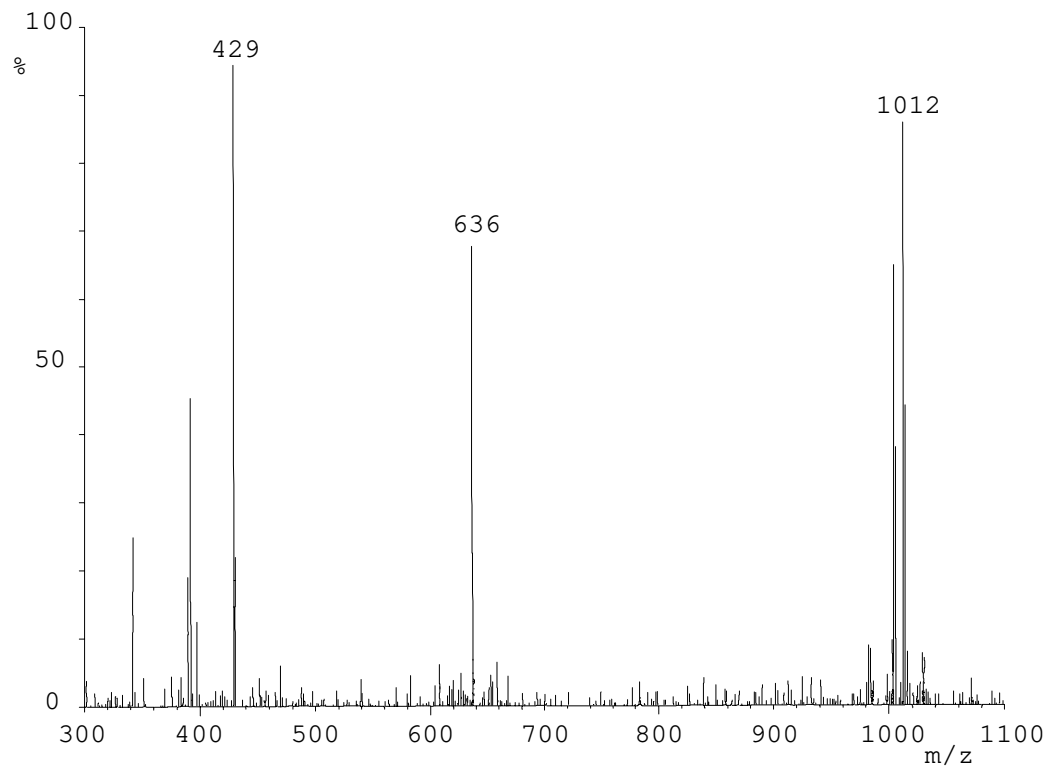


Abbildung 20: CID-Spektrum von Dihydroxy-SDZ RAD ($t_R=12,4$ min)

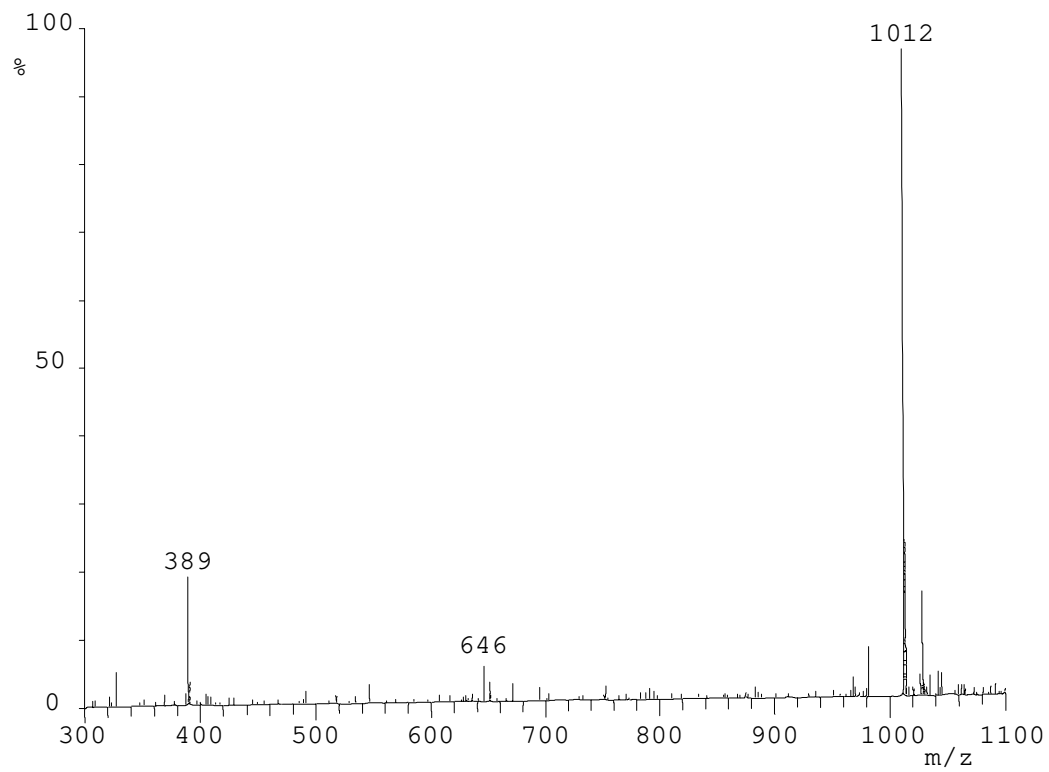


Abbildung 21: CID-Spektrum von Dihydroxy-SDZ RAD ($t_R=19,4$ min)

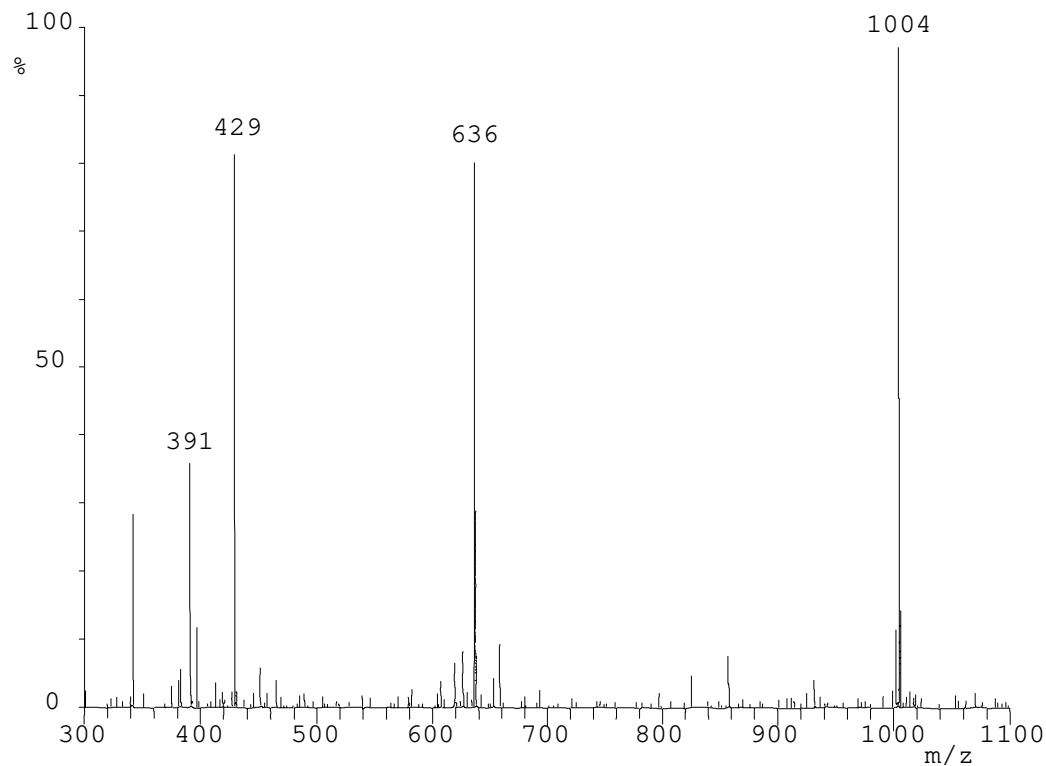


Abbildung 22: CID-Spektrum von 39-O-Demethyl-hydroxy-SDZ RAD ($t_R=11,0$ min)

3.3 Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik

3.3.1 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface

Heizgastemperatur

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluß der Heizgastemperatur auf die Signalintensität. Im System mit großer Flußrate stieg die Signalintensität mit steigender Heizgastemperatur bis 300 °C an. Die Erhöhung der Temperatur von 300 auf 350 °C führte zu keiner Veränderung der Signalintensität.

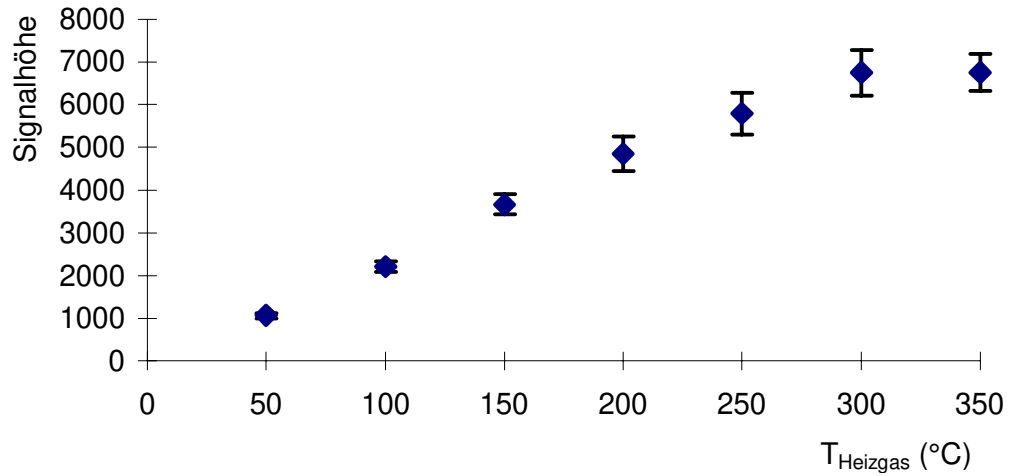


Abbildung 23: Einfluß der Heizgastemperatur im ESI-Interface auf die Signalintensität (LC-Flußrate: 200 µL/min), dargestellt sind die Mittelwerte der Signalthöhen ± SEM (n=3)

Die Ergebnisse für das Laufmittelsystem mit kleiner Flußrate entsprechen qualitativ etwa denen der höheren Flußrate.

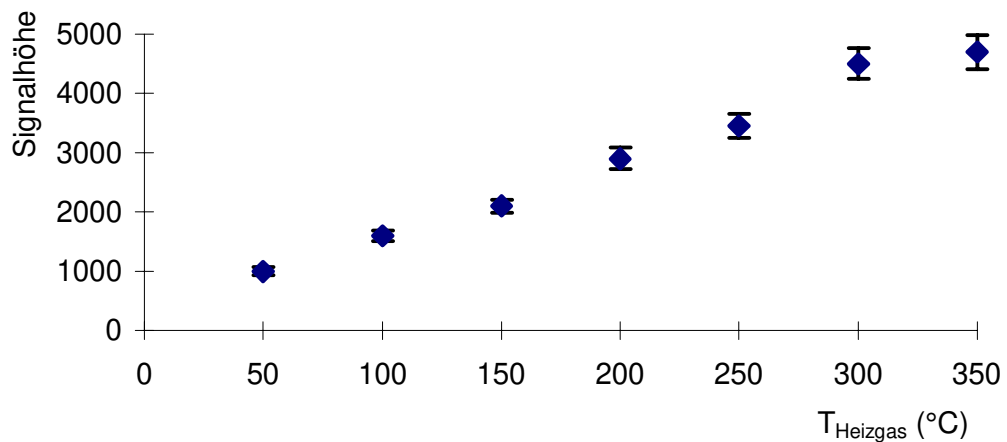


Abbildung 24: Einfluß der Heizgastemperatur im ESI-Interface auf die Signalintensität (LC-Flußrate: 25 µL/min), dargestellt sind die Mittelwerte der Signalthöhen ± SEM (n=3)

Heizgasfluß

Für das Laufmittelsystem mit großer Flußrate nahm die erhaltene Signalintensität mit höherem Heizgasfluß zu und lag bei 10 L/min schließlich mehr als doppelt so hoch wie bei 2,5 L/min (Abbildung 25).

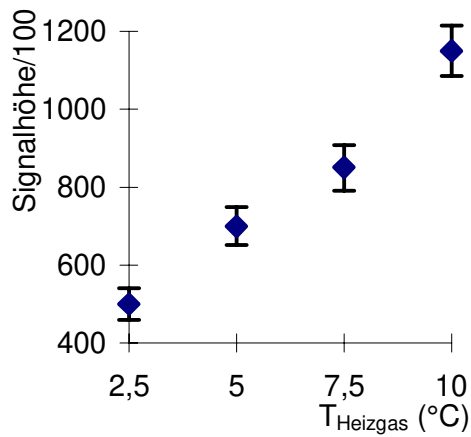


Abbildung 25: Einfluß des Heizgasflusses auf die Signalintensität (LC-Flußrate: 200 µL/min), dargestellt sind die Mittelwerte der Signalhöhen ± SEM (n=3)

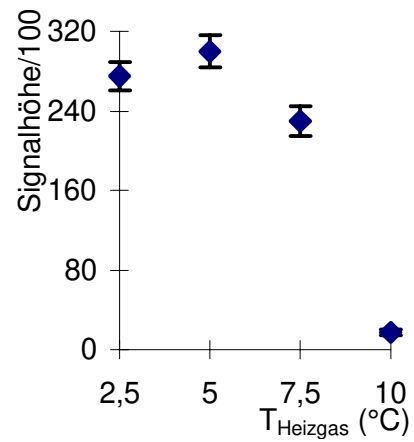


Abbildung 26: Einfluß des Heizgasflusses auf die Signalintensität (LC-Flußrate: 25 µL/min), dargestellt sind die Mittelwerte der Signalhöhen ± SEM (n=3)

Bei der Verwendung einer LC-Flußrate von 25 µL/min wurde bei Heizgasflüssen > 5 L/min die Signalintensität deutlich gemindert. Das Optimum lag bei 5 L/min (Abbildung 26).

Druck des Vernebelungsgases

Bei Variation des Vernebelungsgas-Druckes im Laufmittelsystem mit großer Flußrate stiegen die Signalhöhen mit zunehmendem Druck des Vernebelungsgases bis 560 kPa deutlich an (Abbildung 27).

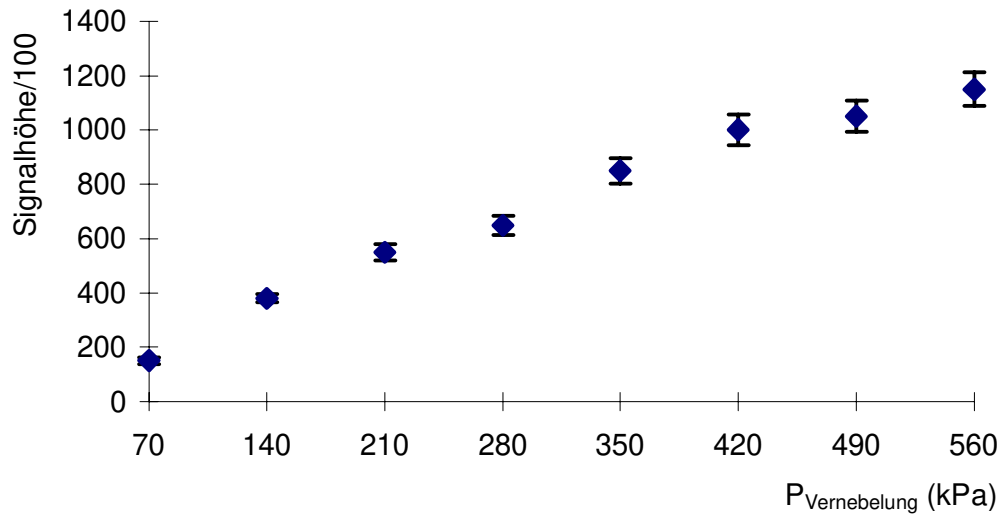


Abbildung 27: Einfluß des Vernebelungsgas-Druckes auf die Signalhöhe (LC-Flußrate: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$).
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalhöhen \pm SEM ($n=3$)

Für das Laufmittelsystem mit kleiner Flußrate stieg beim Erhöhen des Vernebelungsgas-Druckes von 70 auf 210 kPa die Signalhöhe an (Abbildung 28). Bei 210 kPa lag das Maximum, bei weiterer Erhöhung des Gasdrucks nahmen die Signalintensitäten wieder ab, bis sie bei 560 kPa nur noch etwa 10% der maximalen Intensität hatten.

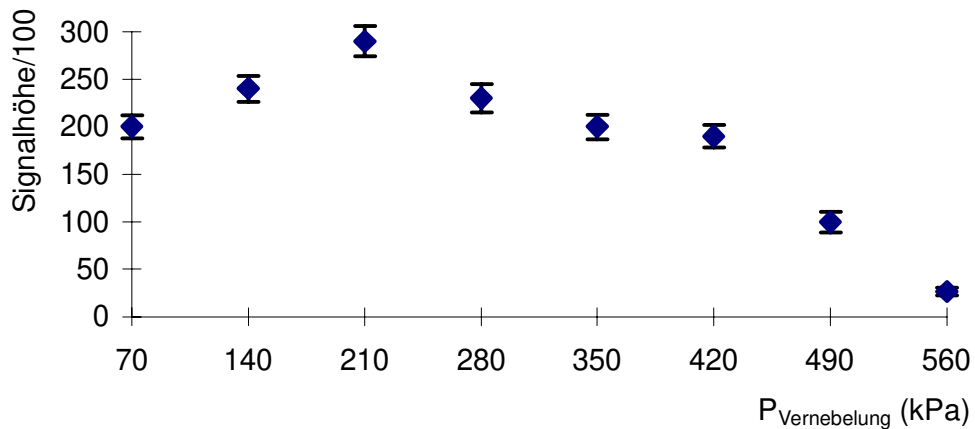


Abbildung 28: Einfluß des Vernebelungsgas-Druckes auf die Signalhöhe (LC-Flußrate: 25 $\mu\text{L}/\text{min}$).
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalhöhen \pm SEM ($n=3$)

3.3.2 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion

Der Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion von Tacrolimus, Sirolimus und SDZ RAD ist in den Abbildungen 29 bis 32 dargestellt.

Bei Tacrolimus stieg die Intensität des Signals m/z 826,5 ($[M+Na]^+$) bis 220 V Kapillarausgangsspannung an und fiel bei weiterer Erhöhung der Kapillarausgangsspannung wieder ab. Ab einer Spannung von etwa 200 V wurde ein zusätzliches Signal bei m/z 616,3 detektiert, dessen Intensität bei Erhöhung der Spannung bis 270 V auf etwa ein Drittel der maximalen Intensität des (Quasi-)Molekularions von Tacrolimus anstieg und danach deutlich abfiel (Abbildung 29).

Abbildung 30 zeigt CID-Spektren von Tacrolimus, die bei Kapillarausgangsspannungen von 200, 300 und 350 V aufgenommen wurden. Mit steigender Kapillarausgangsspannung treten in den Spektren zunehmend kleinere Fragmente auf, während die Intensität der größeren Bruchstücke abnimmt.

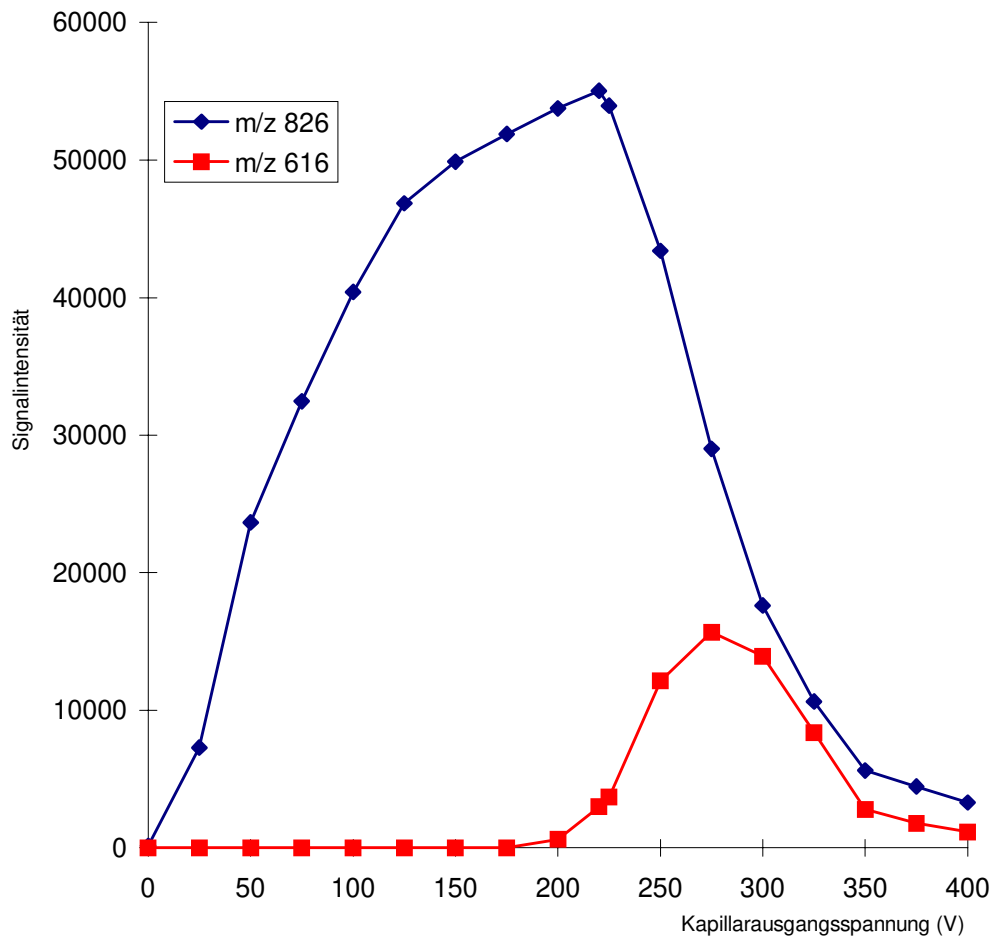


Abbildung 29: Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion von Tacrolimus

Die maximale Signalintensität des Signals m/z 936,6 ($[M+Na]^+$) für Sirolimus wurde bei einer Kapillarausgangsspannung von 260 V erhalten (Abbildung 31). Bei weiterer Erhöhung der Kapillarausgangsspannung fiel die Intensität wieder ab. Ab einer Spannung von etwa 250 V wurde ein zusätzliches Signal bei m/z 607,4 detektiert, dessen maximale Intensität bei 350 V Kapillarausgangsspannung erreicht wurde.

3 Ergebnisse

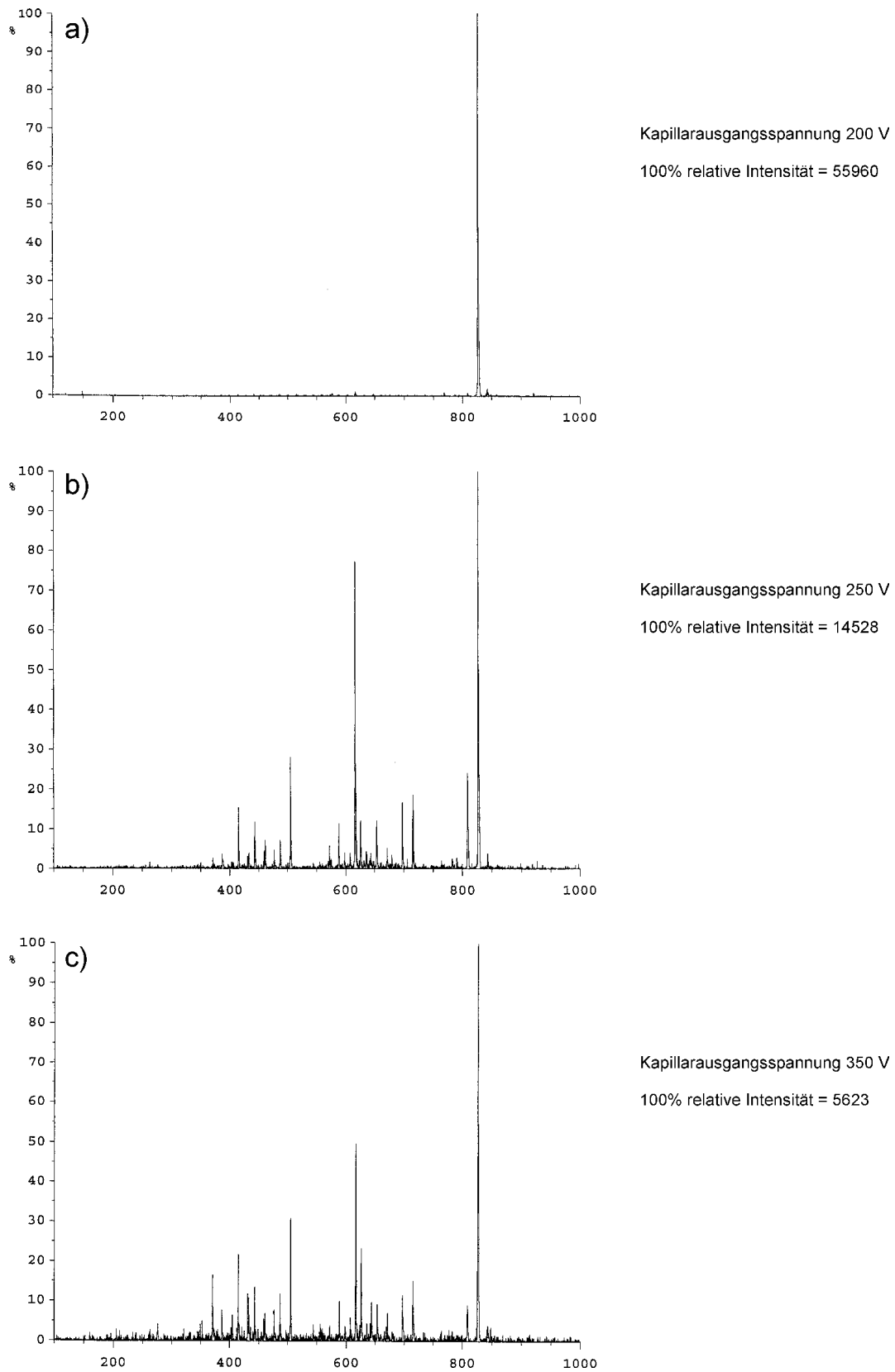


Abbildung 30: CID-Spektren von Tacrolimus bei verschiedenen Kapillarausgangsspannungen: a) 200 V, b) 300 V und c) 350 V

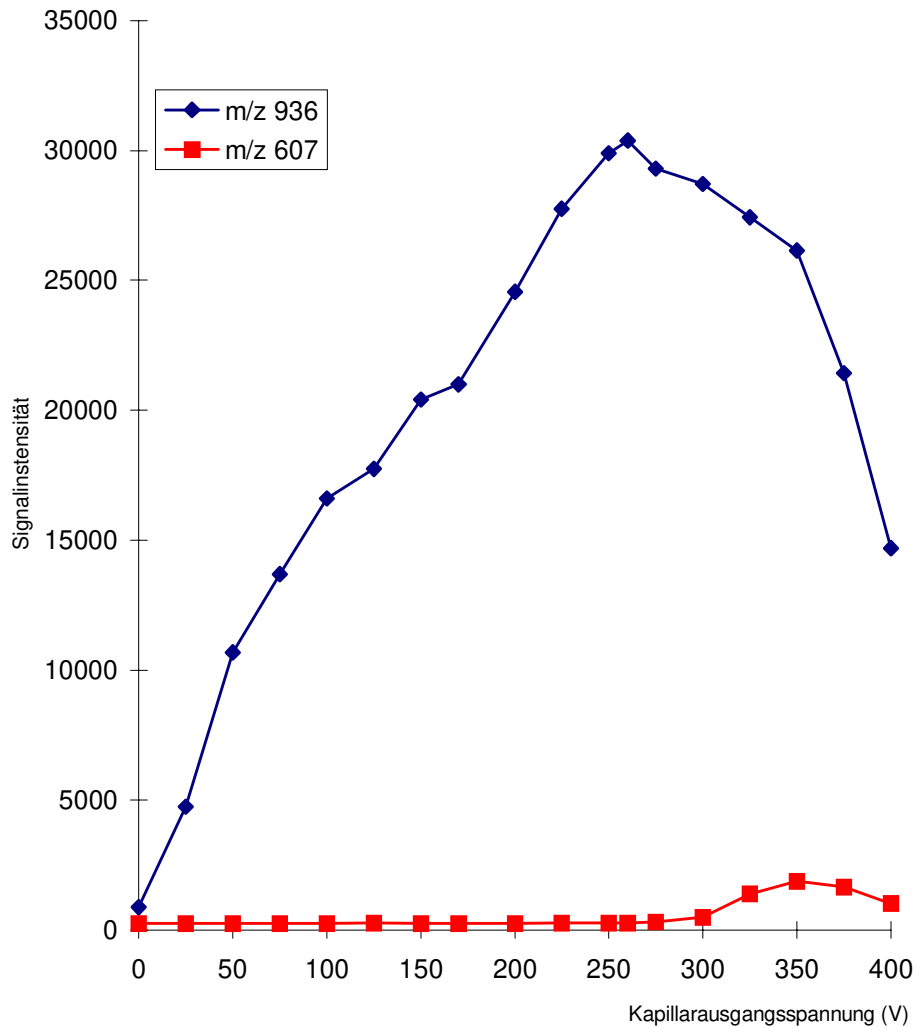


Abbildung 31: Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion von Sirolimus

Bei SDZ RAD wurde die höchste Signalintensität des (Quasi-)Molekularions $[M+Na]^+$ m/z 980,6 bei einer Kapillarausgangsspannung von 280 V erreicht (Abbildung 32). Danach nahm die Intensität wieder ab. Parallel hierzu trat ab etwa 250 V Kapillarausgangsspannung ein zusätzliches Signal bei m/z 389,2 auf, dessen Intensität bis 300 V zunahm.

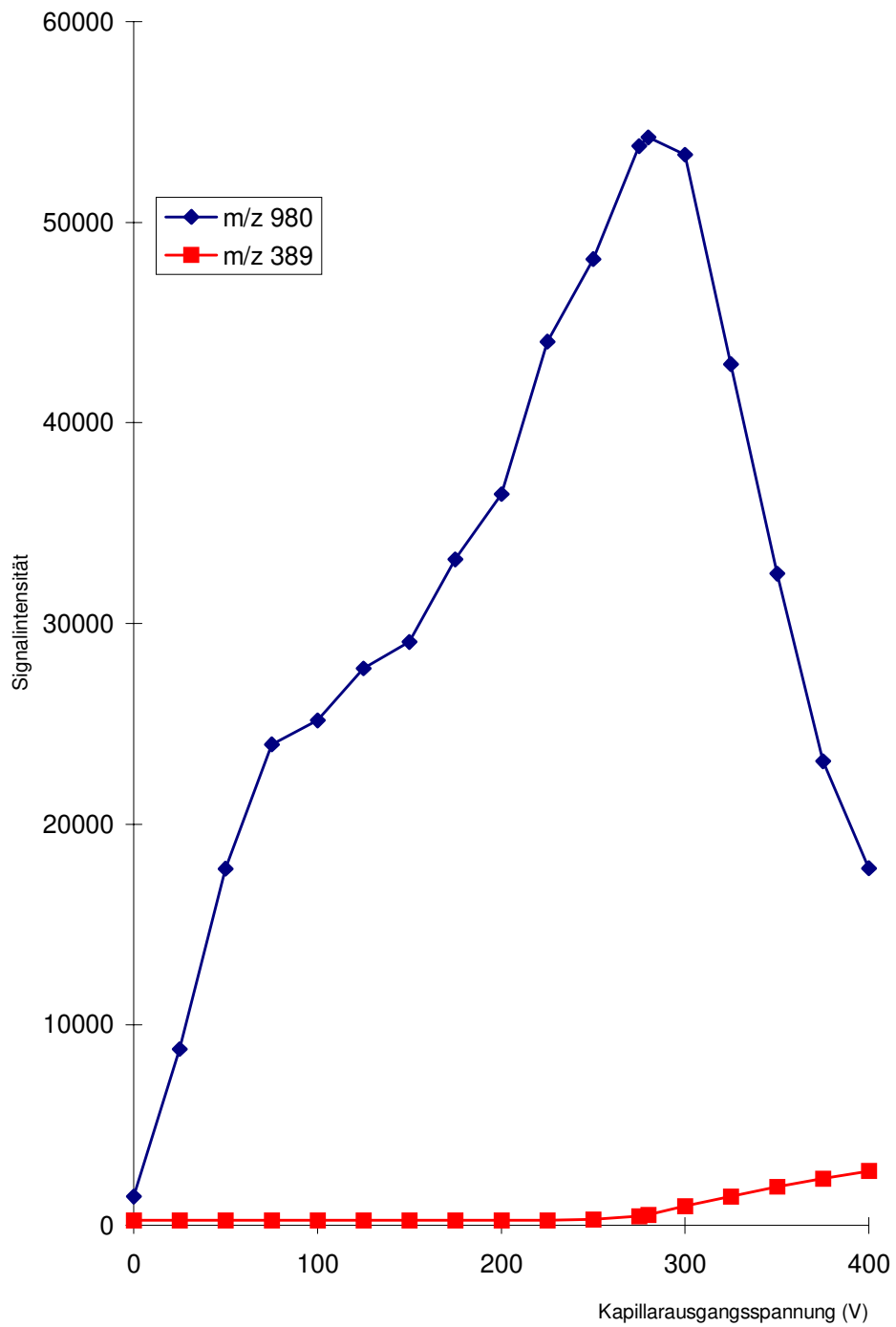


Abbildung 32: Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion von SDZ RAD

3.3.3 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion

Die Ergebnisse zur Detektorcharakteristik des ESI-Massenspektrometers sind in den Abbildungen 33 bis 36 dargestellt. Bei der Variation der LC-Flußraten wurden bei konstanter injizierter Absolutmenge und Konzentration bei kleinen Flüssen die größten Peakflächen erreicht. Mit ansteigendem Fluß wurden die Flächen kleiner, bis bei einem Fluß von 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Peakfläche nur noch weniger als 10% der maximal erreichten Peakfläche betrug (Abbildung 33). Die Peakhöhen nahmen im Flußbereich von 10 bis 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ um etwa Faktor drei zu und anschließend bis auf etwa 20% der maximalen Intensität wieder ab (Abbildung 34).

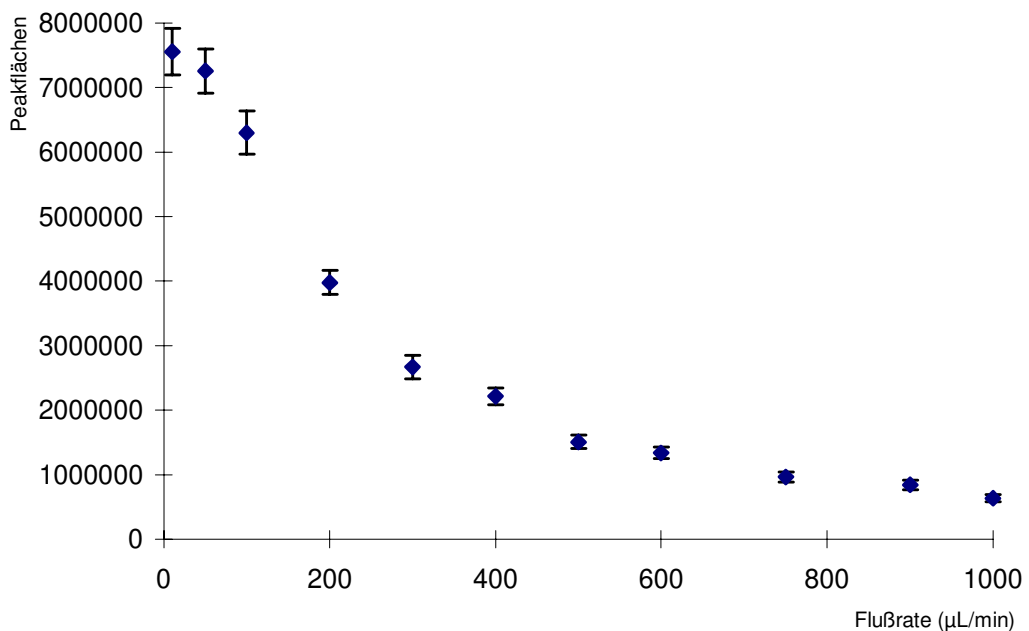


Abbildung 33: Abhängigkeit der Peakfläche von der LC-Flußrate. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakflächen \pm SEM ($n=3$)

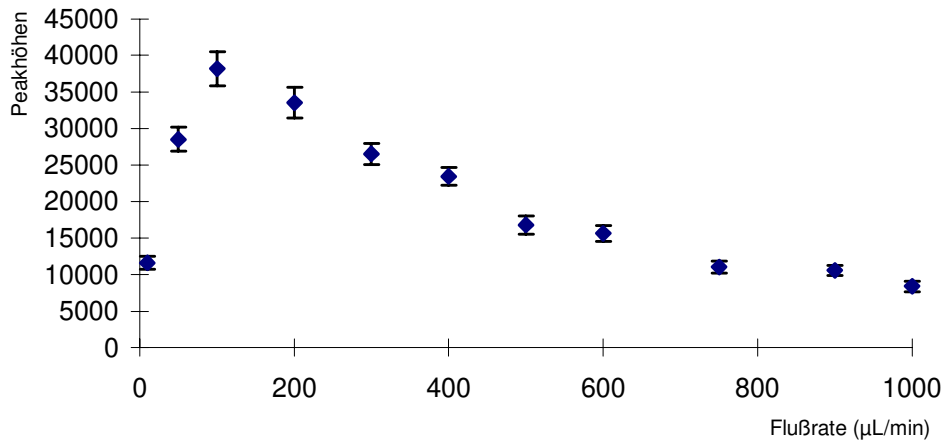


Abbildung 34: Abhängigkeit der Peakhöhe von der LC-Flußrate. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakhöhen \pm SEM ($n=3$)

Die Auswirkungen einer Konzentrationsänderung bei konstanter Flußrate auf die Signalintensität (Fläche und Höhe) sind in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt. Zwischen 10^1 bis 10^{-4} mg/mL SDZ RAD nahm die Peakfläche kontinuierlich ab (Abbildung 35). Auffällig ist der extrem hohe Wert bei 10^1 mg/mL, der auf einen Peak mit etwa fünffacher Breite im Vergleich zu den bei den anderen Konzentrationen ermittelten Werten zurückzuführen ist.

Betrachtet man die Peakhöhen unter den gleichen Bedingungen, ist festzustellen, daß der lineare Bereich kleiner ist als bei Auswertung der Peakflächen. Erst ab 10^{-3} mg/mL trat ein meßbares Signal auf und stieg bis 10^{-1} mg/mL an. Darüber blieb das Signal unabhängig von der Konzentration konstant (Abbildung 36).

3 Ergebnisse

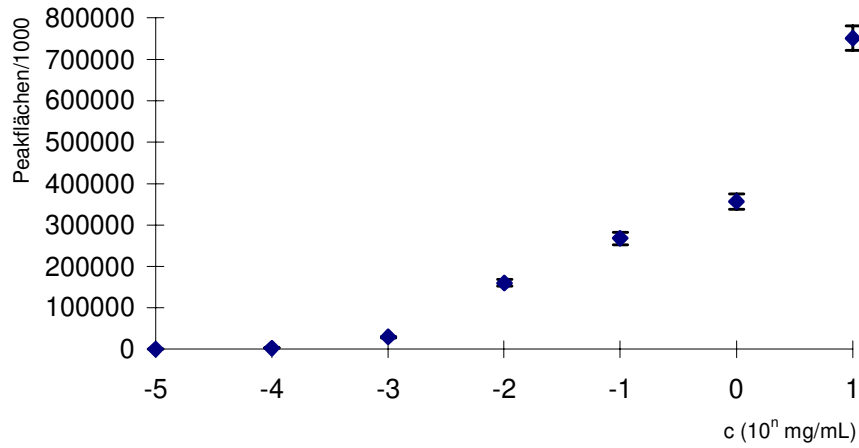


Abbildung 35: Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakflächen \pm SEM ($n=3$)

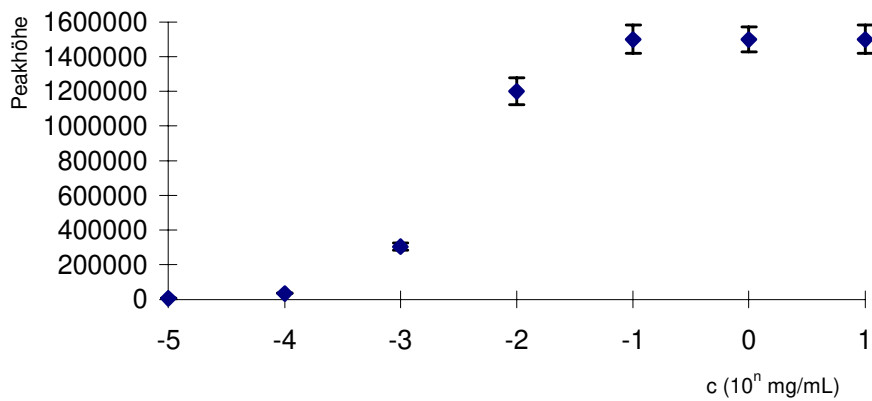


Abbildung 36: Abhängigkeit der Peakhöhe von der Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakhöhen \pm SEM ($n=3$)

3.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens

3.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe

Tabelle 9: Abhängigkeit der Signalintensität für SDZ RAD vom Anteil an deproteiniertem Blut in der Probe

Matrixanteil (in % deproteinierten Blutes)	mittlere Peakfläche (n=2)
0	163762,5
20	30477,5
40	20947,5
60	17641,0
80	8163,5
100	4709,5

Die in Abhängigkeit vom Matrixanteil in der untersuchten Lösung erhaltenen Signale für SDZ RAD (40 µg/L) zeigt Abbildung 37; die entsprechenden Peakflächen, die durch manuelle Integration ermittelt wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Signalintensität bei ESI-MS-Detektion nimmt mit steigendem Anteil an deproteiniertem Blut stark ab. Bereits bei einer Zumischung von 20% (v/v) deproteinierten Blutes fällt die gemessene Peakfläche auf weniger als ein Fünftel des Wertes ab, der aus einer Matrix ohne deproteiniertes Blut bestimmt wurde.

Besteht die Matrix aus 100% deproteiniertem Blut, liegt das Signal für die gewählte Konzentration unter der Nachweisgrenze bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1.

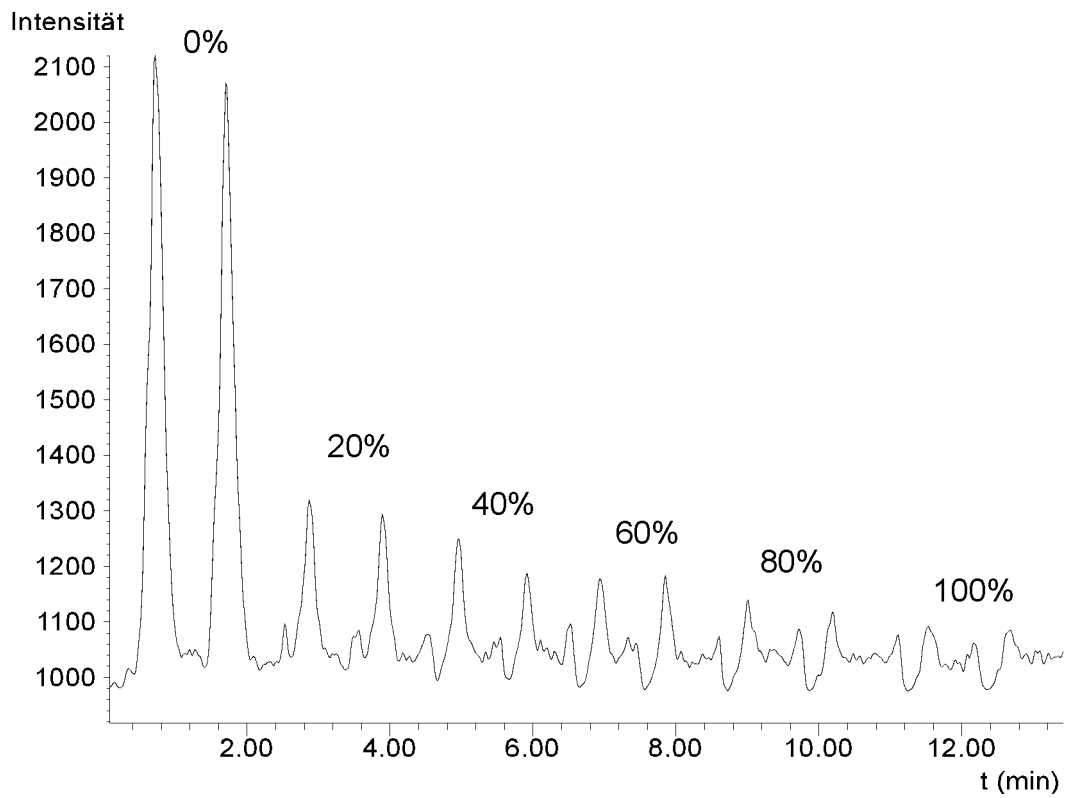


Abbildung 37: Signal von 40 µg/L SDZ RAD in Abhängigkeit vom Anteil an deproteinisiertem Blut (%) in der Probe. Die Prozentangaben entsprechen dem jeweiligen Anteil an deproteinisiertem Blut, die jeweilige Differenz zu 100% war Wasser.

3.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche

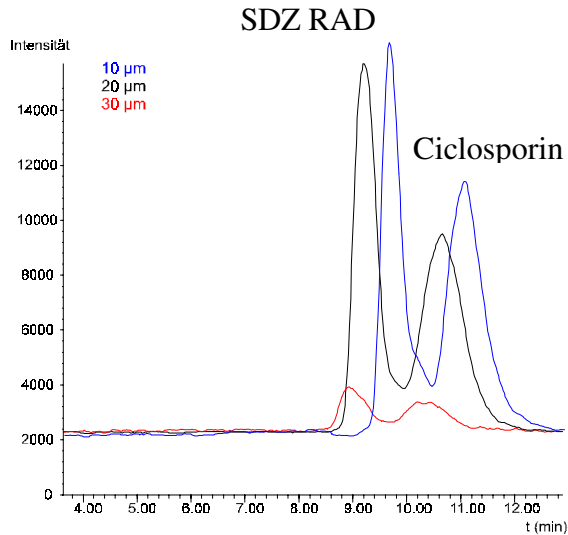


Abbildung 38: Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche

Tabelle 10: Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche

	Partikelgröße (µm)	mittlere Peakfläche (n=4)
SDZ RAD	10	4626629
	20	4168411
	30	299506
Ciclosporin	10	3486985
	20	3349025
	30	285786

Abbildung 38 zeigt die Elutionsprofile von drei Messungen, bei denen für die simultane Extraktion von Cs und SDZ RAD Extraktionskartuschen mit Füllmaterial verschiedener Partikelgrößen verwendet wurden. Die mittleren Peakflächen nach Integration der Ionenspuren sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Mit einer Partikelgröße von 10 µm ergab sich für beide Komponenten die größte Peakfläche, mit 30 µm Partikelgröße die kleinste. Die Peakbreiten nahmen mit kleinerem Partikeldurchmesser ab. Für 30 µm ergaben sich 0,6/0,9 min, für 20 µm 0,5/0,8 min und für 10 µm 0,4/0,7 min (jeweils für SDZ RAD/Ciclosporin). Die Retentionszeiten wurden mit größerem Partikeldurchmesser des Füllmaterials zunehmend kürzer.

Die beiden Komponenten SDZ RAD und Ciclosporin sind im vorliegenden Fall nicht vollständig getrennt, was auf die im Vergleich zum entwickelten Routineverfahren (vgl. Abschnitt 2.1.1) kürzere analytische Säule zurückzuführen ist.

3.5 Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten

3.5.1 Stabilität von SDZ RAD

Während der Lagerung von SDZ RAD in Acetonitril bei 25 °C und 4 °C wurden über den Zeitraum einer Woche hinweg weder ein Substanzverlust noch eine qualitative Veränderung im Massenspektrum festgestellt. In Blut und deproteiniertem Blut konnte SDZ RAD bei 4 °C ohne Veränderung der Probe mindestens eine Woche gelagert werden, bei Raumtemperatur bis zu drei Tagen.

3.5.2 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion koeluierender Substanzen

Die möglichen Interferenzen bei zeitgleicher ESI-MS-Detektion verschiedener Analyten sind in den Abbildungen 39 bis 42 dargestellt. Die Signale von Sirolimus werden durch Ciclosporin konzentrationsabhängig abgesenkt (Abbildung 39). Hingegen wird das Signal von Ciclosporin durch die in der Probe vorhandenen Sirolimus-Konzentrationen nicht beeinträchtigt (Abbildung 40).

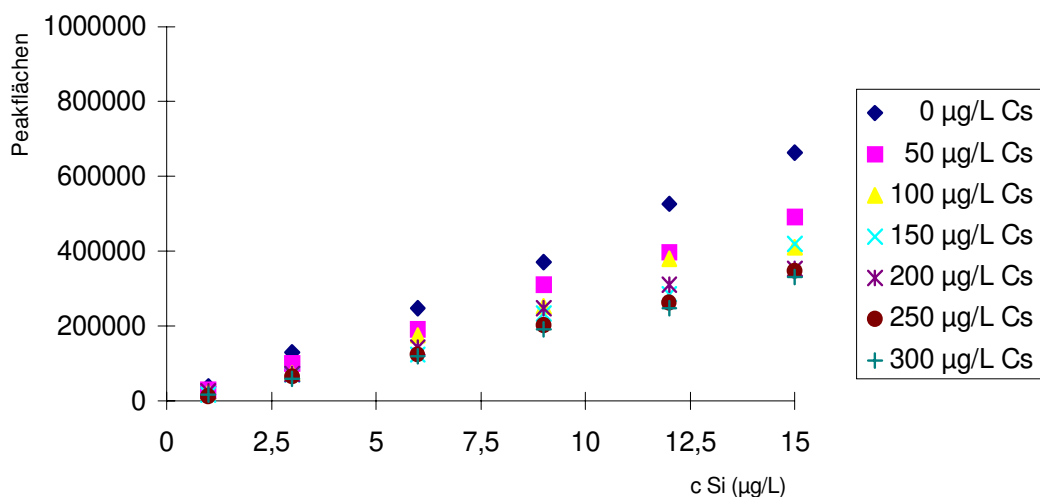


Abbildung 39: Sirolimus neben verschiedenen Ciclosporin-Konzentrationen, detektiert mit ESI-MS nach Fließinjektion

3 Ergebnisse

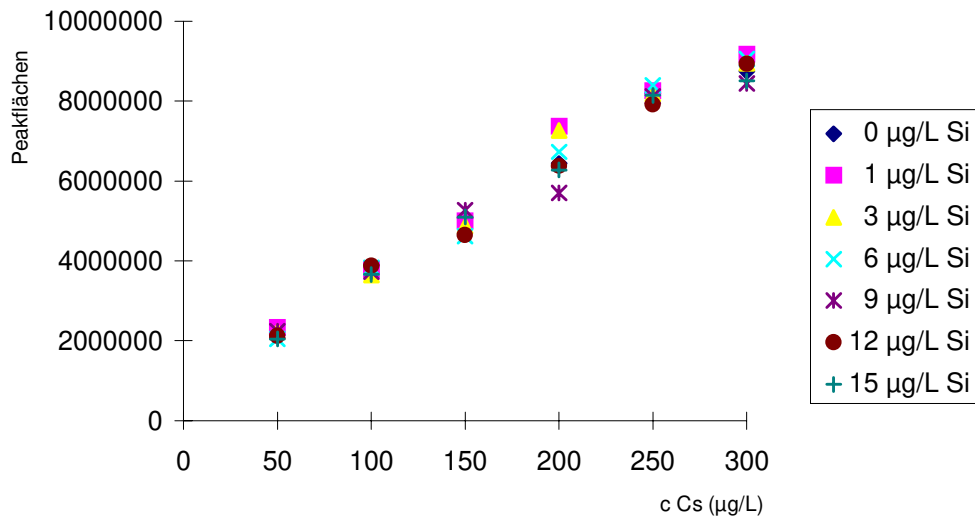


Abbildung 40: Ciclosporin neben verschiedenen Sirolimus-Konzentrationen, detektiert mit ESI-MS nach Fließinjektion

Werden die Komponenten vor der Detektion chromatographisch getrennt, kann sowohl eine kleine Konzentration an Sirolimus neben einem Überschuß an Ciclosporin als auch umgekehrt eine große Ciclosporin-Konzentration neben kleinen Mengen Sirolimus störungsfrei bestimmt werden (Abbildungen 41 und 42).

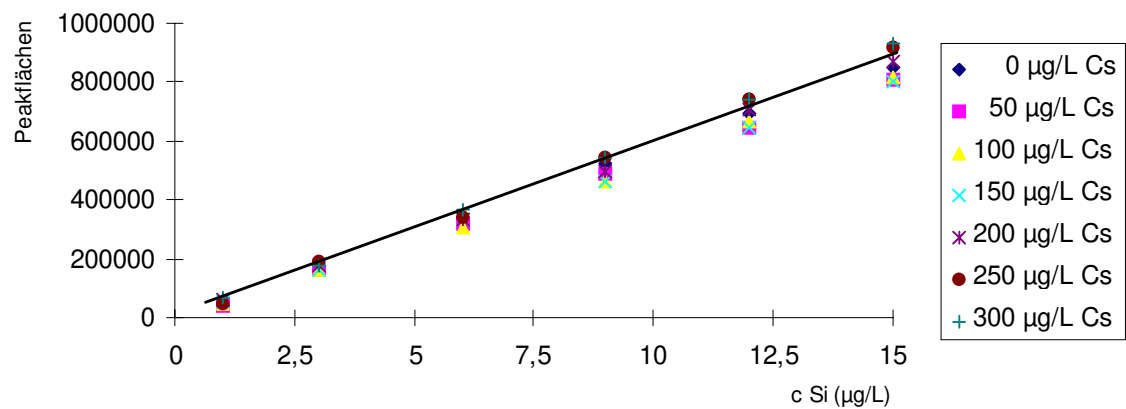


Abbildung 41: Sirolimus neben verschiedenen Ciclosporin-Konzentrationen, detektiert mit ESI-MS nach flüssigkeitschromatographischer Trennung

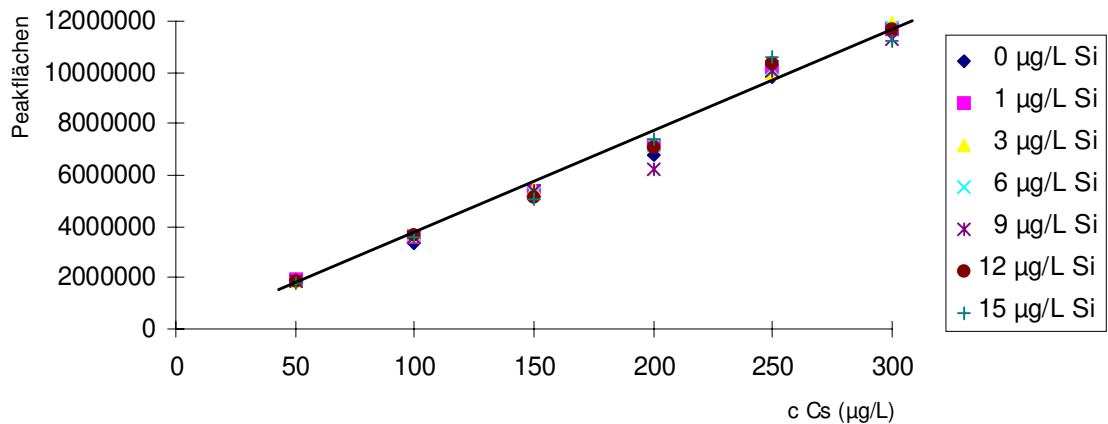


Abbildung 42: Ciclosporin neben verschiedenen Sirolimus-Konzentrationen, detektiert mit ESI-MS nach flüssigkeitschromatographischer Trennung

3.5.3 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren

Die möglichen Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren sind in den Abbildungen 43 bis 46 dargestellt. In keinem Fall konnte ein signifikanter Einfluß anderer Pharmaka auf den Meßwert der entsprechenden Referenzprobe ohne Zusatz eines der untersuchten Medikamente festgestellt werden.

Die Abbildungen 43 bis 46 enthalten Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen, von SDZ RAD (Abbildung 43), Sirolimus (Abbildung 44), Tacrolimus (Abbildung 45) und Ciclosporin (Abbildung 46) in Anwesenheit der untersuchten Pharmaka. Dabei ist der 95% Vertrauensbereich des ohne Zusatz gemessenen Werts mit seiner doppelten Standardabweichung markiert.

3 Ergebnisse

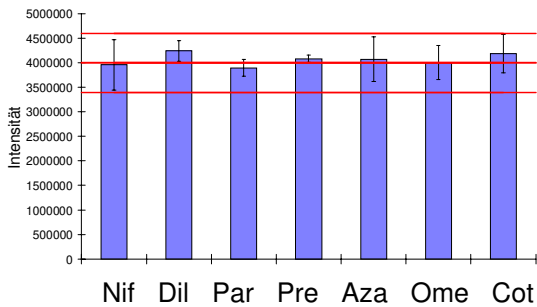


Abbildung 43: Einfluß anderer Pharmaka auf Meßwerte einer Blutprobe von 10 µg/L SDZ RAD (n=3)

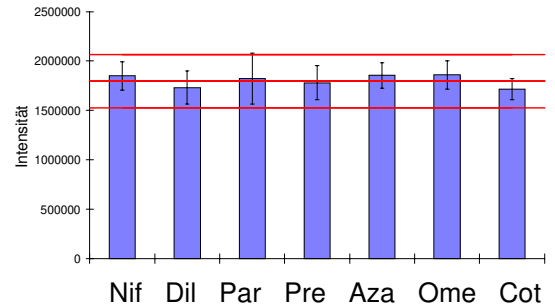


Abbildung 44: Einfluß anderer Pharmaka auf Meßwerte einer Blutprobe von 10 µg/L Sirolimus (n=3)

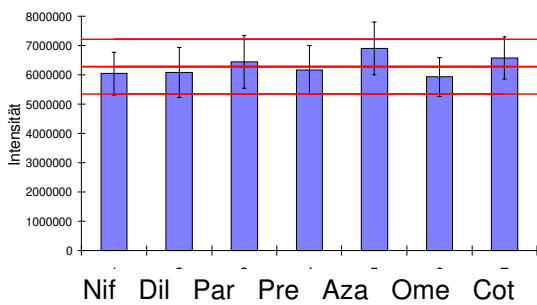


Abbildung 45: Einfluß anderer Pharmaka auf Meßwerte einer Blutprobe von 10 µg/L Tacrolimus (n=3)

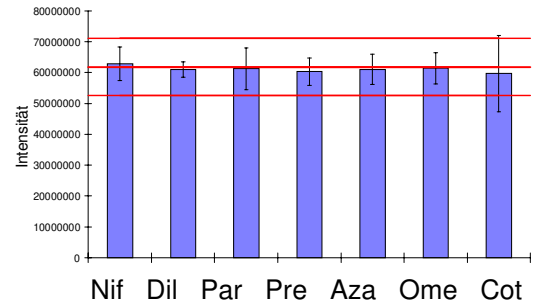


Abbildung 46: Einfluß anderer Pharmaka auf Meßwerte einer Blutprobe von 100 µg/L Cyclosporin (n=3)

Die verwendeten Wirkstoffe waren: 120 ng/mL Nifedipin (Nif), 200 ng/mL Diltiazem (Dil), 12 µg/mL Paracetamol (Par), 1 µg/mL Prednisolon (Pre), 2 µg/mL Azathioprin (Aza), 1,5 µg/mL Omeprazol (Ome) und Cotrimoxazol (Cot): 5 µg/mL Trimethoprim und 25 µg/mL Sulfamethoxazol.

4 Diskussion

4.1 *Das automatisierte analytische Routineverfahren für Makrolid-Immunsuppressiva*

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens, das möglichst universell auf die drei wichtigsten Makrolid-Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und SDZ RAD anwendbar sein sollte. Neben der Möglichkeit, die klinisch relevante Simultanbestimmung von Sirolimus bzw. SDZ RAD und Ciclosporin durchführen zu können, deren Arbeitsbereiche sich um eine Größenordnung unterscheiden, sollte das Verfahren auch ein Maximum an Flexibilität hinsichtlich einer Anpassung des Arbeitsbereichs erlauben, was für verschiedenartige Untersuchungen unerlässlich ist. Außerdem sollte ein hoher Probendurchsatz möglich sein. Gleichzeitig waren auch Gesichtspunkte der Wirtschaftlichkeit zu berücksichtigen. Wie die Validierungsdaten zeigen, erfüllt das entwickelte Verfahren auf der Basis von LC/ESI-MS die geforderten Kriterien hinsichtlich Nachweisstärke, Reproduzierbarkeit, Selektivität und Probendurchsatz.

Für die Bestimmung von Tacrolimus und Sirolimus gibt es zahlreiche analytische Methoden [32, 33, 34]. Verfahren zur Bestimmung von SDZ RAD aus biologischen Matrices wurden bisher noch nicht beschrieben. Aufgrund des Fehlens einer ausreichend chromophoren Gruppierung, die die UV-Detektion ermöglichen würde, wird mit HPLC-UV bei den Makrolid-Immunsuppressiva die unter klinischen Bedingungen erforderliche Nachweisgrenze von $< 1 \mu\text{g/L}$ nicht erreicht. Auch mit Fluoreszenzdetektion, die zur Bestimmung von Tacrolimus eingesetzt wurde, wird die erforderliche Nachweisstärke nicht erreicht [35, 36]. Für Ciclosporin wurden zahlreiche analytische Techniken entwickelt, die meist auf HPLC mit UV-Detektion basieren, was für den klinisch relevanten Arbeitsbereich, der typischerweise zwischen 50 und 1000 $\mu\text{g/L}$ liegt, ein adäquater Ansatz ist [37, 38, 39, 40]. Für die Simultanbestimmung geeignet ist eine auf Elektrospray-Massenspektrometrie basierende Methodik.

Vorarbeiten mit Immunsuppressiva aus unserer und anderen Arbeitsgruppen zeigten be-

reits das Potential der Anwendung von HPLC/ESI-MS auf diese Substanzklasse [28, 41]. Die Bestimmung der Makrolide erfolgte dabei in allen Fällen aus Extrakten, die manuell und *offline* durch Festphasen- oder Flüssig-flüssig-Extraktion erhalten wurden. Elektrospray-MS war jeweils die Detektionsmethode der Wahl, da sie den massenspektrometrischen Zugang zu instabilen und hochpolaren Substanzen wie den Makroliden erlaubt.

Die Kopplung an das flüssigchromatographische System erwies sich als unkompliziert, und auch automatischer Über-Nacht-Betrieb verlief problemlos. Im SIM-Modus konnten die Komponenten interferenzfrei detektiert werden. Die stark bevorzugte Bildung des Natriumadduktes der Makrolidmoleküle, wie sie auch von anderen Autoren berichtet wird [3, 5], war für die routinemäßige Messung von Vorteil. Da unter den gewählten Bedingungen keine Fragmentierung auftrat, war die Gesamtintensität jeweils auf das (Quasi-)Molekularion konzentriert, so daß der SIM-Modus die geeignete Detektionsart darstellte [42]. TAYLOR et al. [41] verwendeten Tandem-Massenspektrometrie bei der Analyse von Tacrolimus in Blut. Da in den vorliegenden Untersuchungen keinerlei Interferenzen beobachtet wurden, war die Verwendung von MS/MS nicht erforderlich. Die Analyten konnten im gesamten therapeutisch relevanten Bereich bestimmt werden.

Alle Techniken für die chemische Analytik von Immunsuppressiva, die bisher publiziert wurden, erfordern manuelle oder zumindest *offline* ausgeführte Probenvorbereitung [28, 36, 37, 38, 39, 41]. Vor dem Hintergrund hoher Personalkosten und der Anforderungen an die Präzision wurde daher eine *online*-Probenvorbereitung ausgearbeitet, die durch Säulenschaltung unter Verwendung einer konventionellen C-18 Vorsäulenkartusche die gleichzeitige Aufreinigung und Anreicherung der Proben erlaubte. Mehrere Verfahren hierzu sind in der Literatur zur Bestimmung von Wirkstoffen in klinischen Anwendungen beschrieben [43, 44, 45, 46].

Erstmals wurde mit dem vorliegenden Verfahren eine *online*-Probenvorbereitung, der lediglich ein manueller Schritt zur Proteinfällung vorausgeht, in einen Prozeß zur direkten Wirkstoffbestimmung im Bereich der immunsuppressiven Therapie integriert. Konventionelle Probenvorbereitung ist ein äußerst kritischer Schritt innerhalb eines analytischen Verfahrens und damit eine mögliche Fehlerquelle [47]. Außerdem ist manuelle Probenaufbereitung zeitintensiv. Daher ist die automatisierte und *online* gekoppelte Ausführung

dieses Schritts *offline*-Prozeduren überlegen. Aufgrund der guten Präzision, die mit dem entwickelten analytischen System während Mehrfachinjektionen erzielt wurde, war die Verwendung eines internen Standards nicht notwendig. Auch andere Autoren nutzen diesen Vorteil der *online* ausgeführten Probenvorbereitung [46].

Der zur automatischen Probenaufreinigung und -anreicherung modifizierte Flüssigchromatograph erlaubte einen kontinuierlichen und störungsarmen Betrieb. Die Aufgabe großer Volumina mit einer 500 µL-Spritze war unproblematisch. Da deproteiniertes Blut derzeit die für die Bestimmung von Immunsuppressiva allgemein akzeptierte Matrix ist [36, 48, 49], war es nicht nötig, teure maßgeschneiderte Adsorbentien auf der Basis von *restricted access* Material [50] in der Extraktionskartusche einzusetzen [50, 51, 52]. Wie auch von anderen Autoren berichtet [46, 53, 54, 55], war die Kapazität konventionellen C-18-modifizierten Kieselgels für die vorliegende Fragestellung ausreichend. Im untersuchten Arbeitsbereich wurde keine Überladung der Vorsäule beobachtet. Die Wiederfindungsraten lagen im Bereich 80-100%. Selbst relativ polare Substanzen, wie Ciclosporin und Makrolide, wurden während der Anreicherung und Aufreinigung zurückgehalten. Durch Leerläufe nach je einer Serie von Kalibrierproben konnte gezeigt werden, daß keine *memory*-Effekte im Zusammenhang mit der Anreicherung auf der Vorsäule auftraten. Die Lebensdauer einer Extraktionskartusche reichte für mehr als 500 deproteinierte 400 µL Blutproben, was zeigt, daß der Waschschrift mit Wasser ausreichte, um Salze etc. zu entfernen. Die Rekonditionierung mit Methanol und Wasser erwies sich gleichfalls als adäquat. Im Hinblick auf die hohe Lebensdauer der Extraktionssäulen werden die Kosten an Verbrauchsmaterial bei der Aufreinigung praktisch vernachlässigbar. Durch zeitliches Verschränken von chromatographischer Trennung und Rekonditionieren der Vorsäule konnte direkt nach Beendigung eines chromatographischen Laufs erneut injiziert werden. Dadurch wurden der Probendurchsatz optimiert und der Verbrauch an Lösemitteln stark eingeschränkt.

Durch Elution der Analyten im *backflush*-Modus von der Extraktionssäule entstanden sehr schmale Peaks ohne Auftreten von *tailing*. Die Chromatogramme zeigten vollständig getrennte Peaks, was die automatische Auswertung und Integration erlaubte.

Der Vergleich der drei eingesetzten Makrolide (vgl. Abbildung 7, Seite 33) zeigte, daß die

Signalintensität bei der massenspektrometrischen Bestimmung mit Elektrospray-Ionisierung bei gleicher Konzentration der Analyten je nach Substanz erheblich differiert. Obwohl gleiche Konzentrationen der drei Makrolide eingesetzt wurden und die Wiederfindungsraten in der gleichen Größenordnung liegen, ergaben sich doch stark differenzierte Signalintensitäten. Hauptursache hierfür dürfte die unterschiedliche Desolvatisierung der Makrolidmoleküle sein, die zu verschiedenen großen Anteilen an „freiem“ detektierbarem Analyten führt [2]. Quantitative Vergleiche anhand von Signalhöhen oder Peakflächen sind aus diesem Grund bei ESI-Experimenten nur nach systematischen Voruntersuchungen zulässig.

4.2 Strukturaufklärung von Metaboliten von SDZ RAD

Die strukturelle Identifikation von SDZ RAD-Metaboliten war das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit. Bisher gibt es keine Untersuchungen zum Metabolismus von SDZ RAD. Die durchgeführten Strukturaufklärungsexperimente lieferten erste Informationen zum qualitativen Ablauf des Stoffwechsels des Wirkstoffes. ESI-MS konnte dabei als äußerst schonende Ionisierungstechnik eingesetzt werden, die – wie gezeigt wurde – bei Anwendung der Technik der kollisionsinduzierten Fragmentierung auch strukturelle Information liefert.

Entsprechend den vorliegenden Untersuchungen wird SDZ RAD durch humane Lebermikrosomen zu mindestens 20 Produkten metabolisiert. Dabei stellen Ringöffnung, Hydroxylierung und Demethylierung sowie mehrfache Kombinationen dieser Transformationen die vorherrschenden Stoffwechselwege dar. Obwohl die ring-geöffneten Produkte auch als Degradationsprodukte bekannt sind (Hauck, C.; persönliche Mitteilung, Basel (1997)), sind sie hier als das Ergebnis einer Biotransformation anzusehen, da sie ausschließlich in den mit Mikrosomen inkubierten Ansätzen gefunden wurden. Der Mechanismus der Ringöffnung könnte, ähnlich wie für Lovastatin gezeigt, unter Mitwirkung von Esterasen ablaufen, die in der menschlichen Leber vorhanden sind. Eine Beteiligung von Cytochrom P-450 kommt für diese enzymatische Reaktion nicht in Frage [56].

Bei der Untersuchung des Metabolismus des strukturell verwandten Sirolimus durch STREIT et al. waren ebenfalls Demethylierung und Hydroxylierung die wichtigsten Trans-

formationsschritte [57]. Der Metabolismus, der für Tacrolimus beschrieben wird, ist gleichfalls charakterisiert durch Demethylierungs- und Hydroxylierungsschritte [58]. In Analogie zur Metabolisierung von Tacrolimus und Sirolimus ist anzunehmen, daß die Demethylierung vorzugsweise an den Methoxygruppen auftritt.

Da die Transformationsprodukte unterschiedlich polar sind, wie sich an den deutlich verschiedenen Retentionszeiten zeigt, darf die Ionisierungswahrscheinlichkeit während des Elektrospray-Prozesses nicht als für alle Komponenten gleich angenommen werden. Da für die identifizierten Produkte keine Referenzmaterialien zur Verfügung standen und somit weder eine Kalibrierung durchgeführt noch die Wiederfindung bestimmt werden konnte, war eine Quantifizierung nicht möglich. In den bisherigen Untersuchungen zeigte sich, daß die Signalintensität bei der massenspektrometrischen Bestimmung mit Elektrospray-Ionisierung bei gleicher Konzentration der Analyten je nach Substanz erheblich differiert (vgl. Abschnitt 4.1). In der Praxis wurde bisher bei Verfahren mit *electron impact*-Ionisierung davon ausgegangen, daß der entscheidende Parameter im Zusammenhang mit der Ionisierungswahrscheinlichkeit die effektive Größe des jeweiligen Moleküls ist. Die Konsequenz hieraus war beispielsweise die Annahme, daß die Ionisierungswahrscheinlichkeit von Metaboliten, die sich im allgemeinen nur durch geringe strukturelle Modifikationen (typischerweise Demethylierung, Hydroxylierung) von der Muttersubstanz ableiten, praktisch gleichzusetzen sei mit derjenigen der Muttersubstanz. Daher konnten zumindest semi-quantitative Aussagen vor dem Hintergrund dieser Annahme getroffen werden. Bei der Elektrospray-Ionisierung fallen Einflüsse wie Polarität oder Solvatationsenergien der Analyten wesentlich stärker ins Gewicht, so daß quantitative Aussagen ohne entsprechende Voruntersuchungen nicht zulässig sind.

Die Verwendung der LC/MS-Kopplung zur direkten Strukturaufklärung der von der analytischen Säule eluierenden Substanzen löste gleichzeitig das Problem der Unterscheidung isobarer Analyten. STREIT et al. fraktionierten ihre Inkubationsextrakte mittels semi-präparativer *offline*-HPLC vor [57]. Diese Vorgehensweise erlaubt es jedoch nicht, zwischen Substanzen zu unterscheiden, die die gleiche Molekularmasse besitzen, sehr nahe beieinander eluieren und demnach in der gleichen Fraktion gesammelt wurden.

Die gewählten chromatographischen Bedingungen führten zu einer ausreichenden Tren-

nung der wichtigsten Metabolisierungsprodukte und erlaubten die Aufnahme von CID-Spektren zur eindeutigen strukturellen Identifizierung der Komponenten. Die Verwendung von Tandem-MS war nicht erforderlich; hinsichtlich der Vielzahl von Metaboliten mit gleicher Molekularmasse erscheint die adäquate flüssigchromatographische Trennung als notwendige Voraussetzung auch für MS/MS-Experimente, worauf auch in der Literatur immer wieder hingewiesen wird [3, 59]. Die Untersuchungen zeigten, daß eine Gradientenelution in Verbindung mit ESI angewendet werden kann, so daß auch komplexe Trennungen mit LC/ESI-MS zu bewältigen sind.

Im Verlauf der Untersuchungen zur strukturellen Identifikation von Metaboliten wurden einige mit der Meßtechnik verbundene Besonderheiten festgestellt, die für weiterführende Experimente von Bedeutung sein könnten. Mehrfach wurden doppelte Natriumadduktionen in Fällen gefunden, in denen die vorgeschlagene Struktur der entsprechenden Fragmente eine Carbonsäurefunktion enthielt. In einer solchen strukturellen Konstellation erscheint die Koordination eines zweiten Natriumkations als wahrscheinlich, da die Säurefunktion durch Abstraktion eines Protons mesomer stabilisiert werden kann, so daß ein Carboxylat-Anion entsteht, das leicht ein weiteres Natriumion koordinieren kann. Am Beispiel des Molekularions der ring-geöffneten Form von SDZ RAD, das als $[M-H+2 Na]^+$ (m/z 1020) im Spektrum auftritt, wird dieses Phänomen verdeutlicht.

Die Untersuchungen zeigten, daß unter den Bedingungen von CID Fragmentierung in der Hauptsache in Form von α -Brüchen stattfindet. ESI führt zu fein abgestuften Präferenzen bei der Bildung verschiedener (Alkali-) Addukt-Ionen. Vergleicht man die Spektren der ringgeöffneten Form von SDZ RAD und seines Dehydrates (siehe die Abbildungen 11 und 12), stellt man fest, daß im Spektrum des hydratisierten Derivats zwei zusätzliche Signale bei m/z 445 und 652 auftreten. Infolge der Ringöffnung und Einführung einer zusätzlichen Hydroxyfunktion scheint die Affinität für die Anlagerung von Kalium als zweites Alkali-Ion erhöht zu sein, was zur Bildung gemischter Alkaliaddukt-Ionen $[M-H+Na+K]^+$ führt, die im Spektrum als Signale bei m/z 429+16 and 636+16 auftreten.

Obwohl konventionelle ESI zu Spektren führt, die in der Hauptsache (Quasi-)Molekularionen aufweisen [3, 59], stellt die optionale Anwendung von CID im Skimmerbereich einen wichtigen Zugang zu struktureller Information dar. Die Tatsache, daß Fragmentierung

unter CID-Bedingungen nur zu einer begrenzten Anzahl von Bindungsbrüchen führt, kann als Beschränkung von Strukturaufklärungsexperimenten mit ESI-MS angesehen werden. Da das Kohlenstoffgerüst zwischen C(15) und C(27) unter den gewählten Bedingungen nicht aufbrach, erlaubten die CID-Spektren der mono-hydroxylierten Derivate von SDZ RAD keine eindeutige Identifizierung der Hydroxylierungsposition. Hinzu kommt, daß in einigen Fällen die Stabilität des Natrium-Adduktions der gefundenen Stoffwechselprodukte so groß war, daß die Fragmentationen in den Spektren nur mit geringer Intensität auftraten. In anderen Fällen, etwa bei den dihydroxylierten Stoffwechselprodukten war die vorhandene Analytmenge in den Proben so gering, daß die Gesamt-Signalintensität der Spektren ebenfalls sehr klein war. Für die Interpretation und detaillierte Aufklärung von Molekülstrukturen reichten die unter diesen Bedingungen gewonnenen Spektren nicht aus.

4.3 Methodisch wichtige Variablen und apparative Eigenschaften der ESI-Technik

4.3.1 Abhängigkeit der Signalintensität von den Gasflüssen im Interface

Heizgastemperatur und Heizgasfluß

Für die beiden untersuchten Laufmittelsysteme stieg die Signalintensität mit der Temperatur des Heizgases an und war im Bereich der maximalen Einstellung von 350 °C unter den gewählten Elutionsbedingungen maximal. Gleiche Ergebnisse erzielte HAU [1] an einem Interface mit heizbarer Transferkapillare. Für das Routineverfahren wurde daher eine Heizgastemperatur von 350 °C gewählt.

Um die möglichst vollständige Verdampfung des Laufmittels – 25 µL/min Acetonitril bzw. 200 µL/min des Lösemittelgemischs aus Methanol und Wasser – und die Desolvatisierung des Analyten zu erreichen, mußte die Heizleistung des Systems von 350 °C voll ausgeschöpft werden. Auch unter diesen Bedingungen nahm die Signalintensität nicht ab, so daß thermische Zersetzung des Analyten ausgeschlossen werden konnte. Hierbei ist zu beachten, daß zum einen die Einstellung am Heizregler nur die Heizleistung des Systems bestimmt, d.h. nur annähernd die tatsächliche Gastemperatur im Interface wiedergibt. Zum

anderen wirkt sich die im Interface herrschende Temperatur nur bedingt auf den Analyten selbst aus, da bei der Entfernung der Solvathülle dem betreffenden Molekül thermische Energie entzogen, es also abgekühlt wird. Die thermische Belastung der Analyten ist somit gering, was mit dazu beiträgt, daß ESI eine äußerst schonende Ionisierungsart darstellt, die auch auf thermisch labile Substanzen angewendet werden kann [7].

Vernebelungsgasdruck

Die Untersuchungen verdeutlichen, daß bei Verwendung einer LC-Flußrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Signalintensität mit höherem Vernebelungsgasdruck ansteigt, so daß für das Routineverfahren 560 kPa gewählt wurden. Wird ein Fluß von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet, ist der Einsatz einer pneumatischen Unterstützung von untergeordneter Bedeutung. Bereits bei 210 kPa Gasdruck wird die maximale Intensität erreicht, bei höheren Drücken machen sich auch hier – wie bereits beim Heizgas diskutiert – ungünstige aerodynamische Effekte bemerkbar und die Signalintensität nimmt ab.

4.3.2 Einfluß der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion

Bei der Untersuchung des Einflusses der Kapillarausgangsspannung auf die Detektion gab es bei allen drei Makroliden einen weiten Bereich, innerhalb dessen die Intensität des (Quasi-) Molekularions mit ansteigender Kapillarausgangsspannung kontinuierlich anstieg, ein Maximum durchlief und danach rasch abfiel.

Die Kapillarausgangsspannung hat entscheidenden Einfluß auf die Detektion der Analyten und ist damit einer der bestimmenden Parameter der massenspektrometrischen Messung. Die Ergebnisse zeigen, daß es sich um eine substanzspezifische Größe handelt, so daß der optimale Wert für jeden Analyten individuell bestimmt werden muß.

Durch Anlegen einer Spannung zwischen den Kapillarausgang und den ersten Skimmer (vgl. Abbildung 3, Seite 19) ist es möglich, die aus der Kapillare austretenden Ionen zu beschleunigen. Je nach Größe der Spannungsdifferenz wird die übertragene kinetische Energie unterschiedlich hoch sein. In gewissen Grenzen führt die Beschleunigung der Ionen zu einer Erhöhung der Signalintensität. Dies ist darauf zurückzuführen, daß es in der CID-Region, also dem Bereich des Vorvakuums, zu Stößen mit dem Restgas kommt. Im

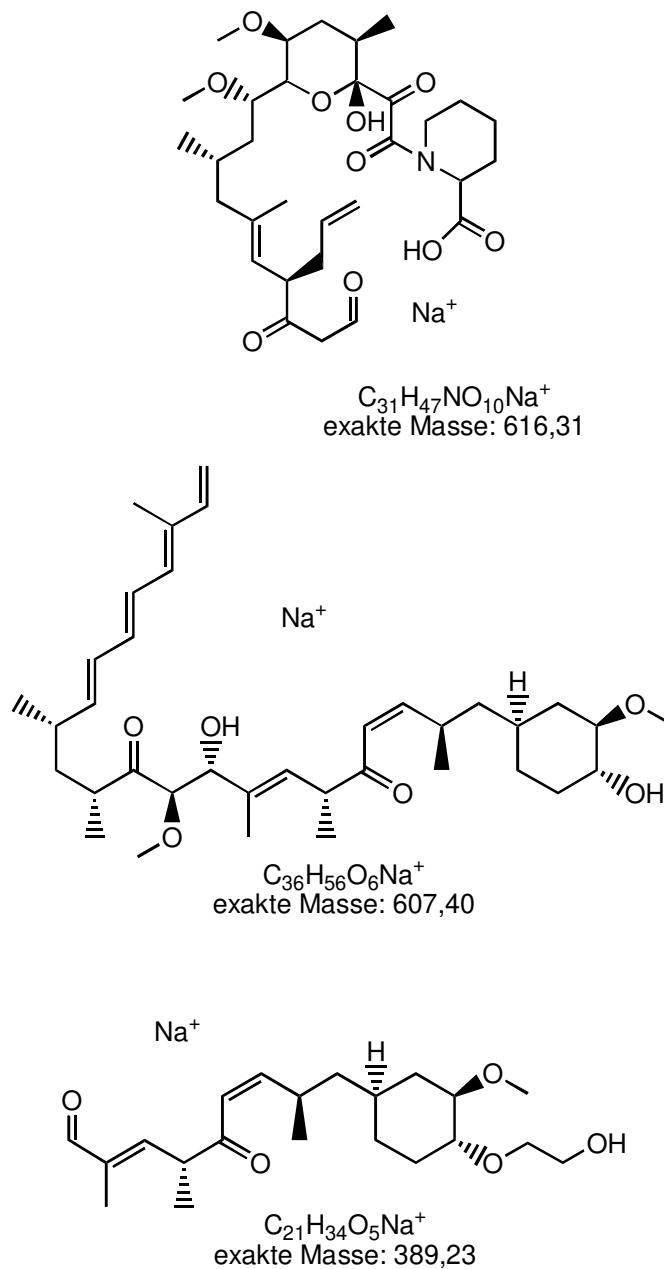


Abbildung 47: Hauptfragmente von a) Tacrolimus,
 b) Sirolimus und c) SDZ RAD unter CID-Bedingungen

m/z-Werte lassen sich Strukturvorschläge für die entstandenen Fragmentationen postulieren, die in Abbildung 47 dargestellt sind.

Die Intensität des intensivsten Fragmentations von Tacrolimus nimmt mit steigender Kapillarausgangsspannung wieder ab. Dies wird aus Abbildung 30 (Seite 55) deutlich. Mit steigender Kapillarausgangsspannung verschieben sich in den Spektren die Intensitäten

Bereich geringer Stoßenergien kommt es dabei zum sogenannten *collisional warming*, einer Übertragung thermischer Energie auf die Analytionen, was durch die Aufhebung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Entfernung noch vorhandener Moleküle aus der Solvathülle führt. Unter diesen Bedingungen erreichen verhältnismäßig mehr freie Ionen den Sekundärionenvervielfacher, so daß die Intensität ansteigt [59, 60].

Hier zeigt sich auch die unterschiedliche Stabilität der Adduktionen der drei untersuchten Makrolide: Während die Intensität des Hauptfragmentations von Tacrolimus bis auf etwa ein Drittel der maximalen Intensität des Mutterions ansteigt, bleiben bei Sirolimus und SDZ RAD die Fragmentintensitäten vergleichsweise gering. Für die während des Experiments beobachteten

zugunsten kleinerer Bruchstücke, da die beim Stoß übertragene Energie größer wird und daher auch mehrfache Bindungsbrüche stattfinden und kleinere Fragmentationen entstehen können.

4.3.3 Charakteristik der massenspektrometrischen Detektion

Um im Hinblick auf das Routineverfahren Informationen über den linearen Detektionsbereich und die optimale Flußrate zu erhalten, wurde die Signalabhängigkeit von der LC-Flußrate untersucht. Die Auswertung erfolgte hierbei über die Peakfläche und -höhe. Werden Fließinjektions-Experimente mit variabler Flußrate durchgeführt, muß die Peakhöhe als quantitatives Maß für die Signalintensität hinzugezogen werden, da bei höherer Flußrate die Peakflächen aufgrund der kürzeren zur Detektion der Substanz zur Verfügung stehenden Zeit kleiner werden. Umgekehrt führt eine Verringerung der Flußrate zu einer Vergrößerung der Peakflächen.

Wie bei einem konzentrationsabhängigen Detektor zu erwarten, nehmen die Peakflächen mit zunehmender Flußrate ab. Wie oben diskutiert, läßt die Betrachtung der Flächenwerte bei variabler Flußrate allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Signalintensität zu. Betrachtet man die entsprechenden Peakhöhen, so stehen die erhaltenen Ergebnisse im Widerspruch zur Theorie eines konzentrationsabhängigen Detektors, wonach bei konstanter Analytkonzentration für verschiedene Flußraten die gleiche Signalhöhe zu erwarten wäre. Unterhalb 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ steigt die Signalhöhe mit zunehmender Flußrate an, darüber geht sie kontinuierlich zurück. Dies zeigt, daß noch weitere Faktoren die Signalintensität beeinflussen.

Wesentlich dürften hier die bereits diskutierten Einflüsse von Heiz- und Vernebelungsgas sein. Bei kleinen Flußraten werden Vernebelungs- und Heizgasstrom – die im vorliegenden Experiment konstant gehalten und nicht an die jeweiligen Flußraten angepaßt wurden – die Transmission der Analytionen in das Massenspektrometer erheblich beeinträchtigen. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang in erster Linie aerodynamische Gründe, aber auch das bestehende Mißverhältnis der Volumina bei der Vernebelung geringer Flüssigkeitsmengen unter Anwesenheit sehr großer Gasmengen.

Werden große LC-Flußraten eingesetzt, läuft die Desolvatisierung nicht mehr so effizient

ab, so daß insgesamt weniger freie Analytionen vorliegen und die gemessene Intensität zurückgeht. Hieraus läßt sich die optimale Wahl von Flußraten bei der Kopplung an die HPLC ableiten. Demnach wird bei einer Flußrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ unter den gewählten Elutionsbedingungen die maximale Signalthöhe erreicht. Dies erfordert Säulendurchmesser kleiner 2 mm. Aus Gründen der Robustheit wurden für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten chromatographischen Systeme 2 mm-Säulen bei einer Flußrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingesetzt. Wie aus den Experimenten ersichtlich wurde, wird auch unter diesen Bedingungen eine hohe Signalintensität erzielt.

Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Detektion zeigte, daß die Verwendung der Peakflächen als quantitatives Maß einen größeren linearen Bereich abdeckt als die Auswertung der Peakhöhen. Der lineare Bereich für SDZ RAD erstreckt sich dabei über mindestens drei Dekaden von etwa 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 1 mg/mL , was für die spätere Festlegung des Arbeitsbereichs eine wichtige Vorabinformation darstellt.

Bei 10 mg/mL wurde eine überproportional große Peakfläche erhalten, die vor allem auf die große Peakbreite zurückgeht. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei einer solch hohen Konzentration die Spraykammer mit Analytionen gesättigt wird. Kontinuierlich wird aus dem Gasraum Probe in den Vakuumteil des Massenspektrometers überführt und ein entsprechendes Signal erhalten, das auf hohem Niveau bestehen bleibt, bis das Volumen des Gasraums ausreichend gespült ist. Bei der Bestimmung von Substanzen im Spurenbereich sind keine Störungen zu erwarten. Der Gasraum der Spraykammer wird durch Heiz- und Vernebelungsgas sowie das verdampfende Lösungsmittel ausreichend gespült. Nicht in das Massenspektrometer überführter Analyt wird rasch durch eine Öffnung im Boden der Spraykammer der Abluft zugeführt. Daher ist beim Einsatz von Konzentrationen im Spurenbereich die Kopplung mit HPLC möglich, bei der Signaländerungen in kurzen Zeitabständen aufgezeichnet werden müssen.

4.4 Ausarbeitung eines Extraktionsverfahrens

4.4.1 Abhängigkeit der Signalintensität vom Matrixanteil in der untersuchten Probe

Die bei der Untersuchung der Auswirkung der Matrix auf die ESI-MS-Detektion erzielten Ergebnisse zeigen deutlich die Notwendigkeit einer effizienten Probenaufreinigung, sofern die Bestimmung – wie beim Routineverfahren gefordert – aus biologischer Matrix erfolgen soll. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren, die bei ESI-MS-Detektion ebenfalls Intensitätseinbußen mit ansteigendem Salzgehalt von Proben feststellten. In der Literatur wird mehrfach darauf hingewiesen, daß die Verwendung der LC/MS-Kopplung bei ESI eine Grenze findet, sobald dem Eluenten Puffersalze in bestimmter Menge zugesetzt werden [3]. Die Abnahme der Signalintensität läßt sich auf zwei mögliche Ursachen zurückführen: Zum einen kann die starke Emission anorganischer Ionen aus den Tröpfchen des Sprays in Konkurrenz zur Freisetzung von Analytionen treten. Zum andern können Analytmoleküle bei der Desolvatisierung der Tröpfchen auch von auskristallisierenden Salzen eingeschlossen werden [3].

In das zu erarbeitende Routineverfahren für die Bestimmung von Makrolid-Immunsuppressiva aus deproteiniertem Blut mußte daher ein Aufreinigungsschritt integriert werden, der reproduzierbar die quantitative Entfernung der salzbelasteten Matrix erlaubte. Erreicht wurde dies durch die *online*-Extraktion (vgl. Abschnitt 2.1.1).

4.4.2 Abhängigkeit der Extraktionscharakteristik von der Partikelgröße des Füllmaterials der Kartusche

Erwartungsgemäß war bei einem Partikeldurchmesser von 10 µm wegen der größeren Adsorptionsoberfläche die Extraktionseffizienz deutlich größer als an Partikeln mit einem Durchmesser von 30 µm, was durch entsprechende Wahl von Kartuschen für die Routinebestimmung berücksichtigt wurde. Weitere physiko-chemische Faktoren wie die Packungsdichte oder die Porengröße des Füllmaterials bestimmen ebenfalls die Extraktionseffizienz, waren aber experimentell nicht zugänglich.

4.5 *Eigenschaften und Detektionsverhalten der Analyten*

4.5.1 Stabilität von SDZ RAD

Wie die experimentellen Ergebnisse zeigen, ist SDZ RAD unter den für die Praxis relevanten Bedingungen ausreichend stabil. Die Aufbewahrung bei Raumtemperatur über bis zu drei Tage – beispielsweise im automatischen Probengeber während einer Meßreihe – erwies sich als unkritisch. Stammlösungen von SDZ RAD in Acetonitril sollten einmal pro Woche frisch angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt werden.

4.5.2 Interferenzen bei zeitgleicher Detektion koeluierender Substanzen

Mit dem zu entwickelnden Verfahren sollte ein möglichst hoher Probendurchsatz ermöglicht werden. Dieses Bestreben stößt an eine Grenze, da aufgrund der auftretenden Interferenzen bei der Detektion koeluierender Substanzen auf eine chromatographische Trennung nicht verzichtet werden kann. Entsprechend einer Modellvorstellung, nach der die Analyten im ESI-Interface um die Ionisierung konkurrieren, sind unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen Analyten zu den adduktbildenden Ionen (z.B. Protonen, Alkali- oder Ammonium-Ionen) als Ursache für die Interferenzen anzusehen. Daher war die effektive flüssigkeitschromatographische Trennung unabdingbarer Bestandteil des zu entwickelnden Bestimmungsverfahrens.

In der Literatur ist dieser Aspekt bisher nur in Zusammenhang mit anderen massenspektrometrischen Techniken diskutiert worden. So berichtete LEHMANN über ähnliche Beobachtungen bei Experimenten mit FAB-MS [3]. Für chemisch sehr ähnliche Verbindungen hält LEHMANN eine Gemischanalyse ohne Vortrennung für zulässig. Dies ist jedoch nicht generalisierbar, da, wie das Beispiel von Sirolimus und SDZ RAD zeigt, selbst ein vergleichsweise geringfügiger Unterschied im Molekülaufbau (hier die Addition einer Hydroxyethyl-Funktion) große Unterschiede in der Elektrospray-Detektion zur Folge haben kann (vgl. Abschnitt 4.1).

4.5.3 Prüfung der Interferenzen anderer Pharmaka mit dem Nachweisverfahren

Die Untersuchungen zeigten, daß auch Blutproben von transplantierten Patienten, die neben Immunsuppressiva eine Komedikation aufgrund weiterer Indikationen erhalten, störungsfrei gemessen werden können. Bei keiner der ausgewählten Komedikationen wurde bei der statistischen Überprüfung eine signifikante Abweichung vom entsprechenden Referenz-Meßwert der ohne Zugabe eines Komedikaments vermessenen Proben festgestellt.

Allerdings kann diese Aussage nur auf die hier exemplarisch ausgewählten Vertreter der jeweiligen Wirkstoffklassen bezogen werden. Bei der Vielzahl an unterschiedlichen Medikamenten können die Untersuchungen nur beispielhaft das experimentelle Vorgehen aufzeigen. Im Einzelfall sind weitere Experimente notwendig, um mögliche Interferenzen anderer Wirkstoffe ausschließen zu können.

Wie bereits diskutiert wurde, ist die ESI-Detektion grundsätzlich anfällig gegenüber Störungen, wenn Substanzen koeluieren. Auch wenn weitere in der Probe enthaltene Komponenten nicht massenspektrometrisch erfaßt werden, aber gleiche Retentionszeiten haben und zeitgleich ins Interface gelangen, können sie zur Ionisierung der eigentlichen Analyten in Konkurrenz treten. Daher ist für die zuverlässige Beurteilung eines Meßwerts die Kenntnis der gleichzeitig verabreichten Arzneimittel erforderlich.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung eines routinetauglichen, weitgehend automatisierten Bestimmungsverfahrens für drei wichtige Wirkstoffe aus der Gruppe der Makrolid-Immunsuppressiva – Tacrolimus (FK-506), Sirolimus (Rapamycin) und SDZ RAD (40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin). Ciclosporin, ein zyklisches Peptid, das in Kombination mit Sirolimus und SDZ RAD ebenfalls als Immunsuppressivum im Einsatz ist, kann simultan bestimmt werden. Die Kalibrierfunktion für SDZ RAD bzw. Ciclosporin ist linear von 0,15-30 $\mu\text{g/L}$ bzw. 1,5-1000 $\mu\text{g/L}$. Der Arbeitsbereich kann in weiten Grenzen den klinischen Anforderungen angepaßt werden. Im kontinuierlichen Betrieb wurden mehr als 500 Proben mit einem Durchsatz von vier pro Stunde gemessen. Das beschriebene Verfahren kommt ohne zeitaufwendige Probenvorbereitungsschritte aus, die Präzision ist durch die Automatisierung hoch. Es zeichnet sich gegenüber anderen analytischen Ansätzen bei ähnlichen Fragestellungen durch hohen Probendurchsatz, hohe Reproduzierbarkeit und Anwenderfreundlichkeit aus. Im besonderen eignet es sich für große Probenserien im kontinuierlichen Betrieb. Mit dem Verfahren können Patientenproben routinemäßig vermessen werden, etwa zur Bestimmung pharmakokinetischer Profile oder im Rahmen eines *drug monitoring* zur individuellen Dosisanpassung.

Desweiteren wurde die Elektrospray-Technik zur Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten des neuentwickelten Immunsuppressivums SDZ RAD eingesetzt. Es wurde gezeigt, daß ESI-MS in Verbindung mit der CID-Technik ein leistungsstarkes Instrument zur Strukturaufklärung unbekannter Substanzen in komplexen Mischungen darstellt. Insbesondere für thermisch labile und stark polare Analyten ist ESI-MS anderen Ionisierungstechniken überlegen und ist in vielen Fällen sogar der einzig praktikable Ansatz für massenspektrometrische Messungen.

Für den Stoffwechsel von SDZ RAD wurden die Ringöffnung, Hydroxylierung und Demethylierung als wichtigste Transformationswege identifiziert. Die Strukturen von 16-O-Demethyl-SDZ RAD, der ring-geöffneten Form von SDZ RAD sowie des entsprechenden Dehydrates konnten aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurden mehrere demethylierte und

hydroxylierte Stoffwechselprodukte charakterisiert.

Im Verlauf der Methodenentwicklung wurden einige grundlegende Experimente zur ESI-Technik durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß die Ausbildung des Sprays und die sich daran anschließende Desolvatisierung des Analyten den wesentlichen Schritt des ESI-Prozesses darstellen. Die Parameter für das Heiz- und Vernebelungsgas bestimmen maßgeblich den Ablauf des Ionisierungsprozesses, insbesondere bei Verwendung HPLC-typischer Flußraten.

Die Kapillarausgangsspannung hat entscheidenden Einfluß auf die Detektion der Analyten und ist damit einer der bestimmenden Parameter der massenspektrometrischen Messung. Es handelt sich dabei um eine substanzspezifische Größe, die für jeden Analyten sorgfältig zu optimieren ist.

Wie die Ergebnisse zeigten, kann ein Anteil von nur 20% der deproteinierten Blutmatrix in Proben eine Reduzierung der Signalintensität um mehr als 80% verursachen. Die quantitative Entfernung salzbelasteter Matrices ist daher essentiell für jedes auf ESI basierende Bestimmungsverfahren.

Schließlich wurde gezeigt, daß die direkte Fließinjektion von Gemischproben ins ESI-Interface nicht ohne systematische Voruntersuchungen zulässig ist. Eine saubere Quantifizierung ohne Interferenzen ist nur nach chromatographischer Trennung der Komponenten möglich. Ebenso wurde gezeigt, daß die Kenntnis gleichzeitig verabreichter Pharmaka für die zuverlässige Beurteilung eines Meßwerts erforderlich ist. Auch hier sind jeweils entsprechende Voruntersuchungen auf mögliche Interferenzen nötig.

Ausgehend von den erzielten Ergebnissen sollte es möglich sein, das entwickelte Routineverfahren zur Bestimmung von Makrolid-Immunsuppressiva auch auf andere Wirkstoffgruppen anzuwenden. Einzelne Module des analytischen Verfahrens könnten für ähnliche Applikationen genutzt werden, etwa die *online*-Probenvorbereitung für eine Einzelbestimmung von Ciclosporin mit HPLC/UV. Nicht zuletzt sollte es problemlos möglich sein, Stoffwechselprodukte der Analyten – etwa die strukturell identifizierten Transformationsprodukte von SDZ RAD – in das routineanalytische Verfahren zu integrieren. Hinsichtlich der chromatographischen Trennung besitzt das ausgearbeitete System hohe Variabilität. Für komplexe Gemische könnte ggf. eine Gradientenelution eingesetzt werden. Problem

bei der Einbeziehung von Metaboliten, die nicht als Reinsubstanz erhältlich sind, ist die Quantifizierung.

Der in der vorliegenden Arbeit ausgearbeitete Ansatz zur Strukturaufklärung mit LC/ESI-MS unter Einsatz der CID-Technik bildet eine solide methodische Basis für weiterführende Forschungsarbeiten. Über die Untersuchungen an SDZ RAD hinaus sollte die methodische Vorgehensweise auch in vergleichbaren Fällen die Charakterisierung von Substanzen in komplexen Gemischen und biologischen Matrices erlauben. Insgesamt zeigten die Untersuchungen, daß bei weiterführenden LC/ESI-MS-Experimenten der Schwerpunkt der Optimierung eher im Bereich der LC-Trennung als bei den technischen Parametern in Zusammenhang mit der Massenspektrometrie liegen sollte.

Zusätzliche NMR-Experimente, wie sie WANG et al. für Sirolimus-Metaboliten [61] und IWASAKI et al. für die Transformationsprodukte von Tacrolimus [58] ausführten, könnten die Unterscheidung von Strukturisomeren wie z.B. der mono-hydroxylierten Spezies ermöglichen. Limitierender Faktor ist hierbei jedoch die zur Verfügung stehende absolute Substanzmenge, die für kernresonanz-spektroskopische Experimente im Milligramm-Bereich liegen muß. Da der Stoffumsatz bei der *in vitro*-Metabolisierung relativ gering ist, müßten Absolutmengen eingesetzt werden, die derzeit nicht verfügbar sind.

Die Elektrospray-Massenspektrometrie ist für viele Anwendungen aus den verschiedensten Bereichen der Medizin attraktiv. Sie wird allerdings bisher nur von wenigen Instituten genutzt. Dennoch findet die Technik derzeit rasche Verbreitung, und eine Vielzahl neuer Anwendungsfelder wird erschlossen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich die Methodik noch in einem Pionierstadium befindet, in dem die theoretischen Hintergründe vieler Effekte noch unverstanden sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Hau, J.
Ionisation bei Atmosphärendruck
Dissertation, Dortmund (1994)
2. Tomer, K.B.; Parker, C.E.
Biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. 492 (1989) 189-221
3. Lehmann, W.D.
Massenspektrometrie in der Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford (1996)
4. Schmeer, K.
Einsatzmöglichkeiten von Elektrospray-Massenspektrometrie und ihren Kopplungen in
Chemie und Biochemie
Dissertation, Tübingen (1995)
5. Parker, C.E.; Perkins, J.R.; Tomer, K.B.; Shida, Y.; O'Hara, K.; Kono, M.
Application of nanoscale packed capillary liquid chromatography (75 μm id) and
capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry to the Analysis
of macrolide antibiotics
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3 (1992) 563-574
6. Gonschior, A.-K.; Christians, U.; Winkler, M.; Linck, A.; Baumann, J.; Sewing, K.-Fr.
Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant
patients
Clin. Chem. 42 (1996) 1426-1432
7. Tang, L.; Kebarle, P.
Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current.
Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry
Anal. Chem. 63 (1991) 2709-2715

8. Hopfgartner, G.; Wachs, T.; Bean, K.; Henion, J.
High-flow ion spray liquid chromatography/mass spectrometry
Anal. Chem. 65 (1993) 439-446
9. Dole, M.; Mack, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B.
Molecular beams of macroions
J. Chem. Phys. 49 (1968) 2240-2249
10. Clegg, G.A.; Dole, M.
Molecular beams of macroions. III. Zein and polyvinylpyrrolidone
Biopolymers 10 (1971) 821-826
11. Yamashita, M.; Fenn, J.B.
Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme
J. Phys. Chem. 88 (1984) 4451-4459
12. Yamashita, M.; Fenn, J.B.
Negative ion production with the electrospray ion source
J. Chem. Phys. 88 (1984) 4671-4675
13. Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.)
Römpp Chemie Lexikon
9., erweiterte und neubearbeitete Auflage 1995 (Bd. 4), Georg Thieme Verlag Stuttgart,
New York
14. Myers, B.D.
Cyclosporine nephrotoxicity
Kidney Int. 30 (1986) 964-974
15. Mason, J.
The pathophysiology of Sandimmune (cyclosporine) in man and animals
Pediatr. Nephrol. 4 (1990) 554-574
16. Racusen, L.C.; Solez, K.
Cyclosporine nephrotoxicity
Int. Rev. Exp. Pathol. 30 (1988) 107-157

- 17.Thompson, C.B.; June, C.H.; Sullivan, E.M.; Thomas, E.D.
Association between cyclosporine neurotoxicity and hypomagnesemia
Lancet 2 (1984) 1116-1120
- 18.Schachter, M.
Cyclosporine A and hypertension
J. Hypertens. 6 (1988) 511-516
- 19.Neu, H.C.; Young, L.S.; Zinner, S.H. (Ed.)
The new macrolides, azalides, and streptogramins - pharmacology and clinical applications
New York (1992)
- 20.Abu-Elmagd, K.; Fung, J.J.; Alessiani, M.; Jain, A.; Venkataramanan, R.; Warty, V.S.;
Takaya, S.; Todo, S.; Shannon, W.D.; Starzl, T.E.
The effect of graft function on FK506 plasma levels, dosages, and renal function, with
particular reference to the liver
Transplantation 52 (1991) 71-77
- 21.McCauley, J.; Fung, J.; Jain, A.; Todo, S.; Starzl, T.E.
The effects of FK506 on renal function after liver transplantation
Transplant. Proc. 22 (1990) 17-20
- 22.Morris, R.E.
Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive
macrolides
Transplant. Rev. 6 (1992) 39-87
- 23.Freeman, D.J.; Stawecki, M.; Howson, B.
Stability of FK 506 in whole blood samples
Ther. Drug Monit. 17 (1995) 266-267
- 24.Annesley, T.M.; Hunter, B.C.; Fidler, D.R.; Giacherio, D.A.
Stability of tacrolimus (FK 506) and cyclosporin G in whole blood
Ther. Drug Monit. 17 (1995) 361-365

25. Jusko, W.J.; Thomson, A.W.; Fung, J.; McMaster, P.; Wong, S.H.; Zylber-Katz, E.; Christians, U.; Winkler, M.; Fitzsimmons, W.E.; Liebermann, R.; McBride, J.; Kobayashi, M.; Warty, V.; Soldin, S.J.
Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506)
Ther. Drug Monit. 17 (1995) 606-614
26. Taylor, P.J.; Jones, A.; Balderson, G.A.; Lynch, S.V.; Norris, R.L.G.; Pond, S.M.
Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry
Clin. Chem. 42 (1996) 279-285
27. Yatscoff, R.W.; Faraci, C.; Bolingbroke, P.
Measurement of rapamycin in whole blood using reverse-phase high-performance liquid chromatography
Ther. Drug Monit. 14 (1992) 138-141
28. Streit, F.; Christians, U.; Schiebel, H.-M.; Napoli, K.L.; Ernst, L.; Linck, A.; Kahan, B.D.; Sewing, K.-Fr.
Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry
Clin. Chem. 42 (1996) 1417-1425
29. v. Bruchhausen, F. (Hrsg.)
Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis
5., vollst. neubearb. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1990)
30. Kümmerle, H.P.
Klinisch-Pharmakologische Arzneimittelprofile. Datenhandbuch für Klinik und Praxis
4. Auflage, ecomed, Landsberg (1984)
31. DIN 32 645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze – Ermittlung unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung
Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin (1994)

32. Christians, U.; Braun, F.; Kosian, N.; Schmidt, M.; Schiebel, H.M.; Ernst, L.; Kruse, C.; Winkler, M.; Holze, I.; Linck, A.; Sewing, K.-Fr.
High performance liquid chromatography/mass spectrometry of FK 506 and its metabolites in blood, bile, and urine of liver grafted patients
Transplant. Proc. 23 (1991) 2741-2744
33. Gonschior, A.-K.; Christians, U.; Winkler, M.; Schiebel, H.M.; Linck, A.; Sewing, K.-Fr.
Simplified high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for measurement of tacrolimus and its metabolites and cross-validation with microparticle enzyme immunoassay
Ther. Drug Monit. 17 (1995) 504-510
34. Takada, K.; Oh-Hashi, M.; Yoshikawa, H.; Muranishi, S.
Determination of a novel immunosuppressant (FK-506) in rat serum and lymph by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection
J. Chromatogr. 530 (1990) 212-218
35. Beysens, A.J.; Beumann, G.H.; van der Heijden, J.J.; Hoogtanders, K.E.J.; Steijger, O.M.; Lingeman, H.
Determination of tacrolimus (FK 506) in whole blood using liquid chromatography and fluorescence detection
Chromatographia 39 (1994) 490-495
36. Yatscoff, R.W.; Faraci, C.; Bolingbroke, P.
Measurement of rapamycin in whole blood using reverse-phase high-performance liquid chromatography
Ther. Drug Monit. 14 (1992) 138-141
37. Christians, U.; Zimmer, K.O.; Wonigeit, K.; Maurer, G.; Sewing, K.-Fr.
Liquid-chromatographic measurement of cyclosporine A and its metabolites in blood, bile and urine
Clin. Chem. 34 (1988) 34-39

38. Christians, U.; Zimmer, K.O.; Wonigeit, K.; Sewing, K.-Fr.
Measurement of cyclosporine A and four metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 413 (1987) 121-129
39. Christians, U.; Sewing, K.-Fr.
Whole blood sample clean-up for chromatographic analysis
Transplant. Proc. 20 (1988) 609-613
40. Oldhafer, K.J.; Schumann, G.; Wonigeit, K.; Oellerich, M.; Ringe, B.; Pichlmayr, R.
Cyclosporine A monitoring by radioimmunoassay (RIA) and high-performance liquid chromatography (HPLC) after liver transplantation: influence of route of administration and of liver function on the RIA:HPLC ratio
Transplant. Proc. 20 (1988) 361-365
41. Taylor, P.J.; Jones, A.; Balderson, G.A.; Lynch, S.V.; Norris, R.L.G.; Pond, S.M.
Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry
Clin. Chem. 42 (1996) 279-285
42. Windig, W.; Phalp, J.M.; Payne, A.W.
A noise and background reduction method for component detection in liquid chromatography/mass spectrometry
Anal. Chem. 68 (1996) 3602-3606
43. Dow, J.; Lemar, M.; Frydman, A.; Gaillot, J.
Automated high-performance liquid chromatographic determination of spiramycin by injections of plasma, using column-switching for sample clean-up
J. Chromatogr. 344 (1985) 275-283
44. De Jong, J.; Munniksmas, C.N.; Guérand, W.S.
Fully automated determination of a new anthracycline N-1-leucyldoxorubicin and six metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with on-line sample handling
J. Chromatogr. 574 (1992) 273-281

45. Kato, Y.; Kaneko, H.; Matsushita, T.; Inamori, K.; Egi, S.; Togawa, A.; Yokoyama, T.; Mohri, K.
Direct injection analysis of melphalan in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography
Ther. Drug Monit. 14 (1992) 66-71
46. Müller, H.; Zulliger, H.W.; Dörig, B.A.; Egli, R.A.
Quantitative determination of suprofen in human plasma and urine by fully automated high-performance liquid chromatography
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 32 (I) (1982) 257-260
47. Roth, W.; Beschke, K.; Jauch, R.; Zimmer, A.; Koss, F.W.
Fully automated high-performance liquid chromatography. A new chromatograph for pharmacokinetic drug monitoring by direct injection of body fluids
J. Chromatogr. 222 (1981) 13-22
48. Yatscoff, R.; Shaw, L.
Therapeutic drug monitoring of cyclosporine, FK506, and rapamycin [Editorial]
Ther. Drug Monit. 14 (1992) 267-268
49. Yatscoff, R.; LeGatt, D.; Keenan, R.; Chackowsky, P.
Blood distribution of rapamycin
Transplantation 56 (1993) 1202-1206
50. Lubda, D.; Wieland, G.; Battermann, G.; Müller, M.; Boos, K.-S.
Integration der Probenaufbereitung in die HPLC
LaborPraxis 20 (1996) 44-49
51. Lubda, D.; Meyer, B.; Wieland, G.; Grimm, C.-H.; Boos, K.-S.
HPLC-integrierte Festphasenextraktion und Analyse biologischer Proben, Teil I: Maßgeschneiderte Adsorbentien und Methodenerstellung
GIT LaborMedizin 19 (1996) 202-209

52. Juergens, U.H.

Analysis of sulthiame in serum by narrow-bore high-performance liquid chromatography. Comparison of direct sample injection with pre-column switching and extrelut extraction

J. Chromatogr. 553 (1991) 7-13

53. Nazareth, A.; Jaramillo, L.; Karger, B.L.; Giese, R.W.

Automated analysis of antiepileptic drugs in serum by column-switching high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. 309 (1984) 357-368

54. Juergens, U.

Routine determination of eight common anti-epileptic drugs and metabolites by high-performance liquid chromatography using a column-switching system for direct injection of serum samples

J. Chromatogr. 310 (1984) 97-106

55. Daoud, N.; Arvidsson, T.; Wahlund, K.-G.

Precolumn-venting plug technique for direct injection of untreated blood plasma samples into reversed-phase liquid chromatographic systems

J. Chromatogr. 385 (1987) 311-322

56. Tang, B.-K.; Kalow, W.

Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver

Eur. J. Clin. Pharmacol. 47 (1995) 449-451

57. Streit, F.; Christians, U.; Schiebel, H.-M.; Meyer, A.; Sewing, K.-Fr.

Structural identification of three metabolites and a degradation product of the macrolide immunosuppressant sirolimus (rapamycin) by electrospray-MS/MS after incubation with human liver microsomes

Drug Metab. Dispos. 24 (1996) 1272-1278

58. Iwasaki, K.; Shiraga, T.; Nagase, K.; Tozuka, Z.; Noda, K.; Sakuma, S.; Fujitsu, T.; Ahimatani, K.; Sato, A.; Fujioka, M.
Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone
Drug Metab. Dispos. 21 (1993) 971-977
59. Voyksner, R.D.; Pack, T.
Investigation of collisional-activation decomposition process and spectra in the transport region of an electrospray single-quadrupole mass spectrometer
Rapid Commun. Mass Spectrom. 5 (1991) 263-268
60. Covey, T.; Douglas, D.J.
Collision cross sections for protein ions
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4 (1993) 616-623
61. Wang, P. C.; Chan, K. W.; Schiksnis, R. A.; Scatina, J.; Sisenwine, S. F.
High-performance liquid-chromatographic isolation, spectroscopic characterization and immunosuppressive activities of two rapamycin degradation products
J. Liq. Chromatogr. 17 (1994) 3383-3392
62. Schwedt, G.
Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
63. DIN-ISO 5725-1: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen. Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe
Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin (1994)
64. DIN 38 402: Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A51)
Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin (1986)
65. Funk, W.; Dammann, V.; Donnevert, G.
Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie
Weinheim, New York, Basel, Cambridge (1992)

66. Currie, L.A.

Detection: international update, and some emerging dilemmas involving calibration, the blank and multiple detection decisions

Chemom. Intell. Lab. Syst. 37 (1997) 151-181

67. Currie, L.A.

Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities

Pure Appl. Chem. 67 (1995) 1699-1723

68. Currie, L.A.; Horwitz, W.

IUPAC recommendations for defining and measuring detection and quantification limits

Analusis 22 (1994) M24-M26

69. Kaiser, H.

Zur Definition der Nachweisgrenze, der Garantiegrenze und der dabei benutzten Begriffe

Z. Anal. Chem. 216 (1966) 80-94

70. Kaiser, H.; Specker, H.

Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren

Z. Anal. Chem. 149 (1956) 46-66

71. Kaiser, H.

Zum Problem der Nachweisgrenze

Z. Anal. Chem. 209 (1965) 1-18

72. Persson, B.-A.; Vessmann, J.; McDowall, R.D.

Is your method specific or just selective?

LC·GC Internat. 11 (1998) 160-164

73. den Boef, G.; Hulanicki, A.

Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry

Pure Appl. Chem. 55 (1983) 554-556

7 Anhang

7.1 *Maßnahmen der Qualitätssicherung*

Die Durchführung analytischer Messungen im medizinischen Bereich erfordert geeignete Maßnahmen der Qualitätssicherung. Auf diesen Aspekt ist um so mehr Sorgfalt zu verwenden, als das Ergebnis der Messung der Konzentration im Blut von Patienten direkt das weitere therapeutische Vorgehen bestimmen kann. Da sich die vorliegende Arbeit mit chemisch-analytischen Fragestellungen im medizinischen Bereich befaßt, sollen an dieser Stelle wichtige Gesichtspunkte und Maßnahmen der Qualitätssicherung beschrieben sowie einige Begriffe und Definitionen eingeführt werden.

Richtigkeit und Präzision

Wichtige Kenndaten eines analytischen Verfahrens werden mit den Begriffen **Richtigkeit** (*accuracy*) und **Präzision** (*precision*) beschrieben. Die Richtigkeit eines Analyseverfahrens beschreibt das Ausmaß systematischer Fehler, d.h. Abweichungen vom wahren Analysenergebnis in eine Richtung. Die Bestimmung der Richtigkeit ist mit großem Aufwand verbunden. Hierzu sind der Vergleich verschiedener voneinander unabhängiger Methoden, die vergleichende Analyse von Referenzmaterialien sowie der Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien notwendig. Diese Kriterien sind meist nur für bereits längere Zeit etablierte Methoden zu erfüllen. Wird – wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit – ein analytisches Verfahren für eine neue Substanz (-gruppe) entwickelt, steht normalerweise keine dieser Vergleichsmöglichkeiten zur Verfügung. In solchen Fällen müssen die Teilschritte des Verfahrens sorgfältig auf mögliche systematische Fehlerquellen untersucht werden.

Zufällige Fehler bestimmen die Präzision: Sie gibt in Form einer Standardabweichung Auskunft über das Ausmaß der Übereinstimmung von Ergebnissen, wenn eine Analysemethode bzw. ein Analyseverfahren wiederholt auf eine Probe angewendet wird. Hierbei ist zu unterscheiden zwischen der **Wiederholbarkeit** (*repeatability*) als Präzision einer

Methode bzw. eines Verfahrens bei Anwendung durch ein und denselben Mitarbeiter und der **Vergleichbarkeit** bei der Durchführung von verschiedenen Mitarbeitern oder in verschiedenen Laboratorien [62]. Der Begriff der **Reproduzierbarkeit** (*reproducibility*) wird begrifflich oftmals unscharf verwendet. Neuere Normen verwenden die Reproduzierbarkeit als Synonym für Vergleichbarkeit [63]. Der Begriff der **Genauigkeit** vereint in sich das Resultat aus Richtigkeit und Präzision.

Ein quantitatives Maß für die Präzision ist die Standardabweichung, die den Zufallsfehler des Verfahrens wiedergibt. Theoretisch ergibt sie sich aus der Betrachtung einer unendlichen Zahl von Meßwerten einer Probe. In der Praxis bedient man sich des entsprechenden Schätzwertes s_i für i Meßwerte, der im Sprachgebrauch im allgemeinen nicht von der Standardabweichung unterschieden wird:

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (1)$$

x_i	Meßwerte
\bar{x}	Mittelwert der Meßwerte
n	Anzahl der Meßwerte.

Auch in den folgenden Ausführungen wird zur sprachlichen Vereinfachung nicht mehr unterschieden zwischen dem Schätzwert und der eigentlichen Standardabweichung. Verbreitet ist auch die Verwendung des Begriffs der Varianz V . Sie ist das Quadrat der Standardabweichung:

$$V = s_i^2. \quad (2)$$

Praktisch bedeutsam, weil anschaulich, ist auch der Variationskoeffizient, der die Standardabweichung in ein prozentuales Verhältnis zum Mittelwert setzt:

$$VK\% = \frac{s_i}{\bar{x}} \cdot 100\%. \quad (3)$$

Kalibrierung: Linearität und Arbeitsbereich

Die Kalibrierung eines Verfahrens dient der Erstellung einer mathematischen Funktion, die die Zuordnung von Meßwerten (Peakflächen, counts etc.) zu Konzentrationen des Analyten erlaubt. Als Arbeitsbereich wird der Konzentrationsbereich zwischen kleinster und größter Standardkonzentration bezeichnet. Die Kalibrierkonzentrationen sollen äquidistant über den Arbeitsbereich verteilt sein [64].

Anhand von mindestens sechs Mehrfachbestimmungen der kleinsten und der größten Standardkonzentrationen werden die Standardabweichungen des Verfahrens an den beiden Arbeitsbereichsgrenzen bestimmt [31]. Mittels F-Test (mit festzulegendem Signifikanzniveau, i.d.R. 95% oder 99%) wird festgestellt, ob sich die beiden Standardabweichungen signifikant unterscheiden. Indiziert der F-Test keinen signifikanten Unterschied, so wird von Varianzhomogenität innerhalb des Arbeitsbereiches ausgegangen. Die Varianzhomogenität im Arbeitsbereich ist die Grundvoraussetzung, um eine statistisch abgesicherte Linearitätsprüfung und Ermittlung der Kenngrößen der Kalibrierfunktion durchführen zu können. Liegt keine Homogenität der Varianzen vor, so muß das zu prüfende Verfahren dahingehend optimiert oder der Arbeitsbereich eingeschränkt werden.

In einem nächsten Schritt muß eine Kalibrierfunktion für das Verfahren ermittelt werden. Dabei ist zu prüfen, ob diese im gewählten Arbeitsbereich linear ist. Hierzu wird anhand der erhaltenen Wertepaare durch Regressionsanalyse die Kalibrierfunktion ersten Grades:

$$y = a + bx$$

$$\begin{array}{ll} a & \text{y-Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion} \\ b & \text{Steigung der Kalibrierfunktion} \end{array} \quad (4)$$

berechnet. Aus der Reststandardabweichung $s_{y,x}$

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-2}} \quad (5)$$

$$\hat{y}_i \quad \text{geschätzter Funktionswert bei der} \\ \text{Kalibrierung: } \hat{y}_i = a + b \cdot x_i$$

ergibt sich die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :

$$s_{x0} = \frac{s_{y,x}}{a}. \quad (6)$$

Ebenso wird die Verfahrensstandardabweichung für die Kalibrierfunktion zweiten Grades

$$y = a + bx + cx^2 \quad (7)$$

berechnet. Die aus den jeweiligen Kalibrierfunktionen ermittelten Werte für s_{x0} werden mittels F-Test verglichen. Wird dabei festgestellt, daß die Verfahrensstandardabweichung der Kalibrierfunktion zweiten Grades nicht signifikant größer als die der linearen Funktion ist, so kann von einer linearen Kalibrierfunktion ausgegangen werden. Ansonsten stellt die Funktion zweiten Grades die bessere Näherung für die Kalibrierfunktion dar.

Die grafische Residualanalyse dient dazu, die Abweichungen (Residuen) der Meßwerte von den aus der Kalibrierfunktion berechneten Werten zu visualisieren. Die Residuen werden dabei gegen die Kalibrierkonzentrationen aufgetragen. An der Verteilung der Residuen um die Nulllinie können mögliche Trends oder Ausreißerwerte innerhalb einer Kalibrierung visuell erkannt werden. Potentielle Ausreißer werden mit dem Grubbs-Test gesondert überprüft und ggf. eliminiert.

Charakterisierung des unteren Grenzbereichs von Spurenanalysen

Von besonderer Bedeutung ist die Charakterisierung eines analytischen Verfahrens im unteren Grenzbereich von Spurenanalysen. Hierzu gibt es in der Literatur und im Sprachgebrauch eine Vielzahl von Begriffen und Definitionen, deren Verwendung keineswegs einheitlich erfolgt. Für die vorliegende Arbeit werden die Festlegungen der DIN 32 645 [31] zugrundegelegt.

Grundsätzlich gibt es zwei Ansätze, die Verfahrenskennndaten zu ermitteln: bei Verfahren, die einen Leerwert liefern, können die Größen aus Einzelmessungen an Leerproben abgeleitet werden. Wird kein Leerwert ausgegeben, können die Kenngrößen aus der Kalibrierung im Bereich nahe der Grenzwerte berechnet werden [31, 65]. Das Bestimmungsverfahren, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgearbeitet wurde, liefert bei Leerproben keine Peakfläche (keinen Leerwert), so daß die Kalibriergeradenmethode zur

Bestimmung der Kenngrößen eingesetzt wurde, die im folgenden erläutert wird. Als Voraussetzungen für die Gültigkeit der Berechnungsgrundlage müssen folgende Kriterien erfüllt sein: die Varianzenhomogenität zwischen kleinstem und größtem Kalibrierwert ist gegeben (die Überprüfung dieses Kriteriums wurde bereits dargestellt), die Meßwerte der Kalibrierproben bzw. die der Leerprobe sind voneinander unabhängig und normalverteilt, und die Kalibrierfunktion ist im Arbeitsbereich linear.

Der **kritische Wert der Meßgröße** y_k beschreibt das kleinste Signal, das mit einer festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit vom Analyten stammt und nicht auf das Rauschen von Leerwerten zurückzuführen ist. Mit der Breite des einseitigen Prognoseintervalls für den Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden Δa :

$$\Delta a = s_{y,x} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (8)$$

Δa	Breite des einseitigen Prognoseintervalls für den Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden
$s_{y,x}$	Reststandardabweichung der Meßwerte der Kalibrierung
$t_{f;\alpha}$	Quantil der t-Verteilung, einseitig
m	Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
n	Gesamtanzahl der Kalibriermessungen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung

ergibt sich über die Beziehung

$$y_k = a + \Delta a \quad (9)$$

$$y_k = a + s_{y,x} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (10)$$

Nach Umrechnung in die Konzentration ergibt sich daraus die **Nachweisgrenze** x_{NG} :

$$x_{NG} = \frac{(y_k - a)}{b} \quad (11)$$

bzw. aus (6) und (10):

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}. \quad (12)$$

Im angelsächsischen Sprachraum ist für die Nachweisgrenze die Bezeichnung *limit of detection* üblich, jedoch gibt es auch abweichende Bezeichnungen, z.B. *critical level* (IUPAC, [66, 67, 68]). Die Bedeutung der Nachweisgrenze ist darin zu sehen, einen Validierungsparameter zur Verfügung zu haben, der die Gefahr falsch-positiver Aussagen auf ein bestimmtes Risiko einschränkt. In der Regel wird dieses sogenannte α -Risiko auf 1 bis 5% festgelegt (DIN 32 645; KAISER, [69]). Andererseits faßt das sogenannte β -Risiko die Gefahr von falsch-negativen Aussagen in Zahlen: an der Nachweisgrenze beträgt dieses 50%. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze gibt es auch eine weit verbreitete Definition nach KAISER [70, 71] als derjenige Gehalt, dessen Signal die dreifache Standardabweichung des Leerwertes aufweist. Diese Definition stößt in der Praxis an ihre Grenzen, wenn keine korrekte Messung der Unsicherheit des Leerwertes möglich ist.

Oft wird auch der Begriff der *sensitivity* bzw. der Empfindlichkeit in Zusammenhang mit der Nachweisgrenze gebraucht und dient dabei als Synonym für das Nachweisvermögen eines Verfahrens. Hier kommt es immer wieder zu Mißverständnissen. In der vorliegenden Arbeit wird die Terminologie nach FUNK et al. [65] zugrundegelegt und dementsprechend die Empfindlichkeit durch die Steigung der Kalibriergeraden beschrieben (siehe unten).

Die **Erfassungsgrenze** x_{EG} ist die kleinste Analytkonzentration, die mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit ein vom Rauschen unterscheidbares Signal liefert. Im angelsächsischen Sprachgebrauch wird hier vom *limit of determination* gesprochen, allerdings stiften auch hier abweichende Begriffe Verwirrung. So spricht z.B. IUPAC von *detection limit* [66]. I.d.R. wird das β -Risiko an der Erfassungsgrenze auf 1 bis 5% festgelegt, bzw. positiv ausgedrückt: das Signifikanz-Niveau beträgt 99 bzw. 95%. Auch für die Erfassungsgrenze gibt es eine verbreitete Definition, die sie als das Doppelte der Nachweisgrenze festlegt. Nach DIN berechnet sich die Erfassungsgrenze x_{EG} zu

$$x_{EG} = x_{NG} + s_{x0} \cdot t_{f;\beta} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}. \quad (13)$$

Für den Sonderfall $\alpha=\beta$ ergibt sich daher:

$$x_{EG} = 2x_{NG}. \quad (14)$$

Schließlich ist die **Bestimmungsgrenze** x_{BG} die untere Grenze des Anwendungsbereichs des Verfahrens. Formal ist diese nach DIN 32 645 definiert als derjenige „Gehalt, bei dem unter Zugrundelegung einer festgelegten Wahrscheinlichkeit α die relative Ergebnisunsicherheit, definiert als Quotient aus dem halben zweiseitigen Prognoseintervall und dem zugehörigen Gehalt, einen vorgegebenen Wert annimmt“. Aus Sicht der Praxis bedeutet dies letztlich, daß der für die Analyse Verantwortliche ein Leistungsniveau oberhalb der Erfassungsgrenze garantiert, das auch unter nicht ganz optimalen äußeren Bedingungen (Geräteeinstellung etc.) erreichbar ist. Auch für die Bestimmungsgrenze gibt es wiederum angelsächsische Begriffe, die sich nach Übersetzung nicht mit der deutschen Bezeichnung decken: IUPAC z.B. bezeichnet diese Grenze als *quantification limit*. Nach DIN 32 645 ergibt sich für die Bestimmungsgrenze x_{BG} aus der halben Breite des zweiseitigen Prognoseintervalls bei Gehaltsbestimmungen Δx_{BG} :

$$\Delta x_{BG} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (15)$$

mit der Definition

$$\frac{\Delta x_{BG}}{x_{BG}} = \frac{1}{k} \quad (16)$$

als

$$x_{BG} = k \cdot \Delta x_{BG}, \quad (17)$$

wobei k die relative Ergebnisunsicherheit auf vorgegebenem Signifikanzniveau ausdrückt und frei zu wählen ist. Üblich ist z.B. $k=3$ entsprechend einer Ergebnisunsicherheit von 33%.

Für die Bestimmungsgrenze ergibt sich schließlich die Iterationsvorschrift:

$$x_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_x}}. \quad (18)$$

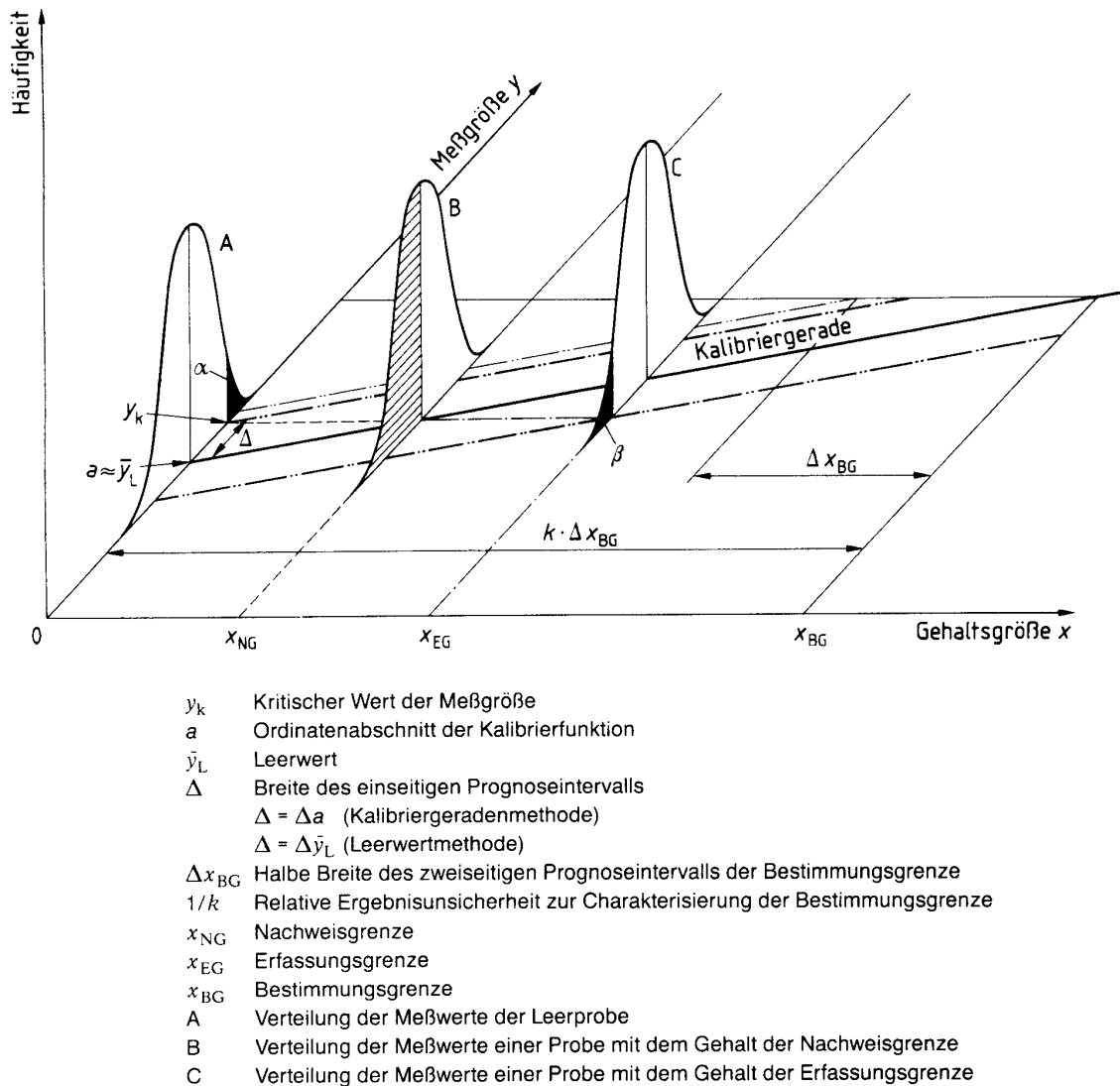


Abbildung 48: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [31]

Störungen

Im Rahmen von analytischen Methoden und Verfahren können vielfältige Störungen, z.B. aus den verwendeten Matrices, auftreten. Beispielsweise können Matrixbestandteile Analyten irreversibel binden und damit einer Bestimmung entziehen. Als Interferenzen werden Störungen bezeichnet, die auf weitere Analyten oder Probenbestandteile zurückzuführen sind. So können einzelne Analyten Signale anderer unterdrücken und damit deren Bestimmung unmöglich machen bzw. verfälschen.

Der Begriff der **Selektivität** (*selectivity*) beschreibt das Ausmaß der Leistungsfähigkeit, einen Analyten neben anderen in komplexen Mischungen bzw. Matrices störungsfrei

bestimmen zu können. Im Idealfall geht der Begriff der Selektivität über in den der **Spezifität** (*specificity*): Sie wird dann erreicht, wenn keinerlei Störungen durch andere Analyten für einen speziellen Analyten oder auch eine Analytgruppe feststellbar sind [62, 72]. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden diese auch nach IUPAC [73] klar definierten Begrifflichkeiten oft nicht sauber getrennt. Insbesondere die Tatsache, daß Spezifität nicht zu steigern ist, wird in der Literatur oft mißachtet. Es finden sich dann Ausdrücke wie „höchst spezifisch“ etc..

7.2 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Routineanalytisches Verfahren

- HP 5989 B Massenspektrometer mit API-Elektrospray Interface HP 59987 A
- Flüssigchromatograph HP 1090 Series II (Hewlett-Packard, Waldbronn)
- Rheodyne 7010 Sechs-Wege-Hochdruck-Schaltventil mit pneumatischem Zwei-Positionen-Antrieb Rheodyne 5701 (Rheodyne, Cotati/CA)
- (10 x 2) mm Vorsäulenkartusche, gefüllt mit Nucleosil 100 C-18, Partikelgröße 10 µm (Schambeck SFD, Bad Honnef)
- (250 x 2) mm Hypersil ODS Säule (Partikelgröße 5 µm) mit (10 x 2) mm Vorsäule (gleiches Füllmaterial, Schambeck SFD, Bad Honnef)
- zusätzliche HPLC-Pumpe (WellChrom Micro-Star K-100, Knauer GmbH, Berlin)
- Spritze mit 500 µL Nennvolumen (Hamilton, Bonaduz/Schweiz)
- 500 µL Probenschleife aus PEEK[®] (Rheodyne)

Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten

- Flüssigchromatograph HP Series 1100 mit Vakuum-Entgaser G 1322 A, binärer Pumpe G 1312 A, automatischem Probengeber G 1313 A und Säulenofen G 1316 A
- hochauflösendes Massenspektrometer Finnigan MAT 95 S mit API Elektrospray-Interface

- Spritzenpumpe Harvard Apparatus 22
- Hamilton 2,5 mL-Spritze
- C-18 Festphasenextraktions-Kartusche (Clin Rep[®], Merck, Darmstadt)
- (100 x 2,1) mm Hypersil ODS-Säule (Partikelgröße 3 µm) und (20 x 2,1) mm Vorsäule mit gleichem Füllmaterial (Hewlett-Packard, Waldbronn)

7.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Routineanalytik

- Acetonitril, Methanol, Wasser: Gradienten-Qualität, J.T. Baker, Deventer/Niederlande
- Zinksulfat: Sigma Aldrich, Deisenhofen
- der Eluent für die chromatographische Trennung wurde vorgemischt und zusätzlich 15 min im Ultraschallbad entgast, um seinen Gasgehalt zu minimieren
- SDZ RAD und Ciclosporin als Reinsubstanz wurden freundlicherweise von Novartis Pharma Inc., Basel/Schweiz zur Verfügung gestellt
- physiologische Kochsalzlösung (0,9%): B. Braun Melsungen, Melsungen
- Stickstoff (99,9999%): Linde AG, Höllriegelskreuth

Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten

- humane Lebermikrosomen: aus Lebergewebe nach Leberteilektomien; nach einer unter [57] beschriebenen Methode isoliert. Mikrosomen von drei Individuen (zwei weiblich, einer männlich) wurden für die vorliegenden Untersuchungen gepoolt und in Phosphatpuffer (pH 7,4, Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄, Sigma Aldrich, Deisenhofen) suspendiert
- NADPH generierendes System: angesetzt aus 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L MgCl₂, 0,84 mmol/L NADP und 18 mmol/L Isozitroneisäure
- Acetonitril, Methanol, Wasser: Gradienten-Qualität, J.T. Baker, Deventer/Niederlande
- Ammoniumacetat (> 99%): Fluka, Neu-Ulm
- Stickstoff (99,9999%): Linde AG, Höllriegelskreuth

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Herr Prof. Dr. K.-Fr. Sewing regte die Thematik an und ermöglichte die Durchführung der experimentellen Arbeiten an seinem Institut. Für die akademische Begleitung meiner Arbeit, die gekennzeichnet war durch Offenheit und Diskussionsbereitschaft, sowie die sorgfältige Korrektur der Arbeit möchte ich meinen Dank aussprechen. Besonders danken möchte ich auch für die Möglichkeit, Ergebnisse meiner Arbeit auf internationalen Tagungen vorzustellen und zu diskutieren. Ich erfuhr dies als fachliche und persönliche Bereicherung und erhielt dabei zahlreiche Impulse für den Fortgang meiner Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. G. Wunsch (Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie, Lehrgebiet Analytische Chemie) danke ich für seine Diskussionsbereitschaft, konstruktive Anregungen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts. Danken möchte ich auch für die Möglichkeit der Teilnahme am wissenschaftlichen Kolloquium seines Arbeitskreises, wodurch mir Einblicke in aktuelle analytische Forschungsprojekte und kreative Anregungen für meine eigene Arbeit vermittelt wurden.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. G. Kirchner und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Pharmakologie, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen meiner Arbeit beitrugen. Herr Dr. W. Jacobsen stellte freundlicherweise Mikrosomen für die Untersuchung des in vitro-Stoffwechsels, Novartis Pharma Inc./Basel stellte SDZ RAD als Reinsubstanz zur Verfügung.

Die Stiftung Stipendienfonds des Verbandes der Chemischen Industrie e.V. förderte mich während der Durchführung meiner Arbeit als Kekulé-Stipendiat. Dafür möchte ich meinen Dank aussprechen.

Ich danke Angelika, die mir immer wieder Motivation verlieh und den Fortgang meiner Arbeit konstruktiv unterstützte. Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern für die stete Bereitschaft danken, mich - nicht nur in finanzieller Weise - zu unterstützen.

Lebenslauf

Christian Vidal

* 29.12.1968 in Ludwigshafen/Rh.

Schulbildung

1975 - 1979	Grundschule Neuhofen
1979 - 1988	Staatl. Geschwister-Scholl-Gymnasium Ludwigshafen
1988	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1990 - 09/1992	Grundstudium Chemie (Diplom) an der Universität Konstanz
10/1992 - 09/1993	Hauptstudium Chemie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg
09/1993 - 04/1994	Auslandsaufenthalt als ERASMUS-Stipendiat an der Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille und der Universität Lille
04/1994 - 10/1994	Fortsetzung des Hauptstudiums an der Philipps-Universität Marburg
02/1995 - 11/1995	Anfertigung der Diplomarbeit, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe in Hannover, Abt. Organische Geochemie/ Umweltanalytik: „Abbauverhalten von Explosivstoffen in Böden - mikrobiologischer und photochemischer Abbau“
11/1995	Diplom Chemie
04/1996 - 06/1998	Promotion, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Allgemeine Pharmakologie: „Entwicklung eines automatisierten routinetauglichen Bestimmungsverfahrens sowie Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten für Makrolid-Immunsuppressiva mit Hilfe von LC/Elektrospray-MS“