

Untersuchung der Amphetamin- und Guanfacinkonzentrationen im Speichel als mögliche alternative Matrix für Therapeutisches Drug Monitoring



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christopher Philipp Wohkittel

aus Koblenz

Würzburg 2023

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am: _____

Gutachter der Dissertation

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Manfred Gerlach
sowie unter Betreuung im klinischen Abschnitt von
Herrn Prof. Dr. Marcel Romanos
am Zentrum für Psychische Gesundheit,
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie,
Universitätsklinikum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
als externe Doktorarbeit
am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
unter Betreuung von
Frau Prof. Dr. Petra Högger
angefertigt.

Bislang aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen:

Originalpublikationen

Wohkittel C., Högger P., Fekete S., Romanos M., Gerlach M.,
Relationship between amphetamine concentrations in saliva and serum in children and
adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder.
Therapeutic Drug Monitoring, 2021; 43: p. 564-569, DOI: 10.1097/ftd.0000000000000831
PMID: 33149054

Wohkittel C., Scherf-Clavel O., Fekete S., Romanos M., Högger P., Gerlach M.,
Determination of guanfacine in oral fluid and serum of children and adolescents with
attention-deficit/hyperactivity disorder: A short communication.
Therapeutic Drug Monitoring, 2022; 44: p. 340-344, DOI: 10.1097/FTD.0000000000000917
PMID: 34334681

Posterbeiträge

Wohkittel C., Högger P., Fekete S., Romanos M., Gerlach M.,
Influence of saliva pH-value on the ratio of amphetamine saliva to serum concentration.
XIIIth Symposium of the Task Force Therapeutic Drug Monitoring of the AGNP
Alpbach, Austria, 13.–15.06.2018
Abstract in Pharmacopsychiatry 2018; 51(03): 113-114, DOI: 10.1055/s-0038-1649542

Wohkittel C., Romanos M., Diehl A., Högger P., Gerlach M.,
Influence of saliva pH-value on the ratio of amphetamine saliva to serum concentration.
1st Symposium of the Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und
Pharmakopsychiatrie (AGNP) and Deutsche Gesellschaft für Biologische Psychiatrie (DGBP)
Berlin, Germany, 06.–08.03.2019
Abstract in Pharmacopsychiatry 2019; 52(02): 105-106, DOI: 10.1055/s-0039-1679172

Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Gerlach meinen herzlichen Dank aussprechen für die freundliche Aufnahme ins TDM-Labor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie und für die Möglichkeit, an diesem sehr interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Für die fachliche und beständige Unterstützung während des gesamten Forschungsvorhabens möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die allzeit offene Tür und die wertvollen Hilfestellungen bei den regelmäßigen Treffen zur Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Marcel Romanos für die unermüdliche Unterstützung im klinischen Teil bedanken, vor allem beim Entwurf des Ethikantrags und der Durchführung der Studie, ohne die die Fertigstellung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Zuge der Studie möchte ich auch Frau PD Dr. Regina Taurines, Frau Christine Kulpok, Herr Prof. Dr. Timo Vloet, Frau Dr. Andrea Vloet und Frau Dr. Stefanie Fekete für ihr Engagement bei der Probandenrekrutierung danken. Des Weiteren möchte ich auch allen beteiligten Klinikmitarbeitern und Patienten meinen großen Dank aussprechen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Oliver Scherf-Clavel für die geduldige und fachliche Unterstützung rund um die LC-MS/MS Analytik bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Christoph Hiemke, der mein Interesse für das Therapeutische Drug Monitoring geweckt hat und somit den Anstoß gab, in diesem Bereich zu promovieren, Frau Dr. Maike Scherf-Clavel und Herrn Dr. Matthias Falter für die vielen hilfreichen Gespräche und das kritische Lesen dieser Arbeit.

Auch dem Team des TDM-Labors: Rainer und Margit Burger, Kerstin Balcioglu, Marion Weyer, Ulrike Sachse und Corinna Kobold, möchte ich für die geduldige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und für die bereitwilligen Speichelspenden zur Methodenentwicklung meinen herzlichen Dank aussprechen. Bei Linda Volpp möchte ich mich für die praktische Unterstützung und die Einweisung in das LC-MS/MS Instrument bedanken.

Meinen Eltern Brunhilde und Erhard, meiner Schwester Anna-Sophie und David und besonders meiner Frau Alina gilt ein riesengroßes Dankeschön. Ihr habt mich bedingungslos unterstützt, immer wieder motiviert und bestärkt, aber auch abgelenkt, wenn es notwendig war.

Vielen Dank dafür.

„Die Wahrheit ist selten rein und niemals einfach.“

Oscar Wilde

Inhaltsverzeichnis

<u>A</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1	Therapeutisches Drug Monitoring	1
1.1	TDM in der Kinder- und Jugendpsychiatrie.....	2
2	Speichel	6
2.1	Speichel im TDM.....	6
2.2	Physiologische Grundlagen	7
2.3	Wirkstofftransfer in den Speichel.....	8
3	Ziele der Arbeit	9
<u>B</u>	<u>ALLGEMEINER TEIL</u>	<u>11</u>
1	Probengewinnung	13
2	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Amphetamin	15
2.1	Bestimmung der Amphetaminkonzentration im Speichel und Serum.....	15
2.2	Vergleich der gemessenen Amphetaminkonzentrationen im Speichel und Serum.....	17
2.3	Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumamphetaminkonzentration	20
2.4	Vergleich der berechneten mit der gemessenen Serumkonzentration	25
3	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Guanfacin	29
3.1	Bestimmung der Guanfacinkonzentration im Speichel und Serum	29
3.2	Korrelation zwischen Speichel- und Serumguanfacinkonzentration.....	30
3.3	Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumguanfacinkonzentration	31
<u>C</u>	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	<u>35</u>
1	Klinische Studie	37
1.1	Ethikvotum.....	37
1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	37
1.3	Drop-out- und Verweigerungsstichprobe.....	37
1.4	Datenerhebung	38

1.5	Stichprobenbeschreibung.....	38
1.6	Probengewinnung	39
2	Materialien, Reagenzien und Geräte	41
2.1	Chemikalien.....	41
2.2	Verbrauchsmaterialien	42
2.3	Geräte	43
2.4	Humanes Plasma	44
2.5	Humaner Speichel	44
2.6	Interner Standard	44
2.7	Spikelösungen	44
3	Methode zur Quantifizierung von Amphetamin	45
3.1	Auswahl der Methode	45
3.2	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	47
3.3	Durchführung der HPLC-FL Methodenentwicklung	48
3.4	Methodenvalidierung zur Quantifizierung von Amphetamin.....	58
4	Methode zur Quantifizierung von Guanfacin	66
4.1	Auswahl der Methode	66
4.2	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	67
4.3	Durchführung der LC-MS/MS Methodenentwicklung.....	69
4.4	Methodenvalidierung zur Quantifizierung von Guanfacin	74
5	Bestimmung der <i>in-vivo</i>-Proben	82
6	Statistische Auswertung	83
<u>D</u>	<u>TABELLARISCHER ANHANG.....</u>	<u>85</u>
1	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Amphetamin	87
1.1	Klinische Parameter der 28 Probanden aus der Amphetamingruppe.....	87
2	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Guanfacin	94
2.1	Klinische Parameter der 9 Probanden aus der Guanfacingruppe.....	94
3	Berechnung des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration für Amphetamin und Guanfacin	96
4	Methode zur Quantifizierung von Amphetamin	97
4.1	Methodenentwicklung	97

4.2	Methodenvalidierung	98
5	Methode zur Quantifizierung von Guanfacin	105
5.1	Methodenvalidierung	105
<u>E</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>113</u>
1	Zusammenfassung	115
2	Summary	117
<u>F</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>119</u>
<u>G</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>127</u>
<u>H</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>133</u>

A

Einleitung

Das Wort „Pharmakon“ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet Arzneistoff, Droge und Gift, die dem Menschen in entsprechender Dosierung helfen oder schaden.[1] Dabei stehen die Begrifflichkeiten „Arzneistoff“ und „Gift“ zwar im Widerspruch zueinander, jedoch kann ein Arzneistoff neben der gewünschten Wirkung auch unerwünschte Wirkungen hervorrufen. So erkannte bereits Theophrastus Bombastus von Hohenheim, dass allein die Dosis das Gift ausmacht.[2] Ebenso muss in der Pharmakotherapie zwischen der gewünschten Wirkung des Pharmakons am Zielort und dem Risiko des Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) abgewogen werden. Besonders in der medikamentösen Behandlung psychiatrischer Erkrankungen ist der direkte Nutzen nur schwierig objektiv quantifizierbar. In den letzten Jahren hat sich daher die Bestimmung und Bewertung der Serumkonzentration von Arzneistoffen als nützliches Werkzeug zur patientenindividuellen Dosisoptimierung (Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)) in der Psychopharmakotherapie etabliert.[3] Da die entsprechende Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) hauptsächlich für erwachsene Patienten ausgelegt ist, besteht für TDM im Kindes- und Jugendalter großer Forschungsbedarf. Neben der Evaluierung der therapeutischen Referenzbereiche für diese Altersgruppen gewinnen auch Untersuchungen alternativer Matrices zur vereinfachten Probenahme zunehmend an Bedeutung.

1 Therapeutisches Drug Monitoring

Die Pharmakokinetik eines Arzneistoffs kann aufgrund interindividueller Unterschiede in der Absorption, Distribution, beim Metabolismus und der Eliminierung sehr variabel sein. So kann bei gleicher Dosierung die Serumkonzentration im Fließgleichgewicht (Steady-State) um das 20-Fache variieren.[4] Die Ursachen dafür sind multifaktoriell; neben Geschlecht und Alter sind auch Komedikation, Lebensgewohnheiten sowie genetische Faktoren bekannte Einflussgrößen.[4] Um dieser Problematik zu begegnen, hat sich TDM bewährt. Hierbei wird die Wirkstoffkonzentration im Patientenblut quantifiziert und klinisch-pharmakologisch bewertet, um dem behandelnden Arzt Anhaltspunkte für eine individuelle Dosistitration geben zu können. So kann eine Wirkstoffkonzentration aufgebaut werden, die ein gutes Therapieansprechen mit einem minimalen Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen verbindet. Bei rationaler Anwendung kann TDM eine patientenindividuelle und kosteneffiziente Therapie leiten.[3, 5]

Die Konsensus-Leitlinie der TDM-Arbeitsgruppe der AGNP dient als Grundlage für die korrekte Anwendung von TDM.[4]

1.1 TDM in der Kinder- und Jugendpsychiatrie

Kinder und Jugendliche stellen eine besondere Risikogruppe in der psychiatrischen Pharmakotherapie dar, da viele Psychopharmaka für diese Altersgruppen nicht zugelassen sind und die Behandlung somit außerhalb der Zulassung (Off-Label) erfolgt.[4] Zudem weisen sie aufgrund entwicklungsphysiologischer Unterschiede andere pharmakodynamische und -kinetische Parameter auf als Erwachsene.[6, 7] Insgesamt ist somit das Risiko für diese Patientengruppe, eher von Dosierungsfehlern oder UAW betroffen zu sein, gegenüber Erwachsenen erhöht.[6-11] Für Kinder und Jugendliche ist aus diesen Gründen die Durchführung von TDM zur Überwachung und Optimierung der Psychopharmakotherapie in der klinischen Routine generell empfohlen.[4, 12]

TDM findet üblicherweise zum Talspiegel und unter Steady-State-Bedingungen statt. Als Talspiegel (c_{\min}) wird der Zeitraum mit der niedrigsten Wirkstoffkonzentration im Blut innerhalb eines Dosierungsintervalls bezeichnet (Abbildung 1). In diesem Zeitintervall unterliegt die Serumkonzentration nur sehr geringen Schwankungen und ist somit robuster gegenüber zeitlichen Varianzen bei der Probenahme.[4] Als Steady-State wird das Fließgleichgewicht zwischen Absorption und Elimination eines Arzneistoffes bezeichnet, das sich bei regelmäßiger Einnahme im Rahmen einer Dauertherapie chronischer Erkrankungen einstellt. Abhängig vom Arzneistoff und Dosierungsintervall wird der Steady-State meist nach vier bis fünf Halbwertszeiten erreicht.[13-16] Ausnahmen von der üblichen Vorgehensweise bilden Arzneistoffe mit einer kurzen Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) und einer täglichen Einmalgabe, da sich aufgrund dieser Faktoren kein Fließgleichgewicht einstellt.[4, 12] Hierzu zählen vor allem Arzneistoffe zur Behandlung der Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitätsstörung (ADHS).[17] Bei diesen Wirkstoffen findet die Blutentnahme zum Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration (t_{\max}) statt und muss exakt eingehalten werden, da die maximale Serumkonzentration (c_{\max}) im Gegensatz zum Talspiegel stark zeitabhängig ist.

Zur Bewertung der Wirkstoffkonzentrationen werden in der Konsensus-Leitlinie therapeutische Referenzbereiche angegeben, die sich durch ein optimales Verhältnis von therapeutischem Effekt zu UAW auszeichnen.[4] Unterhalb des therapeutischen Referenzbereichs ist das Ansprechen auf die Pharmakotherapie unwahrscheinlich, oberhalb nehmen UAW zu und eine Verbesserung des Therapieeffekts ist unwahrscheinlich.[4]

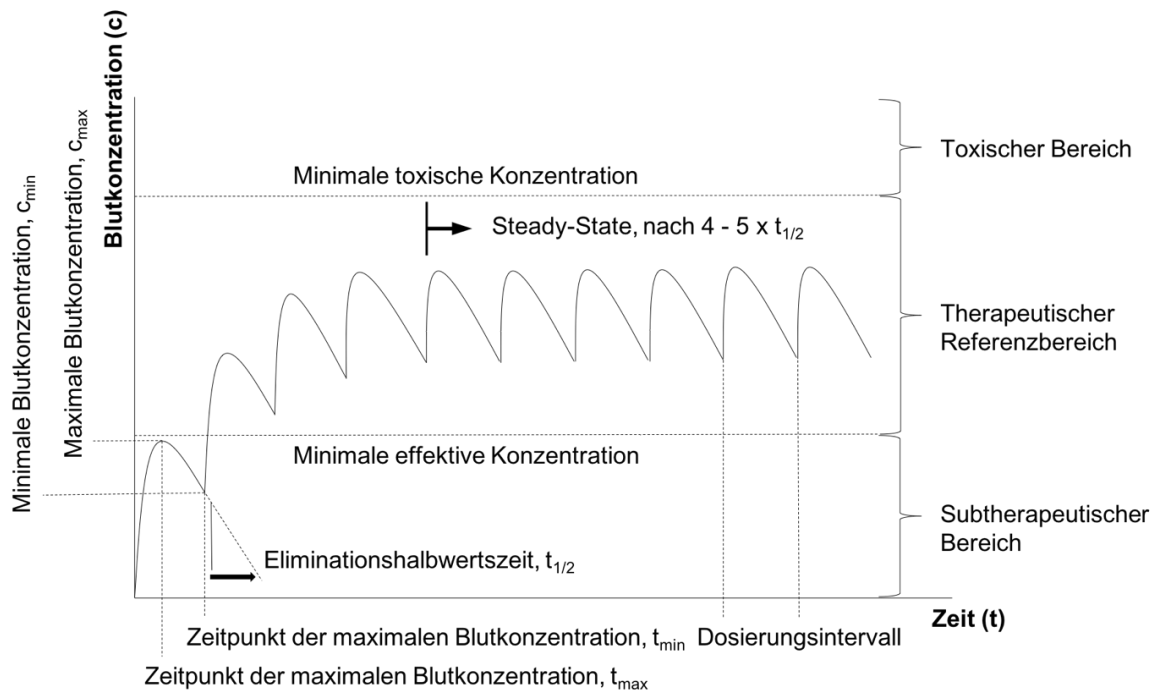


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Arzneistoffkonzentration im Blut bei mehrmaliger Medikamenteneinnahme mit den dazugehörigen Kenngrößen. (Abbildung modifiziert nach [15], Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5372360793752)

Da die meisten Psychopharmaka überwiegend für Erwachsene zugelassen und somit auch die therapeutischen Referenzbereiche der Konsensus-Leitlinie nur für diese Altersgruppe validiert sind, ist eine Bewertung der Wirkstoffkonzentration bei Kindern und Jugendlichen problematisch.[3, 12] In den letzten Jahren wurde daher im kinder- und jugendpsychiatrischen Bereich intensiv geforscht, um therapeutische Referenzbereiche speziell für diese Altersgruppen zu evaluieren und anzupassen.[18-24] Eine Ausnahme bilden die therapeutischen Referenzbereiche für die Arzneistoffe zur Behandlung der ADHS, da diese für C_{max} bei Kindern und Jugendlichen definiert sind.[4, 17]

Zur Pharmakotherapie der ADHS sind in Deutschland aktuell fünf Wirkstoffe zugelassen (Abbildung 2).[25]

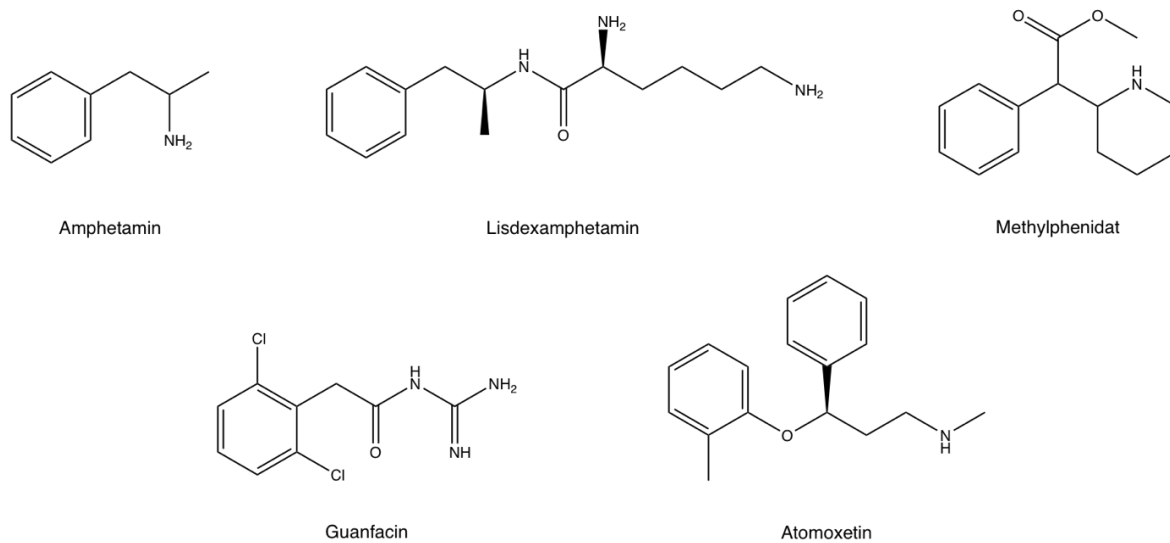


Abbildung 2: Die Molekülstrukturen der in Deutschland zur Behandlung der ADHS im Kindes- und Jugendalter zugelassenen Arzneistoffe.

Die Psychostimulanzien, wie Methylphenidat, Amphetamin und Lisdexamphetamin, sind aufgrund der hohen Effektstärken im Kindes- und Jugendalter Mittel der ersten Wahl, darüber hinaus sind Methylphenidat und Lisdexamphetamin auch zur Anwendung im Erwachsenenalter zugelassen.[25-28] Bei unzureichendem Ansprechen oder Unverträglichkeit der Erstlinientherapie kann eine Behandlung mit Nicht-Psychostimulanzien, wie Guanfacin (selektiver α_{2A} -Adrenorezeptoragonist) und Atomoxetin (selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer), erfolgen.[25] Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten dieser Arzneistoffe und der daraus resultierenden steilen Konzentration-Zeitkurve, die zu einem raschen Wirkungsabfall bei schnellfreisetzenden Präparaten führen,[12, 29-31] werden bevorzugt Arzneiformen mit veränderter Wirkstofffreisetzung und verlängerter Wirkdauer eingesetzt.[25] So wird für den Wirkstoff Guanfacin eine retardierte Arzneiform verwendet, um die Einnahme auf einmal täglich zu begrenzen.[32, 33] Bei Lisdexamphetamin handelt es sich dagegen um ein Prodrug, das erst durch die hydrolytische Spaltung in den Erythrozyten das pharmakologisch wirksame Dexamphetamin zeitverzögert freisetzt und somit die Wirkdauer gegenüber schnellfreisetzenden Präparaten verlängert.[34-36]

1.1.1 TDM der ADHS-Pharmakotherapie

Neben der Off-Label Anwendung von Arzneimitteln stellt der Verdacht auf unregelmäßige Medikamenteneinnahme eine weitere Indikation für TDM in der Kinder- und Jugendpsychiatrie dar, da in diesen Altersgruppen die Gefahr der Non-Adhärenz generell erhöht ist.[37-39] Diese Problematik scheint sich bei Patienten, die unter einer ADHS leiden, aufgrund der verminderten

Aufmerksamkeit zusätzlich noch zu verstärken.[40] Erschwerend kommt eine Untersuchung zu dem Ergebnis, dass Eltern die Adhärenz ihrer Kinder nicht verlässlich einschätzen konnten und dass nur ca. die Hälfte der Kinder über drei bis vier Messpunkte zuverlässig Methylphenidat einnahmen.[41] Ebenso belegt eine Übersichtsarbeit, dass Medikamente zur Behandlung einer ADHS in allen Altersgruppen an mehr als 30 % der Tage nicht eingenommen wurden.[40]

Neben der Adhärenzkontrolle sind aufgrund der hohen interindividuellen Varianz der Serumspiegel von Amphetamin und Guanfacin, ähnlich wie bei Methylphenidat, mehrere Wirkstoffbestimmungen zum t_{\max} in der klinischen Routine zur Dosisfindung sinnvoll.[42-44]

Eine weitere Indikation für TDM im Rahmen einer ADHS-Pharmakotherapie stellt der Verdacht auf Störung des Arzneistoffmetabolismus über das Cytochrom P450 (CYP) System dar. So können zum einen Polymorphismen der Isoenzyme den Arzneistoffmetabolismus beeinflussen.[45] Zum anderen erhöhen Kombinationen von Wirkstoffen, die diese Isoenzyme inhibieren oder induzieren, das Risiko klinisch relevanter Wechselwirkungen.[4, 14] Insbesondere Amphetamin und Atomoxetin, die über CYP 2D6 abgebaut werden,[14, 46, 47] sowie Guanfacin, das überwiegend über CYP 3A4 und 3A5 metabolisiert wird,[48] können hiervon betroffen sein. Daher ist bei pharmakokinetischen Interaktionen TDM zur Dosissteuerung empfohlen, um das Risiko einer Unverträglichkeit oder eines Therapieversagens zu vermeiden.[3]

Aus diesen Aspekten besteht bei Kindern und Jugendlichen unter ADHS-Pharmakotherapie ein besonderer Bedarf für TDM, das jedoch aufgrund der invasiven Probenahme und des Zeitaufwands im klinischen Alltag sehr restriktiv eingesetzt wird. Die Verwendung von nicht invasiv gewonnenen Matrices, wie zum Beispiel Speichel, hätte das Potenzial einer niederschwelligeren Anwendung von TDM in der klinischen Routine und könnte somit die Wirksamkeit und Sicherheit der Pharmakotherapie verbessern.

2 Speichel

Als Probenmatrix bietet Speichel vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. So können bereits systemische Krankheitserreger, wie das humane Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis oder SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2), über spezifische Marker im Speichel nachgewiesen werden.[49-51] Daneben eignet er sich auch zur Bestimmung endokrinologischer und immunologischer Biomarker wie Kortisol, Estrogen und Immunglobulin A (IgA).[49] Auch Substanzen mit hohem Missbrauchspotenzial, wie Amphetamine, Kokain und Opiate, können gut im Speichel nachgewiesen werden, sodass diese Matrix für polizeiliche Drogenscreenings eingesetzt wird.[49, 52-54]

2.1 Speichel im TDM

Die standardmäßige Blutentnahme für TDM ist in der Kinder- und Jugendpsychiatrie speziell bei ängstlichen und jungen Patienten eine große Herausforderung, sowohl für die Betroffenen als auch für das Klinikpersonal. Da die notwendige Venenpunktion häufig mit Schmerzen assoziiert ist und akute Stressreaktionen hervorrufen kann, lehnen Patienten und deren Erziehungsberechtigte eine Blutentnahme tendenziell ab.[55, 56] Die nicht invasive Speichelgewinnung bietet daher einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Blutentnahme und wird auch von der Mehrheit der pädiatrischen Patienten und deren Erziehungsberechtigten bevorzugt.[56] Zudem ist die Durchführung unkomplizierter, sodass kein speziell ausgebildetes Personal benötigt wird und somit auch eine Probenahme zu Hause durch die Erziehungsberechtigten im Rahmen einer ambulanten Therapie möglich wäre.[56] Neben dem personellen Aufwand sind auch die Materialkosten und der Zeitaufwand für eine Speichelentnahme geringer.[56] Speichel bietet somit eine Reihe von Vorteilen, die ihn zu einer interessanten Alternative zum Serum für TDM machen.

Obwohl die potenzielle Verwendung von Speichel als alternatives Medium für TDM schon seit Jahrzehnten untersucht wird und viele relevante Wirkstoffe im Speichel stabil nachweisbar sind,[57, 58] konnte Speichel Serum als Standardmatrix noch nicht ablösen.[4, 59, 60] Um Konzentrationsbestimmungen im Speichel mit den serumspezifischen Referenzwerten möglichst unkompliziert vergleichen zu können, wäre ein konstantes Verhältnis zwischen der Speichel- und Serumkonzentration vonnöten. Dies wurde bereits für einige Arzneistoffe wie Theophyllin,[61] Phenytoin,[62, 63] Phenobarbital,[62, 63] Lamotrigin,[64] und Fluconazol nachgewiesen.[65] Dagegen weisen Antipsychotika, wie zum Beispiel Risperidon, Clozapin und Quetiapin, zwar eine hohe Variabilität zwischen der Speichel- und Serumkonzentration auf, dennoch eignet sich hier die Verwendung von Speichel zur Adhärenzkontrolle.[66] In diesen Studien ist auch erkennbar, dass die Fallzahlen abhängig von der Verordnungshäufigkeit sind und somit wirkstoffbezogen erheblich

schwanken. So wurden bereits von einigen Arbeitsgruppen Speichel- und Serumkonzentrationen von Psychostimulanzien, hauptsächlich von Methylphenidat, bei Kindern und Jugendlichen erforscht.[67-69] Amphetamin wurde dagegen lediglich in einer kleinen Subgruppe (n = 4) von Stegmann et al. betrachtet.[68] Weitere pharmakokinetische Untersuchungen von Amphetaminderivaten bei Erwachsenen deuten an, dass sich Speichel als Serumkorrelat eignen kann, weisen jedoch zeitgleich auf eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität hin.[70-73] Bislang fehlt allerdings ein adäquater Vergleich der beiden Matrices im Rahmen einer klinischen Validierung, um Speichel als alternative Matrix routinemäßig für TDM von Amphetamin im Zuge einer ADHS-Pharmakotherapie einsetzen zu können.[74] Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Speichel- und Serumkonzentration sowie zwischen Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration und dem pH-Wert des Speichels werden üblicherweise Korrelationsanalysen nach Pearson oder Spearman in Abhängigkeit von der Normalverteilung der Daten eingesetzt. Der Zusammenhang zweier Parameter allein legitimiert aber nicht den Einsatz in der klinischen Routine.[75] Daher wird der Bland-Altman-Plot als Verfahren der Wahl zur klinischen Validierung eingesetzt. Mit diesem werden Abweichungen der Alternativmethode von der Standardmethode erfasst und bewertet.[74]

2.2 Physiologische Grundlagen

Die Hauptaufgabe des Speichels ist es, die Mundschleimhäute zu befeuchten. Zusätzlich erleichtert er das Sprechen, macht den Speisebrei gleitfähig und fördert die Geschmackswahrnehmung. Um eine ausreichende Speichelmenge für die gesamte Mundhöhle zu bilden, gibt es drei große Drüsen: die Glandula parotis (Ohrspeicheldrüse), Glandula submandibularis (Unterkieferdrüse) und Glandula sublingualis (Unterzungendrüse).[76] Sie sezernieren Wasser, Elektrolyte und Glykoproteine, zusätzlich dazu produzieren die Unterkiefer- und Unterzungendrüse Muzine, die dem Speichel die Viskosität verleihen und die Gleitfähigkeit der Nahrung beeinflussen.[76] Die Speichelsekretion ist auch essenziell für die Mundgesundheit, so bildet der Speichel durch verschiedene Enzyme (Lysozym und α -Amylase) und Antikörper (IgA) die erste Immunabwehr des Körpers und leitet die Verdauung ein.[76] Ein stark verminderter Speichelfluss (< 0,3 mL/min) und die daraus folgende Mundtrockenheit bergen ein erhöhtes Risiko von pathologischen Veränderungen wie Karies, Entzündungen und Soor.[77]

Neben der basalen Sekretion in Ruhe kommt es in der kephalen Phase zu einer Stimulation der Speichelproduktion und -sekretion.[76] Auch die Zusammensetzung des Speichels ändert sich situationsbedingt; innerviert durch den Parasympathikus und Sympathikus wird der Speichel dünnflüssiger und glykoproteinarm oder viskoser durch einen höheren Muzinanteil.[76] Die im Speichel gelösten Elektrolyte Na^+ , Cl^- , K^+ und besonders HCO_3^- sind für die Pufferfunktion und somit

für die Regulierung des pH-Wertes verantwortlich.[77] Die Elektrolytzusammensetzung im Primärspeichel entspricht der des Blutes, jedoch sind die Konzentrationen bis auf die von K^+ niedriger.[78] Diese sind im Wesentlichen von der Speichelflussrate durch den Drüsengang abhängig, da in diesem Abschnitt ein großer Teil der Elektrolyte rückresorbiert wird, sodass der Speichel im Mundraum hypoton ist.[78, 79] Da die Rückresorption transporterabhängig und somit geschwindigkeitslimitierend ist, steigt bei erhöhter Durchflussrate die Na^+ , Cl^- und HCO_3^- -Konzentration an, während die K^+ -Konzentration leicht sinkt.[78, 80, 81] So liegt der Speichel-pH-Wert in Ruhe zwischen 6,5 und 6,9 und steigt nach Stimulation auf 7,0 - 7,2.[76] Der Speichelpuffer ist essenziell für die Mundgesundheit; so kann ein niedriger pH-Wert die antibakterielle Wirkung vermindern und das Kariesrisiko erhöhen sowie zur Demineralisierung der Zahnwurzel führen.[77]

2.3 Wirkstofftransfer in den Speichel

Eine Voraussetzung für die Bestimmung von Analyten im Speichel ist, dass diese dorthin gelangen und in diesem chemisch stabil sind. Für den Wirkstofftransfer vom Blut in den Speichel werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert.[82] Generell ist der Transport intrazellulär durch passive Diffusion von nicht ionisierten, lipophilen Stoffen oder durch aktive Transportmechanismen von Proteinen und Elektrolyten sowie extrazellulär durch Ultrafiltration von sehr kleinen Molekülen möglich.[82] Die passive Diffusion wird durch Moleküleigenschaften wie Molekulargewicht, Lipophilie, pK_s und das Ausmaß der Plasmaproteinbindung beeinflusst.[82] Da nur der freie Wirkstoffanteil in den Speichel diffundieren kann, wird häufig vereinfacht angenommen, dass die Speichelkonzentration den pharmakologisch aktiven Anteil eines Wirkstoffes repräsentiert.[82, 83] Neben den Moleküleigenschaften beeinflussen auch physiologische Parameter wie der Speichel- und Blut-pH-Wert, die Speichelflussrate und pathophysiologische Veränderungen des Mund-/Rachenraums den Wirkstofftransfer in den Speichel.[82] Der pK_s - sowie Speichel- und Blut-pH-Wert spielen bei der passiven Diffusion eine wesentliche Rolle, da sich durch Variation dieser Parameter die Lipophilie des Moleküls ändert. Insbesondere der Speichel-pH-Wert ist situativ sehr variabel und muss somit bei der Bewertung der Speichelkonzentration berücksichtigt werden.

Es wird angenommen, dass Amphetamin als basisches Molekül (pK_s 10,13)[84] mit einer geringen Plasmaproteinbindung (16 - 20 %)[85, 86] aus dem Blut in der nicht ionisierten Form gut in den Speichel diffundiert und dort aufgrund des niedrigeren pH-Werts akkumuliert.[54, 82] Für Guanfacin wird ebenfalls erwartet, dass der passive Wirkstofftransport in den Speichel über die nicht ionisierte Form abläuft, jedoch ist damit zu rechnen, dass der Transfer aufgrund der sehr schwach basischen Eigenschaft (pK_s 7,1)[48] und der moderaten Plasmaproteinbindung (64 %)[48] von Guanfacin in geringerem Ausmaß stattfindet als bei Amphetamin.

3 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Speichel als Matrix für die Konzentrationsbestimmung von Amphetamin und Guanfacin eignet und ob diese für TDM genutzt werden kann. Dazu sollte in einer klinischen Studie bei Kindern und Jugendlichen, die im Rahmen einer leitlinienindizierten ADHS-Pharmakotherapie Amphetamin und/oder Guanfacin erhalten, korrespondierende Speichel- und Serumkonzentrationen bestimmt werden. Um die beiden Arzneistoffe quantifizieren zu können, sollten Literaturmethoden optimiert und im Anschluss vollständig validiert werden.[68, 87]

An diesem Studiensample sollten 1.) die Wirkstoffkonzentrationen der beiden Matrizes miteinander verglichen und 2.) der Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf die Speichelamphetaminkonzentration bestimmt werden, da angenommen werden konnte, dass dieser maßgeblich ist. In diesem Falle sollte erstmals 3.) der pH-Wert durch Umrechnung in eine theoretische Serumkonzentration berücksichtigt und 4.) die Umrechnung der Speichelkonzentration im Anschluss klinisch validiert werden.

B

Allgemeiner Teil

1 Probengewinnung

Die Probengewinnung wurde im Rahmen einer klinischen Studie in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Es wurden Patienten rekrutiert, die dort stationär, tagesklinisch oder ambulant behandelt wurden und eine leitlinienindizierte ADHS-Pharmakotherapie mit Dexamphetamin, Lisdexamphetamin oder Guanfacin erhielten.

Für Amphetamin und Guanfacin wurde jeweils eine Fallzahl von 44 Patienten mit je einer korrespondierenden Speichel- und Serumprobe angestrebt. Um die Vergleichbarkeit der beiden Matrices zu gewährleisten, sollten beide Studienproben zeitgleich zum t_{\max} des jeweiligen Arzneimittels entnommen werden. Bei Lisdexamphetamin entspricht das ca. 3,5 Stunden und bei Guanfacin ca. 5 Stunden nach der Medikamenteneinnahme.[88, 89] Aufgrund der üblichen Gabe von Guanfacin zum Abend war die Probenahme zum t_{\max} nur eingeschränkt möglich, stattdessen erfolgte sie in den meisten Fällen am darauffolgenden Tag.

Insgesamt willigten 37 Probanden sowie deren Erziehungsberechtigte in die Studienteilnahme ein, von denen jedoch drei Probanden nachträglich ausgeschlossen wurden. Zwei Probanden wurden aufgrund fehlender Speichelproben und ein dritter Proband aufgrund von Non-Adhärenz ausgeschlossen, da weder in der Serum- noch in der Speichelprobe Amphetamin qualitativ nachweisbar war. Somit konnten von 31 Probanden aus der Studie, die ein Amphetaminpräparat zur Behandlung der ADHS einnahmen, nur 28 Probanden bei der Auswertung berücksichtigt werden (Tabelle 1). Alle Probanden der Amphetamingruppe erhielten im Rahmen der ADHS-Pharmakotherapie das Prodrug Lisdexamphetamin. Von vier Probanden, die neben Lisdexamphetamin zusätzlich noch Guanfacin erhielten, wurde ein Proband nachträglich aus der Guanfacingruppe ausgeschlossen, da die Serumkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lag und der Arzneistoff in der Speichelprobe qualitativ nicht nachweisbar war. Die restlichen sechs Probanden erhielten Guanfacin zur Behandlung der ADHS in Monotherapie.

Tabelle 1: Übersicht aller eingeschlossenen Probanden (n = 34). Bei 3 Probanden (Nr. 10, 20 und 27) wurde jeweils eine Bestimmung für Amphetamin und Guanfacin durchgeführt.

Proband	Studiencode	Geschlecht [m/w]	Alter [Jahre]	Wirkstoff
1	A_01	m	11,1	Lisdexamphetamin
2	A_02	w	10,2	Lisdexamphetamin
3	A_03	m	13,3	Lisdexamphetamin
4	A_04	m	12,2	Lisdexamphetamin
5	A_05	m	9,2	Lisdexamphetamin
6	A_07	m	13,0	Lisdexamphetamin
7	A_08	m	8,8	Lisdexamphetamin
8	A_09	m	13,9	Lisdexamphetamin
9	A_10	m	12,8	Lisdexamphetamin
10	A_11	m	7,6	Lisdexamphetamin/Guanfacin
11	A_14	m	13,3	Lisdexamphetamin
12	A_15	m	8,9	Lisdexamphetamin
13	A_18	w	16,9	Lisdexamphetamin
14	A_21	m	7,4	Lisdexamphetamin
15	A_22	m	12,5	Lisdexamphetamin
16	A_23	m	9,4	Lisdexamphetamin
17	A_24	m	7,6	Lisdexamphetamin
18	A_25	m	9,1	Lisdexamphetamin
19	A_26	m	9,3	Lisdexamphetamin
20	A_27	w	7,7	Lisdexamphetamin/Guanfacin
21	A_28	w	13,0	Lisdexamphetamin
22	A_30	m	9,9	Lisdexamphetamin/Guanfacin
23	A_32	m	13,0	Lisdexamphetamin
24	A_34	m	9,8	Lisdexamphetamin
25	A_36	w	13,2	Lisdexamphetamin
26	A_37	m	14,6	Lisdexamphetamin
27	A_38	m	15,1	Lisdexamphetamin
28	A_39	m	14,2	Lisdexamphetamin
29	G_02	m	8,6	Guanfacin
30	G_03	m	13,1	Guanfacin
31	G_04	m	7,9	Guanfacin
32	G_06	m	12,9	Guanfacin
33	G_07	w	6,5	Guanfacin
34	G_08	w	8,1	Guanfacin

1.1 Diskussion

Eine grundsätzliche Problematik die die Durchführung von Studien in der Kinder- und Jugendpsychiatrie gegenüber der Erwachsenenpsychiatrie erschwert ist, dass häufig nur geringe Patientenzahlen zur Verfügung stehen. Der Hauptgrund, der dazu führte, dass in der vorliegenden

Arbeit die geplante Fallzahl für Amphetamin nicht erreicht wurde war, dass die Motivation der Kinder zur Studienteilnahme aufgrund der notwendigen Blutentnahme gemindert und somit von ungefähr einem Viertel der in Frage kommenden Patienten abgelehnt wurde (Exp. Teil, C 1.3).

Für Guanfacin konnte nur ein Viertel der ursprünglich geplanten Proben gesammelt werden, da es aufgrund der jungen Zulassung als Mittel der zweiten Wahl entsprechend selten verordnet wurde (0,43 mio defined daily doses (DDD))[90] und somit generell weniger Patienten für die Studienteilnahme in Frage kamen als für Amphetamin. Dennoch konnten für Amphetamin alle und für Guanfacin ein Teil der geplanten Berechnungen durchgeführt werden, da die zur Fallzahlberechnung geschätzten Parameter von einem schlechteren Zusammenhang zwischen den beiden Matrices ausgegangen waren und dadurch eine größere Stichprobe kalkuliert wurde.

2 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Amphetamin

2.1 Bestimmung der Amphetaminkonzentration im Speichel und Serum

Die aus den Studienproben ermittelten Serumamphetaminkonzentrationen lagen zwischen 35,0 und 181,8 ng/mL (Mittelwert \pm SD $77,7 \pm 31,7$ ng/mL; Median 77,2 ng/mL)(Tabelle 2).

Im Speichel lagen die Amphetaminkonzentrationen der Proben zwischen 44,3 und 2155,4 ng/mL (Mittelwert \pm SD $421,7 \pm 585,0$ ng/mL; Median 257,8 ng/mL). Im Median lag die Wirkstoffkonzentration im Speichel um das 2,7-Fache über der im Serum (Wilcoxon-Test; 257,8 ng/mL versus 77,2 ng/mL; $z = -4,51$, $P = 0,001$)(Tab. Anhang, D 1.1.2). Die pH-Werte der Speichelproben verteilten sich über einen Bereich von pH 6,18 bis 7,92 (Mittelwert \pm SD $pH 7,20 \pm 0,48$; Median 7,30)(Tabelle 2).

Tabelle 2: Amphetaminkonzentration in Serum und Speichel von 28 Probanden. Die hervorgehobenen Proben weisen sehr hohe Speichelkonzentrationen und niedrige Speichel-pH-Werte auf.

Proband	Studiencode	Serumkonzentration [ng/mL]	Speichelkonzentration [ng/mL]	Speichel-pH- Wert
1	A_01	67,6	125,9	7,92
2	A_02	73,9	459,2	6,41
3	A_03	45,2	63,7	7,30
4	A_04	43,2	296,2	7,23
5	A_05	45,5	67,7	7,65
6	A_07	94,5	267,5	7,45
7	A_08	101,3	258,8	7,17
8	A_09	64,2	441,7	7,22
9	A_10	35,0	55,3	7,36
10	A_11	103,7	183,2	7,41
11	A_14	95,0	224,9	7,44
12	A_15	100,1	364,9	7,11
13	A_18	91,3	2155,4	6,18
14	A_21	93,4	256,8	7,33
15	A_22	83,6	220,9	7,55
16	A_23	82,4	262,1	6,68
17	A_24	98,0	348,1	6,47
18	A_25	60,5	134,2	7,85
19	A_26	121,1	2019,5	6,48
20	A_27	57,2	297,0	7,53
21	A_28	50,2	59,7	7,65
22	A_30	80,5	59,0	7,77
23	A_32	68,3	288,5	7,14
24	A_34	181,8	1856,0	6,18
25	A_36	43,3	44,3	7,27
26	A_37	106,5	807,6	6,98
27	A_38	39,4	85,1	7,54
28	A_39	50,1	104,3	7,29

2.2 Vergleich der gemessenen Amphetaminkonzentrationen im Speichel und Serum

2.2.1 Hintergrund

Der lineare Zusammenhang zwischen Serum- und Speichelkonzentration kann zwar durch eine Korrelationsanalyse bestimmt werden, allerdings wird dadurch nur die Wechselbeziehung zweier Variablen nachgewiesen (Einleitung, A 2.1).[75] Da für die Austauschbarkeit zweier Methoden in der klinischen Routine jedoch die Abweichungen der Messwerte relevant sind, wird für eine klinische Validierung die Plotanalyse nach Bland-Altman angewendet.[74] Die Bland-Altman-Analyse ist ein Verfahren zum Vergleich zweier quantitativer Methoden, dabei werden die Differenzen und der Mittelwert der in unterschiedlichen Matrices gemessenen Konzentrationen für jede Probe gegeneinander aufgetragen.[74] Somit lassen sich Ausreißer und systematische Unterschiede identifizieren und anhand der Akzeptanzlimits bewerten.[74, 75] Da dieses Verfahren für verschiedene quantitative Methoden einsetzbar ist, existiert kein allgemeingültiges Akzeptanzintervall.[75] Es wird daher empfohlen, vor der Analyse ein der klinischen Anforderung entsprechendes Intervall festzulegen.[75] In der vorliegenden Arbeit wurde sich an den Vorgaben der Leitlinie zur bioanalytischen Methodvalidierung der EMA (European Medicines Agency) orientiert, wonach 67 % der Proben innerhalb eines Akzeptanzintervalls von 20 % liegen sollen.[91]

2.2.2 Korrelation zwischen der Speichel- und Serumamphetaminkonzentration

2.2.2.1 Ergebnisse

Da die verwendeten Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ nicht normalverteilt waren (Shapiro-Wilk-Test)(Tab. Anhang, D 1.1.1), wurde die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman angewendet. Diese ergab zwar einen linearen Zusammenhang zwischen der Speichel- und der Serumamphetaminkonzentration ($\rho = 0,628$; $P < 0,001$; Abbildung 3)[92], im Bland-Altman-Plot war dagegen eine große mittlere Differenz von -343 ng/mL zwischen den Messwerten beim Vergleich zwischen Serum- und Speichelkonzentration (Abbildung 4) sowie eine erhebliche Abweichung über das Akzeptanzintervall hinaus (Abbildung 5) zu beobachten.

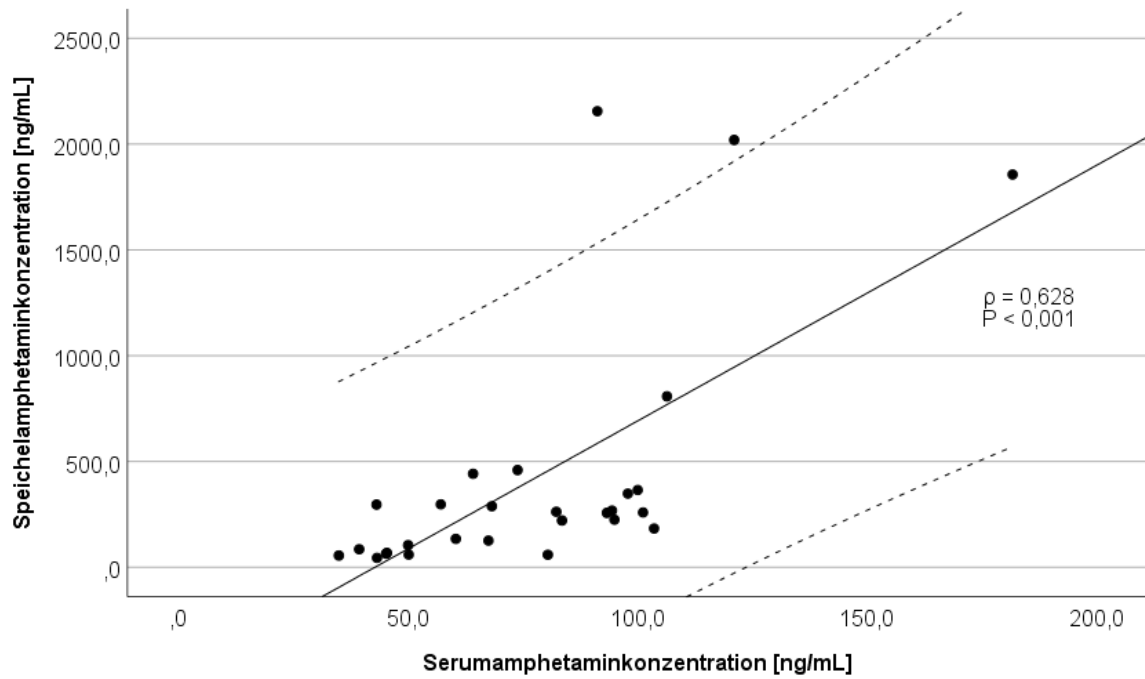


Abbildung 3: Korrelation zwischen Speichel- und Serumkonzentration (n = 28). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192)

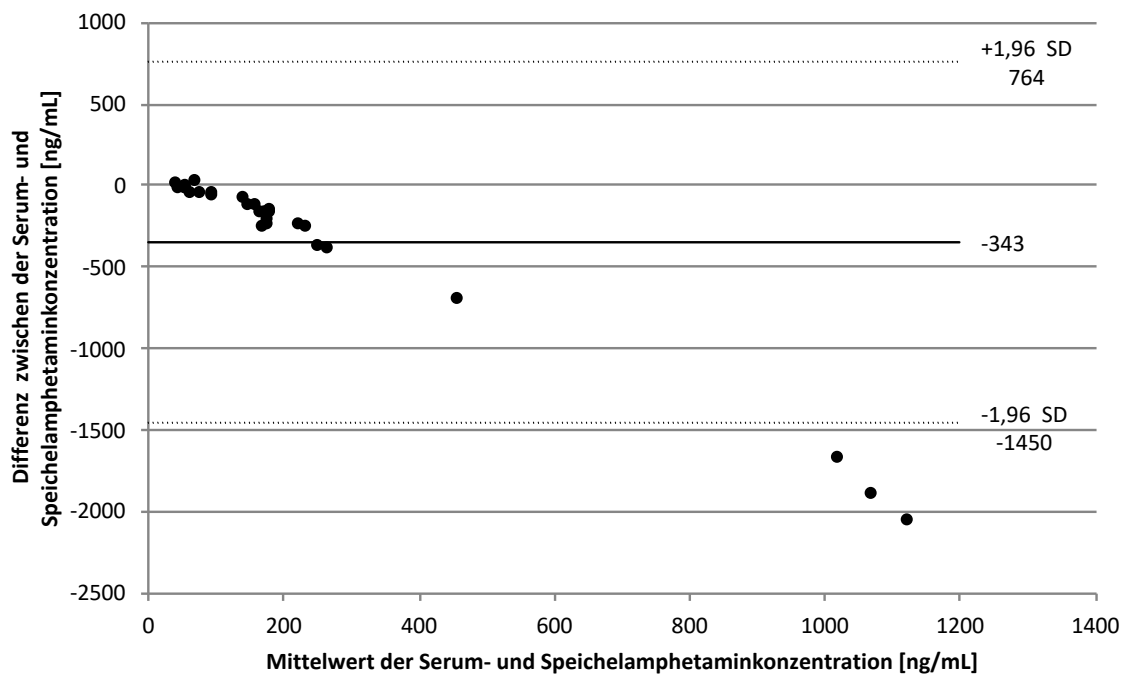


Abbildung 4: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der im Serum und im Speichel gemessenen Konzentrationen (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen und die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden.

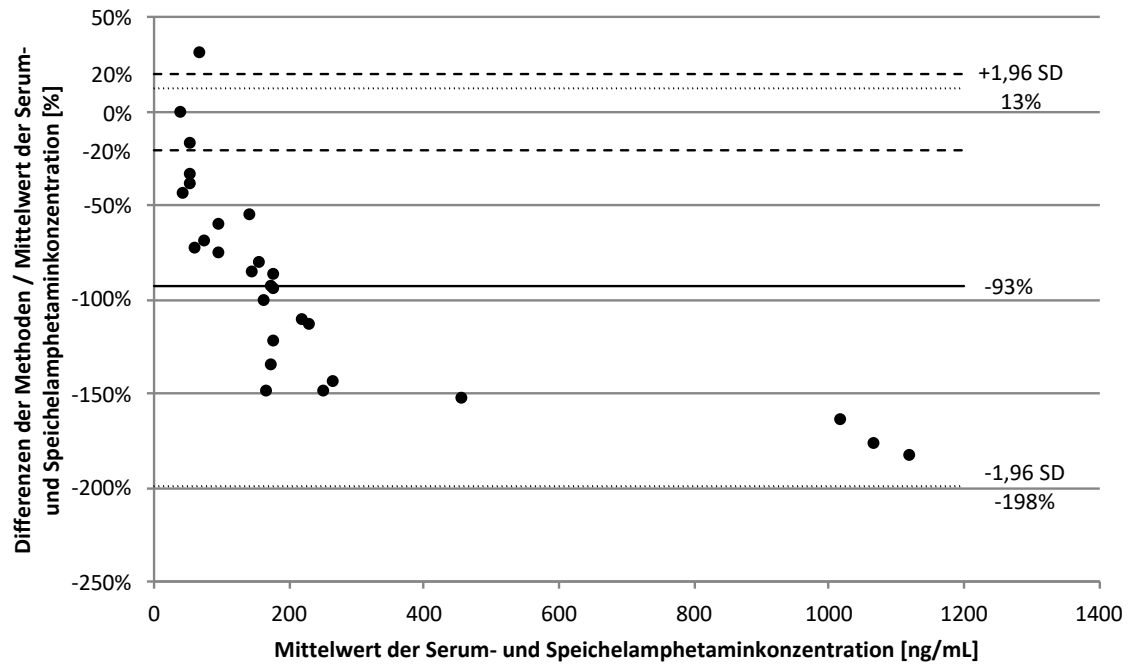


Abbildung 5: Bland-Altman-Plot zum relativen Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der Speichel und Serumamphetaminkonzentration ($n = 28$). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen und die gepunkteten Linien das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden. Die gestrichelten Linien zeigen ± 20 % Abweichung von dem Mittelwert der Differenzen an; in diesem Bereich sollten in Anlehnung an die Vorgaben der EMA 67 % der Proben liegen. Nur zwei Messwerte liegen innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 %.

2.2.2.2 Diskussion

In der Untersuchung konnte zwar auf den ersten Blick eine starke Korrelation zwischen der Speichel- und Serumamphetaminkonzentration nachgewiesen werden (Allg. Teil, B 2.2.2.1, Abbildung 3), jedoch fällt eine inhomogene Verteilung der Messwerte im Streudiagramm auf. Während die meisten Werte im unteren Kurvenbereich verteilt sind, weisen die obersten drei Werte im Vergleich zu den restlichen Proben verhältnismäßig hohe Speichelkonzentrationen (> 1800 ng/mL)(Abbildung 3) auf. Zudem zeigt sich, bei näherer Betrachtung, dass diese drei Proben sehr niedrige Speichel-pH-Werte ($< 6,5$) aufweisen (Allg. Teil, B 2.1, Tabelle 2). Die physikochemischen Zusammenhänge (Einleitung, A 2.3) legen nahe, dass der Speichel-pH-Wert einen starken Einfluss auf die Speichelkonzentration von basischen Arzneistoffen mit geringer Plasmaproteinbindung hat, was die sehr hohen Speichelamphetaminkonzentrationen erklären könnte.[82] In anderen wissenschaftlichen Arbeiten konnte dieser pH-Effekt in kleinen Stichproben für Amphetamin beobachtet werden.[54, 68]

Darüber hinaus weist die Bland-Altman-Analyse (Allg. Teil, B 2.2.2.1, Abbildung 4) eine deutliche Verschiebung der mittleren Differenz vom Nullwert auf und bekräftigt die inhomogene Verteilung der Werte im Streudiagramm. Aufgrund der starken Abweichung zwischen den Speichel- und Serumkonzentrationen lagen nur zwei Messwerte innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 % (Allg. Teil, B 2.2.2.1, Abbildung 5), sodass eine Austauschbarkeit von Serum durch Speichel nicht ohne weiteres möglich ist.

2.3 Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumamphetaminkonzentration

2.3.1 Hintergrund

Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass der Speichel-pH-Wert einen maßgeblichen Einfluss auf die Speichelkonzentration von basischen Arzneistoffen mit geringer Plasmaproteinbindung hat (Einleitung, A 2.3).[54, 68, 69, 73, 93] Es wird vermutet, dass sich diese Wirkstoffe bei niedrigem pH-Wert im Speichel aufkonzentrieren.[82, 94] Diese Hypothese ist eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse aus Allg. Teil, B 2.2.2 und soll im Folgenden betrachtet werden.

Aufgrund der biochemischen Zusammenhänge, die den Wirkstofftransfer in den Speichel beeinflussen (Einleitung, A 2.3), konnte mittels Speichel- und Blut-pH-Wert, pK_s -Wert und der freien Fraktion des Wirkstoffs der zu erwartende Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration berechnet werden. Dazu wurde die nach Matin et al. modifizierte Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Formel 1) verwendet, die das Verhältnis der Wirkstoffanteile in dem jeweiligen Kompartiment abhängig von dem vorherrschenden pH-Wert beschreibt.[93] Auf diese Weise kann auch das theoretische Verteilungsverhalten, der Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration, eines Wirkstoffs zwischen Speichel und Blut, über einen pH-Bereich abgebildet werden (Abbildung 6).

Formel 1: Modifizierte Henderson-Hasselbalch-Gleichung für basische Arzneistoffe nach Matin et al. [93]

$$\frac{c_{\text{Speichel}}}{c_{\text{Serum}}} = \frac{1 + 10^{-(pH_{\text{Speichel}} - pK_s)}}{1 + 10^{-(pH_{\text{Serum}} - pK_s)}} \times \frac{f_{\text{Serum}}}{f_{\text{Speichel}}}$$

Da nur der ungebundene Wirkstoff durch passive Diffusion in den Speichel übergehen kann, ist dieser Anteil eine wichtige Kenngröße für die Berechnung. Die ungebundene Fraktion liegt bei Amphetamin abhängig von physiologischen Faktoren zwischen 80 und 84 %.[54, 82, 85, 86] Aufgrund des niedrigen Proteinanteils im Speichel und der somit geringen Bindungskapazität kann der proteingebundene Wirkstoffanteil im Speichel generell mit < 1 % angenommen werden.[79, 95]

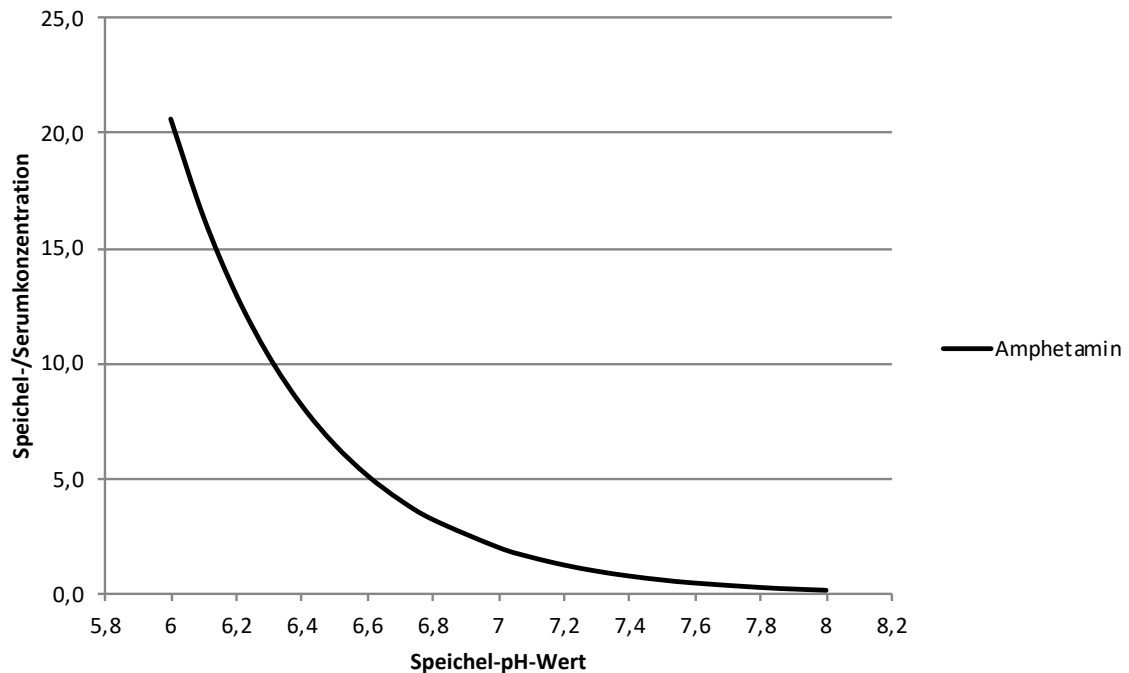


Abbildung 6: Darstellung des Verhältnisses von Speichel- zur Serumamphetaminkonzentration über den pH-Bereich von 6 - 8. Als Grundlage für die Berechnung wurde ein konstanter Blut-pH-Wert von 7,4 und eine Speichelproteinbindung von 0 % angenommen. Für Amphetamin wurde der pK_s 10,13 und ein serumproteingebundener Anteil von 18 % verwendet (Tab. Anhang, D 3).

Da die physikochemischen Eigenschaften für den transmembranären Transport eine wichtige Rolle spielen, können Arzneistoffe in vier Gruppen eingeteilt werden. Für die erste Gruppe ist ein niedriger Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration (< 1) charakteristisch, hierunter befinden sich zumeist schwach saure Wirkstoffe und solche, die eine relevante Plasmaproteinbindung aufweisen.[82] In der zweiten Gruppe entspricht die Speichelkonzentration der Serumkonzentration ($= 1$), hierunter fallen vor allem neutrale Moleküle, die nicht an Plasmaproteine gebunden sind.[82] Die dritte Gruppe besteht vor allem aus Substanzen, die aufgrund eines aktiven Transportmechanismus einen hohen Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration (> 1) aufweisen.[96] Im Unterschied zur dritten Gruppe weist die vierte Gruppe einen sehr hohen Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration (> 1) auf, dies trifft hauptsächlich auf basische Arzneistoffe mit einer geringen Serumproteinbindung, wie Amphetamin, zu.[96]

So wurde bereits in kleineren Untersuchungen ($n = 4 - 10$) für Amphetamin ein zwei- bis vierfach höherer Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration nachgewiesen.[54, 68] Für unsere Analyse sollte aber der Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Transfer von Amphetamin in den Speichel, dargestellt als Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration, ermittelt werden, um diesen zur Rückrechnung der Serumkonzentration berücksichtigen zu können.

2.3.2 Ergebnisse

Um den Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf die Speichelkonzentration zu bestimmen, wurde aus den Messwerten (Allg. Teil, B 2.1; Tabelle 2) der Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration berechnet und mit dem Speichel-pH-Wert korreliert. Die Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration lagen zwischen 0,73 und 23,60 (Mittelwert \pm SD $4,59 \pm 4,95$; Median 2,70) und verliefen exponentiell zum Speichel-pH-Wert (Abbildung 7). Über den gemessenen pH-Bereich von 6,18 bis 7,92 fällt die Speichelkonzentration in Relation zur Serumkonzentration stärker ab, somit weist der Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration eine starke negative Korrelation mit dem pH-Wert auf ($y = -1,269x + 10,285$) ($\rho = -0,712$; $P < 0,001$; Abbildung 8)[92].

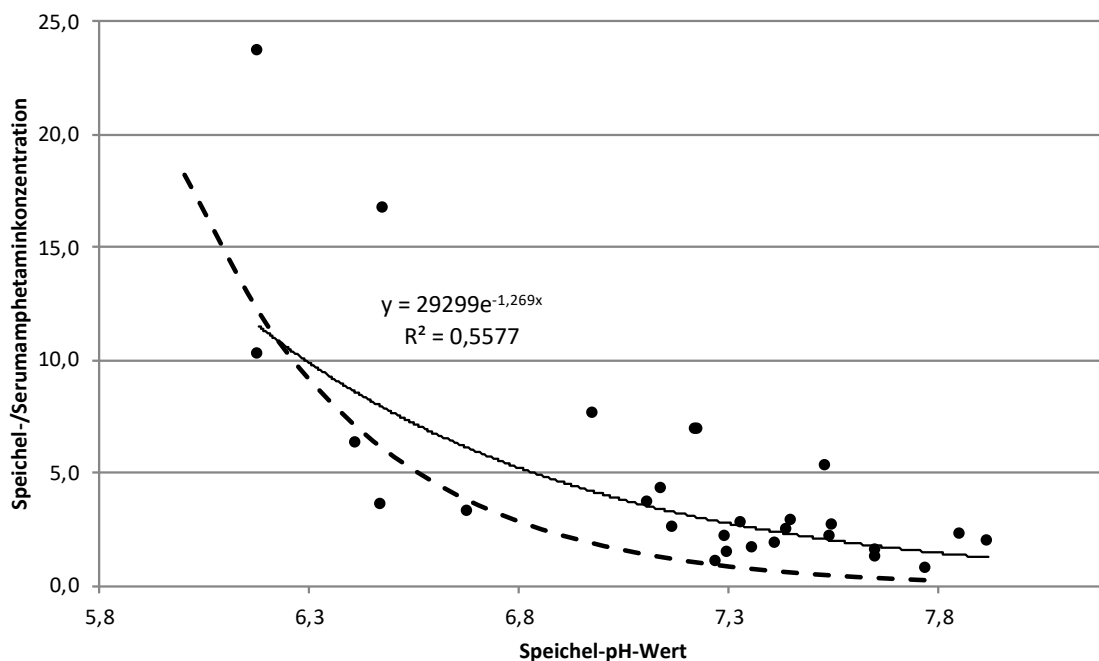


Abbildung 7: Darstellung des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 28). Die gestrichelte Linie stellt den nach der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechneten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration (Abbildung 6) und die durchgezogene Linie stellt die die exponentielle Trendlinie dar.

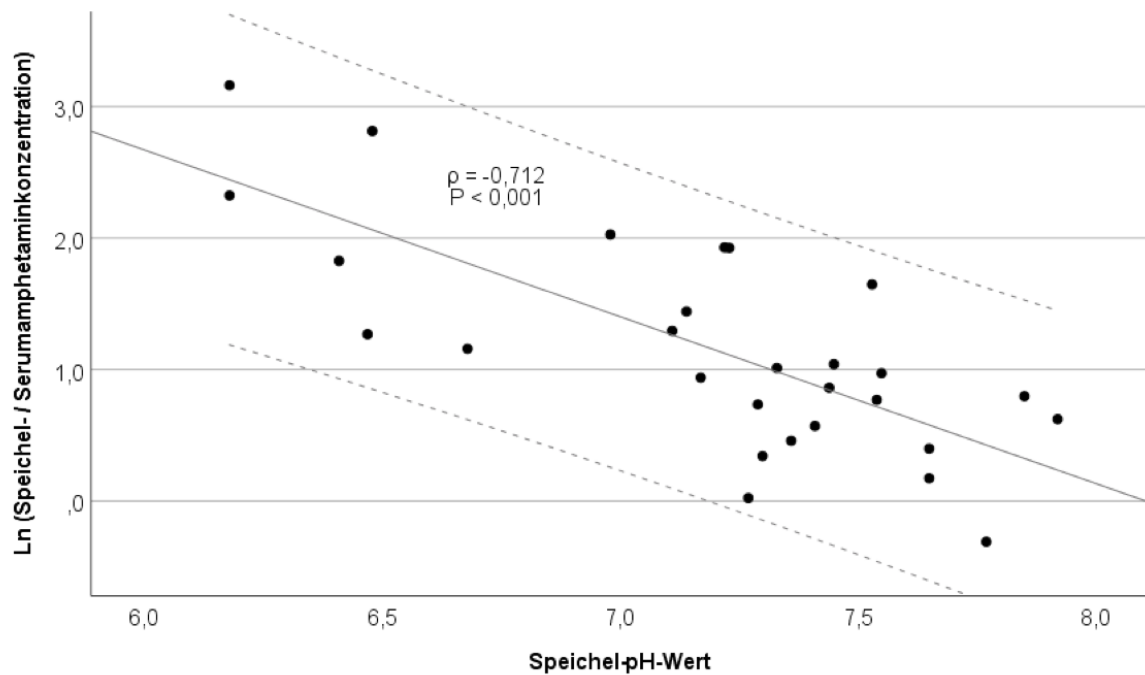


Abbildung 8: Darstellung des logarithmierten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 28). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall und die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192)

2.3.3 Diskussion

Die Speichelproben lagen im pH-Bereich zwischen 6,18 und 7,92, dieser war vergleichbar mit denen aus anderen wissenschaftlichen Untersuchungen wie von Stegmann et al. 5,05 - 8,66;[68] Ebert et al. 4,8 - 9,1;[97] und Preiskorn et al. 5,8 - 7,83[67]. Insgesamt konnte eine hohe Variabilität des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration und eine starke negative Korrelation mit dem Speichel-pH-Wert festgestellt werden.

Die Variabilität des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration ist in der vorliegenden Arbeit zwar größer als in der Untersuchung von Stegmann et al. für Amphetamin (Mittelwert \pm SD 2,7 \pm 1,7; n = 4),[68] jedoch ist die Vergleichbarkeit nur eingeschränkt möglich, da die Stichprobe mit vier Probanden sehr klein ist und zudem nicht klar ist, in welchem pH-Bereich die Proben liegen.[68] Darüber hinaus sind keine weiteren vergleichbaren Untersuchungen im kinder- und jugendpsychiatrischen Bereich zu Amphetamin bekannt. Für Methylphenidat, das ähnliche physikochemische Eigenschaften (pK_s 8,9; Serumproteinbindung 10 - 33 %)[98, 99] wie Amphetamin besitzt, wurden dagegen von Stegmann et al. (Mittelwert \pm SD 4,0 \pm 3,4; n = 13) und von Preiskorn et al. (Mittelwert \pm SD 4,65 \pm 2,4; n = 18) vergleichbare Ergebnisse an größeren Stichproben beobachtet.[67, 68] Es wird vermutet, dass die hohe Variabilität der Speichelamphetaminkonzentration auf die Akkumulation nach dem Ionenfallenprinzip zurückzuführen ist.[54] Dabei kann der freie, nicht ionisierte und daher lipophilere Anteil gut aus

dem Blut durch die Mundschleimhaut in den Speichel diffundieren. Aufgrund der basischen Eigenschaften von Amphetamin (pK_s 10,13)[84] und des – relativ zum Blut – niedrigeren pH-Wertes verschiebt sich im Speichel das Dissoziationsgleichgewicht zur protonierten Form des Moleküls (Abbildung 9), in der es nicht zurückdiffundieren kann. Da der Speichel-pH-Wert inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegt (Einleitung, A 2.2), der physiologische pH-Wert des Blutes jedoch durch Puffersysteme konstant gehalten wird, verstärkt sich dieser Effekt, je niedriger der Speichel-pH-Wert ist, durch den exponentiellen Zusammenhang (Allg. Teil, B 2.3.1, Abbildung 6) erheblich und bedingt somit die hohe Variabilität der Speichel- und Serumkonzentration über den in der vorliegenden Studie untersuchten pH-Bereich.[93]

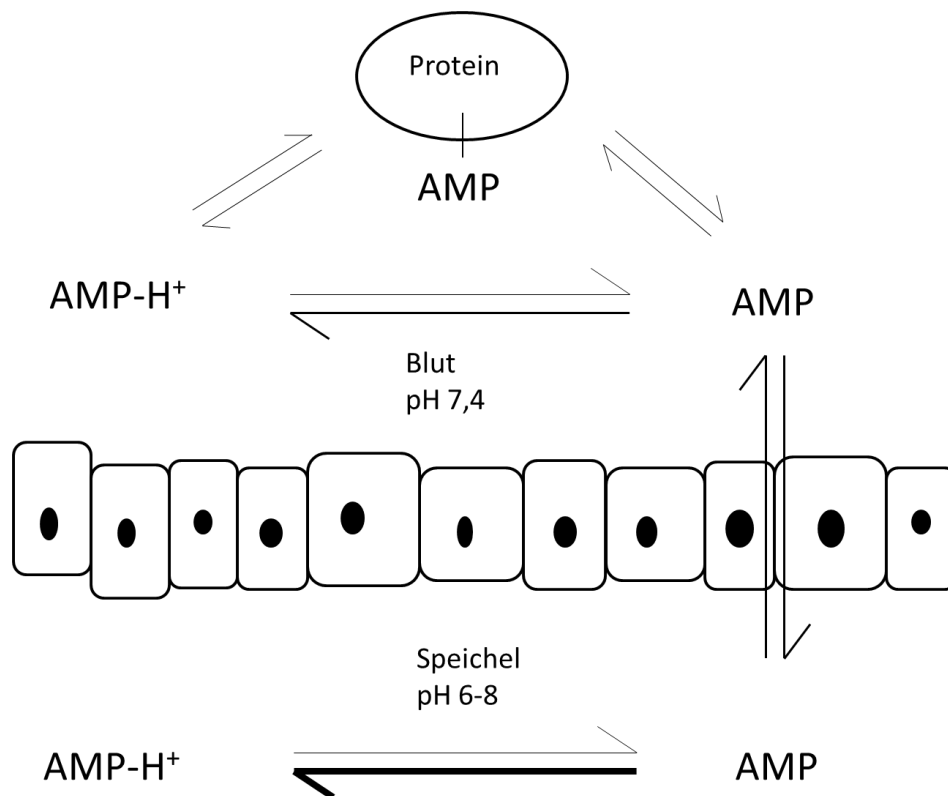


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Verteilungsverhaltens von Amphetamin in Speichel und Blut in Anlehnung an Haeckel et al.[82] Die hervorgehobenen Pfeile zeigen eine Gleichgewichtsverschiebung abhängig vom pH-Wert an. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5375981451797)

Die Speichelamphetaminkonzentration ist somit in erheblichem Maße vom pH-Wert abhängig, der selbst durch die Speichelflussrate beeinflusst wird (Einleitung, A 2.2).[100, 101] So sinkt die Bicarbonatsekretion bei vermindertem Speichelfluss, die Pufferkapazität nimmt ab und der Speichel-pH-Wert sinkt; umgekehrt verhält es sich dagegen bei einer Stimulation der Speichelflussrate.[78, 81, 100, 101] Der Speichelfluss kann durch sensorische (gustatorische,

olfaktorische) und mechanische Reize (Kauen), physiologische (Alter, Geschlecht, systemische Erkrankungen und Entzündungen) und psychologische Bedingungen (Stress, Angst und Depression) sowie durch Medikamente beeinflusst werden.[78, 102-104] Da zur Speichelstimulation schon minimale Reize, wie etwa das Spucken in ein Plastikgefäß, ausreichen, ist es schwierig, per Definition unstimulierten Speichel zu gewinnen.[79] So wird auch nur durch das Einlegen einer Saugrolle die Speichelflussrate angeregt.[105] Dennoch wird in der Literatur in diesem Zusammenhang häufig von unstimuliertem Speichel gesprochen.[79] Es muss aber zwischen der Art und Stärke der Stimulation differenziert werden; so wird zwar durch Ausspucken von Speichel die Flussrate auf ca. 0,5 mL/min angeregt, jedoch können mechanische Reize wie etwa Kaubewegungen auf einer Saugrolle, Kaugummi oder Parafilm® die Speichelflussrate auf 1 - 3 mL/min und eine gustatorische Stimulation durch Zitronensäure sogar auf 5 - 10 mL/min erhöhen.[79, 106] Dabei können Verdünnungseffekte auftreten, da es bei sehr hohen Speichelflussraten aufgrund der begrenzten Diffusionsrate nicht mehr zu einer vollständigen Äquilibration kommt.[73, 107] Im Gegensatz dazu können eine Reihe von Medikamenten Mundtrockenheit (Xerostomie) auslösen.[77] Obwohl der genaue Mechanismus nicht vollständig geklärt ist, werden vor allem Medikamente mit einem anticholinergen und/oder sympathomimetischen Wirkungsprofil mit Hyposalivation in Verbindung gebracht.[77, 102] So wird in der Fachinformation von Elvanse® (Lisdexamphetamin) ebenfalls Xerostomie als häufige UAW bei Kindern und Jugendlichen angegeben.[108] In der vorliegenden Untersuchung sollte durch ein standardisiertes Prozedere bei der Probenahme die Einflussfaktoren auf den Speichel-pH-Wert minimiert werden (Exp. Teil, C 1.6.2).

2.4 Vergleich der berechneten mit der gemessenen Serumkonzentration

2.4.1 Hintergrund

Die Ergebnisse in Allg. Teil, B 2.2.2 zeigen, dass eine einfache Umstellung von Serum- auf Speichelproben nicht möglich ist. Für andere alternative Matrices, wie zum Beispiel Dried Blood Spots (DBS), ist es gängig, dass ein Korrekturfaktor, im Falle des DBS für den Hämatokrit, ermittelt wird, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Messwerten aus Trockenblut und Plasma zu erreichen.[109] Analog zu diesem Vorgehen ist aufgrund der starken pH-Abhängigkeit eine Korrektur der Speichelkonzentration durch den Speichel-pH-Wert naheliegend (Allg. Teil, B 2.3). Dieser Korrekturfaktor sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals für Amphetamin ermittelt und überprüft werden.

Im ersten Schritt wurde ein korrigierter Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration für jede Probe berechnet (Formel 2).

Formel 2: Formel zur Berechnung des korrigierten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration.[92]

$$\text{korrigierte } \frac{c_{\text{Speichel}}}{c_{\text{Serum}}} = e^{((\text{Steigung}_{\text{Regression}} \times pH_{\text{Speichel}}) + (\gamma - \text{Achsenabschnitt}_{\text{Regression}}))}$$

Im Anschluss wurde die gemessene Speichelkonzentration durch den korrigierten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration dividiert und für jede Probe eine korrigierte Serumkonzentration berechnet (c_{kSe}) (Formel 3)(Tab. Anhang, D 1.1.7).

Formel 3: Formel zur Berechnung der korrigierten Serumkonzentration.[92]

$$c_{kSe} = \frac{c_{\text{Speichel}}}{\text{korrigierte } \frac{c_{\text{Speichel}}}{c_{\text{Serum}}}}$$

2.4.2 Ergebnisse

Der Vergleich zwischen der berechneten und der gemessenen Serumamphetaminkonzentration zeigt eine positive Korrelation nach Spearman ($\rho = 0,593$; $P < 0,001$; Abbildung 10)[92].

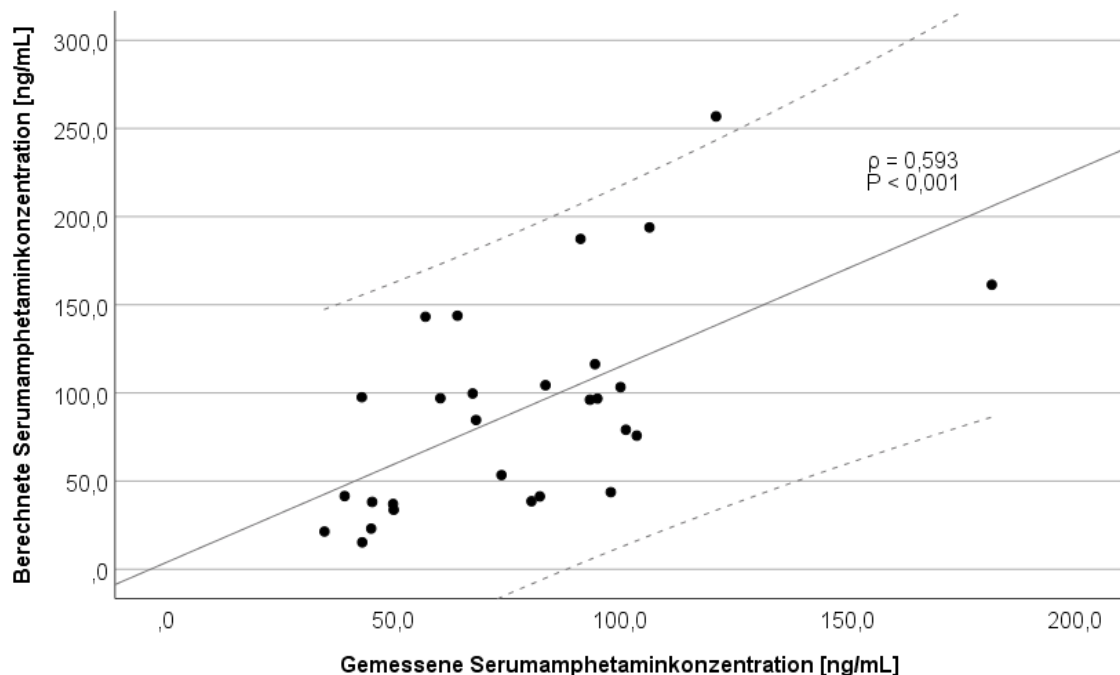


Abbildung 10: Korrelation zwischen der gemessenen und der berechneten Serumkonzentration (n = 28). Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade und die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192)

Die Differenzen der beiden Verfahren wiesen im Bland-Altman-Plot im Mittel eine Verschiebung um -12 ng/mL auf. Das Konfidenzintervall lag dabei zwischen -106 und 81 ng/mL und schloss somit

95 % der Proben ($n = 27$) ein (Abbildung 11). Durch die negative Abweichung des Mittelwertes von null ist eine systematische Überschätzung der berechneten Serumkonzentration zu erkennen, somit stimmen die berechnete und die gemessene Serumkonzentration nicht überein.

Eine Auftragung der Differenzen relativ zum Mittelwert der beiden Messmethoden zeigt, dass auch die Differenzen zwischen -103 und 102 % vom Mittelwert liegen. In dem zuvor festgelegten Akzeptanzintervall von 20 % liegen nur 21 % der Proben in diesen Bereichen (Abbildung 12)[92].

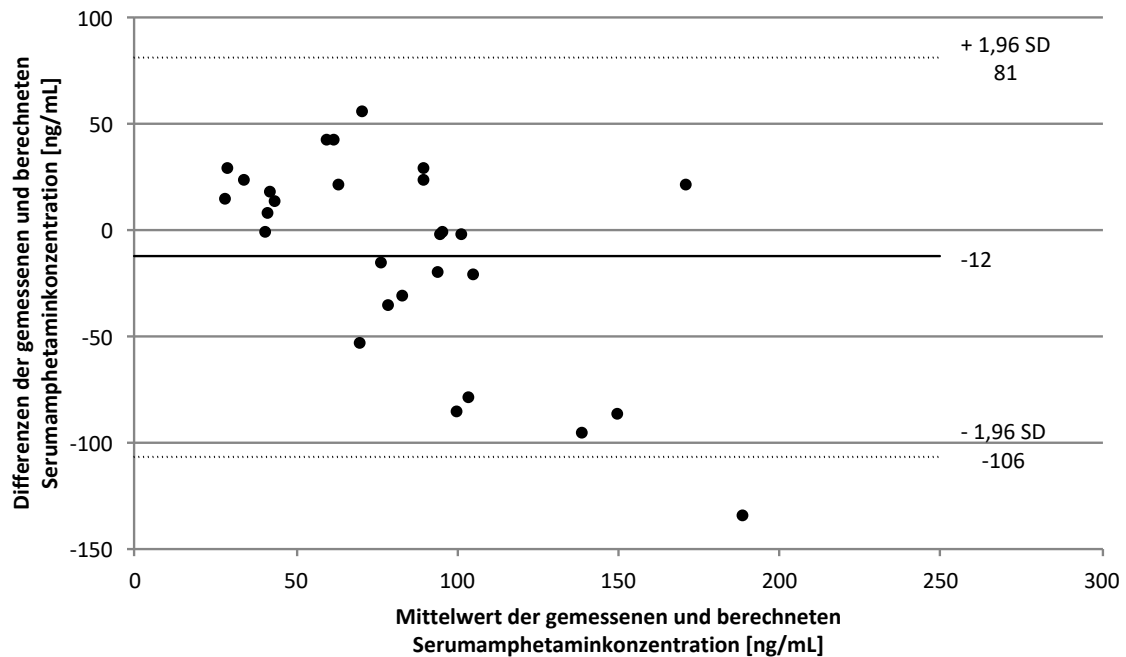


Abbildung 11: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der gemessenen und berechneten Amphetaminkonzentration ($n = 28$). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen dar, die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden.

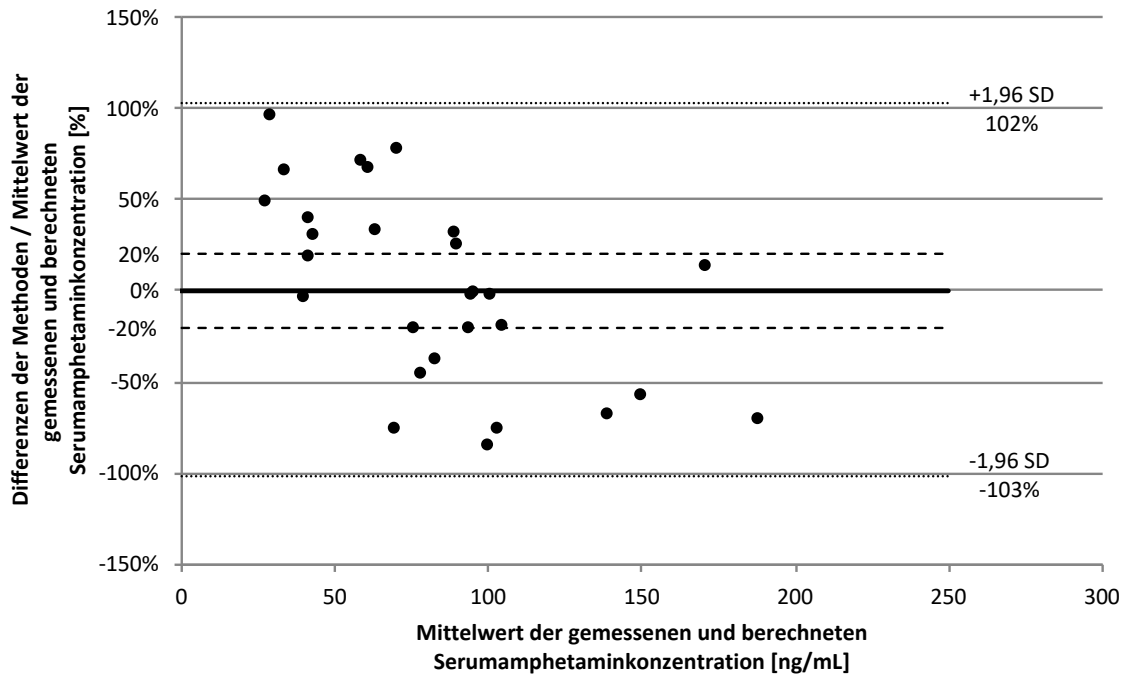


Abbildung 12: Bland-Altman-Plot zum relativen Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der gemessenen und berechneten Amphetaminkonzentration (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen dar, die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die gestrichelten Linien zeigen ± 20 % Abweichung von dem Mittelwert der Differenzen an, in diesem Bereich sollten in Anlehnung an die Vorgaben der EMA 67 % der Proben liegen. Insgesamt liegen 6 Messwerte innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 %. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192)

2.4.3 Diskussion

Für den Vergleich unterschiedlicher Messmethoden wird in der EMA-Leitlinie zur Validierung von bioanalytischen Methoden ein Bereich von ± 20 % des Mittelwertes der Differenzen definiert, in dem mindestens 67 % der Proben liegen sollen.[91] In der vorliegenden Untersuchung lagen bei nur 21 % der Proben die Differenzen der Mittelwerte von berechneter und gemessener Serumkonzentration innerhalb dieses Intervalls (Allg. Teil, B 2.4.2, Abbildung 12). Es konnte zwar insgesamt eine Verbesserung der Vergleichbarkeit durch die Umrechnung der Speichelkonzentration erreicht werden, dennoch waren die Messwertabweichungen zwischen den beiden Matrices zu groß, sodass die klinische Validierung nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

Somit ist ein grundsätzlicher Austausch von Serum- gegen Speichelmatrix für TDM von Amphetamin nicht möglich. Insbesondere zur Dosisanpassung ist Speichel aufgrund der großen Varianzen zur Serumkonzentration ungeeignet. Dennoch ist eine Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Speichel zur Adhärenzkontrolle sinnvoll. So konnte in der vorliegenden Arbeit ein Patient identifiziert werden, der das Medikament unregelmäßig einnahm. Ebenso kamen Böttcher et al. 2019 in einer groß angelegten Untersuchung zum Schluss, dass sich die Quantifizierung von

Amphetamin in einer Speichelmatrix zur Kontrolle der Medikamenteneinnahme von Lisdexamphetamin eignet.[110]

In Zukunft wäre auch eine Verwendung von Speichel zur Verlaufskontrolle nach der DosisEinstellung, wie bei Methylphenidat,[67] denkbar, dazu sind jedoch weitere Untersuchungen zur intraindividuellen Variabilität der Speichelamphetaminkonzentration notwendig.

3 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Guanfacin

3.1 Bestimmung der Guanfacinkonzentration im Speichel und Serum

Die in neun Patientenproben bestimmten Serumguanfacinkonzentrationen schwankten zwischen 2,99 und 13,57 ng/mL (Mittelwert \pm SD 7,47 \pm 3,61 ng/mL; Median 7,77 ng/mL). In den dazu korrespondierenden Speichelproben lagen die Guanfacinkonzentrationen zwischen 0,45 und 5,55 ng/mL (Mittelwert \pm SD 2,36 \pm 1,68 ng/mL; Median 1,88 ng/mL). Die pH-Werte der Speichelproben erstreckten sich über einen pH-Bereich von 6,60 bis 7,77 (Mittelwert \pm SD 7,22 \pm 0,37; Median 7,35)(Tabelle 3).

Tabelle 3: Guanfacinkonzentration in Serum und Speichel von 9 Probanden.

Proband	Studiencode	Serumkonzentration [ng/mL]	Speichelkonzentration [ng/mL]	Speichel- pH-Wert
29	G_02	12,05	4,43	6,98
30	G_03	4,64	2,37	7,08
31	G_04	13,57	5,55	6,85
32	G_06	4,07	1,88	6,60
33	G_07	8,84	1,19	7,45
34	G_08	5,40	0,45	7,35
10	A_11	7,77	2,94	7,41
20	A_27	2,99	1,39	7,53
22	A_30	7,88	1,07	7,77

3.2 Korrelation zwischen Speichel- und Serumguanfacinkonzentration

3.2.1 Ergebnisse

Nachdem die zu testenden Variablen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ normalverteilt waren (Shapiro-Wilk-Test)(Tab. Anhang, D 2.1.1), wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Aus dieser ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Speichel- und Serumkonzentration ($r = 0,758$; $P = 0,018$; Abbildung 13)[111].

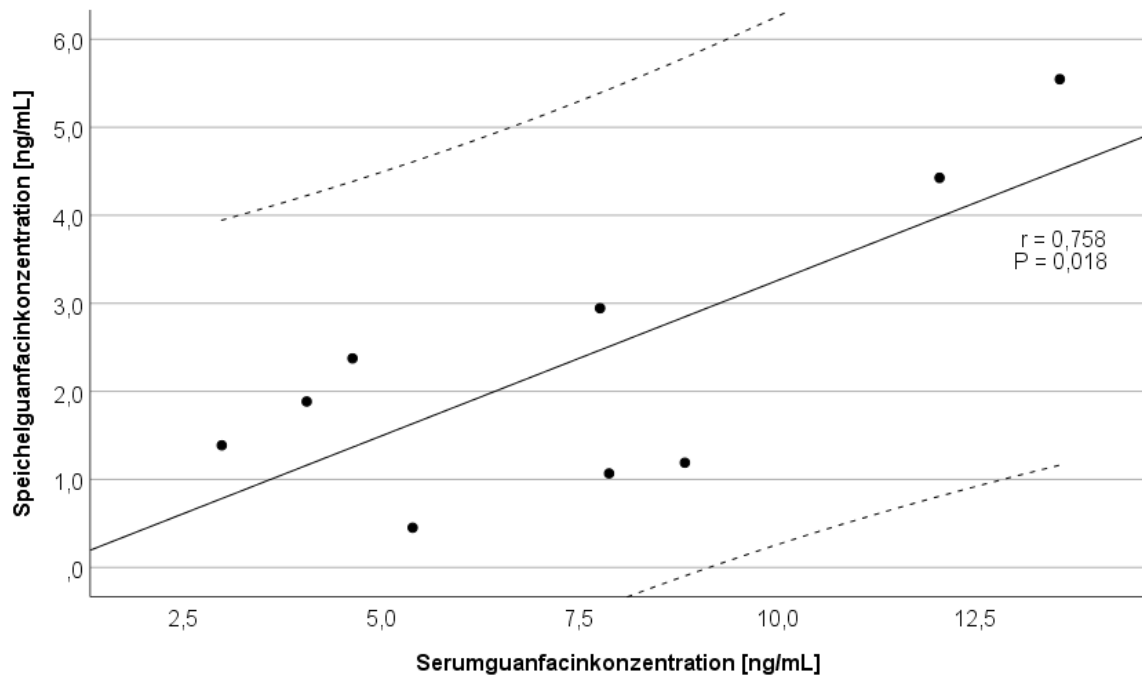


Abbildung 13: Korrelation zwischen der Speichel- und Serumguanfacinkonzentration (n = 9). Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade und die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [111] unter Lizenznummer: 5371260362338)

3.2.2 Diskussion

Unseres Wissens ist dies die erste Arbeit, die Guanfacin im Speichel von Kindern und Jugendlichen untersucht hat und somit die ersten klinischen Daten liefert, die einen starken Zusammenhang zwischen Speichel- und Serumguanfacinkonzentration nachweisen. Der in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Korrelationskoeffizient ist vergleichbar mit denen von schwach sauren Arzneistoffen mit moderater Serumproteinbindung wie Phenobarbital (pK_s 7,3; 45 % serumproteingebunder Wirkstoffanteil).[112, 113]

3.3 Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumguanfacinkonzentration

3.3.1 Hintergrund

Für Guanfacin wurde ebenso wie für Amphetamin der Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration mit Hilfe der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung nach Matin et al. für verschiedene Speichel-pH-Werte berechnet,[93] um das theoretische Verteilungsverhalten im Speichel über einen pH-Bereich von 6 - 8 darzustellen (Allg. Teil, B 2.3).

Da Guanfacin deutlich schwächer basisch (pK_s 7,1) ist als Amphetamin und in größerem Ausmaß an Serumproteine gebunden wird (64 %),[48] ist ein anderes Verteilungsverhältnis zwischen Speichel und Serum als bei dem Psychostimulans zu erwarten (Abbildung 14).

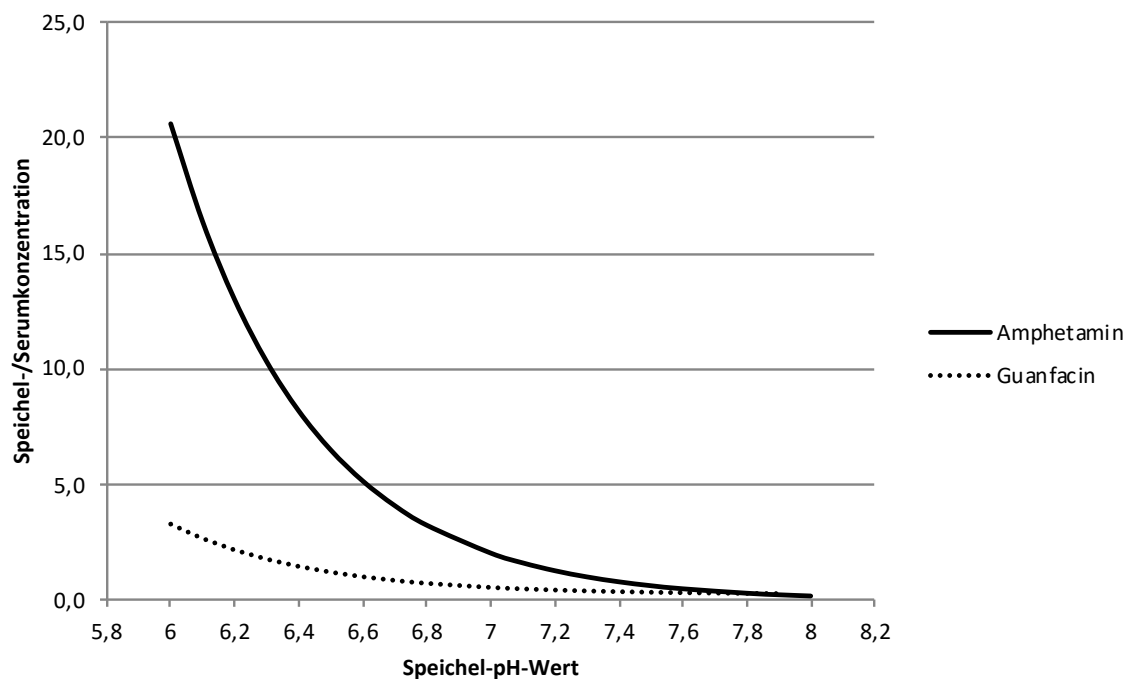


Abbildung 14: Darstellung des Verhältnisses von Speichel- zur Serumkonzentration für Guanfacin und Amphetamin über den pH-Bereich von 6 - 8. Für die Berechnung wurde für Blut ein pH-Wert von 7,4 und eine Speichelproteinbindung von 0 % verwendet. Für Amphetamin wurde ein pK_s von 10,13 sowie eine Serumproteinbindung von 18% und für Guanfacin ein pK_s von 7,1 sowie eine Serumproteinbindung von 64% angenommen (Tab. Anhang, D 3).

3.3.2 Ergebnisse

Die Serumkonzentrationen von Guanfacin waren im Mittel um das 3-Fache höher als die Speichelkonzentrationen (verbundener t -Test, 2,36 ng/mL vs. 7,47 ng/mL; $t(8) = 5,94$; $P < 0,001$)(Tab. Anhang, D 2.1.4), somit lag auch der Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration zwischen 0,08 und 0,51 (Mittelwert \pm SD 0,33 \pm 0,16; Median 0,38).

Über den gemessenen pH-Bereich zwischen 6,60 und 7,77 wurde kein signifikanter Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration festgestellt, jedoch ließ sich ein Trend erkennen ($r = -0,574$; $P = 0,106$; Abbildung 15)[111].

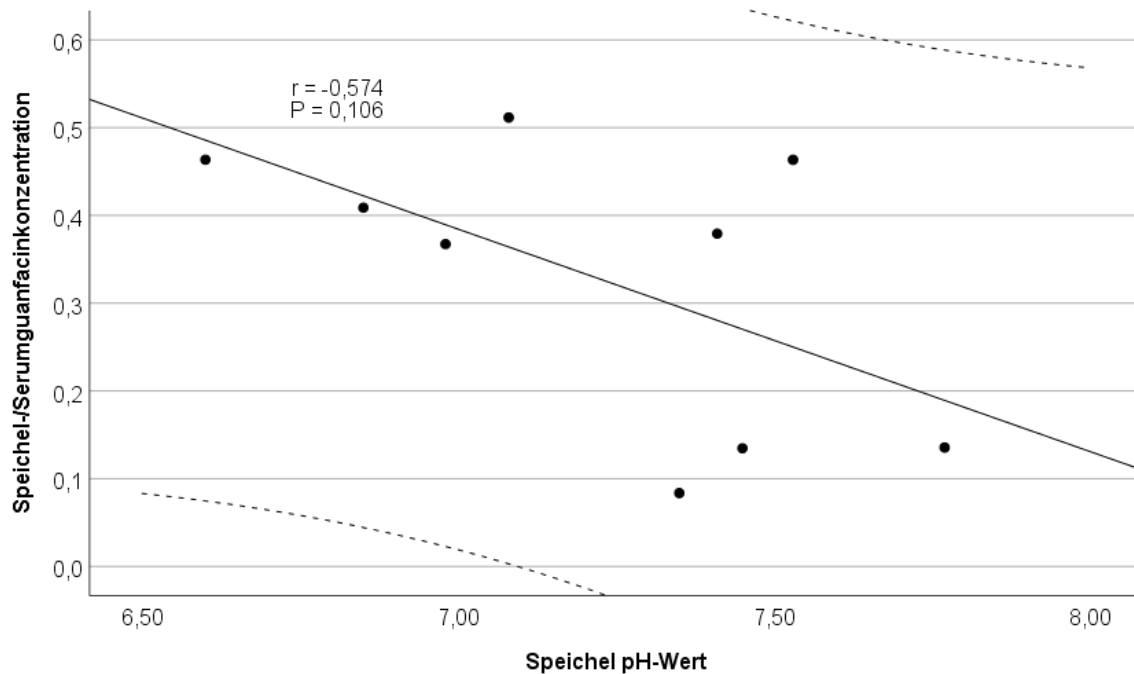


Abbildung 15: Darstellung des Quotienten aus Speichel- und Serumguanfacinkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 9). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall und die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [111] unter Lizenznummer: 5371260362338)

3.3.3 Diskussion

Es wurde zwar kein signifikanter Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gefunden, jedoch zeichnete sich ein Trend ab. Zudem wurde im Vergleich zur Serumkonzentration eine 3-fach niedrigere Speichelkonzentration und eine geringe Variabilität des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration beobachtet.

Im Gegensatz zu den stärker basischen Psychostimulanzien, die bei niedrigerem pH-Wert im Speichel akkumulieren (Allg. Teil, B 2.3.2), wird die Speichelkonzentration von Guanfacin aufgrund der sehr schwach basischen Eigenschaften ($pK_s 7,1$)[48] weniger stark durch den Speichel-pH-Wert beeinflusst. Ungebundenes Guanfacin liegt im Blut vorwiegend ungeladen vor und gelangt aufgrund der lipophilen Eigenschaften mittels passiver Diffusion in den Speichel (Einleitung, A 2.3). Bei einem Speichel-pH-Wert über 7,1 liegt ein Großteil des Arzneistoffes ungeladen vor, der somit wieder in das Blut zurückdiffundieren kann, während der kleinere ionisierte Anteil im Speichel verbleibt. Erst unterhalb eines Speichel-pH-Wertes von 7,1 kippt das Dissoziationsgleichgewicht zugunsten des ionisierten Anteils und es kommt zur Akkumulation im Speichel (Abbildung 16).

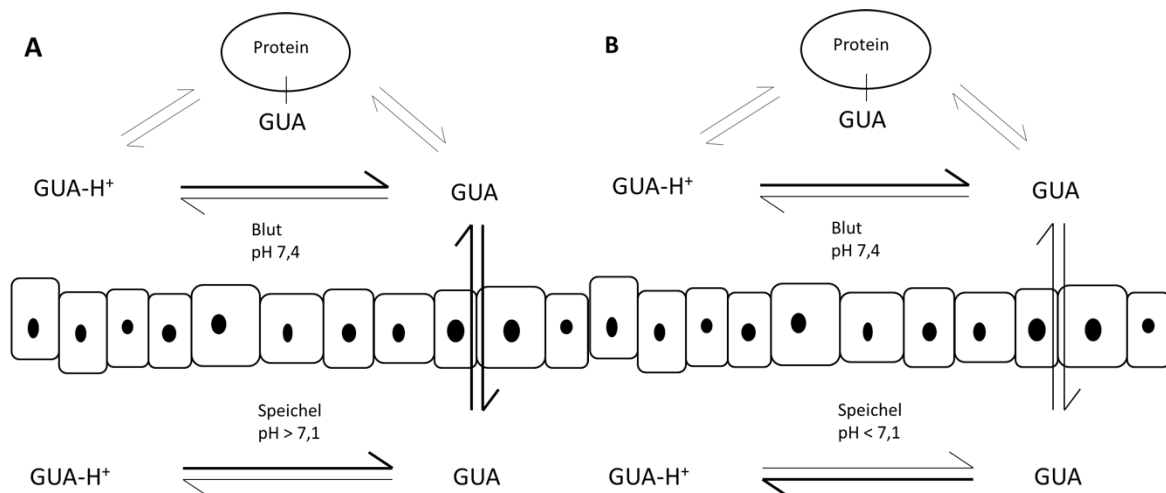


Abbildung 16: Darstellung des Verteilungsverhaltens von Guanfacin zwischen Blut und Speichel nach Haeckel et al.[82]
 In Grafik A wird die Verteilung für Speichel-pH-Werte über 7,1 und in Grafik B für Speichel-pH-Werte unter 7,1 abgebildet. Die hervorgehobenen Pfeile geben eine Gleichgewichtsveränderung abhängig vom pH-Wert an. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5375981451797)

Nach Haeckel et al. lassen sich Arzneistoffe anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften und der Verteilungsverhältnisse zwischen Speichel und Serum eingruppiert werden (Allg. Teil, B 2.3.1).[82] Guanfacin kann aufgrund des niedrigen Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration (0,33) der Gruppe der schwach sauren Arzneistoffe mit mittlerer Serumproteinbindung zugeordnet werden, so ist der Wert gut vergleichbar mit dem Literaturwert von Phenobarbital (0,28).[82, 112]

Nach der Modellberechnung mittels der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung ist eine signifikante Korrelation zwischen dem Speichel-pH-Wert und dem Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration zu erwarten (Allg. Teil, B 3.3.1, Abbildung 14), jedoch lässt sich aus den vorliegenden Studiendaten, bedingt durch den geringen Stichprobenumfang, nur ein Trend erkennen. Anhand der Modellberechnung ist jedoch ersichtlich, dass der Einfluss des pH-Wertes nahe des pK_s -Wertes grundsätzlich kleiner ist und somit auch eine geringere Auswirkung auf die Speichelkonzentration des Wirkstoffs hat als bei stärker basischen Substanzen. Damit kann für Guanfacin die im Vergleich zu Amphetamin deutlich geringere Variabilität des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration erklärt werden.

Mit unseren Ergebnissen liefern wir erste Hinweise darauf, dass der Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration von Guanfacin weniger stark ausgeprägt ist und Guanfacin somit ein vielversprechenderer Kandidat für TDM im Speichel ist als stärker basische Arzneistoffe. Allerdings müssen diese ersten Ergebnisse durch weitere Untersuchungen an einer größeren Stichprobe repliziert und klinisch validiert werden.

C

Experimenteller Teil

1 Klinische Studie

1.1 Ethikvotum

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Aktenzeichen: 118/16-sc) und durch den Datenschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Würzburg freigegeben (Aktenzeichen: 683/16).

Die Patienten und deren Erziehungsberechtigte wurden sowohl mündlich als auch schriftlich durch eine altersgerechte Patienteninformation über die Durchführung und den Zweck der Studie aufgeklärt. Zudem wurden sie über die Freiwilligkeit der Studienteilnahme, die Anonymisierung der erhobenen Daten und über die Möglichkeit eines mündlichen Widerrufs der Teilnahme, ohne dass daraus eine Benachteiligung entsteht, informiert.

1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Vor der Durchführung der Studie wurden Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt.

Einschlusskriterien waren:

- Männliche und weibliche Patienten im Alter zwischen sechs und 18 Jahren
- Eine leitliniengerechte indizierte Pharmakotherapie mit einem der drei Präparate (Attentin®, Elvanse® und Intuniv®)
- Die Patienten müssen die Diagnose (ICD-10) einer hyperkinetischen Störung (F90) oder Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität (F98.8) aufweisen

Ausschlusskriterien waren:

- Wenn Probanden 30 Minuten vor der Speichelentnahme Kaugummi gekaut, geraucht, getrunken oder gegessen hatten
- Das Fehlen der unterzeichneten Patienteninformation und -einwilligung
- Die mündliche Rücknahme der bereits unterzeichneten Einwilligungserklärung durch die/den Erziehungsberechtigten oder das Kind bzw. den Jugendlichen

1.3 Drop-out- und Verweigerungsstichprobe

Insgesamt verweigerten acht Patienten aus unterschiedlichen Gründen die Teilnahme. In einem Fall wurde nach der Aufklärung die Studienteilnahme von den Erziehungsberechtigten abgelehnt. Daneben verweigerten fünf Patienten die Teilnahme an der Studie und zwei weitere widerriefen mündlich kurz vor der Blutentnahme ihre Zustimmung.

Zwei Probanden wurden noch vor der Probenahme aus der Studie ausgeschlossen, da kurzfristig die Medikation umgestellt oder abgesetzt wurde, sodass ebenfalls keine Probenahme mehr möglich war.

1.4 Datenerhebung

Die notwendigen Daten wie Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, Diagnose, Medikament und Dosierung sowie Einnahmezeitpunkt, Zeitpunkt der letzten Mahlzeit, Komedikation, Raucherstatus und Koffeinkonsum wurden durch Studienmitarbeiter mithilfe des behandelnden Therapeuten erhoben. Im Anschluss an die Quantifizierung der Proben wurden die Datenerfassungsbögen anonymisiert.

1.5 Stichprobenbeschreibung

Es wurden insgesamt 27 männliche (79,4 %) und sieben weibliche Patienten (20,6 %) in die Studie eingeschlossen, die im Rahmen der ADHS-Pharmakotherapie Medikamente mit den Wirkstoffen Guanfacin und/oder Lisdexamphetamin oder Dexamphetamin erhielten (Tabelle 4).

Die eingenommenen Tagesdosen von Lisdexamphetamin lagen in der Studienpopulation zwischen 20 und 80 mg (Mittelwert \pm SD $41,8 \pm 14,9$ mg; Median 40,0 mg). Dies entspricht einer äquivalenten Dexamphetamindosis zwischen 5,9 und 23,7 mg (Mittelwert \pm SD $12,4 \pm 4,4$ mg; Median 11,9 mg). Bei zwei Probanden wurde die Tagesdosis auf zwei Einnahmezeitpunkte aufgeteilt (Tab. Anhang, D 1.1). Ein weiterer Proband erhielt neben der morgendlichen Gabe Lisdexamphetamin zusätzlich mittags noch ein schnellfreisetzendes Dexamphetaminpräparat. Bei den Probanden mit aufgeteilten Tagesdosen fand die Probenahme zum t_{\max} der ersten Einnahme und vor der Einnahme der zweiten Dosis statt. Die zur Behandlung der ADHS eingenommenen Tagesdosen von Guanfacin schwankten in der Untersuchung zwischen 1 bis 4 mg (Mittelwert \pm SD $2,4 \pm 1,2$ mg; Median 3,0 mg).

Die Zeitspanne zwischen Medikamenteneinnahme und Probenahme schwankte bei Lisdexamphetamin zwischen 2,50 und 6,08 Stunden (Mittelwert \pm SD $3,67 \pm 0,67$ Stunden; Median 3,50 Stunden; Tab. Anhang, D 1.1) und bei Guanfacin zwischen 2,17 und 19,25 Stunden (Mittelwert \pm SD $10,06 \pm 6,85$ Stunden; Median 6,58 Stunden; Tab. Anhang, D 2.1).

Tabelle 4: Physiologische Parameter aller Studienteilnehmer (n = 34).

	Mittelwert \pm SD	Spanne
Alter [Jahre]	11,0 \pm 2,7	6,5 - 16,9
Körpergröße [cm]	144,5 \pm 17,4	110,2 - 180,7
Körpergewicht [kg]	38,5 \pm 14,8	18,0 - 76,5
BMI [kg/m ²]	17,7 \pm 3,2	13,4 - 28,0

1.6 Probengewinnung

1.6.1 Serumproben

Um den Probanden eine separate Venenpunktion zu ersparen, wurde die Probenahme für diese Studie mit einer Blutentnahme in der klinischen Routine verbunden. Dabei wurde dem Probanden durch Punktion der Vena brachialis Blut in eine Serum-Monovette (7,5 mL) entnommen.

1.6.2 Speichelproben

Zur Speichelgewinnung wurde die Salivette[®] Cortisol verwendet. Diese Ausführung beinhaltet eine Kunstfaserrolle, die speziell zur Gewinnung von geringen Probenvolumina konzipiert wurde.[114]

Die Probanden legten sich zur Probengewinnung die Kunstfaserrolle der Salivette[®] selbst für ca. fünf Minuten in die Wangentasche. Zuvor wurden sie darauf hingewiesen, während des Prozederes den Speichel im Mund zu behalten und nicht runterzuschlucken, damit sich die Kunstfaserrolle vollsaugen konnte.

1.6.3 Probenlagerung

Nach der Probenahme wurden sowohl die Speichel- als auch die Serumproben für zehn Minuten bei 25 °C und 1850 g zentrifugiert. Aufgrund des Aufbaus der Salivette[®] sammelte sich während der Zentrifugation der Speichel am Boden der Röhre (Abbildung 17). Hierbei wird nahezu der gesamte Speichel aus der Kunstfaserrolle zurückgewonnen.[114]

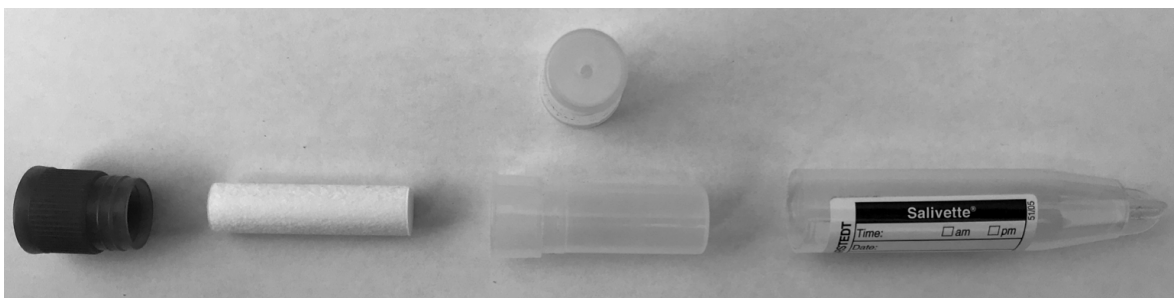


Abbildung 17: Speichelentnahmesystem Salivette[®] Cortisol, bestehend aus (von links nach rechts): Verschlussstopfen, Kunstfaserrolle, Einhängengefäß und Salivettenröhre.

Im Anschluss wurde mit einer zuvor auf den pH-Bereich 4 bis 9 kalibrierten Elektrode für kleine Probenvolumina der pH-Wert des Speichels bestimmt. Zur Lagerung wurden das abgetrennte Serum und der Speichel in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt und bei -80 °C bis zur Probenanalyse aufbewahrt. Um die Stabilität zu gewährleisten, wurden die Speichel- und Serumproben zur Bestimmung der Amphetaminkonzentration maximal 18 Monate bei -80 °C gelagert (Exp. Teil, C 3.4.2.7.2). Die Serumproben zur Bestimmung der Guanfacinkonzentration wurden maximal 28 Monate und die Speichelproben maximal 32 Monate bei -80 °C gelagert (Exp. Teil, C 4.4.8.2).

2 Materialien, Reagenzien und Geräte

2.1 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheit
Acetonitril	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV [®] , ≥ 99,9 %
Acetonitril	JT Baker	BAKER ANALYZED [®] , ≥ 99,9 %
Ameisensäure	Fluka	Puriss. p.a. for HPLC 50 % in water, 49-51 %
Ammoniak	Merck	For analysis, 25 %
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich	For massspectrometry, ≥ 99,0 %
Amphetaminlösung	Cerilliant	certified reference material
Atomoxetinlösung	Cerilliant	certified reference material
1-Chlorbutan	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV [®] , ≥ 99,8 %
DIB-Cl HCl	Tokyo chemical industry Co., LTD	For HPLC Labeling, > 97 %
Essigsäureethylester	AppliChem	For analysis, ≥ 99,8 %
Guanfacin-HCl	Tokyo chemical industry Co., LTD	≥ 98 %
¹³ C, ¹⁵ N ₃ -Guanfacin-HCl	Santa Cruz	≥ 98 %
n-Hexan	Merck	For HPLC ≥ 95 %
Hydroxyatomoxetin	Santa Cruz	≥ 98 %
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. EUR., ≥ 99,8 %
Methylphenidat-HCl	Sigma-Aldrich	≥ 98 %
Methanol	Sigma-Aldrich	CHROMASOLV [®] , ≥ 99,9 %
Methanol	JT Baker	BAKER ANALYZED [®] , ≥ 99,8 %
MPPA	Sigma-Aldrich	≥ 98 %
Natriumcarbonat	Merck	For Analysis, ≥ 99,8 %
Natriumhydrogencarbonat	Merck	For Analysis, ≥ 99,7 %
Wasser	VWR Chemicals	HiPerSolv CHROMANORM [®] , for LC-MS

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Serienbezeichnung
C18 Säule	Macherey-Nagel	C18 HD (EC 150/4,6 Nucleosil 100-3 C18HD)
C18 Säule	Agilent	ZORBAX StableBond 80Å C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm
Inserts	Agilent	400 µL flat bottom glass insert, 500/pk
Nitrilhandschuhe	diverse	diverse
Pipettenspitzen	Sarstedt	diverse
Pipettenspitzen	ThermoFisher Scientific	Finntipp 5ml
Pufferlösung (pH-Meter)	Carl Roth GmbH	ROTI® Calipure, Pufferlösung pH 9,0
Pufferlösung (pH-Meter)	VWR Chemicals	AVS Titriorm Pufferlösung pH 7,0
Pufferlösung (pH-Meter)	VWR Chemicals	AVS Titriorm Pufferlösung pH 4,0
Reagenzgläser Speedvac	für Kimble	ASTM Type 1, Borsilicate Glass Disposable Culture Tubes (12x75mm 6ml)
Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt	Safe seal Reagiergefäß 1,5ml
Reagiergefäße 2,0ml	Sarstedt	Safe lock Reagiergefäß 2,0 ml
Salivette	Sarstedt	Salivette® Cortisol, Code blau
Serum-Monovetten	Sarstedt	S-Monovette®, 7,5ml ohne Präparierung
Tubes 50ml	Sarstedt	Röhre 50ml 114x28mm, PP
Tubes 15ml	Greiner Bio-one	Cellstar Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile
Vials	Agilent	Vial, Screw 2ml
Vialkappen	Agilent	Cap, 9mm blue screw, preslit
Vorsäulenkartuschen	MZ Analysentechnik	Vorsäulenkartuschen 10x4,0mm PerfectBond CN 20µm

2.3 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerätetyp/-klasse	Hersteller	Gerätebezeichnung
Analog/Digital Wandler	Agilent	Dual Interface
Analysenwaage	Mettler	PB4002-S/FACT
Feinwaage	Mettler	HL52
Finntip	Thermo Scientific	Finnpipette F2
Gefrierschrank	Liebherr	Comfort
Gefrierschrank	Liebherr	ProfiLine
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	GKW-30
Gefrierschrank (-80 °C)	ThermoFisher Scientific	HERAfreeze HFU B Serie
HPLC-Degasser	Agilent 1100	G1379A Degasser
HPLC-Degasser	Agilent 1200	G1379B
HPLC-Fluoreszenzdetektor	Agilent 1260	G1321C 1260 FLD
HPLC-Gradienten Pumpe	Agilent 1100	G1312A BinPump
HPLC-Binäre Pumpe	Agilent 1200	G1312B
HPLC-Probengeber	Agilent 1100	G1329A ALS
HPLC-Probengeber	Agilent 1200	G1367D
HPLC-QQQ	Agilent 6460	G6460A
HPLC-Säulenofen	Agilent 1200	G1316A TCC
HPLC-Säulenofen	Agilent 1200	G1316B
HPLC-Thermostat	Agilent 1100	G1330B ALS Therm
Kühlfalle (-50 °C)	Thermo Scientific Savant	RVT400230
Kühlschrank	Liebherr	Comfort
Kolbenhubpipetten verschiedener, bedarfsgemäß maximaler Volumina	Eppendorf	Reference2 bzw. Research und Multipipette E3
Nanopure® - Reinstwasseranlage	ThermoFisher Scientific	Barnstead Nanopure® Diamond™ Life Science (UV/UF)- Reinstwasseranlage
pH-Elektrode	Mettler Toledo	Inlab pro
pH-Elektrode	Mettler Toledo	Inlab Ultra Micro
pH-Meter	Mettler	Seven Easy
Reagenzgläser Schraubverschluss	mit Schott Glaswerke	
Rotor	Thermo Scientific Savant	RH7212
Rührmischer	VWR	VMS-A
Speedvac Konzentrator	Thermo Scientific Savant	SPD121P
Teflon-Schlauch-Kit	Thermo Scientific Savant	UTP-TEF0.5
Überkopf- Rotationsmischer	Hartenstein	Rotary Mischer
Vakuumpumpe	Thermo Scientific Savant	OFP400-230

Vortexer	LMS	VTX 3000L
Vortexer	VWR	VM-3000
Zentrifuge	Hettich	Mikro 200
Zentrifuge	Hettich	Rotanta 460R
Zentrifuge	Hettich	Mikro 20

2.4 Humanes Plasma

Humanes Plasma wurde zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg bezogen. Um Poolplasma zu erhalten, wurden die Plasmen von sechs Einzelspendern gemischt, in 50 mL Tubes aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.5 Humaner Speichel

Humaner Leerspeichel wurde mittels Salivette® von mindestens sechs freiwilligen Spendern, die keinen der beiden Arzneistoffe einnahmen, wie in Exp. Teil, C 1.6.2, gewonnen.

Im Anschluss wurden die eingespeichelten Salivetten® wie in Exp. Teil, C 1.6.3 zentrifugiert und der aufgefangene Speichel gepoolt. Der gepoolte Leerspeichel wurde in 50 mL Tubes aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.6 Interner Standard

Als interner Standard wurde eine methanolische Lösung (5 µmol/L = 746 ng/mL) von 1-Methyl-3-phenylpropylamin (MPPA) verwendet. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Für Guanfacin wurde als interner Standard eine methanolische Lösung von ¹³C, ¹⁵N₃-Guanfacin (2 ng/mL) verwendet. Diese wurde bei 2 bis 8 °C gelagert.

2.7 Spikelösungen

Ausgehend von der Amphetaminstammlösung (100 µg/mL) wurden methanolische Verdünnungen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (Exp. Teil, C 3.2.1.2). Die Spikelösungen wurden in ausreichend hoher Konzentration produziert, sodass nur 2 % zur Matrix hinzugegeben werden mussten, um so die Lösungsmittelleffekte auf die Matrix möglichst gering zu halten und die benötigte Endkonzentration zu erreichen.

Ebenso wurden methanolische Verdünnungen in unterschiedlichen Konzentrationen aus einer methanolischen Guanfacin-stammlösung (5 mg/mL) hergestellt.

3 Methode zur Quantifizierung von Amphetamin

3.1 Auswahl der Methode

Zur Quantifizierung von Amphetamin wird nach aktuellem Stand der Wissenschaft das im Vergleich zu anderen Methoden sensitivere, aber auch kostenintensivere flüssigchromatographische Verfahren mit Tandem-Massenspektrometrie Kopplung (LC-MS/MS) verwendet.[110, 115-117] Um Amphetamin aber möglichst einfach und mit denen im Routinelabor zur Verfügung stehenden Geräten detektieren zu können, sollte die hochleistungsflüssigchromatographische Methode mit fluoreszenzspektrometrischer Detektion (HPLC-FL) von Stegmann et al. auf diese Geräte übertragen und optimiert werden.[68]

Bislang ist für den Wirkstoff Amphetamin in der Konsensus-Leitlinie für TDM noch kein therapeutischer Referenzbereich im Plasma zur Behandlung einer ADHS definiert.[4] Es gibt jedoch Angaben zur c_{\max} von Dexamphetamin aus pharmakokinetischen Untersuchungen bei Kindern im Alter von sechs bis zwölf Jahren, die mit Lisdexamphetamin behandelt wurden, sowie aus der Fachinformation von Attentin® (Dexamphetamin).[88, 118, 119] Demnach liegt die c_{\max} von Dexamphetamin der in Deutschland zugelassenen Fertigarzneimittel Attentin® und Elvanse® im Plasma, abhängig von Präparat und Dosierung, im Mittel zwischen 11 ng/mL und 134 ng/mL.[88, 119]

Um diesen Konzentrationsbereich abdecken zu können, ist eine ausreichend empfindliche Messmethode notwendig, jedoch wird die Analytik von sympathomimetischen Aminen durch die geringe spezifische UV-Absorption erschwert.[120, 121] Um dieser Problematik zu begegnen, ist es üblich, die Analyten vor der Detektion mit einem Chromophor oder Fluorophor zu derivatisieren.[120, 122-125] Das Lophinderivat 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl Chlorid (DIB-Cl), das erstmals von Nakashima et al.[126] zur Fluoreszenzmarkierung von Aminen synthetisiert wurde, zeichnet sich durch einfache Reaktionsbedingungen und eine hohe Fluoreszenzintensität aus.[126, 127] In der Folge hat es sich als Reagenz zur Fluoreszenzmarkierung von primären und sekundären Aminen wie Atomoxetin, Methylphenidat, MPPA, Amphetamin, Methylamphetamin und anderen Amphetaminderivaten etabliert (Abbildung 18).[68, 127-129] So konnte die Bestimmungsgrenze für Amphetamin und Methylphenidat im Vergleich zur UV-Detektion deutlich verbessert werden.[68, 128, 130]

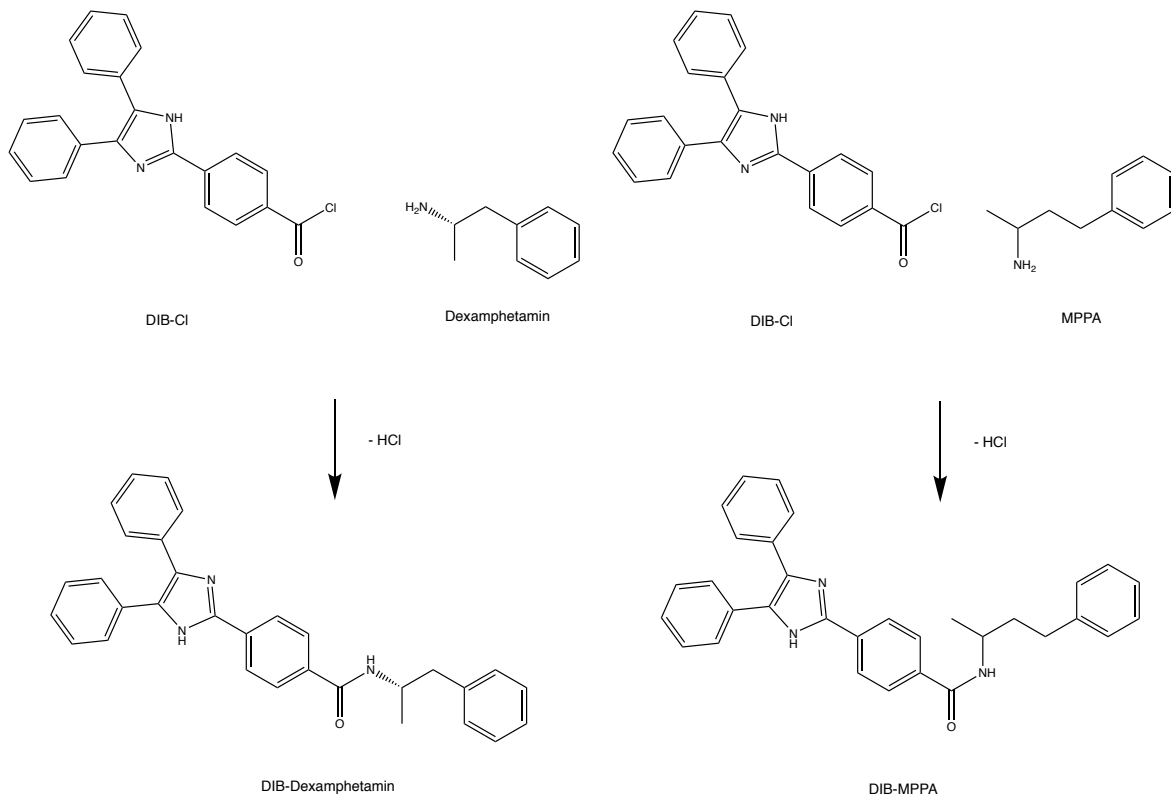


Abbildung 18: Derivatisierungsreaktion von Dexamphetamine und MPPA mit DIB-Cl.

Im Hinblick auf die Sensitivität der Messmethode ist die Quantifizierung der Amphetaminkonzentration im Speichel weniger kritisch zu beurteilen, da hier mit höheren Konzentrationen im Vergleich zum Serum gerechnet werden kann und Speichel zudem weniger störende Matrixbestandteile enthält (Einleitung, A 2.3).[54, 68]

In den Vorschriften zur Validierung von bioanalytischen Methoden der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) und der europäischen Arzneimittelbehörde EMA wird nicht zwischen Speichel-, Serum- und Plasmamatrix differenziert.[91, 131] Somit konnte für beide Matrizes dieselbe Probenvorbereitung und dasselbe quantitative Verfahren verwendet werden.

3.2 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

3.2.1 Standardlösungen

3.2.1.1 Standardlösungen zur Methodenentwicklung aus Reinsubstanzen

Aus den Stammlösungen von Amphetamin (100 µg/mL), Methylphenidat (5 mg/mL) und Atomoxetin (1 mg/mL) wurden methanolische Standardlösungen (500 ng/mL und 1000 ng/mL) sowohl einzeln für jeden Analyten als auch als Gemisch hergestellt und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Standardlösungen zur Methodvalidierung

Für die Kalibriergerade wurde aus der Amphetaminstammlösung (100 µg/mL) eine methanolische Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung einer Kalibriergeraden (SK). Für die Kalibriergerade in Speichel wurde ein weiterer Kalibrierpunkt (SK7) verwendet.

Benennung	c (Amphetamin) [µg/mL]
SK 1	0,25
SK 2	0,50
SK 3	1,00
SK 4	2,00
SK 5	4,00
SK 6	8,00
SK 7	12,00

Zusätzlich wurden unabhängige methanolische Verdünnungen aus der Stammlösung für QC-Proben hergestellt, die auch zur Untersuchung der Kurzzeit- und Autosamplerstabilität verwendet wurden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung von QC-Proben (SQC).

Benennung	c (Amphetamin) [µg/mL]
SQC 1	0,25
SQC 3	1,00
SQC 5	4,00

Als interner Standard wurde die Lösung aus Exp. Teil, C 2.6 verwendet.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate und der Extraktionseffizienz wurden post-Extraktion-spiked Proben mit ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9) hergestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentrationen von Amphetamin und IS der post-Extraktion-spiked Lösungen (pEs) in ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9).

Benennung	c (Amphetamin) [µg/mL]	c (MPPA) [µg/mL]
pEs 2	0,5	3,725
pEs 6	8,0	3,725

Um die Langzeit-, Einfrier- und Auftaustabilität nachzuweisen, wurden ebenfalls Spikelösungen für QC-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung von QC-Proben zur Überprüfung der Stabilität (StQC).

Benennung	c (Amphetamin) [µg/mL]
StQC 1	0,25
StQC 5	8,00

3.2.1.3 Matrix

Die verwendeten Matrices wurden im Exp. Teil, C 2.4 und C 2.5 beschrieben.

3.2.1.4 HPLC-FL Anlage

Die verwendete Anlage wurde im Exp. Teil, C 2.3 aufgeführt. Zur Auswertung der Chromatogramme und Datensammlung wurde die Software Agilent ChemStation® Version C.01.07 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

3.3 Durchführung der HPLC-FL Methodenentwicklung

3.3.1 Trennung von Amphetamin, Methylphenidat und Atomoxetin aus Reinsubstanzlösungen per HPLC-FL

Für die Methodenentwicklung wurden methanolische Reinsubstanzlösungen (500 ng/mL und 1000 ng/mL) hergestellt (Exp. Teil, C 3.2.1.1).

Vor der Injektion wurden die Reinsubstanzlösungen mit DIB-Cl derivatisiert, um die Fluoreszenzemission messen zu können. Dazu wurden 10 µL Reinsubstanzlösung und 10 µL methanolischer IS (2,5 µmol/L = 373 ng/mL) mit 10 µL ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9,0) und 100 µL DIB-Cl (30 µmol/L) versetzt und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Im Anschluss wurden die Proben über 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur derivatisiert. Durch Zugabe

von 10 μL konzentriertem Ammoniak wurde die Derivatisierungsreaktion gestoppt. Es wurden 10 μL des Extraktes zur Vermessung in das HPLC-System injiziert.

Zur flüssigchromatographischen Trennung der Analyten wurde eine C18 Säule (EC 150/4,6 Nucleosil 100-3 C18 HD; Macherey und Nagel, München, Deutschland) eingesetzt. Als mobile Phase wurde Acetonitril und Nanopure®-Wasser verwendet. Die optimale Absorptions- und Emissionswellenlänge für DIB-Derivate von 330 nm und 440 nm wurde aus der Literatur übernommen.[68, 127]

Da während der Messungen von methanolischen Reinsubstanzlösungen Lösungsmittelpeaks auftraten, wurden 2 mL des Extraktionsmittels (Acetonitril und 1-Chlorbutan; 1:4, v/v) mit 10 μL methanolischer Reinsubstanzlösung und 10 μL IS (746 ng/mL) gespickt und im Anschluss das Lösungsmittel bei 40 °C über 30 Minuten im Vakuum abgedampft. Danach wurde der Rückstand mit 10 μL ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9,0) und 100 μL DIB-Cl (30 $\mu\text{mol/L}$) versetzt und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Die Proben wurden im Anschluss für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur derivatisiert. Zum Schluss wurde durch Zugabe von 10 μL konzentriertem Ammoniak die Derivatisierungsreaktion gestoppt. Zur Analyse wurden 10 μL der Lösung in die HPLC-Anlage injiziert (Abbildung 19).

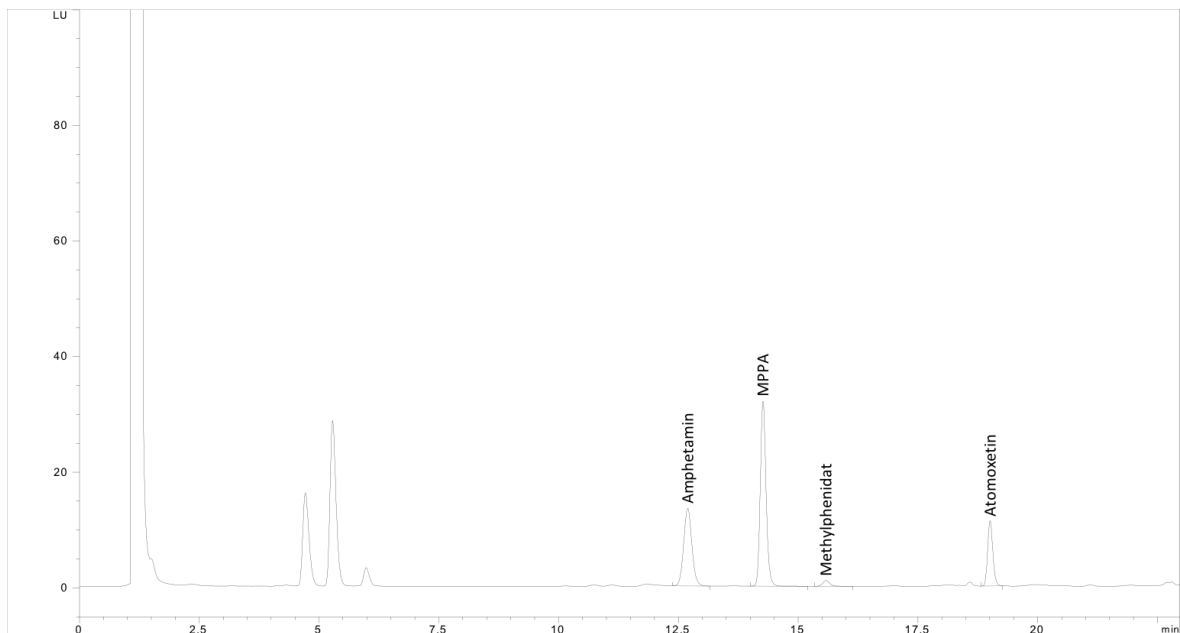


Abbildung 19: Chromatogramm der Reinsubstanzen und des internen Standards. Auftrennung der Arzneistoffe nach Abdampfen des mit 10 μL Analyten (1000 ng/mL) und 10 μL MPPA (746 ng/mL) gespickten Extraktionsmittels Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v).

Zur Trennung der verschiedenen Reinsubstanzen inklusive des internen Standards wurden verschiedene Fließmittelgradienten getestet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Die im Lauf der Methodenentwicklung getesteten Fließmittelgradienten. A stellt den organischen Anteil des Laufmittels dar. Die Temperatur des Säulenofens war konstant auf 35 °C eingestellt.

Benennung	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A [%]
1	0	1	50
	4	1	60
	11	1	60
	12	1	70
	18	1	70
	19	1	50
2	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	15	1	70
	16	1	85
	18	1	85
3	0	1	50
	4	1	60
	11	1	60
	16	1	85
	19	1	85
4	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	14	1	70
	15	1	85
	18	1	85
5	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	13	1	70
	14	1	85
	19	1	85
6	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	12	1	70
	13	1	85
	18	1	85

7	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	13	1	85
	18	1	85
8	0	1	50
	4	1	60
	10	1	60
	11	1	70
	15	1	70
	16	1	85
	19	1	85

3.3.2 Optimierung der HPLC-FL-Methode für Amphetamin, Methylphenidat und Atomoxetin aus Matrixproben

Zur Umstellung der Methode von Reinsubstanzlösungen auf Matrixproben wurden sowohl Matrixproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Amphetamin, Methylphenidat, Atomoxetin und dem Metabolit 4-OH-Atomoxetin hergestellt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Konzentrationen der Analyten in den Matrixproben zur Methodenoptimierung.

c (Amphetamin) [ng/mL]	c (Methylphenidat) [ng/mL]	c (Atomoxetin) [ng/mL]	c (4-OH-Atomoxetin) [ng/mL]
20	20	250	250
320	320	4000	4000

Es wurde 1 mL der dotierten Matrixprobe mit 50 µL internem Standard (746 ng/mL) und mit 1 mL Carbonatpuffer (pH 10,5) versetzt und kurz auf einem Vortex gemischt. Im Anschluss wurden 2 mL Extraktionsmittel (Acetonitril und 1-Chlorbutan; 1:4, v/v) hinzugegeben und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Danach wurden die Proben für zehn Minuten mit einem Überkopf-Rotationsmischer (40 U/min) gemischt.

Die Phasen wurden bei 1850 g bei 25 °C für zehn Minuten getrennt und im Anschluss für zehn Minuten bei -80 °C eingefroren, um die organische Phase in frische Einwegreagenzgläser zu überführen. Das Extraktionsmittel wurde bei 40 °C in einer Vakuumzentrifuge über 30 Minuten abgedampft. Die evaporierten Proben wurden mit 10 µL ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9) und 100 µL DIB-Cl (30 µmol/L) versetzt und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Zur Derivatisierung wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einen abgedunkelten

Laborschrank gestellt. Danach wurde die Derivatisierungsreaktion durch die Zugabe von 10 μL konzentriertem Ammoniak abgebrochen, für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt und 10 μL des Überstandes zur Analyse in die HPLC-Anlage injiziert.

Da sich durch die Matrixbestandteile Störpeaks ergaben, musste der Fließmittelgradient angepasst werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Der im Lauf der Methodenentwicklung ermittelte Fließmittelgradient zur chromatographischen Trennung von Speichel- und Plasmaprobe. A stellt den organischen Anteil des Laufmittels dar.

Benennung	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A [%]
9	0	1	50
	3	1	60
	9	1	60
	11	1	70
	16	1	70
	17	1	80
	19	1	80

3.3.3 Optimierung der Probenaufarbeitung

Während der Speichlextraktionen mit dem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v) kam es zur Emulgation der organischen Phase (Abbildung 20). Aufgrund der gelartigen Konsistenz war eine vollständige Entnahme nach der Zentrifugation sowie eine reproduzierbare Quantifizierung nicht möglich.



Abbildung 20: Bildung einer Emulsion während der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v). Darstellung einer Speichelprobe unmittelbar nach Extraktion mit Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v) und Zentrifugation (10 Minuten, 25°C, 1850 g). Die untere klare Phase besteht aus Speichel und Carbonatpuffer, darüber ist die milchige, gelartige Emulsion in der organischen Phase mit geringem Überstand zu erkennen.

Ziel der Methodenoptimierung war es daher, ein geeignetes Extraktionsmittel zu finden, das Amphetamin möglichst vollständig, aber ohne viele Matrixbestandteile extrahiert. Dazu wurde die Speichlextraktion (Exp. Teil, C 3.3.2) mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt und hinsichtlich der Extraktionseffizienz von Amphetamin aus Speichelmatrix untersucht.

3.3.3.1 Auswahl des Extraktionsmittels

Um die verschiedenen Extraktionsmittel zu vergleichen, wurde Blank-Speichel mit methanolischen Lösungen des Analyten dotiert, sodass Endkonzentrationen von 5 ng/mL, 20 ng/mL und 80 ng/mL ($n = 3$) erreicht wurden.

Die dotierten Proben wurden wie in Exp. Teil, C 3.3.2 extrahiert und derivatisiert.

Um die Extraktionseffizienz zu bewerten, wurden die Mittelwerte der absoluten Peakhöhen sowie die Präzision, ausgedrückt als relative Standardabweichung, des Analyten miteinander verglichen.

Im Gegensatz zum Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v) wurde bei der Extraktion mit Hexan und Essigsäureethylester jeweils keine Emulgation der Speichelproben beobachtet. Essigsäureethylester wies jedoch gegenüber Hexan eine deutlich größere Extraktionseffizienz (Abbildung 21) auf und zeigte zudem über den ausgewählten Konzentrationsbereich ein gleichmäßiges Extraktionsverhalten ($r = 1$) mit einer hohen Präzision (1,7 - 6,6 %)(Abbildung 22)(Tab. Anhang, D 4.1.1).

Aufgrund der besseren Extraktionseigenschaften, der reproduzierbaren und präzisen Ergebnisse wurde das Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v) durch Essigsäureethylester als Extraktionsmittel in der Probenaufarbeitung ersetzt.

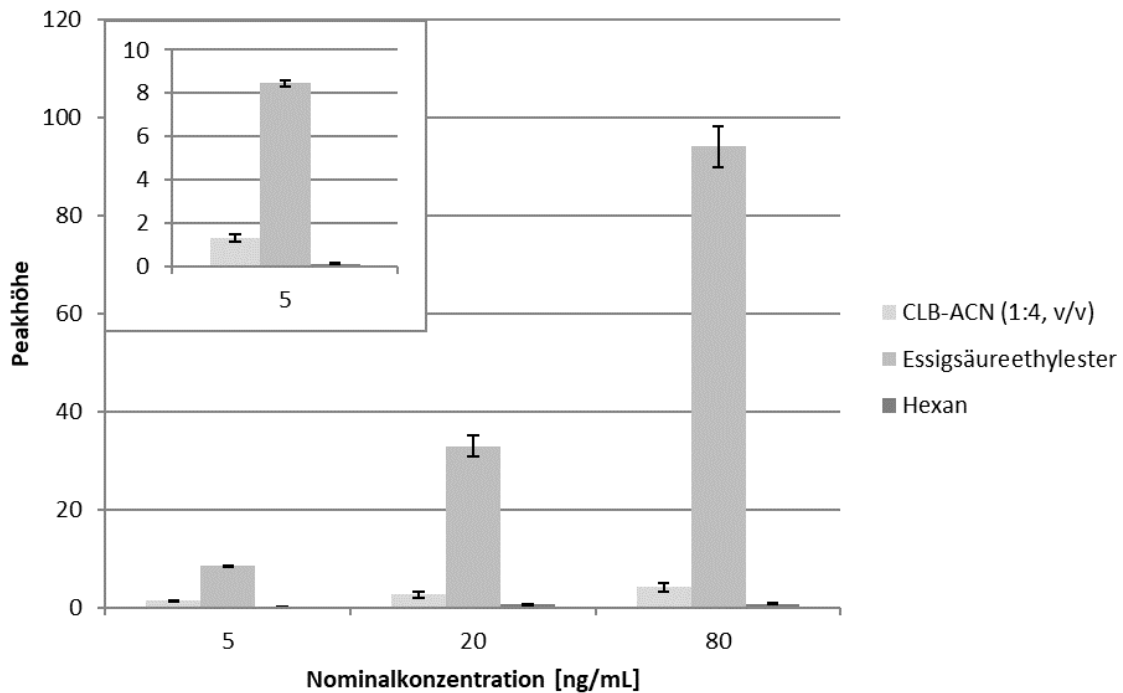


Abbildung 21: Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen dem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril (ACN) und 1-Chlorbutan (CLB-ACN) (1:4, v/v), Essigsäureethylester und Hexan bei unterschiedlichen Speichelamphetaminkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen ($n = 3$).

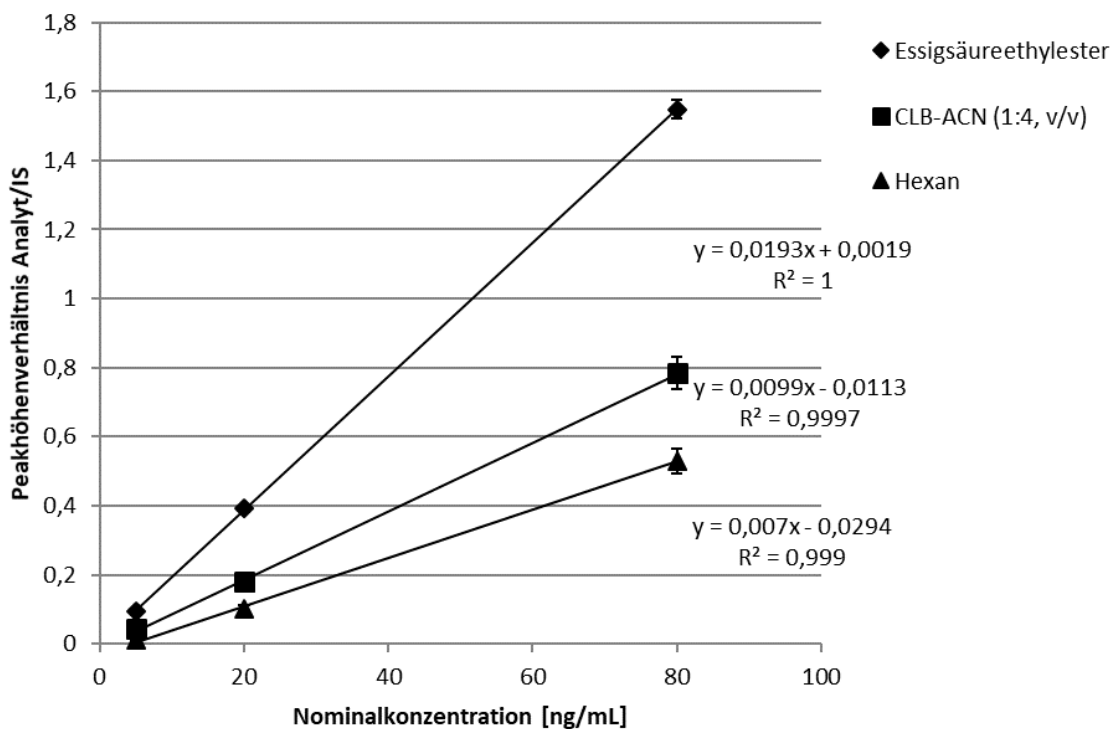


Abbildung 22: Darstellung der Kalibriergeraden aus Speichelproben nach der Extraktion mit Essigsäureethylester. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhenverhältnisse Analyt/IS ($n = 3$).

3.3.3.2 Auswahl der Konzentration des Derivatisierungsreagenzes

Zum Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen des Derivatisierungsreagenzes wurden methanolische Standardlösungen (0,25 µg/mL, 2 µg/mL und 16 µg/mL; n = 3) verwendet.

Die Analytlösung (10 µL) wurde mit 10 µL gebrauchsfertiger ROTI® Calipure Pufferlösung (pH 9) versetzt. Im Anschluss wurde der Lösung 100 µL des Derivatisierungsreagenzes in unterschiedlicher Konzentration (30 µmol/L, 100 µmol/L, 250 µmol/L und 1000 µmol/L) hinzugegeben und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Die Derivatisierung fand über 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µL konzentriertem Ammoniak abgebrochen und für fünf Sekunden auf einem Vortex gemischt. Von der Lösung wurden 10 µL zur Analyse in die HPLC-Anlage injiziert.

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der absoluten Peakhöhen sowie die relative Standardabweichung des Analyten miteinander verglichen.

Bis zu einer DIB-Cl Konzentration von 250 µmol/L kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der mittleren Peakhöhe, bei höheren Konzentrationen (1000 µmol/L) konnte jedoch keine weitere Steigerung der Signalstärke festgestellt werden (Abbildung 23). Neben der Ausbeute verbesserte sich mit steigender DIB-Cl Konzentration auch die Präzision (Abbildung 24)(Tab. Anhang, D 4.1.2). Daher wurde die DIB-Cl Konzentration auf 250 µmol/L zur Derivatisierung festgelegt. Abbildung 25 stellt die endgültige Probenaufarbeitung nach Abschluss der Optimierung dar.

Da die vorgenommenen Änderungen der Probenaufarbeitung keinen Einfluss auf die chromatographische Trennung hatten, konnte die Gradientenschaltung aus Exp. Teil, C 3.3.2 beibehalten werden.

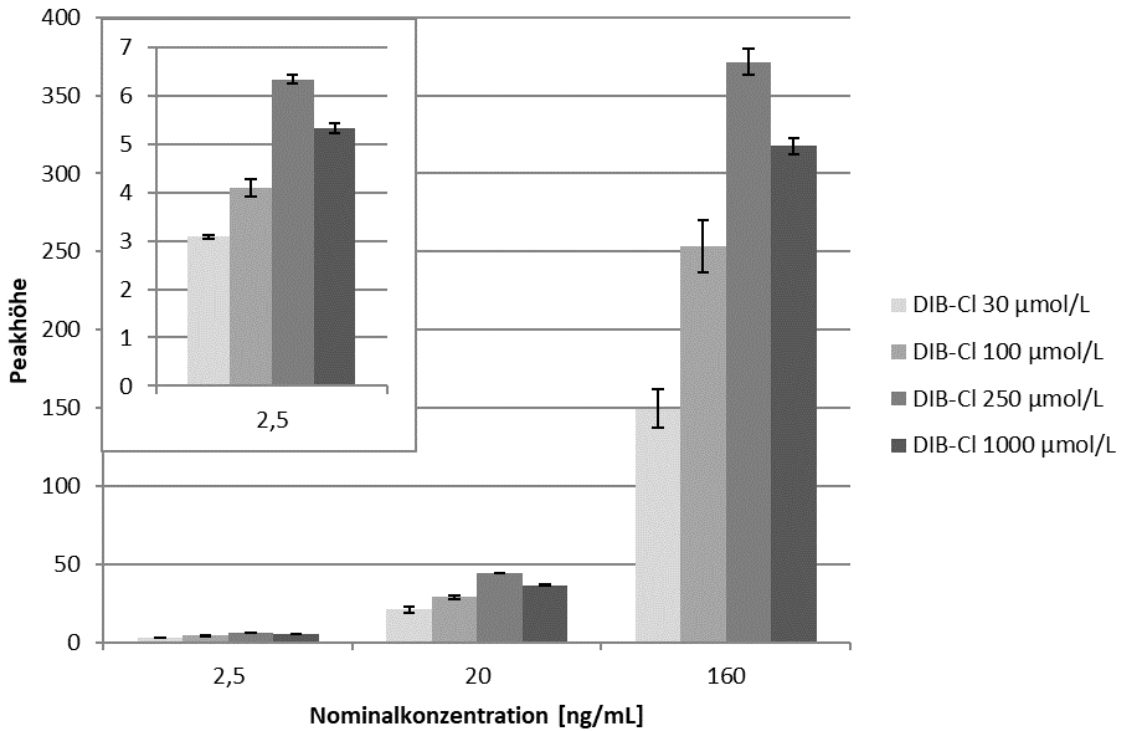


Abbildung 23: Vergleich der Peakhöhen methanolischer Amphetaminlösungen verschiedener Konzentrationen nach Derivatisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen DIB-Cl. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen ($n = 3$).

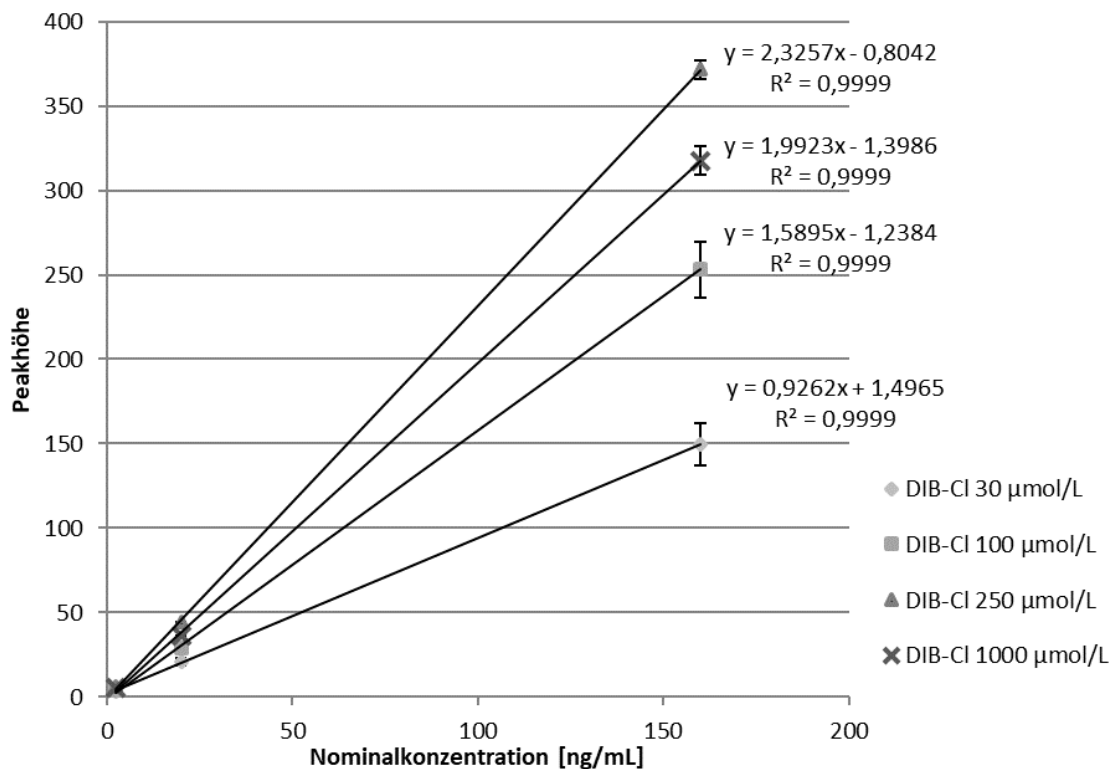


Abbildung 24: Kalibriergerade methanolischer Amphetaminlösungen verschiedener Konzentrationen nach Derivatisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen DIB-Cl. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen ($n = 3$).

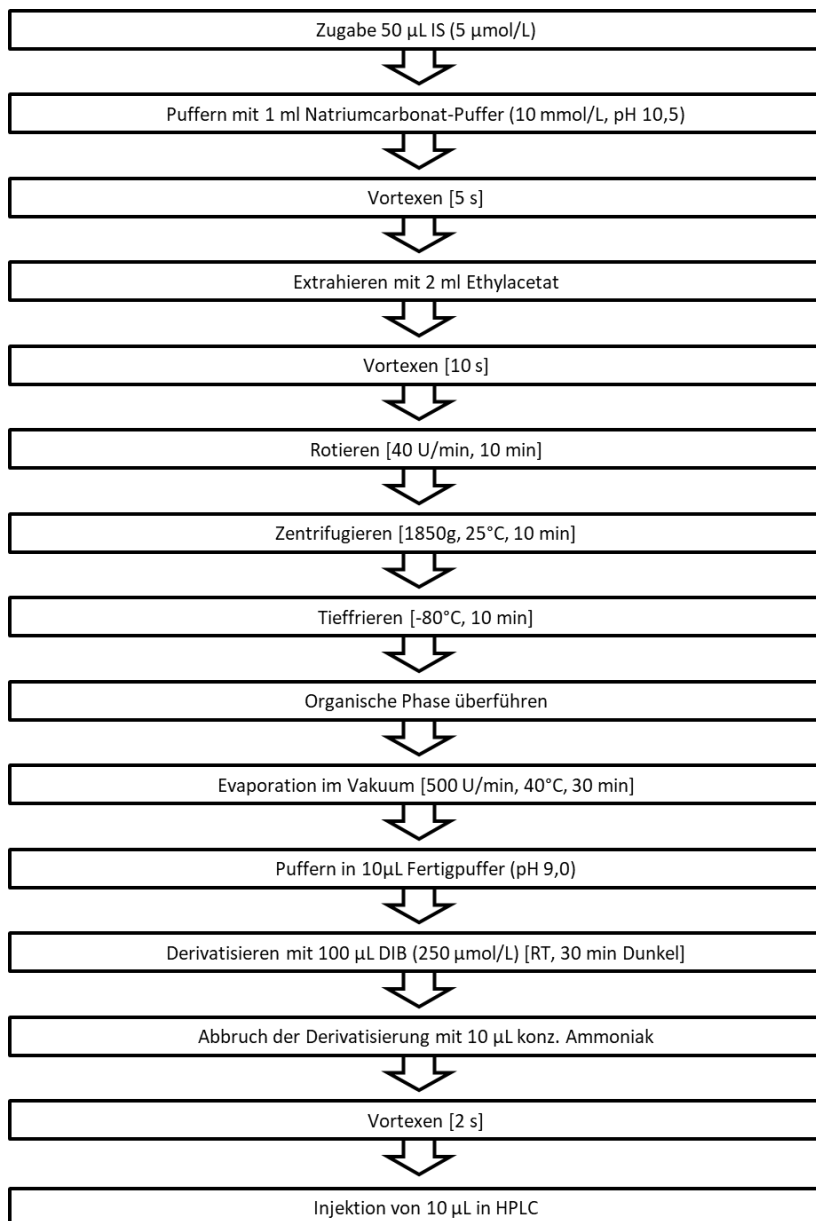


Abbildung 25: Fließdiagramm der optimierten Extraktionsmethode aus 1 mL Probe.

3.4 Methodenvalidierung zur Quantifizierung von Amphetamin

Die Validierung einer analytischen Methode ist notwendig, um die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Die Leitlinie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) berücksichtigt die Anforderungen der FDA sowie der EMA und eignet sich daher zur Validierung bioanalytischer Methoden.[91, 131, 132]

Im Rahmen der Methodenvalidierung werden die Selektivität, Linearität der Kalibrierfunktion für den festgelegten Bereich, die Bestimmungsgrenze, die Richtigkeit und Genauigkeit, die Wiederfindungsrate und die Extraktionseffizienz sowie die Verschleppung der Analyten in folgende Analysen (carry-over) und die Probenstabilität bis zur Analyse untersucht.

3.4.1 Begrifflichkeiten

3.4.1.1 Selektivität und Spezifität

Die Selektivität einer Methode beschreibt die Fähigkeit, verschiedene Analyten neben anderen endogenen und exogenen Bestandteilen qualitativ zu erfassen. Dabei müssen die Analyten, der interne Standard und die Matrixkomponenten störungsfrei differenziert werden können.[91]

Die Spezifität beschreibt dagegen die Fähigkeit einer Methode, einen Analyten in einer Probe eindeutig zu identifizieren, sodass er nicht durch andere Probenbestandteile verfälscht wird.[132]

3.4.1.2 Linearität

Die Signalstärke eines Detektors verhält sich innerhalb eines Messbereiches direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Zur Überprüfung der Linearität einer Methode wird eine über den Messbereich verteilte Kalibriergerade, bestehend aus mindestens sechs Kalibrierpunkten, erstellt und die Steigung sowie der Achsenabschnitt bestimmt.[131] Von den Kalibrierstandards müssen mindestens 75 % der rückgerechneten Konzentration die erforderlichen Kriterien (Richtigkeit $\pm 15\%$, an der Bestimmungsgrenze $\pm 20\%$) erfüllen.[131]

3.4.1.3 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze gibt die niedrigste Konzentration (lower limit of quantification, LLOQ) des Analyten in einer Matrix an, die noch mit ausreichender Richtigkeit ($\pm 20\%$) und Präzision ($\leq 20\%$) gemessen werden kann. Dazu soll das Signal fünfmal höher sein als in einer Blank Probe.[131]

3.4.1.4 Genauigkeit

Unter Genauigkeit versteht man die Differenz eines einzelnen Messwerts vom Sollwert, hier fließen sowohl systematische als auch zufällige Fehler ein.[132]

3.4.1.4.1 *Richtigkeit*

Unter Richtigkeit versteht man den Abstand des Mittelwertes von mehreren Messwerten zum Sollwert.[131, 132] Der systematische Fehler (Bias) wird als Maß für die Richtigkeit einer Messmethode angegeben.[132]

3.4.1.4.2 *Präzision*

Die Präzision gibt das Ausmaß der Streuung einzelner Messwerte um den Mittelwert an und stellt zufällige Fehler der Analysemethode dar.[131, 132]

3.4.1.4.2.1 *Wiederholpräzision*

Die Wiederholpräzision ist die Präzision von unabhängigen Messergebnissen eines Verfahrens, die unter gleichen Bedingungen in kurzen Abständen hintereinander erhalten werden.[131, 132]

3.4.1.4.2.2 *Laborpräzision*

Die Laborpräzision entspricht der Wiederholpräzision, bei der bewusst ein Parameter verändert wurde. Hierunter fällt die tagesverschiedene Laborpräzision, bei der der Zeitfaktor verändert wird. [131, 132]

3.4.1.5 *Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Carry-over*

Die Wiederfindungsrate gibt den Verlust des Analyten an, der durch die Probenaufarbeitung beim Transfer aus einer Matrix in die zu vermessende Lösung entsteht. Hierbei wird der Einfluss der Matrix nicht berücksichtigt, da die Bezugsgröße „100 %“ ebenfalls aus Matrix vermessen wird.[133]

Im Gegensatz dazu wird bei der Extraktionsausbeute neben dem Probenverlust durch die Aufarbeitung auch noch der Einfluss der Matrix auf die Quantifizierung bestimmt, indem die Bezugsgröße „100 %“ aus reinem Lösungsmittel vermessen wird.[133] Um eine gleichmäßige Extraktion zu gewährleisten, sollen die Ergebnisse möglichst präzise und reproduzierbar sein.[131]

Unter „Carry-over“ wird die Verschleppung eines Analyten in die darauffolgende Probenanalyse bezeichnet.[91]

3.4.1.6 *Stabilität*

Die chemische Stabilität eines Analyten muss in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen über einen festgelegten Zeitraum untersucht werden, um zu gewährleisten, dass die Analytkonzentration von der Probenahme über den Transport, die Lagerung, die Aufarbeitung im Labor bis hin zur Analyse nicht beeinflusst wird.[131, 132] Da die Stabilität während der Lagerung sowie nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen methodenunabhängig ist, muss diese nachgewiesen werden, sofern keine Literaturdaten vorhanden sind.[132]

3.4.2 Durchführung der Methodvalidierung zur Quantifizierung von Amphetamin

Die HPLC-Methode zur Bestimmung von Amphetamin in Speichel und Serum wurde in Anlehnung an die Leitlinie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GFTCh) vollständig validiert.

3.4.2.1 Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden Plasmen und Speichel von je sechs Einzelspendern untersucht. Es wurde pro Spender eine Blank Probe extrahiert und analysiert. Zusätzlich wurden noch für jede Matrix zwei aus Poolmatrix hergestellte Zero Proben, das sind mit IS versetzte Blank Proben, untersucht.

Neben dem Analyten Amphetamin (5 ng/mL und 160 ng/mL) wurden auch Methylphenidat (5 ng/mL und 160 ng/mL) und Atomoxetin (62,5 ng/mL und 2000 ng/mL) sowie dessen Metabolit 4-OH-Atomoxetin (20 ng/mL und 160 ng/mL) als potenzielle interferierende Substanzen in beiden Matrices untersucht. Dazu wurde eine gepoolte Leermatrix mit 2 % der methanolischen Stammlösung versetzt und wie in Exp. Teil, C 3.3.3.2 beschrieben extrahiert.

Bei keiner der untersuchten Blank Proben gab es relevante Interferenzen zwischen Matrixbestandteilen und den Analyten sowie dem IS.

3.4.2.2 Linearität

Um den Messbereich festzulegen, wurden Kalibriergeraden (n = 6) in Speichel- und Plasmamatrix analysiert, die die nachfolgenden Konzentrationsbereiche einschlossen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Amphetaminkonzentrationen in Matrix zur Erstellung einer Kalibriergeraden im Rahmen der Methodvalidierung. Im Speichel wurden sieben Kalibrierpunkte verwendet, um einen größeren Konzentrationsbereich abdecken zu können.

Benennung	c _{Plasma} (Amphetamin) [ng/mL]	c _{Speichel} (Amphetamin) [ng/mL]
K 1	5	5
K 2	10	10
K 3	20	20
K 4	40	40
K 5	80	80
K 6	160	160
K 7		240

Zur Bestimmung der Amphetaminkonzentration wurde durch die Auswertungssoftware automatisch der Quotient aus der Peakhöhe des Analyten und des IS gegen die Nominalkonzentration aufgetragen. Mit jeder Kalibriergeraden wurde eine Blank Probe vermessen.

Im Plasma war das Peakhöhenverhältnis von Amphetamin und IS über den Messbereich von 5 ng/mL bis 160 ng/mL und im Speichel von 5 ng/mL bis 240 ng/mL linear zur Nominalkonzentration. Der Korrelationskoeffizient betrug im Plasma $r = 0,9999$ und im Speichel $r = 0,9990$ (Abbildung 26)(Tab. Anhang, D 4.2.1).

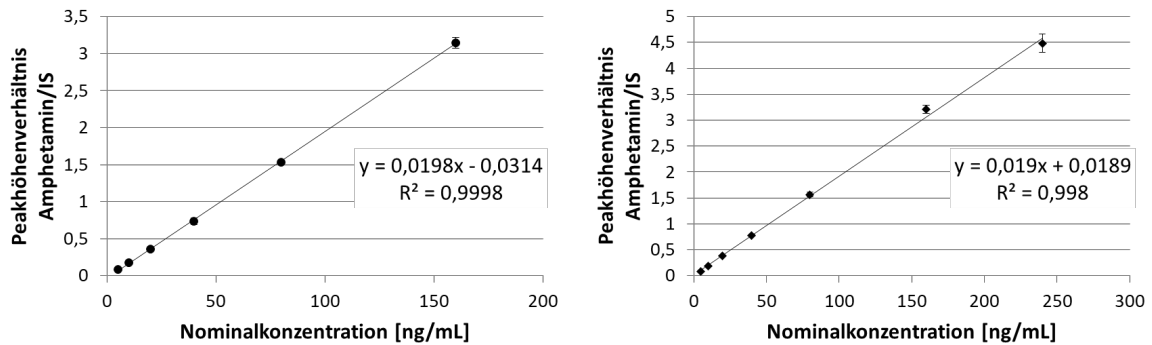


Abbildung 26: Kalibriergerade von Amphetamin in Plasma (linke Abbildung) und in Speichel (rechte Abbildung). Die Punkte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Einzelbestimmungen ($n = 6$) dar.

3.4.2.3 Bestimmungsgrenze

Die niedrigste Amphetaminkonzentration, die sowohl im Plasma als auch im Speichel noch mit einem maximal tolerierbaren Fehler von $\pm 20\%$ nachgewiesen werden konnte, betrug 5 ng/mL (Tab. Anhang, D 4.2.2). Es wurden jeweils vier dotierte Plasma- und Speichelproben mit dieser Konzentration extrahiert, vermessen und sowohl Richtigkeit als auch Präzision bestimmt.

3.4.2.4 Genauigkeit

3.4.2.4.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde jeweils für beide Matrices bestimmt, indem an sechs unterschiedlichen Tagen Plasma- und Speichel QC-Proben ($n = 4$), die je drei unterschiedliche Konzentrationslevel abdeckten, vermessen wurden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Amphetaminkonzentrationen zur Validierung der Genauigkeit und Präzision in Speichel und Plasma.

Benennung	c (Amphetamin) [ng/mL]
QC 1	5
QC 3	20
QC 5	80

Der Bias wurde nach folgender Formel (Formel 4) sowohl für die Richtigkeit innerhalb eines Tages als auch an unterschiedlichen Tagen bestimmt.

Formel 4: Berechnung des Bias.

$$\text{Bias [\%]} = \frac{\text{Mittelwert} - \text{Sollwert}}{\text{Sollwert}} * 100 \%$$

Für die Amphetaminkonzentration im Plasma und Speichel lag der systematische Fehler der Messergebnisse verglichen zur Nominalkonzentration an unterschiedlichen Tagen zwischen -17,25 (Bestimmungsgrenze) und 0,97 % sowie zwischen -10,25 und 3,33 %. Der Fehler innerhalb eines Tages lag im Plasma und Speichel zwischen -16,29 (Bestimmungsgrenze) und -4,21 % sowie zwischen -8,34 und 2,97 % (Tab. Anhang, D 4.2.3).

3.4.2.4.2 Präzision

Zur Bestimmung der Wiederhol- und Laborpräzision wurden an sechs unterschiedlichen Tagen Plasma- und Speichel QC-Proben (n = 4), die je drei unterschiedliche Konzentrationslevel abdeckten, vermessen. Um die Präzision zu bestimmen, wurde die relative Standardabweichung der einzelnen Messwerte sowohl innerhalb eines Tages (Wiederholpräzision) als auch an unterschiedlichen Tagen (Laborpräzision) berechnet. Präzision und Richtigkeit wurden dabei aus denselben QC-Proben ermittelt.

Die Laborpräzision im Plasma und Speichel lag zwischen 0,65 und 7,91 % sowie zwischen 0,33 und 3,92 %. Innerhalb eines Tages reichte die Wiederholpräzision im Plasma und Speichel von 3,03 bis 7,91 % und von 0,99 bis 3,92 % (Tab. Anhang, D 4.2.3).

3.4.2.5 Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute

Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem die Peakhöhen des Analyten von QC-Proben (pre-spiked Proben) mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 ng/mL und 80 ng/mL; n = 6), die die komplette Probenaufarbeitung durchliefen, mit den Peakhöhen des Analyten von post-spiked Proben verglichen wurden. Post-spiked Proben sind Blank Proben, die ebenso wie pre-spiked Proben den Extraktionsprozess durchlaufen. Sie werden jedoch nach dem Abdampfen des Extraktionsmittels mit Pufferlösungen (pH 9) wieder rekonstituiert, die den Analyten in äquivalenter Stoffmenge zu den pre-spiked Proben enthalten. Die post-spiked Proben stellen somit eine 100 %ige Analytenextraktion dar. Zur Berechnung der Wiederfindungsrate wurde die nachfolgende Formel verwendet (Formel 5):

Formel 5: Berechnung der Wiederfindungsrate aus den Messwerten der pre- und post-spiked Proben.

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \left(\frac{\text{Peakhöhe Analyt pre - spiked Probe}}{\text{Peakhöhe Analyt post - spiked Probe}} \right) * 100$$

Um die Extraktionsausbeute zu bestimmen, wurde das Verhältnis aus den Peakhöhen der pre-spiked Proben und der äquivalenten Analytkonzentration in Lösungsmittel (post-spiked Lösung) berechnet. Hierzu wurden dieselben pre-spiked Proben, die schon zur Bestimmung der Wiederfindungsrate verwendet wurden, mit post-spiked Lösung verglichen. Die Berechnung der Extraktionsausbeute wurde anschließend nach folgender Formel durchgeführt (Formel 6):

Formel 6: Berechnung der Extraktionsausbeute aus den Messwerten der pre-spiked Proben und der post-spiked Lösungen.

$$\text{Extraktionsausbeute [\%]} = \left(\frac{\text{Peakhöhe pre - spiked Probe}}{\text{Peakhöhe post - spiked Lösung}} \right) * 100$$

Ebenso wurde auch für den internen Standard MPPA die Wiederfindungsrate und die Extraktionsausbeute bestimmt.[91]

Die mittlere Extraktionsausbeute für Amphetamin und internen Standard lag im Plasma unter und im Speichel über den empfohlenen 50 % (Tabelle 17). Es wurden jedoch alle geforderten Kriterien wie Präzision und Reproduzierbarkeit erfüllt (Exp. Teil, C 3.4.1.5, Tab. Anhang, D 4.2.4), somit sind auch geringere Ausbeuten akzeptabel.[131]

Tabelle 17: Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute von Amphetamin in Plasma und Speichel zu 5 und 80 ng/mL (n = 6).

		5 ng/mL	745 ng/mL	80 ng/mL	745 ng/mL
	Matrix	Ausbeute ± SD [%]	Ausbeute IS ± SD [%]	Ausbeute ± SD [%]	Ausbeute IS ± SD [%]
Wiederfindungsrate	Plasma	24,50 ± 1,04	29,05 ± 1,43	28,15 ± 1,61	32,79 ± 0,64
	Speichel	50,32 ± 6,06	54,89 ± 2,33	53,41 ± 3,80	55,02 ± 1,09
Extraktionsausbeute	Plasma	23,52 ± 1,49	27,99 ± 1,96	30,44 ± 3,17	35,03 ± 0,62
	Speichel	52,18 ± 3,92	58,73 ± 0,77	61,15 ± 6,45	63,48 ± 2,95

3.4.2.6 Carry-over

Um eine Verschleppung des Analyten sowie des internen Standards in die nachfolgende Probenanalyse zu überprüfen, wurden Proben (n=5) beider Matrices mit der höchsten Konzentration der Kalibriergeraden ($C_{\text{Plasma}} = 160 \text{ ng/mL}$; $C_{\text{Speichel}} = 240 \text{ ng/mL}$) aufgearbeitet und vermessen. Im Anschluss wurde eine aufgearbeitete Blank und Zero Probe derselben Matrix injiziert. Die Verschleppung des Analyten in die Blank Probe sollte $\leq 20 \%$ der Peakhöhe der niedrigsten QC-Probe sein, für den internen Standard sollte die Verschleppung $\leq 5 \%$ der Peakhöhe betragen.[91]

Für den Analyten konnte im Plasma und im Speichel keine Verschleppung festgestellt werden. Für den internen Standard lag die Verschleppung im Plasma zwischen 0,45 und 0,82 % sowie im Speichel zwischen 0,25 und 0,33 % und entsprach somit den Anforderungen (Tab. Anhang, D 4.2.5).

3.4.2.7 Stabilität

Zur Evaluierung der Stabilität wurden die Konzentrationen der Plasma- und Speichel QC-Proben bestimmt und für diese die Richtigkeit und Präzision ermittelt. Der Fehler sollte dabei $\leq 15\%$ ($\leq 20\%$ an der Bestimmungsgrenze) und die relative Standardabweichung $\leq 15\%$ sein. Die Kalibrierstandards wurden immer frisch am Tag der Analyse hergestellt und extrahiert. Die Stabilität der methanolischen Amphetaminstammlösung bei -20 °C wurde durch den Hersteller gewährleistet.

3.4.2.7.1 Kurzzeitstabilität

Um die Kurzzeitstabilität der Matrixproben außerhalb eines Gefrierschranks zu gewährleisten, wurden QC-Proben (5 ng/mL und 80 ng/mL; $n = 6$) hergestellt und nach einer Lagerung von 48 Stunden bei Raumtemperatur aufgearbeitet und anschließend analysiert.

Der Fehler im Plasma und Speichel lag zwischen -18,51 (Bestimmungsgrenze) und -11,42 % sowie zwischen -14,58 und -6,92 %, die Präzision bewegte sich zwischen 0,97 und 1,22 % sowie zwischen 1,59 und 2,77 % (Tab. Anhang, D 4.2.6.1). Die Ergebnisse zeigten keinen relevanten Unterschied zur Nominalkonzentration, nahe der Bestimmungsgrenze ist eine Richtigkeit von $\leq 20\%$ akzeptabel. Zudem waren die Messungen ausreichend präzise, sodass bei Aufbewahrung oder Transport der Proben über 48 Stunden bei Raumtemperatur kein Substanzverlust zu erwarten ist.

3.4.2.7.2 Autosamplerstabilität

Um die Stabilität der Proben im Autosampler bis zur Analyse zu gewährleisten, wurden QC-Proben (5 ng/mL, 20 ng/mL und 80 ng/mL; $n = 6$) hergestellt und extrahiert. Nach der Probenaufarbeitung wurde das jeweilige QC-Level gepoolt und in den Autosampler (15 °C) gestellt. Die Proben wurden dann nach festgelegten Zeitintervallen über 24 Stunden (0, 3, 6, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden) in die HPLC-Anlage injiziert und analysiert.

Im Plasma und Speichel lag der Fehler zwischen -2,33 und 11,8 % sowie zwischen -5,91 und 3,09 %. Die Präzision reichte dabei im Plasma und Speichel von 1,21 bis 1,60 % sowie von 1,54 bis 0,91 % (Tab. Anhang, D 4.2.6.2). Im Verlauf von 24 Stunden kam es zu keiner relevanten Abweichung, sodass die Proben ohne Qualitätsminderung für 24 Stunden im Autosampler bei 15 °C bis zur Analyse aufbewahrt werden konnten.

3.4.2.7.1 Einfrier- und Auftaustabilität

Zur Bestimmung der Einfrier- und Auftaustabilität durchliefen die QC-Proben (5 ng/mL und 160 ng/mL; n = 6) drei Einfrier- und Auftauzyklen. Ein Zyklus bestand dabei aus einer mindestens 24-stündigen Einfrier- und einer mindestens einstündigen Auftauphase bei Raumtemperatur.

Der Fehler lag im Plasma und im Speichel zwischen -11,07 und -0,25 % sowie zwischen -4,47 und 9,98 %. Die Präzision lag im Plasma und im Speichel zwischen 3,74 und 4,20 % sowie zwischen 1,41 und 1,85 % (Tab. Anhang, D 4.2.6.3). Auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen kam es zu keinem Qualitätsverlust der QC-Proben.

3.4.2.7.2 Langzeitstabilität

Die Studienproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert. Um zu gewährleisten, dass die Proben auch über einen längeren Zeitraum bei -80 °C ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden können, wurden QC-Proben (5 ng/mL und 160 ng/mL; n = 6) unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt und anschließend analysiert. Dabei lag der Fehler im Plasma und Speichel zwischen -9,72 und -1,27 % sowie zwischen -16,56 (Bestimmungsgrenze) und -12,14 %. Die Präzision lag zwischen 1,64 und 6,81 % sowie zwischen 2,14 und 2,79 % (Tab. Anhang, D 4.2.6.4). Damit konnte sichergestellt werden, dass die Proben über einen Zeitraum von 18 Monaten bei -80 °C ohne Qualitätseinbußen gelagert werden konnten.

3.4.2.8 Verdünnungseffekte

Da bei der Probensammlung oft weniger als 1 mL Speichel entnommen wurde, was jedoch aufgrund der Eigenschaften der Salivette® erst nach der Zentrifugation aufgefallen war (Exp. Teil, C 1.6.3), konnte in den Fällen aufgrund der zeitlich eng getakteten klinischen Abläufe keine erneute Probenahme stattfinden. Somit war es notwendig, die vorhandenen Proben vor der Extraktion mit Poolspeichel auf 1 mL aufzufüllen und zu analysieren. Da dieser Schritt nicht in der Leitlinie der GTFCh abgedeckt war, wurde nachträglich überprüft, ob Verdünnungseffekte mit Poolspeichel auftreten.

Um die Verdünnungseffekte zu untersuchen, wurden 500 µL aus drei QC-Speichelproben (5 ng/mL, 20 ng/mL und 160 ng/mL; n = 3) entnommen und mit 500 µL Poolspeichel (Exp. Teil, C 2.5) verdünnt, extrahiert und analysiert. Zur Auswertung wurde die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend Richtigkeit und Präzision bestimmt.

Der Fehler lag zwischen -1,25 und 9,62 % und die Präzision zwischen 5,34 und 12,71 %. So wurde nachgewiesen, dass eine Verdünnung keinen relevanten Einfluss auf die Speichelproben hat

(Tab. Anhang, D 4.2.7). Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung von Comiran et al. bestätigt. Zusätzlich konnten sie es auch für Plasma nachweisen.[115]

4 Methode zur Quantifizierung von Guanfacin

4.1 Auswahl der Methode

Um eine Anwendung in einem Routinelabor zu ermöglichen, sollte die Messmethode möglichst einfach und schnell durchführbar sein.

In der Literatur sind bisher LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Guanfacin in Plasma von Tieren,[87, 134] in Urin im Rahmen von toxikologischen Untersuchungen und als DBS-Methode beschrieben.[135-137] In publizierten Untersuchungen liegt bei gesunden Erwachsenen die mittlere c_{max} von Guanfacin im Plasma zwischen 0,98 - 3,58 ng/mL.[138] Bei Kindern und Jugendlichen liegt die c_{max} dagegen deutlich höher (Tabelle 18).[89]

Tabelle 18: Guanfacinplasmakonzentrationen bei Kindern und Jugendlichen nach kontinuierlicher Einnahme von Intuniv® über sechs Tage. [89]

	Kinder	Jugendliche	Kinder	Jugendliche
Tagesdosis [mg]		2		4
c_{max} [ng/mL]	4,4	2,9	10,1	7,0

Für den Konzentrationsbereich von Guanfacin in Speichelmatrix gibt es bislang noch keine publizierten Untersuchungen, jedoch lässt sich mittels der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung das Verhältnis von Speichel- zu Serumkonzentration berechnen (Allg. Teil, B 3.3.1). So kann im pH-Bereich von 6,6 - 8,0 eine relativ zur Serumkonzentration niedrigere Speichelkonzentration erwartet werden (Tab. Anhang, D 3).

Um die dazu erforderliche Sensitivität erreichen zu können, wurde die Quantifizierung von Guanfacin aus Speichel- und Serumproben mittels LC-MS/MS Analytik durchgeführt.

4.2 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

4.2.1 Standardlösungen

4.2.1.1 Standardlösungen zur Methodenentwicklung aus der Reinsubstanz

Für die Methodenentwicklung wurden methanolische Reinsubstanzlösungen für Guanfacin und den internen Standard (1 µg/mL und 5 µg/mL) hergestellt und 5 µL zur Analyse in die LC-MS/MS Anlage injiziert.

4.2.1.2 Standardlösungen zur Methodenoptimierung und -validierung

Für die Kalibriergerade in Speichel wurde ausgehend von der Stammlösung (5 mg/mL) eine methanolische Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 19). Für die Kalibriergerade und QC-Proben in Plasma wurden aus unabhängigen Stammlösungen methanolische Spikelösungen (3200 ng/mL) hergestellt.

Tabelle 19: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung der Kalibriergeraden (SK) in Speichel.

Benennung	c (Guanfacin) [ng/mL]
SK 1	13,3
SK 2	26,7
SK 3	40,0
SK 4	80,0
SK 5	160,0
SK 6	320,0

Für Speichel QC-Proben wurden methanolische Verdünnungen aus einer unabhängigen Stammlösung hergestellt (Tabelle 20). Die höchste und niedrigste Konzentration wurde auch für den Nachweis der Autosampler-, Kurzzeit-, Einfrier- und Auftaustabilität verwendet.

Tabelle 20: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung von QC-Proben (SQC) in Speichel.

Benennung	c (Guanfacin) [ng/mL]
SQC 1	13,3
SQC 2	26,7
SQC 4	80,0
SQC 6	320,0

Als interner Standard wurde die Lösung aus Exp. Teil, C 2.6 verwendet.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate, der Extraktionseffizienz und der Matrixeffekte wurden post-Extraktion-spiked Proben hergestellt. Da sich die Aufarbeitung je nach Matrix um einen Verdünnungsschritt unterschied (Exp. Teil, C 4.3.1.2.3), wurden sowohl für Speichel (Tabelle 21) als auch für Plasma (Tabelle 22) individuelle post-Extraktion-spiked Lösungen hergestellt.

Tabelle 21: Konzentrationen der post-Extraktion-spiked Lösungen (pEs) für Speichel.

Benennung	c (Guanfacin) [ng/mL]	c (¹³C, ¹⁵N₃-Guanfacin) [ng/mL]
pEs 1	4,45	66,66
pEs 6	106,66	66,66

Tabelle 22: Konzentrationen der post-Extraktion-spiked Lösungen (pEs) für Plasma.

Benennung	c (Guanfacin) [ng/mL]	c (¹³C, ¹⁵N₃-Guanfacin) [ng/mL]
pEs 1	1,66	13,33
pEs 7	106,66	13,33

Um die Langzeitstabilität nachzuweisen, wurden separate Spikelösungen für QC-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Konzentrationen der methanolischen Spikelösungen zur Herstellung von QC-Proben zur Überprüfung der Langzeitstabilität (StQC).

Benennung	c (Guanfacin) [ng/mL]
StQC 1	50
StQC 2	200

4.2.1.3 Matrix

Humanes Serum und Speichel in Exp. Teil, C 2.4 und C 2.5 beschrieben.

4.2.1.4 LC-MS/MS Anlage

Die verwendete Anlage wurde in Exp. Teil, C 2.3 beschrieben. Zur Datensammlung und -auswertung wurde die Agilent Software MassHunter Workstation Version B 08.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet, die auch das Agilent Programm MassHunter Optimizer zur Optimierung der Fragmentorspannung (FV) und Kollisionsenergie (CE) für verschiedene Tochterionen enthält.

4.3 Durchführung der LC-MS/MS Methodenentwicklung

4.3.1.1 Entwicklung der LC-MS/MS Methode aus Reinsubstanzen

4.3.1.1.1 Entwicklung der MRM-Methode

Zur Quantifizierung per LC-MS/MS wurde zunächst eine Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Methode für Guanfacin und den internen Standard ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin entwickelt.

Um die Übergänge von Guanfacin zu ermitteln, wurde zuerst 5 μL methanolische Reinsubstanzlösung (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ohne Analysensäule injiziert. Aus dieser Reinsubstanzlösung wurde mittels Full Scan (FS) das Mutterion unter den voreingestellten Standardparameter für FV = 135 V, cell accelerator voltage (CAV) = 7 V und electron multiplier voltage (ΔEMV) = 0 V detektiert.

Da natürlich vorkommendes Chlor aus einem Isotopengemisch (^{35}Cl und ^{37}Cl) im Verhältnis 3:1 besteht, zeigt sich bei der massenspektrometrischen Analyse chloresubstituierter Wirkstoffe ein charakteristisches Isotopenmuster.[139] Somit wurden für Guanfacin, das doppelt chloriert ist, drei Mutterionen (m/z 246, 248 und 250) detektiert, von denen m/z 246 das intensivste war.

Im Anschluss wurde mit Hilfe des Programms Agilent MassHunter Optimizer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) nach den unterschiedlichen Tochterionen gesucht und die FV und CE im ESI positiven Modus optimiert. Das Programm scannt über den zuvor festgelegten Bereich die Quellenparameter selbsttätig. Für die FV wurde zuvor der Scanbereich von 70 bis 200 V und für die CE von 0 bis 150 V festgelegt. Zunächst wurde die FV für das Mutterion optimiert und im Anschluss die CE für die unterschiedlichen Tochterionen bestimmt. Aufgrund der Isotopenverteilung des Chlors wurde für das zweite Mutterion mit dem gleichen Übergang (m/z 248 \rightarrow 60) eine deutliche höhere Signalintensität detektiert als für das schwächere Tochterion des ersten Mutterions (m/z 246 \rightarrow 159)(Abbildung 27).

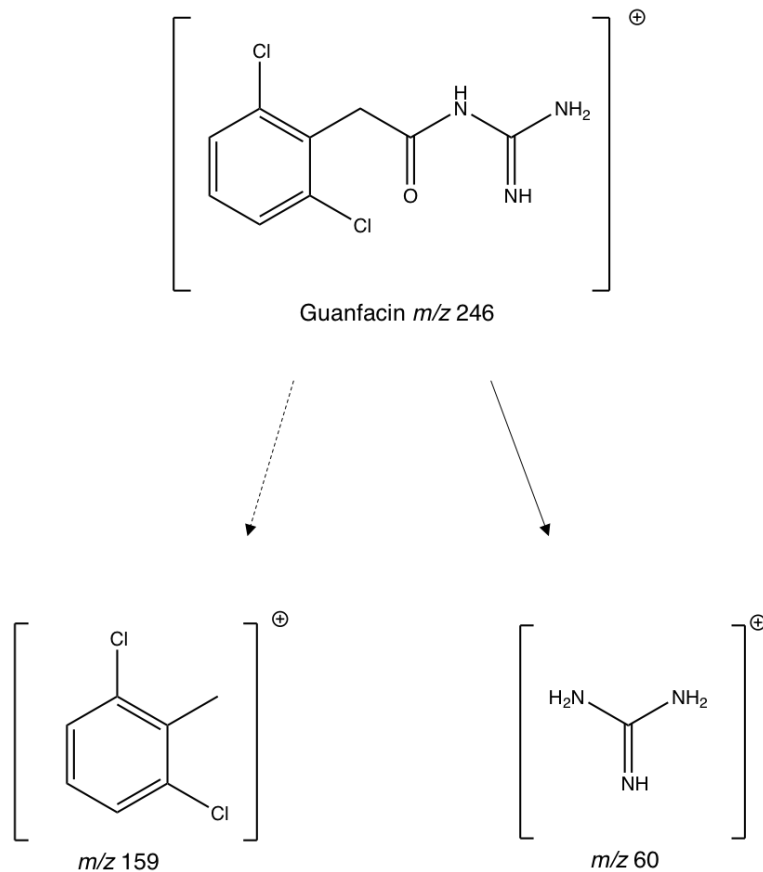


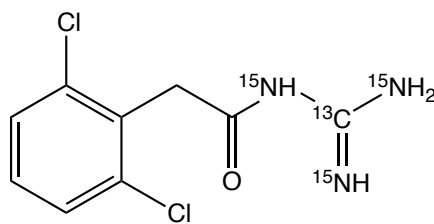
Abbildung 27: Strukturabbildung der Tochterionen des Guanfacins im ESI positiven Modus.

Im nächsten Schritt wurde die CAV optimiert, hierzu blieben die Standardeinstellungen der Resolution für MS1 und MS2 (unit/unit) sowie für die Dwell Time (200 ms) gleich. Die optimierten Werte für FV (96 V) und für CE (12 V) für das intensivste Tochterion (m/z 246 \rightarrow 60) wurden für den ESI positiven Modus angepasst. Durch wiederholte Injektion von 5 μ L der methanolischen Verdünnung zu 5 μ g/mL wurde die CAV über einen Bereich von 0 - 8 V variiert.

Für die Quantifizierung wird in der Regel das sensitivere Tochterion als Quantifier Ion und ein zweites als Qualifier Ion definiert. Da bei der Vermessung der Proben der Übergang m/z 246 \rightarrow 60 deutlich empfindlicher war als m/z 246 \rightarrow 159, wurde Ersterer als Quantifier festgelegt. Der Übergang m/z 248 \rightarrow 60 wurde als Qualifier verwendet, da dieser aufgrund der Isotopenkombination des Chlors deutlich intensiver war als m/z 246 \rightarrow 159.

Im Anschluss wurde analog dazu die Optimierung für ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin aus methanolischer Lösung (1 μ g/mL) durchgeführt.

Für den internen Standard wurde das intensivste Mutterion m/z 250 und der intensivste Übergang m/z 250 \rightarrow 64 (Abbildung 28) bei einer FV von 100 V und einer CE von 12 V ermittelt. Die optimale CAV lag für beide Tochterionen bei 8 V.

 ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin**Abbildung 28: Molekülstruktur des isotope markierten internen Standards.**

Die Konzentration der methanolischen Lösung des internen Standards (2 ng/mL), die zur Probenaufbereitung verwendet wurde, wurde so festgelegt, dass sie im Bereich der Kalibriergeraden in Speichel und Plasma liegt. So konnte ein ähnliches Verhalten zum Analyten in der Probenmatrix gewährleistet werden. Für massenspektrometrische Bestimmungen werden als interne Standards isotope markierte Analoga der Analyten empfohlen, da diese identische physikalisch-chemische Eigenschaften wie der Analyt aufweisen.[91, 140-142] Daher wurde ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin als interner Standard ausgewählt.

4.3.1.2 Optimierung der Quellenparameter

Neben der Entwicklung der MRM-Methode ist die Optimierung der Grundeinstellung der Quellenparameter (Tabelle 24) für eine hohe Ionisierungsausbeute wichtig. Hierfür wurden zunächst durch Zugabe von 2 % der Spikelösung (Exp. Teil, C 4.2.1.2) Plasmastammlösungen (64 ng/mL) und durch einen weiteren Verdünnungsschritt Plasmaproben mit einer Analytkonzentration von 32 ng/mL hergestellt. Zur Aufarbeitung wurden 100 μL einer Probe mit 200 μL methanolischem internen Standard (2 ng/mL) versetzt und kurz auf einem Vortex gemischt. Danach wurde das Gemisch für fünf Minuten bei 4 °C und 18000 g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 50 μL mit 250 μL Wasser in ein neues Reagiergefäß überführt und auf einem Vortex gemischt. Im Anschluss wurden die aufgearbeiteten Matrixproben mittels Trennsäule flüssigchromatographisch analysiert. Als organisches Fließmittel wurde Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure und als wässrige Phase ein 5 mmol/L Ammoniumformiatpuffer mit 0,065 % Ameisensäure verwendet. Das Injektionsvolumen der aufgearbeiteten Proben in die LC-MS/MS betrug 6 μL .

Tabelle 24: Grundeinstellungen der Quellenparameter.

Parameter	Grundeinstellung
Gas Temperatur [°C]	300
Gas Fluss [L/min]	10
Nebulizer [psi]	50
Sheath Gas Temperatur [°C]	400
Sheath Gas Fluss [L/min]	12
Capillary [V]	3500
Nozzle Voltage [V]	0

Es wurde jeweils nur die Einstellung des zu testenden Quellenparameters geändert, die restlichen Quellenparameter verblieben in der Standardeinstellung, bis auf die Parameter des Sheath und Drying Gases. Hier wurden jeweils der Fluss und die Temperatur variiert (Tabelle 25). Für die Auswertung wurde nur der Übergang m/z 246 \rightarrow 60 betrachtet.

Tabelle 25: Darstellung der verwendeten Einstellungen für Sheath und Drying Gas im Rahmen der Optimierung der Quellenparameter. Es wurde jeweils nur die Parameter des Sheath oder Drying Gas variiert und die Grundeinstellungen des jeweils anderen beibehalten.

Sheath Gas		Drying Gas	
Fluss [L/min]	Temperatur [°C]	Fluss [L/min]	Temperatur [°C]
10	250	13	200
11	250	5	250
12	250	8	250
10	300	12	250
11	300	8	300
12	300	10	300
8	350	12	300
10	350	5	350
11	350	8	350
12	350	10	350
8	400		
10	400		
12	400		

Die Drücke des Nebulizer wurden von 10 bis 60 psi, die Kapillarspannung von 0 bis 5000 V und die Nozzle voltage von 0 bis 2000 V variiert. Darüber hinaus wurden noch die besten drei Einstellungen für das Drying Gas und das Sheath Gas getestet, um die optimale Kombination zu ermitteln. Bei einer Kapillarspannung von 3000 V und einer Nozzle Voltage von 0 V wurde das intensivste Signal erfasst. Die optimale Einstellung lag für den Nebulizer bei 50 psi sowie für die Temperatur und den Fluss des Drying und des Sheath Gases jeweils bei 350 °C und 12 L/min.

4.3.1.2.1 Optimierung der MRM-Methode

Im Lauf der Methodenentwicklung wurde die Dwell Time angepasst und das ΔEMV , die Signalverstärkung durch den Multiplier, optimiert, um die bestmögliche Empfindlichkeit der Messmethode zu erreichen. Die Grundeinstellungen der Resolution für die Quadrupole MS 1 und 2 mit der geringsten Durchlässigkeit (unit/unit) wurden beibehalten, da sich die unterschiedlichen Mutterionen von Guanfacin und ^{13}C , $^{15}N_3$ -Guanfacin nur um $\pm m/z 2$ unterschieden. Das ΔEMV (0 V) und Dwell time (200 ms) der nicht variierenden Parameter blieben gleich und der jeweils zu testende Parameter wurde geändert. Um die optimale ΔEMV zu ermitteln, wurde sie über einen Bereich von 0 - 600 V variiert. Die größte Signalintensität wurde bei einer Spannung von 600 V gemessen.

Da die optimale Anzahl der Datenpunkte pro Analyt zwischen 10 und 20 liegen sollte, wurde die Dwell Time anhand der Peakbreite auf 50 ms und auf 150 ms für die Plasma- und Speichelmethode festgelegt. So wurden für die Dwell time von 50 ms der Plasmamethode ca. 18 Datenpunkte und für 150 ms bei der Speichelmethode ca. 14 Datenpunkte gemessen. Die unterschiedliche Dwell Time der beiden Methoden kommt dadurch zustande, dass bei der Methode zur Quantifizierung von Plasmaproben neben den ermittelten Übergängen noch zwei zusätzliche Referenzübergänge aus der Literatur für Guanfacin ($m/z 246 \rightarrow 159$ und $m/z 248 \rightarrow 159$) sowie für ^{13}C , $^{15}N_3$ -Guanfacin ($m/z 250 \rightarrow 159$ und $m/z 252 \rightarrow 159$) miterfasst wurden.[87] Ebenso wurden diese Übergänge auch für ^{13}C , $^{15}N_3$ -Guanfacin $m/z 250 \rightarrow 159$ und $m/z 252 \rightarrow 159$ detektiert. Da sich diese Übergänge als nicht relevant für die Analytik herausstellten, wurden die Übergänge aus der Messmethode für Speichel entfernt und die Dwell Time entsprechend angepasst. Zur Auswertung wurde nur der Übergang $m/z 246 \rightarrow 60$ betrachtet.

4.3.1.2.2 Fließmittelzusammensetzung

Zusätzlich zur Optimierung der Quellenparameter hat die Auswahl des Fließmittels und der Modifier einen Einfluss auf die Ionisierung des Analyten. Hierzu wurden verschiedene Fließmittelkombinationen aus Acetonitril mit 0,05 % und 0,1 % Ameisensäure und 5 mmol/L Ammoniumformiatpuffer mit unterschiedlichen Anteilen Ameisensäure (0,065 %, 0,097 % und 0,13 %) getestet. Die bisher verwendete mobile Phase aus 5 mmol/L Ammoniumformiatpuffer mit 0,065 % Ameisensäure und Acetonitril mit Zusatz von 0,1 % Ameisensäure zeigte eine minimal höhere Intensität als die anderen Fließmittelzusammensetzungen, sodass diese beibehalten wurde. Im Verlauf der Methodenentwicklung wurde der Fließmittelgradient festgelegt (Tabelle 26), um die Quelle des MS/MS mit möglichst wenig Matrixbestandteilen zu belasten.

Tabelle 26: Der Fließmittelgradient der LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Guanfacin. A stellt den organischen Anteil des Laufmittels dar. Die Temperatur des Säulenofens war konstant auf 40 °C eingestellt.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A [%]
0	0,5	10
0,5	0,5	10
2,5	0,5	95
4,0	0,5	95
4,1	0,5	10
6,0	0,5	10

4.3.1.2.3 Injektionsvolumina

Für Speichelproben (6,4 ng/mL) wurden verschiedene Injektionsvolumina (1 µL, 2 µL und 3 µL) verglichen, da auf den letzten Verdünnungsschritt der Probenaufarbeitung der Plasmamethode verzichtet wurde (Abbildung 29). Aufgrund der verringerten Empfindlichkeit des Signals bei 1 und 2 µL Injektionsvolumen wurden 3 µL ausgewählt. Zur Auswertung wurde nur der Übergang m/z 246 → 60 betrachtet.

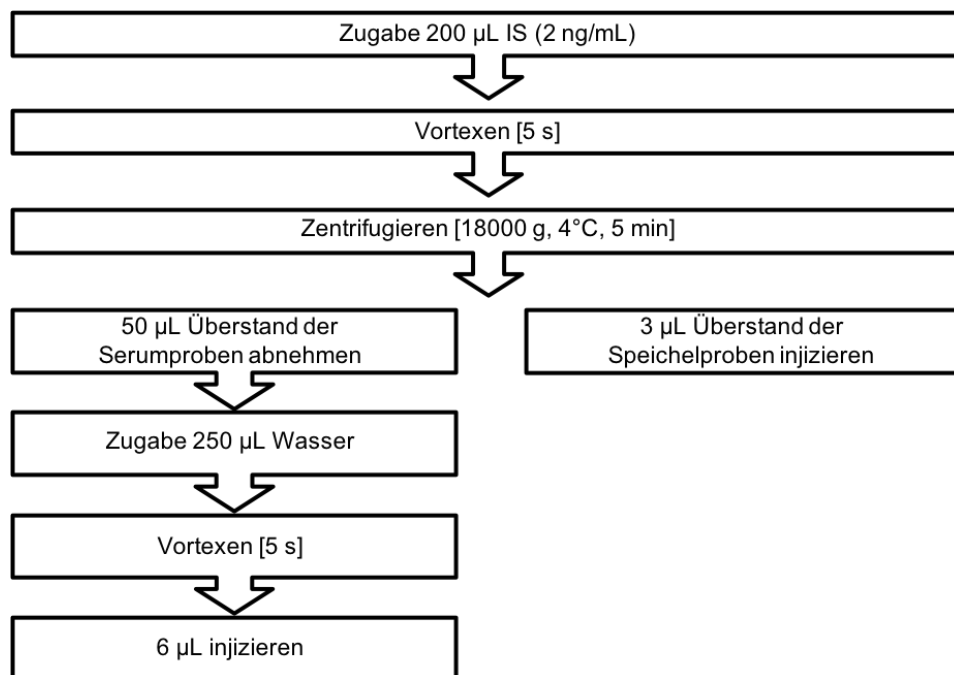


Abbildung 29: Finale Aufarbeitung von 100 µL Probenvolumen.

4.4 Methodvalidierung zur Quantifizierung von Guanfacin

Die Validierung der entwickelten LC-MS/MS Methode wurde in Anlehnung an die Vorschriften der GFTCh, die die Anforderungen zur bioanalytischen Methodvalidierung der FDA sowie der EMA berücksichtigen, durchgeführt.[131, 132]

Neben den Parametern zur Methodenvalidierung aus (Exp. Teil, C 3.4.1) wurde zusätzlich untersucht, ob die Matrix einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Matrixeffekte spielen in der massenspektrometrischen Analytik eine besondere Rolle, da sie durch Anwesenheit von interferierenden Substanzen in der Probe auftreten und das Messsignal direkt oder indirekt beeinflussen können.[131] Es ist sowohl eine Verstärkung (Ion enhancement) als auch eine Abschwächung (Ion suppression) des Messsignals möglich, die sowohl durch endogene als auch durch exogene Substanzen verursacht werden können.[143, 144] Als endogene Substanzen können Lipide oder Metabolite in der Probe enthalten sein. Exogene Substanzen können dagegen Zusätze der mobilen Phase sein, wie Trifluoressigsäure oder auch Polymere, die sich während der Probenaufarbeitung aus Plastikgefäßen lösen können.[144] Der Einfluss auf die Ionenintensität des Analyten und des Internen Standards kann in derselben biologischen Matrix, abhängig vom Spender, durch interindividuell schwankende Faktoren variieren.[133, 144] Der genaue Mechanismus ist noch unklar, es wird jedoch vermutet, dass Substanzen, die diese Effekte verursachen, mit den Analyten um primäre Ionen, die im LC-MS/MS Interface entstehen, konkurrieren und so die Bildung von Analytionen beeinflussen.[133] Somit hat die Probenmatrix und insbesondere die Probenaufarbeitung einen großen Einfluss auf die Reaktion.[133] Zusätzlich wurde auch berichtet, dass die Matrixeffekte abhängig von dem LC-MS/MS Interface variieren.[133, 143] So scheint die Elektronensprayionisation (ESI) anfälliger für Matrixeffekte zu sein als die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI).[143] Zudem sind die Effekte auch von den physikochemischen Eigenschaften der Analyten abhängig, so sind polare Moleküle davon deutlich häufiger betroffen als unpolare. Folglich wird angenommen, dass viele Matrixbestandteile, die diese Effekte verursachen, ebenfalls polar sind und mit den polaren Analyten koeluiieren.[144]

Matrixeffekte sind somit das Resultat aus all diesen Faktoren. Sie können durch Ionensuppression, Interferenzen mit anderen Metaboliten und „Cross-Talk“-Effekte die quantitativen Ergebnisse beeinflussen.[144] Der Cross-Talk ist ein weiterer Störfaktor in der Massenspektrometrie und kommt zustande, wenn Substanzen Fragmente mit der gleichen Masse wie die des Analyten erzeugen. So kann es vorkommen, dass noch Fragmente des letzten Übergangs in der Kollisionszelle vorhanden sind, wenn schon der nächste Übergang betrachtet wird. Diese Überlagerung führt dann zu falschen Messergebnissen.[144] Im Rahmen des TDM ist dies besonders gravierend, da eine falsche Therapieentscheidung die Folge wäre. Eine adäquate Maßnahme zur Minimierung der Matrixeffekte ist daher die Probenaufarbeitung; dadurch können potenziell interferierende Matrixbestandteile weitestgehend entfernt werden.[144] Zudem sollte ein isotoopenmarkierter interner Standard verwendet werden, der mindestens 3 Dalton schwerer sein sollte als der Analyt, um einen Cross-Talk zu vermeiden.[142, 144] Es ist daher essentiell für den Analyten und den

internen Standard den Matrixfaktor (MF) zu bestimmen, dazu wird das Verhältnis der Signalstärke des Analyten mit und ohne Matrixhintergrund ermittelt.[131] Zusätzlich wird auch der auf den internen Standard bezogene Matrixfaktor (MFIS) berechnet, da der Matrixeffekt nicht das Verhältnis des Analyten und des isotonenmarkierten internen Standards beeinflussen darf.[131, 133]

4.4.1 Selektivität

Um die Selektivität der Messmethode zu ermitteln, wurden Plasma und Speichel von je sechs Einzelspendern untersucht. Hierzu wurde pro Spender eine Blank Probe extrahiert und analysiert. Zusätzlich wurden noch je Matrix zwei Zero Proben – also Blank Proben mit zugesetztem internem Standard – aus Poolmatrix untersucht.

In den untersuchten Einzelproben traten keine Interferenzen zwischen Matrixbestandteilen und dem Analyten oder dem IS auf.

4.4.2 Linearität

Um den Messbereich festzulegen, wurden Kalibriergeraden ($n = 6$) in Plasma und Speichel über die im Folgenden dargestellten Konzentrationsbereiche erstellt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Darstellung der in der Matrix verwendeten Guanfacinkonzentrationen zur Erstellung der Kalibriergeraden (K). In Plasma wurden 7 Kalibrierpunkte und in Speichel 6 verwendet.

Benennung	c_{Plasma} (Guanfacin) [ng/mL]	c_{Speichel} (Guanfacin) [ng/mL]
K 1	0,5	0,267
K 2	1,0	0,533
K 3	2,0	0,800
K 4	4,0	1,600
K 5	8,0	3,200
K 6	16,0	6,400
K 7	32,0	

Zur Bestimmung der Guanfacinkonzentration wurde das Verhältnis aus Peakhöhe des Analyten und der Peakhöhe des IS gegen die Nominalkonzentration durch die Software aufgetragen. Mit jeder Kalibriergeraden wurde eine Blank Probe und eine Zero Probe aufgearbeitet und vermessen.

Die Guanfacinkonzentration war im Plasma über den Messbereich von 0,5 ng/mL bis 32 ng/mL und im Speichel von 0,267 ng/mL bis 6,4 ng/mL linear. Der Korrelationskoeffizient betrug im Plasma $r = 0,9996$ und im Speichel $r = 0,9996$ (Abbildung 30). Die Konzentration des untersten Kalibrierpunkts, der die Anforderungen dazu erfüllt (Exp. Teil, C 3.4.1), lag im Plasma bei 0,5 ng/mL und im Speichel bei 0,267 ng/mL (Tab. Anhang, D 5.1.1).

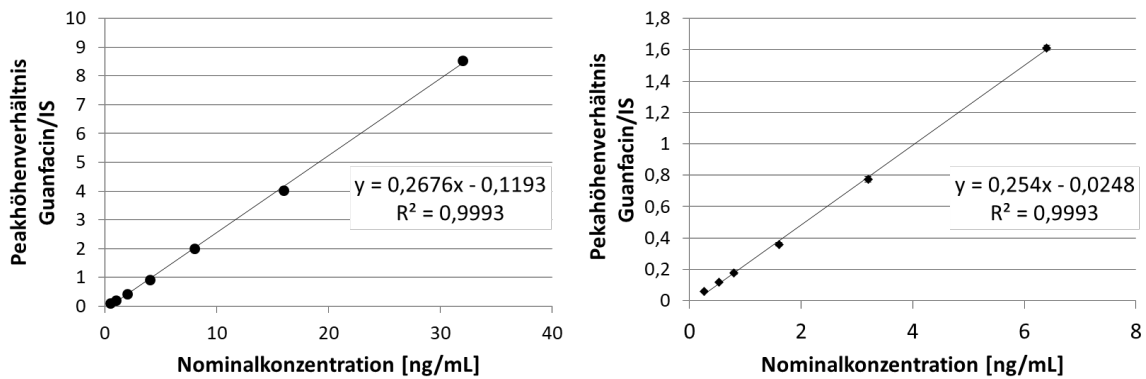


Abbildung 30: Die Kalibriergerade von Guanfacin in Plasma (links) und in Speichel (rechts). Die Punkte stellen die berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Einzelbestimmungen ($n = 6$) dar.

4.4.3 Bestimmungsgrenze

Für die Bestimmungsgrenze ist ein maximaler Fehler von $\pm 20\%$ akzeptabel. Die niedrigste Analytkonzentration, die noch in diesem Bereich liegt, ist $0,5 \text{ ng/mL}$ in Plasma und $0,267 \text{ ng/mL}$ in Speichel. Es wurden jeweils fünf dotierte Plasma- und Speichelproben mit dieser Konzentration extrahiert, vermessen und die Richtigkeit und Präzision bestimmt (Tab. Anhang, D 5.1.2).

4.4.4 Genauigkeit

4.4.4.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde bestimmt, indem an drei unterschiedlichen Tagen je vier unterschiedliche Konzentrationen an QC-Proben ($n = 5$) in Plasma- und Speichelmatrix vermessen wurden (Tabelle 28).

Tabelle 28: Guanfacinkonzentration der Qualitätskontrollen (QC) zur Validierung der Richtigkeit und Präzision.

Benennung	C_{Plasma} (Guanfacin) [ng/mL]	C_{Speichel} (Guanfacin) [ng/mL]
QC 1	0,5	0,267
QC 2	1,0	0,533
QC 4	4,0	1,600
QC 6		6,400
QC 7	32,0	

Der Bias wurde anhand der Formel (Exp. Teil, C 3.4.2.4.1, Formel 4) sowohl für die Richtigkeit innerhalb eines Tages als auch an unterschiedlichen Tagen bestimmt.

Der systematische Fehler der Messergebnisse lag an unterschiedlichen Tagen im Plasma und Speichel zwischen $-8,76$ und $10,14\%$ sowie zwischen $-4,76$ und $9,53\%$. Innerhalb eines Tages lag

der Fehler im Plasma und Speichel zwischen -8,76 und 7,79 % sowie zwischen -4,76 und 6,64 % (Tab. Anhang, D 5.1.3).

4.4.4.2 Präzision

Für die Bestimmung der Wiederhol- und Laborpräzision wurden an drei unterschiedlichen Tagen Plasma und Speichel QC-Proben ($n = 5$), die je vier unterschiedliche Konzentrationen abdeckten, analysiert (Tabelle 28). Die relative Standardabweichung der einzelnen Messwerte wurde sowohl innerhalb eines Tages (Wiederholpräzision) als auch an unterschiedlichen Tagen (Laborpräzision) berechnet. Präzision und Richtigkeit wurden aus denselben QC-Proben berechnet.

Die Laborpräzision im Plasma und Speichel lag zwischen 0,86 und 3,88 % sowie zwischen 1,25 und 7,40 %. Innerhalb eines Tages reichte die Wiederholpräzision im Plasma und Speichel von 0,86 bis 3,00 % und von 3,38 bis 7,40 % (Tab. Anhang, D 5.1.3).

4.4.5 Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Peakhöhen des Analyten von pre-spiked Proben (0,5 ng/mL und 32 ng/mL in Plasma; 0,267 ng/mL und 6,4 ng/mL in Speichel; $n = 6$) mit denen aus post-spiked Proben verglichen (Exp. Teil, C 3.4.2.5). Post-spiked Proben sind extrahierte Blank Proben, die nach der Proteinfällung mit einer wässrigen Lösung verdünnt werden, die den Analyten in äquivalenter Stoffmenge zu den pre-spiked Proben enthält, als wenn dieser zu 100 % extrahiert werden würde (Exp. Teil, C 3.4.2.5, Formel 5).

Die Extraktionsausbeute wurde bestimmt, indem das Verhältnis aus den Peakhöhen der pre-spiked Proben und den Peakhöhen der äquivalente Analytkonzentration in Lösungsmittel (post-spiked Lösung) berechnet wurde (Exp. Teil, C 3.4.2.5, Formel 6).

Ebenso wurde auch die Wiederfindungsrate und die Extraktionsausbeute für ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin (2 ng/mL) die bestimmt.

Die mittlere Extraktionsausbeute lag sowohl für Guanfacin als auch für ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin im Speichel unter den empfohlenen 50 % (Tabelle 29)(Tab. Anhang, D 5.1.4). Da die Plasma und Speichel QC-Proben alle geforderten Kriterien wie Präzision und Reproduzierbarkeit erfüllten, sind auch Ausbeuten unter 50 % akzeptabel.[131]

Tabelle 29: Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute von Guanfacin und ^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin (IS) in Plasma und Speichel. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 6$) und die Standardabweichung der Ausbeuten.

	Matrix	$C_{\text{Guanfacin}}$ [ng/mL]	Ausbeute \pm SD [%]	Ausbeute IS (2 ng/mL) \pm SD [%]
Wiederfindungsrate	Plasma	0,5	96,42 \pm 7,72	82,07 \pm 4,51
		32,0	90,18 \pm 4,93	86,13 \pm 3,77
	Speichel	0,267	119,80 \pm 11,16	108,43 \pm 3,44
		6,400	116,20 \pm 5,36	107,53 \pm 4,24
Extraktionsausbeute	Plasma	0,5	78,96 \pm 4,99	74,17 \pm 3,86
		32,0	73,12 \pm 3,08	74,17 \pm 2,31
	Speichel	0,267	25,63 \pm 2,17	22,31 \pm 2,18
		6,400	23,33 \pm 1,91	21,64 \pm 1,81

4.4.6 Matrixeffekte

Zur Untersuchung der Matrixeffekte wurde Speichel und Plasma von sechs Einzelpendern zur Probenherstellung verwendet. Zur Bestimmung der Matrixeffekte für Guanfacin wurden die Peakhöhen von post-spiked Proben mit denen des Analyten im Lösungsmittel verglichen (Plasma: 0,5 ng/mL und 32 ng/mL; Speichel: 0,267 ng/mL und 6,4 ng/mL; $n = 3$). Für den internen Standard wurde dies ebenso bestimmt (^{13}C , $^{15}\text{N}_3$ -Guanfacin 2 ng/mL). Im Anschluss wurde der Matrixfaktor (MF)(Formel 7) sowie der auf den internen Standard normalisierten Matrixfaktor (MFIS) berechnet (Formel 8). Dabei soll die relative Standardabweichung des MFIS nicht mehr als 15 % betragen.[91, 131]

Formel 7: Berechnung des Matrixfaktors aus post-spiked Proben und der äquivalenten Konzentration in Lösungsmittel.

$$\text{Matrixfaktor [\%]} = \left(\frac{\text{Peakhöhe Analyt (post - spiked Probe)}}{\text{Peakhöhe Analyt (äquivalente Konzentration in LM)}} \right) * 100$$

Formel 8: Berechnung des auf den internen Standard normalisierten Matrixfaktor.

$$\text{Interner Standard normalisierter Matrixfaktor [\%]} = \left(\frac{\text{MF Analyt}}{\text{MF interner Standard}} \right) * 100$$

Der MFIS lag in den sechs individuellen Plasmamatrizes zwischen 80,17 und 98,53 % sowie in den sechs individuellen Speichelmatrices zwischen 95,50 und 112,20 % (Tabelle 30). Im Plasma lag die Präzision für den MFIS bei 4,55 % und im Speichel bei 4,16 % und entsprach somit den Akzeptanzkriterien (Tab. Anhang, D 5.1.4). Die Matrixeffekte können durch den internen Standard ausgeglichen werden und beeinflussen somit nicht das Messergebnis.[131, 133]

Tabelle 30: Matrixeffekte von Guanfacin und IS in Plasma und Speichel von sechs verschiedenen Einzelspendern in zwei Konzentrationen (n = 3). Der Quotient aus dem Matrixfaktor (MF) von Guanfacin und internen Standard ergibt den auf den internen Standard normalisierte Matrixfaktor (MFIS).

Matrix	Konzentration [ng/mL]	MF ± SD [%]	MF (IS) (2 ng/mL) ± SD [%]	MFIS ± SD [%]
Plasma	0,5	81,38 ± 7,29	89,79 ± 5,07	90,55 ± 5,15
	32,0	81,18 ± 2,65	86,24 ± 3,74	94,18 ± 1,69
Speichel	0,267	21,54 ± 2,40	20,58 ± 2,05	104,63 ± 4,22
	6,400	20,13 ± 1,97	20,17 ± 1,95	99,82 ± 2,61

4.4.7 Carry-over

Um eine Verschleppung des Analyten sowie des internen Standards in die nachfolgende Analyse zu überprüfen, wurden Proben (n = 5) beider Matrices mit der höchsten Konzentration der Kalibrierfunktion (Plasma: 32 ng/mL; Speichel: 6,4 ng/mL) aufgearbeitet und vermessen. Im Anschluss wurde reines Lösungsmittel sowie eine aufgearbeitet Blank und Zero Probe derselben Matrix injiziert. Die Verschleppung des Analyten in die Blank Probe sollte ≤ 20 % der Peakhöhe der niedrigsten QC-Probe sein, für den internen Standard sollte die Verschleppung ≤ 5 % der Peakhöhe sein.[91]

Für den Analyten lag die Verschleppung im Plasma sowie im Speichel zwischen 0,93 und 1,36 % sowie zwischen 0,86 und 1,87 %. Für den internen Standard lag die Verschleppung im Plasma zwischen 0,01 und 0,04 % sowie im Speichel zwischen 0,01 und 0,07 %. Die Ergebnisse entsprachen somit den Anforderungen (Tab. Anhang, D 5.1.5).

4.4.8 Stabilität

Die Stabilität wurde für alle Proben auf dieselbe Weise untersucht, dazu wurden die Analytkonzentrationen der QC-Proben, die unter verschiedenen Bedingungen gelagert wurden, bestimmt und für diese die Richtigkeit und Präzision berechnet. Der Fehler soll dabei ≤ 15 % (≤ 20 % an der Bestimmungsgrenze) und die relative Standardabweichung ≤ 15 % sein. Die Kalibrierpunkte zur Konzentrationsbestimmung wurden am Tag der Analyse aufgearbeitet und analysiert.

4.4.8.1 Stammlösungsstabilität

Um die Stabilität der methanolischen Guanfacinlösung (3200 ng/mL) über einen Zeitraum von acht Monaten bei -20 °C zu bestimmen, wurde aus dieser eine wässrige Lösung (10,67 ng/mL) hergestellt und 6 µL injiziert (n = 6). Diese wurde gegen eine frisch hergestellte Lösung mit gleicher Konzentration verglichen. Aus den Peakhöhen wurde das Verhältnis gebildet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Der Bias der Peakhöhen verglichen zur frisch hergestellten Stammlösung lag zwischen -10,16 und -1,45 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.1).

Die methanolische Stammlösung war somit unter den Lagerungsbedingungen bei -20 °C über einen Zeitraum von acht Monaten stabil.

4.4.8.2 Kurzzeitstabilität

Um die Kurzzeitstabilität der Matrixproben außerhalb des Gefrierschranks zu gewährleisten, wurden Plasma QC-Proben (0,5 ng/mL und 32 ng/mL; n = 6) und Speichel QC-Proben (0,267 ng/mL und 6,4 ng/mL; n = 6) hergestellt und nach Lagerung von 48 Stunden bei Raumtemperatur analysiert. Daneben wurde auch die Stabilität der Proben bei einer Lagerung über 24 Stunden im Kühlschrank (2 °C) überprüft.

Bei den Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, lag der Fehler im Plasma und Speichel zwischen -4,33 und 3,18 % sowie zwischen -9,52 und -3,35 %. Die Präzision bewegte sich zwischen 1,23 und 2,34 % sowie zwischen 0,95 und 7,50 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.2.1).

Bei den Proben, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden, lag der Fehler im Plasma und Speichel zwischen 3,55 und 9,25 % sowie zwischen 3,77 und 10,03 %, die Präzision bewegte sich zwischen 1,08 und 5,31 % sowie zwischen 1,17 und 4,00 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.2.2). Die Auswertungen ergeben, dass die Proben sowohl bei Raumtemperatur über 48 Stunden als auch im Kühlschrank über 24 Stunden bei 2 °C stabil sind.

4.4.8.3 Autosamplerstabilität

Nach der Proteinfällung verblieben die aufgearbeiteten Proben bis zur Vermessung bei Raumtemperatur im Probengeber. Um die Stabilität der Proben bis zur Analyse zu gewährleisten, wurden Plasma QC-Proben (0,5 ng/mL, 4 ng/mL und 32 ng/mL; n = 6) und Speichel QC-Proben (0,267 ng/mL, 1,6 ng/mL und 6,4 ng/mL; n = 6) hergestellt und aufgearbeitet. Anschließend wurden die QC-Proben der jeweiligen Konzentration in je ein Vial vereinigt und in den Probenteller gestellt. Diese wurden dann nach festgelegten Zeitintervallen (0, 3, 6, 12 und 24 Stunden) in die LC-MS/MS injiziert und analysiert.

Im Plasma und Speichel lag der Fehler über 24 Stunden zwischen -7,81 und 10,68 % sowie zwischen 1,77 und 11,07 %. Die Präzision lag zwischen 1,80 und 3,23 % sowie zwischen 3,06 und 3,75 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.3). Im Verlauf von 24 Stunden kam es zu keiner relevanten Abweichung, so dass die Proben ohne Qualitätsminderung für 24 Stunden im Autosampler bis zur Analyse aufbewahrt werden können.

4.4.8.1 Einfrier- und Auftaustabilität

Zur Bestimmung der Einfrier- und Auftaustabilität durchliefen Plasma QC-Proben (0,5 ng/mL und 32 ng/mL; n = 6) und Speichel QC-Proben (0,267 ng/mL, 1,6 ng/mL und 6,4 ng/mL; n = 6) jeweils drei Einfrier- und Auftauzyklen. Ein Zyklus bestand dabei aus einer mindestens 24-stündigen Einfrierphase bei -80 °C und einer mindestens einstündigen Auftauphase bei Raumtemperatur.

Der Fehler lag im Plasma und im Speichel zwischen 2,09 und 4,03 % sowie zwischen 0,78 und 12,29 %. Die Präzision bewegte sich im Plasma und im Speichel zwischen 1,75 und 3,20 % sowie zwischen 1,43 und 6,61 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.4). Basierend auf diesen Ergebnissen führt das mehrmalige Einfrieren und Auftauen der Proben zu keiner relevanten Qualitätsminderung.

4.4.8.2 Langzeitstabilität

Die Studienproben wurden nach der Entnahme bei -80 °C bis zur Extraktion gelagert, ebenso wurden Plasma QC-Proben (1 ng/mL und 16 ng/mL; n = 6) und Speichel QC-Proben (1 ng/mL und 4 ng/mL; n = 6) über denselben Zeitraum wie die Studienproben aufbewahrt und zeitgleich mit diesen analysiert.

Im Plasma und Speichel lag der Fehler zwischen -7,64 und 3,10 % sowie zwischen -1,13 und 10,85 %. Die Präzision lag zwischen 2,51 und 4,47 % sowie zwischen 2,09 und 2,38 % (Tab. Anhang, D 5.1.6.5). Somit wurde bestätigt, dass Plasmaproben über einen Zeitraum von 28 Monaten und Speichelproben über einen Zeitraum von 32 Monaten bei -80 °C ohne Substanzverlust gelagert werden können. Diese Zeiträume entsprachen auch der Lagerungszeit der Studienproben bis zur Analyse.

5 Bestimmung der *in-vivo*-Proben

5.1.1 Extraktion der Studienproben

Die Studienproben wurden vor der Extraktion bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und im Anschluss für zehn Sekunden auf einem Vortex gemischt. Die darauf folgende Probenaufarbeitung und -analyse unterschied sich für Amphetamin- (Exp. Teil, C 3.3.3.2, Abbildung 25) und Guanfacinproben (Exp. Teil, C 4.3.1.2.3, Abbildung 29).

Um auch Proben mit einem geringeren Volumen als einem Milliliter analysieren zu können (Exp. Teil, C 3.4.2.8), wurden diese mit gepoolter Leermatrix ergänzt und nach der Quantifizierung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

5.1.2 Quantifizierung der *in-vivo* Proben

Zur Quantifizierung der Wirkstoffkonzentrationen wurden die Studienproben gegen eine durch QC-Proben validierte Kalibriergerade vermessen. Sowohl die Kalibrierpunkte für Speichel und Serum als auch die für Amphetamin und Guanfacin deckten jeweils unterschiedliche Kalibrierbereiche ab (Exp. Teil, C 3.4.2.2 und C 4.4.2).

6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurde SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, NY, USA) verwendet. Weitere Grafiken wurden mit Microsoft PowerPoint 2016 und Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erstellt.

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurden die relevanten Variablen mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft, abhängig davon wurde bei normalverteilten Werten die Pearson Korrelation (r) oder bei nicht-normalverteilten die Spearman Rangkorrelation (ρ) verwendet. Zur Beurteilung des Zusammenhangs zweier Variablen wurde der Korrelationskoeffizient von 0,1 bis 0,3 als schwach, von 0,3 bis 0,5 als moderat und von 0,5 bis 1,0 als stark gewertet.[145]

Zum Vergleich zweier abhängigen Variablen innerhalb einer Gruppe wurde beim Vorliegen einer Normalverteilung ein verbundener t -Test und bei nicht normalverteilten Variablen der Wilcoxon-Test angewendet.

Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($P = 0,05$) lag.

D

Tabellarischer Anhang

1 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Amphetamin

1.1 Klinische Parameter der 28 Probanden aus der Amphetamingruppe

Nr.	Code	m/w	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Dosis [mg]	AMEinnahme - Probenahme [min]	C _{Serum} [ng/mL]	C _{Speichel} [ng/mL]	pH _{Speichel}
1	A_01	m	11,1	15,76	40	195	67,6	125,9	7,92
2	A_02*	w	10,2	14,78	20	225	73,9	459,2	6,41
3	A_03	m	13,3	23,03	50	270	45,2	63,7	7,30
4	A_04	m	12,2	14,08	20	210	43,2	296,2	7,23
5	A_05	m	9,2	19,15	20	210	45,5	67,7	7,65
6	A_07	m	13,0	20,31	60	215	94,5	267,5	7,45
7	A_08	m	8,8	20,30	50	205	101,3	258,8	7,17
8	A_09	m	13,9	17,86	40	210	64,2	441,7	7,22
9	A_10	m	12,8	19,71	30	240	35,0	55,3	7,36
10	A_11*	m	7,6	16,67	40	210	103,7	183,2	7,41
11	A_14	m	13,3	13,68	40	190	95,0	224,9	7,44
12	A_15*	m	8,9	15,05	50	210	100,1	364,9	7,11
13	A_18	w	16,9	28,03	50	213	91,3	2155,4	6,18
14	A_21	m	7,4	21,52	40	270	93,4	256,8	7,33
15	A_22	m	12,5	17,15	50	200	83,6	220,9	7,55
16	A_23	m	9,4	14,90	30	180	82,4	262,1	6,68
17	A_24	m	7,6	14,49	40	210	98,0	348,1	6,47
18	A_25	m	9,1	15,86	40	165	60,5	134,2	7,85
19	A_26	m	9,3	15,72	50	270	121,1	2019,5	6,48
20	A_27	w	7,7	14,95	20	150	57,2	297,0	7,53
21	A_28	w	13,0	20,58	40	210	50,2	59,7	7,65
22	A_30	m	9,9	15,12	30	250	80,5	59,0	7,77
23	A_32	m	13,0	18,76	30	210	68,3	288,5	7,14
24	A_34	m	9,8	14,34	50	240	181,8	1856,0	6,18
25	A_36	w	13,2	18,49	30	365	43,3	44,3	7,27
26	A_37	m	14,6	19,69	70	225	106,5	807,6	6,98
27	A_38	m	15,1	18,87	40	210	39,4	85,1	7,54
28	A_39	m	14,2	20,64	50	210	50,1	104,3	7,29

* Proband A_02 erhielt sowohl morgens 20 mg Lisdexamphetamin als auch mittags 5 mg Amphetamin.

* Proband A_11 erhielt sowohl morgens 40 mg Lisdexamphetamin als auch mittags 20 mg Lisdexamphetamin.

* Proband A_15 erhielt sowohl morgens 50 mg Lisdexamphetamin als auch mittags 30 mg Lisdexamphetamin.

BMI = Body-Mass-Index; AM = Arzneimittel

1.1.1 Testung auf Normalverteilung der relevanten Variablen

	Tests auf Normalverteilung		
	Statistik	df	Shapiro-Wilk Signifikanz
Serumkonzentration [ng/mL]	,902	28	,013
Speichelkonzentration [ng/mL]	,599	28	,000
Speichel pH	,911	28	,021

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

1.1.2 Vergleich der medianen Speichel- und Serumamphetaminkonzentration mittels Wilcoxon-Test

		Ränge		
		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Speichelkonzentration [ng/mL] -	Negative Ränge	1 ^a	5,00	5,00
	Positive Ränge	27 ^b	14,85	401,00
Serumkonzentration [ng/mL]	Bindungen	0 ^c		
	Gesamt	28		

a. Speichelkonzentration [ng/mL] < Serumkonzentration [ng/mL]

b. Speichelkonzentration [ng/mL] > Serumkonzentration [ng/mL]

c. Speichelkonzentration [ng/mL] = Serumkonzentration [ng/mL]

		Statistik für Test ^a	
		Speichelkonzentration [ng/mL] - Serumkonzentration [ng/mL]	
Z			-4,509b
Asymptotische	Signifikanz (2-		,000
seitig)			
Exakte Signifikanz (2-seitig)			,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)			,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit			,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

1.1.3 Korrelation zwischen Speichel- und Serumamphetaminkonzentration

Korrelation nach Spearman			
		Serumkonzentration [ng/mL]	Speichelkonzentration [ng/mL]
Serumkonzentration [ng/mL]	Korrelations- koeffizient	1,000	,628**
	Sig. (2-seitig)	.	,000
	N	28	28
Speichelkonzentration [ng/mL]	Korrelations- koeffizient	,628**	1,000
	Sig. (2-seitig)	,000	.
	N	28	28

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

1.1.4 Berechnung des Bland-Altman-Plots für Speichel- und Serumamphetaminkonzentration

Zur Berechnung des Bland-Altman-Plots wurde für jeden Probanden die Differenz und der Mittelwert aus der gemessenen Speichel- und der gemessenen Serumkonzentration ermittelt.

Proband	Studiencode	C _{Serum} [ng/mL]	C _{Speichel} [ng/mL]	Differenz (C _{Serum} - C _{Speichel})	Mittelwert (C _{Serum} und C _{Speichel})
1	A_01	67,6	125,9	-58,4	96,8
2	A_02	73,9	459,2	-385,1	266,5
3	A_03	45,2	63,7	-18,8	54,6
4	A_04	43,2	296,2	-252,8	169,6
5	A_05	45,5	67,7	-22,5	56,7
6	A_07	94,5	267,5	-172,5	180,7
7	A_08	101,3	258,8	-157,7	180,1
8	A_09	64,2	441,7	-377,8	253,1
9	A_10	35,0	55,3	-20,0	45,0
10	A_11	103,7	183,2	-79,3	143,3
11	A_14	95,0	224,9	-130,0	160,0
12	A_15	100,1	364,9	-264,9	232,6
13	A_18	91,3	2155,4	-2063,7	1123,2
14	A_21	93,4	256,8	-163,6	175,2
15	A_22	83,6	220,9	-127,4	147,3
16	A_23	82,4	262,1	-169,6	167,2
17	A_24	98,0	348,1	-250,0	223,0
18	A_25	60,5	134,2	-73,5	97,2
19	A_26	121,1	2019,5	-1897,9	1070,1
20	A_27	57,2	297,0	-239,8	177,1
21	A_28	50,2	59,7	-9,8	55,1
22	A_30	80,5	59,0	21,5	69,8
23	A_32	68,3	288,5	-219,7	178,2
24	A_34	181,8	1856,0	-1674,2	1018,9
25	A_36	43,3	44,3	-0,7	43,6
26	A_37	106,5	807,6	-701,5	457,2
27	A_38	39,4	85,1	-45,6	62,2
28	A_39	50,1	104,3	-53,9	77,0

1.1.5 Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumamphetaminkonzentration

Korrelation nach Spearman			
		LNratioSPSE	Speichel pH
LNratioSPSE	Korrelationskoeffizient	1,000	-,712**
	Sig. (2-seitig)	.	,000
	N	28	28
Speichel pH	Korrelationskoeffizient	-,712**	1,000
	Sig. (2-seitig)	,000	.
	N	28	28

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

1.1.6 Korrelation zwischen der berechneten und gemessenen Serumamphetaminkonzentration

Korrelation nach Spearman			
		Berechnete Serumkonzentration [ng/mL]	Gemessene Serumkonzentration [ng/mL]
Berechnete Serumkonzentration [ng/mL]	Korrelations- koeffizient	1,000	,593**
	Sig. (2-seitig)	.	,001
	N	28	28
Gemessene Serumkonzentration [ng/mL]	Korrelations- koeffizient	,593**	1,000
	Sig. (2-seitig)	,001	.
	N	28	28

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

1.1.7 Berechnung der korrigierten Serumamphetaminkonzentration aus der Speichelamphetaminkonzentration

Die korrigierte Ratio wurde für jede Probe, aus der Geradengleichung des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gegen pH, mit der Gleichung ($= \text{EXP} (-1,269 * \text{pH}_{\text{Speichel}} + 10,285)$) berechnet. Für jeden Patienten wurde die gemessene Speichelkonzentration durch die korrigierte Ratio geteilt und so die korrigierte Serumkonzentration ermittelt.

Proband	Studiencode	c_{Speichel} [ng/mL]	$\text{pH}_{\text{Speichel}}$	Korrigierte Ratio	c_{KSe} [ng/mL]
1	A_01	125,9	7,92	1,26	99,5
2	A_02	459,2	6,41	8,59	53,5
3	A_03	63,7	7,30	2,78	22,9
4	A_04	296,2	7,23	3,03	97,6
5	A_05	67,7	7,65	1,78	38,0
6	A_07	267,5	7,45	2,30	116,5
7	A_08	258,8	7,17	3,27	79,0
8	A_09	441,7	7,22	3,07	143,7
9	A_10	55,3	7,36	2,57	21,5
10	A_11	183,2	7,41	2,42	75,9
11	A_14	224,9	7,44	2,32	96,7
12	A_15	364,9	7,11	3,53	103,3
13	A_18	2155,4	6,18	11,50	187,4
14	A_21	256,8	7,33	2,67	96,1
15	A_22	220,9	7,55	2,02	109,3
16	A_23	262,1	6,68	6,10	43,0
17	A_24	348,1	6,47	7,96	43,7
18	A_25	134,2	7,85	1,38	97,1
19	A_26	2019,5	6,48	7,86	256,9
20	A_27	297,0	7,53	2,07	143,2
21	A_28	59,7	7,65	1,78	33,5
22	A_30	59,0	7,77	1,53	38,6
23	A_32	288,5	7,14	3,40	84,8
24	A_34	1856,0	6,18	11,50	161,4
25	A_36	44,3	7,27	2,88	15,3
26	A_37	807,6	6,98	4,17	193,8
27	A_38	85,1	7,54	2,05	41,5
28	A_39	104,3	7,29	2,81	37,1

1.1.8 Berechnung des Bland-Altman-Plots für die berechnete und die gemessene Serumamphetaminkonzentration

Zur Berechnung des Bland-Altman-Plots wurde für jeden Probanden die Differenz und der Mittelwert aus der korrigierten (C_{kSe}) und der gemessenen Serumkonzentration (C_{Serum}) ermittelt.

Proband	Studiencode	C_{Serum} [ng/mL]	C_{kSe} [ng/mL]	Differenz ($C_{Serum} - C_{kSe}$)	Mittelwert (C_{Serum} und C_{kSe})
1	A_01	67,6	99,5	-58,4	96,8
2	A_02	73,9	53,5	-385,1	266,5
3	A_03	45,2	22,9	-18,8	54,6
4	A_04	43,2	97,6	-252,8	169,6
5	A_05	45,5	38,0	-22,5	56,7
6	A_07	94,5	116,5	-172,5	180,7
7	A_08	101,3	79,0	-157,7	180,1
8	A_09	64,2	143,7	-377,8	253,1
9	A_10	35,0	21,5	-20,0	45,0
10	A_11	103,7	75,9	-79,3	143,3
11	A_14	95,0	96,7	-130,0	160,0
12	A_15	100,1	103,3	-264,9	232,6
13	A_18	91,3	187,4	-2063,7	1123,2
14	A_21	93,4	96,1	-163,6	175,2
15	A_22	83,6	109,3	-127,4	147,3
16	A_23	82,4	43,0	-169,6	167,2
17	A_24	98,0	43,7	-250,0	223,0
18	A_25	60,5	97,1	-73,5	97,2
19	A_26	121,1	256,9	-1897,9	1070,1
20	A_27	57,2	143,2	-239,8	177,1
21	A_28	50,2	33,5	-9,8	55,1
22	A_30	80,5	38,6	21,5	69,8
23	A_32	68,3	84,8	-219,7	178,2
24	A_34	181,8	161,4	-1674,2	1018,9
25	A_36	43,3	15,3	-0,7	43,6
26	A_37	106,5	193,8	-701,5	457,2
27	A_38	39,4	41,5	-45,6	62,2
28	A_39	50,1	37,1	-53,9	77,0

2 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Speichel- und Serumkonzentration von Guanfacin

2.1 Klinische Parameter der 9 Probanden aus der Guanfacin-Gruppe

Nr.	Code	m/w	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Dosis [mg/d]	AMEinnahme - Probenahme [min]	C _{Serum} [ng/mL]	C _{Speichel} [ng/mL]	pH _{Speichel}
29	G_02	m	8,6	19,52	4	315	12,05	4,43	6,98
30	G_03	m	13,1	22,39	3	290	4,64	2,37	7,08
31	G_04	m	7,9	15,33	3	225	13,57	5,55	6,85
32	G_06	m	12,9	15,75	2	395	4,07	1,88	6,60
33	G_07	w	6,5	17,21	3	850	8,84	1,19	7,45
34	G_08	w	8,1	13,38	1	1155	5,40	0,45	7,35
10	A_11	m	7,6	16,67	1	210	7,77	2,94	7,41
20	A_27	w	7,7	14,95	1	150	2,99	1,39	7,53
22	A_30	m	9,9	15,12	4	250	7,88	1,07	7,77

2.1.1 Testung auf Normalverteilung der relevanten Variablen

	Tests auf Normalverteilung		
	Statistik	df	Shapiro-Wilk Signifikanz
Serumkonzentration [ng/mL]	,937	9	,552
Speichelkonzentration [ng/mL]	,907	9	,297
Speichel pH	,969	9	,886

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

2.1.2 Korrelation zwischen Speichel- und Serumguanfacinkonzentration

Korrelation nach Pearson			
		Serumkonzentration [ng/mL]	Speichelkonzentration [ng/mL]
Serumkonzentration [ng/mL]	Korrelation nach Pearson	1	,758*
	Signifikanz (2-seitig)		,018
	N	9	9
Speichelkonzentration [ng/mL]	Korrelation nach Pearson	,758*	1
	Signifikanz (2-seitig)	,018	
	N	9	9

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

2.1.3 Korrelation zwischen dem Quotienten aus Speichel- und Serumguanfacinkonzentration und Speichel pH

Korrelation nach Pearson			
		Ratio Speichel-/Serum- konzentration	Speichel pH
Ratio Speichel- /Serum- konzentration	Korrelation nach Pearson	1	-,574
	Signifikanz (2-seitig)		,106
	N	9	9
Speichel pH	Korrelation nach Pearson	-,574	1
	Signifikanz (2-seitig)	,106	
	N	9	9

2.1.4 Vergleich zwischen Speichel- und Serumguanfacinkonzentration mittels verbundenem t-Test

Statistik bei gepaarten Stichproben					
		Mittelwert	N	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1	Serumkonzentration [ng/mL]	7,4670	9	3,60861	1,20287
	Speichelkonzentration [ng/mL]	2,3634	9	1,68131	,56044

Korrelation nach Pearson bei gepaarten Stichproben				
		N	Korrelation	Signifikanz
Paaren 1	Serumkonzentration [ng/mL] & Speichelkonzentration [ng/mL]	9	,758	,018

Test bei gepaarten Stichproben							
-----Gepaarte Differenzen-----							
	Mittelwert	Std.Ab- weichung	Mittel- wertes	Standard- fehler des 95% Konfidenzintervall der Differenz		T	Sig. (2- seitig)
				Untere	Obere		df
Serumkonzentration [ng/mL] - Speichelkonzentration [ng/mL]	5,10357	2,57806	,85935	3,12190	7,08524	5,939	8 ,000

3 Berechnung des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration für Amphetamin und Guanfacin

Für die theoretische Berechnung nach der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung nach Matin et al.[93] des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration für Amphetamin und Guanfacin wurde für Blut ein pH-Wert von 7,4 und eine Speichelproteinbindung von 0 % verwendet. Für Amphetamin wurde ein pK_s 10,13 und ein serumproteingebundener Anteil von 18 % für Guanfacin pK_s 7,1 und eine Serumproteinbindung von 64 % verwendet.

Speichel-pH-Wert	Quotient aus Speichel- und Serumkonzentration	
	Guanfacin	Amphetamin
6,0	3,26	20,56
6,2	2,14	12,97
6,4	1,44	8,19
6,6	1,00	5,17
6,8	0,72	3,26
7,0	0,54	2,06
7,2	0,43	1,30
7,4	0,36	0,82
7,6	0,32	0,52
7,8	0,29	0,33
8,0	0,27	0,21

4 Methode zur Quantifizierung von Amphetamin

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Vergleich der Extraktionsmittel

Speichelmatrix			
Extraktionsmittel	Nominalkonzentration [ng/mL]	Peakhöhen	
		MW \pm SD (n = 3)	Präzision [%]
Essigsäureethylester	5	8,46 \pm 0,14	1,70
	20	32,92 \pm 2,19	6,64
	80	94,12 \pm 4,15	4,41
ACN-CLB 1:4, v/v	5	1,28 \pm 0,16	12,59
	20	2,62 \pm 0,59	22,63
	80	4,07 \pm 0,96	23,59
Hexan	5	0,10 \pm 0,06	59,01
	20	0,54 \pm 0,05	9,12
	80	0,75 \pm 0,03	3,60

4.1.2 Vergleich der DIB-Cl Konzentrationen

Speichelmatrix			
DIB-Cl	Nominalkonzentration [ng/mL]	Peakhöhen	
		MW \pm SD (n = 3)	Präzision [%]
30 μ mol/L	2,5	3,09 \pm 0,03	1,10
	20,0	20,83 \pm 2,13	10,22
	160,0	149,60 \pm 12,66	8,46
100 μ mol/L	2,5	4,10 \pm 0,18	4,51
	20,0	29,02 \pm 1,14	3,93
	160,0	253,26 \pm 16,50	6,52
250 μ mol/L	2,5	6,34 \pm 0,10	1,53
	20,0	44,21 \pm 0,23	0,52
	160,0	371,47 \pm 8,46	2,28
1000 μ mol/L	2,5	5,33 \pm 0,11	2,11
	20,0	36,48 \pm 0,36	0,98
	160,0	317,59 \pm 5,37	1,69

4.2 Methodenvalidierung

4.2.1 Linearität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
5	4,28 ± 0,26	5,17	-14,40
10	9,11 ± 0,06	0,65	-8,92
20	18,59 ± 0,37	1,84	-7,06
40	37,75 ± 2,12	5,29	-5,62
80	78,83 ± 1,93	2,42	-1,46
160	161,30 ± 1,37	0,85	0,81

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
5	4,50 ± 0,10	2,26	-10,04
10	9,75 ± 0,26	2,65	-2,45
20	19,99 ± 0,60	3,01	-0,03
40	40,42 ± 0,45	1,11	1,04
80	81,31 ± 0,94	1,16	1,64
160	166,87 ± 3,53	2,12	4,29
240	234,15 ± 3,30	1,41	-2,44

4.2.2 Bestimmungsgrenze

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 4)				
5	1	4,14 ± 0,06	1,50	-17,25
	2	4,18 ± 0,14	3,40	-16,47
	3	4,19 ± 0,16	3,85	-16,29
	4	4,73 ± 0,14	3,03	-5,50
	5	4,41 ± 0,04	0,84	-11,87
	6	4,79 ± 0,03	0,68	-4,11
Laborpräzision (n = 24)				
5		4,40 ± 0,29	6,55	-11,91

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW \pm SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 4)				
5	1	4,66 \pm 0,11	2,32	-6,77
	2	4,53 \pm 0,05	1,18	-9,47
	3	5,15 \pm 0,19	3,71	2,97
	4	4,97 \pm 0,04	0,79	-0,56
	5	4,60 \pm 0,07	1,62	-8,06
	6	4,63 \pm 0,10	2,16	-7,38
Laborpräzision (n = 24)				
5		4,57 \pm 0,25	5,45	-8,69

4.2.3 Genauigkeit

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW \pm SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 4)				
5	1	4,14 \pm 0,06	1,50	-17,25
	2	4,18 \pm 0,14	3,40	-16,47
	3	4,19 \pm 0,16	3,85	-16,29
	4	4,73 \pm 0,14	3,03	-5,50
	5	4,41 \pm 0,04	0,84	-11,87
	6	4,79 \pm 0,03	0,68	-4,11
20	1	17,65 \pm 0,13	0,71	-11,73
	2	17,33 \pm 0,24	1,37	-13,34
	3	17,93 \pm 0,21	1,17	-10,36
	4	19,76 \pm 0,16	7,91	-1,18
	5	17,31 \pm 0,31	1,76	-13,43
	6	17,91 \pm 0,57	3,20	-10,46
80	1	71,14 \pm 1,50	2,11	-11,08
	2	72,04 \pm 1,86	2,59	-9,94
	3	76,64 \pm 2,56	3,35	-4,21
	4	75,91 \pm 2,75	3,62	-5,11
	5	75,69 \pm 1,43	1,89	-5,39
	6	80,78 \pm 0,53	0,65	0,97
Laborpräzision (n = 24)				
5		4,40 \pm 0,29	6,55	-11,91
20		17,98 \pm 1,09	6,07	-10,08
80		75,37 \pm 3,71	4,92	-5,79

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW \pm SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]

Wiederholpräzision (n = 4)				
5	1	4,66 \pm 0,11	2,32	-6,77
	2	4,53 \pm 0,05	1,18	-9,47
	3	5,15 \pm 0,19	3,71	2,97
	4	4,97 \pm 0,04	0,79	-0,56
	5	4,60 \pm 0,07	1,62	-8,06
	6	4,63 \pm 0,10	2,16	-7,38
20	1	18,41 \pm 0,51	2,79	-7,93
	2	20,36 \pm 0,80	3,92	1,81
	3	18,64 \pm 0,61	3,26	-6,79
	4	19,65 \pm 0,27	1,40	-1,77
	5	17,95 \pm 0,32	1,78	-10,25
	6	18,52 \pm 0,39	2,11	-7,38
80	1	80,85 \pm 1,52	1,88	1,07
	2	79,65 \pm 0,79	0,99	-0,44
	3	73,33 \pm 2,52	3,44	-8,34
	4	82,41 \pm 0,28	0,33	3,02
	5	75,27 \pm 0,91	1,21	-5,91
	6	82,66 \pm 1,57	1,90	3,33

Laborpräzision (n = 24)				
5		4,57 \pm 0,25	5,45	-8,69
20		18,92 \pm 0,97	5,12	-5,38
80		79,03 \pm 3,82	4,84	-1,21

4.2.4 Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute

Plasmamatrix				
	Nominalkonzentration [ng/mL] (n = 6)	Peakhöhen		
		100 Pufferlösung MW ± SD	% Post-spike MW ± SD	Pre-spike MW ± SD
Amphetamin	5	17,28 ± 0,90	16,57 ± 0,83	4,06 ± 0,20
	80	256,66 ± 12,64	276,49 ± 12,93	77,74 ± 4,33
MPPA	746	171,91 ± 7,29	165,54 ± 8,23	48,11 ± 3,73
	746	162,17 ± 7,41	173,24 ± 7,77	56,79 ± 2,36

Speichelmatrix				
	Nominalkonzentration [ng/mL] (n = 6)	Peakhöhen		
		100 Pufferlösung MW ± SD	% Post-spike MW ± SD	Pre-spike MW ± SD
Amphetamin	5	17,28 ± 0,90	18,05 ± 1,63	9,00 ± 0,61
	80	256,66 ± 12,64	292,90 ± 13,41	156,39 ± 12,53
MPPA	746	171,91 ± 7,29	184,52 ± 14,88	100,95 ± 4,01
	746	162,17 ± 7,41	186,98 ± 9,93	102,98 ± 7,39

4.2.5 Carry-over

Plasmamatrix			
		Peakhöhen	
Matrixproben		Matrixblank	
Amphetamin [5 ng/mL]	MPPA [746 ng/mL]	Amphetamin	MPPA
4,25	52,08	0	0,24
3,68	44,41	0	0,26
4,40	47,92	0	0,39
3,41	41,88	0	0,29
4,34	52,87	0	0,29

Speichelmatrix			
		Peakhöhen	
Matrixproben		Matrixblank	
Amphetamin [5 ng/mL]	MPPA [746 ng/mL]	Amphetamin	MPPA
8,63	99,25	0	0,31
8,76	99,53	0	0,31
8,12	92,97	0	0,31
6,32	83,52	0	0,24
7,12	95,52	0,14	0,24

4.2.6 Stabilität

4.2.6.1 Kurzzeitstabilität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,07 ± 0,05	-18,51	1,22
80	70,86 ± 0,69	-11,42	0,97

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,27 ± 0,12	-14,58	2,77
80	74,46 ± 1,19	-6,92	1,59

4.2.6.2 Autosamplerstabilität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,88 ± 0,08	-2,33	1,60
20	19,29 ± 0,24	-3,53	1,24
80	89,44 ± 1,09	11,81	1,21

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,70 ± 0,04	-5,91	0,91
20	19,88 ± 0,31	-0,61	1,54
80	82,47 ± 0,81	3,09	0,98

4.2.6.3 Einfrier-/Auftaustabilität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,45 ± 0,17	-11,07	3,74
80	79,80 ± 3,35	-0,25	4,20

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,78 ± 0,09	-4,47	1,85
80	87,99 ± 1,24	9,98	1,41

4.2.6.4 Langzeitstabilität

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Zeitraum [Monate]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	18	4,94 ± 0,08	-1,27	1,64
80	18	72,73 ± 2,81	-9,09	3,86

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Zeitraum [Monate]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	18	4,17 ± 0,12	-16,56	2,79
80	18	70,29 ± 1,50	-12,41	2,14

4.2.7 Überprüfung auf Verdünnungseffekte

Die gemessenen Konzentrationen wurden zur Auswertung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den berechneten Konzentrationen wurden dann die Richtigkeit und Präzision bezogen auf die Nominalkonzentration bestimmt.

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	berechnete Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 3)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
5	4,52 ± 0,57	9,62	12,71
20	19,36 ± 1,03	3,20	5,34
160	162,00 ± 9,34	-1,25	5,77

5 Methode zur Quantifizierung von Guanfacin

5.1 Methodvalidierung

5.1.1 Linearität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
0,5	0,52 ± 0,03	4,94	3,80
1,0	0,93 ± 0,02	2,51	-7,10
2,0	1,83 ± 0,08	4,64	-8,70
4,0	3,75 ± 0,06	1,53	-6,29
8,0	8,11 ± 0,20	2,43	1,36
16,0	16,35 ± 0,38	2,31	2,21
32,0	34,52 ± 0,51	1,49	7,89

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
0,267	0,262 ± 0,016	6,04	-1,83
0,533	0,505 ± 0,020	4,00	-5,29
0,800	0,76 ± 0,05	6,17	-4,65
1,600	1,54 ± 0,05	3,28	-4,03
3,200	3,30 ± 0,07	2,27	2,98
6,400	6,87 ± 0,07	1,06	7,27

5.1.2 Bestimmungsgrenze

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 5)				
0,5	1	0,53 ± 0,01	2,27	6,76
	2	0,51 ± 0,01	2,32	1,35
	3	0,52 ± 0,02	3,00	3,53
Laborpräzision (n = 15)				
0,5		0,52 ± 0,02	3,33	3,88

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 5)				
0,267	1	0,278 ± 0,013	4,69	4,00
	2	0,291 ± 0,007	2,55	9,12
	3	0,282 ± 0,016	5,81	5,52
Laborpräzision (n = 15)				
0,267		0,284 ± 0,014	4,88	6,26

5.1.3 Genauigkeit

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 5)				
0,5	1	0,53 ± 0,01	2,27	6,76
	2	0,51 ± 0,01	2,32	1,35
	3	0,52 ± 0,02	3,00	3,53
1,0	1	0,97 ± 0,04	3,88	-2,75
	2	0,95 ± 0,03	3,18	-4,88
	3	0,91 ± 0,02	2,35	-8,76
4,0	1	3,82 ± 0,10	2,55	-4,45
	2	3,84 ± 0,11	2,83	-4,07
	3	3,76 ± 0,06	1,58	-5,92
32,0	1	34,57 ± 0,60	1,74	8,04
	2	35,24 ± 0,60	1,71	10,14
	3	34,49 ± 0,30	0,86	7,79
Laborpräzision (n = 15)				
0,5		0,52 ± 0,02	3,33	3,88
1,0		0,95 ± 0,04	4,17	-5,46
4,0		3,81 ± 0,10	2,53	-4,81
32,0		34,77 ± 0,62	1,78	8,66

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Tag	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Wiederholpräzision (n = 5)				
0,267	1	0,278 ± 0,013	4,69	4,00
	2	0,291 ± 0,007	2,55	9,12
	3	0,282 ± 0,016	5,81	5,52
0,533	1	0,512 ± 0,009	1,74	-3,88
	2	0,528 ± 0,011	2,13	-1,01
	3	0,542 ± 0,018	3,38	1,64
1,600	1	1,52 ± 0,02	1,56	-4,76
	2	1,62 ± 0,03	1,90	0,95
	3	1,57 ± 0,12	7,40	-2,18
6,400	1	6,83 ± 0,10	1,46	6,64
	2	7,01 ± 0,09	1,25	9,50
	3	6,74 ± 0,27	4,03	5,34
Laborpräzision (n = 15)				
0,267		0,284 ± 0,014	4,88	6,26
0,533		0,527 ± 0,019	3,69	-1,08
1,600		1,57 ± 0,06	3,85	-2,00
6,400		6,86 ± 0,14	2,09	7,16

5.1.4 Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Matrixeffekte

Plasmamatrix					
	Nominalkonzentration [ng/mL] (n = 3)	Peakhöhen			
		100 % Reinslösung MW ± SD	Post-spike MW ± SD	Pre-spike MW ± SD	
Guanfacin	0,5	2210,33 ± 99,95	1810,94 ± 124,85	± 1742,50	± 94,01
	32,0	203252,00 ± 3437,48	± 164950,06 ± 4485,14	± 148595,17	± 6004,02
IS	2	24171,00 ± 787,10	± 21864,24 ± 989,69	± 17909,11	± 754,93
	2	23755,33 ± 398,86	± 20482,11 ± 829,44	± 17617,78	± 551,58

Speichelmatrix				
	Nominalkonzentration [ng/mL] (n = 3)	Peakhöhen		
		100 % Reinslösung MW ± SD	Post-spike MW ± SD	Pre-spike MW ± SD
Guanfacin	0,267	2750,00 ± 105,04	590,94 ± 53,11	704,06 ± 55,79
	6,400	87014,33	± 17512,61	± 20301,11
		354,13	1711,10	1657,90
IS	2	78324,00	± 16088,33	± 17435,39
		3479,91	1312,29	1439,12
	2	79901,33	± 16114,56	± 17293,39
		379,70	1554,35	1445,41

5.1.5 Carry-over

Plasmamatrix			
	Peakhöhen		
	Matrixproben	Lösungsmittel	
Guanfacin [0,5 ng/mL]	¹³ C, ¹⁵ N ₃ -Guanfacin [2 ng/mL]	Guanfacin (Blank)	¹³ C, ¹⁵ N ₃ -Guanfacin (Blank)
1764	17532	24	5
1642	18155	19	1
1725	17783	16	1
1974	18018	26	2
1841	18282	25	8

Speichelmatrix			
	Peakhöhen		
	Matrixproben	Lösungsmittel	
Guanfacin [0,267 ng/mL]	¹³ C, ¹⁵ N ₃ -Guanfacin [2 ng/mL]	Guanfacin (Blank)	¹³ C, ¹⁵ N ₃ -Guanfacin (Blank)
642	9997	12	5
554	9592	6	0
580	9644	5	2
592	9116	10	1
504	8897	8	6

5.1.6 Stabilität

5.1.6.1 Stammlösungsstabilität

Eine methanolische Guanfacinlösung (3200 ng/mL) wurde über einen Zeitraum von acht Monaten bei -20 °C gelagert und mit einer frisch hergestellten Guanfacinlösung verglichen. Hierzu wurden aus beiden jeweils eine wässrige Lösung (10,67 ng/mL) hergestellt und 6 µL injiziert (n = 6).

Peakhöhen Stammlösungsverdünnung [10,67 ng/mL]		Peakhöhen (8 Monate – 20 °C)/ Peakhöhen (frische hergestellt)
Frisch	8 Monate – 20°C	
911467	840927	0,92
844282	832043	0,99
918933	825527	0,90
913998	827625	0,91
883538	823483	0,93
897474	820227	0,91

5.1.6.2 Kurzzeitstabilität

5.1.6.2.1 Raumtemperatur

Die Proben wurden über 48 Stunden im Kühlschrank bei Raumtemperatur gelagert und im Anschluss gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade quantifiziert.

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,5	0,52 ± 0,01	3,18	2,34
32,0	30,61 ± 0,38	-4,33	1,23

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,267	0,257 ± 0,019	-3,35	7,50
6,400	5,79 ± 0,06	-9,52	0,95

5.1.6.2 Kühlschrank

Hierzu wurden Proben für 24 Stunden im Kühlschrank bei 2 °C gelagert und anschließend gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade quantifiziert.

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,5	0,55 ± 0,03	9,25	5,31
32,0	33,14 ± 0,36	3,55	1,08

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,267	0,293 ± 0,012	9,62	4,00
6,400	6,64 ± 0,08	3,77	1,17

5.1.6.3 Autosamplerstabilität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,5	0,55 ± 0,02	10,68	3,23
4,0	3,69 ± 0,10	-7,81	2,62
32,0	33,92 ± 0,61	6,01	1,80

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,267	0,286 ± 0,009	7,23	3,06
1,600	1,63 ± 0,06	1,77	3,75
6,400	7,11 ± 0,25	11,07	3,50

5.1.6.4 Einfrier-/Auftaustabilität

Plasmamatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,5	0,52 ± 0,02	4,03	3,20
32,0	32,67 ± 0,57	2,09	1,75

Speichelmatrix			
Nominalkonzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
	MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
0,267	0,268 ± 0,018	0,40	6,61
6,400	7,19 ± 0,10	12,29	1,43

5.1.6.5 Langzeitstabilität

Plasmamatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Zeitraum [Monate]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
1	28	0,92 ± 0,04	-7,64	4,47
16	28	16,50 ± 0,41	3,10	2,51

Speichelmatrix				
Nominalkonzentration [ng/mL]	Zeitraum [Monate]	gemessene Konzentration [ng/mL]		
		MW ± SD (n = 6)	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
1	32	0,99 ± 0,02	-1,13	2,09
4	32	4,43 ± 0,11	10,85	2,38

E **Zusammenfassung**

1 Zusammenfassung

Für Kinder und Jugendliche stellt die Blutentnahme im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) aufgrund der Invasivität häufig eine große physische sowie psychische Belastung dar. Diese Stresssituation kann durch Speichelsammlung aufgrund des nicht invasiven Prozederes vermieden und zusätzlich der Material-, Personal- und Zeitaufwand im Vergleich zu einer Blutentnahme minimiert werden. Da die therapeutischen Referenzbereiche in der AGNP Konsensus-Leitlinie zum TDM von Psychopharmaka nur für Serum und Plasma validiert sind, sind vergleichende Untersuchungen von alternativen Matrices mit Serum oder Plasma sowie eine klinische Validierung essenziell für die Implementierung in die klinische Praxis.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, den Zusammenhang zwischen Speichel- und Serumkonzentrationen von Amphetamin und Guanfacin zu untersuchen, um zukünftig das Prozedere der Probenahme für TDM bei Kinder und Jugendliche unter ADHS-Pharmakotherapie durch ein nicht invasives Verfahren zu erleichtern. Zur quantitativen Bestimmung wurden zwei unterschiedliche Methoden aus der Literatur weiterentwickelt. So war es möglich, aus Speichel- und Serumproben Amphetamin mittels HPLC-FL Analytik sowie Guanfacin mittels LC-MS/MS Analytik zu quantifizieren. Die chromatographischen Methoden wurden in Anlehnung an die Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) erfolgreich validiert.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Speichel- und Serumkonzentrationen von Amphetamin und Guanfacin bei Kinder und Jugendlichen wurde eine klinische Studie in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikum Würzburgs initiiert. Von 34 Probanden, die mit Lisdexamphetamin und/oder Guanfacin behandelt wurden, konnte jeweils eine korrespondierende Speichel- und Serumprobe gewonnen und quantifiziert werden. Für Amphetamin wurde belegt, dass der Speichel-pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf die Wirkstoffverteilung, den Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration, hat ($\rho = -0,712$; $P < 0,001$). Dadurch konnte erstmalig unter Berücksichtigung des Speichel-pH-Wertes eine Berechnung der theoretischen Serumkonzentration aus der Speichelkonzentration durchgeführt werden. Es wurde zwar gezeigt, dass sich sowohl der Mittelwert der Differenzen durch die Berechnung theoretischen Serumkonzentration von -343 auf -12 ng/mL als auch die Anzahl der Messwert innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 % verbessern, jedoch war auch nach der Umrechnung die Differenz der Messwerte zu groß, sodass eine klinische Validierung für Amphetamin nicht möglich war. In dieser Studie wurde auch erstmals Guanfacin im Speichel nachgewiesen und quantifiziert, die Konzentrationen lagen zwischen 0,45 und 5,55 ng/mL und waren im Mittel dreifach niedriger als im Serum (2,36 ng/mL vs. 7,47 ng/mL; $t(8) = 5,94$; $P < 0,001$).

Die Speichelguanfacinkonzentration wies einen starken Zusammenhang mit der korrespondierenden Serumkonzentration auf ($r = 0,758$; $P = 0,018$). Obwohl ein nicht signifikanter Trend für den Einfluss des Speichel-pH-Wertes auf den Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration zu erkennen war, scheint dieser weniger stark ausgeprägt zu sein als bei Amphetamin und anderen basischen Arzneistoffen ($r = -0,574$; $P = 0,106$).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass sich die Speichelbestimmung von Amphetamin nur zum qualitativen Nachweis für TDM eignet. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der Speichel-pH-Wert einen geringeren Einfluss auf die Speichelkonzentration von Guanfacin zu haben scheint, als es bei Amphetamin der Fall ist, und sich Guanfacin somit potenziell für TDM in Speichel eignet. Zukünftig könnten Speichelproben zur Kontrolle der Adhärenz sowohl von Amphetamin als auch von Guanfacin verwendet werden und die Probenahme für die Patienten vereinfachen.

2 Summary

Due to the invasive procedure, blood sampling for therapeutic drug monitoring (TDM) is often associated with high stress levels for children and adolescents, which may be avoided by non-invasive oral fluid collection. Furthermore, it may reduce material, personnel and time costs compared to blood collection. Since the therapeutic ranges of the AGNP guideline for TDM of psychotropic drugs are only validated for serum and plasma, comparative studies of alternative matrices with serum or plasma, as well as a clinical validation are essential for the implementation into clinical practice.

To investigate the relationship between oral fluid and serum concentrations of amphetamine and guanfacine in children and adolescents, a clinical study was initiated at the Clinic and Polyclinic for Child and Adolescent Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy at the University Hospital of Würzburg. Therefore, corresponding oral fluid and serum samples derived from 34 subjects treated with lisdexamfetamine and/or guanfacine were collected and quantified. A significant effect of oral fluid pH on drug distribution ($\rho = -0.712$; $P < 0.001$), reported as the quotient of oral fluid to serum concentration, was observed for amphetamine. For the first time a calculation of serum concentration from oral fluid concentration, taking oral fluid pH into account, could be performed. Although the calculation improved both the mean of the differences of both methods from -343 to -12 ng/mL and the number of samples within the 20 % acceptance interval, the clinical validation was missed due to the variation between the measured and the calculated serum concentration of amphetamine. Furthermore, guanfacine was detected and quantified in oral fluid for the first time, with concentrations from 0.45 to 5.55 ng/mL, which was three times lower compared to serum concentrations (2.36 ng/mL vs. 7.47 ng/mL; $t(8) = 5.94$; $P < 0.001$). A strong relationship between oral fluid and the corresponding serum concentration of guanfacine ($r = 0.758$; $P = 0.018$) was observed. Although a non-significant trend suggested an influence of oral fluid pH on the oral fluid-to-serum concentration ratio, it appeared to be significantly less pronounced than for amphetamine and other basic drugs ($r = -0.574$; $P = 0.106$).

With the herein presented work it was shown that, on the one hand, the determination of amphetamine in oral fluid may be suitable for qualitative issues in TDM, and, on the other hand, oral fluid pH seems to have a smaller influence on the oral fluid concentration of guanfacine than it is the case for amphetamine and, thus, guanfacine is promising candidate for TDM in oral fluid. In future, oral fluid could be used for compliance monitoring of amphetamine and guanfacine and to facilitate specimen collection as a non-invasive procedure for children and adolescents.

F

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Arzneistoffkonzentration im Blut bei mehrmaliger Medikamenteneinnahme mit den dazugehörigen Kenngrößen. (Abbildung modifiziert nach [15], Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5372360793752)	3
Abbildung 2: Die Molekülstrukturen der in Deutschland zur Behandlung der ADHS im Kindes- und Jugendalter zugelassenen Arzneistoffe.	4
Abbildung 3: Korrelation zwischen Speichel- und Serumkonzentration (n = 28). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192).....	18
Abbildung 4: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der im Serum und im Speichel gemessenen Konzentrationen (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen und die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden.	18
Abbildung 5: Bland-Altman-Plot zum relativen Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der Speichel und Serumamphetaminkonzentration (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen und die gepunkteten Linien das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden. Die gestrichelten Linien zeigen $\pm 20 \%$ Abweichung von dem Mittelwert der Differenzen an; in diesem Bereich sollten in Anlehnung an die Vorgaben der EMA 67 % der Proben liegen. Nur zwei Messwerte liegen innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 %.....	19
Abbildung 6: Darstellung des Verhältnisses von Speichel- zur Serumamphetaminkonzentration über den pH-Bereich von 6 - 8. Als Grundlage für die Berechnung wurde ein konstanter Blut-pH-Wert von 7,4 und eine Speichelproteinbindung von 0 % angenommen. Für Amphetamin wurde der pK_s 10,13 und ein serumproteingebundener Anteil von 18 % verwendet (Tab. Anhang, D 3).	21
Abbildung 7: Darstellung des Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 28). Die gestrichelte Linie stellt den nach der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechneten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration (Abbildung 6) und die durchgezogene Linie stellt die die exponentielle Trendlinie dar.	22
Abbildung 8: Darstellung des logarithmierten Quotienten aus Speichel- und Serumkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 28). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall und die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192)	23

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Verteilungsverhaltens von Amphetamin in Speichel und Blut in Anlehnung an Haeckel et al.[82] Die hervorgehobenen Pfeile zeigen eine Gleichgewichtsverschiebung abhängig vom pH-Wert an. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5375981451797) 24

Abbildung 10: Korrelation zwischen der gemessenen und der berechneten Serumkonzentration (n = 28). Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade und die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192) 26

Abbildung 11: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der gemessenen und berechneten Amphetaminkonzentration (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen dar, die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die Verschiebung des Mittelwertes von Null zeigt eine systematische Abweichung zwischen den beiden Methoden..... 27

Abbildung 12: Bland-Altman-Plot zum relativen Vergleich der Differenzen und der Mittelwerte der gemessenen und berechneten Amphetaminkonzentration (n = 28). Die durchgehende Linie stellt den Mittelwert der Differenzen dar, die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall (Mittelwertes $\pm 1,96$ x Standardabweichung) dar. Die gestrichelten Linien zeigen ± 20 % Abweichung von dem Mittelwert der Differenzen an, in diesem Bereich sollten in Anlehnung an die Vorgaben der EMA 67 % der Proben liegen. Insgesamt liegen 6 Messwerte innerhalb des Akzeptanzintervalls von 20 %. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [92] unter Lizenznummer: 5371260395192) 28

Abbildung 13: Korrelation zwischen der Speichel- und Serumguanfacinkonzentration (n = 9). Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade und die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [111] unter Lizenznummer: 5371260362338) 30

Abbildung 14: Darstellung des Verhältnisses von Speichel- zur Serumkonzentration für Guanfacin und Amphetamin über den pH-Bereich von 6 - 8. Für die Berechnung wurde für Blut ein pH-Wert von 7,4 und eine Speichelproteinbindung von 0 % verwendet. Für Amphetamin wurde ein pK_s von 10,13 sowie eine Serumproteinbindung von 18% und für Guanfacin ein pK_s von 7,1 sowie eine Serumproteinbindung von 64% angenommen (Tab. Anhang, D 3)..... 31

Abbildung 15: Darstellung des Quotienten aus Speichel- und Serumguanfacinkonzentration gegen den pH-Wert des Speichels (n = 9). Die gestrichelten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall und die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade dar. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik aus [111] unter Lizenznummer: 5371260362338) 32

Abbildung 16: Darstellung des Verteilungsverhaltens von Guanfacin zwischen Blut und Speichel nach Haeckel et al.[82] In Grafik A wird die Verteilung für Speichel-pH-Werte über 7,1 und in Grafik B für Speichel-pH-Werte unter 7,1 abgebildet. Die hervorgehobenen Pfeile geben eine Gleichgewichtsveränderung abhängig vom pH-Wert an. (Erlaubnis zur Verwendung der Grafik unter Lizenznummer: 5375981451797).....	33
Abbildung 17: Speichelentnahmesystem Salivette® Cortisol, bestehend aus (von links nach rechts): Verschlussstopfen, Kunstfaserrolle, Einhängegefäß und Salivettenröhre.....	39
Abbildung 18: Derivatisierungsreaktion von Dexamphetamin und MPPA mit DIB-Cl.....	46
Abbildung 19: Chromatogramm der Reinsubstanzen und des internen Standards. Auftrennung der Arzneistoffe nach Abdampfen des mit 10 µL Analyten (1000 ng/mL) und 10 µL MPPA (746 ng/mL) gespikten Extraktionsmittels Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v).....	49
Abbildung 20: Bildung einer Emulsion während der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v). Darstellung einer Speichelprobe unmittelbar nach Extraktion mit Acetonitril und 1-Chlorbutan (1:4, v/v) und Zentrifugation (10 Minuten, 25°C, 1850 g). Die untere klare Phase besteht aus Speichel und Carbonatpuffer, darüber ist die milchige, gelartige Emulsion in der organischen Phase mit geringem Überstand zu erkennen.	52
Abbildung 21: Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen dem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril (ACN) und 1-Chlorbutan (CLB-ACN) (1:4, v/v), Essigsäureethylester und Hexan bei unterschiedlichen Speichelamphetaminkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen (n = 3).....	54
Abbildung 22: Darstellung der Kalibriergeraden aus Speichelproben nach der Extraktion mit Essigsäureethylester. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhenverhältnisse Analyt/IS (n = 3).....	54
Abbildung 23: Vergleich der Peakhöhen methanolischer Amphetaminlösungen verschiedener Konzentrationen nach Derivatisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen DIB-Cl. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen (n = 3).	56
Abbildung 24: Kalibriergerade methanolischer Amphetaminlösungen verschiedener Konzentrationen nach Derivatisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen DIB-Cl. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Peakhöhen (n = 3).	56
Abbildung 25: Fließdiagramm der optimierten Extraktionsmethode aus 1 mL Probe.....	57
Abbildung 26: Kalibriergerade von Amphetamin in Plasma (linke Abbildung) und in Speichel (rechte Abbildung). Die Punkte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Einzelbestimmungen (n = 6) dar.	61
Abbildung 27: Strukturabbildung der Tochterionen des Guanfacins im ESI positiven Modus.	70
Abbildung 28: Molekülstruktur des isotopenmarkierten internen Standards.....	71

Abbildung 29: Finale Aufarbeitung von 100 μ L Probenvolumen. 74

Abbildung 30: Die Kalibriergerade von Guanfacin in Plasma (links) und in Speichel (rechts). Die Punkte stellen die berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Einzelbestimmungen (n = 6) dar..... 77

G

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung
AGNP	Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BMI	Body Mass Index
CAV	Cell accelerator voltage
CE	Collision energy
CLB	1-Chlorbutan
C_{max}	Maximale Serumkonzentration
CYP	Cytochrom P450
DBS	Dried Blood Spot
DDD	Defined Daily Doses
DIB-Cl	4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chlorid
EMA	European Medicines Agency
EMV	Electron multiplier voltage
ESI	Elektrospray Ionisation
f	Anteil des ungebundenen Wirkstoffs
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fluoreszenzspektrometer
FS	Full Scan
FV	Fragmentor voltage
GFTCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

ICD-10	International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems (Version 10)
IgA	Immunglobulin A
IS	Interner Standard
LC	Liquid Chromatography
LLOQ	Lower Limit of Quantification
MF	Matrixfaktor
MFIS	Matrixfaktor auf den internen Standard normalisiert
MPPA	1-methyl-3-phenylpropylamin
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
MW	Mittelwert
P	Signifikanzniveau
pEs	post-Extraktion-spiked
QC-Probe	Qualitätskontrollprobe
r	Pearsons Korrelationskoeffizient
Sig.	Signifikanzniveau
SD	Standardabweichung
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
t_{\max}	Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
ρ	Spearman Korrelationskoeffizient

H

Literaturverzeichnis

1. Drepper C. and Gerlach M., *Grundlagen der Neuro-/Psychopharmakologie*, in *Neuro-/Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter: Grundlagen und Therapie*. Third ed. 2016: Springer-Verlag.
2. Paracelsus T., *Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Recepte*, in *Septem Defensiones (1538)*. Second ed. 1965: Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt.
3. Hiemke C., Baumann P., Bergemann N., Conca A., Dietmaier O., Egberts K., et al., *AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011*. *Pharmacopsychiatry*, 2011. 44: p. 195-235.
4. Hiemke C., Bergemann N., Clement H.W., Conca A., Deckert J., Domschke K., et al., *Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017*. *Pharmacopsychiatry*, 2018. 51: p. 9-62.
5. Ostad Haji E., Mann K., Dragicevic A., Müller M.J., Boland K., Rao M.L., et al., *Potential cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring for depressed patients treated with citalopram*. *Ther Drug Monit*, 2013. 35: p. 396-401.
6. Egberts K., Mehler-Wex C., and Gerlach M., *Therapeutic drug monitoring in child and adolescent psychiatry*. *Pharmacopsychiatry*, 2011. 21: p. 249-253.
7. Poggesi I., Benedetti M.S., Whomsley R., Le Lamer S., Molimard M., and Watelet J.B., *Pharmacokinetics in special populations*. *Drug Metab Rev*, 2009. 41: p. 422-54.
8. Mehler-Wex C., Kölch M., Kirchheiner J., Antony G., Fegert J.M., and Gerlach M., *Drug monitoring in child and adolescent psychiatry for improved efficacy and safety of psychopharmacotherapy*. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 2009. 3: p. 14.
9. Pichini S., Papaseit E., Joya X., Vall O., Farré M., Garcia-Algar O., et al., *Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs in pediatrics*. *Ther Drug Monit*, 2009. 31: p. 283-318.
10. Gerlach M., Egberts K., Dang S.Y., Plener P., Taurines R., Mehler-Wex C., et al., *Therapeutic drug monitoring as a measure of proactive pharmacovigilance in child and adolescent psychiatry*. *Expert Opin Drug Saf*, 2016. 15: p. 1477-1482.
11. Conn R.L., Kearney O., Tully M.P., Shields M.D., and Dornan T., *What causes prescribing errors in children? Scoping review*. *BMJ Open*, 2019. 9: p. e028680.
12. Egberts K., Fekete S., Häge A., Hiemke C., Scherf-Clavel M., Taurines R., et al., *Therapeutic drug monitoring to optimize psychopharmacotherapy in children and adolescents - update and guidelines for practice*. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother*, 2021. 50: p. 133-152.
13. Högger P., Strehl E., and Krämer I., *Repetitorium Klinische Pharmazie*. Third ed. 2015: Govi-Verlag.
14. Walitza S., Romanos M., Renner T., and Gerlach M., *Psychostimulanzien und andere Arzneistoffe, die zur Behandlung der Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS) angewendet werden*, in *Neuro-/Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter: Grundlagen und Therapie*. Third ed. 2016: Springer-Verlag.
15. Hiemke C., Baumann P., and Stingl J., *Pharmakokinetik, Pharmakogenetik und therapeutisches Drug Monitoring*, in *Handbuch der psychiatrischen Pharmakotherapie*. Second ed. 2012: Springer Verlag.
16. Klein H.G. and Ekkehard H., *Pharmakogenetik und Therapeutisches Drug Monitoring*. First ed. 2018: De Gruyter.
17. Gerlach M. and Warnke A., *Pocket Guide Neuro-/Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter*. Second ed. 2021: Springer.
18. Fekete S., Wewetzer C., Mehler-Wex C., Holtkamp K., Burger R., Reichert S., et al., *Therapeutic drug monitoring in children and adolescents under pharmacotherapy with olanzapine in daily clinical practice*. *Ther Drug Monit*, 2017. 39: p. 273-281.
19. Wokkittel C., Gerlach M., Taurines R., Wewetzer C., Unterecker S., Burger R., et al., *Relationship between clozapine dose, serum concentration, and clinical outcome in children and adolescents in clinical practice*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016. 123: p. 1021-31.
20. Albantakis L., Egberts K., Burger R., Kulpok C., Mehler-Wex C., Taurines R., et al., *Relationship between daily dose, serum concentration, and clinical response to quetiapine in children and adolescents with psychotic and mood disorders*. *Pharmacopsychiatry*, 2017. 50: p. 248-255.
21. Koelch M., Pfalzer A.K., Kliegl K., Rothenhofer S., Ludolph A.G., Fegert J.M., et al., *Therapeutic drug monitoring of children and adolescents treated with fluoxetine*. *Pharmacopsychiatry*, 2012. 45: p. 72-6.
22. Taurines R., Burger R., Wewetzer C., Pfuhlmann B., Mehler-Wex C., Gerlach M., et al., *The relation between dosage, serum concentrations, and clinical outcome in children and adolescents treated with sertraline: a naturalistic study*. *Ther Drug Monit*, 2013. 35: p. 84-91.

23. Egberts K.M., Gerlach M., Correll C.U., Plener P.L., Malzahn U., Heuschmann P., et al., *Serious adverse drug reactions in children and adolescents treated on- and off-label with antidepressants and antipsychotics in clinical practice*. Pharmacopsychiatry, 2022.
24. Fekete S., Hiemke C., and Gerlach M., *Dose-related concentrations of neuroactive/psychoactive drugs expected in blood of children and adolescents*. Ther Drug Monit, 2020. 42: p. 315-324.
25. Banaschewski T., Hohmann S., and Millenet S., *Langfassung der interdisziplinären evidenz- und konsensbasierten (S3) Leitlinie "Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter"*. 2018. AWMF Registernummer 028-045, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/028-045l_S3_ADHS_2018-06.pdf [accessed: April 17, 2019].
26. Wolraich M.L., Hagan J.F., Allan C., Chan E., Davison D., Earls M., et al., *Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents*. Pediatrics, 2019. 144: p. e20192528.
27. *Fachinformation Medikinet® adult*. Iserlohn, Germany: MEDICE Pharma GmbH & Co. KG; 2018.
28. *Fachinformation Elvanse Adult®*. Dublin, Ireland: Shire Pharmaceuticals Ireland Limited; 2019.
29. Scahill L., Chappell P.B., Kim Y.S., Schultz R.T., Katsovich L., Shepherd E., et al., *A placebo-controlled study of guanfacine in the treatment of children with tic disorders and attention deficit hyperactivity disorder*. Am J Psychiatry, 2001. 158: p. 1067-74.
30. Markowitz J.S. and Patrick K.S., *The clinical pharmacokinetics of amphetamines utilized in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder*. J Child Adolesc Psychopharmacol, 2017. 27: p. 678-689.
31. Hodgkins P., Shaw M., Coghill D., and Hechtman L., *Amphetamine and methylphenidate medications for attention-deficit/hyperactivity disorder: complementary treatment options*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2012. 21: p. 477-492.
32. Biederman J., Melmed R.D., Patel A., McBurnett K., Konow J., Lyne A., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of guanfacine extended release in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder*. Pediatrics, 2008. 121: p. e73-e84.
33. *Fachinformation Intuniv 1 mg/2 mg/3 mg/4mg Retardtabletten*. Dublin, Ireland: Shire Pharmaceuticals Ireland Limited; 2020.
34. Sharman J. and Pennick M., *Lisdexamfetamine prodrug activation by peptidase-mediated hydrolysis in the cytosol of red blood cells*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014. 10: p. 2275-80.
35. Dolder P.C., Strajhar P., Vizeli P., Hammann F., Odermatt A., and Liechti M.E., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lisdexamfetamine compared with d-amphetamine in healthy subjects*. Front Pharmacol, 2017. 8: p. 617.
36. Ermer J.C., Pennick M., and Frick G., *Lisdexamfetamine dimesylate: prodrug delivery, amphetamine exposure and duration of efficacy*. Clin Drug Investig, 2016. 36: p. 341-356.
37. Asadi-Pooya A.A., *Drug compliance of children and adolescents with epilepsy*. Seizure, 2005. 14: p. 393-5.
38. Taddeo D., Egedy M., and Frappier J.Y., *Adherence to treatment in adolescents*. Paediatr Child Health, 2008. 13: p. 19-24.
39. Häge A., Weymann L., Bliznak L., Marker V., Mechler K., and Dittmann R.W., *Non-adherence to psychotropic medication among adolescents - a systematic review of the literature*. Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother, 2018. 46: p. 69-78.
40. Gajria K., Lu M., Sikirica V., Greven P., Zhong Y., Qin P., et al., *Adherence, persistence, and medication discontinuation in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder - a systematic literature review*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014. 10: p. 1543-69.
41. Pappadopulos E., Jensen P.S., Chait A.R., Arnold L.E., Swanson J.M., Greenhill L.L., et al., *Medication adherence in the MTA: saliva methylphenidate samples versus parent report and mediating effect of concomitant behavioral treatment*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2009. 48: p. 501-510.
42. Tsuda Y., Matsuo Y., Matsumoto S., and Wajima T., *Population pharmacokinetic and exposure-response analyses of d-amphetamine after administration of lisdexamfetamine dimesylate in Japanese pediatric ADHD patients*. Drug Metab Pharmacokinet, 2020. 35: p. 548-554.
43. Tsuda Y., Matsuo Y., Matsumoto S., and Wajima T., *Population pharmacokinetic and exposure-response analyses of guanfacine in Japanese pediatric ADHD patients*. Drug Metab Pharmacokinet, 2019. 34: p. 365-371.
44. Shader R.I., Harmatz J.S., Oesterheld J.R., Parmelee D.X., Sallee F.R., and Greenblatt D.J., *Population pharmacokinetics of methylphenidate in children with attention-deficit hyperactivity disorder*. J Clin Pharmacol, 1999. 39: p. 775-785.

45. Zhou S.F., *Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II*. Clin Pharmacokinet, 2009. 48: p. 761-804.
46. Michelson D., Read H.A., Ruff D.D., Witcher J., Zhang S., and McCracken J., *CYP2D6 and clinical response to atomoxetine in children and adolescents with ADHD*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2007. 46: p. 242-51.
47. Bach M.V., Coutts R.T., and Baker G.B., *Involvement of CYP2D6 in the in vitro metabolism of amphetamine, two N-alkylamphetamines and their 4-methoxylated derivatives*. Xenobiotica, 1999. 29: p. 719-32.
48. Kiechel J.R., *Pharmacokinetics and metabolism of guanfacine in man - a review*. Br J Clin Pharmacol, 1980. 10: p. S25-S32.
49. Gröschl M., *Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics*. Bioanalysis, 2017. 9: p. 655-668.
50. Yeh C.K., Christodoulides N.J., Floriano P.N., Miller C.S., Ebersole J.L., Weigum S.E., et al., *Current development of saliva/oral fluid-based diagnostics*. Tex Dent J, 2010. 127: p. 651-61.
51. Atieh M.A., Guirguis M., Alsabeeha N.H.M., and Cannon R.D., *The diagnostic accuracy of saliva testing for SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis*. Oral Dis, 2021.
52. Lillsunde P., *Analytical techniques for drug detection in oral fluid*. Ther Drug Monit, 2008. 30: p. 181-7.
53. Samyn N. and van Haeren C., *On-site testing of saliva and sweat with drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users*. Int J Legal Med, 2000. 113: p. 150-4.
54. de la Torre R., Farre M., Navarro M., Pacifici R., Zuccaro P., and Pichini S., *Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices*. Clin Pharmacokinet, 2004. 43: p. 157-85.
55. Humphrey G.B., Boon C.M., and van de Wiel H.B., *The occurrence of high levels of acute behavioral distress in children and adolescents undergoing routine venipunctures*. Pediatrics, 1992. 90: p. 87-91.
56. Gorodischer R., Burtin P., Hwang P., Levine M., and Koren G., *Saliva versus blood sampling for therapeutic drug monitoring in children: patient and parental preferences and an economic analysis*. Ther Drug Monit, 1994. 16: p. 437-443.
57. Levy G., Ellis E.F., and Koysooko R., *Indirect plasma-theophylline monitoring in asthmatic children by determination of theophylline concentration in saliva*. Pediatrics, 1974. 53: p. 873-6.
58. Danhof M. and Breimer D.D., *Therapeutic drug monitoring in saliva*. Clin Pharmacokinet, 1978. 3: p. 39-57.
59. Singh K., Ziesenitz V., Usemann J., Van Den Anker J., Frey U., von der Weid N., et al., *Progress towards therapeutic drug monitoring via breath analysis*. Arch Dis Child, 2019. 104: p. 9.
60. Raju K.S.R., Taneja I., and Singh S.P., *Utility of noninvasive biomatrices in pharmacokinetic studies*. Biomed Chromatogr, 2013. 27: p. 1354-1366.
61. Siegel I.A., Ben-Aryeh H., Gozal D., Colin A.A., Szargel R., and Laufer D., *Comparison of unbound and total serum theophylline concentrations with those of stimulated and unstimulated saliva in asthmatic children*. Ther Drug Monit, 1990. 12: p. 460-4.
62. Cook C.E., Amerson E., Poole W.K., Lesser P., and O'Tuama L., *Phenytoin and phenobarbital concentrations in saliva and plasma measured by radioimmunoassay*. Clin Pharmacol Ther, 1975. 18: p. 742-7.
63. Goldsmith R.F. and Ouvrier R.A., *Salivary anticonvulsant levels in children: a comparison of methods*. Ther Drug Monit, 1981. 3: p. 151-7.
64. Malone S.A., Eadie M.J., Addison R.S., Wright A.W., and Dickinson R.G., *Monitoring salivary lamotrigine concentrations*. J Clin Neurosci, 2006. 13: p. 902-7.
65. van der Elst K.C., van Alst M., Lub-de Hooge M.N., van Hateren K., Kosterink J.G., Alffenaar J.W., et al., *Clinical validation of the analysis of fluconazole in oral fluid in hospitalized children*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. 58: p. 6742-6.
66. Fisher D.S., van Schalkwyk G.I., Seedat S., Curran S.R., and Flanagan R.J., *Plasma, oral fluid, and whole-blood distribution of antipsychotics and metabolites in clinical samples*. Ther Drug Monit, 2013. 35: p. 345-351.
67. Preiskorn J., Studer S., Rauh R., Lukacin R., Geffert C., Fleischhaker C., et al., *Interindividual and intraindividual variation of methylphenidate concentrations in serum and saliva of patients with attention-deficit/hyperactivity disorder*. Ther Drug Monit, 2018. 40: p. 435-442.
68. Stegmann B., Dörfelt A., and Haen E., *Quantification of methylphenidate, dexamphetamine, and atomoxetine in human serum and oral fluid by HPLC with fluorescence detection*. Ther Drug Monit, 2016. 38: p. 98-107.

69. Marchei E., Farré M., Pardo R., Garcia-Algar O., Pellegrini M., Pacifici R., et al., *Correlation between methylphenidate and ritalinic acid concentrations in oral fluid and plasma*. Clin Chem, 2010. 56: p. 585-592.
70. Comiran E., Souza D.Z., Boehl P.O., de Cássia Mariotti K., Pechansky F., Duarte P.d.C.A.V., et al., *Fenproporex and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid after controlled oral administration of fenproporex*. Ther Drug Monit, 2012. 34: p. 545-553.
71. Navarro M., Pichini S., Farré M., Ortuño J., Roset P.N., Segura J., et al., *Usefulness of saliva for measurement of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH*. Clin Chem, 2001. 47: p. 1788-1795.
72. Comiran E., Carlos G., Barreto F., Pechansky F., Fröhlich P.E., and Limberger R.P., *Lisdexamfetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid, plasma, and urine after controlled oral administration of lisdexamfetamine*. Biopharm Drug Dispos, 2021. 42: p. 3-11.
73. Schepers R.J., Oyler J.M., Joseph R.E., Cone E.J., Moolchan E.T., and Huestis M.A., *Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers*. Clin Chem, 2003. 49: p. 121-132.
74. Altman D.G. and Bland J.M., *Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies*. Statistician, 1983. 32: p. 307-317.
75. Giavarina D., *Understanding bland altman analysis*. Biochem Med (Zagreb), 2015. 25: p. 141-151.
76. Jänig W. and Vaupel P., *Funktionen des Magen-Darm-Trakts*, in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Thirty-second ed. 2010: Springer-Verlag.
77. Laurisch L., *Mundtrockenheit - Hintergründe und Therapie eines zunehmenden Problems*. Dtsch Zahnärztl, 2012: p. 430-437.
78. Aps J.K. and Martens L.C., *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva*. Forensic Sci Int, 2005. 150: p. 119-31.
79. Hold K.M., de Boer D., Zuidema J., and Maes R.A., *Saliva as an analytical tool in toxicology*. Int J Drug Test, 1996. 1: p. 1-36.
80. Mandel I.D., *Relation of saliva and plaque to caries*. J Dent Res, 1974. 53: p. 246-66.
81. Thaysen J.H., Thorn N.A., and Schwartz I.L., *Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva*. Am J Physiol, 1954. 178: p. 155-9.
82. Haeckel R., *Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs*. Ann N Y Acad Sci, 1993. 694: p. 128-42.
83. Langman L.J., *The use of oral fluid for therapeutic drug management: clinical and forensic toxicology*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1098: p. 145-166.
84. *U.S. National Library of Medicine: ChemIDplus*. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/300-62-9> [accessed: July 05, 2020].
85. Franksson G. and Änggård E., *The plasma protein binding of amphetamine, catecholamines and related compounds*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1970. 28: p. 209-214.
86. Baggot J.D., Davis L.E., and Neff C.A., *Extent of plasma protein binding of amphetamine in different species*. Biochem Pharmacol, 1972. 21: p. 1813-1816.
87. Li X., Li N., Sun X., Yang W., Dai Y., Xu J., et al., *Development and validation of a simple, sensitive and accurate LC-MS/MS method for the determination of guanfacine, a selective alpha2A - adrenergicreceptor agonist, in plasma and its application to a pharmacokinetic study*. Biomed Chromatogr, 2013. 27: p. 1708-13.
88. Boellner S.W., Stark J.G., Krishnan S., and Zhang Y., *Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover study*. Clin Ther, 2010. 32: p. 252-264.
89. Boellner S.W., Pennick M., Fiske K., Lyne A., and Shojaei A., *Pharmacokinetics of a guanfacine extended-release formulation in children and adolescents with attention-deficit-hyperactivity disorder*. Pharmacotherapy, 2007. 27: p. 1253-1262.
90. Lohse M.J. and Müller-Oerlinghausen B., *Psychopharmaka*, in *Arzneiverordnungs-Report 2017*. 2017: Springer.
91. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf [accessed: June 27, 2019]. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

92. Wokkittel C., Högger P., Fekete S., Romanos M., and Gerlach M., *Relationship between amphetamine concentrations in saliva and serum in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Ther Drug Monit*, 2021. 43: p. 564-569.
93. Matin S.B., Wan S.H., and Karam J.H., *Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva*. *Clin Pharmacol Ther*, 1974. 16: p. 1052-8.
94. Jusko W.J. and Milsap R.L., *Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva*. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 694: p. 36-47.
95. Kidwell D.A., Holland J.C., and Athanaselis S., *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998. 713: p. 111-135.
96. Haeckel R. and Hänecke P., *Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1996. 34: p. 171-91.
97. Ebert K., Maurice E., Lukacin R., Fleischhaker C., Schulz E., Ebert D., et al., *Serum and saliva concentrations of venlafaxine, O-desmethylenlafaxine, quetiapine, and citalopram in psychiatric patients*. *Ther Drug Monit*, 2018. 40: p. 351-355.
98. Seçilir A., Schrier L., Bijleveld Y.A., Toersche J.H., Jorjani S., Burggraaf J., et al., *Determination of methylphenidate in plasma and saliva by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. 923: p. 22-28.
99. *Fachinformation Ritalin® 10 mg Tabletten*. Nürnberg, Germany: Novartis Pharma GmbH; 2018.
100. Kreusser W., Heidland A., Hennemann H., Wigand M.E., and Knauf H., *Mono- and divalent electrolyte patterns, pCO₂ and pH in relation to flow rate in normal human parotid saliva*. *Eur J Clin Invest*, 1972. 2: p. 398-406.
101. Wolff M. and Kleinberg I., *Oral mucosal wetness in hypo- and normosalivators*. *Arch Oral Biol*, 1998. 43: p. 455-62.
102. Saleh J., Figueiredo M.A.Z., Cherubini K., and Salum F.G., *Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics*. *Arch Oral Biol*, 2015. 60: p. 242-255.
103. Al-Manei K., Almotairy N., Bostanci N., Kumar A., and Grigoriadis A., *Effect of chewing on the expression of salivary protein composition: a systematic review*. *Proteomics Clin Appl*, 2020. 14: p. 1900039.
104. Bulthuis M.S., Jager D.H.J., and Brand H.S., *Relationship among perceived stress, xerostomia, and salivary flow rate in patients visiting a saliva clinic*. *Clin Oral Investig*, 2018. 22: p. 3121-3127.
105. Navazesh M., *Methods for collecting saliva*. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 694: p. 72-7.
106. Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., et al., *Guidelines for saliva nomenclature and collection*. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 694: p. XI+ XII+.
107. O'Neal C.L., Crouch D.J., Rollins D.E., and Fatah A.A., *The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations*. *J Anal Toxicol*, 2000. 24: p. 536-42.
108. *Fachinformation Elvanse 20 mg/30 mg/40 mg/50 mg/60 mg/70 mg Hartkapseln*. Dublin, Ireland: Shire Pharmaceuticals Ireland Limited; 2019.
109. Kloosterboer S.M., de Winter B.C., Bahmany S., Al-Hassany L., Dekker A., Dieleman G.C., et al., *Dried blood spot analysis for therapeutic drug monitoring of antipsychotics: drawbacks of its clinical application*. *Ther Drug Monit*, 2018. 40: p. 344-350.
110. Böttcher M., Kühne D., and Beck O., *Compliance testing of patients in ADHD treatment with lisdexamfetamine (Elvanse®) using oral fluid as specimen*. *Clin Mass Spectrom*, 2019. 14: p. 99-105.
111. Wokkittel C., Scherf-Clavel O., Fekete S., Romanos M., Högger P., and Gerlach M., *Determination of guanfacine in oral fluid and serum of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: a Short communication*. *Ther Drug Monit*, 2022. 44: p. 340-344.
112. Hutchinson L., Sinclair M., Reid B., Burnett K., and Callan B., *A descriptive systematic review of salivary therapeutic drug monitoring in neonates and infants*. *Br J Clin Pharmacol*, 2018. 84: p. 1089-1108.
113. Waddell W.J. and Butler T.C., *The distribution and excretion of phenobarbital*. *J Clin Invest*, 1957. 36: p. 1217-26.
114. *Handhabungshinweis Salivette® Cortisol*. Nümbrecht, Deutschland: Sarstedt AG & Co. KG.
115. Comiran E., Barreto F., Meneghini L.Z., Carlos G., Froehlich P.E., and Limberger R.P., *Method validation and determination of lisdexamfetamine and amphetamine in oral fluid, plasma and urine by LC-MS/MS*. *Biomed Chromatogr*, 2017. 31.
116. Concheiro M., de Castro A., Quintela Ó., Cruz A., and López-Rivadulla M., *Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem*, 2008. 391: p. 2329-2338.

117. Herbrink M., Thijssen B., Hillebrand M.J.X., Rosing H., Schellens J.H.M., Nuijen B., et al., *Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of dexamphetamine in human plasma*. J Pharm Biomed Anal, 2018. 148: p. 259-264.
118. Biederman J., Boellner S.W., Childress A., Lopez F.A., Krishnan S., and Zhang Y., *Lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts extended-release in children with ADHD: a double-blind, placebo-controlled, crossover analog classroom study*. Biol Psychiatry, 2007. 62: p. 970-976.
119. *Fachinformation Attentin® 5 mg Tablette*. Iserlohn, Germany: MEDICE Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG; 2018.
120. Farrell B.M. and Jefferies T.M., *An investigation of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of amphetamines*. J Chromatogr, 1983. 272: p. 111-28.
121. Ebstein I. and Van Meter C.T., *Some ultraviolet absorption characteristics of amphetamine*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, 1952. 41: p. 372-4.
122. Legua C.M., Falcó P.C., and Cabeza A.S., *Extractive-spectrophotometric determination of amphetamine in urine samples with sodium 1, 2-naphthoquinone 4-sulphonate*. Anal Chim Acta, 1993. 283: p. 635-644.
123. Endo M., Imamichi H., Moriyasu M., and Hashimoto Y., *Microdetermination of stimulant drugs in urine by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 1980. 196: p. 334.
124. Al-Dirbashi O., Kuroda N., Akiyama S., and Nakashima K., *High-performance liquid chromatography of methamphetamine and its related compounds in human urine following derivatization with fluorescein isothiocyanate*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997. 695: p. 251-258.
125. Noggle Jr F.T., DeRuiter J., and Clark C.R., *Methods for the analysis and characterization of forensic samples containing amphetamines and related amines*. J Chromatogr Sci, 1990. 28: p. 529-536.
126. Nakashima K., Yamasaki H., Kuroda N., and Akiyama S., *Evaluation of lophine derivatives as chemiluminogens by a flow-injection method*. Anal Chim Acta, 1995. 303: p. 103-107.
127. Al-Dirbashi O., Qvarnstrom J., Irgum K., and Nakashima K., *Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of methamphetamines in human urine as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new fluorescence derivatization reagent*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. 712: p. 105-12.
128. Zhu H.J., Wang J.S., Patrick K.S., Donovan J.L., DeVane C.L., and Markowitz J.S., *A novel HPLC fluorescence method for the quantification of methylphenidate in human plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 858: p. 91-5.
129. Zhu H.J., Wang J.S., Donovan J.L., DeVane C.L., Gibson B.B., and Markowitz J.S., *Sensitive quantification of atomoxetine in human plasma by HPLC with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl) benzoyl chloride derivatization*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 846: p. 351-4.
130. Soldin S.J., Chan Y.P., Hill B.M., and Swanson J.M., *Liquid-chromatographic analysis for methylphenidate (Ritalin) in serum*. Clin Chem, 1979. 25: p. 401-4.
131. *Guidance for industry, bioanalytical methods validation*. 2018. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf> [accessed: March 29, 2019]. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
132. Peters F., Paul L., Musshoff F., Aebi B., Auwaerter V., Kraemer T., et al., *Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen - Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden*. Toxichem Krimtech, 2009. 76: p. 185-208.
133. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., and Chavez-Eng C.M., *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal Chem, 2003. 75: p. 3019-30.
134. Goparaju S.M., Nandula Y.S.M., Kothapalli C.B., Challa B., and Awen B.Z., *Method development and validation of guanfacine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study*. J Pharm Anal, 2013. 3: p. 472-480.
135. Li Y., Henion J., Abbott R., and Wang P., *Dried blood spots as a sampling technique for the quantitative determination of guanfacine in clinical studies*. Bioanalysis, 2011. 3: p. 2501-14.
136. Li Y., Henion J., Abbott R., and Wang P., *The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012. 26: p. 1208-12.
137. Wolf C.E., Kester-Florin S.J., and Poklis A., *A HPLC-MS method to detect and quantify guanfacine in urine*. Clin Chem Lab Med, 2012. 50.

138. Swearingen D., Pennick M., Shojaei A., Lyne A., and Fiske K., *A phase I, randomized, open-label, crossover study of the single-dose pharmacokinetic properties of guanfacine extended-release 1-, 2-, and 4-mg tablets in healthy adults*. Clin Ther, 2007. 29: p. 617-625.
139. Coplen T.B., *Compilation of minimum and maximum isotope ratios of selected elements in naturally occurring terrestrial materials and reagents*. 2002: US Department of the Interior, US Geological Survey.
140. Adaway J.E. and Keevil B.G., *Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. 883: p. 33-49.
141. van den Ouweland J.M. and Kema I.P., *The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. 883: p. 18-32.
142. Paul L., Musshoff F., Aebi B., Auwärter V., Krämer T., Peters F., et al., *Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen*. Toxichem Krimtech, 2009. 76: p. 142-176.
143. Fang N., Yu S., Ronis M.J., and Badger T.M., *Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. 240: p. 488-97.
144. Hall T.G., Smukste I., Bresciano K.R., Wang Y., McKearn D., and Savage R.E., *Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development*, in *Tandem mass spectrometry-applications and principles*. 2012: IntechOpen. p. 407-439.
145. Cohen J., *Statistical power analysis for the behavioural sciences*. Second ed. 1988: Routledge.