

**Quantifizierung von Aminosäuren in
Infusionslösungen mittels
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-
(Tandem) - Massenspektrometrie
(HPLC-[MS/]MS)**

Methodenentwicklung und Validierung

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Claudia Freitag
aus Bamberg

Würzburg 2011

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier

am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt

„Niemaß aufgeben! Immer weitermachen! Immer weiter! Immer weiter!“

Oliver Kahn

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von September 2005 bis Mai 2009 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen, das mir ein sehr selbständiges Arbeiten ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Herren Dr. Volker Krüger und Dr. Christian Herb von der Firma B. Braun Melsungen AG für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Aminosäuren-Projekts und die fortdauernde, bereitwillige Unterstützung bedanken, vor allem im Hinblick auf meine praktischen Arbeiten im Labor in Melsungen. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Herb, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und sich stets Zeit für fachliche Diskussionen genommen hat.

Bei Andreas Menzel, Christine Deist, Elena Kindsvater, Rolf Hartmann, Stefan Heimbuch und Tanja Dohle bedanke ich mich ganz herzlich für die liebe Aufnahme ins Laborteam in Melsungen und für ihre Hilfsbereitschaft. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Rolf Hartmann, der mich mit der LC/MS-Anlage vertraut gemacht hat und bei technischen Schwierigkeiten stets zur Stelle war. Liebe „Braunies“, danke für eure Hilfe im Labor und das gute Arbeitsklima, durch das die Fränkin sich im „fernen Hessen“ schnell heimisch gefühlt hat.

Bastian Knaup danke ich für die schöne, prägende Zeit, die wir Seite an Seite in unserem gemeinsamen „Benimm“-Büro verbracht haben und die meine Promotionszeit zu einer ganz besonderen hat werden lassen. Danke für unsere Freundschaft, Bast!

Danksagung

Dem Arbeitskreis Schreier danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht hierbei an Wolfgang Hümmer für seine Hilfe bei allen Problemen an unserer geliebten LC-MS/MS-Anlage. Bei Anett Oehme, Ebru Ates und Sanja Locher möchte ich mich für unsere gemeinsame „Endphase“ und die schöne Zeit, die wir zusammen in unserer kleinen, feinen Keller-WG verbracht haben, bedanken.

Alexander Breuning danke ich für die Hilfe bei der Synthese des isotonenmarkierten Standards und für die Klärung so manches Rätsels aus dem Bereich der organischen Chemie.

Großer Dank gilt Dr. Bernd Reyer für den IT-Service, da ohne seine Hard- und Software-Unterstützung das Weiterarbeiten oft nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonderer Dank geht an „Herrn“ Fritz von der Warth vom technischen Betrieb der Universität Würzburg mit seinen Jungs Andi Tropschuh, Pierre Schmitt und Thomas Scheiner für ihre stete technische, seelisch-moralische und vor allem kulinarische Unterstützung in unserer gemeinsamen „Kellerzeit“.

Meinen Kommilitonen des Lebensmittelchemiestudiums danke ich für die schöne zweite Studienzeit und die entstandenen Freundschaften.

Großer Dank geht an meine „Mädels“, weil Freunde einfach wichtig sind und unsere Freundschaft etwas ganz Besonderes ist.

Danke an Benny. Für alles.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre Liebe, ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre bedingungslose Unterstützung danken, ohne die ich nie so weit gekommen wäre!

Erläuterungen

- Alle Aminosäuren werden in der vorliegenden Arbeit durchgehend mit dem Dreibuchstabencode benannt. Die als interne Standards verwendeten, stabilisotopenmarkierten Aminosäuren werden unter Voranstellung der Abkürzung ihrer Isotopenmarkierung ebenfalls mit dem Dreibuchstabencode der entsprechenden Aminosäure benannt. Zur besseren Lesbarkeit werden auch für nicht-proteinogene Aminosäuren und andere weitere Analysesubstanzen die gebräuchlichen Abkürzungen verwendet. Alle verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis zusammengefasst.
- Dezimalzahlen werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit in vorliegender Arbeit mit Punkten anstatt der im Deutschen üblichen Kommata dargestellt.
- Die im Abschnitt C aufgeführte Strukturmatrix gibt einen strukturellen Überblick über die verwendeten Substanzen.
- Die abgebildeten Chromatogramme und Spektren wurden unter Verwendung der originalen Rohdaten erstellt.
- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz [®] bzw. [™] versehen.

Abkürzungen

(Cys) ₂	Cystin
[M+H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
[M+H] ⁺	protoniertes Molekülion, Precursorion
°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μmol	mikromol
¹³ C	Kohlenstoff-Isotop
¹³ C ₂ -Lys	DL-Lysin -1,2, ¹³ C ₂
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	L-Threonin- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁
¹³ C ₄ -Asn	L-Asparagin- ¹³ C ₄
¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	L-Isoleucin- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N
¹³ C ₆ -Arg	L-Arginin- ¹³ C ₆
¹³ C ₆ -His	L-Histidin- ¹³ C ₆
¹³ C ₆ -Tyr	L-Tyrosin- ¹³ C ₆ (Phenyl- ¹³ C ₆)
¹⁵ N	Stickstoff-Isotop
Å	Ångström
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
APCI	chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure chemical ionisation“),
AQC	6-Aminochinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat
Area	Peakfläche
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
b	Achsenabschnitt der Regressionsgeraden
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa

CID	kollisions-induzierte Dissoziation ("collision induced dissociation")
Cys	Cystein
D	Deuterium (Wasserstoff-Isotop, ^2H)
d.h.	das heißt
D ₂ -Cys	DL-Cystein-3,3-D ₂
D ₂ -Gly	Glycin-2,2-D ₂
D ₂ -NACys	N-Acetyl-DL-Cystein-3,3-D ₂
D ₃ -Ala	DL-Alanin-3,3,3-D ₃
D ₃ -Asp	L-Asparaginsäure-2,3,3-D ₃
D ₃ -Leu	DL-Leucin-2,3,3-D ₃
D ₃ -Met	DL-Methionin-D ₃ (Methyl-D ₃)
D ₃ -Ser	DL-Serin-2,3,3-D ₃
D ₄ -(Cys) ₂	DL-Cystin-3,3,3,3,-D ₄
D ₅ -Glu	L-Glutaminsäure-2,3,3,4,4-D ₅
D ₅ -Phe	L-Phenylalanin-D ₅ (Phenyl-D ₅)
D ₅ -Trp	L-Tryptophan-D ₅ (Indol-D ₅)
D ₆ -Orn	L-Ornithin-3,3,4,4,5,5,-D ₆
D ₇ -Pro	DL-Prolin-2,3,3,4,4,5,5,-D ₇
D ₇ -Pyr	DL-Pyroglytaminsäure-D ₇
D ₈ -Val	DL-Valin-2,3,4,4,4,5,5,5-D ₈
DANS-Cl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid
E	Empfindlichkeit der quadratischen Regressionsfunktion
ed. bzw. eds.	Herausgeber ("editor" bzw. "editors")
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (" <i>et alii</i> ")
eV	Elektronenvolt
evtl.	eventuell
FA	Ameisensäure ("formic acid")
FM	Fließmittel
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Chlorid
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls

Abkürzungen

Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde bzw. Stunden
H ₂ O	Wasser bzw. Hydrat
HCl	Hydrochlorid bzw. Salzsäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie ("hydrophilic interaction liquid chromatography")
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ("high performance liquid chromatography")
I.D.	Innendurchmesser
IEC	Ionenaustauschchromatographie („ion exchange chromatography“)
IEP	isoelektrischer Punkt
Ile	Isoleucin
IP	Ionenpaar („ion pair“)
IS	interner Standard (isotopenmarkierte Referenz)
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie („liquid chromatography“)
Leu	Leucin
LOD	Nachweisgrenze („limit of detection")
LOQ	Bestimmungsgrenze („limit of quantitation“)
Lys	Lysin
m	Steigung der Ausgleichsgeraden bei der Regressionsanalyse
M	molar (mol/L)
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/L)

M_r	Molekulargewicht (g/mol)
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSO	Methioninsulfoxid
N	Anzahl der Messwerte
n	Parameter der quadratischen Kalibrierfunktion
n.b.	nicht bestimmt
NAcCys	N-Acetyl-Cystein
NAcTyr	N-Acetyl-Tyrosin
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NH ₄ FA	Ammoniumformiat
NMR	magnetische Kernresonanz („nuclear magnetic resonance“)
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
Orn	Ornithin
p.a.	pro analysis
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PITC	Phenylisothiocyanat
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s , Maß für die Stärke einer Säure
Pro	Prolin
Pyr	Pyroglutaminsäure
r	Korrelationskoeffizient (nach Pearson)
r^2	Bestimmtheitsmaß
RP	Umkehrphase ("reversed phase")
RSD	relative Standardabweichung ("relative standard deviation")
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standardabweichung ("standard deviation")
Ser	Serin
SIM	selektiver Aufnahmemodus der MS („selected ion monitoring“)

Abkürzungen

SRM	selektiver Aufnahmemodus der MS („selected reaction monitoring“)
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
s_y	Reststandardabweichung
Tau	Taurin
TDFHA	Tridecafluorheptansäure
Thr	Threonin
TIC	Totalionenchromatogramm ("total ion chromatogram")
t_R	Retentionszeit
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u	atomare Masseneinheit ("unified atomic mass unit")
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegen)
V_{x0}	relative Verfahrensstandardabweichung
WF	Wiederfindung bzw. Wiederfindungsrate
x_i	Konzentrationswert
XIC	extrahiertes Ionenchromatogramm („extracted ion chromatogram“)
x_m	Mittelwert
y_i	Messwert
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	XI
EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
A. KENNTNISSTAND	5
1 AMINOSÄUREN	7
1.1 EINTEILUNG UND PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN.....	7
1.2 AMINOSÄUREN IN INFUSIONSLÖSUNGEN	12
2 FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE - MASSENSPEKTROMETRIE	14
2.1 GRUNDLAGEN DER LC-MS.....	14
2.2 ELEKTROSPRAY (ESI) - IONISIERUNG UND ESI-INTERFACE.....	15
2.3 QUADRUPOLE - MASSENANALYSATOR	17
2.4 MODI BEI VERWENDUNG EINES TANDEM-MASSENSPEKTROMETERS (TRIPLE-QUADRUPOLE-MS)	18
2.5 QUANTIFIZIERUNG MIT STABIL-ISOTOPENMARKIERTEN STANDARDS.....	21
3 ANALYTIK VON AMINOSÄUREN	22
3.1 BESTIMMUNG MITTELS IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE (IEC).....	23
3.1.1 Historische Entwicklung.....	23
3.1.2 Prinzip der Methode.....	24
3.2 BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN-DERIVATEN MITTELS HPLC.....	26
3.3 BESTIMMUNG VON UNDERIVATISIERTEN AMINOSÄUREN MITTELS HPLC-MS	28
3.3.1 HPLC-MS/MS-Analyse von Aminosäuren mittels Ionenpaar-Chromatographie.....	29
3.3.2 Bestimmung von Aminosäuren mittels HILIC-MS.....	33
4 HYDROPHILE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE (HILIC).....	34
4.1 GRUNDLAGEN UND PRINZIP DER HILIC	34
4.2 STATIONÄRE PHASEN	35
4.3 TRENNMECHANISMUS HILIC	36
4.4 BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS HILIC-MS	38
5 METHODENVALIDIERUNG	41
5.1 REGULARIEN UND BEGRIFFSBESTIMMUNG	41
5.2 VALIDIERUNGSPARAMETER.....	42
5.2.1 Nachweis und Bestimmungsgrenze.....	42
5.2.2 Präzision.....	43
5.2.3 Linearität.....	45
5.2.4 Arbeitsbereich	47
5.2.5 Richtigkeit.....	47
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
1 METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS IP-RP-HPLC-MS/MS	51
1.1 FRAGMENTIERUNGSTUDIEN	51
1.1.1 Fragmentierung der Aminosäuren	52
1.1.2 Fragmentierung der stabil-isotopenmarkierten Aminosäuren	59
1.1.3 Interferenzen innerhalb der Analyten.....	61
1.1.4 Fragmentierung weiterer Substanzen.....	65
1.2 IP-HPLC-MS/MS-METHODENENTWICKLUNG	66

1.2.1	Übertragung der HPLC-MS/MS-Methode.....	66
1.2.2	Übertragung der Methode auf die Infusionslösung unter Einbeziehung der IS.....	72
1.3	PROBLEMATIK DER IONENPAAR-HPLC-MS/MS-METHODE	74
1.3.1	Nicht reproduzierbare Retentionszeiten.....	74
1.3.2	Zeitaufwand durch Equilibrierung und Spülen.....	79
1.3.3	Verunreinigung der HPLC-MS-Anlage durch TDFHA.....	80
1.4	ZUSAMMENFASSUNG DER IP-RP-HPLC-MS-METHODE	82
2	METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS HILIC-HPLC-MS(MS)	83
2.1	ALLGEMEINE STUDIEN ZUR TRENNUNG VON AS MITTELS HILIC-HPLC-MS/MS UNTER ISOKRATISCHEN BEDINGUNGEN	83
2.1.1	Fließmittelzusammensetzung – Variation des Wasser-Anteils	84
2.1.2	Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die Trennung von AS.....	87
2.1.3	Zusammenfassung der Vorversuche unter isokratischen Bedingungen	90
2.2	TRENNUNG VON AS MITTELS HILIC-HPLC-MS/MS - GRADIENTENELUTION.....	92
2.3	HILIC-HPLC-MS - METHODENOPTIMIERUNG.....	93
2.3.1	Einfluss der Pufferkonzentration der mobilen Phase auf die Trennung der AS.....	94
2.3.2	Einfluss der Temperatur der stationären Phase.....	101
2.3.3	Einfluss des organischen Anteils in der mobilen Phase - Variation des Gradienten	107
2.4	ÜBERTRAGUNG DER OPTIMISIERTEN METHODE AUF DIE BEDINGUNGEN EINER INFUSIONSLÖSUNG	110
2.5	EINBEZIEHUNG WEITERER SUBSTANZEN	119
2.6	ZUSAMMENFASSUNG DER HILIC-METHODENENTWICKLUNG	120
3	VALIDIERUNG.....	121
3.1	BESTIMMUNG DER ARBEITSKONZENTRATION (100%-LEVEL).....	121
3.2	BESTIMMUNG DER LINEARITÄT	124
3.2.1	Lineare Regression 1. Ordnung	125
3.2.2	Lineare Regression 2. Ordnung (Quadratische Regression)	127
3.2.3	Überprüfung der Linearität.....	128
3.3	PROBLEMATIK DER VALIDIERUNG – EINFLUSS DER MATRIX.....	132
3.3.1	Bestimmung der Wiederfindung.....	133
3.3.2	Bestimmung der Wiederfindung bei höherer Verdünnung.....	135
3.4	VALIDIERUNG IN DER MATRIXLÖSUNG	140
3.4.1	Systempräzision.....	141
3.4.2	Methodenpräzision.....	142
3.4.3	Systemlinearität.....	145
3.4.4	Methodenlinearität.....	148
3.4.5	Richtigkeit	150
3.4.6	Bestimmungsbereich	155
3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER VALIDIERUNG DER HILIC-HPLC-MS-METHODE	156
C.	STRUKTURMATRIX.....	159
1	AMINOSÄUREN	161
2	WEITERE SUBSTANZEN.....	167
D.	MATERIAL UND METHODEN	169
1	METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS RP-HPLC-MS/MS	171
1.1	SUBSTANZEN, CHEMIKALIEN UND GERÄTE	171
1.1.1	Aminosäuren	171
1.1.2	Stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren.....	171
1.1.3	Weitere Substanzen zur Analyse.....	173
1.1.4	Probenlösung Infusionslösung.....	174

1.1.5	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-Cystein.....	175
1.1.6	Chemikalien.....	176
1.1.7	Geräte.....	176
1.2	FRAGMENTIERUNGSSTUDIEN.....	177
1.2.1	Prinzip.....	177
1.2.2	Durchführung.....	177
1.3	IP-HPLC-MS/MS-METHODENENTWICKLUNG.....	178
1.3.1	Optimierung der Methode von Piraud et al. (2005b).....	178
1.3.2	Untersuchungen mit der optimierten IP-RP-HPLC-MS/MS- Methode.....	181
2	METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS HYDROPHILER INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE (HILIC).....	183
2.1	SUBSTANZEN, CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....	183
2.1.1	Aminosäuren.....	183
2.1.2	Stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren.....	183
2.1.3	Substanzen zur Herstellung der Matrix-Lösung.....	184
2.1.4	Chemikalien.....	184
2.1.5	Geräte.....	185
2.2	ALLGEMEINE STUDIEN ZUR TRENNUNG VON AS MITTELS HILIC-HPLC-MS/MS UNTER ISOKRATISCHEN BEDINGUNGEN.....	186
2.2.1	Fließmittelzusammensetzung – Variation des Wasser-Anteils.....	186
2.2.2	Einfluss des pH-Werts.....	187
2.2.3	Zusammenfassung der isokratischen Vortest.....	188
2.3	TRENNUNG VON AS MITTELS HILIC-HPLC-MS/MS – GRADIENTENELUTION.....	188
2.4	HILIC-HPLC-MS-METHODENOPTIMIERUNG.....	189
2.4.1	Einfluss der Pufferkonzentration der mobilen Phase.....	189
2.4.2	Einfluss der Temperatur der stationären Phase.....	190
2.4.3	Einfluss des organischen Anteils in der mobilen Phase - Variation des Fließmittelgradienten.....	191
2.5	ÜBERTRAGUNG DER OPTIMIERTEN METHODE AUF DIE INFUSIONSLÖSUNGEN.....	192
2.5.1	Herstellung der Aminosäuren-Stammlösung („AS-Master-Mix“).....	192
2.5.2	Herstellung der IS-Stammlösung („IS-Master-Mix“).....	193
2.5.3	Herstellung der Untersuchungslösung („Standardlösung AS und IS“).....	195
2.5.4	Optimierte HPLC-MS-Methode.....	196
2.6	EINBEZIEHUNG WEITERER SUBSTANZEN.....	197
3	VALIDIERUNG DER ENTWICKELTEN METHODE.....	198
3.1	BESTIMMUNG DER ARBEITSKONZENTRATION (100%-LEVEL).....	198
3.2	BESTIMMUNG DER LINEARITÄT.....	199
3.2.1	Durchführung.....	199
3.2.2	Lineare Regression 1. Ordnung.....	200
3.2.3	Lineare Regression 2. Ordnung (Quadratische Regression).....	201
3.2.4	Überprüfung der Linearität.....	201
3.3	PROBLEMATIK DER VALIDIERUNG – EINFLUSS DER MATRIX.....	202
3.3.1	Methodenlinearität und Bestimmung der Wiederfindung (1:200-Verdünnung).....	202
3.3.2	Methodenlinearität und Bestimmung der Wiederfindung bei höherer Verdünnung (1:300-Verdünnung).....	203
3.3.3	Matrix-Lösung.....	203
3.4	VALIDIERUNG IN DER MATRIXLÖSUNG.....	204
3.4.1	Herstellung der Untersuchungslösung.....	204
3.4.2	Bestimmung der Validierungsparameter.....	205
	LITERATURVERZEICHNIS.....	207
	ANHANG.....	225

Zusammenfassung

Das Ziel vorliegender Arbeit war die Entwicklung einer HPLC-MS(/MS)-Methode, die im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle zur direkten Quantifizierung von Aminosäuren (AS) in Infusionslösungen angewendet werden kann. Die Zielsetzung schloss eine Validierung innerhalb der für die Zweckbestimmung vorgesehenen Grenzen ein.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde das ESI-MS/MS-Fragmentierungsmuster von 21 Aminosäuren, von 20 stabil-isotopenmarkierten Aminosäuren, die als interne Standards verwendet wurden, sowie von einigen weiteren Substanzen bestimmt. Nach Kenntnis von Precursor- und Produktionen erstellte man eine SRM-Methode zur spezifischen MS/MS-Analyse. Dabei wurden durch das jeweilige Fragmentierungsmuster bedingte Interferenzen bei den zu untersuchenden Aminosäuren bestimmt, die bei der zu erarbeitenden HPLC-MS-Methode beachtet werden mussten.

Die Methodenentwicklung zur HPLC-MS-Analytik von underivatisierten AS umfasste mit der RP-HPLC unter Verwendung eines Ionenpaarreagenzes (IP) und der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) zwei verschiedene chromatographische Ansätze. Bei der Anwendung der RP-HPLC ergaben sich Probleme. Die Verwendung eines IP, im vorliegenden Fall TDFHA (Tridecafluorheptansäure), führte zu langen Equilibrierungs-, Re-Equilibrierungs- und Spülzeiten und damit bei zwar relativ kurzer HPLC-Laufzeit zu einem aber insgesamt hohen Zeitaufwand. Gleichzeitig war die LC-MS-Anlage auf diese Anwendung fixiert, da das Ionenpaarreagenz das Gerät stark verschmutzte und dadurch andere Analysen erheblich störte. Zudem waren die Retentionszeiten der Analyten trotz langer Equilibrierungszeiten schlecht reproduzierbar, so dass eine solche Methode im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle schwer validierbar wäre. Weiterführende Untersuchungen erfolgten daher nicht.

In nachfolgenden Studien mit der HILIC wurden verschiedene Einflussparameter (Anteil organischer Phase im Fließmittel, pH-Wert des Fließmittels, Temperatur der Säule, Pufferkonzentration im Fließmittel, Gradientenelution) auf die Trennung der

AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule untersucht. Durch Optimierung der Parameter wurde so eine HILIC-HPLC-Methode entwickelt, bei der 21 AS und 20 ihrer isotopenmarkierten Referenz-AS innerhalb von 20 min eluierten. Diejenigen AS, bei denen im Rahmen der Fragmentierungsstudien Interferenzen aufgrund gleicher bzw. ähnlicher Massen der Precursor- bzw. Produktionen aufgetreten waren, wurden chromatographisch getrennt. Gleichzeitig hat sich die SIM-Analyse als anwendbar erwiesen. Die Anwendung des spezifischeren SRM-Modus und damit der Tandem-Massenspektrometrie war nicht erforderlich.

Im Rahmen der nachfolgenden Studien zur Validierung ergab sich, dass die entwickelte Methode über einen weiten Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentrations- und Messwerten zeigte. Für drei der 21 AS (*N*AcCys, *N*AcTyr, Pro) wurde die quadratische Regression mit dem Anpassungstest nach Mandel als geeigneteres Regressionsmodell ermittelt.

Bei Untersuchungen zur Wiederfindung wurde ein Einfluss der Matrix-Lösung der Infusionslösung festgestellt, der zu Abweichungen hinsichtlich des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ führte, so dass eine Quantifizierung innerhalb der geforderten Grenzen bei Kalibrierung über reine Standardlösungen nicht möglich war. Die Validierung wurde daher nachfolgend in der Matrixlösung durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass mit der entwickelten HILIC-HPLC-MS-Methode Aminosäuren in Infusionslösungen mit hoher Präzision und Richtigkeit bestimmt werden können. Neun der 21 untersuchten AS konnten im Bereich von 30% - 350%, zehn weitere im Bereich von 50% - 350% innerhalb der zur Gehaltsbestimmung von pharmazeutischen Formulierungen vorgeschriebenen Grenzen (Wiederfindung Einzelbestimmung: 98% - 102.0%, Mittelwert einer Dreifachbestimmung: 98.5% – 101.5%) quantifiziert werden. Für His und Phe gelang allerdings keine Quantifizierung innerhalb der Akzeptanzkriterien, wobei der Grund hierfür in weiteren Studien geklärt werden müsste.

Mit der entwickelten Methode ist damit eine gleichzeitige Quantifizierung verschiedener AS-Infusionslösungsformulierungen möglich, die sich bei gleicher Matrix in der Konzentration an AS unterscheiden. Beispielsweise seien hier die Formulierungen „Aminoplasma[®] E 5% / 10% / 15%“ genannt, die mit der validierten Methode erfassbar sind. Die Probenvorbereitung beschränkt sich dabei auf den Zusatz der IS-Formulierung zur Infusionslösung und einen Verdünnungsschritt. Die Quantifizierung erfolgt über eine 5-Punkt-Kalibriergerade, die aus einer AS- und IS-Standardmischung, nach Zusatz der einfach herzustellenden Elektrolyt-Matrix, erstellt wird. Die Analysenzeit der HPLC-MS-Methode beträgt einschließlich Equilibrierungszeit 35 min und ist damit deutlich kürzer als die 120 min, die bei der nach wie vor zur AS-Analytik allgemein gebräuchlichen Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung anzusetzen sind.

Summary

The aim of this study was to develop an HPLC-MS(/MS) method to be used within pharmaceutical quality control for the direct quantitation of amino acids (AS) in infusion solutions. The validation within the limits of the intended purpose was part of the objective.

In the course of the method development the ESI-MS/MS fragmentation pattern of 21 amino acids, 20 stable isotope labelled amino acids, which were used as internal standards, and some further substances were determined. By knowing precursor- and product ions a SRM-method for specific MS/MS analysis was created. Interferences due to the respective fragmentation pattern within the analytes were detected, which had to be considered during the following HPLC-MS method development.

The HPLC-MS method development for the analysis of underivatized AS comprised two different approaches: the RP-HPLC using an ion-pair reagent (IP) and the hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Problems occurred using the RP-HPLC. Due to the IP, in this study TDFHA (tridecafluoroheptanoic acid), long equilibration-, re-equilibration and rinsing-times were necessary so that this method is very time consuming despite short HPLC run times. Because of the contamination with TDFHA the use of the LC-MS system was limited. Furthermore, despite long equilibration times, retention times of the analytes were poorly reproducible. A validation of the method within the requirements of the pharmaceutical quality control would be therefore hardly to perform. Thus, further studies were not carried out.

The following studies were focused on HILIC. Different parameters (percentage of organic solvent in the eluent, pH of the eluent, column temperature, buffer concentration in the eluent, gradient elution) were checked concerning their effects on the separation of AS on a ZIC[®]-HILIC column. By optimizing the parameters, a HILIC-HPLC method was developed, by which 21 AS and 20 of their stable labelled isotopes were eluted within 20 min. All AS, which interfered with other AS due to their fragmentation pattern, were chromatographically separated. Moreover, the SIM mode was found to be suitable for the separation of AS, thus avoiding SRM mode and tandem mass spectrometry.

During the validation studies the HILIC-HPLC-MS method showed linear relation between AS-concentration and measured value over a wide range. Linearity was tested with the Mandel test revealing better fit by quadratic regression for three of 21 AS (*N*AcCys, *N*AcTyr and Pro).

Recovery studies showed an influence of the matrix of the infusion solution, which led to deviations in the quotients $\text{area}_{\text{AS}} / \text{area}_{\text{IS}}$. As a result, quantitation by calibration with pure AS standard solutions was not possible within the given limits. Thus, validation was performed with matrix solution.

Thereby it was shown that with the developed HPLC-MS method AS could be determined in infusion solutions with high precision and accuracy. Nine of 21 AS were quantified in the range of 30%-350%, ten AS in the range of 50%-350% within the given requirements of pharmaceutical quality control (individual recovery value: 98% -102.0%, mean recovery value (threefold determination): 98.5% – 101.5%). His and Phe could not be quantified within the acceptance criteria; the reason for this would have to be found out in further studies.

With the developed method the simultaneous quantitation of different AS infusion solutions, which differ in analytes concentrations with constant matrix concentration, can be realized. For instance, the formulations „Aminoplasma[®] E 5% / 10% /15%“ can be mentioned, which could be determined by using the validated method. Sample preparation is fast and simple, consisting in addition of IS-formulation to the infusion solution and a single dilution step. Quantitation is performed by external standard calibration; the 5-point-regression-line is made by analyzing AS- and IS-standard solution after adding the electrolyte matrix solution, which is easily to produce. HPLC-MS analysis time is 35 min (including equilibration time), thus considerably shorter than the approximately 120 min required with the still common AS analytical method (ion exchange chromatography with postcolumn ninhydrin derivatization).

Einleitung und Zielsetzung

Die Analytik von Aminosäuren (AS) nimmt aufgrund der vielfältigen Bedeutung der Aminosäuren eine besondere Stellung ein.

Als Bausteine von Peptiden und Proteinen kann nach Hydrolyse anhand der Bestimmung von AS deren quantitative Zusammensetzung ermittelt sowie nach entsprechendem Abbau auch die Primärstruktur des Proteins bestimmt werden, was u.a. in der Bioanalytik von Bedeutung ist. Die Untersuchung der freien AS in physiologischen Flüssigkeiten spielt in der klinischen Diagnostik eine Rolle, wobei Stoffwechselprozesse verfolgt und (Stoffwechsel-) Krankheiten identifiziert werden können. Als Beispiel sei hier der Nachweis der Phenylketonurie oder der Ahornsirupkrankheit genannt. Auch im Bereich der Lebensmittelanalytik werden zur Beantwortung spezifischer Fragestellungen AS sowohl als Bestandteile der Proteinfraction als auch als freie AS untersucht. Nicht zuletzt ist die AS-Analytik in bestimmten Fällen auch im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle von enormer Wichtigkeit, wenn AS als Bestandteile bzw. Wirkstoffe von Arzneimitteln quantifiziert werden.

Aufgrund der verschiedenen Anwendungsgebiete mit den jeweiligen spezifischen Anforderungen an die Analysenmethode sind unzählige Verfahren zur Quantifizierung von AS publiziert. Als Standard gilt jedoch nach wie vor die von Moore und Stein in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts eingeführte und ständig verbesserte, automatisierte Ionenaustauschchromatographie (IEC) mit UV-Detektion nach Ninhydrinderivatisierung (Moore *et al.* 1958b). Weitere Analysenmethoden erfassen AS per HPLC, entweder mit Vor- oder Nachsäulenderivatisierung und UV- bzw. Fluoreszenz-Detektion. Auch GC- und CE-Methoden sind veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit war eine Methode zu entwickeln, mit der AS in Infusionslösungen mittels LC-MS(/MS) quantifiziert werden können. Dabei sollen gegenüber anderen, schon bekannten Methoden, insbesondere im Vergleich zur klassischen Ionenaustauschchromatographie, einige Vorteile erreicht werden. Die AS sollen direkt, d.h. ohne Derivatisierungsschritt (mit den damit verbundenen Schwierigkeiten

wie unvollständige Derivatisierung, instabile Reagenzien u.a.) bestimmt werden. Zudem soll die Analysenzeit, die in der IEC für eine vollständige Aminosäureuntersuchung üblicherweise mehr als 120 min beträgt, deutlich verringert werden, um damit einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen. Die Methode muss darüber hinaus zur Anwendung in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle geeignet sein. Dies bedingt eine sorgfältige Validierung unter Zugrundelegung der für pharmazeutische Prüfverfahren vorgegebenen Akzeptanzkriterien.

Nachfolgend werden nach einem Einblick in den aktuellen Kenntnisstand die Resultate der HPLC-MS-Methodenentwicklung sowie die Ergebnisse der Validierung der entwickelten Methode vorgestellt.

A. Kenntnisstand

1 Aminosäuren

1.1 Einteilung und physikalisch-chemische Eigenschaften

Aminosäuren (AS) sind organische Verbindungen, die mindestens eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe im Molekül enthalten. Alle 20 proteinogenen AS, also diejenigen AS, welche Bausteine der Proteine sind, sind α -Aminosäuren. Sie tragen Amino- und Carboxylgruppe am selben C-Atom, dem α -C-Atom, und unterscheiden sich durch ihre Seitengruppe (-R), die durch Struktur, Größe und elektrische Ladung die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen AS bestimmt (Löffler 2007).

Die Grundstruktur der α -Aminosäuren ist in Abbildung A 1-1 dargestellt. Eine Ausnahme bildet Prolin, welches eine zyklische Aminosäure darstellt.

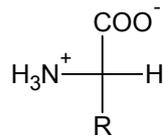


Abbildung A 1-1: Allgemeine Grundstruktur der α -Aminosäuren. Dargestellt ist die Betainstruktur, in der die AS am isoelektrischen Punkt vorliegen.

Die Strukturformeln der α -Aminosäuren sowie weiterer, in vorliegender Arbeit verwendeter Aminosäuren sind in der Strukturmatrix (Kapitel C 1) dargestellt.

Aufgrund der Seitenkette stellt das α -C-Atom bei allen AS mit Ausnahme von Glycin, das als Seitengruppe lediglich ein H-Atom trägt, ein chirales Zentrum dar, so dass zwei Enantiomere existieren.

Für AS ist das D- und L-System nach Fischer zur Bestimmung der Konfiguration gebräuchlich (vgl. Abbildung A 1-2).

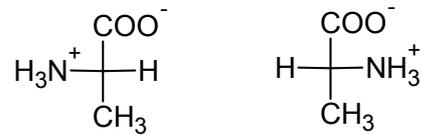


Abbildung A 1-2: Stereoisomerie bei α -Aminosäuren am Beispiel von Alanin. Dargestellt sind L-Alanin (links) und D-Alanin (rechts) in der Fischer-Projektion.

Alle proteinogenen sowie die meisten anderen natürlichen AS sind L-Isomere. D-Isomere existieren nur in wenigen Biomolekülen wie z.B. in Peptiden von Bakterien oder entstehen bei der nicht stereoselektiven chemischen Synthese. Bezogen auf die absolute Konfiguration nach Cahn-Ingold-Prelog sind alle proteinogenen AS am α -C-Atom (S)-konfiguriert, lediglich Cystein besitzt aufgrund der höheren Priorität seiner Thiolgruppe die (R)-Konfiguration.

Bezeichnet werden die Aminosäuren üblicherweise mit ihren Trivialnamen, die oft von ihrem „Fundort“ (z.B. Asparagin nach erster Isolation aus Spargel, lat. *Asparagus officinalis*) oder aus ihren Eigenschaften (z.B. Glycin aufgrund seines süßen Geschmacks von gr. *glykos*: süß) abgeleitet wurden. Für die 20 proteinogenen AS hat sich die Verwendung des Drei-Buchstaben-Codes als Abkürzung bewährt. Daneben existiert auch der Ein-Buchstaben-Code, der vor allem bei der Darstellung von AS-Sequenzen gebräuchlich ist (Jakubke und Jeschkeit 1982).

Die unterschiedlichen Seitenketten der AS bestimmen wie erwähnt deren Eigenschaften, so dass AS auch anhand ihrer Seitenketten klassifiziert werden können. Unpolare (hydrophobe) aliphatische Seitenketten finden sich bei Glycin, Alanin, Prolin, Valin, Leucin und Isoleucin. Auch die schwefelhaltige AS Methionin wird aufgrund der Thioether-Funktion der Seitenkette dieser Gruppe zugerechnet. Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sind mit ihren aromatischen Seitenketten ebenfalls relativ unpolare, wobei Tyrosin und Tryptophan durch ihre Hydroxylgruppe bzw. das Stickstoffatom im Indolring wesentlich polarer sind als Phenylalanin. Polare ungeladene Seitenketten tragen aufgrund ihrer Hydroxyl-, Thiol- bzw. Amidfunktion die AS

Serin, Threonin, Cystein, Asparagin und Glutamin. Hydrophil sind die geladenen Seitenketten, welche bei den sauren AS Asparaginsäure und Glutaminsäure (negativ geladen) sowie bei den basischen AS Arginin, Histidin und Lysin (positiv geladen) vorhanden sind (Nelson und Cox 2009).

Bei der Beschreibung von AS als „unpolar“ ist zu beachten, dass es sich dabei nur um eine Einteilung hinsichtlich der Polarität innerhalb der Gruppe der AS handelt. Grundsätzlich sind AS sehr polare Moleküle, was im Hinblick auf die Analytik von Bedeutung ist.

Eine weitere Einteilung der AS ergibt sich aus der Fähigkeit des menschlichen Körpers, AS biosynthetisch herzustellen. Sogenannte „essentielle“ AS kann der Körper nicht selbst synthetisieren, sie müssen mit der Nahrung zugeführt werden. Acht der proteinogenen AS gelten übereinstimmend als essentiell (Leu, Ile, Thr, Val, Lys, Phe, Trp und Met). Ob His, welches für Säuglinge mit Sicherheit als essentiell anzusehen ist, dies auch für Erwachsene ist, bleibt umstritten. Als „bedingt-essentiell“ gelten weitere AS, die bei ungenügendem Angebot durch die Nahrung aus anderen AS synthetisiert werden können (z.B. Tyr aus Phe). Allerdings können diese bei veränderten Stoffwechselbedingungen sowie in Wachstumsphasen essentiellen Charakter annehmen. Für Säuglinge und Kleinkinder sind daher strenggenommen nur die AS Ala, Asp, Glu und Ser nicht essentiell (Löffler 2007).

In Tabelle A 1-1 sind die Abkürzungen, die Eigenschaften der Seitenkette und die Essentiellität der 20 proteinogenen AS zusammengefasst.

Tabelle A 1-1: Drei- und Ein-Buchstabencode, Eigenschaften der Seitenkette und Essentiellität der 20 proteinogenen AS.

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code	Eigenschaft Seitenkette	essentiell
Alanin	Ala	A	unpolar ungeladen	nein
Arginin	Arg	R	positiv geladen	bedingt
Asparagin	Asn	N	polar ungeladen	bedingt
Asparaginsäure	Asp	D	negativ geladen	nein
Cystein	Cys	C	polar ungeladen	bedingt
Glutamin	Gln	P	polar ungeladen	bedingt
Glutaminsäure	Glu	E	negativ geladen	nein
Glycin	Gly	G	unpolar ungeladen	bedingt
Histidin	His	H	positiv geladen	ja/nein ¹
Isoleucin	Ile	I	unpolar ungeladen	ja
Leucin	Leu	L	unpolar ungeladen	ja
Lysin	Lys	K	positiv geladen	ja
Methionin	Met	M	unpolar ungeladen	ja
Phenylalanin	Phe	F	aromatisch	ja
Prolin	Pro	P	unpolar ungeladen	bedingt
Serin	Ser	S	polar ungeladen	nein
Threonin	Thr	T	polar ungeladen	ja
Tryptophan	Trp	W	aromatisch	ja
Tyrosin	Tyr	Y	aromatisch	bedingt
Valin	Val	V	unpolar	ja

¹: Für His ist noch umstritten, ob es zu den essentiellen AS zu zählen ist.

Neben den 20 proteinogenen Standard-AS wurden in unterschiedlichen Geweben ca. 300 weitere AS nachgewiesen, die bestimmte Funktionen erfüllen, allerdings nicht alle Bestandteile von Proteinen sind. Beispielhaft für seltenere AS seien an dieser Stelle die durch nachträgliche Modifikation von Standard-AS entstandenen AS 4-Hydroxyprolin (Bestandteil des Kollagens) und 6-*N*-Methyllysin (Bestandteil von Myosin) genannt; weiter sind die Zwischenprodukte im Harnstoffzyklus Ornithin und Citrullin zu nennen (Nelson und Cox 2009).

Für die Analytik von AS spielen ferner die pKs-Werte und die damit verbundenen isoelektrischen Punkte eine wichtige Rolle. Für massenspektrometrische Untersuchungen ist zudem die Kenntnis der molaren Masse der Substanzen von Bedeutung.

Eine Übersicht über die relativen molaren Massen, die pKs-Werte sowie die isoelektrischen Punkte (IEPs) wichtiger AS, für die in vorliegender Arbeit eine Methode zur Quantifizierung mittels HPLC-ESI-MS-Analytik entwickelt werden soll, ist in Tabelle A 1-2 dargestellt.

Tabelle A 1-2: Übersicht über die relative molare Masse, die pKs-Werte sowie isoelektrischen Punkte (IEPs) wichtiger AS nach Lehninger Biochemie (Nelson und Cox 2009). Die Werte für Orn sowie die acetylierten AS wurden anderen Quellen entnommen (Blaschek und Reuß 1999; SciFinderScholar 2007).

AS	molare Masse [g/mol]	pKs α -COOH	pKs α -NH ₃	pKs Seitengruppe	IEP
NAcCys	163.19	3.25	-0.91		
NAcTyr	223.23	3.15	-0.83		
Ala	89.09	2.34	9.69		6.02
Arg	174.20	2.17	9.04	12.48 (Guanidin)	11.50
Asn	132.12	2.02	8.80		5.41
Asp	133.10	1.88	9.60	3.65 (β -COOH)	2.77
Cys	121.15	1.96	10.28	8.18 (-SH)	5.02
Glu	147.13	2.19	9.67	4.25 (γ -COOH)	3.22
Gly	75.07	2.34	9.6		5.97
His	155.16	1.82	9.17	6.00 (Imidazol)	7.50
Ile	131.17	2.36	9.68		5.94
Leu	131.17	2.36	9.60		5.98
Lys	146.19	2.18	8.95	10.53 (ϵ -NH ₂)	9.59
Met	149.21	2.28	9.21		5.74
Orn	132.16	1.94	8.65	10.76 (δ -NH ₂)	
Phe	165.19	1.83	9.13		5.48
Pro	115.13	1.99	10.96		6.30
Ser	105.09	2.21	9.15		5.68
Thr	119.12	2.15	9.62		5.64
Trp	204.23	2.38	9.39		5.88
Tyr	181.19	2.20	9.11	10.07 (-OH)	5.65
Val	117.15	2.32	9.62		5.96

1.2 Aminosäuren in Infusionslösungen

Bestimmte Krankheiten bzw. Zustände erlauben es nicht, dass ein Patient oral bzw. enteral ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden kann. Dann ist die parenterale Ernährung, also die Versorgung mit Nährstoffen unter Umgehung des Verdauungstrakts, indiziert. Dazu werden die Nährstoffe periphervenös oder zentralvenös verabreicht, wobei als Substrate neben Aminosäuren Kohlehydrate (Glucose), Lipide in Fettemulsionen sowie Mikronährstoffe (Elektrolyte, Vitamine und Spurenelemente) verwendet werden (Stein 2003).

Werden nur Teile des Nährstoffbedarfs intravenös zugeführt, spricht man von partieller parenteraler Ernährung, während bei totaler parenteraler Ernährung (TPE) der gesamte Nährstoffbedarf gedeckt wird. Indiziert ist die TPE bei schwerkranken Patienten auf der Intensivstation nach 5-10 Tagen ohne adäquate perorale bzw. enterale Ernährung sowie bei Patienten mit aufgrund starker Resektionen praktisch fehlendem Magen-Darm-Trakt.

AS sind zur Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Stickstoffhomöostase essentieller Bestandteil der TEP. Aus Gründen der Arzneimittelsicherheit werden sogenannte „All-in-One“ (AIO) – Lösungen bevorzugt, die als Gesamtnährlösungen alle Nährstoffe (Fett, Kohlehydrate, AS und Mikronährstoffe) enthalten. Daneben gibt es auch Formulierungen, die nur AS enthalten, die bei der getrennten Infusion der Nährstoffe bzw. bei bestimmten Indikationen verabreicht werden. Man unterscheidet hierbei Standardaminosäurelösungen und spezifisch adaptierte AS-Lösungen, die bei Kontraindikation der Standardaminosäurelösungen wie Stoffwechselstörungen der AS (Phenylketonurie, Ahornsirupkrankheit) sowie AS-Verwertungsstörungen (z.B. schwere Leberfunktionsstörungen) indiziert sind.

Generell bestehen die AS-Lösungen aus den essentiellen und nicht-essentiellen AS, wobei aufgrund technologischer Schwierigkeiten (geringe Löslichkeit von Tyr und Cys, geringe Stabilität von Gln) keine der kommerziell erhältlichen Infusionslösungen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung optimal formuliert sind. Neuerdings sind daher Formulierungen verfügbar, welche die problematischen AS in Form der besser

löslichen Dipeptide oder acetylierten AS enthalten (Imoberdorf *et al.* 2003; Stein *et al.* 2007).

Tabelle A 1-3 informiert über die Zusammensetzung einiger in Deutschland kommerziell erhältlicher, reiner AS-Infusionslösungen. Neben den AS können diese auch Elektrolyte enthalten (z.B. Aminoplasma[®] E).

Tabelle A 1-3: Zusammensetzung verschiedener, kommerziell erhältlicher AS-Infusionslösungen (RoteListe 2010). Unabhängig von evtl. verwendeten AS-Salze (Hydrate, Hydrochloride) sind in der Tabelle die Gehalte der reinen AS dargestellt. AP[®]: Aminoplasma[®], KH: Kohlehydrat, E: Elektrolyt.

AS	AP [®] 10% [g/L]	AP [®] E 5% und E 10% [g/L]	AP [®] 15%(E-) und KH-frei [g/L]	AP [®] Hepa 10% [g/L]
NAcCys	-	-	0.5	0.8
NAcTyr	-	-	-	0.86
Ala	10.5	5.25 / 10.5	22.35	8.3
Arg	11.5	5.75 / 11.5	16.05	8.8
Asn	-	-	-	0.48
Asp	5.6	2.8 / 5.6	7.95	2.5
Cys	-	-	-	-
Glu	7.2	3.6 / 7.2	16.2	5.7
Gly	12.0	6.0 / 12.0	19.2	6.3
His	3.0	1.5 / 3.0	5.25	4.7
Ile	5.0	2.5 / 5.0	5.85	8.8
Leu	8.9	4.45 / 8.9	11.4	13.6
Lys	6.85	3.43 / 6.85	7.95	7.51
Met	4.4	2.2 / 4.4	5.7	1.2
Orn	-	-	-	1.3
Phe	4.7	2.35 / 4.7	5.7	1.6
Pro	5.5	2.74 / 5.5	7.35	7.1
Ser	2.3	1.15 / 2.3	3.0	3.7
Thr	4.2	2.1 / 4.2	5.4	4.6
Trp	1.6	0.8 / 1.6	2.1	1.5
Tyr	0.4	0.4	0.5	-
Val	6.2	3.1 / 6.2	7.2	10.6

2 Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie

2.1 Grundlagen der LC-MS

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, bei welcher in einem geeigneten System, dem Massenspektrometer, aus einer Probe gasförmige Ionen erzeugt und diese nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis getrennt und detektiert werden. Man erhält schließlich ein Massenspektrum, in welchem das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) gegen die relative Intensität graphisch aufgetragen wird. Aus diesem können die Molekülmasse bestimmt sowie bei Einzelsubstanzen auch Rückschlüsse auf deren Struktur gezogen werden. Bei Substanzgemischen ist zudem die qualitative und quantitative Zusammensetzung bestimmbar. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in welcher aus der Probe ein Strahl gasförmiger Ionen gebildet wird, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis auftrennt und einem Detektor, der den Ionenstrom misst (Budzikiewicz und Schäfer 2005). Verschiedene Massenanalysatoren sind heutzutage in der Massenspektrometrie gebräuchlich, wobei nachfolgend (Kapitel A 2.3) nur auf den in vorliegender Arbeit verwendeten Quadrupol-Analysator näher eingegangen wird.

Die LC-MS-Analytik verbindet die flüssigchromatographische Trennung (LC bzw. HPLC) von polaren, nichtflüchtigen Verbindungen mit der massenspektrometrischen Detektion. Damit die LC-MS-Kopplung möglich wird, müssen die zu analysierenden Substanzen aus der flüssigen Phase in die Gasphase und das Hochvakuum überführt werden, wobei gleichzeitig das Lösungsmittel abgetrennt werden muss. Dazu sind verschiedene Kopplungssysteme, sogenannte „Interfaces“ entwickelt worden, die den Übergang der freien Ionen in den Massenanalysator ermöglichen. Die in der LC-MS am häufigsten eingesetzten Kopplungstechniken sind die Elektrospray-Ionisation (ESI) und die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI, „atmospheric pressure chemical ionisation“), wobei im Folgenden nur die in dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisierung näher erläutert wird.

2.2 Elektrospray (ESI) - Ionisierung und ESI-Interface

Bei der Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer müssen wie erwähnt die Analyten aus dem Eluenten als Ionen in die Gasphase überführt und ins Massenspektrometer zur Detektion geleitet werden. Dies geschieht im ESI-Interface. Abbildung A 2-1 zeigt schematisch den Aufbau einer LC-MS-Anlage mit Elektrospray-Interface und -Ionenquelle sowie einem Quadrupol-Massenanalysator.

Die mobile Phase der HPLC wird mit Hilfe eines Nebulizers im ESI-Interface zu einem Aerosol versprüht. Durch das Anlegen einer Hochspannung kommt es zur Ionisierung der Substanzen.

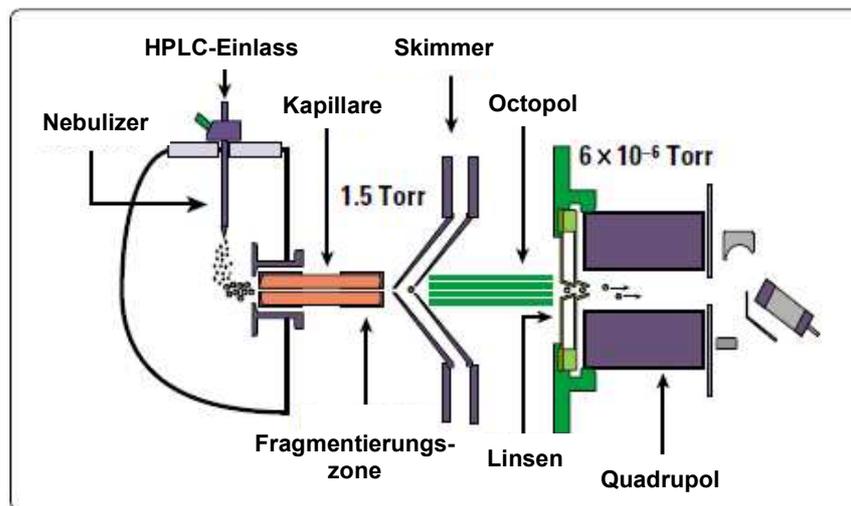


Abbildung A 2-1: Schematische Darstellung des Agilent LC-MSD-Systems mit Elektrospray-Ionenquelle. Graphik modifiziert nach Voyksner (2001).

Abbildung A 2-2 zeigt schematisch den makroskopischen (links) bzw. mikroskopischen (rechts) ESI-Prozess am Beispiel der positiven Ionisierung. Durch das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillare und Massenspektrometer werden die negativ geladenen Ionen an die Anode (Kapillare) gezogen und dort entladen, wohingegen die positiv geladenen Ionen an die Oberfläche der Flüssigkeit und weiter in Richtung Kathode gezogen werden. Es entsteht ein charakteristischer Flüssigkeitskonus („Taylor-Konus“), aus dessen Spitze bei ausreichend hohem elektrischen Feld ein

kontinuierlicher, filamentartiger Flüssigkeitsstrom emittiert wird. Dieser zerfällt in einiger Entfernung von der Anode in winzige Tröpfchen, deren Oberfläche mit positiven Ladungen angereichert ist. Aufgrund des Fehlens von negativen Gegenionen liegt eine positive Nettoladung vor.

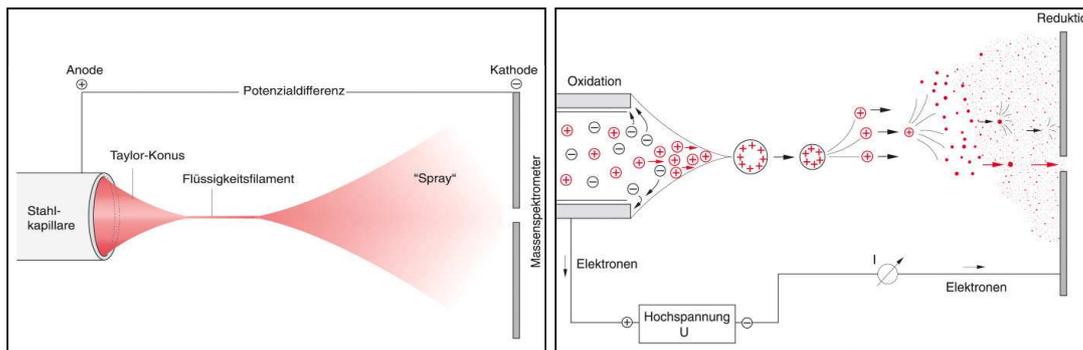


Abbildung A 2-2: Schematische Darstellung des makroskopischen (links) und mikroskopischen (rechts) ESI-Prozesses. Graphik modifiziert nach Lottspeich und Engels (2006).

Die gebildeten Tröpfchen befinden sich aufgrund des geringen Durchmessers (wenige Mikrometer) und der hohen Ladungsdichte nahe an der Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit). Durch weiteres Verdampfen des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen bei gleich bleibender Ladung, bis sie durch Abstoßung gleichnamiger Ladungen in viele kleine Tröpfchen von nur wenigen Nanometern Durchmesser zerfallen (Coulomb-Explosion). Für die anschließende Bildung der freien Gasphasenionen werden zwei Modelle diskutiert. Im älteren, dem sogenannten „charged residue“-Modell wird postuliert, dass nach einer Reihe von Coulomb-Explosionen sehr kleine Tröpfchen (~ 1 nm) gebildet werden, die nur noch aus einem Analyt bestehen. Aus diesem entstehen mittels Desolvatisierung durch Kollision mit Stickstoffmolekülen freie, gasförmige Ionen.

Demgegenüber steht als zweites Modell das Ionenemissionsmodell („ion evaporation model“), bei welchem von einer direkten Emission von Ionen aus hoch geladenen Tröpfchen ausgegangen wird. Die Ionenemission bleibt trotz Abnahme der Ladungen

durch kontinuierliche Verringerung des Tröpfchenradius aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels erhalten.

Der in Abbildung A 2-1 dargestellte Aufbau zeigt eine orthogonale Anordnung der Ionenquelle, die zu geringerer Belastung des Massenspektrometers mit Matrixbestandteilen führen soll (Voyksner 2001). Nach der Ionisation werden die Analytionen durch elektrostatische Anziehung orthogonal aus der Flussrichtung des Nebulizer-Sprays abgelenkt und in die (Transfer-) Kapillare geleitet, wohingegen Lösungsmittelreste in der Sprayrichtung weiterfließen und so nicht ins Massenspektrometer gelangen. Von der Kapillare erreichen die Ionen den Vorvakuumbereich und von dort den Octopol. Dabei werden an den Skimmer-Blenden weitere Lösungsmittelreste und sonstige Partikel abgeschieden. Über den Octopol gelangen die Analyten schließlich in das Hochvakuum des (Quadrupol)- Massenanalysators (Cech und Enke 2001; Lottspeich und Engels 2006; Kebarle und Verkerk 2010).

2.3 Quadrupol - Massenanalysator

In einem Quadrupol-Massenanalysator sind vier stabförmige Metallelektroden parallel angeordnet (Abbildung A 2-3). Gegenüberliegende Stäbe besitzen die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung. Durch den Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes durchlaufen Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses den Quadrupol auf einer stabil oszillierenden Bahn (in der Abbildung rot dargestellt), wohingegen Ionen mit anderen m/z -Verhältnissen auf instabilen Bahnen fliegen (in der Abbildung blau dargestellt) und an den Metallstäben entladen werden (Gross 2004; Lottspeich und Engels 2006).

Quadrupol-Massenanalysatoren sind die am weitesten verbreiteten Massenanalysatoren in der LC-MS-Analytik. Sie können bei einer Massengenauigkeit von ca. 0.1 u im Massenbereichen bis 4000 u betrieben werden, wobei sie am besten für Anwendungen bis 1000 u geeignet sind. Durch das Hintereinanderschalten mehrerer Quadrupole werden relativ einfach sogenannte Tandem-Massenspektrometer erhalten. Der zweite Quadrupol (Q_2) dient dabei als Kollisionszelle (Stoßkammer), in welcher

mit einem Stoßgas, meist Argon, die Fragmentierung der Ionen erfolgt. Mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometern sind verschiedene weitere Analysenmodi möglich. Zudem haben sie sich durch ihre hohe Selektivität und Empfindlichkeit in der quantitativen Analyse bewährt (Willoughby *et al.* 2002).

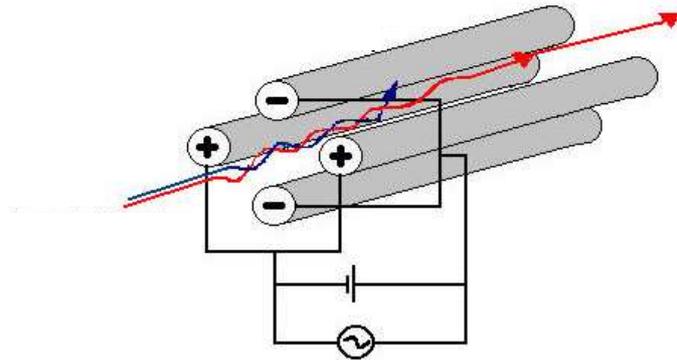


Abbildung A 2-3: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Analysators. Dargestellt sind die Flugbahnen der Ionen durch die vier Metallstäbe, an denen eine Gleich- und Wechselspannung anliegt. Rot dargestellt ist die Flugbahn des resonanten Ions, das den Detektor erreicht, wohingegen die blaue Spur die Flugbahn eines Ions beschreibt, das abgelenkt und an den Stäben des Quadrupols entladen wird. Graphik modifiziert nach Sonsmann (2001).

2.4 Modi bei Verwendung eines Tandem-Massenspektrometers (Triple-Quadrupol-MS)

Ein Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer verfügt über verschiedene Scan-Modi, mit deren Hilfe unterschiedliche analytische Informationen gewonnen werden können bzw. die sich für spezifische Anwendungen eignen (Hoffmann und Stroobant 2007).

Der **Fullscan-Modus** (auch Q_1 bzw. Q_3 -Modus) entspricht in seiner Funktionsweise einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer; die beiden anderen Quadrupole dienen allein der Fokussierung und Weiterleitung der gebildeten Ionen. Der gewählte Quadrupol wird so gesteuert, dass ihn in einem bestimmten Intervall alle Ionen eines

festgelegten m/z -Bereichs passieren. Mittels ESI-MS detektiert man die Molekülionen $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ bzw. spezifische Adduktionen wie z.B. $[M+Na]^+$ der zu analysierenden Substanzen.

Im **SIM-Modus** („selected ion monitoring“), der ebenfalls mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt werden kann, werden in Q_1 bzw. Q_3 ein Ion bzw. mehrere Ionen durch Einstellung der spezifischen m/z -Verhältnisse selektiert. Da dadurch die Messzeit pro Analyt erhöht wird, sind empfindlichere Messungen möglich.

Im **Produktionen-Scan** wird in Q_1 zunächst ein bestimmtes Ion, das sogenannte Precursorion, selektiert und in Q_2 mittels CID („collision induced dissociation“) fragmentiert. In Q_3 werden die entstandenen Produktionen detektiert. So kann das spezifische Fragmentierungsmuster einer Substanz bestimmt werden bzw. umgekehrt können anhand der erhaltenen Fragmentionen Rückschlüsse auf die Identität des untersuchten Analyts gezogen werden. In vorliegender Arbeit wurden mittels Produktionen-Scan das Fragmentierungsmuster der AS und der isotoopenmarkierten Referenzen bestimmt und das für die SRM-Analyse (s. S. 20) geeignete Produktion ermittelt.

Als Umkehrung des Produktionen-Scan kann der **Precursorionen-Scan**, auch Vorläuferanalyse genannt, angesehen werden. Dabei wird in Q_3 ein spezifisches m/z -Verhältnis eingestellt, während Q_1 einen bestimmten m/z -Bereich scannt. Registriert werden alle Massen, die nach Fragmentierung in Q_2 das gewünschte Fragmention liefern. In diesem Modus können u.a. Verbindungen mit gleichen Strukturelementen nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit stellt der **Neutralverlust-Scan** dar. Indem Q_1 und Q_3 so eingestellt werden, dass sie gleichzeitig eine bestimmte Massendifferenz scannen, wird die Abspaltung von Neutralteilchen bestimmt. Damit lassen sich strukturverwandte Substanzen detektieren, die ein gemeinsames Strukturmerkmal tragen. Für

die Untersuchung von α -AS ist eine Methode publiziert, bei der die Analyten im Neutralverlust-Scan (-46 u, entspricht -H₂O und -CO) mittels HILIC-MS/MS-Analytik quantifiziert werden (Langrock *et al.* 2006).

Den selektivsten und empfindlichsten Analysemodus stellt der **SRM-Modus** („selected reaction monitoring“) dar. In Q₁ wird ein definiertes m/z -Verhältnis selektiert; das daraus mittels CID gebildete Produktion wird in Q₃ detektiert. Abbildung A 2-4 zeigt ein Schema des Ablaufes einer HPLC-MS/MS-Analyse im SRM-Modus.

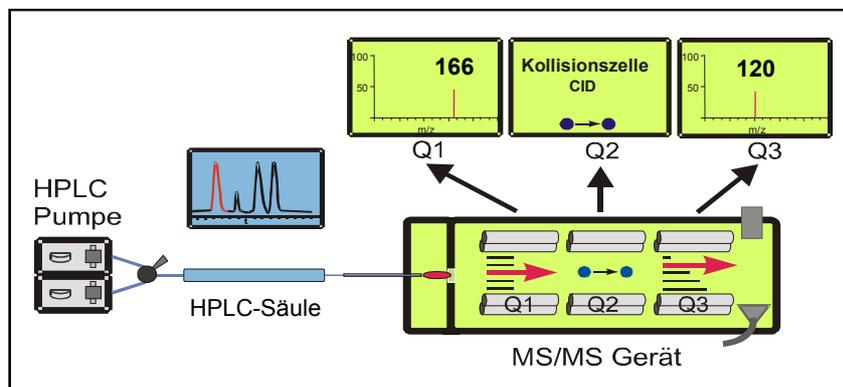


Abbildung A 2-4: Prinzipieller Ablauf einer HPLC-MS/MS-Analyse im SRM-Modus.

An der HPLC-Säule erfolgt die (Vor-)Trennung der Analyten. Im MS/MS-Gerät wird in Q₁ das Precursorion (hier am Beispiel von Phe, $[M+H]^+$ m/z 166) selektiert, in der Kollisionszelle (Q₂) mittels CID fragmentiert und in Q₃ das Produktion (hier $[M+H]^+$ m/z 120) detektiert. Durch die Unterdrückung von störendem Rauschen und die im Vergleich zu Fullscan- oder SIM-Modus erheblich gesteigerte Empfindlichkeit wird der SRM-Modus hauptsächlich zur Quantifizierung eingesetzt.

2.5 Quantifizierung mit stabil-isotopenmarkierten Standards

In vorliegender Arbeit erfolgte die Quantifizierung von AS mit stabil-isotopenmarkierten Referenzen als interne Standards.

Generell sollen durch den Einsatz von internen Standards in der LC-MS-Analytik Unterschiede in der Ionisierung, Verluste bei der Probenaufarbeitung sowie eventuell auftretende Matrixeffekte kompensiert werden. Idealerweise sollte der interne Standard dem Analyten hinsichtlich chemischer und physikalischer Eigenschaften möglichst gleich sein. Diese Anforderungen werden von einem isotopenmarkierten Analyt am besten erfüllt (Willoughby *et al.* 2002).

Die Quantifizierung mit isotopenmarkierten Standards findet als Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) eine breite Anwendung. Dabei wird der zu untersuchenden Probe der isotopenmarkierte Standard (IS) möglichst frühzeitig zugesetzt. Als nahezu idealer Standard wird dieser im Verlauf der Probenaufarbeitung, der chromatographischen Trennung sowie Ionisierung gegenüber dem Analyten nicht diskriminiert. Die Quantifizierung erfolgt durch die Berechnung des Verhältnisses von Analyt zu Isotopenstandard (Rychlik und Asam 2009).

Bei der von uns zu entwickelnden Methode sollen AS in Infusionslösungen quantifiziert werden. Zwar entfällt bei dieser Analysenmatrix eine aufwendige Probenaufarbeitung, durch welche Verluste entstehen können, die den Einsatz von IS bedingen, dennoch ist auch hier die Verwendung von IS indiziert. Diese sollen Unterschiede in der Ionisierungseffizienz, die bei der LC-MS-Analyse auftreten können, ausgleichen (Kirchherr 2008). Im Hinblick auf die Vorgaben der Validierungsparameter ist für die zu entwickelnde Methode der Einsatz von IS unabdingbar.

Die Quantifizierung erfolgt in vorliegender Arbeit durch externe Kalibrierung. Durch die Untersuchung von Standardlösungen aus Analyt (AS, in steigender Konzentration) und isotopenmarkierter Referenz (IS, in gleichbleibender Konzentration) und durch Auftragung des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ gegen die Konzentration an AS wird eine Kalibriergerade erstellt. Nach Analyse der Probelösungen kann mit deren Hilfe die Konzentration an AS berechnet werden.

3 Analytik von Aminosäuren

Aufgrund der Bedeutung der Aminosäuren nimmt wie erwähnt auch deren Analytik eine besondere Stellung ein. Als Bausteine von Peptiden und Proteinen kann nach Hydrolyse anhand der Bestimmung von AS die Zusammensetzung ermittelt sowie nach entsprechendem Abbau auch die Struktur des Peptids bzw. Proteins bestimmt werden. Als Stoffwechselprodukte werden AS in physiologischen Proben (Blut, Urin) quantifiziert, um damit mögliche Krankheiten identifizieren zu können. Wichtigstes Anwendungsfeld ist das Neugeborenencreening zur Diagnose bestimmter angeborener (AS-) Stoffwechselstörungen wie der Phenylketonurie oder der Ahornsirupkrankheit (Woontner und Goodman 2006).

In Lebens- und Futtermitteln werden AS sowohl als Bestandteile der Proteinfraction als auch als freie AS untersucht (Peace und Gilani 2005). Als Beispiele für die Bestimmung von freien AS sei die Fruchtsaftanalytik genannt, bei welcher das AS-Profil zur Charakterisierung eines Safts herangezogen werden kann (A.I.J.N 2010), sowie die Weinanalytik, bei welcher AS als Hefenährstoffe sowie als Vorläufer vieler sekundärer Weinhaltstoffe von Bedeutung sind (Callejón *et al.* 2010). Als gesundheitsfördernde Zusätze werden AS zudem in funktionellen Lebensmitteln („Functional Foods“) und „Nutraceuticals“ bestimmt (Massom 2008). Nicht zuletzt werden AS als Bestandteile von Arzneimitteln im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle quantifiziert.

Wie sich aus dieser kurzen, unvollständigen Aufzählung ablesen lässt, werden AS in den verschiedensten Matrices zur Beantwortung der unterschiedlichsten analytischen Fragestellungen bestimmt. Dies erklärt auch die hohe Anzahl an verschiedenen Methoden, die zur AS-Analytik verwendet werden.

Vor Betrachtung der AS-Analytik sollte man sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der AS in Erinnerung rufen, die bestimmte analytische Besonderheiten bedingen. Bei AS handelt es sich um kleine, polare Moleküle, die sowohl eine saure als auch eine basische Funktion im Molekül tragen. Je nach pH-Wert liegen sie also in verschiedenen Ladungszuständen vor, so dass bei allen Analysen eine genaue pH-

Wert-Kontrolle notwendig ist. Gleichzeitig können sie aufgrund ihrer Polarität ohne Derivatisierung nicht an den klassischen RP-HPLC-Säulen getrennt werden. Als nichtflüchtige Moleküle eignen sie sich zudem nicht zur direkten GC-Analytik. Zudem tragen AS mit Ausnahme von Phe, Trp und Tyr keinen Chromophor, so dass auch eine UV-Detektion ohne vorausgehende Derivatisierung nicht möglich ist.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen flüssigchromatographischen Analysemöglichkeiten der AS gegeben. Zur AS-Analytik mittels Gaschromatographie (GC) und Kapillarelektrophorese (CE) sei auf die einschlägige Literatur verwiesen (Kataoka *et al.* 2001; Husek 2005; Poinso *et al.* 2008; 2010).

3.1 Bestimmung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC)

3.1.1 Historische Entwicklung

Die Chromatographie an Ionenaustauschersäulen mit Ninhydrin - Nachsäulenderivatisierung und anschließender UV-Detektion, die automatisiert in sogenannten Aminosäureanalytoren durchgeführt wird, ist nach wie vor die gebräuchlichste Methode zur Trennung und Quantifizierung von AS.

Die Entwicklung dieser Methode geht auf die beiden Chemiker Moore und Stein zurück. Als Grundlage dienten ihnen die Arbeiten von Synge, der sich seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts mit der (verteilungs-)chromatographischen Trennung von AS an Stärkesäulen zur Peptidcharakterisierung beschäftigte (Synge 1944). Moore und Stein verbesserten diese Methode und führten bereits 1948 einen automatischen Fraktionensammler ein (Moore und Stein 1948). Eine weitere Verbesserung gelang durch die Einführung und Verwendung der Ionenaustauschchromatographie zur AS-Trennung. Als stationäre Phase diente ein sulfoniertes Polystyrolharz (Dowex 50), an welchem die AS durch steigenden pH-Wert eluiert wurden. Dadurch konnten einige Nachteile der Chromatographie an Stärkesäulen aufgehoben werden. Die Analysenzeit betrug zu dieser Zeit noch mehrere Tage (Moore und Stein 1951). In den folgenden Jahren gelangen weitere Verbesserungen der Methode der Ionenaustauschchroma-

tographie (kleinere Partikelgröße, Optimierung der Eluenten), gleichzeitig wurde mit der Entwicklung einer Apparatur zur Automatisierung begonnen. 1958 stellten die Autoren den ersten Analysator und eine verbesserte IEC-Methode vor, wodurch die Analyse eines Proteinhydrolysats in 24 h möglich wurde (Moore *et al.* 1958a; Moore *et al.* 1958b). Diese Arbeiten legten den Grundstein für die Entwicklung der modernen Aminosäureanalysatoren, die trotz vielfältiger Verbesserungen und diverser Hersteller nach wie vor nach dem gleichen Prinzip funktionieren.

3.1.2 Prinzip der Methode

Die Analyse der AS erfolgt an Kationenaustauschern, meist Harze auf Polystyrolbasis, quervernetzt mit Divinylbenzol, die Sulfonsäure-Gruppen (SO_3^-) als aktive Zentren tragen. Zur Elution werden verschiedene (Citrat-)Puffer eingesetzt, die Trennung erfolgt durch steigenden pH-Wert und Änderungen in der Ionenstärke. Anschließend werden die AS automatisch mit Ninhydrin bei ca. 135°C in einer Reaktionskammer derivatisiert, wobei primäre Amine zu Ruhemanns Purpur reagieren und bei 570 nm detektiert werden können (vgl. Abbildung A 3-1). Sekundäre Amine wie Prolin bilden ein gelbes Produkt, welches bei 440 nm erfasst wird.

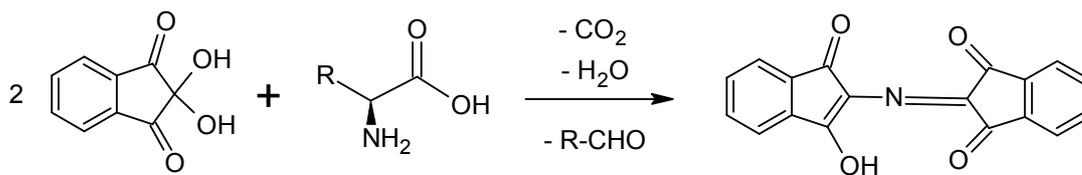


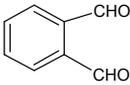
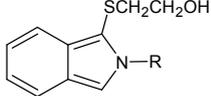
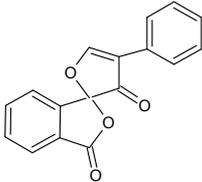
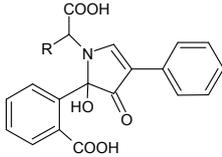
Abbildung A 3-1: Ninhydrin-Reaktion. Die AS reagiert mit 2 Molekülen Ninhydrin unter Abspaltung des Aldehyds zu Ruhemanns-Purpur (Löffler 2007).

Für physiologische Proben werden heute im Allgemeinen Lithium-Ionenaustauschersäulen mit Lithium-(Citrat-)Puffern als Eluenten verwendet. Diese haben die zuvor gebräuchlichen Natrium-(Citrat-)Puffer weitgehend abgelöst, auch weil mit ihnen die Auflösung von Asp, Glu und Gln verbessert wurde. Heute gelingt die Quantifizierung eines Proteinhydrolysats in ca. 2 h. Damit ist zwar im Vergleich zu den Anfangsjahren

eine enorme Verkürzung der Analysenzeit erreicht worden, aber diese ist für die Anwendung in der Routineanalytik nach wie vor sehr hoch und verhindert einen großen Probendurchsatz. Weitere Nachteile der IEC mit Ninhydrin-Derivatisierung sind die Instabilität des Reagenzes sowie die Notwendigkeit der Proteinfällung und deren Abtrennung vor der Analyse (Le Boucher *et al.* 1997; Neveux *et al.* 2004).

Neben Ninhydrin werden zur AS-Analyse mittels Kationenaustauschchromatographie auch Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und Fluorescamin als Nachsäulen-Derivatisierungsreagenzien eingesetzt (siehe Tabelle A 3-1). Die Produkte werden mittels Fluoreszenz-Detektion bestimmt. OPA eignet sich auch als Vorsäulen-Derivatisierungsreagenz, seine Derivate können im UV bei 340 nm bestimmt werden (Peace und Gilani 2005).

Tabelle A 3-1: Reagenzien zur Nachsäulenderivatisierung von AS.

Reagenz	Struktur	Derivat
Ninhydrin		siehe Abbildung A 3-1
OPA ¹		
Fluorescamin		

¹: OPA reagiert mit AS in Anwesenheit von Thiolen. Hier ist das Derivat dargestellt, das unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol als Thiolkomponente entsteht.

Die automatische Quantifizierung von AS mittels Aminosäureanalysatoren erlaubt die Messung aller AS (mit Ausnahme der acetylierten AS); sie ist standardisiert und sehr gut reproduzierbar. Allerdings ist die Anschaffung des Geräts im Vergleich zu einer HPLC-Anlage teuer und das Gerät für diese Anwendung reserviert. Nicht zuletzt führten die relativ langen Analysezeiten der IEC zur Entwicklung von alternativen (HPLC-)Methoden.

3.2 Bestimmung von Aminosäuren-Derivaten mittels HPLC

Aufgrund der Polarität der AS gelingt deren Trennung an klassischen RP-Säulen nur nach vorhergehender Derivatisierung. Verschiedenste Reagenzien sind hierzu entwickelt worden, wobei nur einige routinemäßig eingesetzt werden. Eine Übersicht über die unzähligen Derivatisierungsmöglichkeiten für Aminosäuren in der HPLC enthält das „Handbook of Derivatization Reactions for HPLC“ (Lunn und Hellwig 1998). Klassischerweise als (Vorsäulen-)Derivatisierungsreagenzien von Bedeutung sind OPA (o-Phthaldialdehyd), FMOC (9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid), PITC (Phenylisothiocyanat) und Dansyl-Cl (5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid), die unter anderem zur Analytik von freien AS in biologischen Flüssigkeiten eingesetzt werden (Alteheld *et al.* 2004). Jüngeren Datums ist das Reagenz AQC (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate), das 1993 zur schnellen und einfachen AS-Derivatisierung eingeführt wurde (Cohen und Michaud 1993).

Die Strukturformeln der genannten Reagenzien sowie der durch sie gebildeten AS-Derivate sind in Tabelle A 3-2 dargestellt.

Tabelle A 3-2: Reagenzien zur Vorsäulenderivatisierung von AS.

Reagenz	Struktur	Derivat
OPA		siehe Tabelle A 3-1
FMOC-Cl		
PITC		
DANS-Cl		
AQC		

Mittels RP-HPLC-Analyse nach **OPA**-Vorsäulenderivatisierung werden freie AS z.B. in humanen Plasmaproben in ca. 40 min getrennt und mittels Fluoreszenzmessung (Extinktion: 330 nm, Emission: 440 nm) detektiert. Als Nachteil der OPA-Derivatisierung ist zu nennen, dass nur primäre Amine reagieren, so dass sekundäre Amine wie Prolin nicht erfasst werden können. Zudem entstehen instabile Derivate, die eine automatisierte online-Derivatisierung bedingen. Aufgrund von Fluoreszenzlöschung kann auch Cystein nicht gemessen werden (Alteheld *et al.* 2004).

FMOC-Cl bildet mit primären und sekundären AS stabile Addukte, die fluorimetrisch detektiert werden. Nachteilig ist, dass sowohl Cystein als auch Tryptophan nicht bestimmt werden können, da die Fluoreszenz deren Addukte gelöscht wird. Zudem muss das Derivatisierungsreagenz entfernt werden, um die Derivatisierung zu stoppen und um die Hydrolyse der Derivate zu vermeiden. Mittels FMOC-Derivatisierung und anschließender RP-HPLC-Trennung werden AS in ca. 35 min quantifiziert (Fabiani *et al.* 2002; Peace und Gilani 2005).

Die Derivatisierung mit **PITC** führt für primäre und sekundäre AS zu stabilen Derivaten, überschüssiges Reagenz muss jedoch vor der Analyse abgetrennt werden. Cystein kann bestimmt werden, allerdings ist die Quantifizierung in der Praxis aufgrund geringer Linearität und Reproduzierbarkeit schwierig. Als weiterer Nachteil der Methode sei genannt, dass diese bei der Untersuchung von physiologischen Proben mit einem recht großen Säulenschleiß einhergeht (Alteheld *et al.* 2004). Übliche Analysen im Bereich der Lebensmittelanalytik zur Bestimmung mittels HPLC und PITC-Derivatisierung liegen um die 20 min (Sarwar und Botting 1993; Peace und Gilani 2005).

Dansyl-Cl reagiert mit primären und sekundären Aminen zu fluoreszierenden Derivaten. Allerdings läuft die Derivatisierungsreaktion sehr langsam und nur im Dunklen ab. Aufgrund der Eignung zur Quantifizierung von Cystein sowie des Peptides Glutathion findet die Methode Anwendung in der klinischen Diagnostik. AS aus Plasma-Proben werden dabei in ca. 35 min eluiert (Alteheld *et al.* 2004).

AQC reagiert innerhalb von Sekunden mit primären und sekundären Aminen zu stabilen, fluoreszierenden Derivaten. Überschüssiges Reagenz wird hydrolysiert und stört daher die Analyse nicht (Pappa-Louisi *et al.* 2007). Klassischerweise dauert die Analyse eines Proteinhydrolysats ca. 35 min (Cohen 2001), wobei Trennungen mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC, "ultra high performance liquid chromatography") auch in weniger als 10 min möglich sind (Boogers *et al.* 2008).

Wie aus obiger Beschreibung hervorgeht, ist aufgrund der jeweiligen Nachteile keines der genannten Reagenzien als das „ultimative“ Reagenz zur AS-Analytik anzusehen. Je nach spezifischer Anwendung und Zielsetzung ist das jeweils am besten geeignete Reagenz auszuwählen.

3.3 Bestimmung von underivatisierten Aminosäuren mittels HPLC-MS

Ein genereller Nachteil aller bisher beschriebener Methoden ist der notwendige Derivatisierungsschritt, der nicht nur die Probenvorbereitung und damit die Gesamtanalysenzeit verlängert, sondern gleichzeitig einen kritischen Punkt für exakte Quantifizierungen darstellt (unvollständige Derivatisierung, Entstehung störender Nebenprodukte, die nur durch Anwendung vollständig automatisierter Systeme verringert werden können, u.a.). Zudem ist die Derivatisierung wenig selektiv, so dass bei komplexen Mischungen Unsicherheiten hinsichtlich der Selektivität durch z.B. Reaktionen mit Nicht-AS-Aminogruppen bestehen. Die entstehenden Derivate können, bei gleicher bzw. ähnlicher Retentionszeit, mittels optischer Detektion nicht unterschieden werden.

Daher stellt die massenspektrometrische Detektion eine geeignete Alternative zur Analytik von AS dar. Mittels MS lassen sich - unterschiedliche Massen der Precursor- bzw. Produktionen vorausgesetzt - parallel eluierende Substanzen identifizieren. Zudem kann bei dieser Technik die Derivatisierung der Analyten entfallen.

Zur MS-Bestimmung von Aminosäuren in den unterschiedlichsten Matrices (Blut, Urin, Pflanzenextrakte u.v.m.) sind verschiedenste Methoden publiziert worden. An

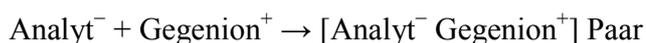
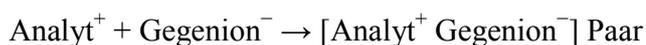
dieser Stelle soll nur ein Überblick über die Analyse von *underivatisierten* AS mittels LC-MS gegeben werden. Auf die Darstellung und Bewertung von Verfahren wie z.B. des Neugeborenen Screenings, bei welchen AS als Butylester zur Diagnose von angeborenen Stoffwechselerkrankungen mittels HPLC-MS/MS untersucht werden, wird verzichtet. Auf die entsprechende Literatur sei hingewiesen (Chace *et al.* 1993; Rashed *et al.* 1997; Schulze *et al.* 2003).

3.3.1 HPLC-MS/MS-Analyse von Aminosäuren mittels Ionenpaar-Chromatographie

3.3.1.1 Prinzip der Ionenpaar-Chromatographie

Die Ionenpaar-Chromatographie ist ein Verfahren zur Analyse von polaren Substanzen, welche normalerweise an RP-Phasen nicht chromatographiert werden können, da sie nicht bzw. nicht ausreichend retardiert werden. Das Trennprinzip beruht auf dem Zusatz eines ionischen organischen Stoffs, welcher die Trennung der entgegengesetzt geladenen Analyt-Ionen ermöglicht. Die dem Retentionsmechanismus der Ionenpaar-Chromatographie zugrunde liegenden chemisch-physikalischen Phänomene sind noch nicht vollständig geklärt und nach wie vor Gegenstand von Untersuchungen (Stahlberg 1999; Cecchi 2008; Pappa-Louisi *et al.* 2010).

Im Allgemeinen werden drei Modelle diskutiert (Fritz und Gjerde 2000; Weiß 2001). Basierend auf den Arbeiten von Horvath *et al.* wird im ersten Modell die Ionenpaarbildung zwischen dem Analyt und dem zugesetzten ionischen Stoff der entgegengesetzten Ladung angenommen (Horvath *et al.* 1976; Horvath *et al.* 1977):



Dieses Ionenpaar, welches eigentlich als Salz vorliegt, nach außen hin aber ein nicht-ionisches organisches Molekül darstellt, kann an einer (unpolaren) Umkehrphase retardiert werden (Meyer 2009).

Beim zweiten Modell wird die Adsorption des zugesetzten lipophilen Reagenzes an die Oberfläche der stationären Phase angenommen, so dass dieser der Charakter eines Ionenaustauschers verliehen wird (Hoffman und Liao 1977; Kissinger 1977; Kraak *et al.* 1977).

Von Bidlingmeyer *et al.* (1979) stammt als drittes Modell das der „Ionenwechselwirkung“ („ion-interaction“). Dieses sieht die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht vor. Eine primäre, geladene Schicht entsteht durch die Adsorption des Ionenpaarreagenzes an der Oberfläche der stationären Phase. Die zweite, diffuse Schicht bildet sich aus den entgegengesetzt geladenen Ionen (Ionen aus der mobilen Phase sowie Analyt-Ionen). Die Retention der Analyt-Ionen wird durch Coulombsche Anziehungskräfte, also die elektrostatische Anziehung der entgegengesetzt geladenen Ionen, sowie durch adsorptive Wechselwirkungen zwischen dem lipophilen Teil des Analyt-Ions und der unpolaren stationären Oberfläche erreicht. Zur Wiederherstellung des elektrostatischen Gleichgewichts kann ein weiteres lipophiles Ion des Ionenpaarreagenzes folgen, so dass zwei entgegengesetzt geladene Ionen, aber nicht notwendigerweise ein Ionenpaar, an der stationären Phase adsorbiert werden.

Anzunehmen ist, dass keines der vorgeschlagenen Modelle die komplexen Vorgänge bei der Ionenpaar-Chromatographie abschließend beschreibt und die einzelnen Mechanismen auch parallel wirksam werden (Blaschek und Reuß 1999; Weiß 2001).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Begriffe Ionenpaar-Chromatographie (IPC) und Ionenpaarreagenz eigentlich ungeeignet sind, da sie den Retentionsmechanismus nicht völlig korrekt beschreiben. Da sie jedoch allgemein gebräuchlich sind, werden sie auch in vorliegender Arbeit verwendet.

Beeinflusst wird die Retention der Analyten bei Anwendung der Ionenpaar-Chromatographie durch eine Vielzahl an Faktoren. Neben der Art der stationären Phase sowie Art und Konzentration des Ionenpaarreagenzes nehmen auch der pH-Wert, die Temperatur sowie die Ionenstärke Einfluss auf die Trennung (Cecchi 2008). Demzufolge ist die strikte Einhaltung standardisierter Bedingungen bei Anwendung der IP-Chromatographie Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse.

Als Ionenpaarreagenzien werden bei der HPLC-Analyse von basischen (kationischen) Substanzen klassischerweise Alkylsulfonsäuren verwendet; bei der Untersuchung von sauren (anionischen) Analyt-Ionen kommen quartäre Ammoniumsalze zum Einsatz (Cecchi 2010). Bei HPLC-MS-Kopplung müssen die verwendeten Ionenpaarreagenzien ausreichend flüchtig sein. Meist kommen fluoridierte Carbonsäuren wie Perfluorpentansäure (NFPA, Nonafluorpentansäure), Perfluorheptansäure (TDFHA, Tridecafluorheptansäure), oder Perfluoroctansäure (PDFOA, Pentadecafluoroctansäure,) als Ionenpaarreagenzien zum Einsatz, die sich in verschiedenen Studien für die HPLC-MS-Kopplung als geeignet erwiesen haben (van Leuken *et al.* 1993; Gao *et al.* 2006). Einen Überblick über den Einsatz von Perfluorcarbonsäuren als Ionenpaarreagenzien geben Aruda und Aruda (2009a).

Ein generelles Problem der ESI-MS-Analytik ist die durch Matrixbestandteile verursachte Ionensuppression („ion suppression“), die in besonderem Maße bei der Verwendung von Ionenpaarreagenzien auftritt (Annesley 2003). Die stärksten Effekte sind für Trifluoressigsäure (TFA) beschrieben, wobei auch die Perfluorcarbonsäuren Einfluss auf die Ionenpaarbildung nehmen (Gustavsson *et al.* 2001; Garcia 2005). Aruda und Aruda (2009b) geben eine gute Zusammenfassung über die von verschiedenen Perfluorcarbonsäuren bei unterschiedlichen MS-Anwendungen hervorgerufene Ionensuppression. Verschiedene fluoridierte Carbonsäuren sind hinsichtlich ihrer Eignung als Ionenpaarreagenzien zur Trennung und Quantifizierung von AS mittels IP-HPLC-ESI-MS/MS untersucht worden, wobei diese Eignung für alle der untersuchten Ionenpaarreagenzien (NFPA, TDFHA, PDFOA) festgestellt wurde. Unterschiede bestehen bezüglich der Selektivität und des Retentionsvermögens, wobei wenige Unterschiede in der Ionensuppression festgestellt wurden (Chaimbault *et al.* 1999; Piraud *et al.* 2005a; de Person *et al.* 2008).

Da die Ionenpaar-Chromatographie universell einsetzbar ist - sowohl anionische als auch kationische Verbindungen können getrennt werden - und zudem die bei der RP-Chromatographie üblichen stationären Phasen und Fließmittel verwendet werden, erlangte die Ionenpaarchromatographie eine gewisse Bedeutung (Weiß 2001). Aller-

dings ist die Anwendung der Ionenpaar-Chromatographie auch mit einigen Nachteilen und Schwierigkeiten verbunden. Exemplarisch seien an dieser Stelle die sehr langen Equilibrierungszeiten sowie die irreversible Kontamination der stationären Phase genannt, welche diese für ein spezifisches Trennproblem determiniert (Snyder *et al.* 1997; Jandera 2000; Gey 2008). Eine ausführliche Diskussion der Problematik der Ionenpaar-Chromatographie findet sich in Kapitel B 1.3.

3.3.1.2 Publierte Anwendungen

Seit Ende der 90er Jahre sind verschiedene Methoden zur Trennung von underivatisierten AS mittels HPLC und anschließender MS/MS-Analytik in der einschlägigen Literatur publiziert worden. Allen Methoden gemeinsam ist die Verwendung von fluorierten Carbonsäuren als Ionenpaarreagenz, welche die HPLC-Trennung der underivatisierten Aminosäuren an RP-Säulen ermöglichen. Die meisten Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Quantifizierung von AS in biologischen Matrices vor dem Hintergrund des Neugeborenen Screenings, bei welchem sich angeborene Störungen des Stoffwechsels durch abweichende AS-Konzentrationen feststellen lassen.

Qu *et al.* stellten 2002 ein Methode zur Quantifizierung von AS in Blut und Serum vor (Qu *et al.* 2002b). Die Trennung von 22 AS erfolgte in ~ 35 min an einer C18-Säule unter Verwendung von TDFHA und TFA als Ionenpaarreagenzien; zur Quantifizierung wurde der SRM-Modus unter Verwendung von stabil-isotopenmarkierten Referenz-AS als interne Standards gewählt.

Die intensivsten Studien zur Quantifizierung von AS mittels HPLC-ESI-MS/MS stammen von der Gruppe um Petritis und Piraud. Aufbauend auf früheren Untersuchungen (Chaimbault *et al.* 1999; Petritis *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003) stellten die Autoren 2005 eine Methode vor, die AS im SRM-Modus nach vorhergehender HPLC-Trennung an einer C18-Säule ebenfalls unter Verwendung von TDFHA als Ionenpaarreagenz erfasst. Insgesamt wurden 76 AS in weniger als 20 min quantifiziert, für 16 von ihnen wurde die Quantifizierung unter Verwendung der entsprechenden isotopenmarkierten Referenzen (IS) validiert (Piraud *et al.* 2005b).

In einer weiteren Veröffentlichung berichten die Autoren von der validierten Quantifizierung von weiteren 33 AS in Plasma und Urin anhand von 16 bereits verwendeten IS (Piraud *et al.* 2005a). Diese Methode scheint auch im Rahmen des Screenings auf Störungen des Aminosäurenstoffwechsels eine gewisse Bedeutung erlangt zu haben (Piraud *et al.* 2011).

Die von Piraud *et al.* etablierte IP-HPLC-Methode wurde von Armstrong *et al.* (2007) zur Analyse von 25 AS in humanem Plasma mit einem time-of-flight (TOF)-Massenspektrometer verwendet.

Zoppa *et al.* (2006) widmeten sich ebenfalls dem Neugeborenencreening. Sie quantifizierten aus Blutstropfen (“dry blood spots“) 40 AS mittels IP-HPLC-MS/MS in 10 Minuten unter Verwendung von TDFHA als Ionenpaarreagenz.

Neben der erwähnten Anwendung der IP-HPLC-MS/MS-Analytik zur Untersuchung von Aminosäuren zur Diagnose von Stoffwechselstörungen wird die Methode u.a. auch zur Analyse von geologischen Proben genutzt. Liu *et al.* (2008), die verschiedene geologische (Boden-) Proben untersuchten, trennten 20 AS an einer C18-Säule unter Verwendung von Nonafluorpentansäure (NFPA) als Ionenpaar-Reagenz in 26 min und quantifizierten diese mittels ESI-MS/MS.

3.3.2 Bestimmung von Aminosäuren mittels HILIC-MS

Mit zunehmender Bedeutung der Hydrophilen Interaktions-Chromatographie (HILIC) erschienen in den letzten Jahren auch einige Methoden zur Trennung und Quantifizierung von AS mittels HILIC-MS. Diese werden nach einer Einführung in diese Technik in Kapitel A 4.4 vorgestellt.

4 Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)

4.1 Grundlagen und Prinzip der HILIC

Die nicht nur in der pharmazeutischen Analytik am weitesten verbreitete flüssig-chromatographische Technik ist die Umkehrphasen („reversed phase“, RP) - HPLC. Die Trennung der Analyten erfolgt vornehmlich an mit Octadecyl- oder Octylresten modifizierten Kieselgelsäulen unter Verwendung einer polaren mobilen Phase, wobei die polaren (hydrophilen) vor den apolaren (hydrophoben) Substanzen eluieren. Ein großer Nachteil der RP-HPLC ist die mangelnde Fähigkeit zur Retention von sehr polaren Stoffen (Doyle 1998; Rizzi 1998).

Die Normalphasen (NP-) Chromatographie hingegen eignet sich prinzipiell zur Trennung von polaren Substanzen, da hier polare stationäre Phasen wie Silica oder Aluminiumoxid und apolare mobile Phasen verwendet werden. Die Retention der Analyten nimmt also mit steigender Polarität zu. Als Nachteile der NP-HPLC sind jedoch die Verwendung von teuren und umweltschädlichen Lösungsmitteln wie Heptan, Hexan oder Pentan als mobile Phase, die geringe Löslichkeit von polaren, hydrophilen Substanzen in diesen Lösemitteln sowie die mangelnde Ionisierungseffizienz und die dadurch geringe Sensitivität bei der ESI-MS-Detektion zu nennen (Caude und Jardy 1998; Snyder *et al.* 2010).

Als Alternative bzw. Ergänzung zu diesen beiden „klassischen“ HPLC-Verfahren ist eine Variante der NP-Chromatographie anzusehen, welche polare Substanzen an hydrophilen stationären Phasen unter Verwendung von wässrig-organischer mobiler Phase trennt. Für diese Technik wurde von A. J. Alpert 1990 der Begriff „Hydrophilic Interaction Chromatography“ (Hydrophile Interaktionschromatographie, HILIC) eingeführt (Alpert 1990). Die HILIC eignet sich zur Analyse von polaren Substanzen, welche in der klassischen RP-Chromatographie kaum retardiert und getrennt werden. Als Vorteile werden neben der guten Peaksymmetrie von basischen Substanzen die Verwendung der klassischen RP-Lösemittel (Wasser, Methanol, Acetonitril, geeignete wässrige Puffersysteme) und die damit verbundene hohe ESI-MS-Empfindlichkeit sowie geringere Viskosität der mobilen Phase beschrieben, wodurch höhere Flussraten

möglich werden (McCalley 2007; Hsieh 2008; Nguyen und Schug 2008; Dejaegher und Vander Heyden 2010).

In den letzten Jahren gewann die Hydrophile Interaktionschromatographie zunehmend an Bedeutung, was sich neben der zunehmenden Zahl an kommerziell erhältlichen stationären HILIC-Phasen auch an der deutlich gestiegenen Zahl der erschienenen Veröffentlichungen ablesen lässt (Lämmerhofer 2010).

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen stationären Phasen, den der HILIC zugrunde liegenden Trennmechanismus sowie die unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten gegeben.

4.2 Stationäre Phasen

Zur HILIC geeignete stationäre Phasen zeichnen sich durch viele unterschiedliche Strukturen aus. Abhängig vom verwendeten Material unterscheidet man Silica- und Polymer-Phasen. Die Silica-Phasen, welche am häufigsten zum Einsatz kommen, lassen sich weiter in reine, chemisch-modifizierte und monolithische Silica-Phasen einteilen. Bei den seltener verwendeten Polymer-Phasen unterscheidet man Partikel- und monolithische Phasen (Dejaegher und Vander Heyden 2010).

Beispiele für chemische Modifizierungen der stationären Silica-Phasen sind Amid-Phasen (z.B. TSK Gel Amid 80, Tosoh Bioscience), 2,3-Dihydroxypropyl-Phasen (YMC pack[®], YMC) oder 3-Aminopropyl-Phasen, wobei letztere gleichzeitig eine schwache Anionenaustauscher-Funktion darstellen (Hemström und Irgum 2006).

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der HILIC-Phasen ergibt sich aufgrund der unterschiedlich starken elektrostatischen Wechselwirkungen, welche die stationären Phasen mit der Oberfläche eingehen können. Neutrale Phasen zeigen keine, geladene Phasen starke und zwitterionische Phasen geringe elektrostatische Wechselwirkungen (Spagou *et al.* 2010).

In vorliegender Arbeit wurde mit ZIC[®]-HILIC-Säulen der Firma SeQuant (Umeå, Schweden) gearbeitet. Bei diesem Typ handelt es sich um Silica- (ZIC[®]-HILIC) bzw. Polymer-Phasen (ZIC[®]-pHILIC), die kovalent gebunden eine zwitterionische Sulfobetaingruppe tragen (vgl. Abbildung A 4-1).

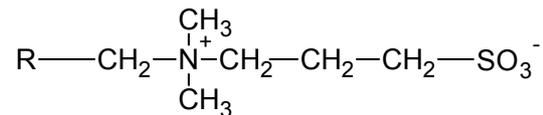


Abbildung A 4-1: Funktionelle Gruppe der stationären ZIC[®]-HILIC- und ZIC[®]-pHILIC-Phasen (SeQuant 2006).

Eine Zusammenfassung der verschiedenen HILIC-Phasen und deren Einsatzmöglichkeiten geben die Übersichtsarbeiten von Jandera (2008), von Hemström und Irgum (2006) sowie von Ikegami *et al.* (2008).

4.3 Trennmechanismus HILIC

Generell wird die HILIC wie erwähnt als Variante der Normalphasen-Chromatographie beschrieben, welche zur Trennung von polaren Substanzen an hydrophilen, polaren stationären Phasen unter Verwendung von wässrig-organischer mobiler Phase (meist mit einem hohen Anteil an ACN) genutzt werden kann. Wasser stellt im Gegensatz zur RP-HPLC das stärkste Elutionsmittel dar, die Retention der Analyten steigt mit zunehmender Polarität bzw. Ionisierung der Substanzen (Snyder *et al.* 2010).

Der genaue Retentionsmechanismus der HILIC wird nach wie vor diskutiert (Guo und Gaiki 2005; Hemström und Irgum 2006; Novakova *et al.* 2010). Es gilt als gesichert, das sich unter HILIC-Bedingungen auf der Oberfläche der stationären Phase eine Wasserschicht ausbildet (Kitano *et al.* 2005; McCalley und Neue 2008). Die Trennung beruht demzufolge wohl hauptsächlich auf Verteilungsvorgängen zwischen dieser wasserreichen Schicht und der weniger polaren, überwiegend organischen mobilen Phase (vgl. Abbildung A 4-2).

Neben Verteilungsvorgängen sind jedoch weitere Wechselwirkungen Bestandteil des Retentionsmechanismus, die je nach chemischer Eigenschaft der stationären Phase unterschiedlich ausgeprägt sind. So nehmen Wasserstoffbrückenbindungen (in Abhängigkeit von der Acidität bzw. Basizität der Analyten), elektrostatische Wechselwirkungen sowie Dipol-Dipol-Interaktionen am Retentionsmechanismus teil, wobei letztere wiederum von der Polarisierbarkeit und den Dipol-Momenten der Analyten abhängen (Yoshida 2004; Hao *et al.* 2008).

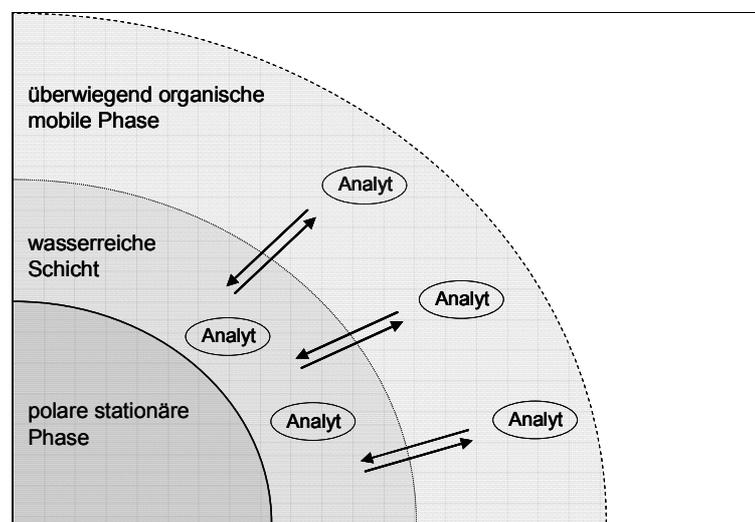


Abbildung A 4-2: Schematische Darstellung des HILIC-Trennmechanismus. Verteilungsvorgänge der polaren Analyten zwischen einer wasserreichen Schicht und der überwiegend organischen mobilen Phase. Graphik erstellt nach SeQuant (2006).

Bei der in vorliegender Arbeit verwendeten ZIC[®]-HILIC-Säule handelt es sich um eine mit einer zwitterionischen Sulfobetainstruktur modifizierte stationäre Phase (vgl. Abbildung A 4-1), die im Vergleich zu anderen HILIC-Säulen einige Unterschiede aufweist. Wie bei den übrigen HILIC-Säulen steigt auch hier die Retention mit zunehmender Polarität der Analyten aufgrund von Verteilungsvorgängen zwischen der Wasserschicht auf der stationären Phase und der mobilen Phase. Durch die Ladung der Sulfobetaingruppe sind auch elektrostatische Wechselwirkungen Bestandteil des Retentionsmechanismus. Diese sind allerdings aufgrund der zwitterionischen Oberfläche weniger stark ausgeprägt als bei anderen geladenen stationären Phasen. Da

keine starken elektrostatischen Interaktionen zu lösen sind, sind keine erhöhten Pufferkonzentrationen in der mobilen Phase notwendig, was wiederum zu einer erhöhten MS-Empfindlichkeit führt (Viklund *et al.* 2001; SeQuant 2006).

Die Retention an der ZIC[®]-HILIC-Phase wird aufgrund der Ladung der Oberfläche im Vergleich zu anderen stationären Phasen wie z.B. Silica- oder Amin-Phasen wenig durch pH-Wert-Änderungen beeinflusst. Der pH-Wert des Eluenten kann auf die zu trennenden Analyten optimiert werden (Unterdrückung oder Verstärkung der Ionisierung), ohne dadurch die Oberfläche der stationären Phase zu modifizieren (Verstärkung bzw. Schwächung der Ionenaustauscher-Funktion) und damit Einfluss auf die Trennung zu nehmen (Guo und Gaiki 2005).

Des Weiteren soll die kovalente Derivatisierung der stationären Phase nach Herstellerangaben den ZIC[®]-HILIC-Säulen zu einer sehr guten Stabilität der Phase mit sehr geringem Säulenbluten verhelfen (Dibowski und Dibowski 2005). Dies wird durch eine Veröffentlichung von Ikegami *et al.* (2008) bestätigt, in welcher die Autoren 19 HILIC-Säulen u.a. hinsichtlich Stabilität und Säulenbluten untersuchten.

4.4 Bestimmung von Aminosäuren mittels HILIC-MS

Am Beispiel von Aminosäuren zeigte Alpert (1990) die im Vergleich zur RP-Chromatographie umgekehrte Elutionsreihenfolge der HILIC. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit spezieller HILIC-Säulen und die allgemein wachsende Beliebtheit dieses Verfahrens wurden in den letzten Jahren auch einige Methoden zur Trennung und Quantifizierung mittels HILIC-MS publiziert. Die Studien stammen dabei aus den unterschiedlichsten Gebieten der Analytik und erfassen AS in diversen Matrices aus den verschiedensten Gründen.

In der Lebensmittelanalytik verwendeten 2003 Schlichtherle-Cerny *et al.* die HILIC zur Untersuchung von polaren, niedermolekularen Komponenten in Weizengluten-Hydrolysaten und Parmesan-Käse. Leu, Glu, Gln, Pro, Ser, Thr werden neben weiteren polaren Analyten an einer TSK-Gel Amid 80 Säule (TOSOH Bioscience, Stuttgart) innerhalb von 90 min eluiert und mittels ESI-MS (LCQ Ion Trap) detektiert.

Die Methode eignete sich auch zur Trennung und Identifizierung von Amadori-Produkten (Schlichtherle-Cerny *et al.* 2003).

Als Vorläufer des physiologisch wirksamen Stickstoffmonoxids (NO) wurden Arginin sowie dessen Derivate, asymmetrisches Dimethylarginin und symmetrisches Dimethylarginin, in Urin, Plasma und Zellkulturüberständen mittels HILIC-ESI-MS quantifiziert. Die HILIC-HPLC-Analytik erfolgte an einer Nucleosil-Silica-Säule (Macherey-Nagel) unter Verwendung von TFA als Fließmittelzusatz, wobei die Analyten nach 4.2 – 4.9 min eluieren (Martens-Lobenhoffer und Bode-Böger 2006).

Im Jahr 2006 erschien eine Publikation, in der 16 von 19 untersuchten proteinogenen AS (Cys war nicht Bestandteil der Studie) ebenfalls an einer TSK-Gel Amid 80 Säule (TOSOH Bioscience, Stuttgart) in 25 min mittels HILIC getrennt und mit ESI-MS/MS (Neutralverlust-Analyse) detektiert wurden. His, Lys und Arg eluieren unter den gewählten Bedingungen deutlich später mit breiten, stark tailenden Peaks und wurden nicht weiter untersucht. Zudem trennten die Autoren mit dieser Methode drei Hydroxyprolin-Isomere (trans-4-Hyp, trans-3-Hyp and cis-4-Hyp) und quantifizierten diese in Kollagen-Hydrolysaten zu deren Charakterisierung (Langrock *et al.* 2006).

Einzelne Aminosäuren wurden im Atemkondensat als Biomarker zur Diagnose von Lungenkrankheiten untersucht. Conventz *et al.* (2007) trennten innerhalb von 15 min 3-Nitrotyrosin, Tyrosin, Hydroxyprolin und Prolin an einer ZIC[®]-HILIC-Säule (SeQuant, Umeå, Schweden) und quantifizierten diese Verbindungen mittels ESI-MS/MS. Mit der gleichen Säule wurden Lysin und *N*- ϵ -Carboxymethyl-Lysin in 10 min eluiert und ebenfalls mittels ESI-MS/MS detektiert (Schettgen *et al.* 2007).

Zur Quantifizierung von AS in Peptid- bzw. Protein-Hydrolysaten stammt eine Publikation aus dem Jahr 2009. Die Autoren trennten an einer ZIC[®]-HILIC-Säule (SeQuant, Umeå, Schweden) zwölf AS aus den Hydrolysaten von Angiotensin I und Bovinem Serum Albumin (BSA) in 55 min und quantifizierten diese mittels stabilisotopenmarkierte Referenz-AS (Kato *et al.* 2009).

Als Metabolite im Fermentationssud von β -Lactam-Antibiotika hat man AS, neben zahlreichen anderen Analyten, in zwei Studien untersucht (Preinerstorfer *et al.* 2010; Schiesel *et al.* 2010). An einer ZIC[®]-HILIC-Säule (SeQuant, Umeå, Schweden) wurden 44 AS und kleine Peptide in 45 min eluiert und mittels ESI-MS/MS quantifiziert. Die isobaren AS Leu und Ile ließen sich nicht chromatographisch trennen.

Zur Bestimmung von AS in der Rhizosphäre wurden in einer aktuellen Veröffentlichung Bodenproben untersucht. Ebenfalls an einer ZIC[®]-HILIC-Säule (SeQuant, Umeå, Schweden) wurden 16 AS in 19 min eluiert und mittels ESI-MS/MS detektiert. Leu und Ile konnten in dieser Studie ebenfalls chromatographisch nicht getrennt werden; die Quantifizierung der beiden erfolgte über spezifische Fragmentationen (Dell'mour *et al.* 2010).

Die genannten Veröffentlichungen belegen alle die prinzipielle Eignung der HILIC zur Trennung von Aminosäuren. Die meisten Studien beschäftigten sich allerdings nur mit wenigen, bestimmten AS vor dem Hintergrund einer spezifischen Aufgabenstellung (z.B. Diagnose von Krankheiten mit AS als Marker, Identifizierung von Protein-Subtypen über den Gehalt bestimmter AS). Für diese liegen teils validierte Quantifizierungen vor. Sofern eine größere Anzahl von AS in die Untersuchungen eingeschlossen ist, sind diese Bestandteil einer großen Zahl an polaren Analyten, die in einer Screening-Methode parallel erfasst werden (Preinerstorfer *et al.* 2010; Schiesel *et al.* 2010). Auch hier wird die prinzipielle Eignung der HILIC demonstriert, allerdings fehlen validierte Daten zur Quantifizierung der AS. Die genannte Studie zur Quantifizierung von AS in der Rhizosphäre beschäftigte sich zwar mit 16 AS (Asn, Gln, Gly und Trp werden nicht untersucht), allerdings fehlen auch hier Validierungsdaten zur Quantifizierung. Einzig Tyr wird mit ¹³C₆-Tyrosin als stabilisotopenmarkiertem internem Standard exakt quantifiziert, für die anderen AS wird auf die Notwendigkeit eines spezifischen IS hingewiesen (Dell'mour *et al.* 2010).

Keine der veröffentlichten Untersuchungen erfasste 21 AS mittels HILIC-MS(/MS) unter Verwendung einer jeweils stabil-isotopenmarkierten Referenz-AS zur Quanti-

fizierung. Die aufgrund von Interferenzen chromatographisch zu trennenden AS (vgl. Kapitel B 1.1.3) eluierten in den vorgestellten Methoden nicht immer getrennt, so dass zur Quantifizierung teils auf spezifische Fragmentionen ausgewichen wurde. Eine Validierung nach den Maßstäben der pharmazeutischen Industrie zur Gehaltskontrolle in der Routineanalytik wurde in keiner der veröffentlichten Methoden vorgestellt.

5 Methodenvalidierung

5.1 Regularien und Begriffsbestimmung

Validierung bedeutet im Allgemeinen die zielgerichtete Beantwortung der Frage, ob ein analytisches Verfahren für den vorgesehenen Zweck geeignet ist (FDA 1999; ICH 2005).

In der pharmazeutischen Qualitätssicherung gibt es verschiedene Leitlinien, herausgegeben von offiziellen Stellen wie der FDA (Food and Drug Administration, die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde) oder der EMA (European Medicines Agency, die europäische Arzneimittelagentur, früher: EMEA), die sich mit der Validierung beschäftigen (FDA 1999; FDA 2000; EMA 2001). Die ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), an der neben der FDA, der EMA und der Japanischen Gesundheitsbehörde auch Arzneimittelherstellerverbände beteiligt sind, hat 2005 die Guideline Q2(R1) mit dem Titel „*Validation of analytical procedures: Text and methodology*“ (ICH 2005) veröffentlicht. In ihr wurden die beiden bisher gültigen Guidelines Q2A und Q2B (ICH 1994; ICH 1996) zusammengefasst. Diese ICH-Guidelines sind als allgemeingültige Richtlinien mit empfehlendem Charakter anzusehen, also als Basis der Validierung einer analytischen Methode. Sie enthalten jedoch keine Detailregelungen; die Verantwortung für Art und Umfang der Validierungsparameter sowie deren Spezifikationsgrenzen obliegt für jede analytische Fragestellung - sofern von regulatorischer Seite keine speziellen Vorschriften bestehen - dem Anwender (Ermer 2005; ICH 2005).

Je nach Ziel des analytischen Verfahrens bzw. der Methode sollen gemäß der ICH-Richtlinie bestimmte Parameter Bestandteil der Validierung sein (vgl. Tabelle A 5-1).

Tabelle A 5-1: Validierungsanforderungen für verschiedene Arten der analytischen Untersuchungen gemäß der ICH-Richtlinien (ICH 2005). +: normalerweise erforderlich, -: normalerweise nicht erforderlich

Parameter	Identifizierung	Art der analytischen Untersuchung		
		Test auf Verunreinigungen Quantifizierung	Grenzprüfung	Gehaltsbestimmung
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision				
- Wiederholpräzision	-	+	-	+
- Laborpräzision	-	+ ¹	-	+ ¹
Spezifität ²	+	+	+	+
Nachweisgrenze	-	- ³	+	-
Bestimmungsgrenze	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Bestimmungsbereich	-	+	-	+

¹: Sofern die Reproduzierbarkeit (Vergleichspräzision) bestimmt wird, ist die Laborspräzision nicht notwendig. ²: Mangelnde Spezifität eines Prüfverfahrens kann ggf. durch ein zusätzliches Verfahren kompensiert werden. ³: Kann in manchen Fällen notwendig sein.

Die wichtigsten Validierungsparameter sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

5.2 Validierungsparameter

5.2.1 Nachweis und Bestimmungsgrenze

Die **Nachweisgrenze** („limit of detection“, LOD) einer analytischen Methode ist diejenige Konzentration bzw. Menge eines Analyten, welche detektiert, also nachgewiesen, aber nicht unbedingt als exakter Wert quantifiziert werden kann. Die **Bestimmungsgrenze** („limit of quantitation“, LOQ) gibt die niedrigste Konzentration bzw. Menge eines Analyten in der Probe an, die mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann.

Die Ermittlung der beiden Parameter kann gemäß den ICH-Guidelines visuell, aus dem Signal-Rausch-Verhältnis, der Kalibriergerade oder der Standardabweichung des Blindwerts erfolgen. Bei Auswertung über das Signal-Rausch-Verhältnis ist für die Nachweisgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1, für die Bestimmungsgrenze von 10:1 üblich (ICH 2005).

Im Bereich der pharmazeutischen Qualitätskontrolle sind LOD und LOQ insbesondere im Bereich der Impurity-Untersuchung wichtig. Bei Quantifizierungen eines Wirkstoffs sind LOD und LOQ im Allgemeinen nicht Bestandteil der Validierung und wurden daher in vorliegender Arbeit auch nicht bestimmt.

5.2.2 Präzision

Die Präzision eines analytischen Verfahrens drückt die Übereinstimmung (bzw. Streuung) unabhängiger Analysenergebnisse untereinander aus. Als Streuungs- bzw. Präzisionsmaß dient die relative Standardabweichung (RSD), die identisch mit dem Variationskoeffizient V_K ist.

In der instrumentellen Analytik gibt es prinzipiell zwei Gründe für die Streuung von Ergebnissen, das Analysengerät selbst und die Methode. Als Maß für die Streuung, die durch das Analysengerät verursacht wird, dient die **Systempräzision** (auch Mess- oder Gerätepräzision). In der HPLC-MS-Analytik wird diese durch den Injektor, kurzzeitige Flussschwankungen sowie insbesondere die Ionisierungseffizienz in der (ESI-) Ionenquelle beeinflusst. Zur Bestimmung wird eine Standardlösung mehrfach (normalerweise sechsmal) aufeinanderfolgend gemessen und der Variationskoeffizient, also die relative Standardabweichung (RSD) bestimmt. Die **Methodenpräzision** ist demgegenüber ein Maß für die Streuung, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden (Probennahme, Wägung, Extraktion, Verdünnung usw.). Bestimmt wird ebenfalls die relative Standardabweichung, die sich jedoch nach Analyse von üblicherweise sechs unabhängig aufgearbeiteten Proben ergibt (Kromidas 2003).

Die ICH-Richtlinie unterscheidet zwischen **Wiederholpräzision** („repeatability“ oder „intra-assay precision“), die **Laborpräzision** („intermediate precision“) sowie die **Reproduzierbarkeit** („reproducibility“). Hinsichtlich der deutschen Begriffe sei darauf hingewiesen, dass in der Literatur eine Vielzahl an unterschiedlichen Übersetzungen bzw. Umschreibungen der Originalbegriffe der ICH-Richtlinie benutzt werden. Als Beispiele seien „Laborpräzision“ (Kromidas 2006), „Vergleichspräzision“ (Hänsel und Steinegger 2010), „Mehrtages-Standardabweichung“ (DPHG 2003) sowie „Laborvergleichspräzision“ (Ermer 2008) als Begriffe für „intermediate precision“ genannt. Für die Reproduzierbarkeit wird auch der Begriff „Vergleichspräzision“ verwendet (Kromidas 2003). Da unter gleichen Begriffen oft Unterschiedliches verstanden wird, muss daher in jedem Fall sorgfältig geprüft werden, was mit dem jeweiligen Begriff gemeint wird.

Die **Wiederholpräzision** („repeatability“ oder „intra-assay precision“) beschreibt die Präzision einer analytischen Methode, die sich unter den gleichen Bedingungen (gleiches Labor, gleicher Mitarbeiter, gleiches Gerät) innerhalb einer kurzen Zeitspanne ergibt. Dazu werden unabhängige Proben hergestellt und innerhalb einer Messreihe analysiert. Laut ICH-Guidelines sind hierfür sechs Bestimmungen vorgesehen (ICH 2005; Ermer 2008). Die oben genannte Methodenpräzision kann somit als Wiederholpräzision gemäß den ICH-Guidelines verstanden werden (Bliesner 2006).

Die nächsten Präzisionsebenen sind die **Laborpräzision** und die **Reproduzierbarkeit**, in welche die (Lang-) Zeitvariabilität der analytischen Methode eingeht. Die **Laborpräzision** („intermediate precision“, früher: „ruggedness“) erfasst dabei die Abweichungen einer analytischen Methode innerhalb eines Labors (verschiedene Tage, anderer Mitarbeiter, verschiedene Geräte), die **Reproduzierbarkeit** („reproducibility“) beschreibt die Streuung zwischen verschiedenen Laboratorien.

Abbildung A 5-1 fasst graphisch die verschiedenen Arten bzw. Ebenen der Präzision sowie einige ihrer Einflussfaktoren zusammen.

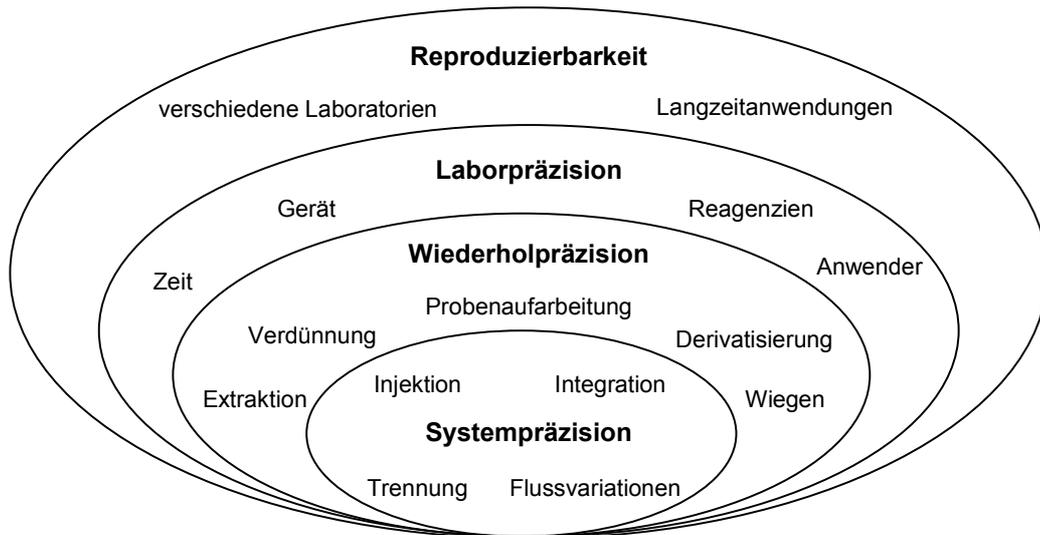


Abbildung A 5-1: Darstellung der verschiedenen Präzisionsebenen sowie einiger ihrer Einflussfaktoren. Graphik modifiziert nach Ermer (2005).

Vorgaben hinsichtlich der einzuhaltenden Grenzen, d.h. maximale RSD-Werte, sind in den offiziellen Dokumenten nicht gegeben. Sie richten sich nach den Anforderungen des Prüfverfahrens. Für die in vorliegender Arbeit zu entwickelnde Methode zur Gehaltsbestimmung von AS in Infusionslösungen im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle sollten die RSD-Werte der Systempräzision bezogen auf den Gehalt $\leq 1.5\%$, die der Methodenpräzision $\leq 2.0\%$ sein, die RSD-Werte der Retentionszeiten jeweils $\leq 1.0\%$ (B.Braun 2008).

5.2.3 Linearität

Die Linearität eines analytischen Verfahrens ist definiert als die Fähigkeit, innerhalb eines bestimmten Bereichs Signale zu erhalten, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten sind (FDA 1999; ICH 2005). Es sei bereits hier angemerkt, dass nicht unbedingt ein linearer Zusammenhang zwischen Mess- und Konzentrationswert bestehen muss. Andere mathematische Zusammenhänge sind möglich bzw. bei manchen Analysemethoden durchaus üblich.

Analog zur Präzision kann auch bei der Linearität zwischen der **Systemlinearität** und der **Methodenlinearität** unterschieden werden.

Die **Systemlinearität** wird dabei durch Untersuchung von Standardlösungen bestimmt, weshalb hierbei die Linearität der Apparatur und des Detektors geprüft wird. Die **Methodenlinearität** dagegen wird anhand von realen Proben bzw. synthetischen Proben (Placeboformulierung, also Analysenmatrix ohne Wirkstoff, welcher der bzw. die Standards des Analyts / der Analyten in der entsprechenden Konzentration zugegeben wurden). System- und Methodenlinearität sind nicht zwangsläufig identisch, häufig ergeben sich aufgrund der Matrix Unterschiede (Kromidas 2003).

Zur Bestimmung der Linearität sollten mindestens fünf Konzentrationen vermessen werden. Jedes Konzentrationsniveau wird dabei dreimal untersucht, wobei im Fall der Methodenlinearität jede Untersuchungslösung unabhängig hergestellt wird. Die Auswertung erfolgt durch Auftragung des Mess- gegen den Konzentrationswert und Bestimmung der Regressionsgeraden (ICH 2005; B.Braun 2008).

Da wie erwähnt kein linearer Zusammenhang der mathematischen Funktion $y = m \cdot x + b$ bestehen muss und dieser auch bei augenscheinlich „guten“ Regressionsgeraden nicht immer gegeben ist, muss im Rahmen der Validierung die ermittelte Kalibrierfunktion geprüft werden. Dies kann durch mehrere Verfahren geschehen, wobei sich insbesondere der Anpassungstest nach Mandel bewährt hat. Zunächst werden die bestimmten Wertepaare (Mess- und Konzentrationswerte) einer linearen und einer quadratischen Regression unterworfen, anschließend die Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} beider Kalibrierfunktionen bestimmt und miteinander verglichen. Als „besser“ ist diejenige Kalibrierstrategie anzusehen, bei welcher V_{x0} geringer ist. Um zufällige Abweichungen der Werte auszuschließen, also die statistische Signifikanz nachzuweisen, wird im Anpassungstest nach Mandel aus den Reststandardabweichungen der beiden Verfahren die Varianzendifferenz Δs^2 berechnet, welche mit der Varianz der quadratischen Anpassung s^2_{quad} über einen F-Test (P=99%) abgeglichen wird. Die mathematischen Grundlagen der Regressionsanalysen sowie des Anpassungstests nach Mandel sind in Anhang I dargestellt (Funk *et al.* 2005).

Als Anforderung an die Linearität wird im Allgemeinen für die Kalibrierfunktion ein Korrelationskoeffizient $r > 0.999$ gefordert (FDA 1994; Kromidas 2003); unter Umständen kann diese Anforderung jedoch auch auf dessen Quadrat, also das Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0.999$ bezogen werden (B.Braun 2008).

5.2.4 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich („range“) bezeichnet das Intervall zwischen der geringsten und der höchsten Konzentration des Analyten, für welche das analytische Prüfverfahren nachweislich einen angemessenen Grad an Präzision, Richtigkeit und Linearität aufweist. Nach den ICH-Guidelines sollte der Arbeitsbereich bei Gehaltsbestimmungen von pharmazeutischen Produkten 80% - 120% umfassen (ICH 2005). In vorliegender Arbeit sollte versucht werden, den Arbeitsbereich wesentlich weiter zu setzen. Das dadurch verfolgte Ziel war, mit einer validierten HPLC-MS-Methode verschiedene AS-Formulierungen (vgl. Tabelle A 1-3, S. 13) untersuchen zu können.

Der Arbeitsbereich leitet sich normalerweise aus den Untersuchungen zur Linearität und Präzision ab. Als „range“ wurde in vorliegender Arbeit der Bereich festgesetzt, in welchem die Anforderungen hinsichtlich Präzision (Gehalt: $RSD \leq 2.0\%$, Retentionszeit: $\leq 1.0\%$), Linearität (Korrelationskoeffizient ≥ 0.999) und Richtigkeit (Wiederfindung: 98.0% - 102% für die Einzelwerte, 98.5% - 101.5% für den Mittelwert) erfüllt sind.

5.2.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit („accuracy“) eines analytischen Prüfverfahrens drückt die Übereinstimmung zwischen einem akzeptierten wahren oder als Referenzwert akzeptierten Wert und dem gefundenen Wert aus (ICH 2005). Die Richtigkeit kann im Rahmen einer Validierung auch aus den Daten der Präzision und Linearität erfolgen, so dass nicht zwingend weitere Untersuchungen notwendig sind. Die Richtigkeit wird als Wiederfindung bzw. Wiederfindungsrate in Prozent angegeben. Da sie über den gesamten Arbeitsbereich zu belegen ist, werden Messungen bei mindestens drei Konzentrationsniveaus, idealerweise bei 100% der Zielkonzentration sowie bei der oberen und unteren Grenze des Arbeitsbereichs, an drei unabhängigen Proben durchgeführt (Keitel 2008).

B. Ergebnisse und Diskussion

1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Aminosäuren mittels IP-RP-HPLC-MS/MS

Wie einleitend erwähnt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Methode zur Quantifizierung von underivatisierten Aminosäuren (AS) in Infusionslösungen mittels HPLC-ESI-MS/MS zu entwickeln.

Analysenverfahren zur Quantifizierung von underivatisierten Aminosäuren mittels HPLC-ESI-MS/MS, die in der einschlägigen Literatur vorgestellt wurden, bedienen sich meist der Ionenpaar-Chromatographie (IP-HPLC), wobei beinahe ausnahmslos fluorierte Carbonsäuren als Ionenpaarreagenz zur Trennung der AS an RP-Säulen verwendet werden (vgl. Kapitel A 3.3.1.2).

Die ausführlichsten Studien stammen dabei von der Gruppe um Petritis, die sich in verschiedenen Publikationen intensiv mit der Entwicklung und Etablierung einer IP-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von AS in Blut bzw. Urin zur Diagnose von Störungen des Aminosäurenstoffwechsels beschäftigte (Chaimbault *et al.* 1999; Petritis *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003; Piraud *et al.* 2005a; Piraud *et al.* 2005b).

Die Methodenentwicklung wurde daher zunächst ausgehend von diesen Arbeiten aufgenommen.

1.1 Fragmentierungsstudien

Vor Entwicklung einer SRM („selected reaction monitoring“) - Methode bedarf es der genauen Kenntnis von Precursor- und Produktion sowie der optimalen Kollisionsenergie der jeweiligen Analyten und ihrer isotopenmarkierten Referenzen (IS). Zudem werden Informationen bezüglich des Fragmentierungsmusters der Analyten bzw. ihrer IS benötigt, um eventuell auftretende Interferenzen aufgrund gleicher Precursor- und / oder Produktionen bei der Methodenentwicklung berücksichtigen zu können.

Zur Ermittlung dieser Parameter wurden die AS- und IS-Referenzen mittels ESI_{pos}-MS/MS untersucht (Durchführung siehe Abschnitt D 1.2.).

Für die AS (s. Abschnitt B 1.1.1) wurden die publizierten Daten (Rogalewicz *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003) unter den vorliegenden Bedingungen überprüft; für die meisten IS sowie weitere, in vorliegender Arbeit verwendete Substanzen lagen keine Literaturdaten vor, so dass hier die Fragmentierungsmuster neu bestimmt wurden.

Als Ionisierungsmodus wurde ausschließlich der positive Modus gewählt, da mit diesem zum einen laut Literatur (Piraud *et al.* 2003) alle zur Methodenentwicklung vorgegebenen AS detektiert werden können, zum anderen in der späteren HPLC-Methode Tridecafluorheptansäure (TDFHA) als Ionenpaarreagenz dem Fließmittel zugesetzt wird. TDFHA verbessert als Säure die Ionisierung im positiven Modus (verstärkte Bildung von positiv geladenen Analyt-Molekülen), so dass in diesem Fall die HPLC-MS/MS-Analyse im positiven Modus von Vorteil ist (Cech und Enke 2010).

Während der Fragmentierungsstudien wurde dem Lösungsmittel ebenfalls TDFHA zugesetzt, um die Ionisierung zu verbessern und gleichzeitig Bedingungen zu schaffen, die denjenigen der späteren HPLC-Methode möglichst nahe kommen. Parallel wurde so geprüft, ob und in welchem Ausmaß das Ionenpaarreagenz Einfluss auf die Fragmentierung nimmt.

1.1.1 Fragmentierung der Aminosäuren

Abbildung B 1-1 zeigt am Beispiel von Ornithin die ESI_{pos}-Produktionen-Spektren, die sich nach CID („collision induced dissociation“, 2.0 mTorr Argon) ergeben.

Bei -10 eV tritt zunächst wenig Fragmentierung ein. Das Precursorion $[M+H]^+$ m/z 133.1 ist mit einer Intensität von $3.76 \cdot 10^4$ dominierend. Als Produktionen werden m/z 116.0 (-17u, -NH₃), m/z 115.0 (-18u, -H₂O) sowie m/z 70.1 (-63u, entspricht -NH₃, -H₂O, -CO) detektiert.

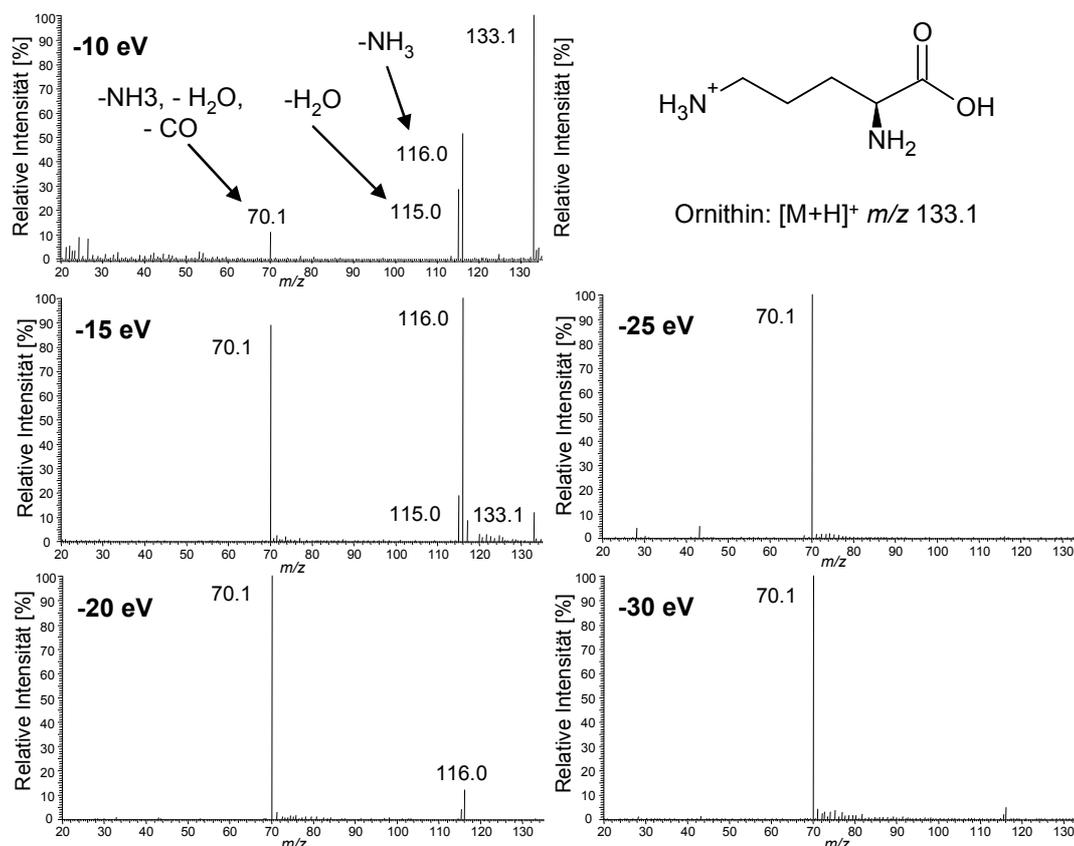


Abbildung B 1-1: ESI_{pos}-Produktions-Spektren von Orn nach CID (2.0 mTorr Argon).

Die genauen ESI-MS-Bedingungen sind in Abschnitt D 1.2 gegeben.

Fragmentierungsenergien: -10eV, -15eV, -20eV, -25eV, -30eV. Precursorion: m/z 133.1, Produktionen: m/z 116.0 (-17 u), m/z 115.0 (-18 u), m/z 70.1 (-63 u).

Intensitäten: 10eV: $3.67 \cdot 10^4$ (m/z 133.1), 15eV: $3.96 \cdot 10^4$ (m/z 116.0), 20eV: $5.30 \cdot 10^4$ (m/z 70.1), 25eV $4.40 \cdot 10^4$ (m/z 70.1), 30eV $4.29 \cdot 10^4$ (m/z 70.1).

Bei Steigerung der Spannung nimmt die Fragmentierung zu, wobei bei -15 eV das Produktion m/z 116.0 vorherrscht (Intensität: $3.96 \cdot 10^4$). Von -20 eV bis -30 eV dominiert das Produktion m/z 70.1. Seine größte Intensität weist dieses mit einer Intensität von $5.3 \cdot 10^4$ bei -20 eV auf, so dass diese Spannung als charakteristische Stoßenergie gewählt wurde. Als weiteres Produktion wird unter diesen Bedingungen nur noch m/z 116.0 detektiert.

Die so ermittelten Ergebnisse der Fragmentierungsstudien aller AS sind in Tabelle B 1-1 (S. 58) zusammengefasst.

Generell stehen die Ergebnisse der Fragmentierungsstudien im Einklang mit verschiedenen Literaturdaten zur Fragmentierung von AS mittels ESI_{pos}-MS/MS-Analytik (Dookeran *et al.* 1996; Petritis *et al.* 2000; Rogalewicz *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003).

Wie aus Tabelle B 1-1 ersichtlich wird, ist unter den gewählten Bedingungen die dominierende Fragmentierungsreaktion der Aminosäuren im positiven Modus die bekannte Bildung des Immonium-Ions (-46u, vgl. Abbildung B 1-2), welche durch den aufeinanderfolgenden Verlust von H₂O und CO zustande kommt. Die Bildung des Immonium-Ions folgt dabei bei allen AS (außer His) einem gemeinsamen Mechanismus, der nach der initialen Protonierung am N-Terminus einen Protonentransfer zur Hydroxylgruppe beinhaltet (Rogalewicz und Hoppilliard 2000; Rogalewicz *et al.* 2000).

Teilweise wird in der Literatur, z.B. beschrieben bei Qu *et al.* (2002a; b) und Langrock *et al.* (2006), die Bildung des Immonium-Ions durch den Verlust von Ameisensäure (HCOOH) ausgedrückt, was jedoch nur formal richtig ist. Um dem zugrunde liegenden Fragmentierungsmechanismus, also der aufeinanderfolgenden Abspaltung von H₂O und CO, Rechnung zu tragen, sollte diese Formulierung vermieden werden.

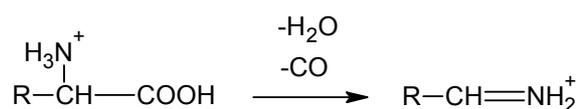


Abbildung B 1-2: Schematische Darstellung der Fragmentierung der AS zum Immonium-Ion.

Das Immonium-Ion wurde bei 18 von 22 untersuchten AS beobachtet, wobei es bei 13 dieser AS (Ala, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val) das Hauptprodukt darstellte. Bei Ala, Gly, Ile, Phe, Pro und Val war es bei der spezifischen Fragmentierungsenergie das einzig entstehende Produkt, bei Leu wurde daneben noch das Fragment m/z 30 ($\text{CH}_2=\text{NH}_2^+$) gebildet, welches ebenso wie m/z 44 ($\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}_3^+$) ein charakteristisches Spaltprodukt der länger-kettigen

Aminosäuren ist (Budzikiewicz und Schäfer 2005). Diese beiden Fragmente wurden in vorliegender Untersuchung bei höherer Stoßenergie zusätzlich zum Immonium-Ion auch bei Ile detektiert (vgl. Tabelle B 1-1).

Nach einer Publikation von Rogalewicz *et al.* (2000), in der Untersuchungen zum genauen Fragmentierungsmechanismus der proteinogenen α -AS unter ESI_{pos}-Bedingungen nach CID vorgestellt werden, zeigten lediglich Arg, Lys und Trp von den 20 proteinogenen AS die Fragmentierung zum Immonium-Ion nicht. Petritis *et al.* (2000) hingegen detektieren auch für Trp das Immonium-Ion. Unsere Studien bestätigen die Ergebnisse von Rogalewicz *et al.* (2000), da nur Arg, Lys und Trp sowie Orn, welches von den Autoren nicht untersucht wurde, die Bildung des Immonium-Ions nicht zeigten.

Postuliert wird für Arg, Lys und Trp eine initiale Protonierung der Seitenkette, die einen anderen Fragmentierungsweg als bei den übrigen AS bedingt. Die Fragmentierung ist beispielhaft für Arg ($[M+H]^+$ m/z 175) in Abbildung B 1-3 dargestellt.

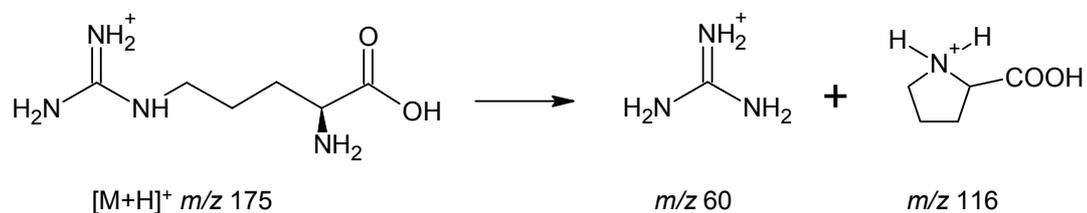


Abbildung B 1-3: Fragmentierung von Arginin nach CID (ESI_{pos}-MS/MS). Aus der an der Seitenkette protonierten Aminosäure ($[M+H]^+$ m/z 175) spaltet sich die Guanidgruppe ab (-59u), so dass protoniertes Guanidin (m/z 60) und das Fragment m/z 116 detektiert werden.

Als spezifische Fragmentierungsreaktion von Arg tritt nach Protonierung der Guanidinstruktur der Verlust dieser funktionellen Gruppe auf (-59u), was zum Fragment m/z 116 sowie zum protonierten Guanidin (m/z 60) führt.

Das Hauptprodukt für Arg ist m/z 70, welches aus dem Fragment m/z 116 durch Verlust von H_2O und CO gebildet wird. Zusätzlich wird für Arg unter vorliegenden

Bedingungen auch die Abspaltung von NH_3 (-17u, m/z 158) sowie der daran anschließende Verlust von H_2O und CO (m/z 112) beobachtet.

Bei Trp und Lys dominiert nach Protonierung der Verlust von NH_3 (-17u), wobei bei Lys ein cyclisches Zwischenprodukt auftritt, welches anschließend H_2O und CO verliert, so dass bei Lys die Hauptproduktion m/z 84 (-63u) entsteht. Trp zeigt nach dem Verlust von NH_3 als Hauptproduktion m/z 188. Für diese AS ist unklar, warum keine Abspaltung von H_2O und CO beobachtet wird, insbesondere da Trp und His große strukturelle und energetische Ähnlichkeiten aufweisen und bei His diese Abspaltung, wenn auch mit einem anderen Mechanismus als bei den übrigen AS, auftritt (Rogalewicz *et al.* 2000). Nicht untersucht wurde von diesen Autoren Ornithin, für welches in unseren Studien ebenfalls bei keiner der verschiedenen Stoßenergien die Bildung des Immonium-Ions beobachtet wurde (vgl. Abbildung B 1-1, S. 53).

Auch in den Untersuchungen von Qu *et al.* (2002b) sowie Piraud *et al.* (2003) wurde das Immonium-Ion von Orn, welches theoretisch ein Masse-Ladungs-Verhältnis von m/z 87 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 133, Bildung Immonium-Ion -46u) aufweisen müsste, nicht detektiert.

Piraud *et al.* (2003) beschreiben die Hauptproduktion bei der spezifischen Kollisionsenergie von Orn m/z 70 durch den Verlust von NH_3 aus dem Immonium-Ion. Dies wäre denkbar, sofern das Immonium-Ion bei dieser Kollisionsenergie bereits so weit fragmentiert wäre, dass es selbst nicht mehr detektiert wird. Allerdings bestehen begründete Zweifel an dieser Annahme. Zum einen konnte in unseren Untersuchungen, wie erwähnt, bei keiner Kollisionsenergie das Immonium-Ion gefunden werden. Zum anderen unterscheidet sich Ornithin strukturell von Lysin nur durch eine CH_2 -Gruppe in der Seitenkette, so dass ein ähnlicher Fragmentierungsmechanismus wie für Lysin, d.h. keine Bildung des Immonium-Ions, angenommen werden kann. Demzufolge ist davon auszugehen, dass auch Ornithin nach CID kein Immonium-Ion zeigt. Dominiert wird die Fragmentierung von Orn, übereinstimmend mit der Fragmentierung von Lys, durch die Abspaltung von NH_3 (-17u) sowie den anschließenden Verlust von H_2O und CO (Hauptproduktion m/z 70). Bei anderen Kollisionsenergien wird außerdem die Abspaltung von Wasser (-18u, m/z 115) beobachtet (vgl. Abbildung B 1-1).

Die Bildung des Immonium-Ions tritt bei den übrigen AS mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette in Konkurrenz mit dem bereits erwähnten Verlust von NH_3 (-17u), der bei Orn beschriebenen Eliminierung von H_2O (-18u) sowie der Abspaltung weiterer, kleiner Moleküle aus der Seitenkette. Da diese Schritte auch aufeinanderfolgend stattfinden, werden als weitere charakteristische Fragmentierungsreaktionen bei einigen AS der Verlust von -63u (Abspaltung in unterschiedlicher Reihenfolge von NH_3 , CO und H_2O) sowie der Verlust von -64u (Abspaltung in unterschiedlicher Reihenfolge von H_2O , CO und H_2O) beobachtet.

Cys ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 122) zeigt neben dem Immonium-Ion durch den Verlust von NH_3 ein deutliches Fragment bei m/z 105, aus welchem weiterhin H_2O abgespalten wird (Fragment m/z 87).

Wie bei Cys wird NH_3 auch bei Met, Tyr und Asn eliminiert, wobei die Abspaltung bei Asn auch an der Seitenkette erfolgen könnte. Bei Tyr entsteht zusätzlich das Tropylium-Kation ($[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, m/z 91) aus der aromatischen Seitenkette (Gross 2004).

Die Abspaltung von Wasser tritt bei Ser ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 106) auf. Neben dem dominierenden Immonium-Ion (m/z 60) wird als Fragment m/z 88 detektiert, aus welchem nochmals H_2O eliminiert wird (-18u, m/z 70).

Ebenfalls abgespalten wird H_2O bei Thr, Asp und Glu, wobei im Falle von Thr die Fragmentierung ausschließlich an der Seitenkette stattfindet, wohingegen bei Asp und Glu auch die Carboxylgruppe beteiligt sein kann (Rogalewicz *et al.* 2000).

Als Hauptproduktion von Asn und Asp entsteht nach der Abspaltung von NH_3 (Asn) bzw. H_2O (Asp) durch den Verlust von CH_2CO das charakteristische Fragment m/z 74. *N*AcCys und *N*AcTyr fragmentieren analog zu den entsprechenden nicht-acetylierten AS, wobei zusätzlich die Abspaltung von Keten (CH_2CO , -42u) aus der Acetylgruppe auftritt. Dieses Fragment ist im Falle von *N*AcCys das Hauptprodukt, bei *N*AcTyr dominiert das Immonium-Ion des Tyrosins (m/z 136), welches nach Abspaltung der Acetylgruppe entsteht. Zusätzlich wird für beide acetylierten AS der Verlust von -88u registriert, was der Eliminierung von CH_2CO sowie H_2O und CO entspricht.

Tabelle B 1-1: Fragmentierungsmuster von 22 AS nach ESI_{pos}-MS/MS-Analyse. Fettgedruckte Zahlen zeigen das Precursorion $[M+H]^+$ sowie das Hauptproduktion. -17u: Verlust von NH₃, -18u: Verlust von H₂O, -42u: Verlust von CH₂CO aus der Acetylgruppe, -46u: Verlust von H₂O und CO, ergibt Immonium-Ion, -63u: Verlust von NH₃ sowie H₂O und CO, -64u: Verlust von H₂O sowie H₂O und CO, -88u: Verlust von CH₂CO sowie H₂O und CO. Für Ile wurde als zweite optimale Energie diejenige aufgenommen, bei welcher das Produktion m/z 69 die größte Intensität aufweist.

AS	optimale Energie [eV]	$[M+H]^+$ (m/z)	- 17 u (m/z)	- 18 u (m/z)	- 42 u (m/z)	- 46 u (m/z)	-63 u (m/z)	- 64 u (m/z)	- 88 u (m/z)	weitere Produktionen (m/z)
NAcCys	-15	164.0		146.0	122.0	117.9			76.0	
NAcTyr	-20	224.0			182.0	178.0			136.0	165.0 ^a
Ala	-15	90.1				44.1				
Arg	-20	175.0	157.9				112.0			130.0, 116.0 ^b , 70.2^c , 60.1 ^d
Asn	-20	133.1	116.0			87.1	70.1			88.1, 74.0^e , 46.1
Asp	-20	134.1		116.0		88.0		70.1		74.0^e , 46.1, 43.1
Cys	-20	122.1	105.1			76.1	59.2			87.1 ^f
Glu	-20	148.0		130.0		102.0		84.0		56.1 ^g
Gly	-35	76.0				30.2				
His	-20	156.0				110.1	93.0			95.0, 83.0
Ile	-15	132.0				86.1				
	-20	132.0				86.1	69.1			44.2, 30.2
Leu	-15	132.0				86.1				30.2
Lys	-20	147.1	130.0				84.1			
Met	-15	150.0	133.0			104.0				102.0 ^h , 74.1, 61.0 ⁱ , 56.1 ^j
Orn	-20	133.1	116.0				70.1			
Phe	-15	166.2				120.1				
Pro	-20	116.1				70.1				
Ser	-15	106.0		88.0		60.1				70.0 ^k
Thr	-15	120.0		102.0		74.1		56.1		83.9 ^k
Trp	-15	205.0	188.0							146.0
Tyr	-20	182.1	165.0			136.1	119.0			123.0, 91.1 ^l
Val	-15	118.0				72.1				

a: Verlust von NH₃-Elimination nach Elimination von CH₂CO und/oder -59u, b: Fragment durch Verlust der Guanidingruppe (-59 u), c: Verlust von H₂O und CO aus Fragment m/z 116, d: protonierte Guanidingruppe, e: Verlust von CH₂CO (-42 u) nach NH₃- bzw. H₂O-Eliminierung, f: Verlust von H₂O nach NH₃-Elimination, g: Verlust von CO aus Fragment m/z 84, h: Verlust von CH₃SH (- 48u), i: Fragment m/z CH₃SCH₂⁺, j: Fragment m/z CH₃SCH₂⁺, k: Verlust von H₂O an der Carboxylgruppe nach H₂O-Elimination aus der Seitenkette, l: Benzyl- bzw. Tropylium-Kation aus der aromatischen Seitenkette.

1.1.2 Fragmentierung der stabil-isotopenmarkierten Aminosäuren

In gleicher Weise wurde das Fragmentierungsverhalten der stabil-isotopenmarkierten Referenz-Aminosäuren bestimmt. Dieses entspricht erwartungsgemäß im Wesentlichen dem der entsprechenden unmarkierten AS.

Neben der Bildung des Immonium-Ions werden auch hier die typischen, in Kapitel B 1.1.1 ausführlich beschriebenen Fragmente detektiert.

Unterschiedliche Fragmentmassen ergeben sich aufgrund der Isotopenmarkierung und den damit verbundenen unterschiedlichen Massen der Verbindungen.

Beispielsweise wird die Bildung des Immonium-Ions im Falle von $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_1$ -Ile, $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_1$ -Thr und $^{13}\text{C}_6$ -His durch den Verlust von -47 u erreicht, da eine ^{13}C -Isotopenmarkierung an der Carboxylgruppe sitzt und somit ^{13}CO und H_2O abgespalten werden. Die Abspaltung von NH_3 aus D_5 -Trp wird durch den Verlust von -18u dargestellt, da die Eliminierung wie bei Trp beschrieben an der Seitenkette erfolgt, wo bei vorliegender Isotopenmarkierung ein Deuterium-Ion sitzt.

Die genauen Ergebnisse der Fragmentierungsstudien der 20 IS sind in Tabelle B 1-2 zusammengefasst.

Aus den Daten der Fragmentierungsstudien werden die ermittelten Precursor- und Produktionen sowie die spezifischen Fragmentierungsenergien der jeweiligen AS bzw. IS zur Erstellung der SRM-Methode verwendet werden.

Das genaue Fragmentierungsmuster ist für die zu entwickelnde HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode insofern von Bedeutung, als dass dadurch Interferenzen innerhalb der Analyten entdeckt werden, welche vor der ESI-MS/MS-Analyse chromatographisch getrennt werden müssen.

Die sich aufgrund der Fragmentierungsstudien ergebenden Interferenzen zwischen AS und IS sind in im folgenden Kapitel (B 1.1.3) zusammengestellt.

Tabelle B 1-2: Fragmentierungsmuster von 21 IS nach ESI_{pos}-MS/MS-Analyse. Fettgedruckte Zahlen zeigen das Precursorion $[M+H]^+$ sowie das Hauptprodukt. Bedingt durch die Isotopenmarkierung ergeben sich für den formalen Verlust bestimmter funktioneller Gruppen teils unterschiedliche Massendifferenzen.

IS	optimale Energie (eV)	$[M+H]^+$ (m/z)	- NH ₃ (m/z)	- H ₂ O (m/z)	-H ₂ O, -CO (m/z)	-NH ₃ , -H ₂ O, -CO (m/z)	-H ₂ O, -H ₂ O, -CO (m/z)	weitere Produktionen (m/z)
D ₂ -NAcCys	-15	166.2		148.1	120.1			124.1^a , 78.1 ^b
D ₃ -Ala	-15	93.1			47.1			
¹³ C ₆ -Arg	-25	181.2						121.0 ^c , 74.1^d , 61.1 ^e
¹³ C ₄ -Asn	-20	137.1	120.0		90.1			76.0^f , 46.2
D ₃ -Asp	-20	137.1		119.0	91.1			75.0^f , evtl.47.1
D ₂ -Cys	-20	124.2	107.1		78.2	61.1		89.1 ^g
D ₅ -Glu	-20	153.2		134.9	107.0		88.1	60.1 ^h
D ₂ -Gly	-25	78.1			32.1			50.1 ⁱ
¹³ C ₆ -His	-20	162.1			115.1			100.1, 87.1
¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	-15	139.2			92.1			
D ₃ -Leu	-15	135.1			89.1			
¹³ C ₂ -Lys	-20	149.1				85.1		
D ₃ -Met	-15	153.1	136.0		107.1			102.1 ^j , 56.1 ^k
D ₆ -Orn	-20	139.2	122.1			76.1		
D ₅ -Phe	-15	171.1			125.1			
D ₇ -Pro	-20	123.2			77.1			
D ₃ -Ser	-20	109.1		91.0	63.2			73.1 ^l
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	-15	125.1		107.1	78.1		60.1	89.1 ^l
D ₅ -Trp	-15	210.1	192.0					150.0
¹³ C ₆ -Tyr	-15	188.2	171.2		142.2			129.0
D ₈ -Val	-15	126.2			80.2			

a: Verlust von CH₂CO, b: Verlust von CH₂CO sowie H₂O und CO, c: Verlust der ¹³C₁- Guanidin-Gruppe, d: Verlust von H₂O und ¹³CO aus Fragment m/z 121, e: protonierte ¹³C₁- Guanidin-Gruppe, f: Verlust von CH₂CO nach NH₃- bzw. H₂O-Elimination, g: Verlust von H₂O nach NH₃-Elimination, h: Verlust von CO aus Fragment m/z 88, i: Verlust von CO (Rogalewicz und Hoppilliard 2000), j: Verlust von CD₃SH (- 51u), k: Fragment m/z CH₃SH, l: Verlust von H₂O an der Carboxylgruppe nach H₂O-Elimination aus der Seitenkette

1.1.3 Interferenzen innerhalb der Analyten

Aus den Ergebnissen der Fragmentierungsstudien ergeben sich verschiedene Interferenzen innerhalb der AS und ihren isotopenmarkierten Referenzsubstanzen, welche die chromatographische Trennung bestimmter Analyten vor der MS/MS-Analyse bedingen.

Wichtige Interferenzen sind durch isobare bzw. isomere Substanzen bedingt.

So zeigten die Konstitutionsisomere **Leu** und **Ile** neben dem gleichen m/z -Verhältnis für das Precursorion ($[M+H]^+$ m/z 132) auch das gleiche Hauptprodukt m/z 86. Zwar wurde bei Ile das Fragment m/z 69 mit einer deutlichen Intensität detektiert, welches bei den gewählten Bedingungen der Fragmentierungsstudien für Leu nicht identifiziert wurde. Dieses Fragmentation konnte auch bei der Methodenentwicklung zur Unterscheidung von Leu und Ile eingesetzt (Kapitel B 1.2 und B 2) werden, es eignet sich aber nur bedingt als spezifischer Übergang zur Quantifizierung, wie es von bestimmten Autoren vorgeschlagen bzw. praktiziert wurde (Piraud *et al.* 2003; Gu *et al.* 2007). Dies resultiert daher, dass auch für Leu nach CID bei den untersuchten Kollisionsenergien das Fragment m/z 69 detektiert wurde, allerdings mit relativen Intensitäten $< 5\%$, so dass es in den Ergebnissen der Fragmentierungsstudien nicht auftaucht. Im Hinblick auf die spätere Anwendung der Methode zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen in der pharmazeutischen Routineanalytik mit der dort geforderten Richtigkeit dürfte der Fehler, der sich durch die Miterfassung des Leu-Fragments bei der Quantifizierung von Ile ergeben würde, zu groß sein. Die Quantifizierung von Ile anhand des spezifischen Übergangs m/z 132 \rightarrow m/z 69 sollte daher nur in Betracht gezogen werden, wenn bestimmte Fehlergrenzen tolerierbar sind und vor allem auf eine rasche Analyse Wert gelegt wird. Beispielhaft seien hier Methoden zur Quantifizierung von AS in Humanblut zur Diagnose von Störungen des Aminosäurenstoffwechsels (Piraud *et al.* 2005b) sowie zur Analyse des Aminosäurenmetabolismus von Pflanzen (Gu *et al.* 2007) genannt.

Zwei neuere Untersuchungen nutzen zur Quantifizierung von Leu und Ile ohne chromatographische Trennung mittels ESI-MS/MS spezifische Fragmentationen, die nach CID mit Argon aus dem in der Ionenquelle durch Dissoziation entstandenen

Immonium-Ion gebildet werden. Gemessen werden als spezifische Übergänge m/z 86 \rightarrow m/z 57 für Ile und m/z 86 \rightarrow m/z 43 für Leu (Bishop *et al.* 2007; Dell'mour *et al.* 2010). Beide Fragmente wurden auch in unseren Studien detektiert, allerdings nur bei sehr hohen Kollisionsenergien und nur mit sehr geringen Intensitäten. Zudem stellt sich bei Verwendung solch kleiner Fragmente als spezifische Produktionen das Problem, dass es zu Interferenzen mit anderen AS kommen kann, die ebenfalls Fragmente mit dem gleichen m/z -Verhältnis bilden. So wurde beispielsweise in unseren Studien, wenn auch nur in geringer Intensität, das Produktion m/z 43 auch bei der Fragmentierung von Asn, Asp, Arg, Glu, His, NAcTyr und NAcCys gebildet. Die Eignung der von Bishop *et al.* (2007) vorgeschlagenen spezifischen Übergänge zur Quantifizierung von Leu und Ile für die vorliegende Anwendung ist daher sehr fraglich und wurde aufgrund der anzustellenden ausführlichen Studien hinsichtlich Interferenzen mit andern AS bzw. IS nicht weiter verfolgt.

Isobare Moleküle ergaben weitere Interferenzen. So zeigten **Asn** und **Orn** ($[M+H]^+$ jeweils m/z 133) beide Produktionen bei m/z 116 und m/z 70, so dass die chromatographische Trennung Voraussetzung zur Quantifizierung dieser beiden AS ist. Zudem sind diese beiden Produktionen isobar zum Precursor- und Hauptproduktion von **Pro**, so dass auch hier eine Basislinientrennung gefordert ist. Gleiches gilt für **Phe** und **D₂-NAcCys** ($[M+H]^+$ jeweils m/z 166), die beide ein Produktion m/z 120 aufweisen, sowie für **D₃-Met** und **D₅-Glu** ($[M+H]^+$ jeweils m/z 153), bei deren Fragmentierung in beiden Fällen ein Produktion m/z 107 entsteht.

Ein weiterer Grund für Interferenzen ist die natürliche Isotopenverteilung. In organischen Molekülen kommen natürlicherweise ca. 1.1% ^{13}C vor, bei schwefelhaltigen Verbindungen 4.4% ^{34}S (McLafferty und Tureček 1995; Riedel 2004). Daraus ergeben sich je nach Anzahl der C- bzw. S-Atome im Molekül unterschiedliche Anteile der Isotope $[M+1+H]^+$ bzw. $[M+2+H]^+$. Sofern sich Analyten nur durch eine Masseinheit bzw. im Fall der schwefelhaltigen Substanzen um zwei Masseinheiten unterscheiden, kann es ohne chromatographische Trennung zu Fehlern bei der Quantifizierung kommen.

Dies ist für **Lys** ($[M+H]^+$ m/z 149) und **Glu** ($[M+H]^+$ m/z 150) von Bedeutung, die beide als Hauptproduktion m/z 84 aufweisen. Chromatographische Trennung ist notwendig, damit das ^{13}C -Isotop von Lys ($[M+1+H]^+$ m/z 150) nicht die Quantifizierung von Glu stört. In diesem Fall bedingt auch die isotopenmarkierte Referenz $^{13}\text{C}_2\text{-Lys}$ ($[M+H]^+$ m/z 149, Produktion m/z 85) die notwendige Trennung von Glu, da sich deren Precursor- bzw. Produktion nur um eine Masseinheit von Precursor- bzw. Produktion von Glu unterscheiden. Gleiches gilt für **Leu** und **Ile** ($[M+H]^+$ m/z 132, Produktion m/z 86) in Verbindung mit **Asn** ($[M+H]^+$ m/z 133, Produktion m/z 87) sowie für **Asn** ($[M+H]^+$ m/z 133) und **Asp** ($[M+H]^+$ m/z 134) mit den Produktionen m/z 74. Zudem erfordern auch deren isotopenmarkierte Referenzen $^{13}\text{C}_4\text{-Asn}$ ($[M+H]^+$ m/z 137, Produktion m/z 76) und **D₃-Asp** ($[M+H]^+$ m/z 137, Produktion m/z 75) die chromatographische Trennung, da ansonsten das ^{13}C -Isotop des Produktions von D₃-Asp mit dem Produktion $^{13}\text{C}_4\text{-Asn}$ interferiert. Auf die gleiche Weise kann der Isotopenpeak von **Asp** ($[M+H]^+$ m/z 134, Produktion m/z 88) die Quantifizierung von **D₃-Leu** ($[M+H]^+$ m/z 135, Produktion m/z 89) stören. Auch bei **D₂-Cys** ($[M+H]^+$ m/z 124, Produktion m/z 78) und $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_1\text{-Thr}$ ($[M+H]^+$ m/z 125, Produktion m/z 78) bedingt die natürliche Isotopenverteilung chromatographische Trennung zur exakten Quantifizierung.

Weitere Interferenzen ergaben sich durch das Fragmentierungsmuster der Substanzen, teils in Kombination mit deren natürlichen Isotopenverteilung. **Arg** zeigt Produktionen mit m/z 116 und m/z 70, die isobar zum Precursor- und Hauptproduktion von **Pro** sowie zu den Fragmenten von **Asn** und **Orn** sind. **Cys** zeigt zwei Fragmente (m/z 105 und m/z 59), deren ^{13}C -Isotope die Quantifizierung von **Ser** ($[M+H]^+$ m/z 106, Hauptproduktion m/z 60) stören können. Fragmente von **Met** (m/z 133 und m/z 74) interferieren mit Precursor- und Produktionen von **Asn** und **Orn**. Die acetylierten AS *N*AcCys und *N*AcTyr zeigen nach Verlust der Acetylgruppe Fragmente, welche den spezifischen Precursor- und Produktionen ihrer nicht-acetylierten Analoga entsprechen (*N*AcCys: Produktionen m/z 122 und m/z 76, *N*AcTyr: Produktionen m/z 182 und m/z 136). Demzufolge müssen auch *N*AcCys und **Cys** sowie *N*AcTyr und **Tyr** getrennt werden.

Die aufgeführten Interferenzen sind in Tabelle B 1-3 zusammengefasst.

Diese waren bei der Methodenentwicklung zu berücksichtigen. Zur genauen Quantifizierung der Analyten ist eine Basislinientrennung der genannten interferierenden Substanzen Voraussetzung.

Tabelle B 1-3: Übersicht über die Interferenzen von Precursor- und Produktionen von AS und ihrer IS, die bei der HPLC-MS(/MS)-Analyse von Bedeutung sind. Substanzen, die zusammen in einer Zeile aufgeführt sind, müssen vor der massenspektrometrischen Quantifizierung chromatographisch getrennt werden.

Analyt	Precursorion	Produktion	Produktion	Grund
Leu	132	86		Konstitutions- isomere
Ile	132	86		
Phe	166	120		isobare Substanzen
D₂-NAcCys	166	120		
D₅-Glu	153	107		isobare Substanzen
D₃-Met	153	107		
Pro	116	70		isobare Substanzen bzw. Fragmente
Asn	133	116	70	
Orn	133	116	70	
Arg	175	116	70	
Met	150	133	74	isobare Substanzen bzw. Fragmente
Asn	133	74		
Orn	133	74		
Ser	106	60		isobare Substanzen bzw. Fragmente
Cys	122	106	59	
NAcCys	164	122	76	isobare Substanzen bzw. Fragmente
Cys	122	76		
NAcTyr	224	182	136	isobare Substanzen bzw. Fragmente
Tyr	182	136		
Asn	133	74		natürliche
Asp	134	74		Isotopenverteilung
Asp	134	88		natürliche
D₃-Leu	135	89		Isotopenverteilung
¹³ C ₄ - Asn	137	76		natürliche
D₃-Asp	137	75		Isotopenverteilung
Lys	147	84		natürliche
Glu	148	84		Isotopenverteilung
¹³ C ₂ - Lys	149	85		
Leu	132	86		natürliche
Ile	132	86		Isotopenverteilung
Asn	133	87		
D₂-Cys	124	78		natürliche
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ - Thr	125	78		Isotopenverteilung

1.1.4 Fragmentierung weiterer Substanzen

Neben den Aminosäuren und ihren isotopenmarkierten Referenzen wurde das Fragmentierungsmuster für fünf weitere Substanzen bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt D 1.2.). Diese Studien wurden durchgeführt, da die Substanzen aus verschiedenen Gründen in die spätere Methode integriert werden könnten.

Als mögliche Nebenprodukte können unter Umständen Pyroglutaminsäure (Pyr) sowie Methioninsulfoxid (MSO) Bestandteil von Infusionslösungen sein. Pyr kann bei Erhitzung aus Glu entstehen und könnte so infolge des Sterilisationsprozesses in die Untersuchungslösungen gelangen. MSO, das Oxidationsprodukt von Met, könnte bei zu hoher Sauerstoffkonzentration in der Lösung entstehen. Cystin ((Cys)₂) wurde auch untersucht, da es in bestimmten AS-Infusionslösungsformulierungen sowohl als physiologischer Bestandteil oder in diesen als Oxidationsprodukt von Cystein vorkommen kann.

Anhand der Kenntnis von Precursor- sowie Produktionen lässt sich während der Methodenentwicklung die generelle Eignung der Methode zur Analyse dieser Substanzen prüfen.

In Tabelle B 1-4 sind die Ergebnisse dieser Fragmentierungsstudien dargestellt.

Tabelle B 1-4: Fragmentierungsmuster von fünf weiteren Substanzen nach ESI_{pos}-MS/MS-Analyse.

Substanz	optimale Energie [eV]	[M+H] ⁺ (m/z)	Haupt-Produktion (m/z)	weitere Fragmente (m/z)
(Cys) ₂	-20	241.1	152.1	195.1, 120.1, 122.1, 74.2
D ₄ -(Cys) ₂	-20	245.2	154.0	199.1, 122.1, 74.1
MSO	-20	166.2	74.1	149.1, 102.1, 75.1, 56.2
Pyr	-20	130.2	84.1	
D ₇ -Pyr	-20	137.2	89.2	

Bei der Fragmentierung von Pyroglutaminsäure (Pyr) und der isotopenmarkierten Referenz D₇-Pyr entstand ausschließlich das Immonium-Ion (-46u bzw. aufgrund der Deuterierung -48u). Weitere, in der Literatur beschriebene Fragmente (Piraud *et al.* 2003) wurden nicht beobachtet.

Methioninsulfoxid (MSO) zeigte neben der Abspaltung von Ammoniak ($[M+H-NH_3]^+$ m/z 149) die für Methionin typischen Fragmente (vgl. Tabelle B 1-1).

Das Fragmentierungsmuster von Cystin entsprach im Wesentlichen den bisher schon bekannten Daten (Piraud *et al.* 2003; Thiele *et al.* 2008). Als Hauptproduktion entstand m/z 152 (-89u). Weitere Fragmente sind bei dieser Kollisionsenergie protoniertes Cystein (m/z 122.1), das aus (Cys)₂ gebildete Immonium-Ion (m/z 195.1, -46u) sowie m/z 120.1 und m/z 74.2. Analog wird ihre isotopenmarkierte Referenzsubstanz D₄-(Cys)₂ fragmentiert.

1.2 IP-HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung

Wie einleitend beschrieben (Abschnitt A 3.3.1), sind verschiedene Verfahren zur Quantifizierung von underivatisierten AS mittels IP-RP-HPLC-MS/MS publiziert. In einem ersten Schritt wurde die von Piraud *et al.* (2005b) beschriebene Methode auf die vorliegenden Bedingungen übertragen.

1.2.1 Übertragung der HPLC-MS/MS-Methode

Die generelle Übertragbarkeit der HPLC-MS/MS-Methode auf unsere Bedingungen wurde in Vorversuchen geprüft, und es wurden verschiedene Parameter optimiert (vgl. Abschnitt D 1.3.1).

Abweichend zur publizierten Methode wurde am Ende des HPLC-Gradienten ein Spülschritt mit 100% ACN eingefügt, um auf der Säule akkumuliertes Ionenpaar-reagenz zu entfernen und so das in der Literatur beschriebene (Qu *et al.* 2002b; Piraud *et al.* 2005b) kontinuierliche Ansteigen der Retentionszeiten der Analyten im Verlauf einer Messreihe zu minimieren.

Der HPLC-MS/MS-Lauf wurde nach vorausgehenden Studien zur Ermittlung der Retentionszeiten der AS in drei Segmente eingeteilt, um so die Anzahl der Scan-Events pro Zeiteinheit zu verringern und damit eine erhöhte Empfindlichkeit zu erreichen. Im Bereich von 0-4 min wurden die spezifischen Übergänge von neun AS (NAcCys, Ala,

Asn, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser und Thr) gemessen. Von 4-11 min eluierten sieben AS (NAcTyr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr). Zuletzt werden im Bereich von 11-15 min Arg, His, Lys, Orn, Trp (fünf AS) detektiert.

Mit der optimierten IP-RP-HPLC-MS/MS-Methode (Abschnitt D 1.3.2) erfolgte die Analyse einer Mischung von 21 AS (Konzentration je 10 $\mu\text{mol/L}$).

Abbildung B 1-4 zeigt exemplarisch das bei der Messung dieser Mischung erhaltene Totalionenchromatogramm (TIC, „total ion chromatogram“). In Abbildung B 1-5 sind die einzelnen, extrahierten Ionenchromatogramme (XIC, „extracted ion chromatogram“) der spezifischen Übergänge der AS dargestellt.

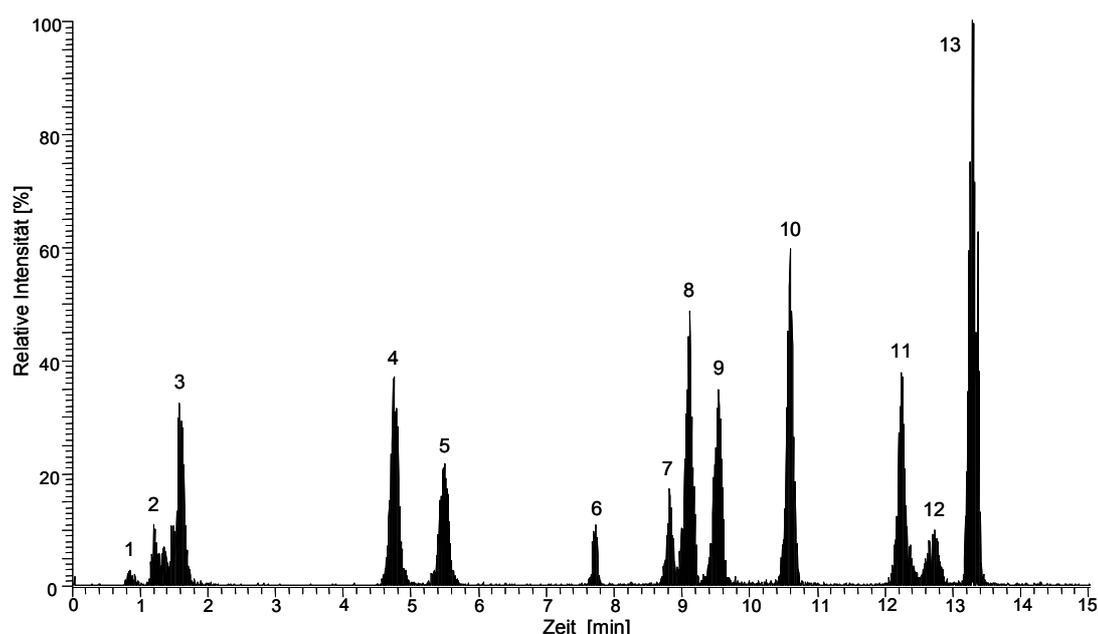


Abbildung B 1-4: Chromatogramm (TIC) der IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Untersuchung einer Mischung von 21 AS (je 10 $\mu\text{mol/L}$).

Säule: QS UptiSphere BP2 (3 μm , 50 mm x 2 mm, Interchim, Montluçon, Frankreich), Gradientenelution mit TDFHA als Ionenpaarreagenz. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

Peak 1: Asp ($t_R = 0.88$ min), Peak 2: Asn ($t_R = 1.16$ min), Ser ($t_R = 1.19$ min), Glu ($t_R = 1.24$ min), NAcCys ($t_R = 1.25$ min), Gly ($t_R = 1.28$ min), Thr ($t_R = 1.38$ min), Peak 3: Ala ($t_R = 1.51$ min), Pro ($t_R = 1.61$ min), Peak 4: Val ($t_R = 4.76$ min), Peak 5: Met ($t_R = 5.50$ min), Peak 6: NAcTyr ($t_R = 7.71$ min), Peak 7: Tyr ($t_R = 8.82$ min), Peak 8: Ile ($t_R = 9.11$ min), Peak 9: Leu ($t_R = 9.55$ min), Peak 10: Phe ($t_R = 10.60$ min), Peak 11: His ($t_R = 12.24$ min), Peak 12: Orn ($t_R = 12.71$ min), Peak 13: Trp ($t_R = 13.28$ min), Lys ($t_R = 13.35$ min), Arg ($t_R = 13.36$ min)

Wie aus den Chromatogrammen (Abbildung B 1-4 und Abbildung B 1-5) ersichtlich ist, wurden alle AS innerhalb von 14 min eluiert. Die vorgenommene Einteilung des Laufs in drei Segmente ist möglich, so dass sich eine gesteigerte Empfindlichkeit aufgrund der verringerten Anzahl an Scan-Events pro Zeiteinheit ergibt.

Die sauren AS sowie diejenigen AS mit polaren Seitenketten werden erfahrungsgemäß unter den Bedingungen der IP-HPLC mit TDFHA als Ionenpaarreagenz kaum zurückgehalten (Waterval *et al.* 2009). Dies wird durch unsere Untersuchungen bestätigt (vgl. Abbildung B 1-5).

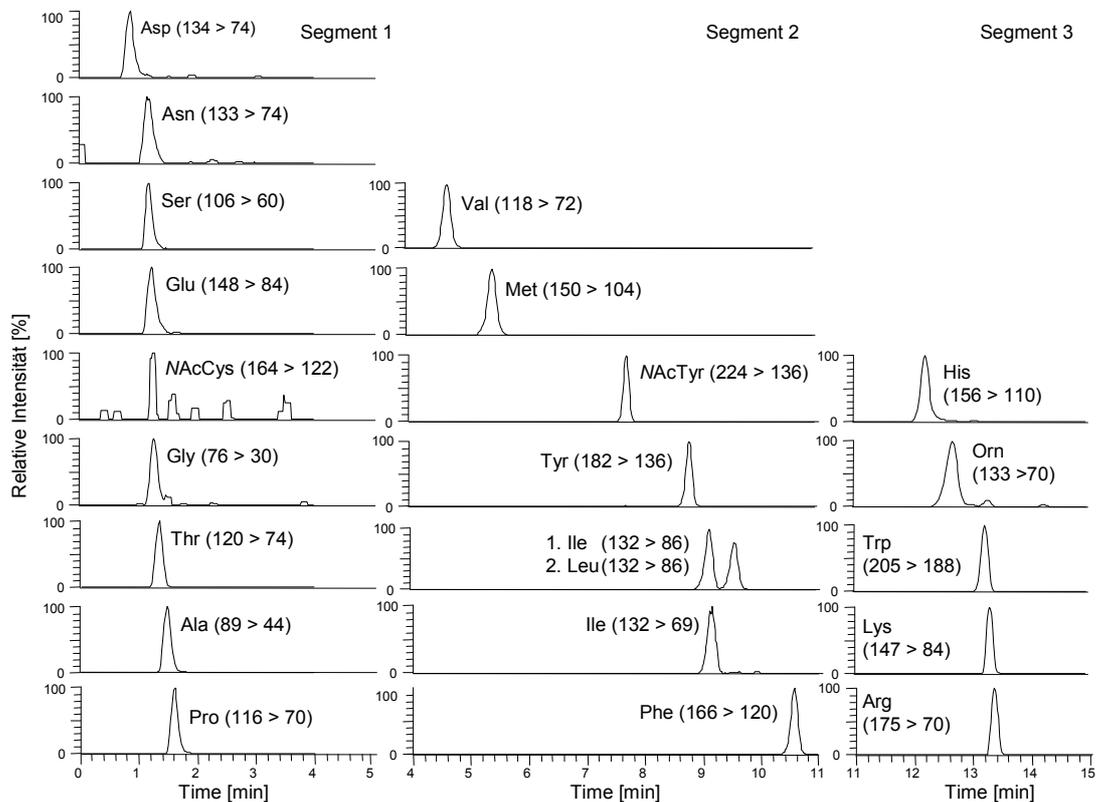


Abbildung B 1-5: HPLC-ESIpos-MS/MS-Chromatogramm der Untersuchung einer Lösung von 21 AS (je 10 µmol/L). Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der spezifischen Übergänge der einzelnen AS.

Säule: QS UptiSphere BP2 (3 µm, 50 mm x 2 mm, Interchim, Montluçon, Frankreich), Gradientenelution mit TDFHA als Ionenpaarreagenz. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

Neben den sauren Aminosäuren Asp und Glu wurden in den ersten beiden Minuten die polaren AS Asn, Ser, Thr und NAcCys (polar aufgrund der Thiol-Gruppe) detektiert, wobei kaum eine Trennung erfolgte. Zusätzlich eluierten parallel Gly, Ala und Pro, die eigentlich zu den AS mit unpolaren Seitenketten zählen. Deren geringe Retention ist durch die schwachen Wechselwirkungen mit der stationären Phase zu erklären, welche durch die geringe Lipophilie der Seitenkette bedingt sind.

Wie sich aus den Ergebnissen der Fragmentierungsstudien ergab, ist aufgrund von Interferenzen zwischen bestimmten Analyten eine chromatographische Trennung Voraussetzung zur exakten Quantifizierung (vgl. Kapitel B 1.1.3). In dieser Elutionsgruppe ist die Trennung von Asn und Asp sowie von Asn und Pro gefordert. Wie aus Abbildung B 1-5 zu entnehmen ist, eluierten Asp (t_R : 0.88 min) und Asn (t_R : 1.16 min) getrennt voneinander. Auch Pro und Asn erscheinen getrennt, wobei jedoch keine vollständige Basislinientrennung erfolgte. Hier muss in weiteren Studien geklärt werden, ob deren Trennung zur Quantifizierung ausreicht.

Zwischen ~4.8 min und ~10.6 min (Segment 2) eluierten die weniger polaren AS bzw. die AS mit unpolaren Seitenketten AS Val, Met, NAcTyr, Tyr, Ile, Leu und Phe gemäß ihrer Lipophilie (Chaimbault *et al.* 1999). In diesem Segment erfolgte eine gute Trennung der AS. Leu und Ile, welche aufgrund gleicher m/z -Verhältnisse von Precursor- und Produktion zur exakten Quantifizierung chromatographisch getrennt werden müssen, eluierten basisliniengetrennt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Trennung der beiden AS aufgrund der großen strukturellen und physikalisch-chemischen Ähnlichkeit auch unter IP-HPLC-Bedingungen nicht trivial ist.

Zuletzt verließen in Segment 3 die relativ unpolare AS Trp sowie die basischen AS His, Orn, Lys und Arg die Säule, wobei zwischen Trp, Lys und Arg keine Trennung erfolgte. Arg und Orn, welche aufgrund gleicher Fragmente chromatographisch getrennt werden müssen, eluierten nacheinander.

Weitere wichtige Informationen ließen sich aus der Auswertung der Peakflächen der einzelnen AS gewinnen. Da in vorliegendem Experiment alle AS in der gleichen (Stoffmengen-) Konzentration vorlagen, also die gleiche Teilchenzahl pro Analyt untersucht wurde, kann ein Vergleich der Peakflächen Aufschlüsse über die unter-

schiedliche Ionisierbarkeit der AS bzw. die Empfindlichkeit der Methode für die jeweilige AS geben. Bei der Interpretation der Werte ist jedoch die Einteilung des Laufs in Segmente zu berücksichtigen, da dadurch und der damit einhergehenden unterschiedlichen Anzahl an AS pro Segment (unterschiedliche Anzahl an Scan-Events) die Empfindlichkeit des Massenspektrometers variiert. Demzufolge sind die erhaltenen Werte nur als Richtwerte zu verstehen.

In Tabelle B 1-5 sind die Peakflächen der AS in aufsteigender Reihenfolge dargestellt.

Tabelle B 1-5: Übersicht über Peakfläche (Area) und Retentionszeit von 21 AS nach IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Untersuchung einer Lösung von 21 AS (je 10 µmol/L). Die AS sind nach steigender Peakfläche sortiert. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

AS	Area (FE)	Retentionszeit (min)	Segment
NAcCys	$2.7 \cdot 10^3$	1.25	1
Gly	$2.0 \cdot 10^4$	1.28	1
Asn	$3.1 \cdot 10^4$	1.16	1
Asp	$7.1 \cdot 10^4$	0.88	1
Ser	$1.1 \cdot 10^5$	1.19	1
Thr	$1.6 \cdot 10^5$	1.38	1
NAcTyr	$2.0 \cdot 10^5$	7.71	2
Ala	$2.4 \cdot 10^5$	1.51	1
Glu	$2.5 \cdot 10^5$	1.24	1
Tyr	$3.8 \cdot 10^5$	8.82	2
Orn	$4.5 \cdot 10^5$	12.71	3
Lys	$7.0 \cdot 10^5$	13.35	3
Met	$7.7 \cdot 10^5$	5.50	2
Pro	$7.9 \cdot 10^5$	1.61	1
Arg	$8.8 \cdot 10^5$	13.36	3
Leu	$1.0 \cdot 10^6$	9.55	2
Val	$1.1 \cdot 10^6$	4.76	2
His	$1.2 \cdot 10^6$	12.24	3
Ile 1	$1.3 \cdot 10^6$	9.11	2
Ile 2	$7.2 \cdot 10^4$	9.11	2
Phe	$1.4 \cdot 10^6$	10.60	2
Trp	$2.2 \cdot 10^6$	13.28	3

Wie aus der Tabelle hervorgeht, variierten die Peakflächen und damit die Empfindlichkeit deutlich ($2.7 \cdot 10^3$ FE (NAcCys) bis $2.2 \cdot 10^6$ FE (Trp)). Dieser Effekt ist für die ESI_{pos}-MS/MS- bzw. TOF-MS-Analyse unterivatisierter AS literaturbekannt (Qu *et al.* 2002b; Piraud *et al.* 2003; Armstrong *et al.* 2007).

Bei unserer Studie war die Ionisierbarkeit von *N*AcCys, Gly, Asn und Asp am schlechtesten, da bei gleicher Stoffmengenkonzentration die geringsten Flächen erhalten wurden. Für *N*AcCys liegt dies wohl an der Acetylierung, die eine leichte Protonierung und damit einfache Ionisierung an der basischen Aminogruppe verhindert. Hierfür spricht auch, dass die zweite acetylierte AS (*N*AcTyr) eine relativ geringe Peakfläche lieferte, obwohl die aromatischen AS im Allgemeinen durch eine gute Empfindlichkeit gekennzeichnet sind. Auch von Piraud *et al.* (2003) wurden *N*AcCys, Gly, Asn und Asp mit der geringsten Empfindlichkeit der 21 hier analysierten AS erfasst, wobei allerdings die Reihenfolge in der Literatur eine andere war.

Dass Gly unter ESI_{pos}-MS/MS-Bedingungen mit der geringsten Empfindlichkeit erfasst wird, ist ebenfalls literaturbekannt (Qu *et al.* 2002b; Armstrong *et al.* 2007). Allerdings stellt diese Tatsache für die Quantifizierung von Gly in biologischen Proben (Blut, Urin) laut Schrifttum kein Problem dar, da Gly in den Matrices in hohen Konzentrationen vorliegt. Da auch in den in vorliegender Arbeit zu analysierenden Infusionslösungen Gly den höchsten Gehalt aller enthaltenen AS aufweist (vgl. Tabelle D 1-4, S. 174), sollte auch für diese Anwendung die geringe Ionisierbarkeit von Gly keine Rolle spielen. Dies wird bei der Übertragung der IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode auf die Infusionslösungen geprüft werden.

Etwas anders gestaltet sich die Situation für *N*AcCys. Diese AS liegt in den Infusionslösungen in geringer Konzentration vor (1.23 mmol/L), so dass ihre geringe Ionisierbarkeit evtl. bei der Quantifizierung der AS in den Infusionslösungen zu Problemen führen kann. Bei der Übertragung der IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode auf die Infusionslösungen wird daher auf die Erfassung von *N*AcCys besonderes Augenmerk gelegt werden müssen.

Die größten Peakflächen ergaben bei vorliegender Untersuchung die aromatischen AS Trp, Phe und His sowie die verzweigt-kettigen AS („branched chain amino acids“, BCAA) Ile, Val und Leu, die auch in der Literatur mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen worden sind (Petritis *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003). Pro zeigte in der Literatur teils die beste Ionisierung, was auch für unsere Studie angenommen werden kann. Zwar war die für diese AS unter vorliegenden Bedingungen erhaltene Peakfläche nur die neuntgrößte, allerdings eluiert Pro in Segment 1, in dem mit 9 AS

deutlich mehr AS gleichzeitig analysiert wurden als in Segment 2 (sieben AS) oder Segment 3 (fünf AS). Demzufolge kann von einer besseren Ionisierung, als aus der Tabelle ersichtlich wird, ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass diejenigen AS, welche in der Infusionslösung nur in geringen Konzentrationen enthalten sind (Tyr: 2.21 mmol/L, Trp: 7.83 mmol/L) mit der IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode gut detektierbar sind bzw. AS mit geringer Ionisierbarkeit in den Infusionslösungen in sehr hoher Konzentration vorliegen (Gly). Eine Ausnahme stellt, wie aufgeführt, NAcCys dar.

1.2.2 Übertragung der Methode auf die Infusionslösung unter Einbeziehung der IS

Nachdem wir zeigen konnten, dass die IP-HPLC-MS/MS-Methode prinzipiell unter den gewählten Bedingungen zur Trennung und Identifizierung von Aminosäuren geeignet ist, wurde sie in einem nächsten Schritt auf die Analysenmatrix, also eine handelsübliche Aminosäuren-Infusionslösung, übertragen. Gleichzeitig wurden die isotopenmarkierten AS als interne Standards in die Methode integriert.

Dabei sollte zunächst geklärt werden, ob bei geeigneter Verdünnung alle in der Infusionslösung vorhandenen AS in einem HPLC-MS/MS-Lauf erfasst werden können. Dies war insofern nicht unkritisch als die AS in der Probelösung in deutlich unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen; von der Methode wird also eine hohe Dynamik gefordert. Der jeweilige Bestimmungsbereich der einzelnen AS unterscheidet sich dabei zwischen der konzentriertesten AS (Gly) und der am geringsten in der Infusionslösung vorhandenen AS (NAcCys) um mehr als den Faktor 100 (Konzentration NAcCys: 1.2 mmol/L, Konzentration Gly: ~ 160 mmol/L).

Ein weiterer Parameter, der die gleichzeitige Quantifizierung aller in der Infusionslösung vorhandenen AS limitieren könnte, ist die hohe Anzahl der in einem Lauf zu analysierenden Substanzen. Durch den Zusatz der IS steigt diese auf 40 (21 AS und aktuell 19 IS, da für NAcCys und NAcTyr noch keine isotopenmarkierte

Referenzen vorliegen). Besonders *N*AcCys scheint bei der Quantifizierung in der Infusionslösung kritisch zu sein, da es, wie erwähnt, nur in geringer Konzentration vorliegt und gleichzeitig durch eine geringe Ionisierbarkeit gekennzeichnet ist (vgl. Kapitel B 1.2.1).

Drei unterschiedliche Verdünnungen der Infusionslösung (1:250, 1:500 und 1:1000) wurden nach Zusatz der IS (Konzentration je 10 $\mu\text{mol/L}$) mit der optimierten IP-HPLC-MS/MS-Methode untersucht. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt D 1.3.2 beschrieben.

Abbildung B 1-6 zeigt am Beispiel von vier AS und ihren isotopenmarkierten Referenzen die XIC-Chromatogramme, die sich nach Untersuchung der 1:500-verdünnten Infusionslösung nach Zusatz der IS mittels IP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS ergaben.

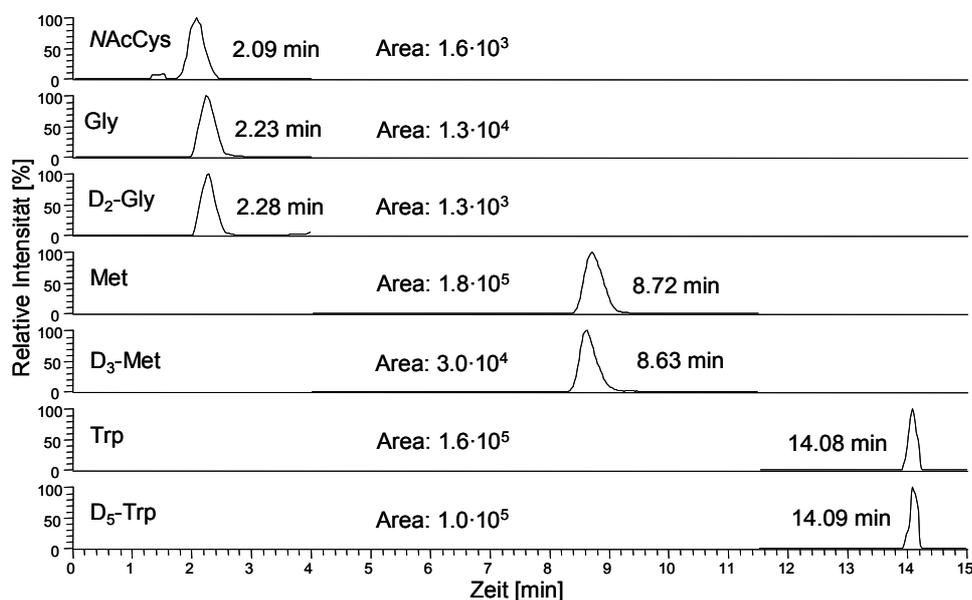


Abbildung B 1-6: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramme der Untersuchung einer Probelösung (AS-Infusionslösung, Verdünnung: 1:500) nach Zusatz von 19 IS (Konzentration je 10 $\mu\text{mol/L}$). Dargestellt sind repräsentativ nur die XIC-Chromatogramme der spezifischen Übergänge von *N*AcCys, Gly und D₂-Gly, Met und D₃-Met sowie von Trp und D₅-Trp.

Säule: QS UptiSphere BP2 (3 μm , 50 mm x 2 mm, Interchim, Montluçon, Frankreich), Gradientenelution mit TDFHA als Ionenpaarreagenz. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

Die Erfassung der AS war bei allen drei gewählten Verdünnungen problemlos möglich. Erwartungsgemäß entsprachen die Retentionszeiten der IS denen ihrer entsprechenden unmarkierten AS. NAcCys ergab trotz der geringen Konzentration einen deutlichen Peak, bei allerdings geringer Peakfläche ($1.6 \cdot 10^3$ FE).

Ausgehend von den bei diesen Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen schien die gleichzeitige Quantifizierung aller in der Infusionslösung vorhandenen AS möglich zu sein. Die deutlichen Konzentrationsunterschiede innerhalb der AS sollten durch die Wahl einer geeigneten Verdünnung kein limitierender Faktor sein. Allerdings traten im Verlauf der weiteren Methodenentwicklung bzw. -optimierung einige Schwierigkeiten und Probleme auf, welche die Quantifizierungsarbeiten unmöglich machten.

1.3 Problematik der Ionenpaar-HPLC-MS/MS-Methode

Die Schwierigkeiten im Verlauf der weiterführenden Studien zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen mittels IP-RP-HPLC-MS/MS äußerten sich vor allem in instabilen Retentionszeiten und einem erhöhten Aufwand durch lange Equilibrierungs- und Spülzeiten. Zudem brachte die Verwendung des Ionenpaarreagenzes weitere Probleme mit sich, welche die Praktikabilität der IP-RP-HPLC-MS/MS-Methode erheblich einschränkten. Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen.

1.3.1 Nicht reproduzierbare Retentionszeiten

Als schwerwiegendstes Problem der IP-RP-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der AS ist die schlechte Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Analyten zu nennen. Die zu Beginn der Methodenentwicklung erhaltenen, erfolgreichen Trennergebnisse (Kapitel B 1.2.1) konnten nicht reproduziert werden.

Aus der Literatur bekannt ist das Phänomen, dass die Retentionszeiten im Verlauf einer Messreihe nicht stabil sind. Sowohl Qu *et al.* (2002a; 2002b) als auch Piraud *et al.* (2005b) berichteten von zunehmenden Retentionszeiten im Verlauf einer Messsequenz, die zu Verschiebungen von bis zu einer Minute führten. Qu *et al.* erklärten

dieses Verhalten in zwei Veröffentlichungen, bei denen die Quantifizierung von AS in Fermentationsmedium bzw. Humanblut mit PDFOA (Pentadecafluorooctansäure) bzw. TDFHA (Tridecafluorheptansäure) als Ionenpaarreagenz beschrieben wird, mit auf der Säule akkumulierendem Ionenpaarreagenz. Sowohl PDFOA als auch TDFHA sollen die Oberfläche der stationären Phase verändern und damit die Trennleistung der Säule verschlechtern, weshalb die Autoren die Säule nach jedem sechsten Lauf 20 Minuten mit 100% ACN spülten (Qu *et al.* 2002a; Qu *et al.* 2002b). Piraud *et al.* (2005b) hingegen machten für das „Faulen“ der Säule und den damit verbundenen Retentionszeitanstieg die biologischen Matrices (Plasma und Urin) anstelle des Ionenpaarreagenzes TDFHA verantwortlich. Auch hier wird ein einstündiger Spülschritt mit ACN nach 14–16 Läufen empfohlen; zudem wird die Säule in dieser Veröffentlichung nach 24 Stunden Messzeit über Nacht mit einem MeOH-H₂O-Gemisch gewaschen. Auch Armstrong *et al.* (2007) berichteten von schlechterer chromatographischer Trennung und Retentionszeitverschiebungen, sofern keine Spülschritte eingefügt werden. Die Autoren wuschen die Säule nach 30 Injektionen, um „non-target analytes“ zu entfernen, wobei unklar bleibt, ob es sich dabei um das Ionenpaarreagenz TDFHA oder um Matrixbestandteile handelte.

In einer anderen Veröffentlichung wird beschrieben, dass auf Spülschritte verzichtet werden kann, wenn eine ausreichende Re-Equilibrierungszeit eingehalten wird (Zoppa *et al.* 2006). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den vorher genannten Publikationen sowie den Ergebnissen unserer eigenen Studien. Während Zoppa *et al.* (2006) Equilibrierungszeiten von 5 min als ausreichend beschrieben, wurde bei gleicher Säulenlänge und -durchmesser bei Piraud *et al.* (2005a) 15 min equilibriert, bei Armstrong *et al.* (2007) 13 min. Auf Spülschritte konnte dennoch nicht verzichtet werden, was unsere Resultate bestätigt.

In unseren Studien wurde ebenfalls ein Anstieg der Retentionszeiten im Verlauf einer Messequenz beobachtet, der allerdings durch die Einführung eines fünfminütigen Spülschritts mit ACN am Ende eines HPLC-Laufs verringert werden konnte. Da bei unseren Untersuchungen AS-Standardlösungen bzw. mit der Infusionslösung eine „einfache“ Matrix verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass das Ionenpaar-

reagenz, wie von Qu *et al.* (2002b) postuliert, an der Retentionszeitverschiebung beteiligt ist.

Weiterhin waren, wie erwähnt, die guten Ergebnisse, die zu Beginn der Methodenentwicklung erhalten worden waren, nicht reproduzierbar. Es traten sowohl Schwankungen der Retentionszeiten von Tag zu Tag auf, als auch starke Retentionszeitverschiebungen im Verlauf der weiteren Arbeiten. Dies wird anhand von Abbildung B 1-7 verdeutlicht, in der am Beispiel von drei AS (Ala, Tyr, Trp) die Retentionszeitunterschiede dargestellt sind.

Die obere Reihe der Chromatogramme (A) entstammt der Methodenübertragung (Kapitel B 1.2.1). Im Vergleich dazu sind fünf weitere Läufe dargestellt, die vier Wochen (Chromatogramme B und C) bzw. acht Wochen später (Chromatogramme D, E und F) mit der gleichen Methode aufgenommen wurden. Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind sowohl von Tag-zu-Tag (Vergleich Zeile B mit Zeile C sowie Vergleich der Zeilen D, E und F untereinander) als auch über den gesamten Zeitraum Unterschiede in den Retentionszeiten festzustellen. Besonders deutlich wird die schlechte Reproduzierbarkeit beim Vergleich der Chromatogramme B - F mit den Chromatogrammen A. Die ursprünglichen Retentionszeiten wurden in keinem Fall erreicht (vgl. auch Abb. Abbildung B 1-6), so dass auch die gewählte Segmententeilung unmöglich wurde.

Tendenziell nahmen mit steigendem Säulenalter auch die Retentionszeiten der AS zu. Anzunehmen ist, dass es im Laufe der Verwendung der Säule zur Modifizierung der stationären Phase kam, so dass veränderte Trennbedingungen herrschten. Das Ausmaß ist insofern überraschend als die Säule weder besonders lange im Einsatz war, noch kritische Matrices wie Blut oder Urin, die durch ihre Zusammensetzung ein „Faulen“ der Säule herbeiführen können, mit ihr getrennt worden sind. Zudem wurde sie regelmäßig mit ACN und MeOH/H₂O gespült, um evtl. vorhandene Ablagerungen an Analyten oder Ionenpaarreagenz zu entfernen.

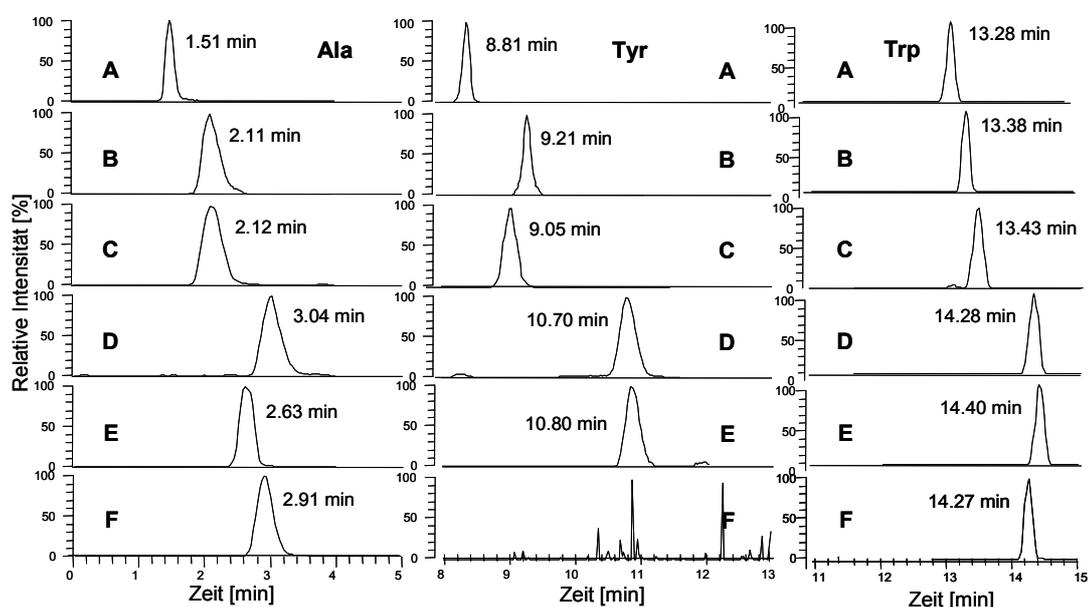


Abbildung B 1-7: Darstellung der schlechten Reproduzierbarkeit der IP-RP-HPLC-MS/MS-Methode anhand der instabilen Retentionszeiten am Beispiel von Ala (links), Tyr (Mitte) und Trp (rechts).

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der drei AS aus sechs unterschiedlichen HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Läufen. Zeile B und Zeile C zeigen die Chromatogramme zweier aufeinanderfolgender Tage, die Zeilen D, E und F zeigen die Chromatogramme an drei aufeinanderfolgenden Tagen vier Wochen später. Zeile A zeigt als Vergleich den Lauf aus der Methodenübertragung (vgl. Abschnitt B 1.2.1, S. 66).

Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

Als Konsequenz auf die veränderten Bedingungen wurde in mehreren Studienreihen versucht, die HPLC-MS/MS-Methode auf die neuen Bedingungen zu optimieren (u.a. Anpassung an die veränderten Retentionszeiten, neue Segmententeilung, veränderter Gradient). Dies war jedoch nicht möglich, da keine Stabilität erreicht wurde, sondern kontinuierlich Veränderungen auftraten (vgl. Retentionszeiten Zeilen B und C mit den Zeilen D – F). Zusätzlich traten weiterhin Schwankungen der Retentionszeiten von Tag zu Tag auf.

Die vergleichsweise geringe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bei der Ionenpaar-Chromatographie ist in der Literatur beschrieben. Zurückzuführen sind die Probleme nach allgemeiner Meinung auf die langsame Equilibrierung der Säule mit dem Ionenpaar-Reagenz. Dies kann, insbesondere bei Anwendung der Gradientenelution, zu den beschriebenen Problemen führen (Snyder *et al.* 1997; Dolan 2008).

Dass die Problematik der instabilen Retentionszeiten auch in der Literatur bei der hier angewendeten IP-HPLC-MS-Methode zur Quantifizierung von AS bekannt ist und diese auch bei routinemäßiger Anwendung auftritt, zeigt sich beim kritischen Lesen einer aktuellen Veröffentlichung von Piraud *et al.* (2011). In dieser erklären die Autoren, dass die spezifischen Übergänge einiger AS in zwei Elutions-Segmenten gescannt werden. Dies geschieht „für den Fall, dass eine geringfügige Veränderung der Retentionszeiten auftritt“. Zudem wird darauf hingewiesen, dass zur genauen Auswertung das Verhältnis der Retentionszeiten von Analyt und internem Standard hilfreich sein kann, welches bei kleinen Veränderungen der Retentionszeiten sehr stabil sei. Gleichzeitig wird in der Publikation empfohlen, die von der Software vorgenommene Integration der Peaks zu prüfen und ggf. zu korrigieren. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf Probleme bei der automatischen Integration, die vermutlich durch verschobene Retentionszeiten verursacht sind.

Als Konsequenz aus der geschilderten Problematik der geringen Reproduzierbarkeit müssten die Equilibrierungs- und Re-Equilibrierungszeiten der IP-HPLC-Methode zum Erreichen stabiler Retentionszeiten extrem verlängert werden. Die ggf. auch danach noch vorhandenen Probleme könnten bei der Quantifizierung der Aminosäuren in den Infusionslösungen in einem gewissen Maße vernachlässigt werden. Durch den Einsatz des SRM-Modus und der Isotopenstandards, welche die gleiche Diskriminierung der Retentionszeit erfahren, ist jeder Analyt eindeutig determiniert. Die Anwesenheit von interferierenden Substanzen, wie sie z.B. in biologischen Matrices von Bedeutung sein können, ist in den Infusionslösungen ausgeschlossen, so dass auf die Retentionszeit zur eindeutigen Identifizierung der Aminosäuren verzichtet werden könnte. Eine automatisierte, computergestützte Auswertung wird dadurch jedoch unmöglich. Aufwendige Kontrollen eines jeden HPLC-MS/MS-Laufs, wie sie von Piraud *et al.* (2011) empfohlen werden, wären unumgänglich. Die Anforderungen, die normalerweise hinsichtlich Reproduzierbarkeit bzw. Robustheit an eine Routine-methode zur Quantifizierung von Wirkstoffen in der pharmazeutischen Qualitätssicherung gestellt werden, sind mit dieser Methode jedoch nicht zu erfüllen.

1.3.2 Zeitaufwand durch Equilibrierung und Spülen

Die Instabilität der Retentionszeiten war nicht die einzige Schwierigkeit, die sich bei der Methodenentwicklung in Verbindung mit dem Einsatz der Ionenpaarchromatographie offenbarte. Bedingt durch das Ionenpaarreagenz waren, wie erwähnt, lange Equilibrierungszeiten zwischen einzelnen Läufen notwendig (15 min), die bei weiterer Methodoptimierung zum Erreichen stabilerer Retentionszeiten wohl noch weiter hätten verlängert werden müssen. Auch der zwischen den Läufen eingefügte Spülschritt sowie die Reinigung der Säule nach einer bestimmten Anzahl an Trennungen trugen erheblich zum Zeitaufwand bei.

Weiterhin waren zusätzlich vor jeder Messsequenz, neben einer anfänglichen Equilibrierung der Säule von 30 min, mindestens zwei Gradienten zur Equilibrierung des Systems notwendig, bevor die übliche Retention der AS erhalten wurde.

Verdeutlicht wird dies anhand Abbildung B 1-8, welche die TIC-Chromatogramme von drei aufeinanderfolgenden HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Läufe einer Mischung von 21 AS zeigt. Zwei solche Equilibrierungsgradienten waren nicht nur zu Beginn einer Messsequenz notwendig, sondern erneut nach jeglicher Unterbrechung der Analyse.

Die bei Anwendung der Ionenpaar-Chromatographie erforderlichen, langen Equilibrierungszeiten sind allgemein bekannt. Zum Erreichen stabiler Bedingungen ist laut Literatur ausreichendes Spülen der Säule mit der mobilen Phase notwendig, wobei von 20 – 50 Säulenvolumina zur Equilibrierung des Systems ausgegangen werden kann (Snyder *et al.* 1997; Dolan 2008). Auch Piraud *et al.* (2005b) berichteten, dass bei der Analyse von Aminosäuren mittels IP-RP-HPLC-MS/MS der erste Gradient einer Messsequenz verworfen werden muss. Bei unseren Untersuchungen genügte ein solcher Equilibrierungsgradient zum Erreichen stabiler Bedingungen nicht; zwei Equilibrierungsläufe waren erforderlich (vgl. Abbildung B 1-8).

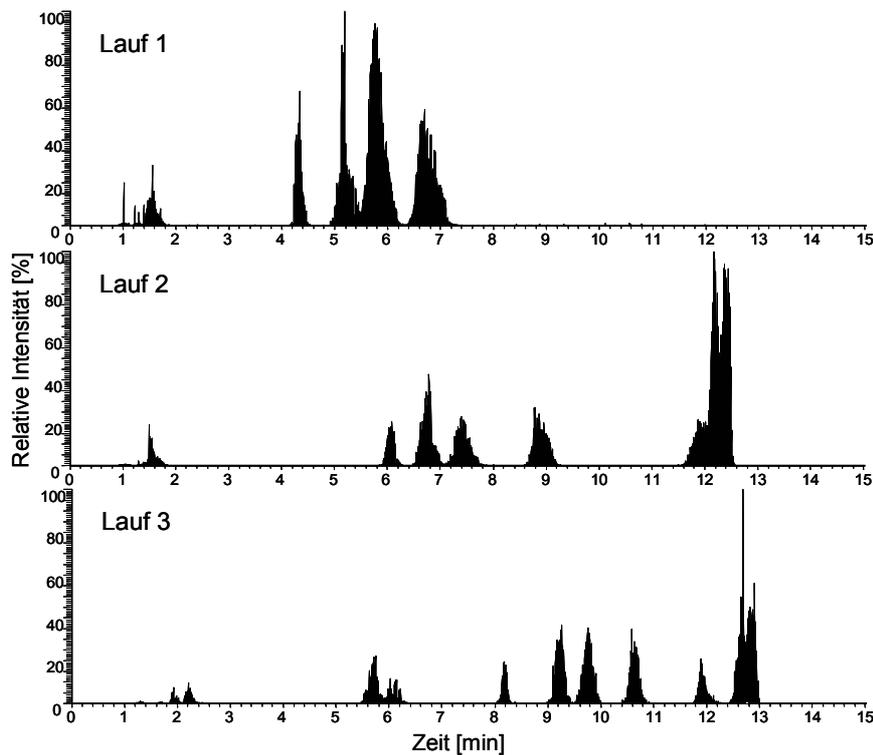


Abbildung B 1-8: Verdeutlichung der Erfordernis von mindestens zwei Equilibrierungsgradienten vor einer Messsequenz bei der IP-HPLC-MS/MS-Analyse.

Dargestellt sind die TIC-Chromatogramme drei aufeinanderfolgender HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Läufe einer Mischung von 21 AS. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 1.3.2.

Dieses Ergebnis wird durch eine neue Veröffentlichung von Piraud *et al.* (2011) bestätigt. Die Autoren berichteten nun abweichend von ihrer früheren Publikation (Piraud *et al.* 2005b), dass stabile Retentionszeiten erst nach Equilibrierung des Systems mit mehreren Gradienten erreicht werden.

Insgesamt steigt dadurch der Zeitaufwand bei der Quantifizierung der AS mittels IP-RP-HPLC-MS/MS weiter an.

1.3.3 Verunreinigung der HPLC-MS-Anlage durch TDFHA

Die Verwendung von TDFHA als Ionenpaarreagenz brachte im Zusammenhang mit der eigentlichen Methode zur Quantifizierung von AS weitere Probleme mit sich. Es ist allgemein bekannt, dass RP-Säulen, welche unter Zusatz von Ionenpaarreagenzien

verwendet wurden, meist nicht mehr für andere Trennungen eingesetzt werden können, da sich das Ionenpaarreagenz nicht mehr vollständig von der stationären Phase entfernen lässt (Rücker *et al.* 2001). Darüber hinaus wurde in unseren Studien festgestellt, dass TDFHA durch die hohe Lipophilie geradezu an allen Teilen der HPLC-MS/MS-Anlage „klebte“ und mit einem deutlichen Signal im negativen Modus ($[M-H]^-$ m/z 363) auch lange nach der IP-HPLC-MS-Analyse der Aminosäuren andere Untersuchungen, die an diesem Gerät im negativen Modus durchzuführen waren, erheblich störte.

Bei Screening-Untersuchungen und Fullscan-Experimenten im negativen Modus zeigt sich TDFHA für das extrem hohe Hintergrundrauschen verantwortlich. Zusätzlich nimmt es als Ionenpaarbildner negativ Einfluss auf die Elektrospray-Ionisierung, da es durch eben die Bildung von Ionenpaaren mit den im Elektrospray-Prozess freigesetzten Ionen die MS-Signalintensität verringert. Abhängig vom Analyten können selbst minimale Rückstände des Ionenpaarreagenzes einen starken Einfluss auf die Ionisierung haben (Kromidas 2006).

Für die praktische Arbeit bedeutet dies, dass die HPLC-MS-Anlage entweder ausschließlich für diese Methode reserviert bleibt, was aufgrund der kostenintensiven Anschaffung selten möglich sein wird, oder dass durch intensives Spülen versucht werden muss, das Ionenpaarreagenz aus der Anlage zu entfernen. Stundenlanges bis tagelanges Spülen ist dabei durchaus üblich (Kromidas 2006). In unseren Versuchen wurden annähernd akzeptable Werte erst nach Austausch aller mobilen Teile der HPLC-MS-Anlage (Fließmittelflaschen, Kapillaren, Verbindungsstücke usw.) sowie Spülen mit ACN und einer MeOH-H₂O-Mischung nach ca. 60 h erreicht, wobei TDFHA auch dann noch nicht vollständig aus dem System entfernt war. Auf die damit verbundene mögliche Problematik bei Analysen im negativen Modus sei nochmals hingewiesen.

Die Aussage, dass die Verwendung eines negativ geladenen Ionenpaarreagenzes den Vorteil mit sich bringt, bei Messungen im positiven Modus nicht ins Massenspektrometer zu gelangen und dieses dadurch nicht verunreinigt wird (Chaimbault *et al.* 1999), kann nicht bestätigt werden. Selbst bei direkter Infusion („loop“) von Testlösungen in das MS, also unter Umgehung des HPLC-Systems, wurde TDFHA

detektiert, so dass die Verschmutzung des Massenspektrometers als gesichert anzusehen ist.

Zudem muss von Zeit zu Zeit geprüft werden, ob und inwiefern diese Verschmutzung durch das Ionenpaarreagenz Einfluss auch auf die AS-Messungen im positiven Modus nimmt.

1.4 Zusammenfassung der IP-RP-HPLC-MS-Methode

Als ein Vorteil der IP-RP-HPLC-MS-Analyse gegenüber der Standardmethode der Ionenaustauschchromatographie wird der Zeitgewinn angesehen. Dieser erscheint auf den ersten Blick auch deutlich, vergleicht man die reinen Laufzeiten von ~ 15 min der oben beschriebenen Methode mit denjenigen der Ionenaustauschchromatographie von ~ 120 min. Rechnet man jedoch neben der zusätzlich notwendigen Equilibrierzeit auch den übrigen Zeitaufwand hinzu, der sich aus den verschiedenen Spül- und Waschschritten sowie den notwendigen Equilibrierungsgradienten ergibt, relativiert sich der Zeitgewinn.

Eines der gewünschten Ziele, nämlich die deutliche Zeitersparnis gegenüber der Standardmethode, wird man demzufolge mit der IP-RP-HPLC-MS-Methode nicht erreichen können.

Zudem war die Methode gekennzeichnet von einer schlechten Reproduzierbarkeit und Robustheit, welche die nach den Anforderungen der pharmazeutischen Industrie durchzuführende Validierung unmöglich machte. Damit die Validierung gelingen könnte, wäre eine weitere „Optimierung“ der Methode notwendig, die durch deutlich längere Equilibrierungs- und Re-Equilibrierungszeiten ggf. zu reproduzierbaren Ergebnissen führen könnte.

Die Eignung der validierten Methode zur Anwendung als Routinemethode in der pharmazeutischen Industrie wäre aufgrund der weiteren Probleme (Zeit- und Kostenaufwand durch Verunreinigung der LC-MS/Anlage, durch erhöhten Fließmittelverbrauch aufgrund von Spülzeiten, durch häufigen Säulenaustausch usw.) mehr als fraglich.

Vorbehalte, die es in der Literatur (Kirchhoff 2002; Kromidas 2006; Dolan 2008) aufgrund unterschiedlicher Schwierigkeiten gegen die Anwendung der Ionenpaar-Chromatographie gibt, wurden durch unsere Studien bestätigt. Zudem wurde gezeigt, dass die IP-HPLC-MS-Methode zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen keinen Vorteil gegenüber der gut eingeführten Standardmethode bringen kann bzw. zur validierten Routineanalytik im Allgemeinen ungeeignet sein wird.

2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Aminosäuren mittels HILIC-HPLC-MS(/MS)

Als Alternative zur Ionenpaarchromatographie wurde im Folgenden eine Methode zur (Vor-)Trennung der AS mittels HILIC entwickelt. Da in der Literatur zum Zeitpunkt der Arbeiten diesbezüglich wenig Informationen vorhanden waren, insbesondere keine hinsichtlich der Trennung von AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule, wurde zunächst mit grundlegenden Studien zum Retentionsverhalten der AS an dieser stationären Phase begonnen.

An zwei verschiedenen Säulen (ZIC[®]-HILIC und ZIC[®]-pHILIC) wurden verschiedene Parameter (ACN-Anteil im Fließmittel, pH-Wert, Temperatur, Art und Konzentration des Puffers) bezüglich ihres Einflusses auf die Trennung von AS untersucht.

2.1 Allgemeine Studien zur Trennung von AS mittels HILIC-HPLC-MS/MS unter isokratischen Bedingungen

Erste Studien zur Trennung der AS mittels HILIC wurden im isokratischen Modus durchgeführt. Neben dem Ziel, grundlegende Informationen zur Elutionsreihenfolge zu erhalten, sollte geprüft werden, ob eine isokratische Methode zur Trennung der AS möglich ist. Vorteil eines solchen Vorgehens ist der Wegfall von Equilibrierungszeiten und damit eine Verkürzung der Analysenzeit. Zudem ist in der Literatur bekannt, dass unter HILIC-Bedingungen im Vergleich zur RP-Chromatographie nur langsame Gradienten eingesetzt werden können (Dibowski und Dibowski 2005).

2.1.1 Fließmittelzusammensetzung – Variation des Wasser-Anteils

Eine Testmischung von 21 AS wurde unter isokratischen Bedingungen mit einer Mischung von 5 mM NH₄Ac-Lösung und ACN als Fließmittel untersucht (Durchführung siehe Kapitel D 2.2.1).

Abbildung B 2-1 zeigt ausschnittsweise die bei 80% organischem Anteil (ACN) in der mobilen Phase erhaltene Trennung der AS.

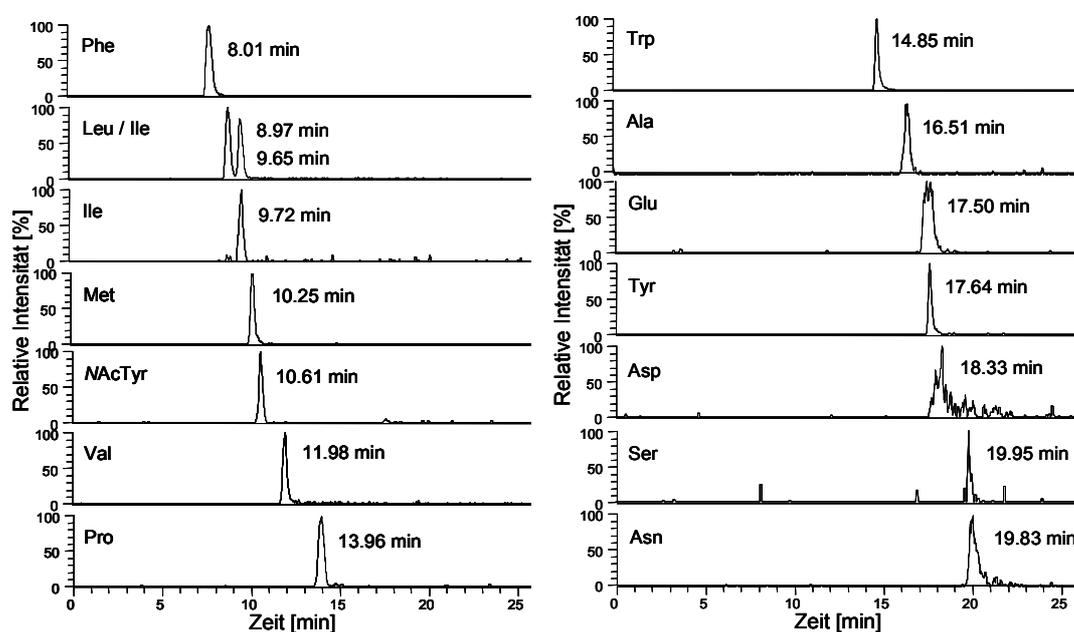


Abbildung B 2-1: Ausschnitt aus der isokratischen HILIC-HPLC-ESIpos-MS/MS-Trennung (XIC-Chromatogramme) einer Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 $\mu\text{mol/L}$). Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der spezifischen Übergänge der einzelnen AS.

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 200 Å , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 20% 5 mM NH₄Ac, 80% ACN, Fluss: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.2.1.

Anhand dieses isokratischen Vorversuchs ließ sich gut der der HILIC zugrunde liegende Trennmechanismus studieren. Die Trennung an der ZIC[®]-HILIC-Säule folgt dem in der HILIC allgemein üblichen Muster, wonach die Retention in Abhängigkeit von der Polarität der Analyten steigt (Hemström und Irgum 2006).

Als Maß für die Polarität von Aminosäuren kann in gewissen Grenzen der Hydropathie-Index von Kyte und Doolittle (1982) herangezogen werden, der zur Bestimmung der hydro- bzw. lipophilen Eigenschaften eines Proteins erstellt wurde. Je kleiner bzw. negativer die Zahlenwerte der Hydropathie-Skala (Tabelle B 2-1), desto größer ist die Hydrophilie der Seitenkette der AS.

Tabelle B 2-1: Hydropathie-Index der 20 proteinogenen AS nach Kyte und Doolittle. Die Scala repräsentiert die hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften der Seitenkette einer AS. Je kleiner der Wert, desto hydrophiler ist eine AS (Kyte und Doolittle 1982).

AS	Hydropathie-Index	AS	Hydropathie-Index
Ile	4.5	Ser	-0.8
Val	4.2	Tyr	-1.3
Leu	3.8	Pro	-1.6
Phe	2.8	His	-3.2
Cys	2.5	Glu	-3.5
Met	1.9	Gln	-3.5
Ala	1.8	Asp	-3.5
Gly	-0.4	Asn	-3.5
Thr	-0.7	Lys	-3.9
Trp	-0.9	Arg	-4.5

Bei unserer Studie eluierten zuerst die unpolaren Aminosäuren Phe, Leu, Ile, Met, NAcTyr, Val, Pro, Trp und Ala, die im Hydropathie-Index durch relativ hohe Zahlenwerte (hydrophob) gekennzeichnet sind. Die Reihenfolge gemäß dieses Index ist für die HILIC-Trennung als Richtwert anzusehen, da neben der Polarität der Seitenkette weitere Größen den Retentionsmechanismus beeinflussen (pKs-Werte und Ladung, sterische Effekte u.a.).

Später eluierten die polaren AS, hier Glu, Asp, Asn und Ser, welche in der Hydropathie-Skala negative Werte aufweisen. Die beiden sauren AS (Glu, Asp) sowie das polare Säureamid Asparagin (Asn) sind allerdings durch unscharfe, breite Peaks gekennzeichnet. Grund hierfür sind neben der allgemeinen Peakverbreiterung der später eluierenden Substanzen bei isokratischer Trennung wohl auch verstärkte ionische Wechselwirkungen der dissoziierten Analyten mit der stationären Phase.

In Abbildung B 2-1 nicht dargestellt sind die basischen AS His, Lys, Arg und Orn sowie Gly und NAcCys, die bei dieser Fließmittelzusammensetzung nicht detektiert

wurden. Für Gly und NAcCys liegt der Grund in der geringen Ionisierbarkeit der beiden Substanzen, die von uns bereits früher festgestellt wurde (Kapitel B 1.2.1). Unter den neutralen Bedingungen (pH 6.8 durch NH₄Ac) wurden Gly und NAcCys nicht genügend ionisiert um detektiert zu werden. Aus dem gleichen Grund lieferte auch Ser lediglich einen schwachen Peak. His, Lys, Arg und Orn wurden unter den gewählten Bedingungen nicht innerhalb des Aufnahmezeitraums (60 min) von der Säule eluiert. Die hohe Hydrophilie der basischen AS (vgl. Tabelle B 2-1) führte zur starken Retention; der Anteil von 20% 5 mM wässriger NH₄Ac-Lösung genügte nicht zur Elution. Die verstärkte Retention der basischen, also bei vorliegendem pH-Wert kationischen AS, ist zudem auf verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Sulfonsäuregruppe der stationären Phase zurückzuführen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen der anionischen, also sauren AS, mit der positiv geladenen quartären Ammoniumgruppe der stationären Phase sind dagegen schwächer ausgeprägt, so dass diese polaren Analyten vor den Basen eluieren. Der Grund für die unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen liegt in der chemischen Struktur der Sulfobetaingruppe der ZIC[®]-HILIC-Säule, welche die negativ geladene Sulfonsäure am äußeren, also der mobilen Phase zugewandten Ende der Alkylkette trägt. Diese kann somit stärker mit den Analytionen in Wechselwirkung treten als die positiv geladene Ammonium-Gruppe, die „abgeschirmt“ innerhalb der Alkylkette sitzt (Xuan *et al.* 2006).

Ebenfalls ablesen ließ sich aus unseren Ergebnissen die im Vergleich zur RP-Chromatographie orthogonale Elutionsreihenfolge. Die genannten polaren, spät eluierenden AS verlassen unter RP-Bedingungen die Säule zuerst. Besonders deutlich ist die veränderte Elutionsreihenfolge am Beispiel von Leu und Ile zu erkennen, die im Vergleich zu RP-Bedingungen in umgekehrter Reihenfolge erscheinen (Abbildung B 2-1, S.84 vs. Abbildung B 1-6, S.73).

Als wichtiges Ergebnis dieses Vorversuchs lässt sich feststellen, dass das durch ähnliche Struktur und chemisch-physikalische Eigenschaften sowie identische Precursor- und Produktionen für die HPLC-MS/MS-Analyse kritische AS-Paar Leu und Ile basisliniengetrennt wurde.

Bei Steigerung des Wasseranteils und damit Erhöhung der Elutionskraft ließen sich auch die basischen AS His, Lys, Arg und Orn detektieren (Abbildung B 2-2), allerdings weiterhin mit breiten, unscharfen Peaks. Die übrigen AS eluieren erwartungsgemäß sehr früh und ohne Trennung, was am Beispiel von Leu und Ile in der Abbildung verdeutlicht wird.

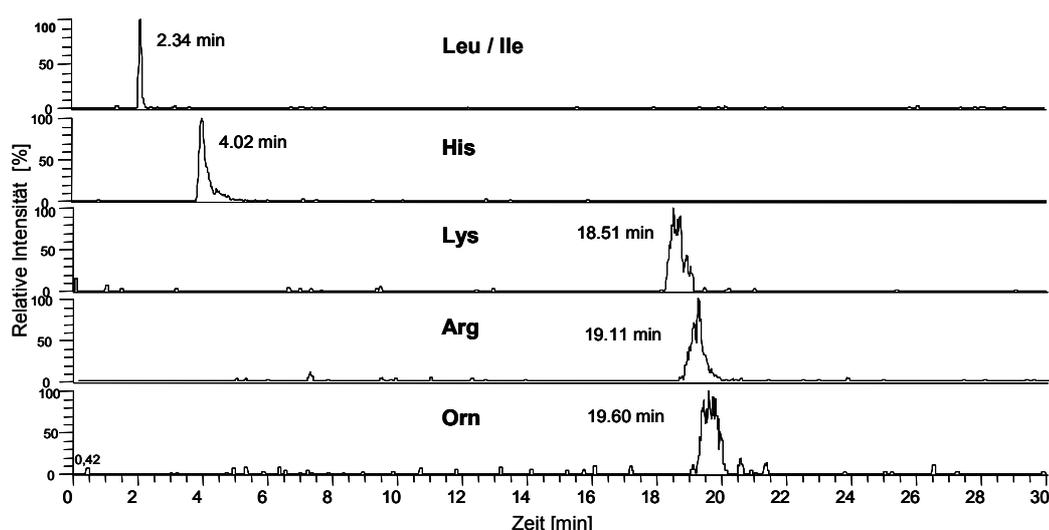


Abbildung B 2-2: Ausschnitt aus der isokratische HILIC-HPLC-ESIpos-MS/MS-Trennung (XIC-Chromatogramme) einer Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 $\mu\text{mol/L}$). Dargestellt ist die Elution der basischen AS bei erhöhtem Anteil an wässriger Phase im Eluenten (50% 5 mM NH_4Ac) bei gleichzeitig früher (Co-)Elution von Leu und Ile. Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 200 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 50% 5 mM NH_4Ac , 50% ACN, Fluss: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Experimentelle HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.2.1.

2.1.2 Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die Trennung von AS

In einer nächsten Versuchsreihe wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Trennung der AS an einer ZIC[®]-pHILIC-Säule untersucht. Durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren bzw. basischen Bereich ändert sich das Ausmaß der Ionisierung der Aminosäuren und damit ihre Polarität, so dass je nach AS mit Änderungen in der Retentionszeit zu rechnen ist.

Zur Untersuchung wurde eine Aminosäuren-Mischung unter isokratischen Bedingungen an einer ZIC[®]-pHILIC-Säule bei verschiedenen pH-Werten (pH 2.5 bis 9.5) der

wässrigen Phase des Eluenten untersucht. Die genauen HPLC-MS/MS-Bedingungen sind in Kapitel D 2.2.2 beschrieben.

Aufgrund der zwitterionischen Struktur der AS mit ihren spezifischen pK_s -Werten sind starke pH-Wert-Änderungen notwendig, um eine deutliche Dissoziation zu erreichen bzw. zu unterdrücken. Aus diesem Grund wurde die Polymer-Phase (ZIC[®]-pHILIC) als stationäre Phase gewählt, da sie im Gegensatz zur Silica-Phase die größere pH-Stabilität aufweist (von pH 2 bis pH 10 statt pH 3 bis pH 8).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die pH-Wert-Einstellung nur in der wässrigen Phase des Eluenten erfolgte und sich die Werte nur darauf beziehen. Der „wahre“ pH-Wert in der mobilen Phase (80% ACN, 20% wässrige Phase) wurde nicht gemessen, dürfte aber höher liegen. Bei einer Mischung von 85% ACN und 15% Format-Puffer (pH 3) liegt der pH-Wert laut Literatur bei 5.2 (McCalley 2007). Zudem gilt zu beachten, dass bei einem hohen Anteil an ACN in der mobilen Phase auch die pK_s -Werte der funktionellen Gruppen andere Werte annehmen als in rein wässriger Lösung. Demzufolge kann das Ausmaß der Ionisierung der AS nur grob abgeschätzt werden.

Bei Änderung des pH-Werts wurden deutliche Effekte auf die Trennung der AS an einer ZIC[®]-pHILIC-Säule festgestellt; dies ist in Abbildung B 2-3 anhand von Asn und Glu graphisch dargestellt.

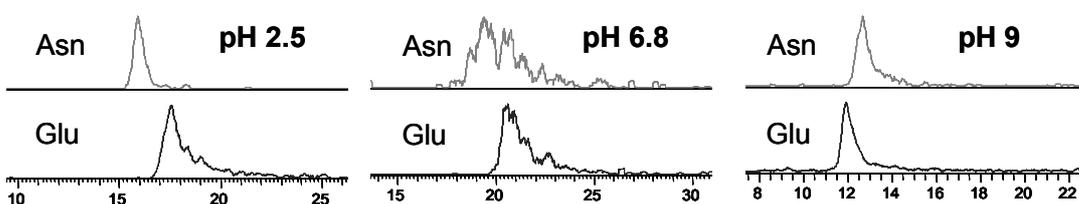


Abbildung B 2-3: Einfluss des pH-Werte des wässrigen Anteils der mobilen Phase auf die Trennung der AS. Dargestellt sind die Veränderungen der Retentionszeiten sowie der Peakformen bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2.5, pH 6.8 und pH 9) am Beispiel von Asn und Glu.

Säule: ZIC[®]-pHILIC (5 μ m, 200 Å , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 30% 5 mM NH_4Ac (pH 2.5, pH 6.8 bzw. pH 9), 70% ACN, Fluss: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. ESI-MS/MS-Bedingungen siehe D 2.2.2.

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, war sowohl bei Erhöhung als auch bei Erniedrigung des pH-Werts eine Abnahme der Retentionszeiten zu beobachten.

Im Allgemeinen kann durch Einstellung des pH-Werts die Ionisierung der Substanzen eingestellt werden und damit deren Polarität. Säuregruppen werden bei sinkendem pH-Wert protoniert, so dass die Hydrophilie abnimmt und damit die Retention an einer ZIC[®]-(p)HILIC-Säule sinkt (Guo und Gaiki 2005). Für basische Substanzen tritt hingegen der umgekehrte Effekt ein, d.h. bei Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich steigt die Retention aufgrund der durch die Protonierung erhöhten Polarität (Nkem Ihunegbo *et al.* 2010).

Das von uns sowohl bei höheren als auch niedrigeren pH-Werten beobachtete, verkürzte Elutionsverhalten der AS lässt darauf schließen, dass dieses einfache Modell zur Erklärung der veränderten Retention nicht ausreicht, da die Verhältnisse für die zwitterionischen AS komplizierter sind.

Ein möglicher Grund für die schnellere Elution könnte sein, dass durch die Säure- bzw. Basenzugabe die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den anionischen bzw. kationischen Gruppen der stationären Phase verringert werden und so die Retention sinkt (Liu *et al.* 2009). Da das beobachtete Verhalten der AS für die zu entwickelnde Methode ohne Bedeutung ist, wurden keine vertiefenden Studien durchgeführt, die zur genauen Klärung dieses Phänomens notwendig gewesen wären.

Abnehmende Retentionszeiten bei pH-Werten sowohl über als auch unter einem bestimmten Wert an einer ZIC[®]-HILIC-Säule sind im übrigen in der Literatur u.a. für zwitterionische Substanzen beschrieben, ohne dass sich Angaben über die Gründe finden (Hmelnickis *et al.* 2008).

Neben der Retention wurde auch die Peakform der AS beeinflusst, insbesondere bei den polaren AS. Sowohl bei pH 2.5 als auch bei pH 9 waren die Peakformen deutlich besser ausgebildet als in neutralem Medium (vg. Abbildung B 2-3).

Als Folge dieser Resultate wurden alle weiteren Untersuchungen bei einem pH von 2.5 durchgeführt, da im Sauren neben der besseren Peakform auch die beste Ionisierung der Analyten bei den ESI_{pos}-MS-Untersuchungen erreicht wurde.

Die Detektion der basischen AS, die bei der bisherigen Versuchsreihe nicht eluiert wurden, gelang ebenfalls bei pH 2.5 mit einer verbesserten Peaksymmetrie (vgl. Abbildung B 2-4), allerdings war zu deren Elution ein höherer Anteil an wässriger Phase im Eluenten notwendig (30% NH₄Ac-Lösung). Zudem wurde, einem Anwendungsbeispiel der Fa. SeQuant folgend, die Konzentration an Puffer auf 55 mM NH₄Ac erhöht (SeQuant 2004). Der genaue Einfluss der Pufferkonzentration wurde in weiterführenden Studien untersucht und wird an späterer Stelle diskutiert (Kapitel B 2.3.1).

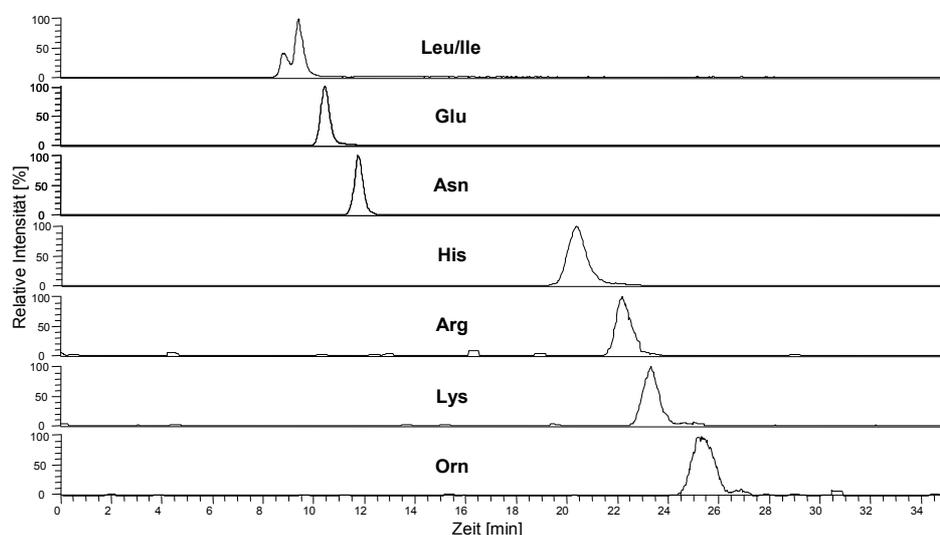


Abbildung B 2-4: Ausschnitt aus der isokratischen HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Trennung (XIC-Chromatogramme) einer Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L). Dargestellt ist die Elution der basischen AS sowie weiterer Beispiel-AS (Leu, Ile, Glu, Asn) bei erhöhtem pH-Wert und erhöhter Pufferkonzentration der wässrigen Phase im Eluenten (55 mM NH₄Ac, pH 2.5).

Säule: ZIC[®]-pHILIC (5 µm, 200 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 30% 55 mM NH₄Ac (pH 2.5), 70% ACN, Fluss: 100µL/min. ESI-MS/MS-Bedingungen siehe D 2.2.2.

2.1.3 Zusammenfassung der Vorversuche unter isokratischen Bedingungen

Aus den unter isokratischen Bedingungen durchgeführten Vorversuchen ergibt sich zusammenfassend, dass die ZIC[®]-HILIC- bzw. ZIC[®]-pHILIC-Säule zur Analyse von AS prinzipiell gut geeignet ist. Durch Variation von pH-Wert und Pufferkonzentration

konnte Einfluss auf die Trennung genommen werden. Die Einstellung des pH-Werts im Sauren verbesserte die Peakform der polaren AS, gleichzeitig wurde durch den Säurezusatz die Ionisierung der AS bei der ESI_{pos}-MS-Analytik verbessert.

Durch Variation von Pufferkonzentration, pH-Wert, Fluss und Anteil wässriger Phase am Eluenten ließen sich jedoch keine Bedingungen schaffen, die zur Trennung aller AS unter isokratischen Bedingungen geeignet gewesen wären. Angemessene Elution der basischen AS wurde nur bei erhöhtem Wasseranteil in der mobilen Phase erreicht, wobei Leu und Ile lediglich angetrennt wurden. Ein zur Trennung dieser AS geeigneter Eluent (80% ACN) wiederum war zur Elution der basischen AS nicht geeignet.

Sofern auf die Basislinientrennung interferierender AS verzichtet werden kann, z.B. weil nicht alle AS für die Anwendung relevant oder kleinere Fehler in der Quantifizierung hinnehmbar sind, ist eine rasche (Vor-)Trennung der AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule möglich. Abbildung B 2-5 zeigt am Beispiel von 8 AS, dass diese in weniger als acht Minuten eluiert wurden.

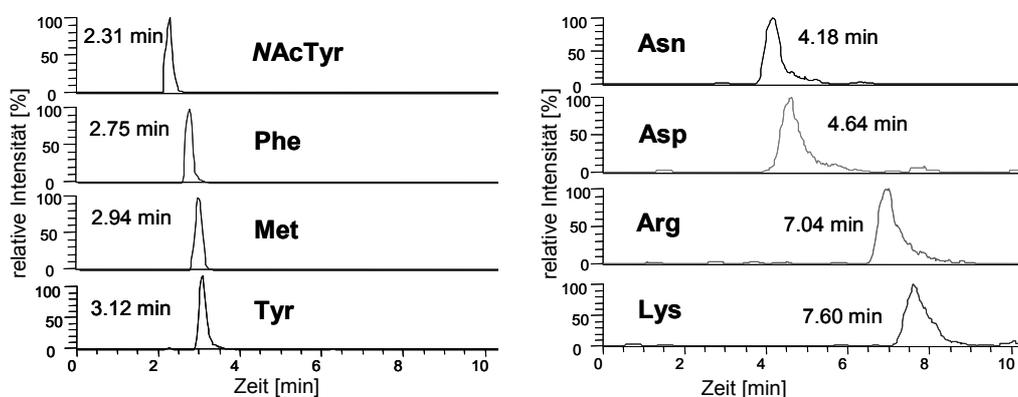


Abbildung B 2-5: Ausschnitt aus der isokratischen HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Trennung (XIC-Chromatogramme) einer Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L). Bei hohem Anteil an wässriger Phase im Eluenten verlassen alle AS die Säule innerhalb von acht Minuten.

Säule: ZIC[®]-pHILIC (5 µm, 200 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40% 55 mM NH₄Ac (pH 2.5), 60% ACN, Fluss: 200 µL/min. ESI-MS/MS-Bedingungen siehe D 2.2.3.

Zur gleichzeitigen Trennung von polaren und unpolaren AS in einem Lauf mit Basislinientrennung der interferierenden Analyten ist allerdings ein Fließmittel-Gradient notwendig, um angemessene Retentionszeiten zu erhalten.

2.2 Trennung von AS mittels HILIC-HPLC-MS/MS - Gradientenelution

Ausgehend von den beschriebenen Vorversuchen wurde ein Fließmittelgradient erstellt, der nach einem isokratischen Anfangsschritt zur Trennung von Leu und Ile den Anteil der wässrigen Phase im Eluenten erhöhte. Abbildung B 2-6 zeigt die XIC-Chromatogramme, die sich nach Untersuchung einer Mischung von 21 AS ergaben. Die genauen HPLC-MS/MS-Bedingungen sind in Abschnitt D 2.3 beschrieben.

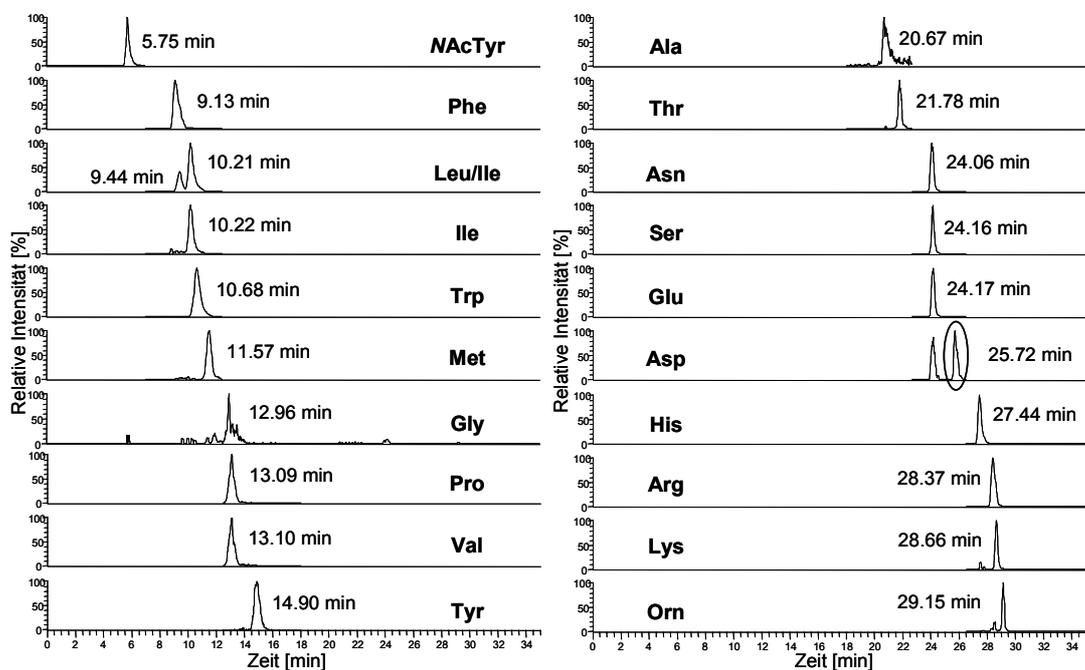


Abbildung B 2-6: XIC-Chromatogramme der HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Untersuchung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L).

Mobile Phase: ACN, 55 mM NH₄FA in H₂O (pH 2.5), Fluss: 100 µL/min. Gradient: 0 - 13 min: 80% ACN, 20% 55 mM NH₄FA (pH 2.5), 13 - 30 min: auf 60% 55 mM NH₄FA (pH 2.5), 30 - 35 min: 60% 55 mM NH₄FA (pH 2.5). Equilibrierzeit: 15 min. Weitere HPLC- und ESI-MS/MS-Bedingungen siehe D 2.3.

Der Peak von Asp ist markiert, beim zweiten Peak im XIC-Chromatogramm handelt es sich um den Isotopenpeak von Asn.

Wie aus den Chromatogrammen hervorgeht, wurden alle AS innerhalb von 30 min eluiert. Die aufgrund von Interferenzen kritischen AS wurden getrennt. Ferner zeigte sich, dass die Untersuchung der AS mittels HILIC-HPLC-MS auch im SIM („single

ion monitoring“) – Modus durchgeführt werden kann: Alle AS, die gleiche bzw. um eine Masseneinheit differierende Precursorionen aufweisen, wurden chromatographisch getrennt. Die durch den SRM-Modus, also die Bestimmung des aus dem Precursorion entstandenen Produktion erhaltene, erhöhte Spezifität ist aufgrund der Infusionslösungs-Matrix nicht notwendig. Die Verwendung des SIM-Modus ist im Hinblick auf die spätere Anwendung insofern von Vorteil als kein aufwendiges Tandem-Massenspektrometer benötigt wird.

2.3 HILIC-HPLC-MS - Methodenoptimierung

Die folgende Methodenoptimierung erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Verkürzung der Analysenzeit sowie der Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften (Peaksymmetrie). Gleichzeitig sollten Informationen bezüglich des Einflusses verschiedener Parameter auf die Trennung an einer ZIC[®]-HILIC-Säule gesammelt werden.

Wie oben beschrieben, wurden die besten Ergebnisse der AS-Trennung unter HILIC-Bedingungen bei pH 2.5 erreicht. Allerdings erforderte dieser pH-Wert die Verwendung der pH-stabilen ZIC[®]-pHILIC-Säule, welche nur in einer Korngröße von 5 µm erhältlich ist. Eine größere Korngröße der stationären Phase führt jedoch zur Verschlechterung der Trennleistung (Unger und Weber 1999). Die ZIC[®]-HILIC-Säule besitzt eine Korngröße von 3.5 µm, damit also generell eine höhere Trennleistung, sollte allerdings aufgrund der Silica-Basis nur bis maximal pH 3 verwendet werden (SeQuant 2006).

In weiterführenden Studien konnten wir zeigen, dass der Vorteil einer geringeren Korngröße der ZIC[®]-HILIC-Säule gegenüber dem einer stärkeren pH-Wert-Erniedrigung überwiegt. Daher wurde zur Methodenoptimierung mit einer ZIC[®]-HILIC Säule bei pH 3 gearbeitet.

2.3.1 Einfluss der Pufferkonzentration der mobilen Phase auf die Trennung der AS

Generell ist der Einsatz einer gepufferten mobilen Phase zur Trennung von geladenen Substanzen unter HILIC-Bedingungen äußerst wichtig, da durch den Puffer die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase kontrolliert werden können (Oertel *et al.* 2004). Zwar sind diese bei Verwendung einer ZIC[®]-HILIC-Säule durch die zwitterionische stationäre Phase weniger stark ausgeprägt als bei anderen HILIC-Phasen (SeQuant 2006), dennoch sind auch hier in neueren Studien Einflüsse durch unterschiedliche Pufferkonzentrationen beschrieben (Liu und Pohl 2010; Marrubini *et al.* 2010; Xie *et al.* 2010).

Zur Untersuchung des Einflusses der Pufferkonzentration auf die Trennung wurde eine AS-Mischung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumformiat (20 mM, 55 mM und 100 mM NH₄FA) in der wässrigen Phase des Eluenten untersucht. Die Durchführung und HPLC-MS-Parameter sind Kapitel D 2.4.1 zu entnehmen.

In Abbildung B 2-7 sind die Totalionenchromatogramme dargestellt, die sich nach der HPLC-MS-Analyse ergaben.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, sind bereits beim Vergleich der Totalionenchromatogramme Einflüsse durch steigende Pufferkonzentration feststellbar, wobei diese, abhängig vom Analyten, sehr unterschiedlich sind. Je nach Struktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren war eine Verlängerung oder eine Verkürzung der Retention festzustellen.

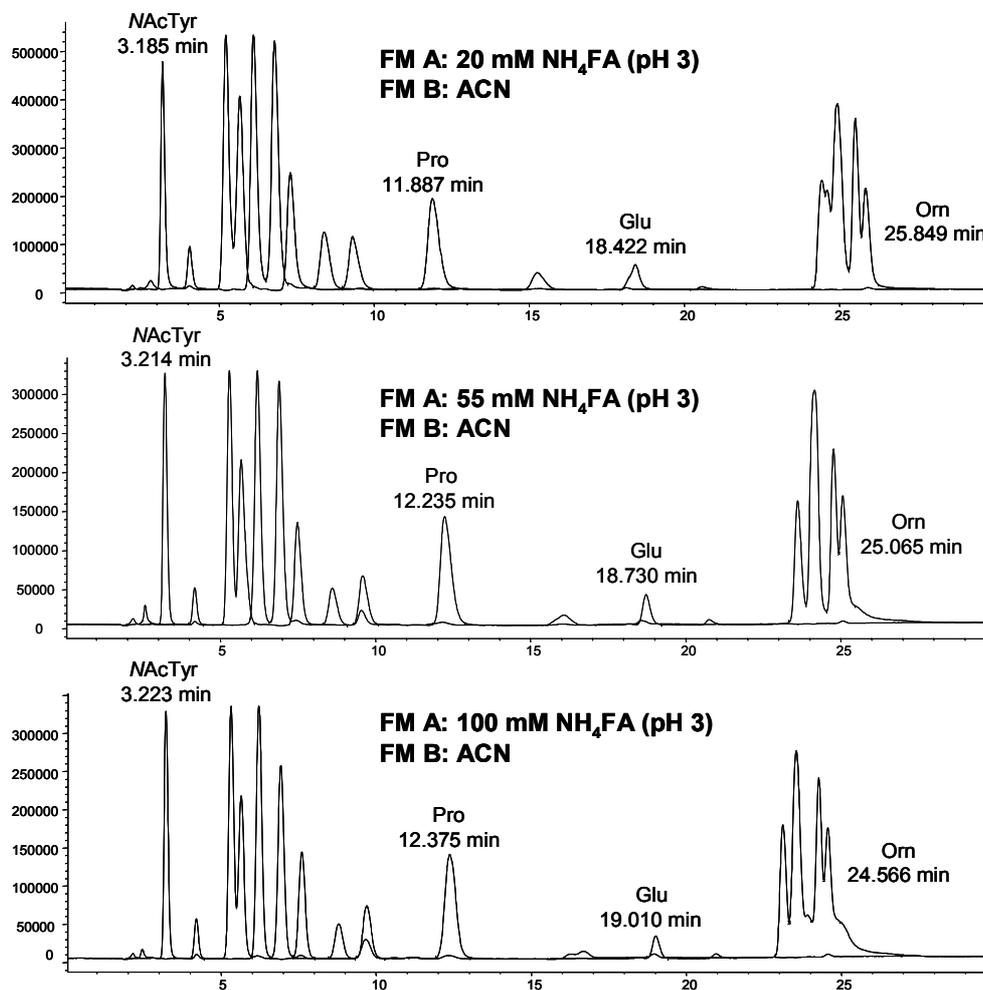


Abbildung B 2-7: Ergebnisse der HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS - Untersuchung (TICs) von AS bei unterschiedlicher Pufferkonzentration der wässrigen Phase des Eluenten. Konzentration AS: je 50 $\mu\text{mol/L}$, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), mobile Phase: FM A: 20 mM, 55 mM bzw. 100 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: ACN. Fluss: 200 $\mu\text{L/min}$. Gradientenelution. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.1.

Die basischen AS, die in den Chromatogrammen (Abbildung B 2-7) die letzten vier Peaks darstellen, eluierten bei steigender Konzentration an NH₄FA früher. Für die übrigen AS war der gegenteilige Effekt festzustellen, was aus den Chromatogrammen am Beispiel der Retentionszeiten von NAcTyr, Pro und Glu hervorgeht.

Verdeutlicht wird die steigende Retention in Abbildung B 2-8 am Beispiel der sauren AS Glu und Asp.

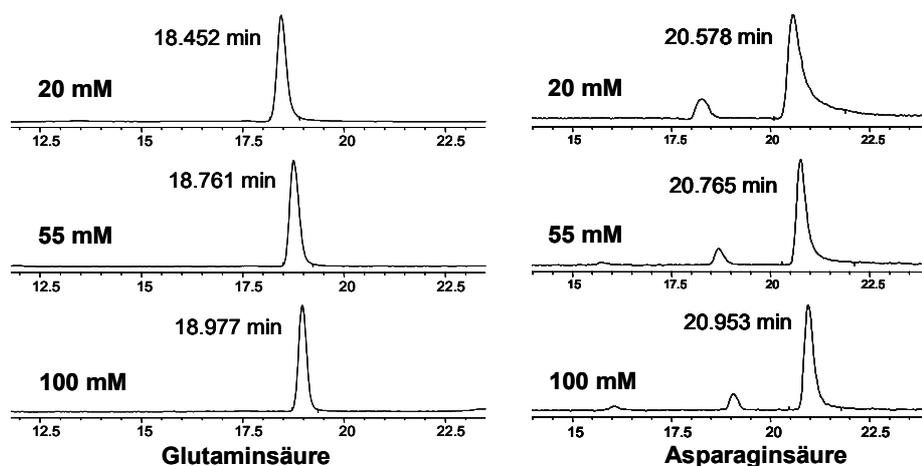


Abbildung B 2-8: XIC-Chromatogramme der HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS - Untersuchung von AS bei steigender Pufferkonzentration der wässrigen Phase des Eluenten
 Dargestellt sind die zunehmenden Retentionszeiten und die Verschärfung der Peaks am Beispiel von Glu (links) und Asp (rechts).

Konzentration AS: je 50 $\mu\text{mol/L}$, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), mobile Phase: FM A: 20 mM, 55 mM bzw. 100 mM NH_4FA in H_2O (pH 3), FM B: ACN. Fluss: 200 $\mu\text{L/min}$. Gradientenelution. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.1.

In den letzten Jahren beschäftigten sich einige Veröffentlichungen mit dem Einfluss der Salzkonzentration auf die Retention unter HILIC-Bedingungen. Je nach Oberfläche der stationären Phase und der damit mehr oder weniger ausgeprägten Ionenaustauscherfunktionen sind stark unterschiedliche Effekte beobachtet worden (Guo und Gaiki 2005). Für die in vorliegender Arbeit verwendete zwitterionische Phase sind bei steigender Pufferkonzentration unterschiedliche Auswirkungen auf die Retention festgestellt worden (Xie *et al.* 2010). Diese Effekte wurden durch die Struktur der Analyten und den postulierten Trennmechanismus der HILIC erklärt.

Der Anstieg der Retentionszeiten bei höheren Salzgehalten wird mit dem der HILIC zugrunde liegenden Mechanismus der hydrophilen Verteilung zwischen der wasserreichen Schicht auf der Oberfläche der stationären Phase und der mobilen Phase begründet. Die Puffersubstanzen befinden sich, bedingt durch den hohen organischen Anteil im Eluenten, hauptsächlich in der wasserreichen Schicht. Bei höheren Pufferkonzentrationen sind entsprechend mehr Salz-Ionen in der Wasserschicht, wodurch diese aufgrund des stärkeren osmotischen Drucks an Volumen und Hydrophilie zunimmt, was zu einem Anstieg der Retention führt (Xie *et al.* 2010).

Zudem wird für die ZIC[®]-HILIC-Säule für saure Analyt-Ionen ein weiterer Mechanismus vorgeschlagen, der von den funktionellen Gruppen der Oberfläche der stationären Phase (Sulfobetaingruppe) bestimmt wird. Die Säuremoleküle können aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativ geladenen Sulfonsäuregruppe nicht die näher an der Silica-Oberfläche sitzenden quartären Ammoniumgruppen erreichen und dort aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen retardiert werden. Durch die erhöhte Salzkonzentration wird die elektrostatische Abstoßung der Sulfonsäuregruppe verringert, so dass die Säuren verstärkt mit der stationären Phase wechselwirken können und so länger retardiert werden (Guo und Gaiki 2005).

Die Verkürzung der Retentionszeit der basischen AS bei Erhöhung der Pufferkonzentration kann ebenfalls durch die Eigenschaften der stationären Phase erklärt werden. Die positiv geladenen basischen AS treten mit den negativ geladenen Sulfonsäuregruppen der stationären Phase in Kontakt. Durch die erhöhte Salzkonzentration nehmen die elektrostatischen Wechselwirkungen ab, da die negativen Ladungen der Sulfonsäuregruppen durch die Gegenionen der mobilen Phase stärker „abgeschirmt“ sind. Die Retention der positiv geladenen AS wird somit hauptsächlich durch die Verteilungsvorgänge zwischen der Wasserschicht und der mobilen Phase erreicht. Die zusätzliche Retention durch elektrostatische Wechselwirkungen wird durch steigende Pufferkonzentration verringert. Diese Vorstellungen werden durch neuere Untersuchungen bestätigt. Liu *et al.* (2009) stellten diesen Effekt für basische Hydrazine fest.

Neben den Retentionszeiten wurden durch steigende Pufferkonzentrationen auch die Peakformen und die Auflösung bestimmter AS beeinflusst.

Abbildung B 2-9 zeigt die XIC-Chromatogramme der Trennung von acht AS, womit der Einfluss der Pufferkonzentration verdeutlichen werden soll.

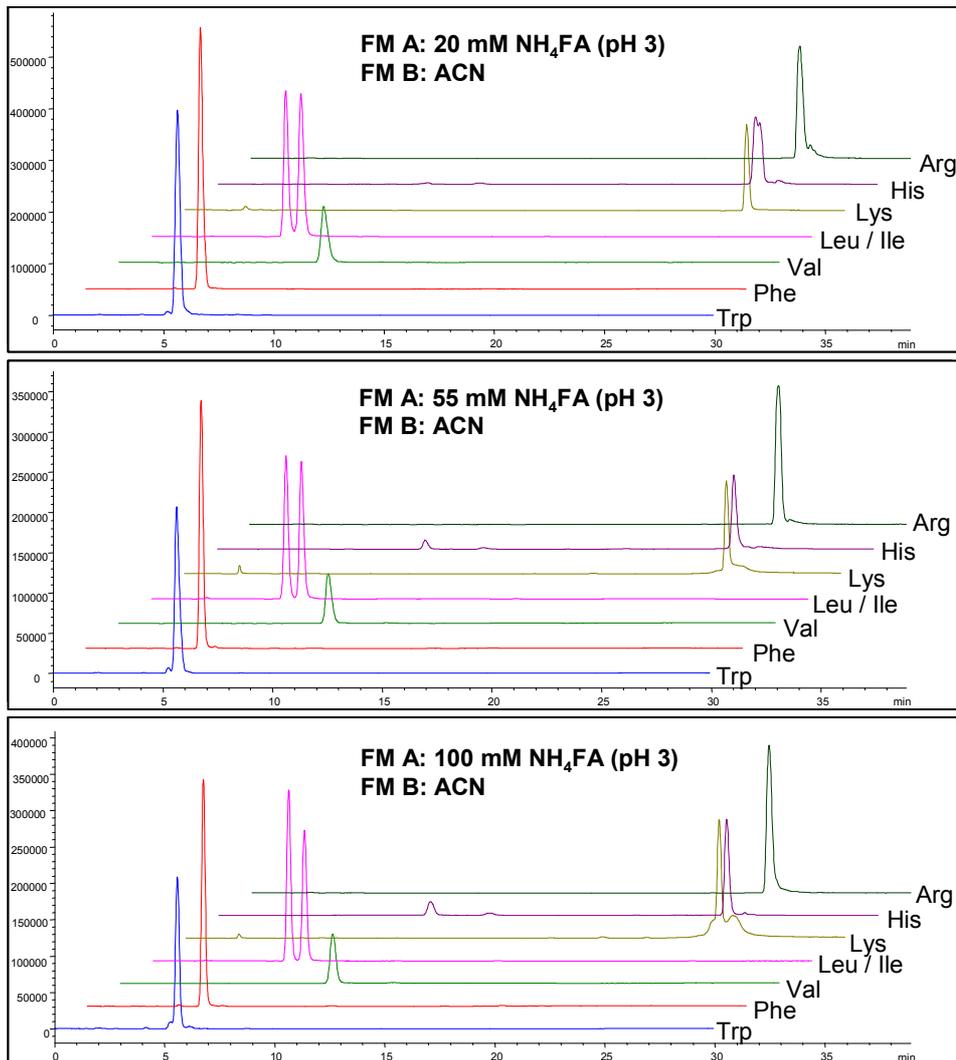


Abbildung B 2-9: Ergebnisse der HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS - Untersuchung von AS bei unterschiedlicher Pufferkonzentration in der wässrigen Phase des Eluenten. Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme von acht Beispiel-AS.

Konzentration AS: je 50 $\mu\text{mol/L}$, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), mobile Phase: FM A: 20 mM, 55 mM bzw. 100 mM NH_4FA in H_2O (pH 3), FM B: ACN. Fluss: 200 $\mu\text{L/min}$. Gradientenelution. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.1.

Die Peakformen der unpolaren AS waren bei allen Salzgehalten gut, wobei bei steigender Konzentration eine leichte Verschärfung der Peaks dieser AS festzustellen war, was in der Abbildung B 2-9 anhand von Phe und Val erkennbar wird.

Besonders deutlich äußerte sich der Effekt der Peak-Verschärfung durch hohe Pufferkonzentrationen bei den polaren sauren AS Glu und Asp (vgl. Abbildung B 2-8, S.96).

Für die Methodenoptimierung war der Einfluss der Pufferkonzentration besonders für Leu und Ile von Bedeutung, die bei einer Pufferkonzentration von 20 mM in der wässrigen Phase des Eluenten nicht vollständig getrennt wurden. Die erhöhten Salzkonzentrationen führten dagegen bei beiden AS zu einer leicht verlängerten Retention in Kombination mit schärferen Peaks, so dass daraus Basislinientrennung resultierte (Abbildung B 2-9, S.98).

Bei den Peakformen weiterer AS zeigten sich bei unterschiedlicher NH_4FA -Konzentration deutliche Effekte, wobei die Auswirkungen nicht einheitlich waren.

Während sich die Peakformen von Arg und His bei steigender Pufferkonzentration verbesserten, d.h. die „Schulter“ des jeweiligen Peaks geringer wurde, trat bei Lys der umgekehrte Effekt auf. Zeigte sich bei 20 mM NH_4FA ein symmetrischer Peak, wurde er bei Erhöhung des Puffers unsymmetrisch und sehr breit.

Die Verschärfung der Peaks für basische Substanzen bei steigender Ionenstärke der mobilen Phase, wie sie in unseren Studien für Arg, His und Orn beobachtet wurde (vgl. Abbildung B 2-9 und Abbildung B 2-10), ist in der Literatur für Hydrazine beschrieben (Liu *et al.* 2009). Das gegensätzliche Verhalten von Lys ist überraschend, insbesondere, da es sich strukturell nur durch eine CH_2 -Gruppe von Orn unterscheidet und diesem auch hinsichtlich der chemisch-physikalischen Eigenschaften (z.B. pKs-Werte) sehr ähnlich ist. Für Orn wurden jedoch bei jeder der untersuchten Pufferkonzentrationen gute Peakformen erhalten (Abbildung B 2-10).

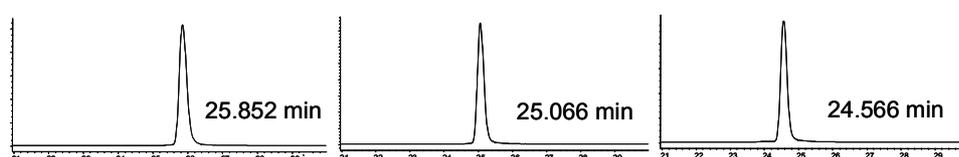


Abbildung B 2-10: Nahezu gleichbleibende Peakform von Orn bei unterschiedlicher Pufferkonzentration in der wässrigen Phase des Eluenten. In den XIC-Chromatogrammen ist dem jeweiligen Peak seine entsprechende Retentionszeit zugeordnet. HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.1.

Der Grund für das gegensätzliche Verhalten von Lys bleibt unklar, war aber auch nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen, insbesondere da im Verlauf der weiteren Methodenentwicklung die Peakform optimiert werden konnte.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass zur Optimierung der Peakform der AS eine Variation der Pufferkonzentration während des Laufes der HILIC - HPLC - Methode nötig ist. Zu Beginn garantiert eine hohe NH_4FA - Konzentration die Trennung von Leu und Ile und führt zu schärferen Peaks der AS, während gegen Ende die Pufferkonzentration gesenkt werden muss, um eine adäquate Peakform für Lys zu erreichen.

In einer anschließenden Versuchsreihe wurden daher zwei verschiedene Puffer-Gradienten hinsichtlich ihrer Eignung zur AS-Trennung untersucht. In beiden Fällen startete der Gradient mit 100% FM A, welches aus 20% 100 mM NH_4FA in H_2O (pH 3) und 80% ACN bestand. Im Verlauf des Gradienten wurde der Anteil der wässrigen Phase durch Erhöhung des Anteils an FM B (20 mM bzw. 40 mM NH_4FA in H_2O (pH 3)) gesteigert, wodurch die Pufferkonzentration in der wässrigen Phase insgesamt abnahm. Abbildung B 2-11 zeigt am Beispiel von sechs AS die Ergebnisse (XIC-Chromatogramme) dieser Untersuchungen.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurden unter den gewählten Bedingungen, also hohe Pufferkonzentration zu Beginn des Gradienten, Leu und Ile in beiden Fällen chromatographisch getrennt. Die Peakform der übrigen AS war gut und wurde durch Variation der Pufferkonzentration, wie geschildert, wenig beeinflusst (vgl. Phe in Abbildung B 2-11). Lys, welches in der vorausgegangenen Versuchsreihe bei einer Pufferkonzentration von 55 mM NH_4FA und höher durch eine schlechte Peakform gekennzeichnet war (Abbildung B 2-9), erschien nun jeweils mit einem scharfen, symmetrischen Peak. Die Peakform von Arg und His war bei 40 mM NH_4FA in FM A deutlich besser.

In weiteren Studien wurde daher mit dieser Pufferkonzentration (FM B: 40 mM NH_4FA , FM A: 20% 100 mM NH_4FA in H_2O (pH 3), 80% ACN) gearbeitet.

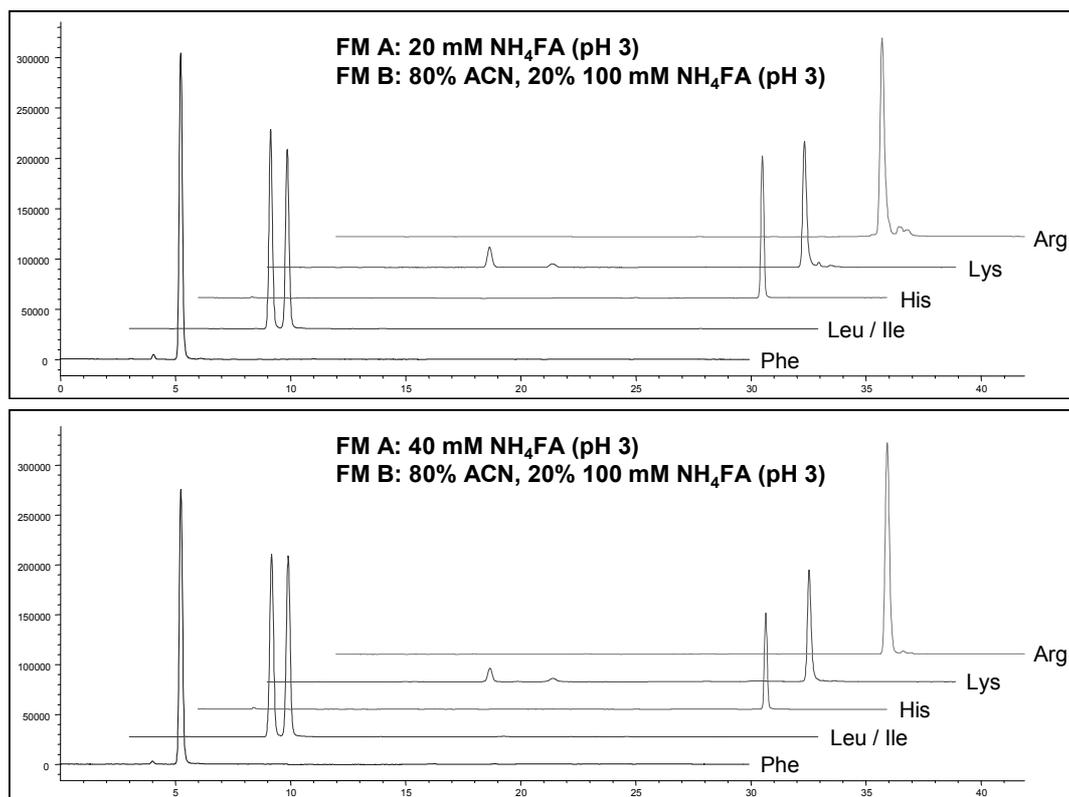


Abbildung B 2-11: Ergebnisse der HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS - Untersuchung von AS bei unterschiedlicher Pufferkonzentration der wässrigen Phase des Eluenten. Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme von sechs Beispiel-AS.

Konzentration AS: je 50 µmol/L, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), mobile Phase: FM A: 20 mM bzw. 40 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), Fluss: 200 µL/min. Gradientenelution. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.1.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Pufferkonzentration im Eluenten einen deutlichen Einfluss auf die Retention der AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule nimmt und die HILIC-Methode durch Variation der Salzmenge optimiert werden kann.

2.3.2 Einfluss der Temperatur der stationären Phase

Bei der HPLC ist die Temperatur eine wichtige Einflussgröße, die neben der Auflösung auch die Retention der Analyten beeinflusst. Art und Ausmaß der Auswirkungen auf die Retention hängen jedoch stark vom Trennmechanismus und

den jeweiligen zu untersuchenden Substanzen ab. In der RP-HPLC nimmt mit steigender Temperatur die Retention der Analyten im Allgemeinen ab, die Trennstufenhöhe nimmt zu (Swadesh 1998).

Die Abhängigkeit der Retention von der Temperatur wird in der (RP-) Chromatographie häufig durch die Van't Hoff – Gleichung beschrieben, die in der für die HPLC vereinfachten Form in Gleichung 1 gegeben ist. Mit steigender Temperatur wird der Retentionsfaktor k also kleiner.

$$\text{Gl. 1} \quad \log k = A + \frac{B}{T_K}$$

k : Retentionsfaktor A, B : temperaturunabhängige Konstanten T_K : Temperatur

Häufig wird die Abhängigkeit auch durch Auftragungen von $\log k$ gegen $1/T_K$ ausgedrückt (Snyder *et al.* 2010).

Ob und in wiefern die Temperatur Einfluss auf die Trennung von AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule nimmt, wurde von uns in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Dazu wurde eine AS-Mischung bei unterschiedlichen Säulentemperaturen (20°C, 40°C sowie Erhöhung auf 50°C nach Anfangsschritt bei 20°C) mittels HILIC-MS analysiert. Durchführung und HPLC-MS-Parameter sind Kapitel D 2.4.2 zu entnehmen.

In Abbildung B 2-12 sind die Totalionenchromatogramme (TICs) dargestellt, die sich bei verschiedenen Temperaturen ergaben.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind für die früher eluierenden AS bereits bei Betrachtung der TICs Einflüsse festzustellen, wohingegen die länger retardierten Analyten durch die Temperaturerhöhung die Säule anscheinend nicht früher verlassen.

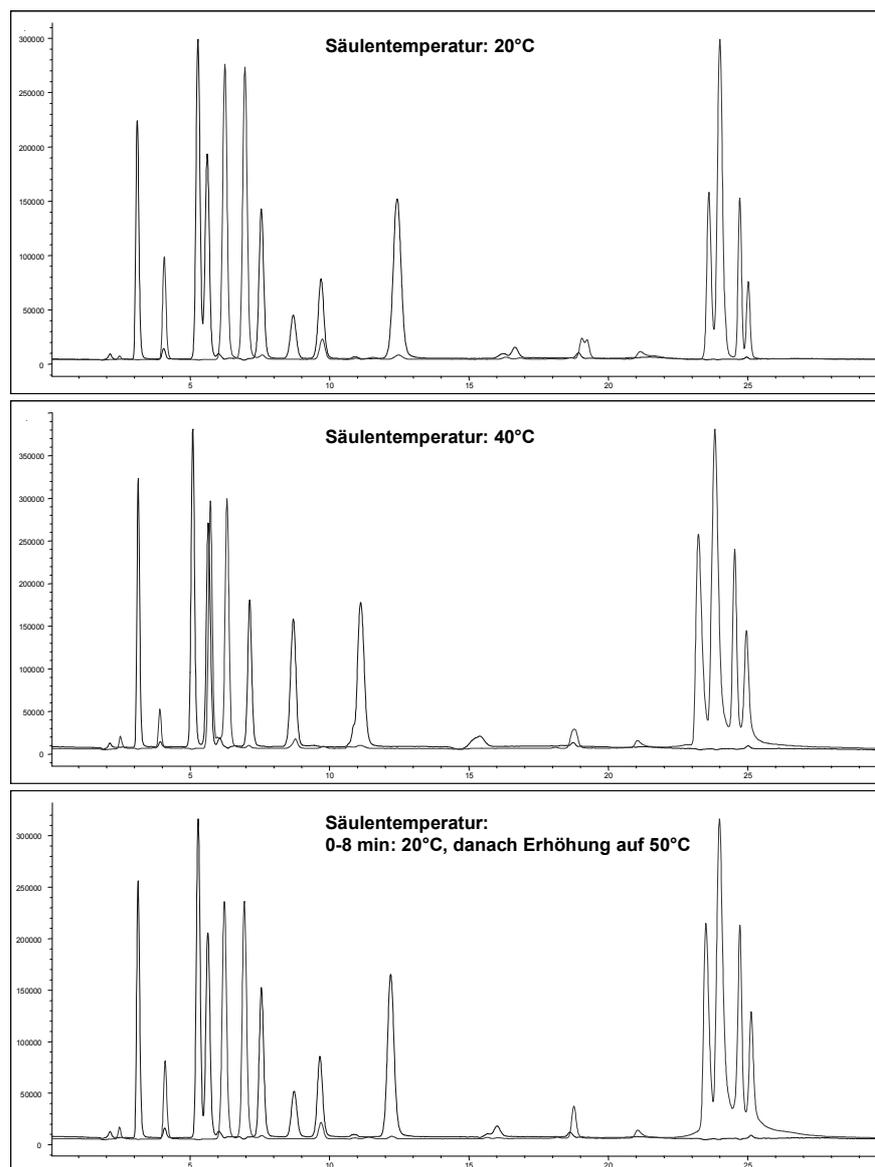


Abbildung B 2-12: Ergebnisse der HPLC-ESI_{pos}MS-Untersuchung von 21 AS bei unterschiedlichen Säulentemperaturen. Dargestellt sind die TICs, die sich bei einer Temperatur von 20°C (oben), von 40°C (Mitte) und von zu Beginn 20°C, nach 8 min Temperaturerhöhung auf 50°C (unten) ergaben.

Konzentration AS: je 50 µmol/L. Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH₄FA (pH 3). Fluss: 200 µL/min. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.2.

Für die früh eluierenden AS ist bei Temperaturerhöhung im Allgemeinen eine Verkürzung der Retentionszeiten festzustellen, was in Abbildung B 2-13 am Beispiel von Leu und Ile sowie Pro dargestellt ist.

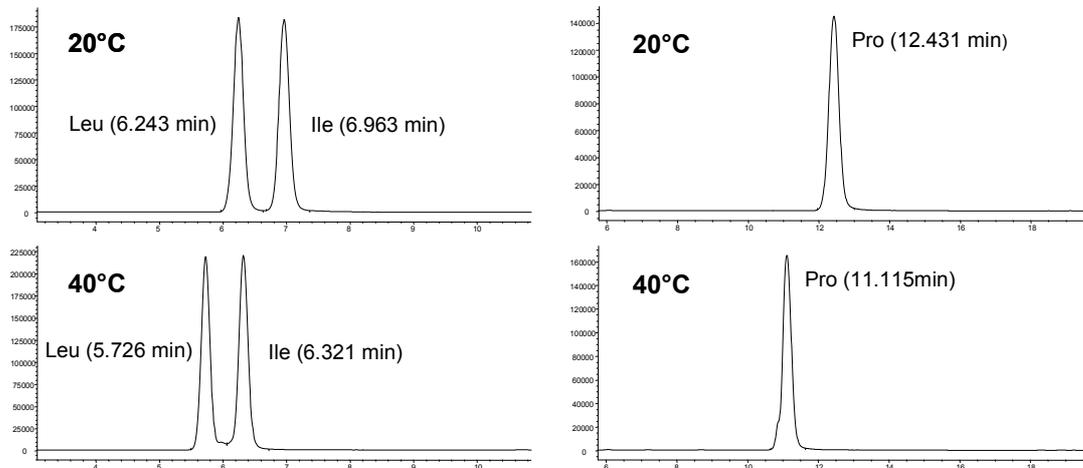


Abbildung B 2-13: Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennung von AS. Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der Beispiel-AS Leu/Ile und Pro bei einer Temperatur von 20°C (oben) und 40°C (unten).

Konzentration AS: je 50 µmol/L, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH₄FA (pH 3). Fluss: 200 µL/min. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.2.

Bedingt durch die frühere Elution wurden bei einer Temperatur von 40°C Leu und Ile nicht mehr vollständig chromatographisch getrennt, die Auflösung war bei 20°C besser. Trp hingegen änderte bei erhöhter Temperatur sein Retentionsverhalten kaum, so dass es dadurch bei 40°C zur vollständigen Trennung von Phe kam. Die Auflösung der beiden AS war hier wesentlich besser (vgl. Abbildung B 2-14).

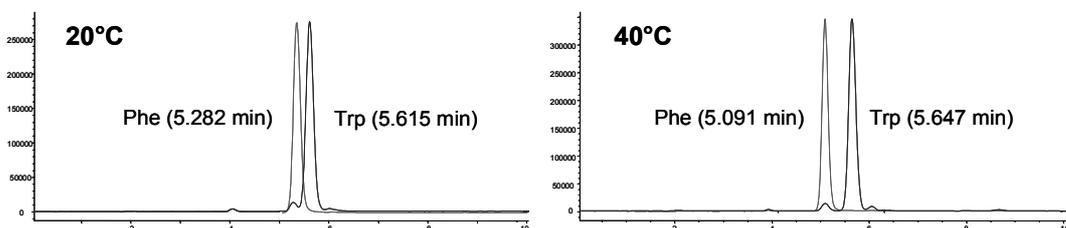


Abbildung B 2-14: Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennung von AS. Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der Beispiel-AS Phe und Trp bei einer Temperatur von 20°C (links) und 40°C (rechts).

Konzentration AS: je 50 µmol/L, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH₄FA (pH 3). Fluss: 200 µL/min. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.2.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Variation der Temperatur Einfluss auf die Selektivität der Trennung an einer ZIC[®]-HILIC-Säule genommen werden kann. Allerdings wird auch deutlich, dass das angestrebte Ziel, durch Temperaturerhöhung auf 40°C die Analysendauer der Trennung von AS merklich zu verkürzen, nicht zu erreichen war. Verdeutlicht wird dies durch Abbildung B 2-15, in der die zuletzt eluierenden, basischen AS dargestellt sind. Durch Erhöhung der Temperatur auf 40°C eluierten zwar alle vier AS früher, bei allerdings nur geringen Unterschieden.

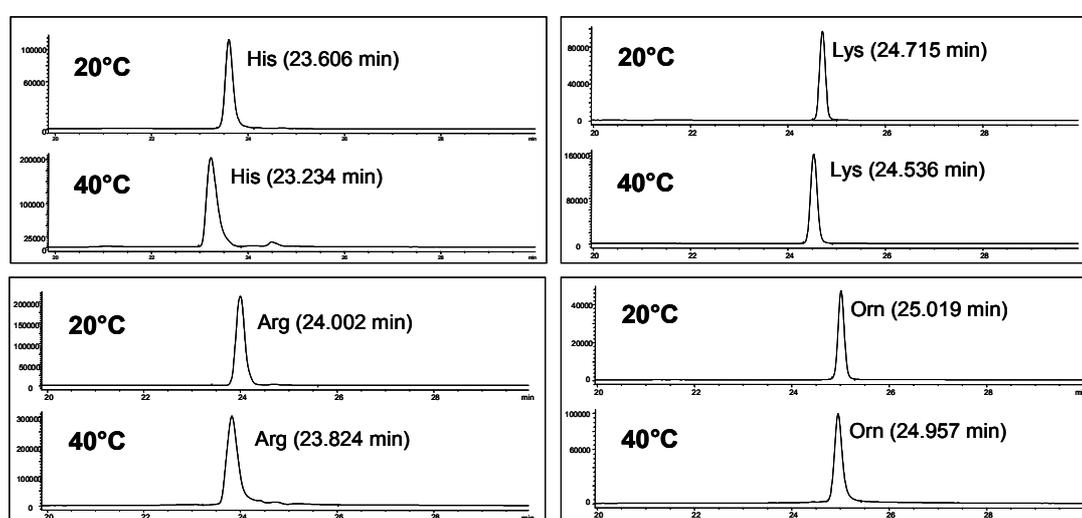


Abbildung B 2-15: Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennung von AS. Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme der basischen AS His, Arg, Lys und Orn bei einer Temperatur von 20°C (jeweils oberes Chromatogramm) und 40°C (jeweils unteres Chromatogramm).

Konzentration AS: je 50 µmol/L, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH₄FA in H₂O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH₄FA (pH 3). Fluss: 200 µL/min. Temperatur: 20°C (oben) sowie 40°C (unten). Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.2.

In einer weiteren Versuchsreihe prüften wir, ob eine Erhöhung auf 50°C zu einer merklich schnelleren Elution der basischen AS führt. Da die Basislinientrennung von Leu und Ile Voraussetzung zur erfolgreichen Quantifizierung der beiden AS im SIM-Modus ist, diese jedoch bei höheren Temperaturen nicht gegeben ist (vgl. Abbildung B 2-13), wurde dazu ein Temperaturgradient angewendet. Nach einem Anfangsschritt von 20°C (zur Trennung von Leu und Ile) erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 50°C.

Wie aus Abbildung B 2-12 (S. 103, unteres Chromatogramm) hervorgeht, konnte auch durch weitere Temperaturerhöhung die Elution der basischen AS (die letzten vier Peaks im TIC) nicht deutlich beschleunigt werden.

In einer aktuellen Veröffentlichung wird u.a. der Einfluss der Temperatur auf die Trennung von Neurotransmittern bzw. deren Precursoren, darunter die AS Trp, Tyr und DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin) an zwölf HILIC-Säulen untersucht (Chirita *et al.* 2010). An der ZIC[®]-HILIC-Säule stellten die Autoren für alle Analyten bei steigender Temperatur zunehmende Retentionszeiten fest, wobei sie keine Erklärung für dieses Verhalten gaben.

Die Resultate dieser Studie stehen im Widerspruch zu unseren Ergebnissen sowie zu den von Guo und Gaiki (2005), Liu *et al.* (2009) sowie Marrubini *et al.* (2010) vorgelegten Informationen, bei denen jeweils an einer ZIC[®]-HILIC-Säule für verschiedene Analyten (Cytosin und Acetylsalicylsäure, Hydrazine sowie Purin- und Pyrimidinbasen) mit steigender Temperatur abnehmende Retentionszeiten ermittelt wurden. Guo und Gaiki (2005) postulierten für die Modellsubstanzen Cytosin und Acetylsalicylsäure einen linearen Zusammenhang zwischen $1/T_K$ und $\ln k$, weshalb sie Verteilungsvorgänge zwischen der wasserreichen Schicht und der mobilen Phase für den dominierenden Retentionsmechanismus einer ZIC[®]-HILIC-Säule hielten; auf die Notwendigkeit weiterer Studien wurde hingewiesen. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Marrubini *et al.* (2010), bei denen für die Trennung der Analyten an einer ZIC[®]-HILIC-Säule keine lineare Funktion abgeleitet werden konnte. Die Autoren erklärten dies mit dem Verhalten ionisierbarer Substanzen bei verschiedenen Temperaturen (Marrubini *et al.* 2010). Für ionisierbare, insbesondere basische Substanzen wurde, auch in Abhängigkeit von pH-Wert und verwendeter Puffer-substanz, kürzlich gezeigt, dass sich keine linearen Van't Hoff - Ableitungen ergeben (Heinisch und Rocca 2009). Diese Erklärung scheint für die von uns ermittelten Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Trennung von AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule anwendbar, bei welcher insbesondere die basischen AS infolge erhöhter Temperaturen die stationäre Phase nur wenig früher verlassen. Zur genauen Klärung des Einflusses der Temperatur sind weiterführende Studien notwendig, die jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Erhöhung der Temperatur Einfluss auf die Selektivität der Trennung der AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule genommen werden kann, wobei jedoch im untersuchten Temperaturbereich (20°C – 50°C) keine merkliche Verkürzung der Analysenzeit erreicht wird. Dies liegt vor allem an den basischen AS, welche bei erhöhter Temperatur nur unwesentlich früher eluiert werden.

2.3.3 Einfluss des organischen Anteils in der mobilen Phase - Variation des Gradienten

In einer anschließenden Versuchsreihe wurde von uns untersucht, inwiefern eine Erhöhung der Endkonzentration an ACN im Gradienten bei gleicher Steilheit der Fließmitteländerung Einfluss auf die Trennung und Peakform der AS nimmt. Zudem wurden verschiedene, steilere Gradienten getestet, mit denen die Analysendauer verkürzt werden sollte. Bei dem in den bisherigen Versuchen verwendeten Fließmittelgradient wurde der Anteil an wässriger Phase im Eluenten nach einem isokratischen Anfangsschritt von 20% auf 60% innerhalb von 16 Minuten erhöht, was einer Änderung von 2.5% pro Minute entspricht. Gewählt wurden diese Bedingungen gemäß den Angaben des Säulenherstellers, der diese Steilheit als geeignet angibt und gleichzeitig darauf verweist, dass schnellere, also steilere Gradienten, ggf. zu Problemen bezüglich der Reproduzierbarkeit führen können (SeQuant 2006).

Neben einer Steigerung des wässrigen Anteils auf nur 30%, 35%, 40% sowie 50% bei einer Änderung von 2.5% pro Minute wurden zudem Gradienten getestet, welche den wässrigen Anteil der mobilen Phase pro Minute um 3% bzw. 4% steigern. Die Durchführung und HPLC-MS-Parameter sind Kapitel D 2.4.3 zu entnehmen.

In Abbildung B 2-16 sind die bei verschiedenen Untersuchungen erhaltenen TICs dargestellt, die nach Gradientenanalyse mit 2.5% Änderung pro Minute erhalten wurden.

Wie erkennbar ist, konnte erwartungsgemäß durch Variation der Zusammensetzung des Fließmittels deutlich Einfluss auf die Trennung der AS genommen werden. Betroffen waren vor allem die zuletzt eluierenden Peaks der basischen AS, die bei

geringerer Elutionskraft der mobilen Phase (Endkonzentration der wässrigen Phase von 30% und 35%) deutlich später und mit breiteren Peaks detektiert wurden. Dabei wurde Basislinientrennung erreicht.

Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich erneut die Leistungsfähigkeit der HILIC zur Trennung von AS. Durch Anwendung eines geeigneten Fließmittelgradienten kann, ggf. in Kombination mit Variation der Temperatur und der Pufferkonzentration, eine vollständige Trennung aller untersuchten AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule erreicht werden. Dies ist auch für die Verwendung anderer als massenspektrometrischer Detektoren von Bedeutung.

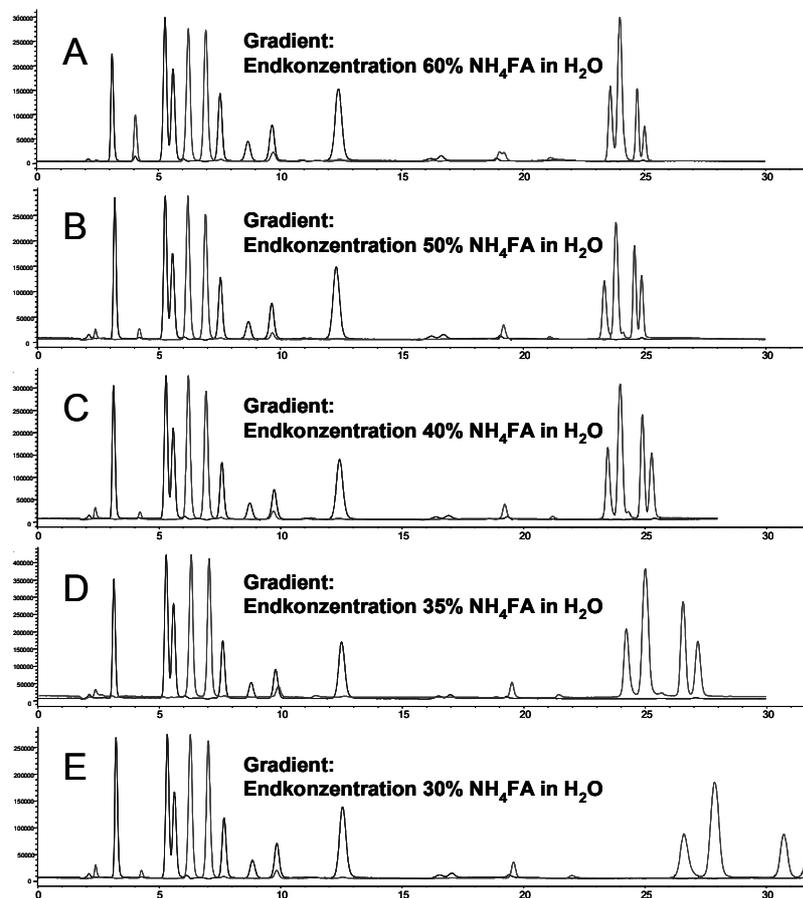


Abbildung B 2-16: Einfluss der Endkonzentration an wässriger Phase im Eluenten auf die Trennung von AS (TICs).

Konzentration AS: je 50 $\mu\text{mol/L}$, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH_4FA in H_2O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH_4FA (pH 3). Fluss: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Temperatur: 20°C. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.3.

Abbildung B 2-17 zeigt die TICs, wie sie von uns bei verschiedenen Untersuchungen mittels Gradientenanalyse mit 3% bzw. 4% Änderung des wässrigen Anteils pro Minute erhalten wurden. In den Chromatogrammen F und G erhöhte der Gradient bei 3% Änderung pro Minute den Anteil an wässriger Phase im Eluenten auf 60% (F) bzw. 40% (G), in den Chromatogramme H und I bei 4% Änderung pro Minute auf 60% (H) bzw. 40% (I).

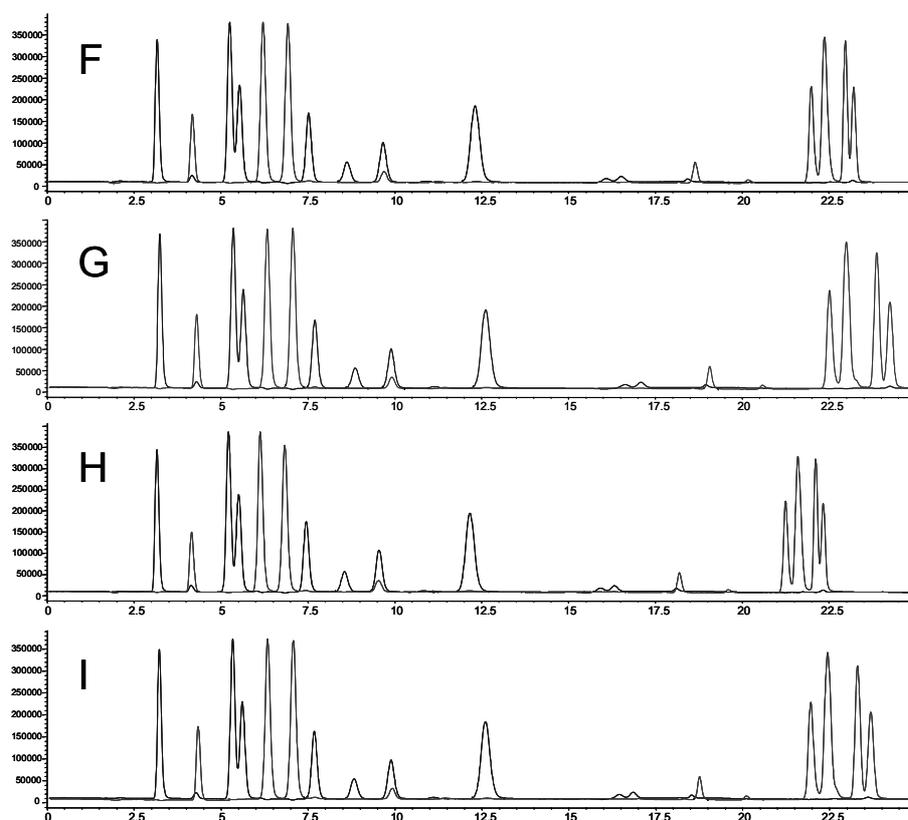


Abbildung B 2-17: Einfluss der Endkonzentration an wässriger Phase im Eluenten sowie der Steilheit des Gradienten auf die Trennung von AS (TIC).

Chromatogramm F: Endkonzentration wässrige Phase im Eluenten 60%, 3% Änderung pro Minute. Chromatogramm G: Endkonzentration wässrige Phase im Eluenten 40%, 3% Änderung pro Minute. Chromatogramm H: Endkonzentration wässrige Phase im Eluenten 60%, 4% Änderung pro Minute. Chromatogramm I: Endkonzentration wässrige Phase im Eluenten 40%, 4% Änderung pro Minute.

Konzentration AS: je 50 $\mu\text{mol/L}$, Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden), Fließmittel: 40 mM NH_4FA in H_2O (pH 3), FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH_4FA (pH 3). Fluss: 200 $\mu\text{L/min}$. Temperatur: 20°C. Weitere HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.4.3.

Erwartungsgemäß ließ sich durch schnellere Erhöhung der wässrigen Phase und damit Erhöhung der Elutionskraft der mobilen Phase die Analysenzeit verkürzen. Durch Steigerung des Gradienten auf 60% wässrigen Anteil bei 4% Änderung pro Minute eluierten alle AS in ca. 22.5 min (Chromatogramm H in Abbildung B 2-17).

Weiterführende Studien zeigten zudem, dass der „schnellere“ Gradient an einer ZIC[®]-HILIC-Säule auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit gut geeignet ist.

Für die Validierung der Methode wird daher ein Gradient zur Anwendung kommen, der den wässrigen Anteil des Eluenten auf 60% bei einer Änderung von 4% pro Minute steigert. Durch die Verkürzung des isokratischen Anfangsschritts auf 5 Minuten gelingt damit die HPLC-(Vor-)Trennung der AS in weniger als 20 min (vgl. Kapitel B 2.4, S.110).

2.4 Übertragung der optimierten Methode auf die Bedingungen einer Infusionslösung

Bei der bisherigen Methodenentwicklung wurde eine AS-Standard-Mischung verwendet, die alle Analyten in der jeweils gleichen Konzentration (50 µmol/L) enthielt. In den Infusionslösungen, in welchen die AS quantifiziert werden sollen, liegen die einzelnen AS jedoch, wie erwähnt, in stark unterschiedlichen Konzentrationen vor. Um die entwickelte HPLC-MS-Methode im Hinblick auf die spätere Anwendung zu prüfen, wurde eine Aminosäuren-Standard-Mischung („AS-Master-Mix“) hergestellt, welche die AS in den entsprechenden Konzentrationen der Infusionslösungen enthält. In den gleichen Konzentrationsverhältnissen wurde eine Mischung der IS („IS-Master-Mix“) hergestellt. Nach geeigneter Verdünnung wurde eine Mischung aus beiden Lösungen („Probelösung AS und IS“) mit der optimierten HPLC-MS-Methode, die sich aus der Kombination der unter Abschnitt B 2.3 erhaltenen Ergebnisse ergab, untersucht (Durchführung und HPLC-MS-Methode siehe Abschnitt D 2.5).

Ziel der Untersuchung war es zu klären, ob trotz der deutlichen Konzentrationsunterschiede, die aus der Formulierung der Infusionslösung resultierten, alle Analyten mit der entwickelten HPLC-MS-Methode bestimmbar sind.

Abbildung B 2-18 zeigt das bei der Analyse des Master-Mixes erhaltene TIC-Chromatogramm.

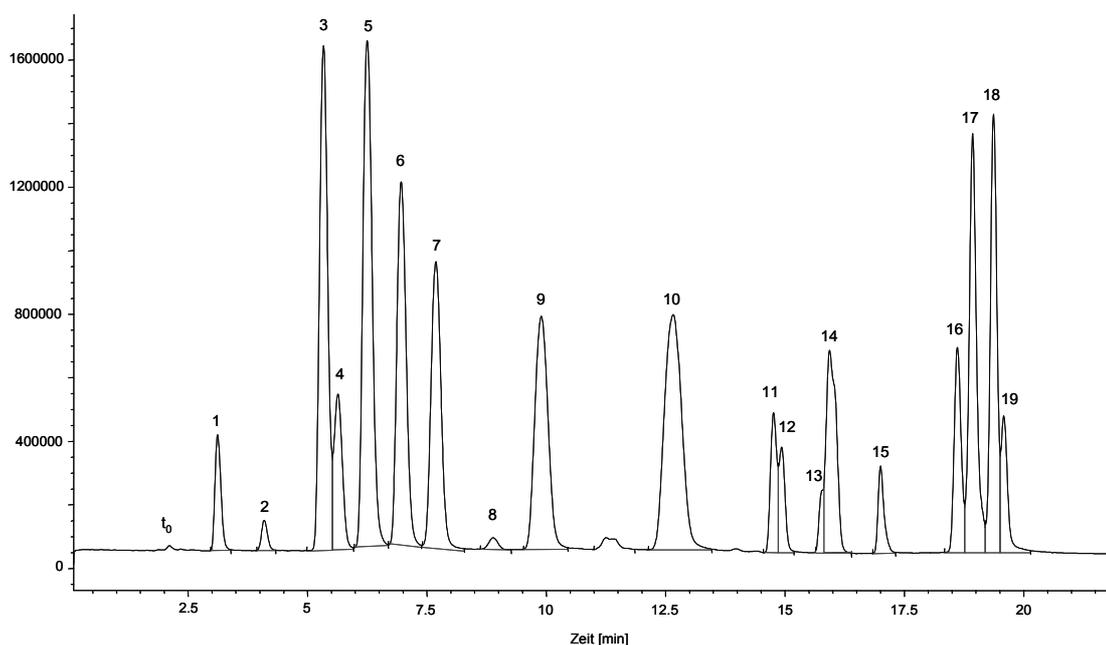


Abbildung B 2-18: Chromatogramm (TIC) der HILIC-HPLC-ESI_{pos}-MS-Untersuchung der „Master-Mix“-Untersuchungslösung (21 AS und 19 IS).

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden). Gradientenelution. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

Peak 1: NAcTyr ($t_R = 3.118$ min), Peak 2: NAcCys ($t_R = 4.095$ min), Peak 3: Phe ($t_R = 5.309$ min), Peak 4: Trp ($t_R = 5.615$ min), Peak 5: Leu ($t_R = 6.235$ min), Peak 6: Ile ($t_R = 6.964$ min), Peak 7: Met ($t_R = 7.661$ min), Peak 8: Tyr ($t_R = 8.895$ min), Peak 9: Val ($t_R = 9.829$ min), Peak 10: Pro ($t_R = 12.559$ min), Peak 11: Ala ($t_R = 14.748$ min), Peak 12: Thr ($t_R = 14.930$ min), Peak 13: Gly ($t_R = 15.764$ min), Peak 14: Glu ($t_R = 15.927$ min), Ser ($t_R = 15.994$ min), Asn ($t_R = 16.034$ min), Peak 15: Asp ($t_R = 17.000$ min), Peak 16: His ($t_R = 18.607$ min), Peak 17: Arg ($t_R = 18.927$ min), Peak 18: Lys ($t_R = 19.366$ min), Peak 19: Orn ($t_R = 19.581$ min).

Die Nummerierung gilt analog für die isotoopenmarkierten Aminosäuren (IS), die parallel zu den entsprechenden Referenz-Aminosäuren eluieren. t_0 markiert die Totzeit.

Aus dem TIC-Chromatogramm lässt sich ablesen, dass trotz der Konzentrationsunterschiede in der Formulierung alle AS innerhalb von 20 min erfasst wurden. Dabei wurden nicht alle AS vollständig chromatographisch getrennt. Einen besseren Einblick erhält man, wenn man im HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm die einzelnen *m/z*-Spuren betrachtet, wie sie in den Abbildungen B 2–19 bis B 2–22 dargestellt sind, und diese untereinander bzw. mit dem TIC-Chromatogramm vergleicht.

Chromatographisch lediglich angetrennt wurden Phe (Peak 3 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 166) und Trp (Peak 4 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 205) sowie Ala (Peak 11 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 90) und Thr (Peak 12 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 120). Dies gilt ebenso für die basischen AS His, Arg, Lys und Orn (Peaks 16 - 19 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 156, $[M+H]^+$ *m/z* 175, $[M+H]^+$ *m/z* 147, $[M+H]^+$ *m/z* 133). Beinahe gleichzeitig eluierten Gly ($[M+H]^+$ *m/z* 76), Glu ($[M+H]^+$ *m/z* 148), Ser ($[M+H]^+$ *m/z* 106) und Asn ($[M+H]^+$ *m/z* 133), die im TIC die Peaks 13 und 14 darstellen.

Für die Quantifizierung mittels HPLC-MS ist die Koelution der genannten AS jedoch nicht von Bedeutung, da sie aufgrund unterschiedlicher Massen der Precursorionen getrennt erfasst werden können.

Aminosäuren mit gleichen bzw. ähnlichen molaren Massen (M_r+1) eluierten getrennt voneinander.

Leu und Ile (Peak 5 und Peak 6 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 132) erschienen nacheinander bei einer Retentionszeit von 6.235 min bzw. 6.964 min. Auch Asn (Peak 14 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 133), Asp (Peak 15 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 134) und Orn (Peak 19 im TIC, $[M+H]^+$ *m/z* 133) eluierten getrennt voneinander bei Retentionszeiten von 16.034 min, 17.000 min bzw. 19.580 min.

Lys, Glu und ¹³C₂-Lys, die durch Precursorionen von *m/z* 147, *m/z* 148 bzw. *m/z* 149 gekennzeichnet sind, lagen im Chromatogramm ebenfalls weit voneinander entfernt ($t_R = 15.927$ min für Glu, Peak 14 im TIC, $t_R = 19.366$ min für Lys und ¹³C₂-Lys, Peak 18 im TIC). Eine weitere Interferenz durch ¹³C₆-Arg ($[M+H]^+$ *m/z* 181) und Tyr ($[M+H]^+$ *m/z* 182) blieb aufgrund des deutlichen Retentionszeitunterschieds ($t_R = 8.895$ min für Tyr, $t_R = 18.925$ für ¹³C₆-Arg) ohne Bedeutung.

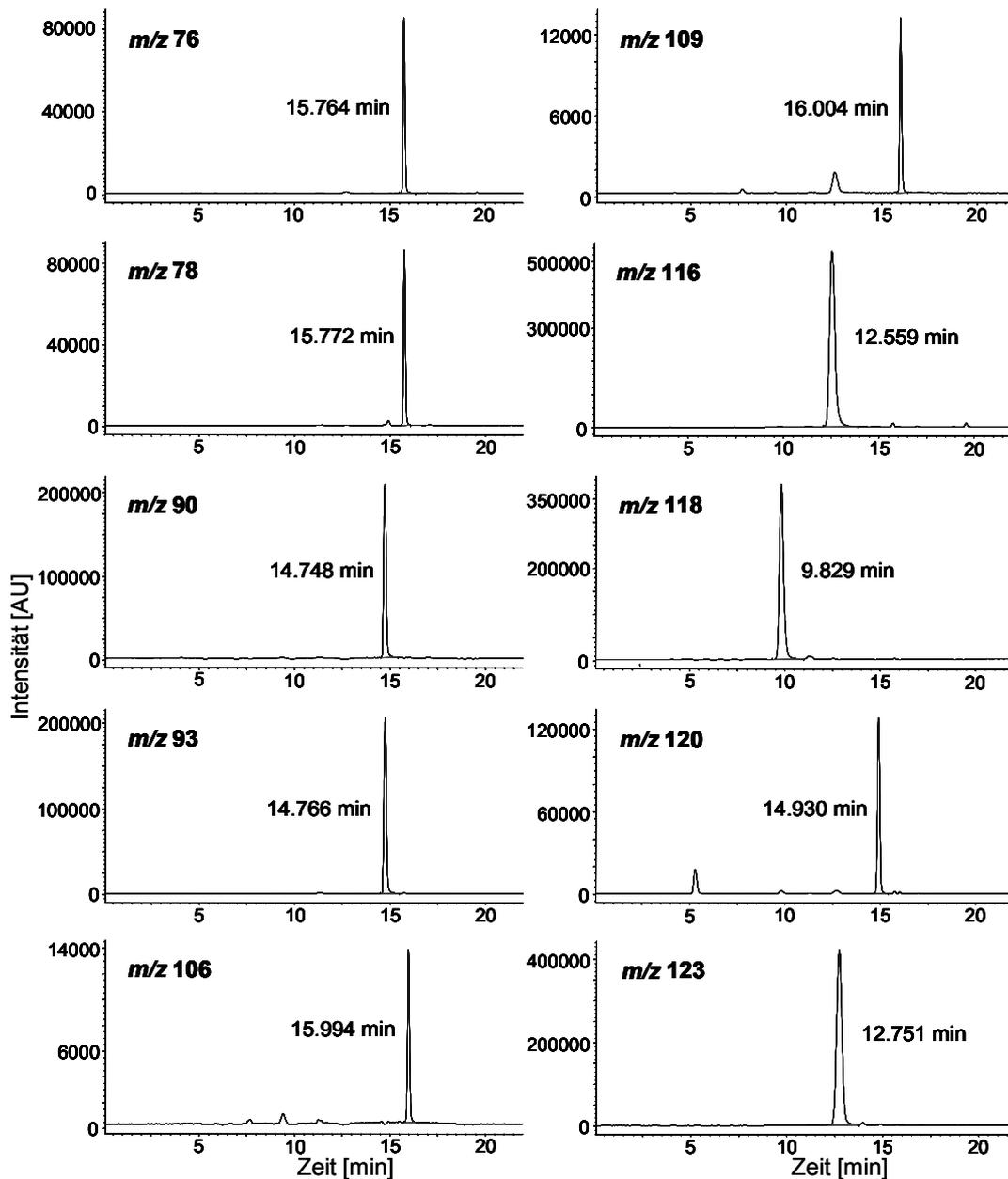


Abbildung B 2-19: HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm der Master-Mix-Analyse (1).

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme (m/z) der Precursorionen $[M+H]^+$. In den einzelnen Chromatogrammen ist den entsprechenden Peaks ihre Retentionszeit in Minuten zugeordnet.

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden). Gradientenelution. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

m/z 76: Gly, m/z 78: D₂-Gly, m/z 90: Ala, m/z 93: D₃-Ala, m/z 106: Ser, m/z 109: D₃-Ser, m/z 116: Pro, m/z 118: Val, m/z 120: Thr, m/z 123: D₇-Pro

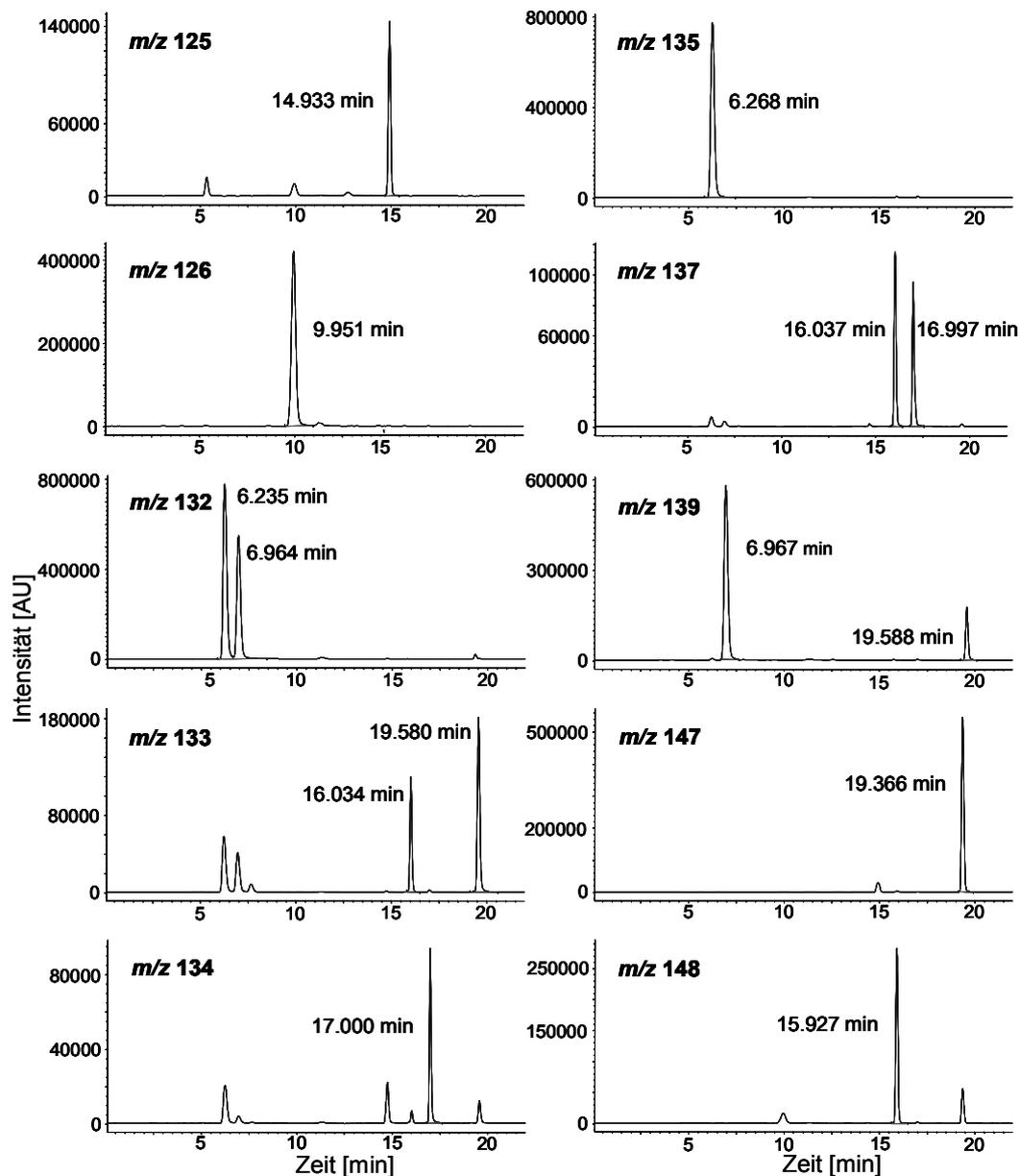


Abbildung B 2-20: HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm der Master-Mix-Analyse (2).

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme (m/z) der Precursorionen $[M+H]^+$. In den einzelnen Chromatogrammen ist den entsprechenden Peaks ihre Retentionszeit in Minuten zugeordnet.

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μ m, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden). Gradientenelution. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

m/z 125: $^{13}\text{C}_4, ^{15}\text{N}_1$ -Thr, m/z 126: D₈-Val, m/z 132: Leu ($t_r = 6.235$ min) und Ile ($t_r = 6.964$ min), m/z 133: Asn ($t_r = 16.034$ min) und Orn ($t_r = 19.580$ min), m/z 134: Asp, m/z 135: D₃-Leu, m/z 137: $^{13}\text{C}_4$ -Asn ($t_r = 16.037$ min) und D₃-Asp ($t_r = 16.997$ min), m/z 139: $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_1$ -Ile ($t_r = 6.967$ min) und D₆-Orn ($t_r = 19.588$ min), m/z 147: Lys, m/z 148: Glu

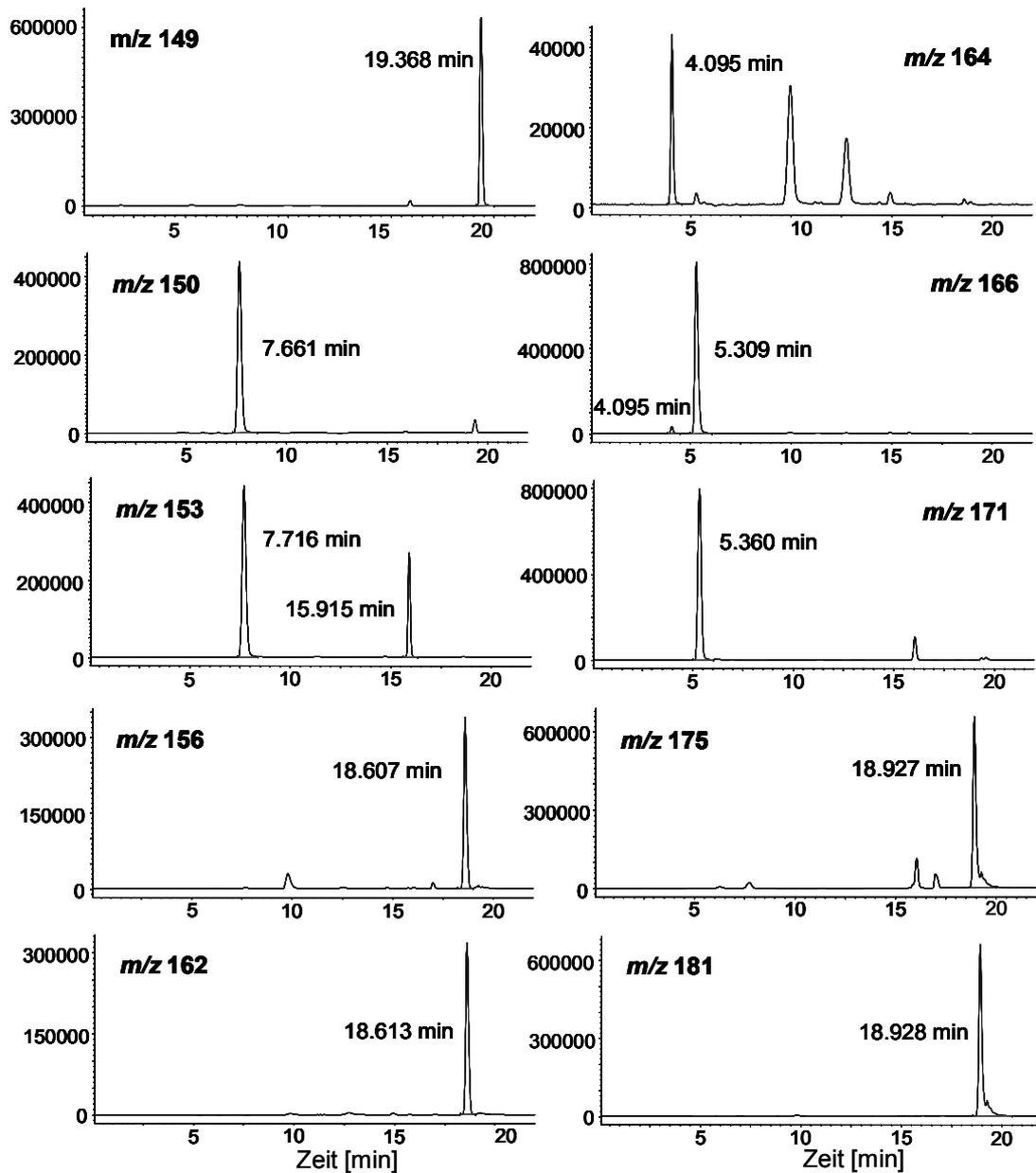


Abbildung B 2-21: HPLC-ESIpos-MS-Chromatogramm der Master-Mix-Analyse (3).

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme (m/z) der Precursorionen $[M+H]^+$. In den einzelnen Chromatogrammen ist den entsprechenden Peaks ihre Retentionszeit in Minuten zugeordnet.

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden). Gradientenelution. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

m/z 149: $^{13}\text{C}_2$ -Lys, m/z 150: Met, m/z 153: D_3 -Met ($t_r = 7.716$ min) und D_5 -Glu ($t_r = 15.915$ min), m/z 156: His, m/z 162: $^{13}\text{C}_6$ -His, m/z 164: NAcCys, m/z 166: D_2 -NAcCys ($t_r = 4.095$ min) und Phe ($t_r = 5.309$ min), m/z 171: D_5 -Phe, m/z 175: Arg, m/z 181: $^{13}\text{C}_6$ -Arg, m/z 182: Tyr

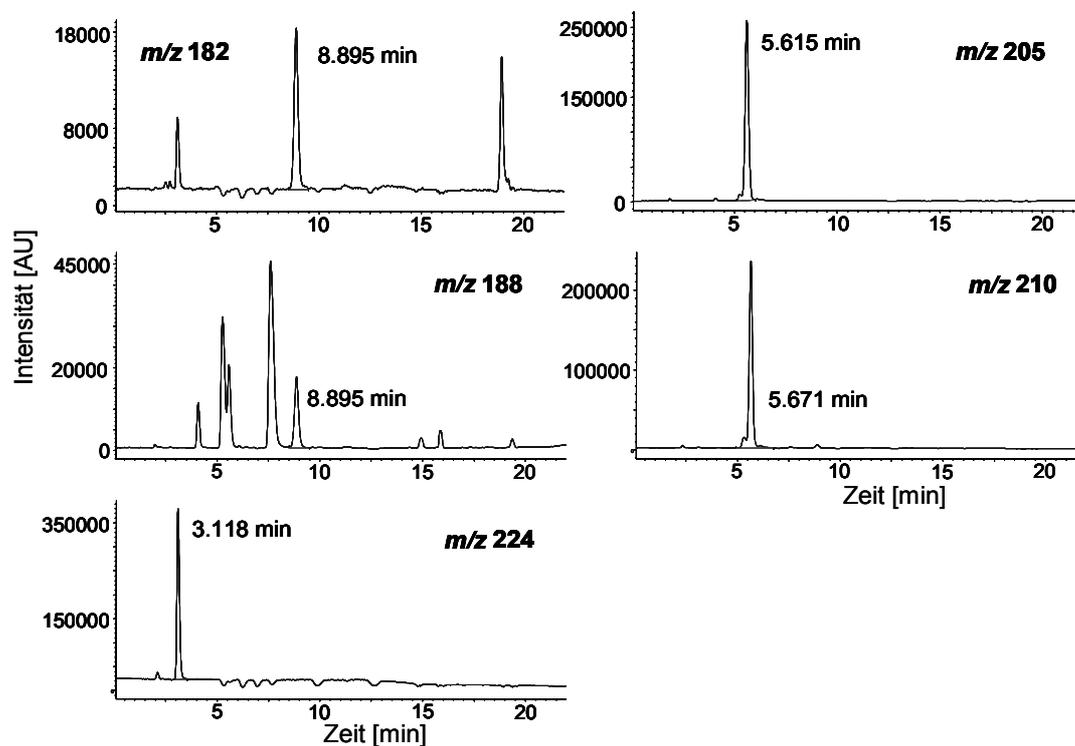


Abbildung B 2-22: HPLC-ESIpos-MS-Chromatogramm der Master-Mix-Analyse (4).

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme (m/z) der Precursorionen $[M+H]^+$. In den einzelnen Chromatogrammen ist den entsprechenden Peaks ihre Retentionszeit in Minuten zugeordnet.

Säule: ZIC[®]-HILIC (3.5 μm , 100 \AA , 150 mm x 2.1 mm, SeQuant, Umeå, Schweden). Gradientenelution. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

m/z 182: Tyr, m/z 188: $^{13}\text{C}_6$ -Tyr, m/z 205: Trp, m/z 210: D_5 -Trp, m/z 224: NAcCys

In den XIC-Chromatogrammen waren teilweise Peaks vorhanden, die nicht den Analyt-Ionen $[M+H]^+$ entsprechen (in Abbildung B 2-19 bis Abbildung B 2-22 ohne zugeordnete Retentionszeit). Besonders deutlich waren diese in der Spur m/z 188 zu erkennen (vgl. Abbildung B 2-22). All diese Peaks können jedoch bestimmten Fragmentationen der AS bzw. IS und klassischen ESI-Addukten zugeordnet werden oder stellen die Isotopenpeaks $[M+H]^+$ bestimmter AS bzw. IS dar. Klassische Addukte, die bei der Elektrospray-Ionisierung entstehen, sind unter anderem Natrium-, Kalium- und Acetonitril-Addukte ($[M+\text{Na}]^+ = [M+23]^+$, $[M+\text{K}]^+ = [M+39]^+$, $[M+\text{ACN}+\text{H}]^+ = [M+42]^+$).

Natrium-Addukte wurden für $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_1\text{-Thr}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 125), $\text{D}_8\text{-Val}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 126) sowie $\text{D}_2\text{-NACys}$ und Phe (jeweils $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 166) beobachtet. Diese wurden als Peaks bei der für die jeweilige Substanz charakteristischen Retentionszeit in den XIC-Chromatogrammen m/z 147 ($[\text{C}_4,^{15}\text{N}_1\text{-Thr}+\text{Na}]^+$), m/z 148 ($[\text{D}_8\text{-Val}+\text{Na}]^+$) und m/z 188 ($[\text{D}_2\text{-NACys}+\text{Na}]^+$ und $[\text{Phe}+\text{Na}]^+$) detektiert.

Kalium-Addukte bildeten Val ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 118), $\text{D}_8\text{-Val}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 125) und Met ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 150); sie wurden als Peaks in den XIC-Chromatogrammen m/z 156, m/z 164 und m/z 188 bei den Retentionszeiten der beiden AS registriert.

Der ^{13}C -Isotopenpeak $[\text{M}+1+\text{H}]^+$ wurde häufig detektiert. So fand er sich für Leu und Ile ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 133), für Asn und Orn ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 134), Lys ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 148), Glu ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 149), $^{13}\text{C}_2\text{-Lys}$ ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 150) sowie für $^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$ ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$ m/z 182) in den entsprechenden XIC-Chromatogrammen.

Zudem entstanden in der Ionisierungsquelle einige Fragmente der AS bzw. IS, die ebenfalls bei der für die entsprechende Substanz charakteristischen Retentionszeit detektiert wurden. So trat das charakteristische Immonium-Ion ($[\text{R-CH}=\text{NH}_2]^+$) bei Phe ($[\text{R-CH}=\text{NH}_2]^+$ m/z 120), $\text{D}_5\text{-Phe}$ ($[\text{R-CH}=\text{NH}_2]^+$ m/z 125) und $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_1\text{-Thr}$ ($[\text{R-CH}=\text{NH}_2]^+$ m/z 78) auf. Bei Met und Trp wurde Ammoniak abgespalten, so dass als Fragmentationen m/z 133 ($[\text{Met-NH}_3+\text{H}]^+$) sowie m/z 188 ($[\text{Trp-NH}_3+\text{H}]^+$) detektiert wurden. Außerdem wurde bei m/z 182 ein Peak registriert, der aus NACtyr entstandenen protoniertem Tyr entspricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hohen Konzentrationsunterschiede bei der gewählten Verdünnung für das Ergebnis keine Rolle spielten. Alle Analyten wurden mit ausreichender Intensität erfasst.

Tabelle B 2-2 gibt eine Übersicht über die Peakflächen und Konzentrationen der AS und IS in der Untersuchungslösung („Probelösung AS und IS“).

Die nur in geringer Konzentration enthaltenen AS, wie z.B. NACys und Tyr , ergaben Peakflächen zwischen $2.43 \cdot 10^5$ FE und $3.62 \cdot 10^5$ FE. Die geringste Peakflächen lieferten Ser und die isotopenmarkierte Referenz $\text{D}_3\text{-Ser}$; beide sind durch geringe Ionisierbarkeit gekennzeichnet und lagen gleichzeitig mit ca. 11.6 mg/L bzw. mit 11.9 mg/L nicht zu konzentriert in der Untersuchungslösung vor.

Das ebenfalls durch eine geringe Ionisierung gekennzeichnete Glycin war hingegen in der Untersuchungslösung mit ca. 60 mg/L in hohem Anteil enthalten, so dass die Analyse dieser AS eine ausreichende Peakfläche lieferte (Area: $6.37 \cdot 10^5$ FE).

Im Hinblick auf die später durchzuführende Validierung war demzufolge die Methode ausreichend leistungsfähig.

Tabelle B 2-2: Übersicht über die Peakflächen (Area) der AS bzw. IS nach HILIC-ESI-MS Analyse der „Master-Mix“-Untersuchungslösung („Probelösung AS und IS“). Die AS und IS sind nach steigender Peakfläche sortiert. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.5.

Aminosäure	Konzentration [mg/L]	Area [FE]	Aminosäure	Konzentration [mg/L]	Area [FE]
D ₃ -Ser	11.90	$9.34 \cdot 10^4$	NAcTyr	12.39	$3.11 \cdot 10^6$
Ser	11.59	$9.66 \cdot 10^4$	Trp	8.01	$3.24 \cdot 10^6$
¹³ C ₆ -Tyr	2.01	$2.43 \cdot 10^5$	¹³ C ₆ -His	15.47	$3.29 \cdot 10^6$
Tyr	2.08	$2.45 \cdot 10^5$	His	15.03	$3.51 \cdot 10^6$
D ₂ -NAcCys	3.56	$2.87 \cdot 10^5$	Lys	34.30	$4.88 \cdot 10^6$
NAcCys	3.74	$3.62 \cdot 10^5$	¹³ C ₂ -Lys	34.68	$5.66 \cdot 10^6$
Asp	27.98	$6.36 \cdot 10^5$	Val	31.03	$6.00 \cdot 10^6$
Gly	60.08	$6.37 \cdot 10^5$	Met	22.11	$6.01 \cdot 10^6$
D ₂ -Gly	62.03	$6.40 \cdot 10^5$	D ₃ -Met	22.40	$6.07 \cdot 10^6$
D ₃ -Asp	28.32	$7.23 \cdot 10^5$	D ₈ -Val	33.08	$6.85 \cdot 10^6$
Asn	20.47	$8.75 \cdot 10^5$	Ile	25.00	$7.61 \cdot 10^6$
¹³ C ₄ -Asn	21.01	$8.56 \cdot 10^5$	D ₇ -Pro	29.11	$8.15 \cdot 10^6$
Thr	21.10	$1.13 \cdot 10^6$	Arg	57.60	$8.00 \cdot 10^6$
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	21.59	$1.25 \cdot 10^6$	¹³ C ₆ -Arg	59.24	$8.01 \cdot 10^6$
D ₆ -Orn	11.80	$1.63 \cdot 10^6$	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	26.19	$8.02 \cdot 10^6$
Orn	11.31	$1.71 \cdot 10^6$	D ₅ -Phe	24.10	$9.01 \cdot 10^6$
D ₃ -Ala	54.10	$1.88 \cdot 10^6$	Phe	23.53	$9.26 \cdot 10^6$
Ala	52.52	$1.90 \cdot 10^6$	D ₃ -Leu	45.58	$1.04 \cdot 10^7$
D ₅ -Glu	36.00	$2.20 \cdot 10^6$	Leu	44.59	$1.05 \cdot 10^7$
Glu	36.76	$2.23 \cdot 10^6$	Pro	27.62	$1.06 \cdot 10^7$
D ₅ -Trp	8.35	$2.95 \cdot 10^6$			

2.5 Einbeziehung weiterer Substanzen

In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurde untersucht, ob ggf. weitere Substanzen, die aus diversen Gründen Bestandteil von AS-Infusionslösungen sein können (vgl. Kapitel B 1.1.4), in die entwickelte HILIC-HPLC-MS-Methode aufgenommen werden können. Dazu wurden Pyr, Cys, (Cys)₂, Tau und MSO der AS-Standard-Mischung zugesetzt und mittels HILIC-HPLC-MS untersucht. Die Durchführung ist in Kapitel D 2.6 beschrieben.

In Abbildung B 2-23 sind die XIC-Chromatogramme der oben genannten fünf Analyten dargestellt, wie sie sich nach HILIC-MS-Untersuchung ergaben. Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurden in der untersuchten Konzentration (je 50 µmol/L) alle Substanzen detektiert.

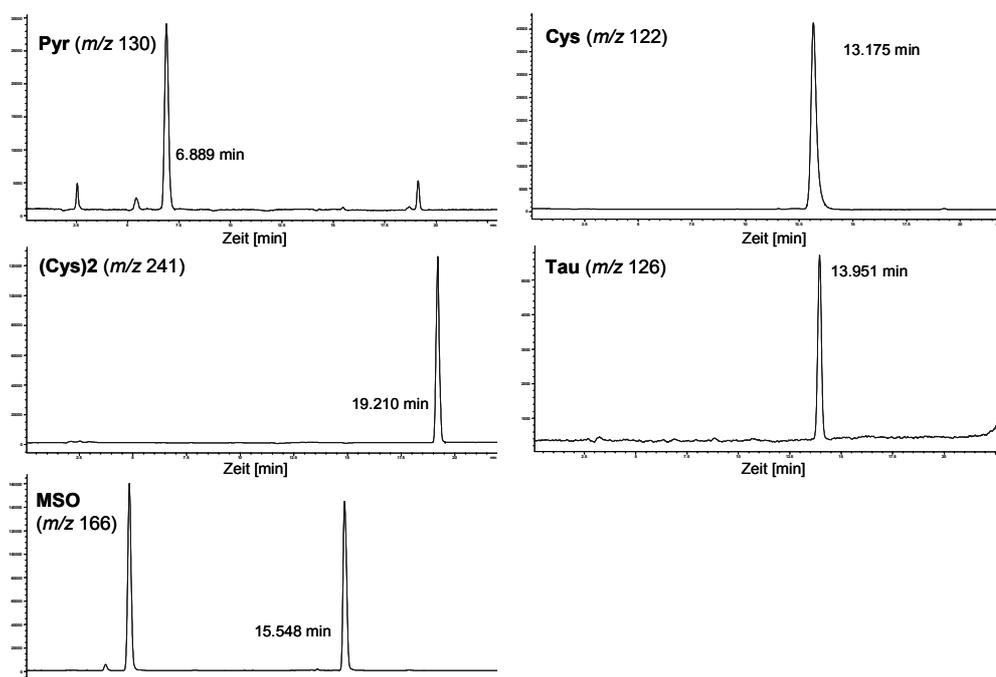


Abbildung B 2-23: HPLC-ESIpos-MS-Chromatogramme von Pyr, Cys, (Cys)₂, Tau und MSO (Konzentration je 50 µmol/L) nach Zusatz zur AS-„Master-Mix“-Mischung.

Dargestellt sind die XIC-Chromatogramme (m/z) der Precursorionen $[M+H]^+$. In den einzelnen Chromatogrammen ist den entsprechenden Peaks ihre Retentionszeit in Minuten zugeordnet. Beim zweiten Peak im XIC-Chromatogramm von MSO (m/z 166) handelt es sich um Phenylalanin. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 2.6.

Anhand der Retentionszeiten kann im Vergleich zu den Abbildungen B 2-19 bis B 2-22 festgestellt werden, dass eine Integration der hier untersuchten Substanzen in die entwickelte Methode prinzipiell möglich ist; es ergaben sich keine Interferenzen mit den AS bzw. IS. Weitere quantitative Untersuchungen erfolgten in vorliegender Arbeit nicht.

2.6 Zusammenfassung der HILIC-Methodenentwicklung

Die Ergebnisse unserer systematischen Versuchsreihen zeigen, dass die HILIC zur Trennung von AS geeignet ist. Durch Optimierung verschiedener Parameter (Fließmittelzusammensetzung, Gradient, Pufferkonzentration, pH-Wert der mobilen Phase) wurde eine HILIC-HPLC-Methode entwickelt, bei der 21 AS und 20 stabilisotopenmarkierte Referenz-AS innerhalb von 20 min an einer ZIC[®]-HILIC-Säule eluiert wurden. Zum ersten Mal wurde eine derart große Anzahl an AS / IS erfasst. Gleichzeitig war der Zeitbedarf mit 20 min geringer als in den in der Literatur beschriebenen Methoden zur AS-Bestimmung mittels HILIC (lediglich in der Veröffentlichung von Dell'mour *et al.* (2010) beträgt die HPLC-Laufzeit nur 15 min, bei allerdings unzureichender Trennung der Analyten).

Bei der von uns vorgestellten Methode wurden die aufgrund gleicher bzw. ähnlicher Massen interferierenden AS chromatographisch getrennt, so dass die Anwendung des SIM-Modus möglich ist.

Die Übertragung auf die Bedingungen einer Infusionslösung zeigte, dass hohe AS-Konzentrationsunterschiede von der Methode problemlos toleriert werden.

3 Validierung

Im Folgenden wird die Validierung der entwickelten Methode zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen vorgestellt.

3.1 Bestimmung der Arbeitskonzentration (100%-Level)

Zunächst wurde die Arbeitskonzentration festgelegt, d.h. eine geeignete Verdünnung der Analysenlösung (Infusionslösung) bestimmt, welche bei der späteren Anwendung der Methode zur Quantifizierung das 100%-Level darstellen wird. Bei dieser Verdünnung liegen AS und IS in der gleichen Konzentration vor; zur Bestimmung der Linearität und zur Kalibrierung werden bei gleich bleibender Konzentration der IS die Konzentrationen der AS variiert.

Die geeignete Verdünnung war insofern von Bedeutung als die einzelnen AS in deutlich unterschiedlichen Konzentrationen in der Infusionslösung vorliegen. Als geeignet kann diejenige Verdünnung angesehen werden, bei welcher die gering konzentrierten AS mit ausreichender Empfindlichkeit erfasst werden und gleichzeitig eine Validierung im Bereich dieses Levels möglich ist, ohne dass für die hochkonzentrierten AS die Grenzen der Methode erreicht werden.

Als Maß für die Eignung der Verdünnung wurde die Präzision bei verschiedenen Konzentrationen der Analysenlösung bestimmt. Neben einem geeigneten 100%-Level sollten zudem Informationen über die Empfindlichkeit der Methode sowie den möglichen Bestimmungsbereich erhalten werden.

Zur Bestimmung der (System-) Präzision wurde die Analysenlösung nach Zusatz der IS bei verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000) mit der entwickelten HILIC-HPLC-MS-Methode untersucht (Sechsfachbestimmung). Als Maß für die Präzision dient die relative Standardabweichung (RSD) des Verhältnisses

von Peakfläche der Aminosäure zur Peakfläche des isotonenmarkierten Standards ($\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$). Die genaue Durchführung ist in Abschnitt D 3.1 beschrieben.

Da für *N*AcTyr die entsprechende isotonenmarkierte Referenz fehlte, wurden die Werte für diese AS sowohl mit D_2 -*N*AcCys (*N*AcTyr 1) als auch mit D_5 -Trp als IS (*N*AcTyr 2) berechnet. D_2 -*N*AcCys wurde gewählt, da diese AS - bedingt durch die ebenfalls vorhandene acetylierte Aminogruppe - strukturell am ähnlichsten zu *N*AcTyr ist und somit den Anforderungen an einen internen Standard am ehesten entspricht (Hibbert 2007). D_5 -Trp dagegen unterscheidet sich zwar strukturell von *N*AcTyr, jedoch entspricht es dieser AS von den früh eluierenden AS bezogen auf die Peakfläche am ehesten (vgl. Abbildung B 2-18 und Tabelle B 2-2).

Wie aus Tabelle B 3-1 hervorgeht, lagen bei der 1:100- sowie der 1:200-Verdünnung die RSD-Werte für alle Analyten unterhalb der geforderten Grenze von 1.5% (FDA 1994; B.Braun 2008), im Falle der 1:200-Verdünnung sogar unter 1%. Bei der 1:500-Verdünnung überschritten Asp und *N*AcCys die Grenze knapp (RSD 1.767 und 1.863). Serin lag wie auch bei der 1:1000-Verdünnung mit RSD Werten von über 3% deutlich außerhalb des zulässigen Bereichs, was auf die geringe Konzentration der AS sowie deren mäßiger Ionisierbarkeit (vgl. Kapitel B 1.2.1, S.66) zurückzuführen ist. Bei der 1:1000-Verdünnung überschritten zudem auch Asp, *N*AcTyr (bei beiden Bezugs-IS) und Tyr die 1.5%-Grenze, einige andere (Asn, Glu, Gly, *N*AcCys) lagen um die 1.3%. Damit war klar, dass diese Verdünnung für die Routineanalytik zur Quantifizierung zu gering ist.

Bezüglich *N*AcTyr scheint die Verwendung von D_5 -Trp als Bezugs-IS geeignet zu sein, da hier die RSD-Werte bei der 1:200- und 1:100-Verdünnung besser waren als bei der Verwendung von D_2 -*N*AcCys. Der Quotient aus $\text{Area}_{\text{NACTYR}} / \text{Area}_{\text{D}_2\text{-NACcys}}$ ergab ein Verhältnis von ~ 10 , der Quotient aus $\text{Area}_{\text{NACTYR}} / \text{Area}_{\text{D}_5\text{-Trp}}$ lediglich von ~ 1.5 . Dadurch, dass zur Auswertung ausschließlich die Flächenverhältnisse herangezogen wurden, ist derjenige IS besser geeignet, der ähnliche Peakflächen wie der Analyt ergibt.

Tabelle B 3-1: Ergebnisse der Bestimmung der Systempräzision bei verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000) der „Master-Mix“-Untersuchungslösung („Probelösung AS und IS“) zur Ermittlung einer geeigneten Arbeitskonzentration der Validierung. Dargestellt ist die relative Standardabweichung (RSD) des Quotienten aus Peakfläche AS zu Peakfläche IS nach Sechsfachbestimmung. Grau und kursiv gedruckt sind diejenigen Werte, welche die geforderte Grenze (RSD < 1.5%) überschreiten. Da für NAcTyr kein IS zur Verfügung stand, wurden die Werte für diese AS sowohl mit D₂-NAcCys (NAcTyr 1) als auch mit D₅-Trp (NAcTyr 2) als IS berechnet. Experimentelle HPLC- und ESI-MS-Bedingungen siehe Abschnitt D 3.1.

Aminosäure	1:100	1:200	1:500	1:1000
	Area _{AS} /Area _{IS} RSD			
NAcCys	0.938	0.973	<i>1.863</i>	1.349
NAcTyr 1	1.137	0.942	0.768	<i>1.691</i>
NAcTyr 2	0.438	0.572	1.123	<i>1.935</i>
Ala	0.473	0.542	0.638	0.345
Arg	0.438	0.759	0.976	0.962
Asn	1.023	0.710	0.665	1.386
Asp	0.889	0.335	<i>1.767</i>	<i>1.967</i>
Glu	0.378	0.541	0.682	1.436
Gly	0.740	0.424	1.002	1.307
His	0.701	0.548	0.422	0.475
Ile	0.506	0.606	0.742	0.607
Leu	0.549	0.320	0.299	0.601
Lys	0.318	0.324	1.366	0.670
Met	0.307	0.565	1.172	1.148
Orn	0.291	0.908	0.635	0.947
Phe	0.151	0.425	0.665	0.903
Pro	0.624	0.734	0.838	0.440
Ser	1.208	0.904	<i>3.062</i>	<i>3.047</i>
Thr	0.242	0.701	0.385	0.802
Trp	0.612	0.656	0.625	0.789
Tyr	1.450	0.780	1.227	<i>2.981</i>
Val	0.362	0.337	0.377	0.339

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so wird ersichtlich, dass eine Verdünnung von 1:200 als 100%-Level geeignet ist, da unter diesen Bedingungen alle AS mit ausreichender Präzision erfasst wurden. Um dieses 100%-Level lässt sich dann kalibrieren, d.h. bei gleich bleibender Konzentration der IS kann durch Variation der AS-Konzentration nach oben und nach unten die Linearität bestimmt und daraus später der Bestimmungsbereich ermittelt werden. Die 1:200-Verdünnung ist zudem geeigneter als die 1:100-Verdünnung, die ebenfalls für alle AS gute Präzisionswerte

ergab, da dort die Absolutwerte der hochkonzentrierten AS kleiner sind und somit das Risiko einer Detektorüberlastung geringer ist.

Für die weiteren Untersuchungen zur Validierung der entwickelten Methode wurde das 100%-Level daher bei einer Verdünnung von 1:200 angesetzt. Die Konzentrationsunterschiede der einzelnen AS in der Infusionslösung, die von 0.4 g/L bzw. 2.2 mmol/L (Tyr) bis zu 12.0 g/L bzw. 160.0 mmol/L (Gly) reichen, sind für die Bestimmung ohne Auswirkungen. NAcTyr wurde bei der gewählten Verdünnung sowohl im Bezug auf D₂-NACcys (NAcTyr 1) als auch auf D₅-Trp (NAcTyr 1) als IS ausreichend präzise erfasst, wobei bei der Verwendung von D₅-Trp bessere Werte erhalten wurden.

3.2 Bestimmung der Linearität

Nach Bestimmung des 100%-Levels wurden in einem nächsten Schritt Studien zur Linearität durchgeführt. Neben der Überprüfung der Linearität, d.h. ob und in welcher Form eine proportionale Abhängigkeit zwischen Messwert und Konzentration besteht (FDA 1999), sollten zudem gleichzeitig weitere Informationen zum Bestimmungsbereich erhalten werden.

Gemäß den Definitionen der Linearität (siehe Abschnitt A 5.2.3) sind verschiedene Kalibrierfunktionen für ein analytisches Verfahren möglich. Generell sollte nach Möglichkeit mit einer linearen Kalibrierfunktion 1. Grades gearbeitet werden, wobei jedoch auch die lineare Kalibrierung 2. Grades (quadratische Regression) angewendet werden kann. In jedem Fall ist für die Validierung der Methode eine Überprüfung der Grundkalibrierung notwendig, besonders wenn begründeter Verdacht auf eine andere Kalibrierfunktion als die der linearen Kalibrierung 1. Grades besteht (Ermer 2005; Funk *et al.* 2005). Die genaue Durchführung der Linearitätsbestimmung ist in Abschnitt D 3.2 beschrieben.

Zur Auswertung wurden aus der Dreifachbestimmung der Mittelwert des Quotienten aus Konzentration der AS und Konzentration des IS (c_{AS} / c_{IS}) sowie der Mittelwert

des Quotienten aus Peakfläche (Area) der AS und der Area des IS bestimmt. *NAcTyr* wurde wiederum auf D_2 -*NAcCys* als IS (*NAcTyr* 1) sowie auf D_5 -Trp als IS (*NAcTyr* 2) bezogen. Gleichzeitig wurde die relative Standardabweichung der Dreifachbestimmung ermittelt und als Maß für die Präzision geprüft. Sobald die RSD-Werte die Grenze von 1.5% überschritten, wurde der entsprechende Datenpunkt nicht mehr in die Kalibrierung aufgenommen. Für die Analyten wurden somit die Datenpunkte von $c_{AS}/c_{IS} = 0.2$ (20% - Level, AS-Verdünnung 1:1000) bis $c_{AS}/c_{IS} = 3$ (300% - Level, AS-Verdünnung 1:66.67) in die Kalibrierung aufgenommen.

Lediglich Tyr konnte erst ab dem 40%-Level ($c_{AS}/c_{IS} = 0.4$, AS-Verdünnung 1:500) kalibriert werden, da unterhalb dieses Wertes die RSD-Werte $> 1.5\%$ lagen. Gleiches gilt für *NAcTyr* bezogen auf D_2 -*NAcCys* als IS, welches erst ab dem 25% - Level ($c_{AS}/c_{IS} = 0.25$, AS-Verdünnung 1:800) kalibriert werden konnte.

Der Grund hierfür liegt im Fall von Tyr an der geringen Konzentration (0.4 g/L bzw. 2.2 mmol/L) bei gleichzeitig mittlerer Ionisierbarkeit der Substanz (vgl. Kapitel B 1.2.1). Bei *NAcTyr* stellte weniger die geringe Konzentration als vielmehr der Bezugs-IS (D_2 -*NAcCys*) das Problem dar. *NAcTyr* lag in der Analysenlösung (unverdünnte Infusionslösung) in einer Konzentration von 11.1 mmol/L (2.48 g/L), D_2 -*NAcCys* dagegen nur mit 4.5 mmol/L (0.75 g/L) vor. Durch die gleichzeitig deutlich bessere Ionisierbarkeit von *NAcTyr* ergaben sich für den Quotienten $Area_{AS}/Area_{IS}$ Werte im Bereich um ~ 10 . Die großen Flächenunterschiede mit den daraus folgenden hohen Quotientenwerten sind für die Auswertung nicht ideal, da, wie gezeigt, gerade im unteren Konzentrationsbereich die Präzision fehlt. D_5 -Trp scheint daher als Bezugs-IS für *NAcTyr* geeigneter zu sein als D_2 -*NAcCys*. Dennoch wurde zur Absicherung die Linearität für beide IS geprüft.

3.2.1 Lineare Regression 1. Ordnung

Die Quotienten aus der Konzentration der AS und der Konzentration des IS (c_{AS}/c_{IS}) wurden gegen die Quotienten aus Peakfläche (Area) der AS und der Area des IS aufgetragen (jeweils der Mittelwert einer Dreifachbestimmung) und einer linearen Regression 1. Ordnung (Geradengleichung: $y = m \cdot x + b$) unterworfen.

In Tabelle B 3-2 sind die für alle AS ermittelten Regressionsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß r^2 und die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} aufgeführt.

Tabelle B 3-2: Bestimmung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen - Ergebnisse der linearen Regression 1. Ordnung.

Aufgeführt sind für 21 AS die jeweiligen Geradengleichungen, die Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} . Die Werte für NAcTyr sind aufgrund eines fehlenden IS sowohl mit D₂-NAcCys (NAcTyr 1) als auch mit D₅-Trp (NAcTyr 2) als IS berechnet. Grau und kursiv dargestellt sind diejenigen r^2 -Werte, die außerhalb der Spezifikation ($r^2 \geq 0.999$) liegen.

100%-Level: 1:200-Verdünnung der „Master-Mix“-Untersuchungslösung („Probelösung AS und IS“), untersuchter Bereich: 20% - 300%. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 und D 3.2.2.

AS	Geradengleichung $y=mx+b$	Bestimmtheitsmaß r^2	V_{x0} [%]
NAcCys	$y = 1.29885x + 0.10807$	<i>0.99552</i>	7.924
NAcTyr 1 ^a	$y = 8.39617x + 2.66743$	<i>0.98280</i>	14.409
NAcTyr 2	$y = 0.28541x + 0.03413$	<i>0.99739</i>	6.102
Ala	$y = 1.05524x - 0.00599$	0.99989	1.211
Arg	$y = 1.18135x - 0.01697$	0.99956	2.493
Asn	$y = 1.01076x - 0.00004$	0.99986	1.394
Asp	$y = 0.94989x - 0.01037$	0.99992	1.046
Glu	$y = 1.02832x - 0.00836$	0.99987	1.340
Gly	$y = 0.97789x + 0.00593$	0.99979	1.703
His	$y = 1.08943x - 0.00071$	0.99963	2.279
Ile	$y = 0.97098x - 0.01790$	0.99978	1.734
Leu	$y = 0.98428x - 0.01431$	0.99993	0.965
Lys	$y = 0.88306x - 0.00088$	0.99970	2.052
Met	$y = 0.95076x + 0.01083$	0.99979	1.681
Orn	$y = 0.96329x + 0.03434$	0.99983	1.557
Phe	$y = 0.98703x - 0.01192$	0.99989	0.802
Pro	$y = 1.05628x + 0.07361$	<i>0.99730</i>	6.153
Ser	$y = 1.00502x - 0.00087$	0.99997	0.679
Thr	$y = 0.91029x - 0.00876$	0.99992	1.078
Trp	$y = 1.08108x - 0.00485$	0.99979	1.715
Tyr ^b	$y = 1.05752x - 0.02615$	0.99975	1.881
Val	$y = 0.83876x + 0.00894$	0.99942	2.854

^a: Bestimmung erfolgte aufgrund mangelnder Präzision bei höherer Verdünnung erst ab dem 25%-Level.

^b: Bestimmung erfolgte aufgrund mangelnder Präzision bei höherer Verdünnung erst ab dem 40%-Level.

3.2.2 Lineare Regression 2. Ordnung (Quadratische Regression)

In einem nächsten Schritt wurden die ermittelten Werte der Linearitätsbestimmung einer quadratischen Regression (lineare Regression 2. Ordnung, Geradengleichung: $(y = n \cdot x^2 + m \cdot x + b)$) unterworfen. Tabelle B 3-3 fasst die Geradengleichung, das Bestimmtheitsmaß r^2 sowie die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} zusammen, die sich nach quadratischer Regression ergaben.

Tabelle B 3-3: Bestimmung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen - Ergebnisse der linearen Regression 2. Ordnung (quadratische Regression). Aufgeführt sind für 21 AS die jeweiligen Geradengleichungen, die Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} . Die Werte für NAcTyr sind aufgrund eines fehlenden IS sowohl mit D₂-NAcCys (NAcTyr 1) als auch mit D₅-Trp (NAcTyr 2) als IS berechnet. 100%-Level: 1:200-Verdünnung der „Master-Mix“-Untersuchungslösung („Probelösung AS und IS“), untersuchter Bereich: 20% - 300%. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 und D 3.2.3.

AS	Geradengleichung $y = nx^2 + mx + b$	Bestimmtheitsmaß r^2	V_{x0} [%]
NAcCys	$y = -0.12305x^2 + 1.66991x - 0.01996$	0.99977	1.683
NAcTyr 1 ^a	$y = -1.58667x^2 + 13.32162x + 0.72824$	0.99951	3.312
NAcTyr 2	$y = -0.01924x^2 + 0.34347x + 0.01398$	0.99949	2.581
Ala	$y = -0.01330x^2 + 1.09535x - 0.01983$	0.99997	0.670
Arg	$y = -0.00781x^2 + 1.20489x - 0.02509$	0.99958	2.558
Asn	$y = -0.01042x^2 + 1.04218x - 0.0108$	0.99991	1.163
Asp	$y = -0.00560x^2 + 0.96678x - 0.01619$	0.99994	0.977
Glu	$y = -0.01353x^2 + 1.06911x - 0.02244$	0.99995	0.837
Gly	$y = -0.01806x^2 + 1.03236x - 0.01286$	0.99995	0.824
His	$y = -0.01995x^2 + 1.14959x - 0.02147$	0.99979	1.782
Ile	$y = -0.01652x^2 + 1.02080x - 0.03509$	0.99992	1.079
Leu	$y = -0.00901x^2 + 1.01145x - 0.02368$	0.99997	0.641
Lys	$y = -0.02099x^2 + 0.94637x - 0.02273$	0.99997	0.697
Met	$y = -0.01801x^2 + 1.00488x - 0.00657$	0.99997	0.688
Orn	$y = -0.01605x^2 + 1.01168x + 0.01764$	0.99996	0.790
Phe	$y = -0.00567x^2 + 1.00413x - 0.01782$	0.99990	1.225
Pro	$y = -0.07822x^2 + 1.29217x - 0.00778$	0.99990	1.160
Ser	$y = -0.00067x^2 + 1.00703x - 0.0015$	0.99997	0.717
Thr	$y = -0.01026x^2 + 0.94123x - 0.01943$	0.99998	0.590
Trp	$y = -0.02117x^2 + 1.14492x - 0.02688$	0.99997	0.650
Tyr ^b	$y = 0.01702x^2 + 1.00620x - 0.00845$	0.99987	1.300
Val	$y = -0.02858x^2 + 0.92494x - 0.02080$	0.99997	0.671

^a: Bestimmung erfolgte aufgrund mangelnder Präzision bei höherer Verdünnung erst ab dem 25%-Level.

^b: Bestimmung erfolgte aufgrund mangelnder Präzision bei höherer Verdünnung erst ab dem 40%-Level.

3.2.3 Überprüfung der Linearität

Generell muss die gewählte Grundkalibrierung geprüft werden. Dazu sind mehrere Verfahren möglich, wovon im Folgenden zwei kurz erläutert werden.

3.2.3.1 Visueller Linearitätstest

Die einfachste Methode zur Überprüfung der Linearität stellt die visuelle Prüfung dar. Dazu werden die Kalibrierdaten graphisch dargestellt und subjektiv beurteilt (Funk *et al.* 2005). Meist erfolgt die Beurteilung unter Einbeziehung des Korrelationskoeffizienten r bzw. des Bestimmtheitsmaßes r^2 , welche einen Wert nahe 1 annehmen werden, sofern die Kalibrierpunkte eng um die Ausgleichsgerade liegen.

Abbildung B 3-1 zeigt die visuelle Auswertung am Beispiel von Leu und Ser. In beiden Fällen wurden subjektiv „gute“, also lineare Kalibriergeraden erhalten. Der subjektive Eindruck wird gestützt durch die Werte von r^2 , welche mit 0.99993 und 0.99997 sehr nahe bei 1 liegen.

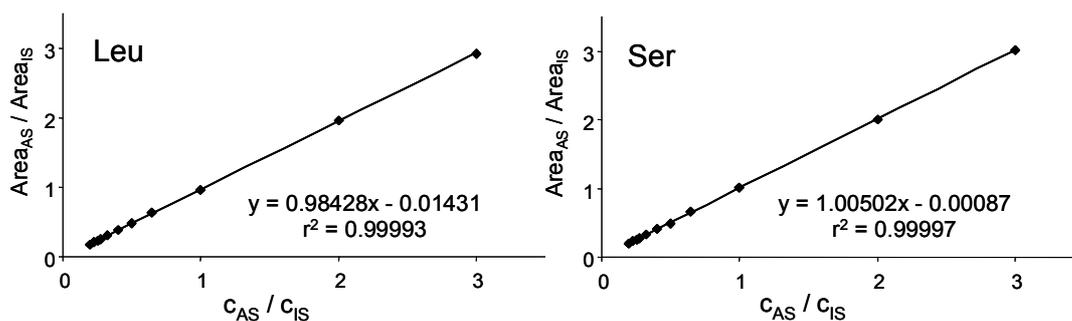


Abbildung B 3-1: Prüfung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen – visuelle Überprüfung der Grundkalibrierung (lineare Regression 1. Ordnung) am Beispiel von Leucin (links) und Serin (rechts). Graphisch dargestellt sind die sich nach linearer Regression ergebenden Kalibriergeraden sowie die jeweiligen Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße r^2 . Bei visueller Auswertung wird hier von einem linearen Zusammenhang (1. Ordnung) ausgegangen. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 und D 3.2.2.

Ähnliche gute Ergebnisse wurden für 18 der 21 AS erhalten, also Kalibriergeraden mit r^2 -Werten > 0.999 (vgl. Tabelle B 3-2, S. 126). Diese AS würden bei zugrunde liegender Linearität 1.Ordnung den geforderten Grenzen entsprechen (FDA 1994; B.Braun 2008).

Problematisch gestalteten sich dagegen bei der linearen Regression 1. Grades die AS *NACys*, *NACtyr* und *Pro*, für welche deutlich schlechtere Werte ($r^2 < 0.999$) erhalten wurden (siehe Tabelle B 3-2, S. 126, graue Werte). Für diese AS scheint keine lineare Abhängigkeit, die sich mit der Funktion $y = m \cdot x + b$ beschreiben lässt, über den gesamten Bereich gegeben zu sein.

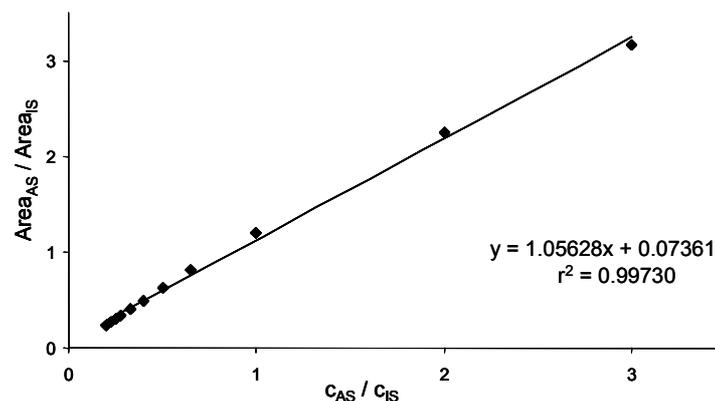


Abbildung B 3-2: Prüfung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen – visuelle Überprüfung der Grundkalibrierung (lineare Regression 1. Ordnung) am Beispiel von Prolin. Graphisch dargestellt sind die sich nach linearer Regression ergebende Kalibriergerade sowie die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß r^2 . Erkennbar ist die Streuung der Messpunkte um die Ausgleichsgerade sowie deren Krümmung, so dass die lineare Regression 1. Ordnung als Kalibrierfunktion über den untersuchten Bereich als ungeeignet anzusehen ist. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 und D 3.2.2.

Bei visueller Betrachtung der ermittelten Geraden (in Abbildung B 3-2 am Beispiel von Prolin dargestellt) kann dies deutlich abgelesen werden. Die Auftragung der Punkte ergibt keine ideale Gerade, vielmehr kann eine Krümmung festgestellt werden. Auch das Bestimmtheitsmaß ($r^2 = 0.99730$) bzw. der sich daraus ergebende Korrelationskoeffizient ($r = 0.9986$) liegen unterhalb der Anforderung von $r \geq 0.999$ (FDA 1994; B.Braun 2008).

Hier scheint bei visueller Betrachtung die quadratische Anpassung (lineare Regression 2. Ordnung) geeigneter zu sein. Abbildung B 3-3 verdeutlicht dies bei Gegenüberstellung der Regressionsfunktionen 1. und 2. Ordnung für *N*AcCys, *N*AcTyr und Pro.

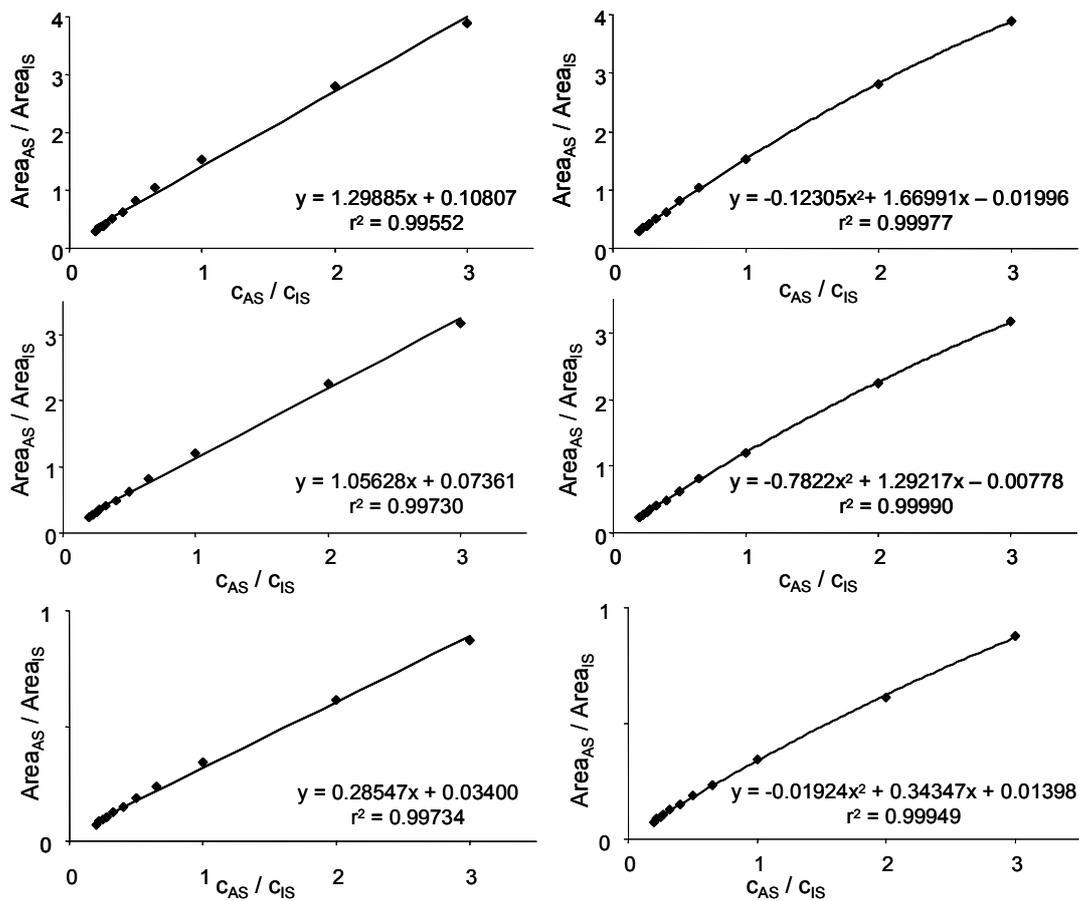


Abbildung B 3-3: Prüfung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen – visuelle Überprüfung der Grundkalibrierung für *N*AcCys (oben), Pro (Mitte) und *N*AcTyr (unten). Dargestellt ist der Vergleich der linearen Regression 1. Ordnung (links) mit der quadratischen Anpassung (rechts) anhand der jeweiligen Kalibriergeraden, der Geradengleichungen und der Bestimmtheitsmaße r^2 . Bei visueller Auswertung ist in allen drei Fällen die quadratische Regression als das geeignetere Regressionsmodell anzusehen. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 bis D 3.2.3.

Anhand der visuellen Auswertung wurde also für 18 der 21 AS (außer *N*AcCys, *N*AcTyr und Pro) von einem linearen Zusammenhang ausgegangen.

3.2.3.2 Prüfung der Kalibrierfunktion - Anpassungstest nach Mandel

Um zu prüfen, ob tatsächlich die lineare Regression für die 18 AS das geeignete Modell ist bzw. welche der beiden Kalibrierfunktionen den Zusammenhang zwischen Mess- und Konzentrationswerten besser beschreibt, vergleicht man die jeweiligen relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} miteinander. Sofern V_{x0} der linearen Regression 1. Ordnung kleiner ist als die der 2. Ordnung, kann die lineare Regression akzeptiert werden. In vorliegender Studie war dies nur für Arg und Ser der Fall (vgl. V_{x0} in Tabelle B 3-2 und Tabelle B 3-3). Für die übrigen AS scheint die quadratische Regression die „bessere“ Anpassungsstrategie zu sein. Um zufällige Abweichungen der Verfahrensstandardabweichungen auszuschließen und die Signifikanz nachzuweisen, wurde für diese AS der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt (Kapitel D 3.2.4.2 und Anhang I c).

Die Ergebnisse des Anpassungstests sind in Tabelle B 3-4 zusammengefasst.

Tabelle B 3-4: Prüfung der Linearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen - Ergebnisse des Anpassungstests nach Mandel zur Überprüfung der Grundkalibrierung. Da für NAcTyr kein IS zur Verfügung stand, wurden die Werte für diese AS sowohl mit D₂-NAcCys (NAcTyr 1) als auch mit D₅-Trp (NAcTyr 2) als IS berechnet. linear: lineare Regression 1. Ordnung geeignetes Modell zur Beschreibung der Grundkalibrierung, quadratisch: quadratische Regression (lineare Regression 2. Ordnung) geeignetes Modell zur Beschreibung der Grundkalibrierung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt D 3.2.1 bis D 3.2.4.

AS	Linearität	AS	Linearität	AS	Linearität
NAcCys	quadratisch	Gly	quadratisch	Pro	quadratisch
NAcTyr 1	quadratisch	His	linear	Ser	linear
NAcTyr 2	quadratisch	Ile	quadratisch	Thr	quadratisch
Ala	quadratisch	Leu	quadratisch	Trp	quadratisch
Arg	linear	Lys	quadratisch	Tyr	linear
Asn	linear	Met	quadratisch	Val	quadratisch
Asp	linear	Orn	quadratisch		
Glu	quadratisch	Phe	linear		

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist nur für sieben AS (Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, Tyr) die lineare Regression 1. Ordnung anwendbar, in allen anderen Fällen ist die quadratische Anpassung das geeignetere Modell zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Mess- und Konzentrationswerten.

Die Ergebnisse verdeutlichen zudem die Notwendigkeit der Überprüfung der Kalibrierfunktion. Die alleinige subjektive Bewertung der Ausgleichsgeraden unter Einbeziehung des Korrelationskoeffizienten r bzw. des Bestimmtheitsmaßes r^2 , wie sie häufig in der Literatur durchgeführt wird, führt, wie hier gezeigt, zu fehlerhaften Ergebnissen. Lediglich für sieben der 18 AS, für die nach visueller Auswertung eine lineare Regression 1. Ordnung angenommen wurde, konnte diese bestätigt werden. Alle anderen werden nach den Ergebnissen des Anpassungstests nach Mandel durch die quadratische Regression besser beschrieben. Zudem wurde hier deutlich, dass der Korrelationskoeffizient r bzw. das Bestimmtheitsmaß r^2 keine Aussage hinsichtlich der Güte der gewählten Anpassung zulassen und auch ein r - bzw. r^2 -Wert nahe 1 kein Beweis für die Linearität ist (AMC 2005).

Die Untersuchung der Linearität zeigt auch die hohe Leistungsfähigkeit der Methode, so dass hier bereits ein großer Bestimmungsbereich („range“) abgelesen werden kann. Zur Interpretation ist wichtig, den Bereich, über welchen die Linearität erstellt wurde, zu betrachten. Der Quotient c_{AS}/c_{IS} reicht vom Wert 3, was dem 300%-Level entspricht, bis hin zum Wert 0.2, was dem 20%-Level entspricht. Standardmäßig umfassen Validierungen zur Gehaltsbestimmung des Wirkstoffs einen Bereich von 80% - 120% (ICH 2005).

3.3 Problematik der Validierung – Einfluss der Matrix

Die bisher beschriebenen Studien zur Validierung (Präzision und Linearität, Abschnitt B 3.1 und B 3.2) wurden mit reinen AS- und IS-Standardlösungen durchgeführt. Im Verlauf der weiteren Validierungsarbeiten wurden die Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindung auf die Probelösung, also eine „imitierte“ Infusionslösung ausgedehnt. Diese enthielt neben AS und IS die Matrixlösung, welche

aus Elektrolyt- und Puffersubstanzen besteht (vgl. Kapitel D 3.3.3). Dabei zeigte sich, dass die Matrix offensichtlich in gewissem Maße Einfluss auf die Analyse der AS mittels HILIC-MS nimmt, so dass die Quantifizierung der AS in der Probelösung nach Kalibrierung mittels reiner Standard-Lösung nicht innerhalb der geforderten Grenzen möglich ist. Dies wird im folgenden Abschnitt verdeutlicht.

3.3.1 Bestimmung der Wiederfindung

Ausgehend von den Linearitätsstudien (Kapitel B 3.2) wurde in einem nächsten Schritt die Methodenlinearität und daraus die Wiederfindung bestimmt. Dazu wurde zunächst durch Vermessen verschiedener Konzentrationen der Standardlösung die Kalibrierung vorgenommen. Anschließend wurden Probelösungen, also die „imitierte“ Infusionslösung, welche durch Zusatz von Matrixlösung in der entsprechenden Verdünnung (jeweils 1:200) erhalten wurde, untersucht. Daraus wurden die Methodenlinearität und anschließend die Wiederfindung, also der Gehalt der AS, durch Einsetzen in die ermittelte Kalibrierfunktion berechnet. Die genaue Durchführung ist in Kapitel D 3.3 beschrieben.

Bei der Methodenlinearität ergeben sich wie bei der Bestimmung der Linearität Funktionen, die durch lineare Regression erster bzw. zweiter Ordnung beschrieben werden konnten (Überprüfung durch den Anpassungstest nach Mandel, Daten nicht gezeigt). Die r^2 -Werte lagen für alle AS > 0.999 und erfüllten damit die Anforderungen. Allerdings wurden bei der Bestimmung der Wiederfindung gerade im höheren Konzentrationsbereich deutlich abweichende Werte gefunden. Tabelle B 3-5 zeigt dies exemplarisch für 4 AS, die übrigen AS verhielten sich entsprechend.

Tabelle B 3-5: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind für vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die Wiederfindungsraten (WF) bei drei verschiedenen Konzentrationsniveaus nach Untersuchung der Probelösung („imitierte“ Infusionslösung). 100%-Level = 1:200-Verdünnung der Probelösung. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.3.1.

AS	WF 100%-Level	WF 300%-Level	WF 20%-Level
Ala	100.7%	108.5%	98.4%
Gly	101.8%	113.4%	99.9%
Met	103.1%	115.3%	94.5%
Val	102.5%	112.4%	100.9%

Graphisch verdeutlicht wird diese Abweichung, wenn man die Regressionsfunktionen der Systemlinearität, die sich nach Analyse der AS-Standardlösungen ergibt, mit denen der Methodenlinearität, die sich aus der Untersuchung der Probelösungen, d.h. mit zugesetzter Matrixlösung, resultiert, vergleicht. In Abbildung B 3-4 sind für die vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die entsprechenden Regressionsgeraden übereinander gelegt.

Aus Abbildung B 3-4 wird deutlich, dass die Geraden v.a. im oberen Konzentrationsbereich (Verhältnis $c_{AS}/c_{IS} = 3.5$) deutlich divergieren. Die Verhältnisse der Peakflächen ($Area_{AS}/Area_{IS}$) bei Untersuchung der Probelösungen sind deutlich größer als diejenigen der Standardlösungen.

Verschiedene Gründe sind dafür denkbar. Zum einen käme ein möglicher „Abbau“ der IS, also der Austausch von D gegen H und damit die Abnahme des Precursorions $[M+H]^+$ im Verlauf der Messsequenz in Betracht, so dass der Quotient $Area_{AS}/Area_{IS}$ insgesamt größer wird. Zum anderen könnte ein Einfluss der Matrix (Elektrolytlösung) zur unterschiedlichen Ionisierung und damit Änderung der Flächenverhältnisse führen. Ersteres konnte durch eine Untersuchung ausgeschlossen werden, bei welcher Standard- und Probelösungen im direkten Wechsel vermessen werden, statt wie bei unseren bisherigen Studien nacheinander. Auch in diesem Fall wurde eine Abweichung der Quotienten $Area_{AS}/Area_{IS}$ von Standard- und Probelösung festgestellt. Sollten tatsächlich im Verlauf der Messreihe Austauschreaktionen eintreten, so wären

diese in dieser Untersuchung bei Standard- und Probelösung im gleichen Maße aufgetreten. Die Peakflächen hätten sich also im gleichen Maße ändern müssen.

Daher lag es nahe, die Matrix als Auslöser der abweichenden Flächenverhältnisse zu vermuten. Dies wurde durch nachfolgende Experimente bestätigt.

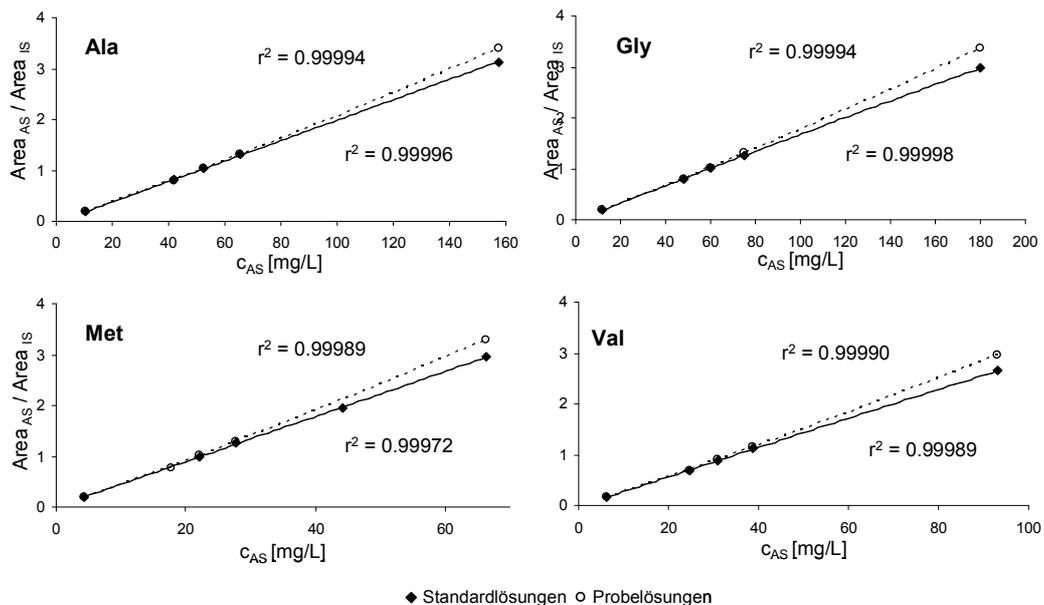


Abbildung B 3-4: Einfluss der Matrix der Infusionslösung auf die Quantifizierung von AS - Vergleich der Systemlinearität (Untersuchung reiner Standardlösungen) mit der Methodenlinearität (Untersuchung der Probelösung, d.h. „imitierte“ Infusionslösung). Dargestellt sind für vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die divergierenden Regressionsgeraden der System- und Methodenlinearität sowie die dazugehörigen r^2 -Werte. Diese beziehen sich auf die jeweils entsprechende Regressionsfunktion (hier: Linearität 2. Ordnung, d.h. quadratische Regression). 100%-Level: 1:200-Verdünnung der Probelösung. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.3.1.

3.3.2 Bestimmung der Wiederfindung bei höherer Verdünnung

Als Folge der bei den vorhergehenden Studien erhaltenen Resultate wurde die Wiederfindung bei einer höheren Verdünnung der Infusionslösung (1:300-Verdünnung = 100%-Level) bestimmt. Dadurch sollte nicht nur der Einfluss der Matrix geprüft werden, der bei höherer Verdünnung geringer ausfallen sollte, sondern auch versucht werden, ob durch geringere Konzentrationen an AS und IS die Methode in den linearen Bereich (Linearität 1. Ordnung) verschoben werden kann.

Bei einer 1:200 -Verdünnung der Infusionslösung wurde, wie gezeigt, die Linearität nur bei sieben der 21 AS mit einer linearen Regression 1. Ordnung beschrieben, für die übrigen AS beschreibt die quadratische Regression den Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Messwert besser (vgl. Kapitel B 3.2.3.2). Zwar ist die quadratische Anpassung generell problemlos zur Auswertung heranzuziehen, die Linearität 1. Ordnung ist aber einfacher in der Handhabung, so dass sie in der Praxis - sofern möglich - bevorzugt wird.

Zunächst wurde analog zu vorhergehenden Studien die Linearität bestimmt, wobei der Bereich von 30% (1:1000-Verdünnung) bis 350% (1:85.17-Verdünnung) reichte. Lediglich Ser und Tyr konnten aufgrund ihrer geringen Konzentration und / oder geringen Ionisierbarkeit erst ab höheren Konzentrationsniveaus mit ausreichender Präzision bestimmt werden. Für Ser beginnt der kalibrierte Bereich bei 50% (1:600-Verdünnung), für Tyr bei 75% (1:400-Verdünnung).

In diesen Studien wurde im untersuchten und kalibrierten Bereich für 18 der 21 AS eine Linearität 1. Ordnung festgestellt (Daten nicht gezeigt, vgl. aber Kapitel B 3.4.3 und B 3.4.4). Lediglich *NACys*, *NACtyr* und *Pro*, die bereits in den vorhergehenden Studien durch eine „gekrümmte“ Gerade auffielen (vgl. Abbildung B 3-3) und für welche die quadratische Regression als das geeignetere Anpassungsmodell bestimmt wurde, zeigten auch in diesen Untersuchungen einen quadratischen Zusammenhang. Das Ziel, durch Verringerung der Analytkonzentration die Methode in den linearen Bereich zu verschieben, wurde also für die meisten AS erreicht.

Anschließend wurden die Wiederfindungsraten der AS berechnet, indem die Werte der Probelösungen (mit Matrix) in die ermittelte Kalibriergerade (aus Standardlösungen) eingesetzt wurden.

Tabelle B 3-6 zeigt für vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die bei drei Konzentrationsniveaus ermittelten Wiederfindungen.

Tabelle B 3-6: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind für vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die Wiederfindungsraten (WF) bei drei verschiedenen Konzentrationsniveaus nach Untersuchung der Probelösung („imitierte“ Infusionslösung). 100%-Level = 1:300-Verdünnung der Probelösung. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.3.2.

AS	WF 100%-Level	WF 300%-Level	WF 30%-Level
Ala	100.4%	100.3%	100.0%
Gly	101.1%	102.7%	94.0%
Met	101.4%	102.6%	95.8%
Val	99.7%	101.7%	94.0%

Vergleicht man die berechneten Werte dieser Untersuchung (100%-Level = 1:300-Verdünnung) mit denen der vorhergehenden Studie (100%-Level = 1:200-Verdünnung, Tabelle B 3-5), so sieht man, dass bessere Wiederfindungsraten erhalten werden. Graphisch verdeutlicht wird dies in Abbildung B 3-5, in der die Regressionsgeraden der Systemlinearität (Standardlösungen) mit denen der Methodenlinearität (Probelösungen) für die vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) übereinander gelegt sind.

Bei der erhöhten Verdünnung entsprechen sich die erhaltenen Regressionsgeraden von Systemlinearität und Methodenlinearität deutlich besser, wobei jedoch auch hier gerade im oberen Bereich der Regressionsgeraden noch leichte Abweichungen festzustellen sind (vgl. Abbildung B 3-5). Insgesamt war die Abweichung jedoch zu groß, also die Wiederfindung zu gering bzw. zu hoch, als dass die Anforderungen hinsichtlich der Validierungsparameter erfüllt worden wären.

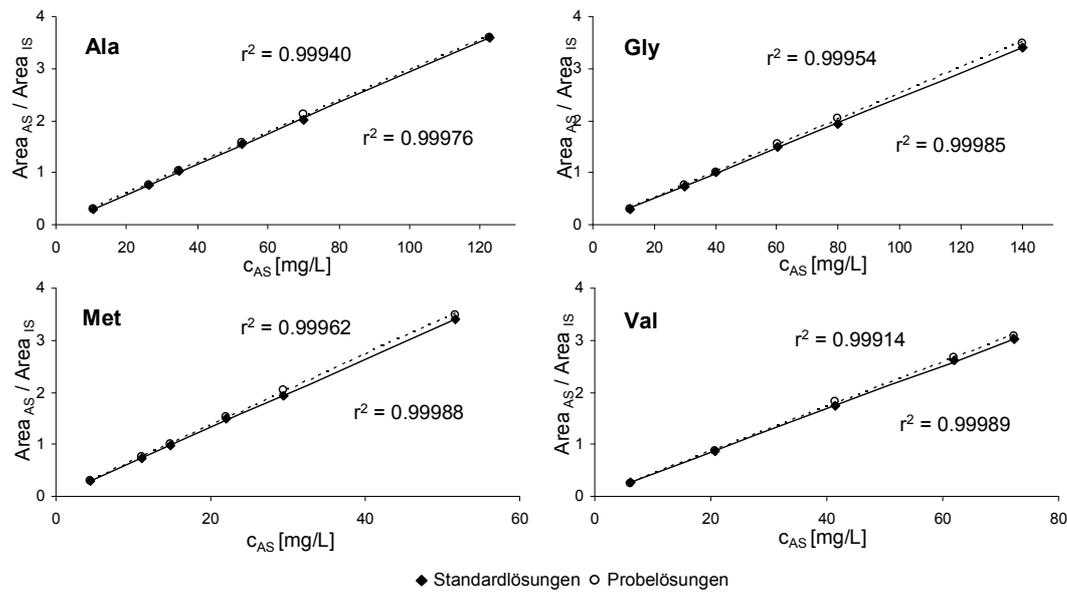


Abbildung B 3-5: Einfluss der Matrix der Infusionslösung auf die Quantifizierung von AS - Vergleich der Systemlinearität (Untersuchung von Standardlösungen) mit der Methodenlinearität (Untersuchung der Probelösung, d.h. „imitierte“ Infusionslösung). Dargestellt sind für vier Beispiel-AS (Ala, Gly, Met, Val) die leicht divergierenden Regressionsgeraden der System- und Methodenlinearität sowie die dazugehörigen r^2 -Werte. Diese beziehen sich auf die jeweils entsprechende Regressionsfunktion (hier: Linearität 1. Ordnung). 100%-Level: 1:300-Verdünnung der Probelösung. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.3.2.

Da, wie erwähnt, die Dauer der Messequenz und damit eventuell verbundene Reaktionen ausgeschlossen worden sind, ist ein geringer Einfluss der Matrix nachgewiesen. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass bei höherer Verdünnung der Infusionslösung geringere Abweichungen festgestellt wurden. Diese kommen dadurch zustande, dass auch die Matrix (Elektrolytlösung) entsprechend verdünnt wird und so weniger Einfluss ausüben kann.

Bestätigt wird die Annahme eines Matrixeinflusses auch dadurch, dass bei der Validierung in der Matrixlösung (Kapitel B 3.4) keine Abweichungen festgestellt werden konnten, sondern die Validierung innerhalb der engen Grenzen möglich war. Dieser Einfluss der Matrix war insofern überraschend als diese bei unseren Untersuchungen nur aus Elektrolyt- und Puffersubstanzen besteht (vgl. Tabelle D 3-1, S. 204) und diese vor der Untersuchung stark verdünnt wurde. Standard- und Probelösung unterschieden sich also nur geringfügig.

Dass Matrixeffekte die Quantifizierung mittels HPLC-MS erschweren, ist in der Literatur bekannt und wurde vor allem für komplexe biologische Matrices (Blut, Pflanzen- oder Lebensmittelextrakte) beschrieben. Als Matrixeffekte bezeichnet man dabei die Änderung der Ionisierungseffizienz im Elektrospray-Interface aufgrund koeluierender Substanzen, die zu unterschiedlichen Signalintensitäten führen. Je nach Substanz und Matrix kann es dabei zur einer Signalverstärkung („ion enhancement“) oder Signalunterdrückung („ion suppression“) kommen, wobei letztere wesentlich häufiger beobachtet wird (Annesley 2003; Taylor 2005; Jessome und Volmer 2006). Der genaue Mechanismus der Ionensuppression wird noch diskutiert, wobei der Hauptgrund wohl in Änderungen der Eigenschaften der Tröpfchen im ESI-Spray liegt. Koeluierende Substanzen wie z.B. natürliche Matrixbestandteile, Metabolite aber auch Salze oder Ionenpaarreagenzien, die nicht flüchtig bzw. weniger flüchtig sind als der Analyt, führen zur Änderung der Tröpfchenbildung und damit zu Änderungen an Ionen in der Gasphase, die den Detektor letztlich erreichen können (King *et al.* 2000). Bei unseren Studien kommen lediglich die Elektrolytsubstanzen für den beobachteten Effekt in Frage. Der Einfluss von Elektrolyten auf die Ionisierung und Signalsuppression hat man in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben (Draper *et al.* 2009; Kostiainen und Kauppila 2009; Cech und Enke 2010). Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung durch Elektrolyte ist die Adduktbildung. Durch die in der Elektrolytlösung vorhandenen Natrium- und Kalium-Ionen könnten Addukte ($[M+Na]^+$ bzw. $[M+K]^+$) entstehen, die bei Untersuchung der protonierten Molekülonen der AS ($[M+H]^+$) im SIM-Modus nicht erfasst werden (Kostiainen und Kauppila 2009).

Generell sollen die genannten Matrixeffekte durch die Auswahl geeigneter interner Standards minimiert und durch die Verwendung von stabil-isotopenmarkierter Referenzen als interne Standards gänzlich unterdrückt werden. Analyt und IS sollten im Falle von auftretenden Matrixeffekten von diesen im gleichen Maße betroffen sein, so dass sich das Verhältnis nicht ändern sollte. In unseren Studien wurde dagegen eine Änderung des Verhältnisses $Area_{AS} / Area_{IS}$ durch die Matrix festgestellt; das bedeutet, dass AS und IS nicht die gleiche prozentuale Änderung durch die vorhandenen Elektrolyten erfahren.

Angaben zur unterschiedlichen Diskriminierung von Analyt und entsprechendem isotoopenmarkierten Standard aufgrund von Elektrolyteinflüssen wurden in der entsprechenden Literatur nicht gefunden. Dagegen ist in der Literatur beschrieben, dass Analyten und ihre jeweiligen isotoopenmarkierte interne Standards gegenseitig die Ionisierung beeinflussen (Liang *et al.* 2003; Sojo *et al.* 2003; Remane *et al.* 2010a; Remane *et al.* 2010b). Dabei nimmt mit steigender Analytkonzentration die Ionisierung der IS ab, umgekehrt wird bei steigender IS-Konzentration die Ionisierung des Analyten unterdrückt. Liang *et al.* (2003) zeigten eine dadurch verursachte Verringerung des linearen Kalibrierbereichs, wohingegen Sojo *et al.* (2003) feststellten, dass sich die Kalibrierfunktion nicht ändert. Eine solche gegenseitige Beeinflussung von Analyt und IS wurde in dem von uns untersuchten Bereich nicht festgestellt.

Was letztlich der Grund für das unterschiedliche Verhalten von AS und IS durch die Matrix ist, konnte aus den erarbeiteten Daten nicht ermittelt werden. Gezeigt wurde, dass der Einfluss bei steigender Verdünnung der Matrix-Lösung deutlich minimiert wurde. Ob er durch weitere Verdünnung gänzlich kompensiert werden könnte, müsste durch weiterführende Untersuchungen ermittelt werden.

Für die in vorliegender Arbeit zu validierende HPLC-MS-Methode zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen ist eine Validierung in der Matrix möglich, da diese aufgrund ihrer „einfachen“ Zusammensetzung leicht herzustellen ist und den AS- und IS-Standardlösungen zur Validierung zugesetzt werden kann. Daher wurde die Validierung der entwickelten Methode im Folgenden in der Matrixlösung durchgeführt.

3.4 Validierung in der Matrixlösung

Wie bei unseren vorausgehenden Studien gezeigt wurde, war der Einfluss der Matrix auf die Ionisierung zu groß, als dass die Methode bezogen auf eine reine Standardlösung über den weiten Bereich innerhalb der geforderten Grenzen validiert werden konnte. Demzufolge wurde die Methode in einem nächsten Schritt in der Matrix validiert. Für die spätere Anwendung in der Praxis ist dies insofern problemlos möglich als die spezifische Infusionslösungsmatrix, die aus verschiedenen Salzen und

Puffersubstanzen besteht, einfach hergestellt und ohne großen Aufwand der reinen AS-Standardlösung zugefügt werden kann.

Die Durchführung der Versuchsreihe ist in Abschnitt D 3.4 beschrieben.

3.4.1 Systempräzision

Die Systempräzision wurde aus den Peakflächen einer Sechsfach-Untersuchung des 100%-Levels berechnet. Aus den Peakflächen der AS sowie der IS wurde der Mittelwert bestimmt (x_m AS bzw. x_m IS) und daraus jeweils die entsprechende Standardabweichung SD und die relative Standardabweichung RSD berechnet. Die Auswertung erfolgte über die Flächenverhältnisse von AS zu IS, also dem Quotienten $Area_{AS} / Area_{IS}$ sowie der dazugehörigen relativen Standardabweichung. Für NAcTyr erfolgte die Berechnung aufgrund des fehlenden IS bezogen auf D₅-Trp, welches sich in vorausgegangenen Studien als geeigneter Bezugs-IS erwiesen hatte.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Systempräzision sind in Tabelle B 3-7 dargestellt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, war die relative Standardabweichung des Quotienten $Area_{AS}/Area_{IS}$ für alle AS < 1%. Die geringste zeigte Thr mit 0.246%, die größte mit 0.877% Asp. Für alle Analyten wurde also die für die Systempräzision geforderte Bedingung einer RSD von < 1.5% deutlich unterschritten.

Auch NAcTyr, für das, wie erwähnt, ein entsprechender IS fehlte, lag die RSD bezogen auf D₅-Trp als IS mit 0.840% innerhalb des geforderten Bereichs.

Zusätzlich lässt sich aus der Tabelle ablesen, dass die Verwendung der isotopenmarkierten Referenzen und die Auswertung über das Verhältnis von AS zu IS notwendig sind.

Im Allgemeinen lagen die RSD-Werte der AS bzw. IS nach Sechsfachbestimmung ihrer Peakflächen um die 1%; 8 von 21 AS zeigten RSD-Werte von > 1.5%, Asn und Thr sogar von > 2%. Die Systempräzision lag für diese also außerhalb des geforderten Bereichs, so dass bereits bei der Systempräzision gezeigt wird, dass ohne Verwendung der IS eine Validierung der entwickelten Methode für die pharmazeutische

Qualitätskontrolle unmöglich wäre. Durch den Einsatz der entsprechenden IS wurden jedoch, wie erwähnt, RSD-Werte von unter 1% erhalten, die IS gleichen also die Unterschiede in der Ionisierung von Lauf zu Lauf aus.

In gleicher Weise wurde die Systempräzision bezogen auf die Retentionszeiten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Anhang II, Tabelle Anhang 3-3 zusammengefasst. Die Retentionszeiten aller AS bzw. IS unterschieden sich von Lauf zu Lauf kaum. Die relativen Standardabweichungen lagen für alle AS bzw. IS bei weniger als 0.1%, so dass die Anforderungen ($RSD < 1\%$) deutlich erfüllt wurden.

3.4.2 Methodenpräzision

Die Methodenpräzision wurde ebenfalls durch Sechsfachbestimmung des 100%-Levels bestimmt, allerdings wurden hier die Untersuchungslösungen sechsmal hergestellt und je einmal vermessen. Die Auswertung erfolgte analog zur Systempräzision. In Tabelle B 3-8 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Methodenpräzision aufgeführt.

Wie schon bei der Bestimmung der Systempräzision erfüllten auch die Werte der Methodenpräzision für alle Analyten die Anforderungen, d.h. die RSD-Werte der Flächenverhältnisse ($Area_{AS} / Area_{IS}$) waren kleiner als 2%.

Zudem wird ersichtlich, dass die RSD-Werte im Vergleich zur Systempräzision erwartungsgemäß größer waren, die Präzision war also schlechter. Durch die sechsfache Verdünnung sind in diesen Werten auch Aufarbeitungsfehler ausgedrückt. Wie aus den Werten deutlich wird, waren diese jedoch vernachlässigbar und blieben im Rahmen der geforderten Grenzen.

Auch bezogen auf die Retentionszeiten lag die Methodenpräzision deutlich innerhalb der geforderten Grenzen (vgl. Anhang II, Tabelle Anhang 3-4). Die Retentionszeiten aller AS bzw. IS unterschieden sich von Lauf zu Lauf nur wenig. Die relativen Standardabweichungen lagen für alle AS bzw. IS bei weniger als 0.2%, so dass auch hier die Anforderungen ($RSD < 1\%$) deutlich erfüllt wurden.

Tabelle B 3-7: Ergebnisse der Bestimmung der Systempräzision im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Peakflächen (Area) von AS und IS sowie des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$, die Standardabweichung (SD) von AS, IS und dem Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$, sowie die relative Standardabweichung (RSD) von AS, IS und dem Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ nach Sechsfachbestimmung. Zur Auswertung wird die RSD von $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ herangezogen, die die gemäß den Anforderungen unter 1.5% liegen muss. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund der fehlenden entsprechenden isotope-markierten Referenz D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

Aminosäure	Area AS x_m	Area IS x_m	$\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ x_m	SD AS	SD IS	SD $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$	RSD AS	RSD IS	RSD $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$
NAcCys	238888	174809	1.367	2868	2409	0.0097	1.201	1.378	0.712
NAcTyr	2035829	1565609	1.300	19385	19192	0.0109	0.952	1.226	0.840
Ala	1015625	977323	1.039	9305	7286	0.0036	0.905	0.737	0.349
Arg	6399835	6165365	1.038	77198	79402	0.0062	1.206	1.288	0.599
Asn	261918	261890	1.000	5358	4441	0.0041	2.046	1.696	0.414
Asp	173000	186110	0.930	2705	4022	0.0081	1.564	2.161	0.877
Glu	940474	918315	1.024	14272	15416	0.0084	1.518	1.679	0.817
Gly	324601	313986	1.034	3847	3662	0.0029	1.185	1.166	0.276
His	2360048	2172346	1.087	31772	39134	0.0091	1.346	1.801	0.840
Ile	5453226	5615805	0.971	84973	58932	0.0056	1.558	1.049	0.574
Leu	7846600	7704671	1.018	73551	77470	0.0040	0.937	1.005	0.392
Lys	3311979	3782026	0.876	51829	43153	0.0074	1.565	1.141	0.851
Met	3879586	3821621	1.015	51143	51136	0.0041	1.318	1.338	0.408
Orn	1162964	1104386	1.053	15489	15672	0.0038	1.332	1.419	0.365
Phe	6190945	5912887	1.047	66659	71889	0.0088	1.077	1.216	0.844
Pro	8324020	6227352	1.337	114611	87617	0.0040	1.377	1.407	0.302
Ser	55521	50717	1.095	946	812	0.0082	1.703	1.601	0.747
Thr	507202	547829	0.926	11439	11976	0.0023	2.255	2.186	0.246
Trp	1772079	1565609	1.132	24899	19192	0.0029	1.405	1.226	0.256
Tyr	119934	115461	1.039	1381	1703	0.0080	1.151	1.475	0.772
Val	4372522	4795083	0.912	69264	61870	0.0046	1.584	1.290	0.502

Tabelle B 3-8: Ergebnisse der Bestimmung der Methodenpräzision im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Peakflächen (Area) von AS und IS sowie des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$, die Standardabweichung (SD) von AS, IS und dem Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$, sowie die relative Standardabweichung (RSD) von AS, IS und dem Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ nach Sechsfachbestimmung. Zur Auswertung wird die RSD von $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ herangezogen, die die gemäß den Anforderungen unter 1.5% liegen muss. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund der fehlenden entsprechenden isotonenmarkierten Referenz D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

Aminosäure	Area AS x_m	Area IS x_m	$\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ x_m	SD AS	SD IS	SD $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$	RSD AS	RSD IS	RSD $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$
NAcCys	194511	139259	1.397	2540	1485	0.0169	1.306	1.066	1.209
NAcTyr	1688554	1341874	1.258	18971	8162	0.0145	1.123	0.608	1.153
Ala	886178	848251	1.045	11517	14267	0.0059	1.300	1.682	0.567
Arg	5698834	5485389	1.039	31387	40959	0.0071	0.551	0.747	0.680
Asn	223765	221408	1.011	2503	2884	0.0065	1.118	1.303	0.647
Asp	145012	154885	0.936	2073	1832	0.0067	1.430	1.183	0.713
Glu	832701	801901	1.039	10904	12596	0.0057	1.309	1.571	0.546
Gly	285024	273912	1.041	2593	3861	0.0114	0.910	1.410	1.097
His	2035518	1965370	1.036	10000	13642	0.0077	0.491	0.694	0.741
Ile	4972584	5095444	0.976	32209	54234	0.0114	0.648	1.064	1.166
Leu	7199447	7011670	1.027	46531	69232	0.0087	0.646	0.987	0.848
Lys	2982376	3386954	0.881	13258	39974	0.0111	0.445	1.180	1.255
Met	3509370	3399402	1.032	23674	22074	0.0076	0.675	0.649	0.735
Orn	1042646	983869	1.060	7731	7187	0.0081	0.741	0.730	0.767
Phe	5586460	5360890	1.042	33991	33020	0.0091	0.608	0.616	0.873
Pro	7581664	5647587	1.342	92726	53538	0.0054	1.223	0.948	0.399
Ser	48239	43254	1.115	544	366	0.0126	1.128	0.845	1.128
Thr	427249	457313	0.934	2168	4036	0.0052	0.507	0.883	0.556
Trp	1548979	1341874	1.154	9942	8162	0.0061	0.642	0.608	0.528
Tyr	101590	98868	1.027	1718	1514	0.0097	1.691	1.531	0.947
Val	4005838	4361093	0.919	18353	42445	0.0083	0.458	0.973	0.906

3.4.3 Systemlinearität

Die Systemlinearität wurde wie in vorausgehenden Untersuchungen durch Dreifachbestimmung der Untersuchungslösung bei verschiedenen Konzentrationen der AS bei gleich bleibender Konzentration von IS (und Matrixlösung) bestimmt. Die Mittelwerte der Flächenverhältnisse ($\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$) wurden gegen die Konzentration AS aufgetragen und einer linearen Regression erster sowie zweiter Ordnung (quadratisch) unterworfen. Ser und Tyr konnten aufgrund geringer Konzentration bzw. geringer Ionisierungseffizienz, wie erwähnt, erst ab höheren Konzentrationsniveaus mit ausreichender Präzision bestimmt werden ($\text{RSD} \leq 1.5\%$). Die Kalibrierung der beiden AS begann daher erst ab dem 50%-Level (Ser) bzw. ab 75% (Tyr).

Die Überprüfung der Kalibrierfunktion erfolgte mit dem Anpassungstest nach Mandel. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt D 3.4 beschrieben.

In Abbildung B 3-6 sind exemplarisch acht Regressionsfunktionen dargestellt, die sich durch Auftragung der Flächenverhältnisse ($\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$) gegen die Konzentration AS (c_{AS}) ergeben.

Wie aus den Diagrammen hervorgeht, wurden subjektiv „gute“ Geraden erhalten, lediglich im Falle von NAcCys und NAcTyr fiel bei visueller Auswertung eine Krümmung auf. Der Anpassungstest nach Mandel bestätigte für diese beiden AS sowie für Pro die quadratische Regression als das geeignetere Regressionsmodell.

Die Regressionsfunktionen, die Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der linearen sowie quadratischen Regression sind für alle 21 AS in Tabelle B 3-9 zusammengefasst.

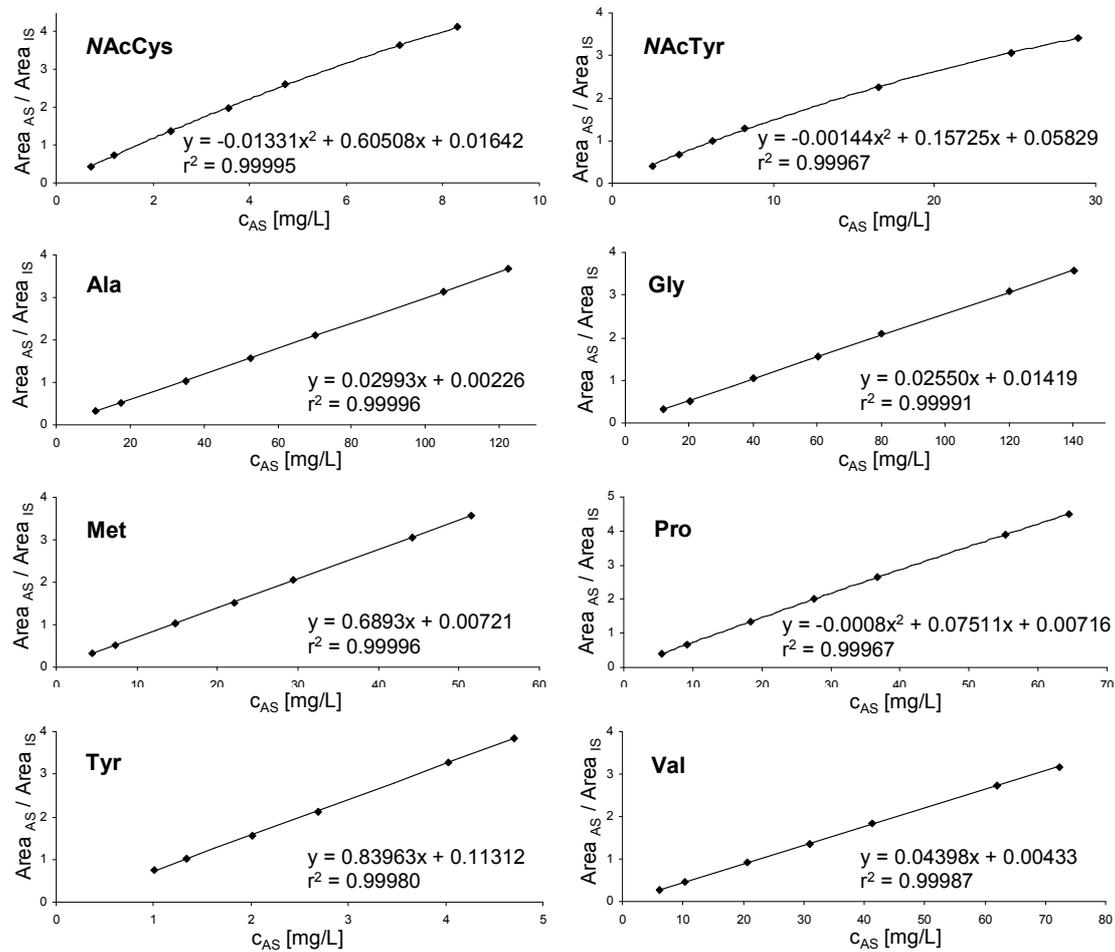


Abbildung B 3-6: Bestimmung der Systemlinearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Dargestellt sind beispielhaft für acht AS (NAcCys, NAcTyr, Ala, Gly, Met, Pro, Tyr und Val), die ermittelten Ausgleichsgeraden und die dazugehörigen Kalibrierfunktionen sowie Bestimmtheitsmaße r^2 , die sich durch Auftragung der Flächenverhältnisse ($\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$) gegen die Konzentration AS (c_{AS}) und anschließende Regressionsanalyse ergaben. NAcCys, NAcTyr und Pro werden durch die quadratische Regressionsfunktion beschrieben, was durch den Anpassungstest nach Mandel bestätigt wurde. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

Wie aus Tabelle B 3-9 ersichtlich ist, ergaben die Regressionsfunktionen aller AS bei erwiesener Linearität erster bzw. zweiter Ordnung Bestimmtheitsmaße $r^2 > 0.999$. Damit wurden für alle AS die Anforderungen hinsichtlich der Linearität ($r \geq 0.999$) erfüllt.

Tabelle B 3-9: Ergebnisse der Bestimmung der Systemlinearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Regressionsfunktionen, die dazugehörigen Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der linearen und quadratischen Regression von 21 AS. Die letzte Spalte gibt das Ergebnis der Prüfung der Kalibrierfunktion durch den Anpassungstest nach Mandel wieder. Grau und kursiv hervorgehoben sind diejenigen AS, welche durch die quadratische Regression beschrieben werden. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund eines fehlenden IS D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS	Regressionsfunktion $y = mx + b$ bzw. $y = nx^2 + mx + b$	r^2	V_{x0} [%]	Regression
NACys	$y = 0.485898x + 0.184458$	0.996752	4.530345	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.01331x^2 + 0.60508x + 0.01642$	0.999955	0.581995	
NACTyr 2	$y = 0.112462x + 0.261441$	0.993659	7.052094	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.001439x^2 + 0.157248x + 0.058286$	0.999671	1.687017	
Ala	$y = 0.02993x - 0.00226$	0.999988	0.271239	linear
	$y = 0.000001x^2 + 0.029855x - 0.000625$	0.999989	0.298498	
Arg	$y = 0.02744x - 0.00758$	0.999937	0.631462	linear
	$y = 0.000004x^2 + 0.026913x + 0.004457$	0.999956	0.586991	
Asn	$y = 0.066984x - 0.025220$	0.999947	0.576466	linear
	$y = -0.000010x^2 + 0.067573x - 0.030659$	0.999951	0.618107	
Asp	$y = 0.049482x + 0.010048$	0.999926	0.681078	linear
	$y = -0.000002x^2 + 0.049591x + 0.008838$	0.999927	0.759945	
Glu	$y = 0.044000x - 0.019090$	0.999872	0.896300	linear
	$y = 0.000017x^2 + 0.042474x + 0.002675$	0.999937	0.708812	
Gly	$y = 0.025504x + 0.014193$	0.999914	0.736391	linear
	$y = -0.000005x^2 + 0.026300x - 0.004744$	0.999966	0.497852	
His	$y = 0.109701x - 0.011611$	0.999918	0.720327	linear
	$y = -0.000053x^2 + 0.111704x - 0.023540$	0.999935	0.711613	
Ile	$y = 0.060444x - 0.018833$	0.999959	0.509057	linear
	$y = 0.000003x^2 + 0.060245x - 0.016861$	0.999959	0.565323	
Leu	$y = 0.035215x - 0.017995$	0.999943	0.599028	linear
	$y = 0.000009x^2 + 0.034187x + 0.000159$	0.999988	0.302063	
Lys	$y = 0.031239x - 0.007817$	0.999958	0.516305	linear
	$y = -0.000002x^2 + 0.031262x - 0.008198$	0.999958	0.577015	
Met	$y = 0.068934x + 0.007215$	0.999957	0.520887	linear
	$y = 0.000009x^2 + 0.068433x + 0.011599$	0.999960	0.563462	
Orn	$y = 0.102672x + 0.067890$	0.999925	0.687302	linear
	$y = -0.000084x^2 + 0.105715x + 0.050470$	0.999972	0.468537	
Phe	$y = 0.068833x - 0.021151$	0.999946	0.584374	linear
	$y = 0.000009x^2 + 0.068303x - 0.016207$	0.999949	0.634497	
Pro	$y = 0.069476x + 0.054484$	0.999631	1.524127	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.000081x^2 + 0.075108x - 0.007159$	0.999982	0.371255	
Ser	$y = 0.140298x + 0.017867$	0.999851	0.875101	linear
	$y = -0.000089x^2 + 0.143060x + 0.002862$	0.999866	0.926825	
Thr	$y = 0.066263x - 0.001412$	0.999927	0.679949	linear
	$y = -0.000016x^2 + 0.067126x - 0.008629$	0.999936	0.710750	
Trp	$y = 0.212916x + 0.002969$	0.999929	0.667081	linear (Mandel)
	$y = -0.000187x^2 + 0.216684x - 0.00898$	0.999946	0.650363	
Tyr	$y = 0.839627x - 0.113121$	0.999432	0.887824	linear (Mandel)
	$y = 0.011699x^2 + 0.772758x - 0.039460$	0.999976	0.355146	
Val	$y = 0.043975x + 0.004330$	0.999871	0.902330	linear (Mandel)
	$y = -0.000012x^2 + 0.044951x - 0.007668$	0.999897	0.898287	

3.4.4 Methodenlinearität

In gleicher Weise wurde die Methodenlinearität bestimmt, wobei in diesem Fall die Untersuchungslösungen je dreimal hergestellt wurden. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt D 3.4 beschrieben.

Ser und Tyr wurden aufgrund unzureichender Präzision beim 30%- bzw. 50%-Niveau wiederum erst ab 50% bzw. 75% in die Regressionsgerade aufgenommen. Die Überprüfung der Kalibrierfunktion erfolgte mit dem Anpassungstest nach Mandel.

Tabelle B 3-10 fasst die bei der Bestimmung der Methodenlinearität ermittelten Regressionsfunktionen, die Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der linearen sowie quadratischen Regression aller 21 AS zusammen.

Auch hier erfüllen im untersuchten Bereich alle 21 AS bei erwiesener Linearität erster bzw. zweiter Ordnung die gestellten Anforderungen durch r^2 -Werte ≥ 0.999

Tabelle B 3-10: Ergebnisse der Bestimmung der Methodenlinearität im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Regressionsfunktionen, die dazugehörigen Bestimmtheitsmaße r^2 sowie die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der linearen und quadratischen Regression von 21 AS. Die letzte Spalte gibt das Ergebnis der Prüfung der Kalibrierfunktion durch den Anpassungstest nach Mandel wieder. Grau und kursiv hervorgehoben sind diejenigen AS, welche durch die quadratische Regression beschrieben werden. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund eines fehlenden IS D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS	Regressionsfunktion $y = mx + b$ bzw. $y = nx^2 + mx + b$	r^2	V_{x0} [%]	Regression
NAcCys	$y = 0.487204x + 0.193384$	0.997054	4.31	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.012487x^2 + 0.599014x + 0.035740$	0.999859	1.03	
NAcTyr 2	$y = 0.114019x + 0.239227$	0.993559	6.39	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.001244x^2 + 0.152825x + 0.048678$	0.999706	1.47	
Ala	$y = 0.029636x + 0.007274$	0.999985	0.30	linear
	$y = -0.000002x^2 + 0.029928x + 0.001181$	0.999990	0.28	
Arg	$y = 0.027305x - 0.005803$	0.999974	0.40	linear
	$y = 0.000004x^2 + 0.026676x + 0.008278$	0.999999	0.08	
Asn	$y = 0.067336x - 0.029882$	0.999871	0.89	linear
	$y = 0.000016x^2 + 0.066411x - 0.021520$	0.999880	1.05	
Asp	$y = 0.049271x + 0.014492$	0.999973	0.45	linear
	$y = -0.000015x^2 + 0.050347x + 0.003772$	0.999993	0.27	
Glu	$y = 0.043659x - 0.007979$	0.999992	0.25	linear
	$y = 0.000002x^2 + 0.043456x - 0.005371$	0.999993	0.27	
Gly	$y = 0.025494x + 0.011830$	0.999963	0.48	linear
	$y = -0.000001x^2 + 0.025693x + 0.007094$	0.999966	0.51	
His	$y = 0.102543x + 0.013313$	0.999894	0.89	linear
	$y = -0.000024x^2 + 0.103454x + 0.008441$	0.999898	1.01	
Ile	$y = 0.060194x - 0.018307$	0.999976	0.39	linear
	$y = 0.000018x^2 + 0.059077x - 0.007236$	0.999994	0.21	
Leu	$y = 0.035219x - 0.019260$	0.999960	0.50	linear
	$y = 0.000005x^2 + 0.034623x - 0.008721$	0.999976	0.44	
Lys	$y = 0.030916x + 0.000484$	0.999969	0.49	linear
	$y = -0.000004x^2 + 0.031367x - 0.006384$	0.999977	0.48	
Met	$y = 0.068994x + 0.010384$	0.999972	0.42	linear
	$y = 0.000007x^2 + 0.068626x + 0.013612$	0.999974	0.46	
Orn	$y = 0.101956x + 0.068485$	0.999955	0.58	linear
	$y = -0.000089x^2 + 0.105150x + 0.052065$	0.999996	0.21	
Phe	$y = 0.066314x + 0.001412$	0.999937	0.63	linear
	$y = -0.000009x^2 + 0.066817x - 0.003282$	0.999940	0.69	
Pro	$y = 0.068853x + 0.062991$	0.999515	1.77	<i>quadratisch</i>
	$y = -0.000093x^2 + 0.075284x - 0.007396$	0.999981	0.39	
Ser	$y = 0.140248x + 0.032691$	0.999834	1.02	linear
	$y = 0.000205x^2 + 0.134262x + 0.060192$	0.999931	0.74	
Thr	$y = 0.066202x + 0.001476$	0.999928	0.66	linear
	$y = -0.000024x^2 + 0.067507x - 0.009218$	0.999947	0.70	
Trp	$y = 0.210433x + 0.017925$	0.999966	0.46	linear
	$y = -0.000258x^2 + 0.215691x + 0.001575$	0.999996	0.18	
Tyr	$y = 0.843045x - 0.120016$	0.999688	1.11	linear
	$y = 0.013180x^2 + 0.767708x - 0.037026$	0.999910	0.69	
Val	$y = 0.043714x + 0.006726$	0.999948	0.62	linear
	$y = -0.000016x^2 + 0.044939x - 0.006802$	0.999981	0.43	

3.4.5 Richtigkeit

Aus den Daten der Linearitätsstudien wurde die Richtigkeit („accuracy“) ermittelt. Dazu wurde die Wiederfindung bei verschiedenen Konzentrationsniveaus über den gesamten kalibrierten Bereich bestimmt (30%, 50%, 100%, 200% und 350%). Die Durchführung ist in Kapitel D 3.4.2 beschrieben.

Tabelle B 3–11 zeigt die berechneten Werte der Wiederfindung von 19 der 21 untersuchten AS.

Als Grenze wird für die Einzelwertbestimmung eine WF von 98.0% - 102.0% gefordert, für den Mittelwert eine WF von 98.5% - 101.5 %. Wie aus der Tabelle hervorgeht, werden 11 AS (Ala, Arg, Asn, Asp, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr) über den gesamten kalibrierten Bereich (30% - 350%, bzw. für Ser beginnend ab 50%, für Tyr ab 75%) mit ausreichender Richtigkeit bestimmt.

NAcCys, NAcTyr, Glu, Gly, Ile, Leu, Orn, Val und Pro überschritten beim 30%-Niveau die geforderten Grenzen und wurden erst ab dem 50%-Level mit ausreichender Richtigkeit erfasst.

Tabelle B 3-11: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind Ergebnisse der Wiederfindung (WF) der Einzelwerte sowie des Mittelwerts der Dreifachbestimmung bei fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus von 19 AS. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund eines fehlenden entsprechenden IS D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS		WF [%] 100%- Level	WF [%] 200%- Level	WF [%] 350%- Level	WF [%] 30%-Level	WF [%] 50%-Level
NACcys	1. Wert	100.16	101.54	101.51	105.50	100.16
	2. Wert	99.97	100.43	101.28	107.51	101.85
	3. Wert	101.04	99.37	101.55	104.96	101.17
	Mittelwert	100.39	100.45	101.44	105.99	101.06
NACtyr 2	1. Wert	100.08	100.81	101.98	91.83	99.22
	2. Wert	100.67	98.51	99.91	93.18	99.44
	3. Wert	101.00	98.02	101.97	93.48	101.19
	Mittelwert	100.59	99.11	101.28	92.83	99.95
Ala	1. Wert	99.87	100.83	99.74	101.06	
	2. Wert	99.98	99.19	98.45	101.63	
	3. Wert	99.64	98.65	98.86	100.59	
	Mittelwert	99.83	99.56	99.02	101.09	
Arg	1. Wert	99.10	99.78	100.42	101.29	
	2. Wert	100.09	98.76	99.67	101.45	
	3. Wert	98.56	98.48	99.05	100.87	
	Mittelwert	99.25	99.01	99.71	101.20	
Asn	1. Wert	99.09	100.42	101.37	100.60	
	2. Wert	99.50	99.50	99.18	101.90	
	3. Wert	100.46	98.48	99.83	101.33	
	Mittelwert	99.69	99.47	100.13	101.28	
Asp	1. Wert	98.95	101.64	100.17	98.84	
	2. Wert	99.94	99.13	99.69	98.82	
	3. Wert	100.41	99.64	98.68	99.47	
	Mittelwert	99.77	100.14	99.51	99.04	
Glu	1. Wert	99.46	100.31	100.80	104.82	101.09
	2. Wert	99.35	99.21	98.56	104.32	101.50
	3. Wert	100.53	99.26	98.80	103.81	100.89
	Mittelwert	99.78	99.59	99.39	104.31	101.16
Gly	1. Wert	100.92	100.37	100.64	97.58	99.18
	2. Wert	99.49	99.92	99.20	98.46	98.47
	3. Wert	100.37	99.46	99.12	97.57	98.95
	Mittelwert	100.26	99.92	99.65	97.87	98.87
Ile	1. Wert	98.30	100.85	100.80	102.45	100.44
	2. Wert	99.30	99.07	98.66	103.12	100.01
	3. Wert	98.70	98.28	99.94	101.05	99.36
	Mittelwert	98.76	99.40	99.80	102.21	99.94
Leu	1. Wert	99.20	100.47	100.49	102.75	100.05
	2. Wert	100.81	99.40	99.93	103.60	100.06
	3. Wert	99.74	98.38	99.32	102.66	100.00
	Mittelwert	99.92	99.42	99.91	103.00	100.04

AS		WF [%] 100%- Level	WF [%] 200%- Level	WF [%] 350%- Level	WF [%] 30%-Level	WF [%] 50%-Level
Lys	1. Wert	99.95	100.70	99.93	101.26	
	2. Wert	100.98	99.19	98.52	101.16	
	3. Wert	99.50	98.40	98.27	101.61	
	Mittelwert	100.14	99.43	98.91	101.34	
Met	1. Wert	100.27	100.95	100.59	100.14	
	2. Wert	100.79	99.20	99.56	100.66	
	3. Wert	100.19	98.86	99.89	100.74	
	Mittelwert	100.42	99.67	100.01	100.51	
Orn	1. Wert	99.32	100.15	100.43	98.57	98.88
	2. Wert	100.36	100.57	98.56	95.97	98.89
	3. Wert	100.53	98.87	98.09	96.33	98.85
	Mittelwert	100.07	99.87	99.03	96.95	98.88
Pro	1. Wert	99.02	101.54	100.01	101.53	
	2. Wert	99.86	99.47	98.38	101.63	
	3. Wert	100.21	98.82	98.95	99.95	
	Mittelwert	99.70	99.94	99.12	101.04	
Ser	1. Wert	98.92	100.69	101.25	n.b.	101.14
	2. Wert	100.59	98.91	100.18	n.b.	99.86
	3. Wert	100.94	99.28	100.10	n.b.	101.56
	Mittelwert	100.15	99.63	100.51	n.b.	100.85
Thr	1. Wert	99.83	101.20	100.48	98.91	
	2. Wert	99.77	99.47	99.10	100.30	
	3. Wert	100.62	99.67	99.11	99.70	
	Mittelwert	100.07	100.11	99.56	99.63	
Trp	1. Wert	100.85	101.37	99.92	99.39	
	2. Wert	100.82	99.66	98.27	101.18	
	3. Wert	101.14	98.67	99.01	99.97	
	Mittelwert	100.94	99.90	99.07	100.18	
Tyr¹	1. Wert	100.05	99.87	101.43	n.b.	n.b.
	2. Wert	100.17	99.01	100.96	n.b.	n.b.
	3. Wert	99.99	98.48	100.65	n.b.	n.b.
	Mittelwert	100.07	99.12	101.01	n.b.	n.b.
Val	1. Wert	98.70	101.16	99.74	95.98	99.22
	2. Wert	99.42	99.79	98.67	97.66	99.83
	3. Wert	100.86	98.34	98.74	95.04	99.44
	Mittelwert	99.66	99.76	99.05	96.23	99.50

¹: Tyr konnte aufgrund mangelnder Präzision bei höherer Verdünnung erst ab dem 75%-Level bestimmt werden. Die WF betrug dort für die Einzelwerte 100.48 %, 99.86% und 100.59 %, für den Mittelwert 100.31%.

Problematisch gestalteten sich die beiden AS His und Phe, deren Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit in Tabelle B 3-12 zusammengefasst sind.

Tabelle B 3-12: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen für His und Phe. Aufgeführt sind die Wiederfindungsraten (WF) der Einzelwerte sowie des Mittelwerts der Dreifachbestimmung bei fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS		WF [%] 100%- Level	WF [%] 200%- Level	WF [%] 350%- Level	WF [%] 30%- Level	WF [%] 50%- Level
His	1. Wert	94.50	96.28	94.51	102.70	99.30
	2. Wert	94.98	92.73	93.44	102.33	99.16
	3. Wert	95.41	94.50	93.04	99.95	97.62
	Mittelwert	94.96	94.51	93.66	101.66	98.69
Phe	1. Wert	99.06	98.03	97.08	101.53	99.82
	2. Wert	98.31	96.13	96.34	102.86	100.09
	3. Wert	98.91	96.32	96.41	102.40	101.09
	Mittelwert	98.76	96.83	96.61	102.26	100.33

Diese beiden AS zeigten deutlich abweichende Werte; sie konnten mit der entwickelten Methode nicht mit ausreichender Richtigkeit bestimmt werden. Graphisch lässt sich diese Abweichung durch Übereinanderlegen der Geraden von System- und Methodenlinearität darstellen (Abbildung B 3-7).

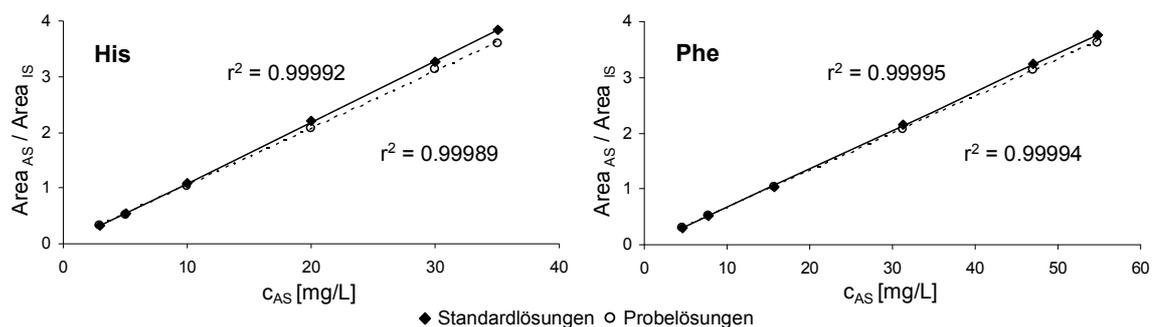


Abbildung B 3-7: Graphische Verdeutlichung der ungenügenden Wiederfindung (Richtigkeit) von His und Phe im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. In der Abbildung sind die Ausgleichsgeraden der System- und Methodenlinearität übereinander gelegt; aus deren Divergenz können die Abweichungen der Wiederfindungen abgeleitet werden. Die r^2 -Werte beziehen sich auf die jeweils dazugehörige Regressionsfunktion. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

In beiden Fällen war das Verhältnis der Peakfläche AS zur Peakfläche IS ($\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$) bei Untersuchung der Probenlösungen (Methodenlinearität) kleiner, insbesondere bei höheren Konzentrationen an AS. Der Grund hierfür ist unklar.

Fehler aufgrund der Probenaufarbeitung kommen nicht in Betracht, da diese sich auf alle AS auswirken würden. Da allerdings nur zwei der 21 AS diese Abweichungen zeigen, können solche Fehler ausgeschlossen werden. Ein „Abbau“ der IS durch Austauschreaktionen im Verlauf der Messsequenz (Gesamtdauer ca. 36 h), ist ebenfalls unwahrscheinlich. Im Fall von stattfindenden Austauschreaktionen würde die Peakfläche der IS kleiner werden, so dass der Quotient $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ größer werden müsste. Hier wird der Quotient jedoch kleiner, was heißt, dass entweder der Zähler (Area_{AS}) kleiner und/oder der Nenner (Area_{IS}) größer wird. Zudem müssten in diesem Fall die beiden AS (His und Phe) bezogen auf einen anderen, stabilen isotoptenmarkierten Standard quantifizierbar werden. Allerdings zeigen sich auch hier Abweichungen, die denen in Abbildung B 3-7 dargestellten entsprechen.

Als ein möglicher Grund, der die Abnahme des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ erklärt, käme der Abbau der AS im Verlauf der Messsequenz in Betracht. Da bei einem Abbau auch der IS entsprechend betroffen sein sollte, müsste zur Änderung der Flächenverhältnisse diese Reaktion die unmarkierte AS stärker betreffen. Dies könnte aufgrund der im Vergleich zum entsprechenden IS höheren Konzentration an AS möglich sein. Bekannt ist die Oxidationsempfindlichkeit einiger AS, insbesondere von Cys, His, Met, Trp und Tyr (Manning und Washington 1992). Da in vorliegender Untersuchung Met, Trp und Tyr jedoch mit ausreichender Richtigkeit erfasst wurden, zudem keine starken Oxidationsmittel in den Untersuchungslösungen enthalten waren und auch keine extremen Lichtbedingungen herrschten, die eine Photo-Oxidation initiieren können, erscheinen oxidative Vorgänge eher unwahrscheinlich. Für His ist zudem die Chelatbildung mit Metallen beschrieben (Mason *et al.* 2010). Diese würde ebenfalls zu einer Abnahme der detektierten His-Konzentration führen.

Was letztlich der Grund für die Abweichungen und die damit verbundene fehlerhafte Quantifizierung von His und Phe ist, kann aus den vorhandenen Daten nicht abgeleitet werden.

3.4.6 Bestimmungsbereich

Aus den Daten der Präzision, Linearität und Richtigkeit wurde der Bestimmungsbereich ermittelt (Durchführung siehe Kapitel D 3.4.2).

Tabelle B 3-13 fasst für 19 AS den Bestimmungsbereich zusammen.

Tabelle B 3-13: Ergebnisse der Ermittlung des Bestimmungsbereichs im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die oberen und unteren Grenzen des Bestimmungsbereichs in Prozent sowie in mg/L (Konzentration AS in der Untersuchungslösung) von 19 AS. His und Phe konnten nicht bestimmt werden (vgl. Abschnitt B 3.4.5) und fehlen daher in der Tabelle. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS	untere Grenze	untere Grenze c _{AS} [mg/L]	obere Grenze	obere Grenze c _{AS} [mg/L]
<i>N</i> AcCys	50%	1.19	350%	8.30
<i>N</i> AcTyr 2	50%	4.13	350%	28.91
Ala	30%	10.50	350%	122.54
Arg	30%	11.52	350%	134.41
Asn * H ₂ O	30%	4.65	350%	54.28
<i>Asn</i>		4.15		48.49
Asp	30%	5.56	350%	65.29
Glu		7.20	350%	83.99
Gly	50%	20.03	350%	140.19
Ile	50%	8.33	350%	58.34
Leu		14.86	350%	104.03
Lys * HCl	30%	8.57	350%	99.98
<i>Lys</i>		6.85		80.00
Met	30%	4.42	350%	51.58
Orn * HCl	50%	4.81	350%	33.69
<i>Orn</i>		3.77		26.40
Pro	30%	5.52	350%	64.43
Ser	50%	3.86	350%	27.05
Thr	30%	4.22	350%	49.23
Trp	30%	1.60	350%	18.68
Tyr	75%	1.01	350%	4.70
Val	50%	10.34	350%	72.40

Neun AS (Als, Arg, Asn, Asp, Lys, Met, Pro, Thr, Trp) ließen sich im Bereich von 30% bis 350% mit ausreichender Präzision, Linearität und Richtigkeit erfassen. Für weitere neun AS (NACys, NACTyr, Gly, Ile, Leu, Orn, Ser, Val) ergab sich ein Bestimmungsbereich von 50% - 350%. Lediglich Tyr wurde aufgrund seiner geringen Konzentration erst ab 75% mit ausreichender Präzision, Linearität und Richtigkeit erfasst.

Bezogen auf die Absolutkonzentration an Analyt ergab sich ein Bestimmungsbereich von ~ 1 mg/L (NACys, Tyr, Trp) bis über 120 mg/L (Ala, Arg, Gly).

3.5 Zusammenfassung der Validierung der HILIC-HPLC-MS-Methode

In den vorausgegangenen Studien zur Validierung der entwickelten HILIC-HPLC-MS-Methode wurde gezeigt, dass bei dieser über einen großen Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentrations- und Messwerten besteht. Einzig für NACys, NACTyr und Pro wurde die quadratische Regression als geeigneteres Anpassungsmodell ermittelt. Gleichzeitig wurde die Bedeutung einer Überprüfung der Grundkalibrierung demonstriert.

Bei Untersuchungen zur Wiederfindung wurde ein Einfluss der Matrix-Lösung festgestellt, der zu Abweichungen hinsichtlich des Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ führte, so dass eine Quantifizierung innerhalb der geforderten Grenzen bei Kalibrierung über reine Standardlösungen nicht möglich war.

Daher wurde die Validierung in der Matrixlösung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass mit der entwickelten HILIC-HPLC-MS-Methode Aminosäuren in Infusionslösungen mit hoher Präzision und Richtigkeit bestimmt werden können. 18 der 21 untersuchten AS ließen sich über den Bereich von 50% - 350% (neun davon sogar von 30% - 350%) innerhalb der zur Gehaltsbestimmung von pharmazeutischen Formulierungen vorgeschriebenen Grenzen (ICH 2005; B.Braun 2008) quantifizieren. Für Tyr gelang diese Quantifizierung im Bereich von 75% - 350%.

Lediglich für His und Phe gelang keine Bestimmung innerhalb der tolerierten Abweichungen, wobei der Grund dafür nicht geklärt wurde.

Die Validierung in der Matrix-Lösung ist bei der späteren Anwendung der entwickelten Methode in der Praxis einfach zu realisieren, da die spezifische Infusionslösungsmatrix, die nur aus verschiedenen Salzen und Puffersubstanzen besteht, einfach hergestellt und ohne großen Aufwand der reinen AS-Standardlösung zugefügt werden kann.

Mit der Methode ist damit eine gleichzeitige Quantifizierung verschiedener AS-Infusionslösungsformulierungen möglich, die sich bei gleicher Matrix in der Konzentration an AS unterscheiden. Beispielsweise seien hier die Formulierungen „Aminoplasmal[®] E 5% / 10% / 15%“ genannt, deren AS-Gehalte mit der entwickelten validierten Methode erfassbar sind.

Die Probenvorbereitung beschränkt sich dabei auf den Zusatz der IS-Formulierung und einen Verdünnungsschritt. Die Quantifizierung erfolgt über eine 5-Punkt-Kalibriergerade, die aus einer AS- und IS-Standardmischung, nach Zusatz der einfach herzustellenden Elektrolyt-Matrix, bestimmt wird.

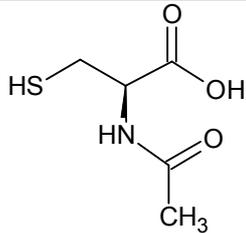
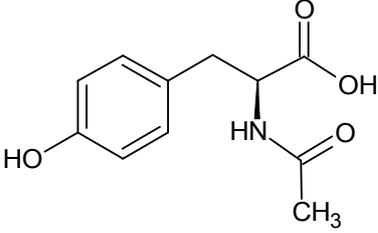
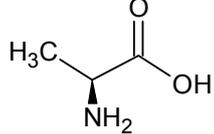
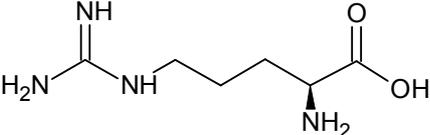
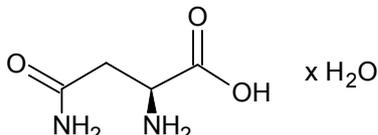
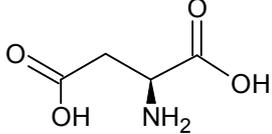
Die Analysenzeit der HPLC-MS-Methode beträgt inkl. Equilibrierungszeit 35 min und ist damit deutlich kürzer als bei der nach wie vor allgemein gebräuchlichen Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung, bei der die Analysenzeit pro Probe üblicherweise ~ 120 min beträgt.

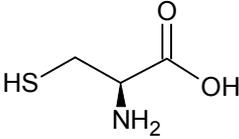
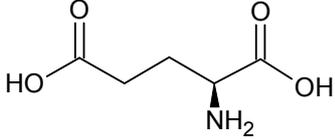
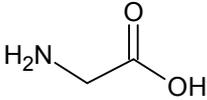
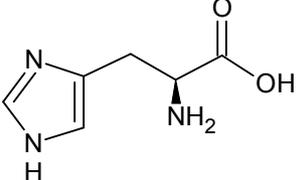
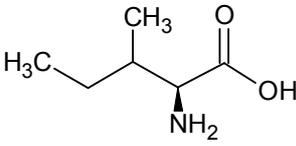
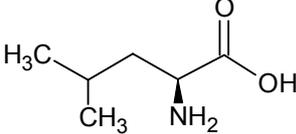
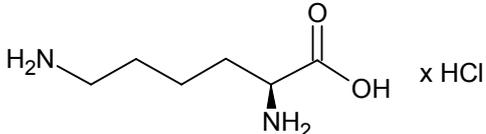
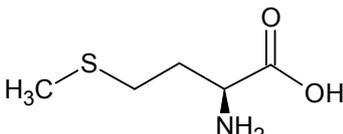
C. Strukturmatrix

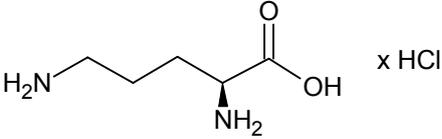
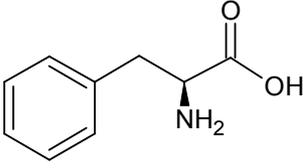
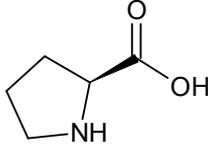
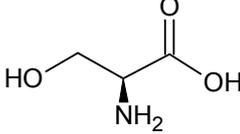
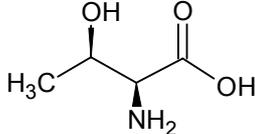
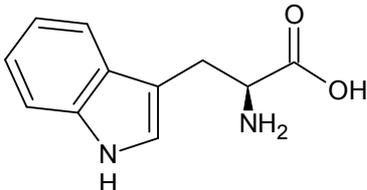
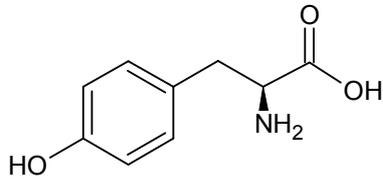
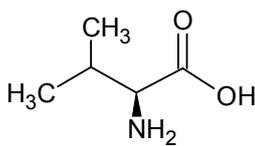
1 Aminosäuren

In Tabelle C 1-1 sind die Strukturformeln der in vorliegender Arbeit verwendeten Aminosäuren zusammengefasst.

Tabelle C 1-1: Übersicht über die in vorliegender Arbeit verwendeten Aminosäuren.

Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
L-N-Acetyl-Cystein	NAcCys	
L-N-Acetyl-Tyrosin	NAcTyr	
L-Alanin	Ala	
L-Arginin	Arg	
L-Asparagin Monohydrat	Asn	
L-Asparaginsäure	Asp	

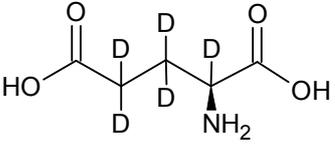
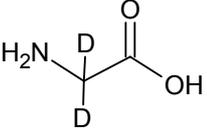
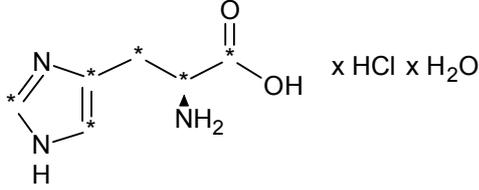
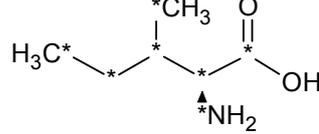
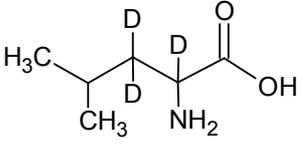
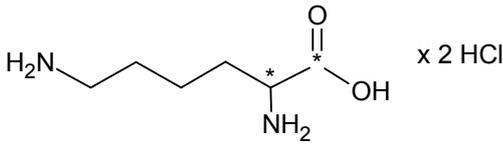
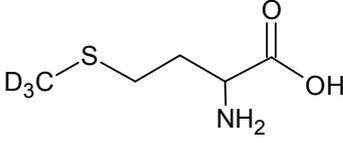
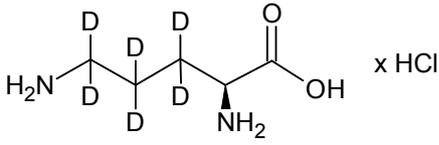
Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
L-Cystein	Cys	
L-Glutaminsäure	Glu	
Glycin	Gly	
L-Histidin	His	
L-Isoleucin	Ile	
L-Leucin	Leu	
L-Lysin Hydrochlorid	Lys	
L-Methionin	Met	

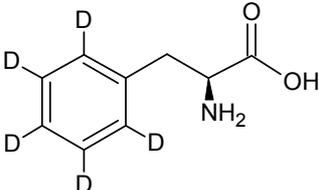
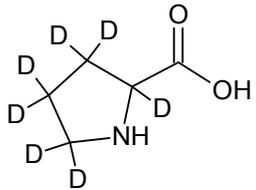
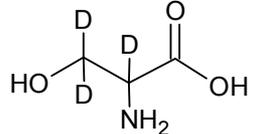
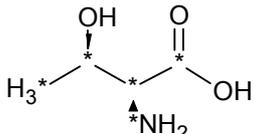
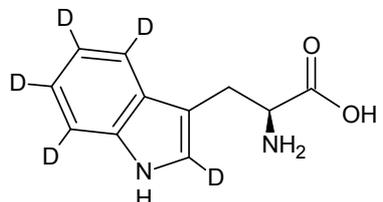
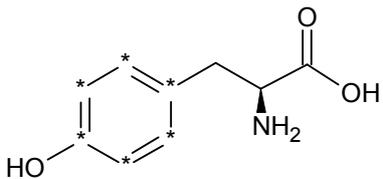
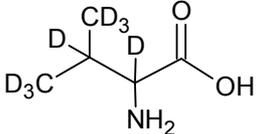
Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
L-Ornithin Hydrochlorid	Orn	 x HCl
L-Phenylalanin	Phe	
L-Prolin	Pro	
L-Serin	Ser	
L-Threonin	Thr	
L-Tryptophan	Trp	
L-Tyrosin	Tyr	
L-Valin	Val	

In Tabelle C 1-2 sind die Strukturformeln der in vorliegender Arbeit verwendeten isotoopenmarkierten Referenz-Aminosäuren zusammengefasst. Ein Sternchen (*) steht dabei für das ^{13}C -Isotop des Kohlenstoffs bzw. das ^{15}N -Isotop des Stickstoffs.

Tabelle C 1-2: Übersicht über die in vorliegender Arbeit verwendeten isotoopenmarkierten Referenz-Aminosäuren. Ein Sternchen (*) determiniert das ^{13}C -Isotop des Kohlenstoffs bzw. das ^{15}N -Isotop des Stickstoffs.

isotoopenmarkierte Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
<i>N</i> -Acetyl-DL-Cystein-3,3-D ₂	D ₂ -NACys	
DL-Alanin-3,3,3-D ₃	D ₃ -Ala	
L-Arginin- $^{13}\text{C}_6$ Hydrochlorid	$^{13}\text{C}_6$ -Arg	
L-Asparagin- $^{13}\text{C}_4$ Monohydrat	$^{13}\text{C}_4$ -Asn	
L-Asparaginsäure-2,3,3-D ₃	D ₃ -Asp	
DL-Cystein-3,3-D ₂	D ₂ -Cys	

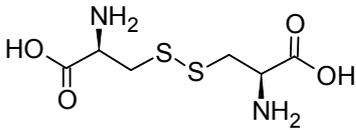
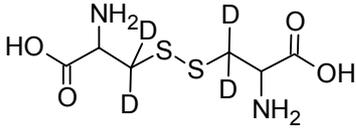
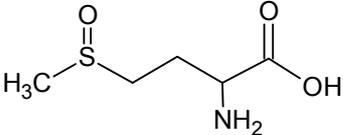
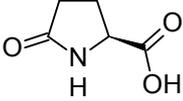
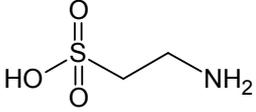
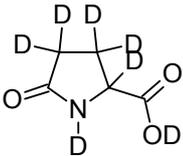
isotopenmarkierte Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
L-Glutaminsäure-2,3,3,4,4-D ₅	D ₅ -Glu	
Glycin-2-2-D ₂	D ₂ -Gly	
L-Histidin- ¹³ C ₆ Hydrochlorid Monohydrat	¹³ C ₆ -His	 x HCl x H ₂ O
L-Isoleucin- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	
DL-Leucin-2,3,3-D ₃	D ₃ -Leu	
DL-Lysin -1,2, ¹³ C ₂ Dihydrochlorid	¹³ C ₂ -Lys	 x 2 HCl
DL-Methionin-D ₃	D ₃ -Met	
L-Ornithin-3,3,4,4,5,5,-D ₆ Hydrochlorid	D ₆ -Orn	 x HCl

isotopenmarkierte Aminosäure	Abkürzung	Strukturformel
L-Phenylalanin-D ₅ (Phenyl-D ₅)	D ₅ -Phe	
DL-Prolin-2,3,3,4,4,5,5,-D ₇	D ₇ -Pro	
DL-Serin-2,3,3-D ₃	D ₃ -Ser	
L-Threonin- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N	¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	
L-Tryptophan-D ₅ (Indol-D ₅)	D ₅ -Trp	
L-Tyrosin- ¹³ C ₆ (Phenyl- ¹³ C ₆)	¹³ C ₆ -Tyr	
DL-Valin-2,3,4,4,4,5,5,5-D ₈	D ₈ -Val	

2 weitere Substanzen

In Tabelle C 2-1 sind die Strukturformeln weiterer, in vorliegender Arbeit verwendeter Substanzen dargestellt.

Tabelle C 2-1: Übersicht über weitere, in vorliegender Arbeit verwendete Substanzen.

Substanz	Abkürzung	Strukturformel
L-Cystin	(Cys) ₂	
DL-Cystin-3,3,3',3',-D ₄	D ₄ -(Cys) ₂	
DL-Methioninsulfoxid	MSO	
L-Pyroglutaminsäure	Pyr	
Taurin	Tau	
DL-Pyroglutaminsäure-D ₇	D ₇ -Pyr	

D. Material und Methoden

1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Aminosäuren mittels RP-HPLC-MS/MS

1.1 Substanzen, Chemikalien und Geräte

1.1.1 Aminosäuren

Zur Methodenentwicklung wurden als Aminosäure-Referenzen Substanzen der Firmen Fluka (Deisenhofen, Deutschland) und Sigma (Steinheim, Deutschland) in der höchstmöglichen Reinheit verwendet.

In Tabelle D 1-1 sind die verwendeten Aminosäuren, ihre Reinheit und Hersteller zusammengefasst.

1.1.2 Stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren

Als interne Standards (IS) wurden stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren-Referenzen verwendet, die von den Firmen Isotec[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA) bezogen wurden.

Tabelle D 1-2 gibt einen Überblick über die stabil-isotopenmarkierten Aminosäuren, ihre Isotopenbereicherung sowie die Hersteller.

Bei der Auswahl der IS wurde darauf geachtet, dass sich die Isotopenmarkierung nicht direkt an funktionellen Gruppen befindet, um eventuell möglichen Austauschreaktionen in Lösung vorzubeugen.

Um mögliche Austauschreaktionen in Lösung zu ermitteln, wurden Stabilitätsstudien der IS in wässriger Lösung bei 4°C Lagertemperatur durchgeführt. Dabei zeigten sich die 20 IS über den Zeitraum von sechs Monaten stabil.

Für *N*AcCys und *N*AcTyr waren keine isotopenmarkierte Referenzen käuflich zu erwerben. D_2 -*N*AcCys wurde aus isotopenmarkiertem Cystein (D_2 -Cys) synthetisiert (siehe Abschnitt D 1.1.5). *N*AcTyr konnte nicht in der geforderten Reinheit isotopenmarkiert hergestellt werden, so dass für diese AS die entsprechende isotopenmarkierte Referenz-AS fehlt.

Tabelle D 1-1: Verwendete Aminosäure-Referenzen

Aminosäure	Abkürzung	Reinheit	Hersteller
<i>N</i> -Acetyl-L-Cystein	<i>N</i> AcCys	puriss., $\geq 99\%$	Fluka
<i>N</i> -Acetyl-L-Tyrosin	<i>N</i> AcTyr	BioChemika $\geq 98\%$	Fluka
L-Alanin	Ala	BioUltra $> 99.5\%$	Fluka
L-Arginin	Arg	BioUltra $\geq 99.5\%$	Fluka
L-Asparagin Monohydrat	Asn	BioUltra, $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Asparaginsäure	Asp	BioUltra $\geq 99.5\%$	Fluka
L-Cystein	Cys	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Glutaminsäure	Glu	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
Glycin	Gly	BioUltra $\geq 99.5\%$	Fluka
L-Histidin	His	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Isoleucin	Ile	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Leucin	Leu	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Lysin Hydrochlorid	Lys	BioUltra $\geq 99.5\%$	Fluka
L-Methionin	Met	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Ornithin Hydrochlorid	Orn	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Phenylalanin	Phe	BioUltra $\geq 99\%$	Fluka
L-Prolin	Pro	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Serin	Ser	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Threonin	Thr	BioUltra $\geq 99\%$	Fluka
L-Tryptophan	Trp	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma
L-Tyrosin	Tyr	BioUltra $\geq 99\%$	Sigma
L-Valin	Val	BioUltra $\geq 99.5\%$	Sigma

Tabelle D 1-2: Verwendete isotoopenmarkierte Aminosäuren (IS)

isotoopenmarkierte Aminosäure	Abkürzung	Isotoopenbereicherung	Hersteller
<i>N</i> -Acetyl-DL-Cystein-3,3-D ₂	D ₂ -NACys	-	Synthese
DL-Alanin-3,3,3-D ₃	D ₃ -Ala	99.5%	Isotec®
L-Arginin- ¹³ C ₆ Hydrochlorid	¹³ C ₆ -Arg	98%	Isotec®
L-Asparagin- ¹³ C ₄ Monohydrat	¹³ C ₄ -Asn	98%	Isotec®
L-Asparaginsäure-2,3,3-D ₃	D ₃ -Asp	98%	Isotec®
DL-Cystein-3,3-D ₂	D ₂ -Cys	98%	CIL
L-Glutaminsäure-2,3,3,4,4-D ₅	D ₅ -Glu	98%	Isotec®
Glycin-2-2-D ₂	D ₂ -Gly	98%	Isotec®
L-Histidin- ¹³ C ₆ Hydrochlorid Monohydrat	¹³ C ₆ -His	98%	CIL
L-Isoleucin- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	98%	Isotec®
DL-Leucin-2,3,3-D ₃	D ₃ -Leu	98%	Isotec®
DL-Lysin -1,2, ¹³ C ₂ Dihydrochlorid	¹³ C ₂ -Lys	99%	Isotec®
DL-Methionin-D ₃ (Methyl-D ₃)	D ₃ -Met	98%	Isotec®
L-Ornithin-3,3,4,4,5,5,-D ₆ Hydrochlorid	D ₆ -Orn	98%	CIL
L-Phenylalanin-D ₅ (Phenyl-D ₅)	D ₅ -Phe	98%	Isotec®
DL-Prolin-2,3,3,4,4,5,5,-D ₇	D ₇ -Pro	97-98%	CIL
DL-Serin-2,3,3-D ₃	D ₃ -Ser	98%	CIL
L-Threonin- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N	¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	98%	Isotec®
L-Tryptophan-D ₅ (Indol-D ₅)	D ₅ -Trp	98%	CIL
L-Tyrosin- ¹³ C ₆ (Phenyl- ¹³ C ₆)	¹³ C ₆ -Tyr	99%	Isotec®
DL-Valin-2,3,4,4,4,5,5,5,-D ₈	D ₈ -Val	98%	Isotec®

1.1.3 Weitere Substanzen zur Analyse

Neben den oben genannten Aminosäuren sowie ihren entsprechenden IS waren einige weitere Substanzen Gegenstand der Untersuchungen. In Tabelle D 1-3 sind diese Analyten, ihre Reinheit bzw. im Falle von isotoopenmarkierten Substanzen ihre Isotoopenbereicherung, sowie ihre Hersteller zusammengefasst.

Die unmarkierten Referenzen stammen von den Firmen Fluka (Deisenhofen, Deutschland) und Sigma (Steinheim, Deutschland), die isotoopenmarkierten Substanzen von den Firmen Isotec® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und CIL (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA).

Tabelle D 1-3: Weitere Substanzen zur Analyse

Substanz	Abkürzung	Reinheit bzw. Isotopenmarkierung	Hersteller
L-Cystin	(Cys) ₂	BioUltra ≥ 99%	Sigma
DL-Cystin-3,3,3,3-D ₄	D ₄ -(Cys) ₂	98%	CIL
DL-Methioninsulfoxid	MSO	purum ≥ 99%	Sigma
L-Pyroglutaminsäure	Pyr	puriss. ≥ 99%	Sigma
DL-Pyroglutaminsäure-D ₇	D ₇ -Pyr	97%	Isotec®

1.1.4 Probenlösung Infusionslösung

Als Probenlösung kam eine Probe der Infusionslösung „Aminoplasma N 10% E“ der Firma B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) zum Einsatz. Über deren Zusammensetzung informiert Tabelle D 1-4.

Tabelle D 1-4: Zusammensetzung der Infusionslösung „Aminoplasma N 10% E“.

Aminosäure	Konzentration [g/L]	Konzentration [mmol/L]	1:500-Verdünnung Konzentration [µmol/L]
<i>N</i> -Acetyl-L-Cystein	0.2	1.23	2.45
<i>N</i> -Acetyl-L-Tyrosin	-	-	-
L-Alanin	10.5	117.86	235.7
L-Arginin	11.5	66.02	132.0
L-Asparagin Monohydrat	-	-	-
L-Asparaminsäure	5.6	42.07	84.2
L-Glutaminsäure	7.2	48.94	97.9
Glycin	12.0	159.85	319.7
L-Histidin	3.0	19.34	38.7
L-Isoleucin	5.00	38.12	76.2
L-Leucin	8.90	67.85	135.7
L-Lysin Hydrochlorid	8.56	44.20	88.4
L-Methionin	4.40	29.49	59.0
L-Ornithin Hydrochlorid	-	-	-
L-Phenylalanin	4.70	28.45	56.9
L-Prolin	5.50	47.77	95.5
L-Serin	2.30	21.89	43.8
L-Threonin	4.20	35.26	70.5
L-Tryptophan	1.60	7.83	15.7
L-Tyrosin	0.40	2.21	4.4
L-Valin	6.20	52.92	105.8

1.1.5 Synthese von *N*-Acetyl-Cystein

Zur Darstellung von DL-*N*-Acetyl-Cystein-3,3-D₂ aus DL-Cystein-3,3-D₂ wurde die Methode von Chen *et al.* (2001) modifiziert. Durch mehrfache Ansätze mit unmarkierter Aminosäure konnte die Methode optimiert und auf die notwendige kleinere Ansatzgröße übertragen werden.

Vorschrift

180 mg (1.49 mmol) DL-Cystein-3,3-D₂ gelöst in 100 mL Acetonitril/Phosphatpuffer pH 6 (1:3 v/v) wurden unter N₂-Atmosphäre 24 - 48 h refluxiert. Die resultierende, klare Lösung wurde nach Abkühlung auf Raumtemperatur im Eisbad mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 eingestellt und anschließend 5 - 7 h bei 0°C gerührt. Nach Extraktion des Gemisches mit Ethylacetat und Trocknung der organischen Phase mit Na₂SO₄ wurde das Solvens im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation zur Entfernung noch vorhandener Lösemittelreste-Reste, wurde DL-*N*-Acetyl-Cysteine-3,3-D₂ (173 mg, 1.06 mmol, Ausbeute: 71%) als weißes, kristallines Pulver erhalten (Deuterierungsgrad ca. 93%). Die Charakterisierung erfolgte mittels LC-MS/MS und ¹H-NMR und Vergleich mit Literaturdaten (Glass *et al.* 1989).

Charakterisierung:

LC/MS: [M+H]⁺ *m/z* 166
[M-H]⁻ *m/z* 164

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 12.50 (br, 1H, COOH), 6.37 (br, 1H, NH), 4.86 (d, ³*J*=4.0 Hz, CH-NH), 3.08 – 3.10 (m, 0.09H, CHD), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.24 (br, 1H, SH) ppm.

br = verbreitert, s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett

Gerät: 400 MHz, Bruker Avance 400, Bruker BioSpin (Rheinstetten, Deutschland)

1.1.6 Chemikalien

Tabelle D 1-5 zeigt weitere Chemikalien, die zur IP-RP-HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung verwendet wurden.

Tabelle D 1-5: Chemikalien zur Methodenentwicklung

Acetonitril	Acetonitril LiChrosolv [®] , hypergrade für LC/MS (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Wasser	Wasser LiChrosolv [®] für die Chromatographie (Merck, Darmstadt, Deutschland)
TDFHA	Tridecafluorheptansäure, 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

1.1.7 Geräte

Die in Tabelle D 1-6 aufgeführten Geräte wurden zur Herstellung von Referenzlösungen und Fließmitteln verwendet.

Tabelle D 1-6: Verwendete Geräte

Analysenwaage	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
Waage	BP210 S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Ultraschallbad	TranssonicT460, (Elma [®] , Singen, Deutschland)
pH-Meter	pH 526 (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
Magnetrührer	IKAMAG [®] RH (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research 100 (10-100 µL) und 1000 (100-1000 µL) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Die IP-RP-HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung wurde mit dem in Tabelle D 1-7 spezifizierten HPLC-MS/MS-System durchgeführt.

Tabelle D 1-7: HPLC-MS-System 1

Gerät	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Elektrospray Ionisations-Interface (ESI)
Pumpe	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)
Spritzenpumpe	Spritzenpumpe Model 980532 (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)
Autosampler	Spark Holland Triathlon mit automatischer Injektion (Emmen, Niederlande)
ESI-Kapillare	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W, Folsom)
Ionenquelle	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Ionisierungsmodus	positiv
Kapillartemperatur	200°C
Kapillarspannung	3.2 kV
Sheathgas	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Auxiliary Gas	Stickstoff 5.0 (10 Skalenteile)
Kollisionsgas	Argon 5.0
Kollisionsgasdruck	2.0 mTorr
Kollisionsenergie	10eV bis 35eV
Multiplierspannung	1450 V für ESI-MS, 1750 V für ESI-MS/MS
Steuerung und Datenverarbeitung	XCalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich)

1.2 Fragmentierungsstudien

1.2.1 Prinzip

Lösungen der einzelnen zu untersuchenden Substanzen wurden mittels Spritzenpumpe direkt in das Massenspektrometer infundiert. Zunächst wurde im Fullscan-Modus das Precursorion $[M+H]^+$ ermittelt. Anschließend erfolgte nach Einstellen des spezifischen Precursorions in Q_1 und CID („collision induced dissociation“) mit Argon in der Stoßkammer (Q_2) die Bestimmung der Hauptproduktion sowie weiterer charakteristischer Produktionen im Q_3 .

1.2.2 Durchführung

Von den einzelnen Analyten wurden je 5 mM Stammlösungen in Wasser hergestellt und bei -18°C im Gefrierschrank gelagert. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Tyr

in Wasser konnte für diese AS nur eine 1 mM Stammlösung hergestellt werden. Die Stammlösungen wurden entsprechend verdünnt und mit TDFHA-Lösung versetzt, so dass sich eine Untersuchungskonzentration von 0.5 mM Analyt in 0.25 mM wässriger TDFHA-Lösung ergab. Diese Untersuchungslösungen wurden nacheinander mittels Spritzenpumpe bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das Massenspektrometer (TSQ 7000, Tabelle D 1-7) infundiert.

Alle verwendeten Referenzen, Chemikalien und Geräte sind in Abschnitt D 1.1 aufgeführt.

Im Fullscan-Modus (ESI_{pos} , m/z 50 – 300) wurde zunächst das Precursorion $[\text{M}+\text{H}]^+$ durch Anzeige des Massenspektrums ermittelt. Anschließend wurde die Betriebsart auf Produktionsanalyse umgestellt. In Quadrupol 1 (Q_1) wurde das entsprechende Produktion selektiert und in Q_2 mit Argon bei einem Stoßgasdruck von 2 mTorr fragmentiert. Die Stoßenergie wurde dabei in -5 eV-Schritten von -10 eV bis -35 eV erhöht. Zu Bestimmung der optimalen Fragmentierungsenergie wurden die bei unterschiedlichen Stoßenergien erhaltenen Produktionen-Spektren verglichen. Als optimal wurde diejenige Energie gewählt, bei welcher das Hauptproduktion die höchste Intensität aufweist. Die weiteren Produktionen wurden bei der entsprechenden optimalen Fragmentierungsenergie bestimmt, wobei nur diejenigen Produktionen aufgenommen wurden, welche mindestens 5% der Intensität des Basispeaks aufwiesen.

1.3 IP-HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung

1.3.1 Optimierung der Methode von Piraud *et al.* (2005b)

In verschiedenen Vorversuchen wurde die von Piraud *et al.* (2005b) publizierte IP-RP-HPLC- ESI_{pos} -MS/MS-Methode für die vorliegende Aufgabenstellung am HPLC-MS-System 1 (Tabelle D 1-7, S.177) optimiert.

Beim HPLC-Gradienten erwies sich ein fünfminütiger ACN-Spülschritt am Ende als geeignet, um die Akkumulation von TDFHA auf der Säule und die damit verbundenen Retentionszeitverschiebungen gering zu halten.

Die MS/MS-Methode wurde anhand der Ergebnisse der Fragmentierungsstudien der AS (Abschnitt D 1.2) erstellt. Für Ile wurde neben dem Hauptproduktion m/z 86 parallel auch der spezifische Übergang m/z 132 \rightarrow m/z 69 gemessen, um Leu und Ile unterscheiden und so das chromatographische Verhalten beider AS besser studieren zu können.

Optimiert wurden weiterhin die Parameter Scanzeit („scan time“) sowie die Peakbreite (width). Als optimal erwiesen sich eine Scanzeit von 0.1 s (optimierter Bereich 0.05 s bis 0.3 s) sowie eine Peakbreite von 0.6 u (optimierter Bereich 0.6 u bis 1 u).

Ebenfalls geprüft wurde die Möglichkeit, den Lauf in SRM-Segmente (Elutionsgruppen) einzuteilen, um so die Anzahl der Scan-Events pro Zeiteinheit zu verringern und damit eine erhöhte Empfindlichkeit zu erreichen. Dies war insofern von Bedeutung als in der späteren Methode 21 AS sowie die entsprechende Anzahl an IS, insgesamt also 42 Analyten, in einem HPLC-MS/MS-Lauf erfasst werden sollen.

In Vorversuchen konnte eine Einteilung des HPLC-MS/MS-Methode in drei Segmente (Elutionsgruppen) als geeignet ermittelt werden.

Im Bereich von 0-4 min wurden die spezifischen Übergänge von neun AS (NACys, Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser und Thr) gemessen. Von 4-11 min eluierten sieben AS (NACtyr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr). Zuletzt wurden im Bereich von 11-15 min Arg, His, Lys, Orn, Trp (fünf AS) detektiert.

Die Bedingungen zur optimierten HPLC-Methode sind in Tabelle D 1-8 (S. 180) zusammengefasst.

Die MS/MS-Methode wurde anhand der Ergebnisse der Fragmentierungsstudien der Analyten (Abschnitt D 1.2) erstellt. Für Ile wurde neben dem Hauptproduktion m/z 86 parallel auch der spezifische Übergang m/z 132 \rightarrow m/z 69 gemessen, um Leu und Ile unterscheiden und so das chromatographische Verhalten beider AS besser studieren zu können.

Die Bedingungen zur SRM-Methode sind in Tabelle D 1-9 (S.180) dargestellt.

Tabelle D 1-8: HPLC-Methode 1

Trennsäule	QS UptiSphere BP 2, 120 Å, 3 µm, 50mm x 2 mm (Interchim, Montluçon, Frankreich)
Säulentemperatur	26°C
Fließmittel	A: 0.5 mM TDFHA in H ₂ O, B: Acetonitril
Fluss	200 µL/min
Gradient	0-1 min: von 2% B auf 15% B, 1-6 min: 15% B halten, 6-9 min: auf 25%, 9-15 min: 25% B halten, 15-16 min: auf 100% B, 16-20 min: 100% B (Spülschritt), 20-21 min: auf 2% B, 15 min
Equilibrierzeit	15 min
Spülschritte	nach 12-14 Läufen: 1 h mit 100% ACN; nach 24-36 h: 16 h mit MeOH/H ₂ O (85:15 v/v) bei 60 µL/min
Injektionsvolumen	20 µL

Tabelle D 1-9: Bedingungen zur SRM-Methode AS 1

Segment	Aminosäure	[M+H] ⁺	spezifisches Produktion	CE (eV)	Scanzeit (s)	width
Segment 1 0 – 4 min	NACys	164.0	121.9	-15	0.1	0.6
	Ala	89.9	43.9	-15	0.1	0.6
	Asn	132.8	73.9	-20	0.1	0.6
	Asp	133.9	73.9	-20	0.1	0.6
	Glu	147.9	83.9	-20	0.1	0.6
	Gly	76.1	30.1	-35	0.1	0.6
	Pro	116.0	70.0	-20	0.1	0.6
	Ser	106.0	60.0	-15	0.1	0.6
	Thr	120.1	74.0	-15	0.1	0.6
Segment 2 4 – 11 min	NACtyr	224.0	136.0	-20	0.1	0.6
	Ile 1	132.0	86.0	-15	0.1	0.6
	Ile 2	132.0	69.0	-20	0.1	0.6
	Leu	132.0	86.0	-15	0.1	0.6
	Met	150.0	103.9	-15	0.1	0.6
	Phe	166.0	120.0	-15	0.1	0.6
	Tyr	182.1	136.1	-20	0.1	0.6
	Val	118.0	72.0	-15	0.1	0.6
Segment 3 11 – 15 min	Arg	174.9	69.9	-20	0.1	0.6
	His	156.0	109.9	-20	0.1	0.6
	Lys	146.9	83.9	-20	0.1	0.6
	Orn	132.9	69.9	-20	0.1	0.6
	Trp	204.9	187.9	-15	0.1	0.6

1.3.2 Untersuchungen mit der optimierten IP-RP-HPLC-MS/MS-Methode

Aus den AS-Stammlösungen (5 mM bzw. 1 mM für Tyr in Wasser, Lagerung im Gefrierschrank bei -18°C) wurde zunächst eine AS-Standard-Mischung hergestellt, die alle 21 AS in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ enthielt.

In gleicher Weise wurde aus den IS-Stammlösungen (5 mM bzw. 1 mM für $^{13}\text{C}_6$ -Tyr in Wasser, Lagerung im Gefrierschrank bei -18°C) eine IS-Standard-Mischung hergestellt, die 19 IS (D_2 -NACys lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht synthetisiert vor) ebenfalls in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ enthielt.

Aus diesen Standard-Mischungen wurden die entsprechenden Untersuchungslösungen durch geeignete Verdünnung mit Lichrosolv[®]-Wasser hergestellt.

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen der Infusionslösungen wurde eine Probe der Infusionslösung (Tabelle D 1-4, S.174), ggf. nach Zusatz entsprechender Mengen der IS-Standard-Mischung, mit Lichrosolv[®]-Wasser verdünnt. Die Endkonzentrationen betragen, bezogen auf die Originallösung, 1:1000, 1:500 und 1:250.

Die Auswahl der Verdünnungen der Infusionslösung richtete sich nach der Konzentration von NACys, da dieses in der Analysenlösung in der geringsten Konzentration vorhanden ist. Wie aus Vorversuchen mit AS-Referenzen bekannt war, ließen sich AS im SRM-Modus unter vorliegenden Bedingungen bis zu einer Konzentration von ca. 1 $\mu\text{mol/L}$ detektieren. Daher wurde eine 1:1000-Verdünnung als höchste Verdünnung hergestellt, da sich hier eine Minimalkonzentration von 1.23 $\mu\text{mol/L}$ für ACC ergab, die sich noch erfassen lassen sollte. Die beiden weiteren Verdünnungen dienen zur Bestimmung einer idealen Verdünnung sowie zur Gewinnung von Informationen über den möglichen Bestimmungsbereich bzw. über evtl. auftretende Konzentrationsprobleme.

Die jeweiligen Untersuchungslösungen wurden anschließend mit der optimierten IP-RP-HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (Abschnitt D 1.3.1) untersucht. Sofern AS bzw. Infusionslösung und IS gleichzeitig analysiert wurden, kam die in Tabelle D 1-10 aufgeführte SRM-Methode zum Einsatz.

Tabelle D 1-10: Bedingungen der SRM-Methode AS und IS 1

Segment	Aminosäure	[M+H] ⁺	spezifisches Produktion	CE (eV)	Scanzeit (s)	width (u)
Segment 1 0 – 4 min	NAcCys	164.0	121.9	-15	0.1	0.6
	Ala	89.9	43.9	-15	0.1	0.6
	D ₃ -Ala	93.1	47.1	-15	0.1	0.6
	Asn	132.8	73.9	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₄ -Asn	137.1	76.0	-20	0.1	0.6
	Asp	133.9	73.9	-20	0.1	0.6
	D ₃ -Asp	137.1	75.0	-20	0.1	0.6
	Glu	147.9	83.9	-20	0.1	0.6
	D ₅ -Glu	153.2	88.1	-20	0.1	0.6
	Gly	76.1	30.1	-35	0.1	0.6
	D ₂ -Gly	78.0	32.1	-25	0.1	0.6
	Pro	116.0	70.0	-20	0.1	0.6
	D ₇ -Pro	123.2	77.4	-20	0.1	0.6
	Ser	106.0	60.0	-15	0.1	0.6
	D ₃ -Ser	109.1	63.1	-20	0.1	0.6
Thr	120.1	74.0	-15	0.1	0.6	
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	125.1	78.1	-15	0.1	0.6	
Segment 2 4 – 11 min	NAcTyr	224.0	136.0	-20	0.1	0.6
	Ile 1	132.0	86.0	-15	0.1	0.6
	Ile 2	132.0	69.0	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	139.2	92.1	-15	0.1	0.6
	Leu	132.0	86.0	-15	0.1	0.6
	D ₃ -Leu	135.1	89.1	-15	0.1	0.6
	Met	150.0	103.9	-15	0.1	0.6
	D ₃ -Met	153.1	107.1	-15	0.1	0.6
	Phe	166.0	120.0	-15	0.1	0.6
	D ₅ -Phe	171.1	125.1	-15	0.1	0.6
	Tyr	182.1	136.1	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₆ -Tyr	188.1	142.2	-15	0.1	0.6
	Val	118.0	72.0	-15	0.1	0.6
D ₈ -Val	126.2	80.2	-15	0.1	0.6	
Segment 3 11 – 15 min	Arg	174.9	69.9	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₆ -Arg	181.2	74.1	-25	0.1	0.6
	His	156.0	109.9	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₆ -His	162.1	115.1	-20	0.1	0.6
	Lys	146.9	83.9	-20	0.1	0.6
	¹³ C ₂ -Lys	149.1	85.1	-20	0.1	0.6
	Orn	132.9	69.9	-20	0.1	0.6
	D ₆ -Orn	139.2	76.1	-20	0.1	0.6
	Trp	204.9	187.9	-15	0.1	0.6
D ₅ -Trp	210.1	192.0	-15	0.1	0.6	

2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Aminosäuren mittels Hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC)

2.1 Substanzen, Chemikalien und Geräte

2.1.1 Aminosäuren

Zur Methodenentwicklung wurden als Aminosäure-Referenzen die unter Abschnitt D 1.1.1 genannten AS verwendet.

Zur Übertragung der entwickelten Methode auf die Infusionslösungen kamen als Aminosäuren-Referenzen die in Tabelle D 2-1 genannten Produktionsrohstoffe der B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) in Arzneibuchqualität zum Einsatz.

Welche AS-Referenzen verwendet wurden ist bei der jeweiligen Beschreibung der Durchführung der einzelnen Experimente aufgeführt.

Tabelle D 2-1: Aminosäure-Referenzen (Produktionsrohstoffe der Firma B. Braun, Melsungen) im Master-Mix.

Aminosäure			
Ala	His	NAcTyr	Thr
Arg	Ile	Orn * HCl	Trp
Asn * H ₂ O	Leu	Phe	Tyr
Asp	Lys * HCl	Pro	Val
Glu	Met	Ser	
Gly	NAcCys	Tau	

2.1.2 Stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren

Als interne Standards wurden die unter Abschnitt D 1.1.2 aufgeführten stabil-isotopenmarkierte Aminosäuren-Referenzen verwendet.

2.1.3 Substanzen zur Herstellung der Matrix-Lösung

Als Bestandteile der Matrix-Lösung wurden Produktionsrohstoffe der B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) verwendet, welche in Tabelle D 2-2 zusammengefasst sind.

Tabelle D 2-2: Substanzen zur Herstellung der Matrix-Lösung

Substanz	Summenformel
Calciumchlorid Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Magnesiumacetat Tetrahydrat	$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
Kaliumacetat	CH_3COOK
Kaliumchlorid	KCl
Natriumchlorid	NaCl
Natriumhydroxid	NaOH
Citronensäure	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
Essigsäure	CH_3COOH

2.1.4 Chemikalien

Zur Herstellung der Fließmittel und Verdünnungslösungen wurden folgende Chemikalien verwendet:

Tabelle D 2-3: Chemikalien zur Herstellung von Fließmittel und Verdünnungslösungen.

Acetonitril	Acetonitril LiChrosolv [®] , hypergrade für LC/MS (Merck, Darmstadt)
Wasser	Aqua B. Braun Ecotainer [®] (B. Braun, Melsungen), Wasser LiChrosolv [®] für die Chromatographie (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumformiat	Ammoniumformiat-Lösung, BioUltra, 10 M in Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ammoniumacetat	Ammoniumacetat-Lösung, BioUltra, 5 M in Wasser (Fluka, Deisenhofen)
Ameisensäure	Ameisensäure puriss. p.a. für Massenspektrometrie (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.1.5 Geräte

Vorversuche zur Methodenentwicklung mittels HILIC wurden an der in Abschnitt D 1.1.7 (S.176) genannten LC-MS/MS-Anlage durchgeführt.

Alle weiteren Messungen zur Methodenoptimierung wurden an der in Tabelle D 2-4 aufgeführten Anlage unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle D 2-4: HPLC-MS-System 2

Gerät	Agilent Quadrupol Massendetektor G1946 MSD
Pumpe	Agilent 1100 Binary Pump
Autosampler	Agilent 1100 Thermostatted Autosampler G1329
Säulenofen	Agilent 1100 Column Thermostat
Probenthermostat	Agilent 1100 Sample Thermostat
Ionisation	AP-ESI positiv
Drying gas und Nebulizer	Stickstoff
Drying gas flow	12 l/min
Drying gas temperatur	350°C
Nebulizer	50 psig
Capillary voltage	3000 V
Peakwidth	0.1 min
Steuerung und Datenverarbeitung	HP ChemStation® LC/MSD Rev. A. 10.2 (Agilent, Dreieich, Deutschland)

Zur Herstellung von Stamm- und Untersuchungslösungen sowie von Fließmitteln kamen weiterhin die in Tabelle D 2-5 genannten Geräte zum Einsatz.

Tabelle D 2-5: Weitere Geräte

Analysenwaage	Analysenwaage XP205DR (Mettler, Toledo, Gießen, Deutschland)
Mikrowaage	Mikrowaage MC 5 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Ultraschallbad	VWR Ultraschallbad USC500D (VWR international, Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter	Metrohm pH-Meter 780 (Metrohm AG, Herisau, Schweiz)
Elektrode	Unitrode Pt 1000 (Metrohm AG, Herisau, Schweiz)
Pipetten	RAININ Pipet-Lite L100 (10-100µL), L300 (20-300µL), L1000 (100-1000µL) (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)

2.2 Allgemeine Studien zur Trennung von AS mittels HILIC-HPLC-MS/MS unter isokratischen Bedingungen

2.2.1 Fließmittelzusammensetzung – Variation des Wasser-Anteils

Zur Prüfung des Einflusses des Wasseranteils in der mobilen Phase wurde eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 $\mu\text{mol/L}$) in 75% ACN mittels HPLC-MS/MS untersucht.

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 1 (Tabelle D 1-7, S.177) im SRM-Modus durchgeführt.

In Vorversuchen wurde in Fragmentierungsstudien der AS festgestellt, dass unter HILIC-Bedingungen zwar keine unterschiedlichen Produktionen entstehen, allerdings teils Anpassungen der spezifischen Kollisionsenergien notwendig sind. Demzufolge wurde die SRM-Methode modifiziert (SRM-Methode AS 2, Tabelle D 2-7, S.187).

Für Ile wird zur Unterscheidung von Leu erneut der spezifische Übergang m/z 132 \rightarrow m/z 69 parallel detektiert.

Die HPLC-Methoden fasst Tabelle D 2-6 zusammen.

Tabelle D 2-6: HPLC-Methoden 2

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC, 3.5 μm , 200 \AA , 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Fließmittel	A: 5 mM NH_4Ac in H_2O (pH 6.8) B: Acetonitril
Fluss	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
isokratische Trennung	1.) 20% FM A, 80% FM B 2.) 50% FM A, 50% FM B
Equilibrierzeit	30 min vor dem ersten Lauf
Injektionsvolumen	5 μL

Tabelle D 2-7: Bedingungen zur SRM-Methode AS 2

Aminosäure	[M+H] ⁺	spezifisches Produktion	CE (eV)	Scanzeit (s)	width (u)
Ala	90.1	44.1	-15	0.1	0.6
Arg	175.0	70.2	-20	0.1	0.6
Asn	133.1	74.0	-20	0.1	0.6
Asp	134.0	74.0	-20	0.1	0.6
Glu	148.0	84.0	-20	0.1	0.6
Gly	76.0	30.2	-35	0.1	0.6
His	156.0	110.1	-20	0.1	0.6
Ile 1	132.0	86.1	-15	0.1	0.6
Ile 2	132.0	69.0	-25	0.1	0.6
Leu	132.9	86.1	-15	0.1	0.6
Lys	146.9	84.1	-20	0.1	0.6
Met	150.0	104.0	-15	0.1	0.6
NAcCys	164.0	122.0	-15	0.1	0.6
NAcTyr	224.0	136.0	-20	0.1	0.6
Orn	133.1	70.1	-20	0.1	0.6
Phe	166.2	120.0	-15	0.1	0.6
Pro	116.1	70.2	-20	0.1	0.6
Ser	106.0	60.1	-15	0.1	0.6
Thr	120.0	74.1	-15	0.1	0.6
Trp	204.9	187.9	-15	0.1	0.6
Tyr	182.1	136.1	-20	0.1	0.6
Val	118.0	72.1	-15	0.1	0.6

2.2.2 Einfluss des pH-Werts

Zur Prüfung des Einflusses des pH-Wertes der mobilen Phase wurde eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L) in 75% ACN mittels HPLC-MS/MS an einer pH-stabilen ZIC[®]-pHILIC-Säule untersucht.

Der pH-Wert des wässrigen Anteils der mobilen Phase wurde in Schritten von 0.5 pH-Einheiten (pH 2.5 bis 9.5) variiert. Die Einstellung erfolgte mit Ameisensäure bzw. Ammoniak.

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 1 (Tabelle D 1-7, S.177) im SRM-Modus (SRM-Methode 2, Tabelle D 2-7) durchgeführt. Die HPLC-Methoden fasst Tabelle D 2-8 zusammen.

Tabelle D 2-8: HPLC-Methoden 3

Trennsäule	ZIC [®] -pHILIC, 5 µm, 200 Å, 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Fließmittel	A: 55 mM NH ₄ Ac in H ₂ O (pH 2.5 bis 9.5) B: Acetonitril
Fluss	200 µL/min
isokratische Trennung	30% FM A, 70% FM B
Equilibrierzeit	30 min vor dem ersten Lauf
Injektionsvolumen	5 µL

2.2.3 Zusammenfassung der isokratischen Vortest

Zur Verdeutlichung der Möglichkeiten einer isokratischen Trennung wurde eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L) in 75% ACN mittels HPLC-MS/MS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule mit den „optimierten“ Parametern untersucht. Der pH-Wert des wässrigen Anteils der mobilen Phase wurde auf pH 3eingestellt, die Pufferkonzentration im wässrigen Anteil des Eluenten auf 55mM erhöht.

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 1 (Tabelle D 1-7, S.177) im SRM-Modus (SRM-Methode 2, Tabelle D 2-7, S.187) durchgeführt. Die HPLC-Methode fasst Tabelle D 2-9 zusammen.

Tabelle D 2-9: HPLC-Methode 4

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC, 3.5 µm, 200 Å, 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Fließmittel	A: 55 mM NH ₄ Ac in H ₂ O (pH 3) B: Acetonitril
Fluss	200 µL/min
isokratische Trennung	40% FM A, 60% FM B
Equilibrierzeit	30 min vor dem ersten Lauf
Injektionsvolumen	5 µL

2.3 Trennung von AS mittels HILIC-HPLC-MS/MS – Gradientenelution

Eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 25 µmol/L) in 75% ACN wurde mittels HPLC-MS/MS an einer pH-stabilen ZIC[®]-pHILIC-Säule untersucht. Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 1 (Tabelle D 1-7, S.177) im SRM-Modus (SRM-

Methode AS 2, Tabelle D 2-7, S.187) durchgeführt. Die HPLC-Methode fasst Tabelle D 2-8 zusammen.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde der Lauf in 6 SRM-Segmente eingeteilt. Segment 1: 0-7 min, Segment 2: 7-12.45min, Segment 3: 12.45-18min, Segment 4: 18-22.65min, Segment 5: 22.65-26.5min, Segment 6: 26.5-35min.

Tabelle D 2-10: HPLC-Methode 5

Trennsäule	ZIC [®] -pHILIC, 5 µm, 200 Å, 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Fließmittel	A: 55 mM NH ₄ Ac in H ₂ O (pH 2.5) B: Acetonitril
Fluss	100 µL/min
Gradient	0-13 min: 20% FM A, 13-30 min: auf 60% FM A, 30-35 min: 60% FM A
Equilibrierzeit	15 min
Injektionsvolumen	5 µL

2.4 HILIC-HPLC-MS-Methodenoptimierung

2.4.1 Einfluss der Pufferkonzentration der mobilen Phase

Zur Untersuchung des Einflusses der Pufferkonzentration auf die Trennung der AS wurde eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 50 µmol/L in 75% ACN) bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumformiat in der wässrigen Phase des Eluenten mittels HILIC-HPLC-MS analysiert.

Abweichend zu vorhergehenden Studien wurde für alle folgenden Untersuchungen eine Säule mit einer kleineren Porengröße (100 Å statt 200 Å) verwendet. Zusätzlich wurde eine Vorsäule angebracht.

Um die Anzahl an Scan-Events gering zu halten, wurde die Mischung jeweils in zwei aufeinanderfolgenden Läufen untersucht. In Lauf A (SIM-Table A) wurden neun Precursorionen (elf AS) gemessen, in Lauf B (SIM-Table B) wurden zehn Precursorionen (zehn AS) gemessen.

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 2 (Tabelle D 2-4, S.185) im SIM-Modus durchgeführt. Die HPLC-Methoden fasst Tabelle D 2-11 zusammen, die SIM-Tables sind in Tabelle D 2-12 gegeben.

Tabelle D 2-11: HPLC-Methoden 6

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC, 3.5 μ m, 100 Å , 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Vorsäule	ZIC [®] -HILIC PEEK Guard (5 μ m, 2.1 x 20 mm, 200 Å) (SeQuant AB, Umeå, Schweden)
Säulentemperatur	20°C
Fließmittel Versuchreihe 1	FM A ₁ : 20 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) FM A ₂ : 55 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) FM A ₃ : 100 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) FM B: ACN
Fließmittel Versuchreihe 2	FM A ₁ : 20 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) FM A ₂ : 40 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) FM B: 80% ACN, 20% 100 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3)
Fluss	200 μ L/min
Gradient Versuchsreihe 1	0-8 min: 20% FM A, 8-24 min: auf 60% FM A, 24-28 min: 60% FM A, 28-30 min: auf 20% FM A
Gradient Versuchsreihe 2	0-8 min: 0% FM A, 8-24 min: auf 50% FM A, 24-28 min: 50% FM A, 28-30 min: auf 0% FM A
Equilibrierzeit	13 min
Injektionsvolumen	5 μ L

Tabelle D 2-12: SIM-Table A und B

[M+H] ⁺	SIM-Table A		[M+H] ⁺	SIM-Table B	
	Aminosäure	Fragmentor (V)		Aminosäure	Fragmentor (V)
76	Gly	70	90	Ala	70
132	Ile, Leu	70	106	Ser	70
133	Asn, Orn	70	116	Pro	70
134	Asp	70	118	Val	70
147	Lys	70	120	Thr	70
148	Glu	70	150	Met	70
156	His	70	166	Phe	70
164	NAcCys	70	182	Tyr	70
175	Arg	70	205	Trp	70
			224	NAcTyr	70

2.4.2 Einfluss der Temperatur der stationären Phase

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur wurde eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 50 μ mol/L in 75% ACN) mittels HILIC-HPLC-MS in zwei aufeinanderfolgenden Läufen untersucht. In Lauf A (SIM-Table A) wurden neun Precursorionen (elf AS), in Lauf B (SIM-Table B) zehn Precursorionen (zehn AS) gemessen (SIM-Tables siehe Tabelle D 2-12).

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 2 (Tabelle D 2-4, S.185) mit den in Tabelle D 2-13 gegebenen HPLC-Methoden durchgeführt.

Tabelle D 2-13: HPLC-Methoden 7

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC, 3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Vorsäule	ZIC [®] -HILIC PEEK Guard (5 µm, 2.1 x 20 mm, 200 Å) (SeQuant AB, Umeå, Schweden)
Säulentemperatur	1.) 20°C 2.) 40°C 3.) Temperaturgradient: 20°C (0 - 8 min), auf 50°C (8 - 8.5 min), 50°C (8.5 bis 30 min)
Fließmittel	A: 40 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) B: 80% ACN, 20% 100 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3)
Fluss	200 µL/min
Gradient	0-8 min: 20% FM A, 8-24 min: auf 60% FM A, 24-28 min: 60% FM A, 28-30 min: auf 20% FM A
Equilibrierzeit	13 min
Injektionsvolumen	5 µL

2.4.3 Einfluss des organischen Anteils in der mobilen Phase - Variation des Fließmittelgradienten

In einer weiteren Studienreihe wurden verschieden steile Fließmittelgradienten hinsichtlich ihrer Eignung zur Trennung von AS an einer ZIC[®]-HILIC-Säule untersucht. Dafür wurde pro Gradient eine Mischung von 21 AS (Konzentration je 50 µmol/L in 75% ACN) mittels HILIC-HPLC-MS in zwei aufeinanderfolgenden Läufen untersucht. In Lauf A (SIM-Table A) wurden neun Precursorionen (elf AS), in Lauf B (SIM-Table B) zehn Precursorionen (zehn AS) gemessen (SIM-Tables siehe Tabelle D 2-12).

Neben einer Steigerung des wässrigen Anteils der mobilen Phase auf nur 30%, 35%, 40% und 50% statt wie in bisherigen Studien auf 60% bei einer Änderung von 2.5% pro Minuten wurden zudem Gradienten getestet, welche den organischen Anteil der mobilen Phase pro Minute um 3% bzw. 4% senkten.

Die Analysen wurden am HPLC-MS-System 2 (Tabelle D 2-4, S. 185) mit den in Tabelle D 2-14 gegebenen HPLC-Methoden durchgeführt.

Tabelle D 2-14: HPLC-Methoden 8

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC, 3.5 µm, 100 Å, 150 mm x 2.1 mm (SeQuant, Umeå, Schweden)
Vorsäule	ZIC [®] -HILIC PEEK Guard (5 µm, 2.1 x 20 mm, 200 Å) (SeQuant AB, Umeå, Schweden)
Säulentemperatur	20°C
Fließmittel	A: 40 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3) B: 80% ACN, 20% 100 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3)
Fluss	200 µL/min
Gradienten	A: 0-8 min: 0% FM A, 8-24 min: auf 50% FM A, 24-28 min: 50% FM A, 28-30 min: auf 0% FM A B: 0-8 min: 0% FM A, 8-20 min: auf 37.5% FM A, 20-28 min: 37.5% FM A, 28-30 min: auf 0% FM A C: 0-8 min: 0% FM A, 8-16 min: auf 25% FM A, 16-26 min: 25% FM A, 26-28 min: auf 0% FM A D: 0-8 min: 0% FM A, 8-14 min: auf 18.7% FM A, 14-30 min: 18.7% FM A, 30-32 min: auf 0% FM A E: 0-8 min: 0% FM A, 8-12 min: auf 12.5% FM A, 12-30 min: 12.5% FM A, 30-32 min: auf 0% FM A F: 0-8 min: 0% FM A, 8-20 min: auf 50% FM A, 20-25 min: 50% FM A, 25-27 min: auf 0% FM A G: 0-8 min: 0% FM A, 8-14 min: auf 25% FM A, 14-25 min: 25% FM A, 25-27 min: auf 0% FM A H: 0-8 min: 0% FM A, 8-18 min: auf 50% FM A, 18-24 min: 50% FM A, 24-26 min: auf 0% FM A I: 0-8 min: 0% FM A, 8-13 min: auf 25% FM A, 13-25 min: 25% FM A, 24-26 min: auf 0% FM A
Equilibrierzeit	13 min
Injektionsvolumen	5 µL

2.5 Übertragung der optimierten Methode auf die Infusionslösungen

2.5.1 Herstellung der Aminosäuren-Stammlösung („AS-Master-Mix“)

Zur Herstellung der AS-Standard-Lösung („AS-Master-Mix“), in welcher die AS in den Konzentrationen enthalten sind, wie sie auch in den Infusionslösungen vorliegen, wurden als Aminosäuren-Referenzen die in Tabelle D 2-1 (S.183) genannten Produktionsrohstoffe der B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) verwendet.

Die AS wurden in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit Wasser, welches zur Entfernung von Sauerstoff 30 min mit Argon begast wurde, bis zum Eichstrich aufgefüllt. Zur vollständigen Lösung der Substanzen wurde der Kolben 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Lösung in 1 mL HPLC-Vials portioniert und bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei -18°C gelagert. Tabelle D 2-15 zeigt die Zusammensetzung des AS-Master-Mix. Für diejenigen AS, die als Salze (Chloride oder Hydrate) eingesetzt wurden, wurde der entsprechende Gehalt der freien AS berechnet (Darstellung in der Tabelle in grauer Schrift).

2.5.2 Herstellung der IS-Stammlösung („IS-Master-Mix“)

In gleicher Weise wurde aus den unter Abschnitt D 1.1.2 genannten IS eine IS-Stammlösung („IS-Master-Mix“) hergestellt, welche die IS in den entsprechenden Konzentrationen ihrer Referenz-AS enthält.

Da von den IS nur geringe Mengen (mg-Bereich) zur Verfügung standen, konnte nur eine im Verhältnis zum AS-Master-Mix 1:50 verdünnte Lösung angesetzt werden. Als Lösungsmittel wurde eine Wasser-Acetonitril-Mischung verwendet, so dass das AS-Master-Mix die gleiche Zusammensetzung wie die Analysenlösung besaß und so direkt zur HPLC-MS-Analyse verwendet werden konnte.

Die IS wurden in einen 200 mL Messkolben eingewogen, mit 50 mL Argon-Wasser versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde mit ACN ad 200.0 mL aufgefüllt (ACN-Gehalt 75%). Nach Portionierung der Lösung in 1 mL HPLC-Vials wurde das IS-Master-Mix bis zur Verwendung bei -18°C im Gefrierschrank gelagert. Im Folgenden wird für das IS-Master-Mix auch die Abkürzung „IS 1:50“ verwendet.

Tabelle D 2-16 zeigt die Zusammensetzung des IS-Master-Mix. Für als Salze (Chloride oder Hydrate) eingesetzte IS wurde der Gehalt der freien IS berechnet (Darstellung in der Tabelle in grauer Schrift).

Tabelle D 2-15: Zusammensetzung des AS-Master-Mix. Kursiv und grau gedruckt sind die Werte der freien AS, welche anhand der Einwaagen ihrer Chloride bzw. Hydrate berechnet worden sind.

Aminosäure	M_r [g/mol]	Einwaage [g/100 mL]	Konzentration [g/L]	Konzentration [mmol/L]
NAcCys	163.2	0.07115	0.7115	4.4
NAcTyr	223.2	0.24779	2.4779	11.1
Ala	89.1	1.05038	10.5038	117.9
Arg	174.2	1.15209	11.5209	66.1
Asn * H ₂ O	150.1	0.46528	4.6528	31.0
<i>Asn</i>	<i>132.1</i>	-	<i>4.0950</i>	<i>31.0</i>
Asp	133.1	0.55965	5.5965	42.0
Glu	147.1	0.71996	7.1996	48.9
Gly	75.1	1.20164	12.0164	160.0
His	155.2	0.30051	3.0051	19.4
Ile	131.2	0.50001	5.0001	38.1
Leu	131.2	0.89171	8.9171	68.0
Lys * HCl	182.7	0.85694	8.5694	46.9
<i>Lys</i>	<i>146.2</i>	-	<i>6.8574</i>	<i>46.9</i>
Met	149.2	0.44213	4.4213	29.6
Orn * HCl	168.7	0.2888	2.888	17.1
<i>Orn</i>	<i>132.2</i>	-	<i>2.2632</i>	<i>17.1</i>
Phe	165.2	0.47055	4.7055	28.5
Pro	115.1	0.5523	5.523	48.0
Ser	105.1	0.23187	2.3187	22.1
Tau	125.2	0.02677	0.2677	2.1
Thr	119.1	0.42198	4.2198	35.4
Trp	204.2	0.6013	1.6013	7.8
Tyr	181.2	0.04029	0.4029	2.2
Val	117.2	0.62057	6.2057	52.9

Tabelle D 2-16: Zusammensetzung des IS-Master-Mix. Kursiv und grau gedruckt sind die Werte der freien isotopenmarkierten Aminosäuren, welche anhand der Einwaagen ihrer Chloride bzw. Hydrate berechnet worden sind.

isotopenmarkierte Aminosäure	M _r [g/mol]	Einwaage [g/200mL]	Konzentration [mg/L]	Konzentration [mmol/L]
D ₂ -NACys	165.2	2.988	14.94	0.090
D ₃ -Ala	92.2	43.276	216.38	2.347
¹³ C ₆ -Arg * HCl	216.7	56.986	284.93	1.315
<i>¹³C₆-Arg</i>	<i>180.2</i>	-	<i>236.96</i>	<i>1.315</i>
¹³ C ₄ -Asn * H ₂ O	154.3	19.028	95.14	0.617
<i>¹³C₄-Asn</i>	<i>136.2</i>	-	<i>84.04</i>	<i>0.617</i>
D ₃ -Asp	136.1	22.654	113.27	0.832
D ₅ -Glu	152.1	29.408	147.04	0.967
D ₂ -Gly	77.1	49.621	248.11	3.218
¹³ C ₆ -His * HCl * H ₂ O	215.6	16.553	82.77	0.384
<i>¹³C₆-His</i>	<i>161.1</i>	-	<i>61.86</i>	<i>0.384</i>
¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	138.0	20.954	104.77	0.759
D ₃ -Leu	134.1	36.460	182.30	1.359
¹³ C ₂ -Lys * 2 HCl	221.1	41.393	206.97	0.936
<i>¹³C₂-Lys</i>	<i>148.2</i>	-	<i>138.72</i>	<i>0.936</i>
D ₃ -Met	152.2	17.918	89.59	0.589
D ₆ -Orn * HCl	174.6	11.905	59.53	0.341
<i>D₆-Orn</i>	<i>138.4</i>	-	<i>47.20</i>	<i>0.341</i>
D ₅ -Phe	170.2	19.280	96.40	0.566
D ₇ -Pro	122.1	23.288	116.44	0.954
D ₃ -Ser	108.1	9.515	47.58	0.440
¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	124.0	17.269	86.35	0.696
D ₅ -Trp	210.1	6.680	33.40	0.159
¹³ C ₆ -Tyr	187.1	1.666	8.33	0.045
D ₈ -Val	125.2	26.462	132.31	1.057

2.5.3 Herstellung der Untersuchungslösung („Standardlösung AS und IS“)

Als direkt zur HPLC-MS-Analyse verwendete Untersuchungslösung diente eine im Bezug auf die Infusionslösung 1:200-Verdünnung in 75% ACN, welche die IS in den gleichen Konzentrationen wie die entsprechenden AS enthielt

Zunächst wurde eine 1:50-Verdünnung des AS-Master-Mix in 75% ACN hergestellt, die anschließend mit dem IS-Master-Mix versetzt und mit einer Verdünnungslösung auf die Endkonzentration verdünnt wurde.

- Herstellung der 1:50-Verdünnung des AS-Master-Mix in 75% ACN (AS 1:50):
0.4 mL AS-Master-Mix und 4.6 mL H₂O werden im 20 mL-Messkolben mit ACN ad 20.0 mL aufgefüllt.
- Herstellung der Verdünnungslösung (75% ACN):
25 mL H₂O werden im 100mL-Messkolben mit ACN ad 100.0 mL aufgefüllt.
- Herstellung der Untersuchungslösung (1:200-Verdünnung in 75% ACN):
200 µL der 1:50-Verdünnung des AS-Master-Mix, 200 µL des IS-Master-Mix (IS 1:50) sowie 400 µL der Verdünnungslösung werden in ein HPLC-Vial pipettiert und gut gemischt.

2.5.4 Optimierte HPLC-MS-Methode

Die Untersuchungslösung wurde am HPLC-MS-System 2 (Tabelle D 2-4, S.185) mit der in Tabelle D 2-17 aufgeführten HPLC-Methode untersucht. Die entsprechende SIM-Methode ist in Tabelle D 2-18 dargestellt.

Tabelle D 2-17: HPLC Methode 9

Trennsäule	ZIC [®] -HILIC PEEK Column (3.5 µm, 2.1 x 150 mm, 100 Å) (SeQuant AB, Umeå, Schweden)
Vorsäule	ZIC [®] -HILIC PEEK Guard (5 µm, 2.1 x 20 mm, 200 Å) (SeQuant AB, Umeå, Schweden)
Säulentemperatur	20°C
Fließmittel	A: 40 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH: 3), B: 80% ACN, 20% 100 mM NH ₄ FA in H ₂ O (pH 3)
Fluss	200 µL/min
Gradient	0-5 min: 0% FM A, 5-15 min: auf 50% FM A, 15-20 min: 50% FM A, 20-22min: auf 0% FM A
Equilibrierungszeit („post time“)	13 min
Injektionsvolumen	5µL

Tabelle D 2-18: SIM-Table AS und IS

[M+H] ⁺	Substanz	Fragmentor (V)	[M+H] ⁺	Substanz	Fragmentor (V)
76	Gly	70	139	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile, D ₆ -Orn	70
78	D ₂ -Gly	70	147	Lys	70
90	Ala	70	148	Glu	70
93	D ₃ -Ala	70	149	¹³ C ₂ -Lys	70
106	Ser	70	150	Met	70
109	D ₃ -Ser	70	153	D ₅ -Glu, D ₃ -Met	70
116	Pro	70	156	His	70
123	D ₇ -Pro	70	162	¹³ C ₆ -His	70
118	Val	70	164	NACys	70
120	Thr	70	166	D ₂ -NACys, Phe	70
125	¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	70	175	Arg	70
126	D ₈ -Val	70	181	¹³ C ₆ -Arg	70
132	Ile, Leu	70	182	Tyr	70
133	Asn, Orn	70	188	¹³ C ₆ -Tyr	70
134	Asp	70	205	Trp	70
135	D ₃ -Leu	70	210	D ₅ -Trp	70
137	¹³ C ₄ -Asn, D ₃ -Asp	70	224	NACtyr	70

2.6 Einbeziehung weiterer Substanzen

Zur qualitativen Prüfung, ob die entwickelte Methode prinzipiell auf weitere Substanzen ausgedehnt werden kann, wurde die AS-Mischung (Tabelle D 2-15) nach Zusatz der zu prüfenden Analyten (Cys, (Cys)₂, MSO, Pyr, Tau) mit der optimierten HILIC-HPLC-MS-Methode (Tabelle D 2-17, S.196) am HPLC-MS-System 2 (Tabelle D 2-4, S.185) untersucht. In die SIM-Methode (Tabelle D 2-18) wurden die entsprechenden *m/z*-Verhältnisse der Precursorionen der fünf Substanzen zusätzlich aufgenommen (Cys *m/z* 122, (Cys)₂ *m/z* 241, MSO *m/z* 166, Pyr *m/z* 130, Tau *m/z* 126).

Die Konzentrationen der fünf Substanzen in der zur HPLC-MS-Analyse verwendeten Untersuchungslösung betragen je 50 µmol/L.

3 Validierung der entwickelten Methode

3.1 Bestimmung der Arbeitskonzentration (100%-Level)

Zur Bestimmung einer geeigneten Arbeitskonzentration wurden verschiedene Verdünnungen (1:100-, 1:200-, 1:500- und 1:1000-Verdünnung) des AS-Master-Mix untersucht und als Maß für die Eignung der Verdünnung jeweils die Präzision der AS nach Sechsfachbestimmung ermittelt.

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen wurde zunächst das AS-Master-Mix 1:50 in 75% ACN (vgl. Abschnitt D 2.5.3) verdünnt. Diese Lösung wurde 1+1 mit der IS-1:50-Lösung versetzt und mit der Verdünnungslösung auf die entsprechende Endkonzentrationen (1:100-, 1:200-, 1:500- und 1:1000-Verdünnung) eingestellt.

Die so hergestellten Untersuchungslösungen wurden zur Bestimmung der (System-) Präzision je sechsmal mit der unter Abschnitt D 2.5.4 genannten HPLC-MS-Methode vermessen.

Als Maß für die Präzision wird die relative Standardabweichung (RSD) der Messwerte herangezogen. Daher wurden zur Auswertung die RSD-Werte der Sechsfachbestimmung bei den vier untersuchten Konzentrationen ermittelt (Excel, Microsoft Office 2003). Über die zugrunde liegenden Gleichungen informieren die Gleichungen Gl. 2 und Gl. 3. Als Messwert dient der Quotient aus Peakfläche der Aminosäure zu Peakfläche des entsprechenden isotoopenmarkierten Standards.

$$\text{Gl. 2: } SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_m)^2}{N-1}}$$

$$\text{Gl. 3: } RSD = \frac{SD}{x_m} \cdot 100\%$$

SD: Standardabweichung

x_i : Einzelwert

N: Anzahl der Messungen

RSD: relative Standardabweichung

x_m : Mittelwert

3.2 Bestimmung der Linearität

3.2.1 Durchführung

Die Durchführung und Auswertung richtete sich nach der gängigen Arbeitsweise zur Linearitätsbestimmung im Bereich der Validierung von chromatographisch-analytischen Verfahren (Kromidas 2003; Bliesner 2006).

Zur Bestimmung der Linearität, in diesem Fall der Systemlinearität, wurde bei gleichbleibender Konzentration der IS (1:200-Verdünnung bezogen auf die Infusionslösung) die AS in Schritten von 1:100 bis zu einer Verdünnung von 1:1000 verdünnt. Die Herstellung der Untersuchungslösungen erfolgte analog zu den bisherigen Versuchen (vgl. Abschnitt D 2.5.3), so dass die resultierende Lösung immer in 75% ACN gelöst war.

Vermessen wurden die Konzentrationsniveaus Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.325, 0.4, 0.5, 0.65, 1.0, 2.0$ und 3.0. Die hohe Anzahl an Messpunkten im unteren Konzentrationsbereich wurde gewählt, um erste Informationen bezüglich des möglichen Bestimmungsbereichs zu erhalten. Die so hergestellten Lösungen wurden in aufsteigender Konzentration je dreimal mit der unter Abschnitt D 2.5.4 genannten HPLC-MS-Methode vermessen.

Zur Auswertung wurde aus der Dreifachbestimmung der Mittelwert des Quotienten aus Peakfläche der AS und Peakfläche des IS ($Area_{AS} / Area_{IS}$) bestimmt. Da für *NAcTyr* die entsprechende isotoopenmarkierte Referenz fehlt, wurde zur Auswertung *NAcTyr* vorläufig sowohl auf D_2 -*NAcCys* (*NAcTyr* 1) als auch auf D_5 -*Trp* (*NAcTyr* 2) bezogen, um zu prüfen, ob eine der beiden und wenn ja, welche der isotoopenmarkierten Referenzen zur Auswertung geeignet ist.

Als Maß für die Präzision wurde die relative Standardabweichung der Dreifachbestimmung ermittelt und geprüft. Sobald die RSD-Werte die Grenze von 1.5% überschritten, wurde der entsprechende Datenpunkt nicht mehr in die Kalibrierung aufgenommen.

Dies war der Fall für *Tyr*, welches erst ab dem Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.4$ (entspricht der 1:500-Verdünnung) mit ausreichender Präzision bestimmt werden konnte. *NAcTyr*

ließ sich, bezogen auf D₂-NACcys als IS, erst ab dem Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.25$ (entspricht der 1:800-Verdünnung) erfassen.

Ziel der linearen Regression ist, eine Ausgleichs- bzw. Kalibriergerade zu finden, die die Abhängigkeit des Messwerts von der Konzentration am besten, d.h. mit der geringsten Abweichung, beschreibt (Gottwald 2000). Dazu wurden die Messwerte einer linearen Regression 1. Ordnung sowie einer quadratischen Anpassung (lineare Regression 2. Ordnung) unterworfen.

3.2.2 Lineare Regression 1. Ordnung

Zur Bestimmung der linearen Regression 1. Ordnung wurden die Konzentrationen der AS gegen die die Mittelwerte der Quotienten $Area_{AS} / Area_{IS}$ aufgetragen und die Regressionsgeraden mittels Excel (Microsoft Office, 2003) berechnet.

Die zugrunde liegende Geradengleichung ist in Gleichung 4 dargestellt.

$$\text{Gl. 4:} \quad y = m \cdot x + b$$

x : unabhängige Größe, hier: c_{AS}

y : abhängige Größe (Messwert), hier: $Area_{AS} / Area_{IS}$

m : Steigung der Ausgleichsgeraden

b : Achsenabschnitt

Die Präzision der linearen Regression wird durch die Reststandardabweichung s_y ausgedrückt, welche ein Maß für die Streuung der Residuen um die Ausgleichsgerade darstellt. Als weitere Kenngröße dient die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} welche die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} bezieht (Gottwald 2000; Kromidas 2003).

Diese Parameter sowie der Korrelationskoeffizient r wurden ebenfalls mittels Excel (Microsoft Office, 2003) berechnet und zur Auswertung herangezogen.

Alle zugrunde liegenden mathematischen Formeln sind in Anhang I a zusammengefasst.

3.2.3 Lineare Regression 2. Ordnung (Quadratische Regression)

Zur Bestimmung der linearen Regression 2. Ordnung (quadratische Regression) wurden die Konzentrationen der AS gegen die die Mittelwerte der Quotienten $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$ aufgetragen und die Regressionsparameter ermittelt. Die Auswertung erfolgte anhand der in Anhang I b aufgeführten Formeln unter Zuhilfenahme von Excel (Microsoft Office, 2003).

Die zugrunde liegende Geradengleichung ist in Gl. 5 dargestellt.

$$\text{Gl. 5: } y = n \cdot x^2 + m \cdot x + b$$

x : unabhängige Größe, hier: c_{AS} [mg/L]

y : abhängige Größe (Messwert), hier: $\text{Area}_{\text{AS}} / \text{Area}_{\text{IS}}$

n : Parameter der Kalibrierfunktion (quadratische Steigung)

m : Parameter der Kalibrierfunktion

b : Achsenabschnitt

Zum Vergleich der Regressionsmodelle wurden ebenfalls die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} sowie die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} berechnet.

3.2.4 Überprüfung der Linearität

3.2.4.1 Visueller Linearitätstest

Die mittels linearer und quadratischer Regression ermittelten Regressionsgeraden wurden visuell überprüft und begutachtet.

3.2.4.2 Anpassungstest nach Mandel

Zur Abschätzung welches Regressionsmodell zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Messwert und Konzentrationswert geeigneter ist, vergleicht man die Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der beiden Bestimmungen (linear bzw. quadratisch). Als „besser“ ist diejenige Strategie anzusehen, bei welcher V_{x0} geringer

ist. Um zufällige Abweichungen der Werte auszuschließen, also die statistische Signifikanz nachzuweisen, wird der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt.

Aus den Reststandardabweichungen der beiden Verfahren wird die Varianzendifferenz Δs^2 berechnet, welche mit der Varianz der quadratischen Anpassung s_{quad}^2 über einen F-Test (P=99%) abgeglichen wird.

Die zugrunde liegenden mathematischen Formeln sind in Anhang I c dargestellt.

3.3 Problematik der Validierung – Einfluss der Matrix

3.3.1 Methodenlinearität und Bestimmung der Wiederfindung (1:200-Verdünnung)

Zur Bestimmung der Wiederfindungen wurde zunächst eine Kalibriergerade erstellt. Als 100%-Level diente eine bezogen auf die Infusionslösung 1:200 verdünnte Lösung, die AS und IS in der gleichen Konzentration enthielt. Weitere Datenpunkte wurden bei 20% (1:1000-Verdünnung), 80% (1:250-Verdünnung), 125% (1:160-Verdünnung) und 300% (1:66.667-Verdünnung) gewählt, wobei die Konzentration an IS immer gleich blieb (1:200-Verdünnung). Diese Standardlösungen wurden je dreimal mit der entwickelten HILIC-MS-Methode Tabelle D 2-18 (Kapitel D 2.5.4) vermessen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung gebildet und die Regressionsgerade bestimmt (linear bzw. quadratisch, je nach Ergebnis der Linearitätsprüfung).

Anschließend wurden in gleicher Weise als Probelösungen „imitierte“ Infusionslösungen untersucht, die neben AS und IS zusätzlich jeweils die Matrixlösung (siehe folgender Abschnitt, Kapitel D 3.3.3) in der 1:200-Verdünnung enthielten.

Die Probelösungen wurden bei den aufgeführten Konzentrationsniveaus ebenfalls dreimal untersucht und anschließend anhand der Messwerte über die ermittelte Kalibrierfunktion der Gehalt an AS berechnet.

3.3.2 Methodenlinearität und Bestimmung der Wiederfindung bei höherer Verdünnung (1:300-Verdünnung)

Analog zur vorhergehenden Versuchsreihe (D 3.3.1) wurde die Wiederfindung und Methodenlinearität bei höherer Verdünnung (100%-Level = 1:300-Verdünnung) ermittelt.

Die Datenpunkte zur Kalibrierung wurden bei 30% (1:1000-Verdünnung), 75% (1:400-Verdünnung), 100% (1:300-Verdünnung), 150% (1:200-Verdünnung), 200% (1:150-Verdünnung) und 350% (1:85.7-Verdünnung) aufgenommen, wobei die Konzentration an IS immer gleich blieb (1:300-Verdünnung). Diese Standardlösungen wurden je dreimal mit der entwickelten HILIC-MS-Methode Tabelle D 2-18 (Kapitel D 2.5.4) vermessen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung gebildet und die Regressionsgerade bestimmt (linear bzw. quadratisch, je nach Ergebnis der Linearitätsprüfung).

Anschließend wurden in gleicher Weise als Probelösungen „imitierte“ Infusionslösungen untersucht, die neben AS und IS zusätzlich jeweils die Matrixlösung (siehe folgender Abschnitt, Kapitel D 3.3.3) in der 1:300-Verdünnung enthielten.

Die Probelösungen wurden bei den aufgeführten Konzentrationsniveaus ebenfalls dreimal untersucht und anschließend anhand der Messwerte über die ermittelte Kalibrierfunktion der Gehalt an AS berechnet.

3.3.3 Matrix-Lösung

Als Matrix-Lösung wurde die Infusionslösungsmatrix (ohne Aminosäurezusatz), die aus den entsprechenden Salzen und Puffersubstanzen (Tabelle D 2-2, S.184) hergestellt wurde, verwendet. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 6.1 eingestellt.

Tabelle D 3-1 informiert über die Zusammensetzung der Matrixlösung.

Tabelle D 3-1: Zusammensetzung der Matrix-Lösung.

Substanz	M _r [g/mol]	Einwaage [g/100mL]	Konzentration [mg/L]	Konzentration [mmol/L]
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	147.2	0.07758	775.8	5.27
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	156.0	0.06167	616.7	3.95
Mg(CH ₃ COO) ₂ * 4 H ₂ O	214.5	0.11673	1167.3	5.44
CH ₃ COOK	98.1	0.36028	3602.8	36.73
KCl	74.6	0.08176	817.6	10.96
NaCl	58.4	0.05398	539.8	9.24
NaOH	40.0	0.1279	1279.0	31.98
Citronensäure	192.1	0.04145	414.5	2.16
Essigsäure	60.1	q.s.	-	-

3.4 Validierung in der Matrixlösung

3.4.1 Herstellung der Untersuchungslösung

Als direkt zur HPLC-MS-Analyse eingesetzte Untersuchungslösung diente eine in 75% ACN verdünnte, „imitierte Infusionslösung“, welche das AS-Master-Mix (Tabelle D 2-15, S.194), das IS-Master-Mix (Tabelle D 2-16, S.195) sowie die Elektrolyt-Matrix-Lösung (Tabelle D 3-1, S.204) enthält.

Als 100%-Level, also diejenige Verdünnung, bei welcher AS und IS in der gleichen Konzentration vorliegen, diente eine 1:300-Verdünnung der jeweiligen Stammlösungen. Über die Zusammensetzung dieser Lösung informiert Tabelle D 3-2.

Die Untersuchungen zur Präzision wurden mit dieser Untersuchungslösung durchgeführt. Die Studien zur Linearität erfolgten mit Lösungen, bei denen bei gleichbleibender Konzentration der IS- und Matrixlösung (1:300-Verdünnung bezogen auf die Infusionslösung) die Konzentration an AS variiert (Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.3$ bis $c_{AS} / c_{IS} = 3.5$).

Tabelle D 3-2: Zusammensetzung der Untersuchungslösung (100%-Level, entspricht bezogen auf die Infusionslösung einer 1:300-Verdünnung).

AS	c_{AS} [mg/L]	IS	c_{IS} [mg/L]
NACys	2.37	D ₂ -NACys	2.49
NACTyr	8.26		
Ala	35.01	D ₃ -Ala	36.06
Arg	38.403	¹³ C ₆ -Arg * HCl	47.49
		¹³ C ₆ -Arg	39.50
Asn * H ₂ O	15.51	¹³ C ₄ -Asn * H ₂ O	15.86
Asn	13.65	¹³ C ₄ -Asn	14.01
Asp	18.66	D ₃ -Asp	18.88
Glu	24.00	D ₅ -Glu	24.51
Gly	40.05	D ₂ -Gly	41.35
His	10.02	¹³ C ₆ -His * HCl * H ₂ O	13.79
		¹³ C ₆ -His	10.31
Ile	16.67	¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁ -Ile	17.46
Leu	29.72	D ₃ -Leu	30.38
Lys * HCl	28.56	¹³ C ₂ -Lys * 2 HCl	34.49
Lys	22.86	¹³ C ₂ -Lys	23.12
Met	14.74	D ₃ -Met	14.93
Orn * HCl	9.63	D ₆ -Orn * HCl	9.92
Orn	7.54	D ₆ -Orn	7.87
Phe	15.69	D ₅ -Phe	16.07
Pro	18.41	D ₇ -Pro	19.41
Ser	7.73	D ₃ -Ser	7.93
Tau	0.89		
Thr	14.07	¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₁ -Thr	14.39
Trp	5.34	D ₅ -Trp	5.57
Tyr	1.34	¹³ C ₆ -Tyr	1.39
Val	20.69	D ₈ -Val	22.05

3.4.2 Bestimmung der Validierungsparameter

Zur Validierung wurde eine HPLC-MS-Sequenz gestartet, anhand derer gleichzeitig die Parameter Systempräzision, Systemlinearität, Methodenpräzision, Methodenlinearität, Bestimmungsbereich sowie Richtigkeit bestimmt wurden. Die HPLC-MS-Methode ist in Abschnitt D 2.5.4 genannt.

Zunächst wurde die **Systemlinearität** bestimmt, indem die Untersuchungslösungen (D 3.4.1) einmal hergestellt und je dreimal vermessen wurden. Vermessen wurden die Konzentrationsniveaus Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0$ und 3.5 . Als 100%-Level ($c_{AS} / c_{IS} = 1.0$) diente, wie erwähnt, eine bezogen auf die Infusionslösung 1:300-verdünnte Lösung. Dieses 100%-Level wurde sechsmal vermessen, um

daraus die **Systempräzision** zu bestimmen. Sofern die Präzision der Mehrfachbestimmungen nicht im vorgeschriebenen Bereich lag, wurden die entsprechenden Werte nicht mehr in die Linearität aufgenommen. Dies war für Ser beim 30%-Level, für Tyr beim 30%- und 50%-Level der Fall.

Analog wurden im Anschluss daran die **Methodenlinearität** sowie die **Methodenpräzision** bestimmt, wobei hier für die Untersuchungslösungen je drei- bzw. sechsmal hergestellt wurden. Als Konzentrationsniveaus wurden ebenfalls die genannten untersucht (Verhältnis $c_{AS} / c_{IS} = 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0$ und 3.5). Die Auswertungen zur Präzision und zur Linearität erfolgten wie in vorausgegangenen Studien (Kapitel D 3.2.2 bis 3.2.4).

Nach der Prüfung und Bestimmung der Linearität (7 Punkte) wurde aus der Systemlinearität eine Fünfpunkt-Kalibriergerade erstellt (30%, 100%, 200%, 300% und 350%). Im Falle von Ser und Tyr, die bei hoher Verdünnung, wie erwähnt, nicht die notwendige Präzision aufwiesen (RSD der Mehrfachbestimmung $> 1.5\%$), wurden als niedrigste Konzentrationsniveaus 50% (Ser) bzw. 75% (Tyr) in die Kalibrierung aufgenommen. Für *NACys*, *NACTyr* und Pro erfolgte die Auswertung mittels quadratischer Regression.

Durch Einsetzen der Werte der Methodenlinearität wurde die **Wiederfindung** (WF) und damit die Richtigkeit bestimmt. Die WF wurde bei verschiedenen Konzentrationsniveaus über den gesamten kalibrierten Bereich (30%, 50%, 100%, 200%, 350%) ermittelt. Die entsprechende Gleichung zur Berechnung der Wiederfindung lautet:

$$\text{Gl. 6:} \quad WF = \frac{x}{x_r} \cdot 100\%$$

x: Messwert x_r : richtiger Wert

Die Wiederfindung wurde sowohl für die drei Einzelmesswerte als auch für den Mittelwert berechnet, wobei sie für die Einzelwerte zwischen 98.0% und 102.0% liegen musste, für den Mittelwert zwischen 98.5% und 101.5%.

Als **Bestimmungsbereich** wurde derjenige Bereich ermittelt, in welchem die AS mit ausreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

- A.I.J.N. Code of Practice for the Evaluation of Fruit and Vegetable Juice. **2010**, *Stand: 2010*, ständige Aktualisierung.
- Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* **1990**, *499*, 177-196.
- Alteheld, B., Stehle, P., Fuerst, P. Measurement of amino acid concentrations in biological fluids and tissues using reversed-phase HPLC-based methods. In: *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition (Second Edition)*. Editor: Cynober, L. CRC Press, **2004**, 29-44.
- AMC. Ist my calibration linear? *Analytical Methods Committee, amc technical brief No. 3* **2005**.
- Annesley, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin Chem* **2003**, *49 (7)*, 1041–1044.
- Armstrong, M., Jonscher, K., Reisdorph, N. A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21 (16)*, 2717-2726.
- Aruda, W. O., Aruda, K. O. Review of volatile perfluorocarboxylic acids as ion pair reagents in LC: Part I. *LC GC North America* **2009a**, August 2009.
- Aruda, W. O., Aruda, K. O. Review of volatile perfluorocarboxylic acids as ion pair reagents in LC: Part II. *LC GC North America* **2009b**, October 2009.
- B.Braun. Validation of chemical-analytical Test Procedures - Standard Operating Procedure (SOP). B. Braun Melsungen AG, Melsungen, **2008**.
- Bidlingmeyer, B. A., Deming, S. N., Jr., W. P. P., Sachok, B., Petrussek, M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1979**, *186*, 419-434
- Bishop, M. J., Crow, B., Norton, D., Kovalcik, K., George, J., Bralley, J. A. A simple and selective method for the measurement of leucine and isoleucine from plasma using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21 (12)*, 1920-1924.
- Blaschek, W., Reuß, W.(eds.). Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer, Berlin, 5., vollständig neubearbeitete Auflage, **1999**.
- Bliesner, D. M. Validating chromatographic methods - a practical guide. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, **2006**.

- Boogers, I., Plugge, W., Stokkermans, Y. Q., Duchateau, A. L. Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatisation method. *J Chromatogr A* **2008**, *1189* (1-2), 406-409.
- Budzikiewicz, H., Schäfer, M. Massenspektrometrie - eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim, 5., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage, **2005**.
- Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Morales, M. L. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta* **2010**, *81* (4-5), 1143-1152.
- Caude, M., Jardey, A. Normal-Phase Liquid Chromatography. In: *Handbook of HPLC*. Editor: Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. and Miller, N. Dekker, New York, **1998**, Chromatographic Science Series, 78, 325-363.
- Cecchi, T. Ion Pairing Chromatography. *Crit Rev Anal Chem* **2008**, *38*, 161-213.
- Cecchi, T. Ion-pair chromatography and related techniques. CRC Press, Boca Raton, **2010**.
- Cech, N. B., Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev.* **2001**, *20* (6), 362-387.
- Cech, N. B., Enke, C. G. Selectivity in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In: *Electrospray and MALDI mass spectrometry - fundamentals, instrumentation, practicalities and biological applications*. Editor: Cole, R. B. Wiley, Hoboken, New Jersey, **2010**, 49-73.
- Chace, D. H., Millington, D. S., Terada, N., Kahler, S. G., Roe, C. R., Hofman, L. F. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry *Clin Chem* **1993**, *39* (66-71).
- Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M. Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1999**, *855* (1), 191-202.
- Chen, H., O'Connor, S., Cane, D. E., Walsh, C. T. Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. *Chem Biol* **2001**, *8* (9), 899-912.
- Chirita, R.-I., West, C., Finaru, A.-L., Elfakir, C. Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (18), 3091-3104.

- Cohen, S. A., Michaud, D. P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **1993**, *211* (2), 279-287.
- Cohen, S. A. Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. In: *Amino Acid Analysis Protocols*. Editor: Cooper, C., Packer, N. and Williams, K. Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, 159, 39-47.
- Conventz, A., Musiol, A., Brodowsky, C., Muller-Lux, A., Dewes, P., Kraus, T., Schettgen, T. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *860* (1), 78-85.
- de Person, M., Chaimbault, P., Elfakir, C. Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces. *J Mass Spectrom* **2008**, *43* (2), 204-215.
- Dejaegher, B., Vander Heyden, Y. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 698-715.
- Dell'mour, M., Jaitz, L., Oburger, E., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., Hann, S. Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 911-922.
- Dibowski, A., Dibowski, H. Hydrophile Interaktionschromatographie - HILIC ist nicht gleich HILIC. *GIT Spezial Separation* **2005**, *01/2005*, 13-15.
- Dolan, J. W. Ion Pairing — Blessing or Curse? *LC GC North America* **2008**, *May 2008*.
- Dookeran, N. N., Yalcin, T., Harrison, A. G. Fragmentation reactions of protonated α -amino acids. *J Mass Spectrom* **1996**, *31*, 500-508.
- Doyle, C. A. Reversed-Phase HPLC: Preparation and Characterization of Reversed-Phase Stationary Phases. In: *Handbook of HPLC*. Editor: Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. and Miller, N. Dekker, New York, **1998**, Chromatographic Science Series, 78, 293-323.
- DPHG. Mitteilungen der DPHG - Positionspapier der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft zum Thema Festlegung von Akzeptanzkriterien. *Pharmazie in unserer Zeit* **2003**, *32* (3), 254-260.

- Draper, W. M., Xu, D., Perera, S. K. Electrolyte-Induced Ionization Suppression and Microcystin Toxins: Ammonium Formate Suppresses Sodium Replacement Ions and Enhances Protonated and Ammoniated Ions for Improved Specificity in Quantitative LC-MS-MS. *Anal Chem* **2009**, *81* (10), 4153-4160.
- EMA. Note for Guidance on Process Validation. European Medicines Agency, London, **2001**.
- Ermer, J. Method validation in pharmaceutical analysis. Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- Ermer, J. Allgemeine Beurteilung analytischer Daten. In: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*. Editor: Kromidas, S. and Kuss, H.-J. Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, 145-170.
- Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G. P., Castellari, M., Galassi, S. High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate. *J Chromatogr Sci* **2002**, *40* (1), 14-18.
- FDA. Validation of Chromatographic Methods - Reviewer Guidance. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), **1994**.
- FDA. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology - Guidance for Industry (draft). Food and Drug Administration, **1999**.
- FDA. Analytical Procedures and Methods Validation - Guidance for Industry (draft). Food and Drug Administration, **2000**.
- Fritz, J. S., Gjerde, D. T. Ion chromatography. Wiley-VCH, Weinheim, 3., completely revised and enlarged edition, **2000**.
- Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G. Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie - Anwendungen in der Umwelt-, Lebensmittel- und Werkstoffanalytik, Biotechnologie und Medizintechnik. Wiley-VCH, Weinheim, 2. Auflage, **2005**.
- Gao, S., Bhoopathy, S., Zhang, Z. P., Wright, D. S., Jenkins, R., Karnes, H. T. Evaluation of volatile ion-pair reagents for the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of polar compounds and its application to the determination of methadone in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* **2006**, *40* (3), 679-688.
- Garcia, M. C. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, *825* (2), 111-123.

- Gey, M. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. Springer, Berlin, 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, **2008**.
- Glass, R. S., Farooqui, F., Sabahi, M., Ehler, K. W. Formation of Thiocarbonyl Compounds in the Reaction of Ebselen Oxide with Thiols. *J Org Chem* **1989**, *54*, **1092-1097**.
- Gottwald, W. Statistik für Anwender. Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- Gross, J. H. Mass spectrometry. Springer, Berlin, **2004**.
- Gu, L., Jones, A. D., Last, R. L. LC-MS/MS assay for protein amino acids and metabolically related compounds for large-scale screening of metabolic phenotypes. *Anal Chem* **2007**, *79* (21), 8067-8075.
- Guo, Y., Gaiki, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **2005**, *1074* (1-2), 71-80.
- Gustavsson, S. A., Samskog, J., Markides, K. E., Langstrom, B. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J Chromatogr A* **2001**, *937* (1-2), 41-47.
- Hänsel, R., Steinegger, E. Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer, Heidelberg, 9., überarbeitete und aktualisierte Auflage, **2010**.
- Hao, Z., Xiao, B., Weng, N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J Sep Sci* **2008**, *31* (9), 1449-1464.
- Heinisch, S., Rocca, J. L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (4), 642-658.
- Hemström, P., Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* **2006**, *29* (12), 1784-1821.
- Hibbert, D. B. Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. Oxford University Press, New York, **2007**.
- Hmelnickis, J., Pugovics, O., Kazoka, H., Viksna, A., Susinskis, I., Kokums, K. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *48* (3), 649-656.

- Hoffman, N. E., Liao, J. C. Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions. *Anal Chem* **1977**, *49* (14), 2231-2234
- Hoffmann, E. d., Stroobant, V. Mass spectrometry - principles and applications. Wiley, Chichester (England), 3. Auflage, **2007**.
- Horvath, C., Melander, W., Molnár, I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr A* **1976**, *125* (1), 129-156.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., Molnar, P. Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Anal Chem* **1977**, *49* (14), 2295-2305
- Hsieh, Y. Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites. *J Sep Sci* **2008**, *31* (9), 1481-1491.
- Husek, P. Quantitation of Amino Acids as Chloroformates - A Return to Gas Chromatography In: *Quantitation of amino acids and amines by chromatography - methods and protocols*. Editor: Molnár-Perl, I. Elsevier, Amsterdam, **2005**, Journal of Chromatography Library, 70, 2-38.
- ICH. Q2A - Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology Q2A. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* **1994**.
- ICH. Q2B - Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* **1996**.
- ICH. Q2 (R1) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* **2005**.
- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **2008**, *1184* (1-2), 474-503.
- Imoberdorf, R., Kündig, A., Haller, A., Ballmer, P. E. Grundlagen und Praxis der parenteralen Ernährung. *Schweiz Med Forum* **2003**, *17*, 397-402.
- Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. Aminosäuren, Peptide, Proteine. Verlag Chemie, Weinheim, überarbeitete Auflage, **1982**.

- Jandera, P. Comparison of various modes and phase systems for analytical HPLC. In: *Handbook of Analytical Separations*. Editor: Valkó, K. Elsevier Science B.V., **2000**, 1-71.
- Jandera, P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J Sep Sci* **2008**, *31* (9), 1421-1437.
- Jessome, L. L., Volmer, D. A. Ion Suppression: A Major Concern in Mass Spectrometry. *LC-GC North America* **2006**, *24* (5), 498-510.
- Kataoka, H., Takagi, K., Tanaka, H., Makita, M. Determination of Sulfur Amino Acids, Glutathione, and Related Amino Thiols in Biological Samples by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. In: *Amino Acid Analysis Protocols*. Editor: Cooper, C., Packer, N. and Williams, K. Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, Methods in Molecular Biology, 159, 207-225.
- Kato, M., Kato, H., Eyama, S., Takatsu, A. Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877* (27), 3059-3064.
- Kebarle, P., Verkerk, U. H. On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS). In: *Electrospray and MALDI mass spectrometry - fundamentals, instrumentation, practicalities and biological applications*. Editor: Cole, R. B. Wiley, Hoboken, New Jersey, **2010**, 3-48.
- Keitel, S. Anforderungen an analytische Prüfverfahren im Rahmen der Arzneimittelzulassung. In: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*. Editor: Kromidas, S. and Kuss, H.-J. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**, 349-364.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**, *11* (11), 942-950.
- Kirchherr, H. Auswertung in der LC-MS-Kopplung. In: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*. Editor: Kromidas, S. and Kuss, H.-J. Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, 267-283.
- Kirchhoff, C. HPLC-Methodenentwicklung und Validierung im Bereich der Stabilitätsanalytik. Dissertation, Universität Würzburg, **2002**.
- Kissinger, P. T. Reverse-phase ion-pair partition chromatography. Comments. *Anal Chem* **1977**, *49*, 883.

- Kitano, H., Mori, T., Takeuchi, Y., Tada, S., Gemmei-Ide, M., Yokoyama, Y., Tanaka, M. Structure of water incorporated in sulfobetaine polymer films as studied by ATR-FTIR. *Macromol Biosci* **2005**, *5* (4), 314-321.
- Kostiainen, R., Kauppila, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (4), 685-699.
- Kraak, J. C., Jonker, K. M., Huber, J. F. K. Solvent-generated ion-exchange systems with anionic surfactants for rapid separations of amino acids. *J Chromatogr A* **1977**, *142*, 671-688
- Kromidas, S. Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim, 2., korrigierter Nachdruck, **2003**.
- Kromidas, S. HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker. Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **1982**, *157* (1), 105-132.
- Lämmerhofer, M. HILIC and mixed-mode chromatography: the rising stars in separation science. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 679-680.
- Langrock, T., Czihal, P., Hoffmann, R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids* **2006**, *30* (3), 291-297.
- Le Boucher, J., Charret, C., Coudray-Lucas, C., Giboudeau, J., Cynober, L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin Chem* **1997**, *43* (8 Pt 1), 1421-1428.
- Liang, H. R., Foltz, R. L., Meng, M., Bennett, P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17* (24), 2815-2821.
- Liu, D. L., Beegle, L. W., Kanik, I. Analysis of underivatized amino acids in geological samples using ion-pairing liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Astrobiology* **2008**, *8* (2), 229-241.
- Liu, M., Ostovic, J., Chen, E. X., Cauchon, N. Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (12), 2362-2370.

- Liu, X., Pohl, C. A. HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 779-786.
- Löffler, G. Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Heidelberg, 8., vollständig neu bearbeitete Auflage, **2007**.
- Lottspeich, F., Engels, J. Bioanalytik. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2. Auflage, **2006**.
- Lunn, G., Hellwig, L. C. Handbook of derivatization reactions for HPLC. Wiley, New York, **1998**.
- Manning, R. J., Washington, C. Chemical stability of total parenteral nutrition mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *81* (1), 1-20.
- Marrubini, G., Mendoza, B. E., Massolini, G. Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 803-816.
- Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S. M. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **2006**, *52* (3), 488-493.
- Mason, B., McCracken, M., Bures, E., Kerwin, B. Oxidation of Free L-histidine by *tert*-Butylhydroperoxide. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27* (3), 447-456.
- Massom, L. R. Amino acid analysis. In: *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals (2nd Edition)*. Editor: Hurst, W. J. CRC Press, Boca Raton, **2008**, 433-464.
- McCalley, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J Chromatogr A* **2007**, *1171* (1-2), 46-55.
- McCalley, D. V., Neue, U. D. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **2008**, *1192* (2), 225-229.
- McLafferty, F. W., Tureček, F. Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- Meyer, V. R. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wiley-VCH, Weinheim, 10. Auflage, **2009**.

- Moore, S., Stein, W. H. Partition Chromatography of Amino Acids on Starch. *Ann N Y Acad Sci* **1948**, *49* (2), 265-278.
- Moore, S., Stein, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J Biol Chem* **1951**, *192* (2), 663-681.
- Moore, S., Spackman, D. H., Stein, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **1958a**, *30*, 1185-1190.
- Moore, S., Spackman, D. H., Stein, W. H. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc* **1958b**, *17* (4), 1107-1115.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. Lehninger Biochemie. Springer, Berlin, 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Übersetzung der 5. amerikanischen Auflage, **2009**.
- Neveux, N., David, P., Cynober, L. Measurement of amino acids concentrations in biological fluids and tissues using ion-exchange chromatography. In: *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition (Second Edition)*. Editor: Cynober, L. CRC Press, **2004**,
- Nguyen, H. P., Schug, K. A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J Sep Sci* **2008**, *31* (9), 1465-1480.
- Nkem Ihunegbo, F., Tesfalidet, S., Jiang, W. Determination of melamine in milk powder using zwitterionic HILIC stationary phase with UV detection. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 988-995.
- Novakova, L., Kaufmannova, I., Janska, R. Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 765-772.
- Oertel, R., Neumeister, V., Kirch, W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J Chromatogr A* **2004**, *1058* (1-2), 197-201.
- Pappa-Louisi, A., Nikitas, P., Agrafiotou, P., Papageorgiou, A. Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with on line UV, fluorescence and electrochemical detection. *Anal Chim Acta* **2007**, *593* (1), 92-97.
- Pappa-Louisi, A., Agrafiotou, P., Papachristos, K. Retention modeling under organic modifier gradient conditions in ion-pair reversed-phase chromatography. Application to the separation of a set of underivatized amino acids. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397* (6), 2151-2159.

- Peace, R. W., Gilani, G. S. Chromatographic determination of amino acids in foods. *J AOAC Int* **2005**, *88* (3), 877-887.
- Petritis, K., Chaimbault, P., Elfakir, C., Dreux, M. Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2000**, *896* (1-2), 253-263.
- Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P., Morla, A., Bouchu, D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17* (12), 1297-1311.
- Piraud, M., Vianey-Saban, C., Bourdin, C., Acquaviva-Bourdain, C., Boyer, S., Elfakir, C., Bouchu, D. A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatized amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005a**, *19* (22), 3287-3297.
- Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P., Bouchu, D. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005b**, *19* (12), 1587-1602.
- Piraud, M., Ruet, S., Boyer, S., Acquaviva, C., Clerc-Renaud, P., Cheillan, D., Vianey-Saban, C. Amino Acid profiling for the diagnosis of inborn errors of metabolism. In: *Metabolic Profiling*. Editor: Metz, T. O. Springer, New York, **2011**, Methods in Molecular Biology, 708, 25-53.
- Poinsot, V., Rodat, A., Gavard, P., Feurer, B., Couderc, F. Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis* **2008**, *29* (1), 207-223.
- Poinsot, V., Gavard, P., Feurer, B., Couderc, F. Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis* **2010**, *31* (1), 105-121.
- Preinerstorfer, B., Schiesel, S., Lammerhofer, M., Lindner, W. Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (3), 312-328.
- Qu, J., Chen, W., Luo, G., Wang, Y., Xiao, S., Ling, Z., Chen, G. Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. *Analyst* **2002a**, *127* (1), 66-69.

- Qu, J., Wang, Y., Luo, G., Wu, Z., Yang, C. Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **2002b**, *74* (9), 2034-2040.
- Rashed, M. S., Bucknall, M. P., Little, D., Awad, A., Jacob, M., Alamoudi, M., Alwattar, M., Ozand, P. T. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles *Clin Chem* **1997**, *43*, 1129-1141.
- Remane, D., Wissenbach, D. K., Meyer, M. R., Maurer, H. H. Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-analyte liquid chromatographic/mass spectrometric procedures. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010a**, *24* (7), 859-867.
- Remane, D., Meyer, M. R., Wissenbach, D. K., Maurer, H. H. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010b**, *24* (21), 3103-3108.
- Riedel, E. Anorganische Chemie. de Gruyter, Berlin, 6. Auflage, **2004**.
- Rizzi, A. Retention and Selectivity. In: *Handbook of HPLC*. Editor: Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. and Miller, N. Dekker, New York, **1998**, Chromatographic Science Series, 78, 1-54.
- Rogalewicz, F., Hoppilliard, Y., Ohanessian, G. Fragmentation mechanisms of α -amino acids protonated under electrospray ionization: a collisional activation and ab initio theoretical study. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *195-196*, 565-590.
- Rogalewicz, F., Hoppilliard, Y. Low energy fragmentation of protonated glycine. An ab initio theoretical study. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *199* (1-3), 235-252.
- RoteListe. Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. *Rote Liste online* **2010**, Stand: August 2010.
- Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3., völlig neu bearbeitete Auflage, **2001**.

- Rychlik, M., Asam, S. Stable isotope dilution assays for quantitation of organic trace compounds in food analysis. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **2009**, *21* (5), 470-482.
- Sarwar, G., Botting, H. G. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1993**, *615* (1), 1-22.
- Schettgen, T., Tings, A., Brodowsky, C., Muller-Lux, A., Musiol, A., Kraus, T. Simultaneous determination of the advanced glycation end product N (epsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387* (8), 2783-2791.
- Schiesel, S., Lämmerhofer, M., Lindner, W. Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of β -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *396* (5), 1655-1679.
- Schlichtherle-Cerny, H., Affolter, M., Cerny, C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. *Anal Chem* **2003**, *75* (10), 2349-2354.
- Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D., Olgemöller, K., Mayatepek, E., Hoffmann, G. F. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* **2003**, *111* (6 Pt 1), 1399-1406.
- SciFinderScholar. CAS Registry Datenbank. **2007**.
- SeQuant. The ZIC[®]-HILIC Column for Separation of Polar and Hydrophilic Compounds - Seminar. **2004**.
- SeQuant. A practical guide to HILIC - A tutorial and application book. SeQuant AB, Umea, Schweden, 1. Auflage, **2006**.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. Practical HPLC method development. Wiley, New York, 2. edition, **1997**.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. Wiley, Hoboken, N.J., 3. edition, **2010**.
- Sojo, L. E., Lum, G., Chee, P. Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. *Analyst* **2003**, *128* (1), 51-54.

- Sonsmann, G. Massenspektrometrische Analyse von Peptiden und Peptidderivaten – Steuerung der Fragmentierung einfach und mehrfach geladener Ionen durch gezielte chemische Modifikationen. Dissertation, Universität Köln, **2001**.
- Spagou, K., Tsoukali, H., Raikos, N., Gika, H., Wilson, I. D., Theodoridis, G. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 716-727.
- Stahlberg, J. Retention models for ions in chromatography. *J Chromatogr A* **1999**, *855* (1), 3-55.
- Stein, J. Praxishandbuch klinische Ernährung und Infusionstherapie. Springer, Berlin, **2003**.
- Stein, J., Boehles, H. J., Blumenstein, I., Goeters, C., Schulz, R. Aminosäuren - Kapitel 4 - Leitlinie Parenterale Ernährung der DGEM. *Aktuel Ernaehr Med* **2007**, *32* (Supplement 1), S 13 - S17.
- Swadesh, J. Temperature Control in Analytical High-Performance Liquid Chromatography. In: *Handbook of HPLC*. Editor: Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. and Miller, N. Dekker, New York, **1998**, Chromatographic Science Series, 78, 607-615.
- Synge, R. L. Analysis of a partial hydrolysate of gramicidin by partition chromatography with starch. *Biochem J* **1944**, *38* (4), 285-294.
- Taylor, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* **2005**, *38* (4), 328-334.
- Unger, K. K., Weber, E. A guide to practical HPLC. GIT Verlag, Darmstadt, **1999**.
- van Leuken, R. G. J., Kwakkenbos, G. T. C., Duchateau, A. L. L. Volatile ion-pairing agents for liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric determination of amino acids and amino acid amides. *J Chromatogr A* **1993**, *647* (1), 131-136.
- Viklund, C., Sjogren, A., Irgum, K., Nes, I. Chromatographic interactions between proteins and sulfoalkylbetaine-based zwitterionic copolymers in fully aqueous low-salt buffers. *Anal Chem* **2001**, *73* (3), 444-452.
- Voyksner, R. D. Advantages of Orthogonal Nebulizer Orientation in Electrospray for Quadrupole and Ion Trap Mass Spectrometers. *Technical Note, Agilent Technologies* **2001**.
- Waterval, W. A., Scheijen, J. L., Ortmans-Ploemen, M. M., Habets-van der Poel, C. D., Bierau, J. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in

- body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. *Clin Chim Acta* **2009**, *407* (1-2), 36-42.
- Weiß, J. Ionenchromatographie. Wiley-VCH, Weinheim, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, **2001**.
- Willoughby, R. C., Sheehan, E. W., Mitrovich, S. A global view of LC-MS. Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania, 2. edition, **2002**.
- Wootner, M., Goodman, S. I. Chromatographic analysis of amino and organic acids in physiological fluids to detect inborn errors of metabolism. *Curr Protoc Hum Genet* **2006**, *Chapter 17*, Unit 17 12.
- Xie, D., Mattusch, J., Wennrich, R. Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* **2010**, *33* (6-7), 817-825.
- Xuan, Y., Scheuermann, E. B., Meda, A. R., Hayen, H., von Wiren, N., Weber, G. Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2006**, *1136* (1), 73-81.
- Yoshida, T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *J Biochem Biophys Methods* **2004**, *60* (3), 265-280.
- Zoppa, M., Gallo, L., Zacchello, F., Giordano, G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006**, *831* (1-2), 267-273.

Anhang

Anhang I

Mathematische Grundlagen zur Regressionsanalyse

Im Folgenden werden die mathematischen Formeln und Hintergründe zur Regressionsanalyse dargestellt, anhand derer die Auswertungen in vorliegender Arbeit durchgeführt wurden (Gottwald 2000).

a) lineare Regression 1. Ordnung

Die Ausgleichsgerade der linearen Regression 1. Ordnung, durch welche bei jedem gemessenen Signalwert y_i der entsprechende Konzentrationswert x_i berechnet werden kann, wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\text{Gl. 7:} \quad y = m \cdot x + b$$

x : unabhängige Größe, hier: c_{AS} [mg/L]

y : abhängige Größe (Messwert), hier: $\text{Area}_{AS} / \text{Area}_{IS}$

m : Steigung der Ausgleichsgeraden

b : Achsenabschnitt

Die beiden Parameter m und b der Geradengleichung lassen sich nach Messung der Kalibrierlösungen wie folgt berechnen:

Die Steigung m der Geraden wird durch Gl. 8 beschrieben.

$$\text{Gl. 8:} \quad m = \frac{\sum (x_i \cdot y_i) - \left[\frac{\sum y_i \cdot \sum x_i}{N} \right]}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}} = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}}$$

m : Steigung der Geraden

y_i : Messwert (hier: $\text{Area}_{AS} / \text{Area}_{IS}$)

Q_{xx} : Quadratsumme xx

x_i : Konzentrationswert

Q_{xy} : Quadratsumme xy

N : Anzahl der Messwerte

Die Quadratsummen Q_{xx} , Q_{yy} und Q_{xy} berechnen sich nach:

$$\text{Gl. 9: } Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$\text{Gl. 10: } Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$\text{Gl. 11: } Q_{xy} = \sum (x_i \cdot y_i) - \left[\frac{(\sum y_i \cdot \sum x_i)}{N} \right]$$

Der Achsenabschnitt b der Geraden berechnet sich nach Gl. 12:

$$\text{Gl. 12: } b = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$$

m : Steigung der Ausgleichsgeraden

\bar{x} : Bereichsmitte der x-Werte

\bar{y} : Bereichsmitte der y-Werte

b : Achsenabschnitt

Die Bereichsmitten \bar{x} und \bar{y} ergeben sich aus folgenden Gleichungen:

$$\text{Gl. 13: } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

$$\text{Gl. 14: } \bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

Die Reststandardabweichung s_y , welche als Maß für die Präzision der linearen Regression herangezogen werden kann, berechnet sich nach Gl. 15. Sie gibt die Streuung der Signalwerte in y-Richtung um die Ausgleichsgerade an, d.h. je größer s_y , desto mehr streuen die Residuen. Ziel der Regressionsanalyse ist demzufolge eine möglichst geringe Reststandardabweichung s_y .

$$\text{Gl. 15: } s_y = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - (m \cdot x_i + b))]^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{Q_{xx} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{yy}}}{N-2}}$$

s_y : Reststandardabweichung

y_i : Messwert (hier: Area_{AS} / Area_{IS})

x_i : Konzentrationswert

m : Steigung der Ausgleichsgeraden

b : Achsenabschnitt

N : Anzahl der Messwerte

Q_{xy} : Quadratsumme xy

Q_{xx} : Quadratsumme xx

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , in welcher Reststandardabweichung s_y und die Empfindlichkeit E - die bei der linearen Regression 1. Ordnung identisch mit der Steigung m ist - zu einem Kennwert zusammengefasst sind, berechnet sich nach Gl. 17:

$$\text{Gl. 16:} \quad s_{x0} = \frac{s_y}{m}$$

s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung
 m : Steigung der Ausgleichsgeraden

s_y : Reststandardabweichung

Eine weitere statistische Kennzahl zur Bewertung der Kalibriergüte ist die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} , welche sich nach Gl. 17 berechnet. Sie bezieht die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} auf die Bereichsmittel \bar{x} (s. Gl. 13) der Konzentrationswerte.

$$\text{Gl. 17:} \quad V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

V_{x0} : relative Verfahrensstandardabweichung
 s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung

\bar{x} : Bereichsmittel

Der Korrelationskoeffizient r gibt an, ob und in wie fern ein Variablenpaar miteinander verknüpft ist, also „korreliert“. Dies geschieht, in dem er die Streuung der Punkte der Regressionsgeraden mit der Gesamtstreuung des Verfahrens vergleicht. Die Berechnung von r erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Gl. 18:} \quad r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 - \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

r : Korrelationskoeffizient
 x_i : Konzentrationswert

y_i : Messwert (hier: Area_{AS} / Area_{IS})

Liegen alle Messwertpunkte exakt auf der berechneten Regressionsgeraden wird der Korrelationskoeffizient r den Wert 1 annehmen. Bei Werten nahe 1 ist ein linearer Zusammenhang zwischen den Konzentrationswerten und den Messwerten wahr-

scheinlich. Das Bestimmtheitsmaß r^2 ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r . Es ergibt „schärfere“ Werte als r und kann ebenfalls zur Abschätzung der Güte der Ausgleichgeraden herangezogen werden.

Allerdings sind durch Betrachtung von r bzw. r^2 keine sicheren Aussagen zur Güte der gewählten Anpassungsfunktion möglich. Diese lässt sich aus den statistischen Kenngrößen s_y , s_{x0} und V_{x0} der linearen Regression 1. Ordnung ablesen, wenn diese mit den Daten der quadratischen Regression (siehe Anhang I b) verglichen werden.

b) quadratische Regression (lineare Regression 2. Ordnung)

Die Ausgleichsgerade der quadratischen Anpassung (lineare Regression 2. Ordnung), durch welche bei Kenntnis der Parameter b , n und m jedem gemessenen Signalwert y_i der entsprechende Konzentrationswert x_i berechnet werden kann, wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\text{Gl. 19: } y = n \cdot x^2 + m \cdot x + b$$

x : unabhängige Größe, hier: c_{AS} [mg/L]

y : abhängige Größe (Messwert), hier: $\text{Area}_{AS} / \text{Area}_{IS}$

n : Parameter der Kalibrierfunktion (quadratische Steigung)

m : Parameter der Kalibrierfunktion

b : Achsenabschnitt

Die Berechnung der Parameter n , m , und b , aus den bei der Kalibrierung gemessenen x_i - und y_i - Werten erfolgt nach folgenden Gleichungen:

$$\text{Gl. 20: } n = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}}$$

$$\text{Gl. 21: } m = \frac{Q_{xy} - n \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$\text{Gl. 22: } b = \frac{[\sum y_i - m \cdot \sum x_i - n \cdot \sum x_i^2]}{N}$$

Die „Q-Summen“ Q_{xx} , Q_{xy} , Q_{x^3} , Q_{x^4} und Q_{x^2y} werden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Gl. 23: } Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$\text{Gl. 24: } Q_{xy} = \sum (x_i \cdot y_i) - \left[\frac{\sum y_i \cdot \sum x_i}{N} \right]$$

$$\text{Gl. 25: } Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left[\frac{\sum y_i \cdot \sum x_i^2}{N} \right]$$

$$\text{Gl. 26: } Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left[\frac{(\sum x_i^2)^2}{N} \right]$$

$$\text{Gl. 27: } Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \cdot y_i) - \left[\frac{\sum y_i \cdot \sum x_i^2}{N} \right]$$

Die Reststandardabweichung s_y errechnet sich nach

$$\text{Gl. 28: } s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - b \cdot \sum y_i - m \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - n \cdot \sum (x_i^2 \cdot y_i)}{N-3}}$$

Da sich die Empfindlichkeit E bei der quadratischen Anpassung ständig ändert, kann sie nicht durch die Steigung ersetzt werden. Sie wird vielmehr ausgedrückt als Tangentensteigung an die Funktion in der Mitte des Arbeitsbereichs (s. Gl. 29).

$$\text{Gl. 29: } E = m + 2 \cdot n \cdot \bar{x}$$

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} sowie die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} berechnet sich wie bei der linearen Regression 1. Ordnung (Anhang I a).

Zur Abschätzung welches Regressionsmodell zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Messwert und Konzentrationswert geeigneter ist, vergleicht man die Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der beiden Bestimmungen (linear bzw. quadratisch). Als „besser“ ist diejenige Strategie anzusehen, bei welcher V_{x0} geringer ist. Um zufällige Abweichungen der Werte auszuschließen, also die statistische Signifikanz nachzuweisen, wird der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt.

c) Anpassungstest nach Mandel

Der Anpassungstest nach Mandel wird durchgeführt, wenn die Verfahrensstandardabweichung V_{x0} der quadratischen Anpassung kleiner ist als die der linearen Regression. Er dient wie erwähnt dazu, die Signifikanz des Unterschiedes nachzuweisen.

Dazu wird aus den Reststandardabweichungen der beiden Verfahren die Varianzdifferenz Δs^2 berechnet,

$$\text{Gl. 30: } \Delta s^2 = [(N_{lin} - 2) \cdot s_{lin}^2] - [(N_{quad} - 3) \cdot s_{quad}^2]$$

Δs^2 : Varianzdifferenz

N : Anzahl Messwerte

s_{lin}^2 : Varianz der Reststandardabweichung der linearen Anpassung

s_{quad}^2 : Varianz der Reststandardabweichung der quadratischen Anpassung

Diese Varianzdifferenz Δs^2 wird mit der Varianz der quadratischen Anpassung s_{quad}^2 über einen F-Test (P=99%) abgeglichen. Dazu wird die Prüfgröße PG berechnet, welche anschließend mit dem F -Wert aus der F -Wert-Tabelle verglichen wird.

$$\text{Gl. 31: } PG = \frac{\Delta s^2}{s_{quadr}^2}$$

Die Differenz der Freiheitsgrade beträgt aufgrund der gleichen Anzahl an Messwerten nach Gl. 32 immer 1, so dass f_1 , welcher die Varianzendifferenz repräsentiert, immer 1 annimmt.

Gl. 32: $\Delta f = (N - 2) - (N - 3) = f_1$

Gl. 33: $f_2 = N - 3$

Man vergleicht die Prüfgröße PG mit dem F -Wert aus der F -Wert-Tabelle. Sofern die PG größer als der Tabellenwert ist, muss von einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Verfahrenstandardabweichungen ausgegangen werden, die quadratische Anpassung ist der linearen Regression 1. Ordnung vorzuziehen.

Anhang II

Auswertung der Systempräzision und der Methodenpräzision anhand der Retentionszeiten

Tabelle Anhang 3-3: Ergebnisse der Bestimmung der Systempräzision im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der **Retentionszeiten** (t_r) von AS und IS sowie des Quotienten $t_{r,AS} / t_{r,IS}$, die Standardabweichung (SD) von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und dem Quotienten $t_{r,AS} / t_{r,IS}$, sowie die relative Standardabweichung (RSD) von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und dem Quotienten $t_{r,AS} / t_{r,IS}$ nach Sechsfachbestimmung. Zur Auswertung werden die RSD-Werte von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und $t_{r,AS} / t_{r,IS}$ herangezogen, die gemäß den Anforderungen unter 1% liegen müssen. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund der fehlenden entsprechenden isotope markierten Referenz D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS	t_r AS x_m	t_r IS x_m	$t_{r,AS} / t_{r,IS}$ x_m	SD AS	SD IS	SD $t_{r,AS} / t_{r,IS}$	RSD AS	RSD IS	RSD $t_{r,AS} / t_{r,IS}$
NACcys	4.226	4.226	1.00004	0.002	0.004	0.0009	0.049	0.103	0.0891
NACtyr	3.232	5.871	0.55053	0.002	0.004	0.0005	0.062	0.071	0.0909
Ala	14.990	15.003	0.99918	0.003	0.004	0.0001	0.022	0.026	0.0109
Arg	19.132	19.134	0.99991	0.002	0.004	0.0001	0.012	0.021	0.0108
Asn	16.236	16.238	0.99986	0.003	0.004	0.0001	0.017	0.022	0.0133
Asp	17.164	17.162	1.00014	0.004	0.004	0.0000	0.024	0.025	0.0030
Glu	16.096	16.083	1.00081	0.004	0.004	0.0001	0.024	0.026	0.0068
Gly	15.972	15.976	0.99975	0.002	0.003	0.0001	0.015	0.018	0.0056
His	18.798	18.803	0.99973	0.002	0.003	0.0001	0.012	0.018	0.0101
Ile	7.197	7.204	0.99908	0.003	0.005	0.0009	0.042	0.072	0.0907
Leu	6.446	6.470	0.99629	0.005	0.003	0.0009	0.079	0.043	0.0919
Lys	19.549	19.551	0.99987	0.003	0.003	0.0001	0.017	0.017	0.0084
Met	7.889	7.933	0.99443	0.003	0.004	0.0007	0.039	0.056	0.0656
Orn	19.765	19.770	0.99971	0.004	0.003	0.0002	0.021	0.017	0.0156
Phe	5.480	5.524	0.99191	0.003	0.003	0.0007	0.051	0.049	0.0667
Pro	12.907	13.077	0.98703	0.009	0.006	0.0010	0.072	0.048	0.0964
Ser	16.201	16.211	0.99935	0.002	0.003	0.0001	0.015	0.017	0.0065
Thr	15.149	15.153	0.99977	0.003	0.003	0.0001	0.021	0.019	0.0055
Trp	5.815	5.871	0.99043	0.005	0.004	0.0008	0.078	0.071	0.0792
Tyr	9.159	9.166	0.99924	0.008	0.007	0.0015	0.092	0.076	0.1455
Val	10.111	10.224	0.98895	0.005	0.006	0.0005	0.048	0.057	0.0552

Tabelle Anhang 3-4: Ergebnisse der Bestimmung der Methodenpräzision im Rahmen der Validierung zur Quantifizierung von AS in Infusionslösungen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der **Retentionszeiten** (t_r) von AS und IS sowie des Quotienten $t_{r,AS}/t_{r,IS}$, die Standardabweichung (SD) von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und dem Quotienten $t_{r,AS}/t_{r,IS}$, sowie die relative Standardabweichung (RSD) von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und dem Quotienten $t_{r,AS}/t_{r,IS}$ nach Sechsfachbestimmung. Zur Auswertung werden die RSD-Werte von $t_{r,AS}$, $t_{r,IS}$ und $t_{r,AS}/t_{r,IS}$ herangezogen, die die gemäß den Anforderungen unter 1% liegen müssen. Zur Berechnung der Werte für NAcTyr wurde aufgrund der fehlenden entsprechenden isotonenmarkierten Referenz D₅-Trp als IS verwendet. Durchführung, experimentelle Bedingungen und Auswertung siehe Abschnitt D 3.4.

AS	t_r AS x_m	t_r IS x_m	$t_{r,AS}/t_{r,IS}$ x_m	SD AS	SD IS	SD $t_{r,AS}/t_{r,IS}$	RSD AS	RSD IS	RSD $t_{r,AS}/t_{r,IS}$
NAcCys	4.220	4.219	1.00008	0.006	0.005	0.0007	0.136	0.130	0.0744
NAcTyr	3.221	5.843	0.55121	0.004	0.006	0.0004	0.132	0.094	0.0796
Ala	14.948	14.961	0.99912	0.031	0.030	0.0002	0.209	0.197	0.0214
Arg	19.097	19.099	0.99989	0.007	0.008	0.0002	0.039	0.043	0.0167
Asn	16.193	16.194	0.99992	0.018	0.020	0.0002	0.113	0.123	0.0155
Asp	17.118	17.113	1.00025	0.014	0.015	0.0001	0.082	0.089	0.0121
Glu	16.043	16.033	1.00062	0.021	0.019	0.0001	0.131	0.122	0.0111
Gly	15.927	15.931	0.99975	0.022	0.022	0.0001	0.136	0.137	0.0079
His	18.757	18.763	0.99972	0.008	0.009	0.0002	0.045	0.050	0.0210
Ile	7.194	7.201	0.99903	0.008	0.004	0.0008	0.115	0.054	0.0777
Leu	6.442	6.467	0.99606	0.005	0.004	0.0003	0.082	0.065	0.0292
Lys	19.517	19.518	0.99997	0.006	0.006	0.0001	0.032	0.033	0.0053
Met	7.872	7.917	0.99434	0.006	0.008	0.0005	0.078	0.103	0.0488
Orn	19.728	19.736	0.99963	0.006	0.005	0.0001	0.030	0.026	0.0123
Phe	5.467	5.510	0.99226	0.005	0.006	0.0006	0.094	0.106	0.0647
Pro	12.883	13.061	0.98640	0.019	0.028	0.0007	0.151	0.218	0.0714
Ser	16.158	16.170	0.99927	0.018	0.019	0.0001	0.114	0.119	0.0113
Thr	15.121	15.124	0.99983	0.022	0.022	0.0001	0.145	0.143	0.0116
Trp	5.787	5.843	0.99036	0.006	0.006	0.0008	0.111	0.094	0.0821
Tyr	9.117	9.120	0.99963	0.008	0.006	0.0006	0.091	0.061	0.0608
Val	10.107	10.230	0.98793	0.007	0.006	0.0003	0.072	0.055	0.0349