

**ERHEBUNG PHARMAKOKINETISCHER DATEN VON
CISAPRID, SC-72393, HALOPERIDOL, LINEZOLID,
METHOTREXAT UND KETOPROFEN NACH
METHODENENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG
DURCH LC-MS/MS-DETEKTION**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Sven Steinhauer
aus Limburg/Lahn

Würzburg 2002

Eingereicht am: 12. Dezember 2002
Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Holzgrabe
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Sörgel
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. U. Holzgrabe
2. Prüfer: Prof. Dr. P. Schreier
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2003

Doktorurkunde ausgehändigt am:

DANKSAGUNG

Die praktischen Tätigkeiten der vorliegenden Arbeit wurden am
Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung Heroldsberg
unter der Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Fritz Sörgel durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Fritz Sörgel
danke ich für die Themenstellung und die wissenschaftlichen Freiheiten bei der
Bearbeitung des Themas. Seine fachliche und menschliche Unterstützung, sowie seine
ständige Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
danke ich für die Betreuung der Arbeit in Würzburg und Ihre immer vorhandene
Bereitschaft über die weiten Entfernungen Zeit für diese Arbeit
und meine Fragen gefunden zu haben.

Herrn Prof. Dr. Schreier möchte ich danken, sich bereiterklärt zu haben, die mündliche
Prüfung mit durchzuführen.

Allen Mitarbeitern des IBMP, die mit mir zusammen gearbeitet haben, möchte ich Dank
sagen für die gute Zusammenarbeit. Bei Frau Dr. Kinzig-Schippers möchte ich mich
bedanken für die ständige Hilfe und Anregungen mit den Systemen. Herrn Jürgen Bulitta
danke ich für die erklärenden Stunden in der Pharmakokinetik. Herrn Dr. Christian Sauber
sei gedankt für die gemeinsamen Jahre im Meßraum und die anregenden Gedanken.

Der Firma Dr. Specht & Partner GmbH Chemische Laboratorien danke ich für die
Unterstützung während der schriftlichen Tätigkeit dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden,
die seit langem auf diese Schrift und zu häufig auf mich gewartet haben.

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	2
2.2	Massenspektrometrie	6
2.2.1	Probeneinlaßsysteme.....	6
2.2.2	Ionisierungstechniken	9
2.2.2.1	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI)	10
2.2.2.2	Elektrospray-Ionisierung (ESI).....	13
2.2.3	Massenanalytoren	17
2.2.4	Verwendete Massenspektrometer	20
2.3	Probenvorbereitung und Injektionsvarianten.....	22
2.4	Pharmakokinetik.....	26
2.5	Validierung	33
2.5.1	Referenzmaterialien	33
2.5.2	Spezifität der Methode.....	34
2.5.3	Validierung des dynamischen Messbereichs (Konzentrationsbereich)	34
2.5.4	Validierung der Präzision und Genauigkeit der Methode durch Qualitätskontrollproben (QC).....	36
2.5.4.1	Präzision von Tag zu Tag.....	38
2.5.4.2	Präzision innerhalb eines Tages	38
2.5.4.3	Präzision von hämolytischem Plasma	38
2.5.4.4	Validierung der Aufarbeitungsstabilität.....	38
2.5.4.5	Validierung der Stabilität bei Raumtemperatur	38
2.5.4.6	Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen	39
2.5.4.7	Validierung einer Langzeitstabilität.....	39
2.5.5	Bestimmung der Wiederfindungsrate	39
3	Geräte und Materialien	41
3.1	Geräte und Materialien	41
3.2	Software.....	44

4 Cisaprid	45
Chemie.....	45
Pharmakokinetische Daten	46
Zielsetzung.....	47
4.1 Geräte und Materialien	48
4.2 Methodenentwicklung und Vorversuche.....	49
4.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen.....	49
4.2.2 Chromatographische Bedingungen.....	54
4.2.3 Aufarbeitung	57
4.2.4 Ergebnisse und Diskussion der Vorversuche.....	59
4.3 Ergebnisse der Methodvalidierung von Cisaprid in Humanplasma	66
4.3.1 Spezifität der Methode.....	66
4.3.2 Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)	66
4.3.3 Präzision von Tag zu Tag	67
4.3.4 Präzision innerhalb eines Tages.....	69
4.3.5 Präzision von hämolytischem Plasma.....	70
4.3.6 Validierung der Aufarbeitungsstabilität.....	71
4.3.7 Validierung der Stabilität bei Raumtemperatur	73
4.3.8 Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen	75
4.3.9 Validierung einer Langzeitstabilität.....	76
4.3.10 Bestimmung der Wiederfindungsrate	78
4.4 Diskussion der Validierungsergebnisse.....	80
4.5 Bioäquivalenzstudie.....	81
4.5.1 Studiendesign und Probanden.....	81
4.5.2 Ergebnisse und Diskussion der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben während der Studie.....	83
4.5.3 Ergebnisse und Diskussion der Formulierung C	85
4.6 Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Cisaprid in Humanplasma.....	90

5	SC-72393	92
	Chemie	92
	Pharmakologische Daten	93
	Zielsetzung	93
5.1	Geräte und Materialien	94
5.2	Methodenentwicklung und Vorversuche	96
5.2.1	Massenspektrometrische Bedingungen	96
5.2.2	Chromatographische Bedingungen	98
5.2.3	Aufarbeitung	100
5.3	Ergebnisse der unabhängigen Methodvalidierung von SC-72393 in Human- plasma	101
5.3.1	Spezifität der Methode:	102
5.3.2	Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)	102
5.3.3	Präzision von Tag zu Tag	103
5.3.4	Präzision innerhalb eines Tages	105
5.3.5	Präzision von hämolytischem Plasma	105
5.3.6	Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen	107
5.3.7	Validierung einer Langzeitstabilität	108
5.4	Zusammenfassung und Diskussion der Validierungsergebnisse	109
5.5	Studien zur oralen Applikation von SC-72393	110
5.5.1	Studiendesign und Probanden	110
5.5.2	Ergebnisse und Diskussion der Qualitätskontrollproben während der Studien	111
5.6	Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von SC-72393 in Humanplasma	114
6	Haloperidol	116
	Chemie	116
	Pharmakokinetische Daten	117
	Haloperidol-Decanoat	117
	Zielsetzung	118

6.1	Geräte und Materialien	119
6.2	Methodenentwicklung	120
6.2.1	Massenspektrometische Bedingungen	120
6.2.2	Chromatographische Bedingungen	126
6.2.3	Aufarbeitung	129
6.2.4	Prüfung auf Validität der Methode	131
6.3	Studie	132
6.3.1	Studiendesign und Probanden	132
6.3.2	Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben	133
6.3.3	Ergebnisse und Diskussion der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben während der Studie	134
6.3.4	Pharmakokinetische Ergebnisse und Diskussion der Haloperidolstudie	136
6.4	Zusammenfassung und Diskussion der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Haloperidol in Humanplasma	139
7	Linezolid.....	144
	Chemie	144
	Pharmakokinetische Daten	145
	Zielsetzung	147
7.1	Geräte und Materialien	147
7.2	Methodenentwicklung	148
7.2.1	Massenspektrometische Bedingungen	149
7.2.2	Chromatographische Bedingungen	153
7.2.3	Aufarbeitung	154
7.2.4	Prüfung auf Validität der Methode	157
7.2.5	Diskussion	160
7.3	Studie	161
7.3.1	Studiendesign	161
7.3.2	Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben	162
7.3.3	Studienergebnisse	164

7.3.3.1	Ergebnisse im Plasma	165
7.3.3.2	Ergebnisse im Urin.....	167
7.4	Diskussion und Zusammenfassung.....	169
8	Methotrexat	171
Chemie.....		171
Pharmakokinetische Daten		172
Zielsetzung.....		173
8.1	Geräte und Materialien	173
8.2	Methodenentwicklung	175
8.2.1	Massenspektrometrische Bedingungen.....	175
8.2.2	Chromatographische Bedingungen.....	181
8.2.3	Aufarbeitung	182
8.2.4	Prüfung auf Validität der Methode	184
8.3	Studie	185
8.3.1	Studiendesign.....	185
8.3.2	Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben	186
8.3.3	Studienergebnisse	189
8.4	Zusammenfassung	191
9	Ketoprofen	193
Chemie.....		193
Pharmakokinetische Daten		194
Zielsetzung.....		195
9.1	Geräte und Materialien	195
9.1.1	Geräte und Materialien für die Methode in Plasma.....	196
9.1.2	Geräte und Materialien für die Methode in Dialysat.....	197
9.2	Methodenentwicklung	198
9.2.1	Massenspektrometrische Bedingungen.....	199
9.2.2	Chromatographische Bedingungen.....	201

9.2.3	Aufarbeitung	203
9.2.4	Ergebnisse der Vorversuche	204
9.3	Ergebnisse der Methodvalidierung von Ketoprofen	204
9.3.1	Methodvalidierung von Ketoprofen in Humanplasma.....	205
9.3.1.1	Spezifität der Methode	205
9.3.1.2	Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich).....	205
9.3.1.3	Präzision von Tag-zu-Tag	207
9.3.1.4	Präzision innerhalb eines Tages	209
9.3.1.5	Präzision von hämolytischem Plasma	209
9.3.1.6	Validierung der Aufarbeitungsstabilität.....	210
9.3.1.7	Validierung der Raumstabilität	213
9.3.1.8	Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen	214
9.3.1.9	Validierung einer Langzeitstabilität.....	216
9.3.1.10	Bestimmung der Wiederfindungsrate	218
9.3.2	Methodvalidierung von Ketoprofen im Dialysat	219
9.3.2.1	Spezifität der Methode	219
9.3.2.2	Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich).....	219
9.3.2.3	Präzision von Tag zu Tag.....	222
9.4	Diskussion der Validierungsergebnisse.....	224
9.5	Studie	226
9.5.1	Studiendesign und Probanden.....	226
9.5.2	Ergebnisse der Dialysatproben von Ketoprofen	228
9.5.2.1	Ergebnisse der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben	228
9.5.2.2	Ergebnisse der Probandenproben.....	229
9.5.3	Ergebnisse der Plasmaproben von Ketoprofen	232
9.5.3.1	Ergebnisse der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben	232
9.5.3.2	Ergebnisse der Probandenproben.....	233
9.5.4	Diskussion der Ergebnisse aus der Studie	237
9.6	Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Ketoprofen in Plasma und Mikrodialysat	240

10 Zusammenfassung.....	242
11 Summary.....	248
12 Literaturverzeichnis	253

[M ± H] ⁻	Molekül-Ion ± Wasserstoffatom
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Å	Längenmaß 10 ⁻¹⁰ Meter
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
A-SPE	Aufarbeitungsfehler
bar	Druckeinheit
CI	Chemische Ionisierung
CID	Kollisions Induzierte Dissoziation
CIP	Ciprofloxacin
CIS	Cisaprid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
C _{max}	Maximalkonzentration
COX	Cyclooxygenase
CPMP	Committe for Proprietary Medical Products
cps	Signalratenpunkte pro Sekunde
CR	Kalibriergerade
CV	relative Standardabweichung, bzw. Variationskoeffizient
EI	Elektronenstoßionisierung
ESI	Elektrospray Ionisierung
eV	Elektronen Volt
FT	Fourier Transformation
g	Erdanziehungskraft
GC	Gaschromatographie
GLP	Gute Labor Praxis
h	Stunde
HEMO	hämolytisches Plasma
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
ICR	Ionen Cyclotron Resonanz
ISV	Ionisierungsspannung an der Kapillare des Elektrospray-Interface
kg	Kilogramm

kV	Kilovolt
l	Liter
L _{Zahl}	Kalibrierstandard
LC	Flüssigkeitschromatographie
LZD	Linezolid
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisierung
MCA Modus	Modus, indem die Signale aufaddiert werden
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrische Detektion
ms	Millisekunden
Mw	Molekulargewicht
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)
NSAR	Nicht-Steroiden Antiphlogistika
OR	Mikroöffnung am Massenspektrometer
pg	Picogramm (10 ⁻¹² g)
psi	Druckeinheit (pressure per square inch)
Q0, Q1, Q2, Q3	Quadrupole
QC	Qualitätskontrollproben
R02	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
R03	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
R2	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
R3	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
RE	Richtigkeit
RNG	Ringspannung am Massenspektrometer
RNS	Ribonukleinsäure
RW	Richtiger Wert
Rx	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
s	Standardabweichung

scan	Aufnahmepunkt für Daten
SFC	Superkritische Flüssigkeitschromatographie
SL	Stammlösung
SPE	Festphasenextraktion
ST3	Spannung an Quadrupol im Massenspektrometer
TOF	Time of Flight Massenfilter
u	Atomare Masseneinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

1 Einleitung

Bei der Entwicklung von Pharmaka müssen diese auf ihre Wirkung untersucht werden. In Experimenten am Tier oder an Probanden werden dabei neben den physiologischen Beobachtungen die Wirkstoffkonzentrationen in den biologischen Systemen quantifiziert. Die Pharmakokinetik, die sich mit der zeitlichen Änderung der Wirkstoffkonzentrationen nach der Applikation befaßt, ist heute eine essentielle Disziplin der Arzneimittelwissenschaft, da es unverzichtbar ist, das Schicksal des Wirkstoffes im Körper zu kennen, um ein Arzneimittel therapeutisch optimal einzusetzen.

Die Analytik von Wirkstoffen aus komplexen biologischen Matrices stellte daher immer eine hohe Anforderung an den Analytiker. Es galt dabei zwei Aufgaben optimal zu erfüllen: Zum einen mußte der Wirkstoff eindeutig als solcher identifiziert werden. Bei der großen Anzahl an endogenen Stoffen muß dies durch einen sehr selektiven Detektor, oder bei unselektiven Detektoren, nach einer aufwendigen Probenvorbereitung erfolgen. Zum anderen muß der Wirkstoff in geringen Konzentrationen zu quantifizieren sein. Neben den wissenschaftlichen Anforderungen bedingen wirtschaftliche Aspekte ein Optimum des Probendurchsatzes, bei einem minimalen materiellen und personellen Aufwand. Zusätzlich muß die Analytik robust und präzise sein, um wenig Fehlmessungen oder Ausfallzeiten zu verursachen. Als analytisches Detektionssystem, welches diese Anforderungen derzeit am besten erfüllt, hat sich im letzten Jahrzehnt die LC-MS/MS-Technik durchgesetzt. Sie ist eines der selektivsten und empfindlichsten Detektionssysteme, die verfügbar sind. Die hohe Selektivität ermöglicht es, den Aufwand der Probenvorbereitung und damit die Kosten gering zu halten. Die hohe Empfindlichkeit ermöglicht es zusätzlich, Konzentrationen selbst aus sehr geringen Probenvolumina, wie sie bei der Bestimmung aus biologischen Matrices (Plasma, Urin und Mikrodialysat) vorkommen, zu quantifizieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für die Wirkstoffe Cisaprid, SC-72393, Haloperidol, Linezolid, Methotrexat und Ketoprofen Methoden zu entwickeln, mit denen die Wirkstoffkonzentrationen in vorgegebenen Matrices bestimmt werden konnten. Die Methoden sollten bislang bekannte Methoden in Bezug auf die oben aufgeführten Anforderungen übertreffen und effiziente Messungen gewährleisten. Zusätzlich wurden die Methoden validiert bzw. auf ihre Validität hin überprüft. Die Methoden wurden anschließend unter Bedingungen der Guten Laborpraxis (GLP) in klinischen Studien zur Anwendung gebracht. Gegebenenfalls wurden außerdem pharmakokinetische Parameter bestimmt.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Teil sollen zum einen die Grundlagen, der in dieser Arbeit verwendeten Techniken skizziert werden (HPLC; MS; und Probenvorbereitung) und zum anderen soll der theoretische Hintergrund für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter, sowie die Erläuterung der durchgeführten Experimente zur Validierung der entwickelten Methoden geschaffen werden. Dabei werden im wesentlichen die für die Arbeit wichtigen Aspekte betrachtet.

2.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Chromatographie allgemein bezeichnet die physikalische Trennung zweier und mehr Komponenten, die sich aufgrund ihres Verteilungskoeffizienten in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen unterschiedlich gut lösen. Dabei fließt eine mobile Phase an einer stationären Phase vorbei. Der chromatographische Prozeß erfolgt durch Adsorption und Desorption der Komponenten an die stationäre Phase. Die mobile Phase gibt dabei der jeweiligen Technik ihren Namen. Neben der Flüssigkeitschromatographie (LC), die in dieser Arbeit verwendet wurde, existieren die Gaschromatographie (GC) und die Superkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC).

Die Ursprünge der Chromatographie gehen auf den russischen Botaniker Tswett^[1] zurück, der im Jahre 1906 einen Pflanzenextrakt auf einen mit Kalziumcarbonat gefüllten Glaszylinder auftrug und die Trennung der im Extrakt enthaltenen Farbstoffmoleküle beobachtete. Seine Entdeckung führte nicht zu einer kontinuierlichen Entwicklung der Chromatographie, sie fand keine wesentliche Beachtung. Erst 1931 wurde von Kuhn *et al.*^[2] die Originalarbeit von Tswett erfolgreich wiederholt. Weitere 10 Jahre später veröffentlichten Martin und Synge^[3] eine Flüssig-Flüssig-Chromatographie mit der sie Acetylaminosäuren trennten. Die stationäre Phase Wasser wurde durch Kieselgel gehalten. Entscheidend jedoch war die Aussage von Martin, die größtmögliche Trennleistung bei Verwendung von kleinen Partikeln und einem maximalen Druckunterschied entlang der Trennsäule, zu erhalten. Den Vorteil des schnelleren Phasenübergangs bei Verwendung einer gasförmigen mobilen Phase wurde ebenfalls nicht sofort aufgegriffen. Die Umsetzung dieser Erkenntnisse von James und Martin^[4] führte zuerst zur Gaschromatographie. Diese entwickelte sich innerhalb einer Dekade zu einer Standardtechnik. Nachdem Anfang der

60er Jahre die Entwicklungsmöglichkeiten der GC weithin ausgeschöpft schienen, wandte sich die Wissenschaft der LC zu. Die technisch schwierigere Umsetzung der LC ließ diese nicht vergleichbar schnell der GC zu einer Routine-Analytik-Methode werden. Allein die Verringerung der Partikelgröße in der Säule, beinhaltete zwei Probleme. Der sich daraus ergebende Gegendruck mußte durch neue Pumpsysteme überwunden werden. Das Aufbringen der Probe auf die Säule mußte durch ein Ventil erfolgen und die Verbindungen zwischen Pumpsystem und Säule den Drücken standhalten. Dies führte zu der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit üblichen Säulenlängen zwischen 20 – 250 mm und einem Innendurchmesser von 2.0 – 4.6 mm, wie sie bis heute verwendet werden.

Das weitaus größere Problem jedoch war die reproduzierbare Herstellung von Säulenfüllungen mit Partikeln $< 30 \mu\text{m}$. Erst 1973 konnten Säulen mit $10 \mu\text{m}$ Partikeln reproduzierbar gepackt werden.^[5]

Neben der Lösung der mechanischen Probleme der stationären Phase wurde auch an der chemisch veränderten Oberfläche der stationären Phase gearbeitet. Anfangs konnten bei der Flüssig-Flüssig-Chromatographie mit polaren Säulenmaterialien (Kieselgel) nur weitgehend unpolare Moleküle zufriedenstellend getrennt werden (Normal-Phasen-Chromatographie). Die chemische Umsetzung der freien Hydroxylgruppen des Kieselgels mit Chlorsilanen führte zur Umkehrung der Polarität der stationären Phase (Umkehrphasen oder Reversed-Phase-Chromatographie). Die Gruppen zur Modifizierung des Basismaterials geben in der Umkehrphasenchromatographie den Säulen ihren Namen (Bsp. C_{18} , C_8 , phenyl, C_6 , C_4 , C_2 , CN, diol und NH_2). Als mobile Phase konnten polare Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril, Methanol und Wasser eingesetzt werden, um polare Moleküle zu trennen. Über die Wahl des eingeführten Alkylrestes kann die Polarität der stationären Phase bestimmt werden und somit die Retention des Analyten. Die Retention eines Analyten nimmt bei der Umkehrphasenchromatographie mit zunehmender Alkylänge zu^[6] und steigender Polarität ab.^[7]

Probleme ergaben sich bei der Umsetzung, die nicht vollständig alle Silanol-Gruppen erfaßte. An den verbleibenden freien Silanol-Gruppen können Adsorptionen von Bestandteilen der Matrix stattfinden, die durch das Elutionsmittel nicht wieder gelöst werden und somit das chromatographische Verhalten der Säule mit zunehmender Nutzung stark verändern. Dies wird z.B. in Kapitel 9.2.2 sichtbar, wo ein Säulenwechsel notwendig wurde,

da sich auf einer Säule das chromatographische Verhalten nach nur wenigen Injektionen nachteilig änderte.

Weiterhin mußten die Hersteller eine Reproduzierbarkeit sicherstellen. Dies war nur möglich mit identischem oder nahezu identischem Basismaterial. Neben der Vorbehandlung des Kieselgels werden heute leichter zu reproduzierende Polymere als Basismaterialien verwendet. Eine Nachbehandlung des Kieselgels mit kleinen Molekülen zur weiteren Umsetzung der freien Silanol-Gruppen (endcapped) wird von vielen Herstellern ebenso durchgeführt wie eine systematische Vernetzung der Kieselgel-Oberfläche, um den Einfluß der freien Silanol-Gruppen zu minimieren. Die sich daraus ergebenden Vorteile sind neben der gewünschten hohen Reproduzierbarkeit, ein größerer pH-Bereich, in dem die Säulen eingesetzt werden können. Zusätzlich werden unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Basismaterial unterdrückt. Die Peakform von basischen Substanzen konnte durch diese Modifikationen seit den 1970er drastisch verbessert werden. Heute nimmt in der Analytik von kleinen Molekülen die Umkehrphasen-Chromatographie nahezu 90 % ein.^[5]

In den Anfängen der HPLC gaben die Säulen die technischen Rahmenbedingungen vor. Seit dieser Zeit enthält eine Standard-HPLC-Anlage eine Säule mit einem Innendurchmesser von ≥ 2 mm. Die Anforderungen an die moderne Analytik heute verlangt jedoch eine möglichst hohe Empfindlichkeit bei sehr geringem Probenmaterial. Hält man in der nachfolgenden Gleichung aus Niessen^[7] alle Parameter konstant bis auf den Innendurchmesser der Säule, so erhält man einen theoretisch quadratischen Anstieg der Maximalkonzentration (C_{\max}) des Analyten bei Verringerung des Innendurchmessers.

$$C_{\max} = \frac{4 M \sqrt{N}}{\pi d^2 \varepsilon L (1 + k') \sqrt{2\pi}}$$

M = injizierte Masse	k' = Säulenkapazität
N = Trennstufenzahl	ε = Porösität
d = Säulendurchmesser	L = Säulenlänge

Covey^[8] zeigt die praktische Anwendung mit einem Massenspektrometer als Detektor bis zu einem Säuleninnendurchmesser vom 0.18 mm. Die so starke Verringerung des Innendurchmessers bedingt wieder neue Anforderungen an die weiteren Systemkomponenten. Neben speziellen Pumpen, die geringe Flüsse zwischen 2 - 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ pulsationsfrei fördern können, müssen die Injektionsvolumina ebenfalls reduziert werden. Ebenso sind die Volumina der Verbindungskapillaren entsprechend gering zu halten. Der reduzierte Säuleninnendurchmesser bedingt daneben eine Abnahme der Säulenkapazität. Nicht zuletzt sind

erneut die Partikelgrößen der stationären Phase eine Komponente, die limitierend wirkt, da diese nicht entsprechend der Reduzierung der Innendurchmesser verringert werden können. Im analytischen Routinebetrieb muß abgewogen werden, ob ein notwendiger Empfindlichkeitsgewinn nur durch die Verringerung des Säuleninnendurchmessers zu erreichen ist. Bei ausreichender Menge an zu analysierender Probe kann eine Konzentrierung der Probe oder ein höheres Injektionsvolumen ebenfalls den gewünschten Erfolg bringen. Dies ist wie unter 2.2.2 erläutert auch von der verwendeten Ionisierungsquelle abhängig.

2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine empfindliche Methode, bei der Moleküle ionisiert und im folgenden nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis getrennt und detektiert werden. Sie kann neben der Molekülmasse, Aufschlüsse über die Zusammensetzung und Struktur von Molekülen geben. Das erhaltene Massenspektrum ist eine graphische Darstellung der relativen Intensität gegen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z).

Ein Massenspektrometer kann in mehrere Bereiche aufgeteilt werden. Nach dem Einbringen der Probe (Interface) muß diese ionisiert werden (Ionisierungsquelle). Im folgenden wird die Probe nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis getrennt (Massenfilterung) und die Ionen detektiert. Die Detektion erfolgt mit einem Sekundärelektronen-Vervielfacher und die anfallenden Daten werden heute mit den von den Herstellern zur Verfügung gestellten Softwareprogrammen bearbeitet. Auf diese beiden Punkte soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Vorgestellt werden Lösungen zur Ionisierung der Probe und dem Übergang von Atmosphärendruck in dem unter Vakuum stehenden Analysatorteil bei der Kopplung einer HPLC-Anlage mit einem Massenspektrometer. Ebenso wird ein kurzer Überblick über die bestehenden und verwendeten Massenfilter gegeben.

2.2.1 Probeneinlaßsysteme

Das Einbringen der Probe in den Massenfilter beinhaltet das Problem, die Probe von Atmosphärendruck in ein Hochvakuum zu überführen. Grundsätzlich können die Probeneinlaßsysteme in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Zum einen kann eine einzelne Probe eingebracht werden, zum anderen ein kontinuierlicher Fluß an Material.

Das direkte Einbringen der Probe mit Schleusensystemen^[9] wurde lange Zeit praktiziert, genügte jedoch nicht mehr den Anforderungen, die an ein System gestellt werden, welches ein Massenspektrometer als Detektor zur quantitativen Bestimmung von Analyten mit Molekülmassen bis zu 2000 u aus einer chromatographischen Trennung verwendet.

Bei der Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer mußten drei Probleme gelöst werden: Erstens mußte die mobile Phase in den gasförmigen Zustand überführt werden. Zweitens mußten die Analyten ionisiert werden, falls sie nicht bereits in der mobilen Phase

ionisiert vorlagen und drittens mußte das entstehende Gasvolumen entfernt werden, um nicht das Vakuum im Massenfilter zu verlieren.^[10]

Die ersten Versuche wurden durch Reduzierung der Flußraten bei direktem Einlaß des Eluenten in den Massenfilter durchgeführt.^[11] Dies führte zu mehreren Problemen: Neben maximalen Flußraten von 50 µl/min wurden nichtflüchtige Substanzen in den Massenfilter mit eingebracht, die sich ablagerten. Des weiteren konnte die benötigte Energiezufuhr zur Verdampfung der mobilen Phase nicht effektiv an das Ende der Kapillare gebracht werden, was zur vorzeitigen Verdampfung der mobilen Phase in der Kapillare oder zu gar keiner Verdampfung führte.^[12]

Eine Lösungsmöglichkeit war, die mobile Phase unter Wärmezufuhr bei Atmosphärendruck außerhalb des Massenfilters zu verdampfen und die Probe anschließend einzubringen.

Als erstes Interface, welches diesen Ansatz aufnahm, setzte sich das System des Moving-belt-interface durch.^[13] Die mobile Phase wird auf ein endloses Band gebracht und durch langsame Druckverminderung und Zuführung von Wärme verdampft. Der Rückstand wird dabei auf dem Band in den Bereich des Massenfilters (Hochvakuum) gebracht und dort ionisiert. Das Band wird im Anschluß gereinigt und die Probe kann erneut aufgebracht werden. Die praktische Handhabung erfordert jedoch ein hohes Maß an Erfahrung und blieb bis heute nur wenigen Spezialisten vorbehalten.

Ein weiterer Ansatz war das Particle-beam-interface,^[14] in dem mit einem Hilfsgas die mobile Phase zu einem Aerosol versprüht wurde. Das Aerosol wird in einem Vorvakuum reduziert und die zu analysierenden Substanzen zu mikroskopischen Teilchen kondensiert, die nach erneutem Verdampfen durch eine Mikroöffnung in das Hochvakuum gebracht werden. Bei der praktischen Anwendung zur Quantifizierung der Analyten, zeigten sich jedoch Effekte, die eine Kalibrierung nicht oder nur im begrenzten Ausmaß zuließen. Zusätze von Ammoniumacetat zur mobile Phase konnten nur zum Teil reproduzierbare Ergebnisse erzielen.^[15]

Anstelle eines Hilfsgases wurde bei der Methode des Thermospray-interface^[16] einzig Wärme zur Verdampfung der mobilen Phase genutzt. Bei Anwesenheit von Puffern wie Ammoniumacetat bilden sich geladene Tröpfchen, in denen die ursprüngliche Ladung auf den Analyten übertragen werden. So entstehen, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Methoden, auch von nichtflüchtigen Substanzen Molekülonen bzw. Addukte, die analysiert werden können.^[17]

Die Zusammenführung dieser einzelnen Methoden und der Ansatz von Aprino und Guiochon,^[18] die mobile Phase im Interface zu entfernen, führte zu den heute am häufigsten verwendeten und kommerziell erhältlichen Interfacen, die die Ionen bei Atmosphärendruck erzeugen: Zum einen das Interface zur Chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) und das Elektrospray-Interface (ESI). Die Ionisierungstechniken werden im folgenden Kapitel vorgestellt. Der Übertritt vom Atmosphärendruck in das Vakuum des Massenfilters erfolgt nach der Ionisierung unabhängig von der ursprünglichen Ionisierung und dem Gerätehersteller. Das entstehende Aerosol aus der mobilen Phase wird mittels eines angelegten Unterdrucks (Vorvakuum) weitestgehend aus der Ionenquelle entfernt. Die geladenen Teilchen werden dabei mittels einer angelegten Spannung durch eine Mikroöffnung in den Massenfilter eingebracht. Die räumliche Anordnung der Mikroöffnung muß dabei nicht axial zu der ursprünglichen Flußrichtung des Eluenten stehen und variiert bei den kommerziell erhältlichen Geräten stark.

Die Abbildung 1 zeigt den Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Geräte von Applied Biosystems (ehemals PE Sciex). Der Stickstoff wird dabei zwischen zwei Platten geführt, die so geformt sind, daß er von dem Massenfilter wegströmt, den Analyten entgegen. Der dabei erzeugte Unterdruck vor der Mikroöffnung verhindert den Verlust des Hochvakuums, ermöglicht jedoch den Durchlaß von geladenen Teilchen, die von der angelegten Spannung an der Mikroöffnung beschleunigt werden.

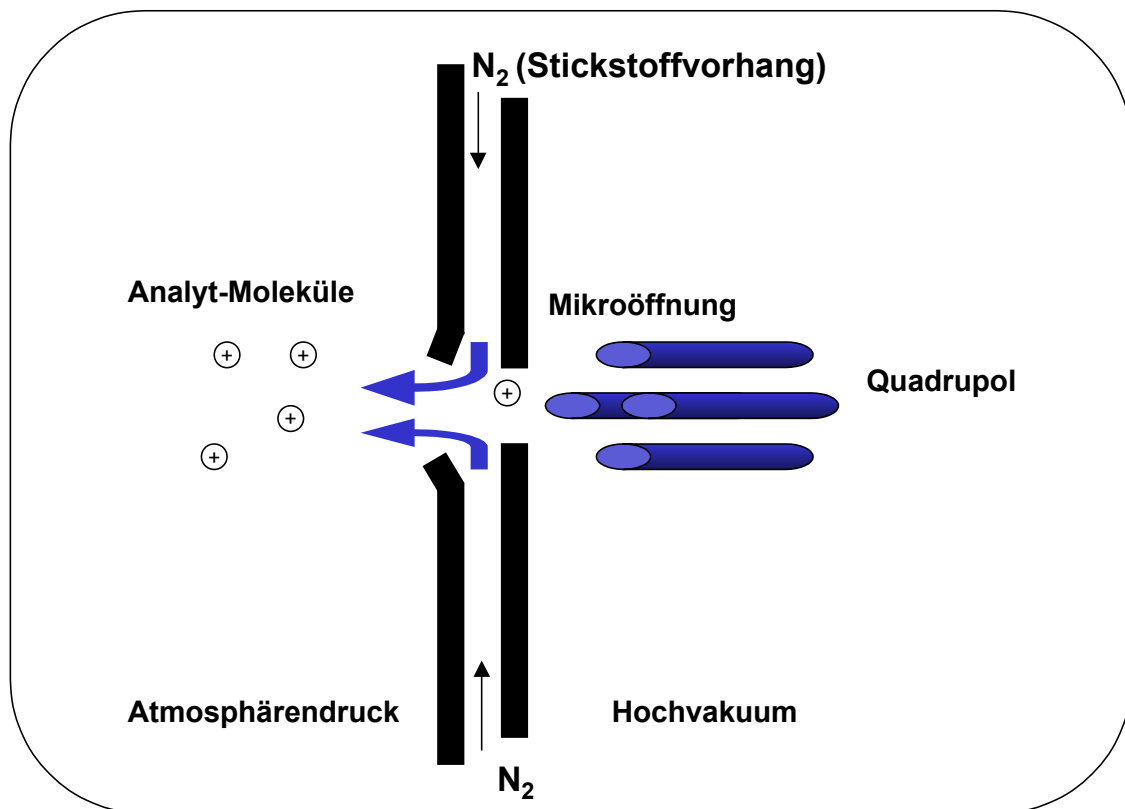
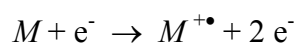


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Mikroöffnung und der Erhaltung des Hochvakuums bei den verwendeten Massenspektrometern von Applied Biosystems.

2.2.2 Ionisierungstechniken

Die am Beginn der Massenspektrometrie verwendete Elektronenstoßionisierung (EI) ist die älteste und am besten verstandene Methode. Die Probe wird mit beschleunigten Elektronen (70 eV) beschossen. Diese schlagen aus dem Molekül ein Elektron heraus, wodurch ein Radikal-Kation erzeugt wird:



Das entstehende Radikal-Kation wird als Molekularion bezeichnet. Sein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) gibt die Molekularmasse an. Probleme ergeben sich aufgrund von Fragmentierungen des Moleküls. Die zur Erzeugung von Ionen verwendeten Elektronen besitzen genügend Energie, um Bindungen innerhalb des Moleküls zu brechen, daher spricht man bei der EI von einer harten Ionisierungsmethode. Neben Radikal-Kationen können dabei auch Neutralteilchen und Kationen entstehen. Der Anteil am Molekularion kann bei dieser Art der Ionisierung sehr gering ausfallen. Vorteil ist die gute Reproduzierbarkeit der Spektren, da in dem hohen Vakuum intermolekulare Kollisionen

nahezu ausgeschlossen sind. Dies läßt die Erstellung einer Spektrenbibliothek zu.^[19] Nachteil ist neben der Fragmentierung des Moleküls bei der Ionisierung die Notwendigkeit, die Probe in die Gasphase zu überführen. Thermolabile und schwer flüchtige Substanzen entziehen sich daher weitestgehend der Analyse.

Die moderne Analytik stellt neue Anforderungen an die Massenspektrometrie. So ist nicht nur die Ionisierung des Analyten ohne Fragmentierungsreaktionen gewünscht, sondern auch eine Kopplung mit anderen analytischen Methoden, wie chromatographischen Trennverfahren. Eine gesonderte Rolle kam dabei dem Übertritt vom Atmosphärendruck zum Vakuum zu. Die Elektronenstoßionisierung war nicht geeignet, für das kontinuierliche Einbringen von Probenmaterial und dessen Ionisierung und spielt bei der Kopplung von chromatographischen Trennverfahren mit der Massenspektrometrie nur noch eine untergeordnete Rolle. Andere Ionisierungsmethoden waren notwendig, die ein kontinuierliches Einbringen von Probenmaterial in ein Vakuum ermöglichen ohne dieses zusammenbrechen zu lassen. Die dazu notwendigen mechanischen Anordnungen wurden unter 2.2.1 bereits beschrieben.

Am erfolgreichsten und breitesten anwendbar erwiesen sich die zwei Ionisierungstechniken der Chemischen Ionisierung (CI) und der Elektrospray-Ionisierung (ESI), auf die im folgenden näher eingegangen wird. Beide Methoden ermöglichen die weiche Ionisierung von Molekülen bei Atmosphärendruck und die Kopplung zwischen LC und MS.

2.2.2.1 Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI)

Die Chemische Ionisierung (CI) ist eine Ionisierungsmethode, die, wie ihr Name bereits andeutet, auf chemischen Reaktionen in der Gasphase beruht.^[20]

Die Erzeugung von Molekülionen erfolgt mittels ionisierter Reaktanden. Dies können Gase sein oder, wie im Fall der LC-MS-Kopplung, Lösungsmittelmoleküle. Die Chemische Ionisierung ist dabei nicht in ihrer Polarität eingeschränkt. So kann die Ionisierung zur Erzeugung positiver wie negativer Ionen verwendet werden. Bei den Reaktionen in der Gasphase kommt es durch intermolekulare Reaktionen zu Protonentransfer, Ladungsaustausch und Elektrophilen Additionsreaktionen. Die Reaktionen finden ohne großen Energietransfer zwischen den Molekülen statt, wodurch die Analytmoleküle weitgehend unfragmentiert ionisiert werden. Die Chemische Ionisierung ist eine weiche Ionisierungsmethode und führt neben Molekularionen zu Adukkten (Anionen oder Kationen).

Im folgenden wird auf die prinzipielle chemische Erzeugung von positiven Ionen unter Atmosphärendruck eingegangen. Ausführliche Abhandlungen dieses Themas finden sich in Übersichtsartikeln zu Beginn der 1980er, als die Technik noch neu war,^[21,22,23] aber auch in den 1990er ist das Thema noch aktuell.^[24,25]

Die Erzeugung von negativen Ionen verläuft über die gleichen Mechanismen und wird an dieser Stelle nicht explizit aufgeführt.

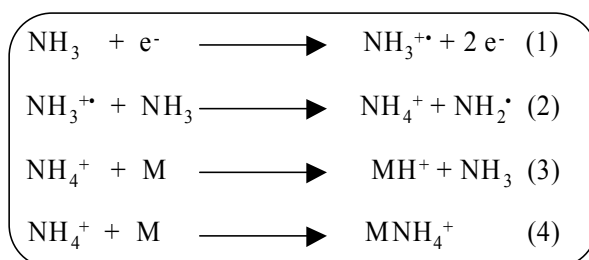


Abbildung 2: Erzeugung eines protonierten Molekülions (3) und eines Addukts (4) durch die primäre Ionisierung (1) des Reaktionsgases und einer Sekundärreaktion (2).

Abbildung 2 zeigt die Erzeugung eines protonierten Molekülions (3) und eines Ammoniumaddukts (4). Vorausgegangen ist die primäre elektrische Ionisierung von Ammoniak (1) zu einem Radikalkation, gefolgt von dessen Sekundärreaktion (2). Zur chemischen Ionisierung von Stickstoff in Anwesenheit von Wasser geben Horning *et al.*^[26] eine Zusammenfassung.

Innerhalb der Quelle befinden sich neben den verdampfbaren Puffersalzen die verwendeten Fließmittel und Hilfsgase, so daß die Sekundärreaktionen und die Protonentransferreaktionen nicht ausschließlich zwischen gleichen Molekülen stattfinden. Um die optimale Protonierung des Analyten zu gewährleisten, werden Hilfsgase im Überschuß eingesetzt. Zum einen wird somit sichergestellt, genügend primäre Ionisierungen zu erhalten. Zum zweiten wird die mittlere freie Weglänge zwischen den Molekülen verringert, wodurch die Folgereaktionen häufiger stattfinden. Die Protonierung des Analyten ist abhängig von der Wahrscheinlichkeit mit einem Teilchen zusammen zu stoßen, welches geeignet ist ein Proton abzugeben. Dabei ist die Protonenaffinität der zusammentreffenden Moleküle ausschlaggebend für eine erfolgreiche Ionisierung des Analyten. So kann ein Molekül nur protoniert werden, wenn seine Protonenaffinität größer als die des Reaktionspartners ist. Innerhalb der Quelle stellt sich ein Gleichgewicht abhängig von Zusammensetzung und Protonenaffinität der einzelnen Komponenten ein. In der Tabelle 1 sind einige Protonenaffinitäten von Reaktionsgasen und funktionellen

Gruppen aufgelistet. Für die funktionellen Gruppen sind Protonenaffinitätsbereiche angegeben. Genauere Untersuchungen zu einzelnen Substanzen^[27,28] oder Substanzklassen^[29] sind publiziert.

Reaktionsgase	PA	Funktionelle Gruppen	PA
H ₂	422	Ether, Ester, Ketone	603-670
CH ₄	536	Polyzyklische	
H ₂ O	723	Aromaten	710-800
CH ₃ OH	773	Carbonsäuren	<800
CH ₃ CN	797	Kohlenhydrate	710-840
i-C ₄ H ₁₀	823	Alkohole	750-840
NH ₃	857	Thio-Gruppen	750-880
CH ₃ NH ₂	894	Amine, Nitro-Gruppen	840-1000
Pyridin	921	Peptide	880-1000

Tabelle 1: Protonenaffinitäten (PA in kJ/mol) von ausgewählten Reaktionsgasen und funktionellen Gruppen nach^[30]

Das häufig in der LC-MS eingesetzte Reaktionsgas Ammoniak wurde von Rudewicz und Munson^[31] unter verschiedenen Partialdrücken untersucht.

Die Chemische Ionisierung ist dabei nicht an einen engen Druckbereich gebunden. So findet sie Anwendung bei geringen Drücken ($<10^{-5}$ bar) in der Ionocyclotron-Massenspektrometrie und in Ionenfallen. Die Ionisierung kann jedoch auch bei Atmosphärendruck stattfinden. Dies ermöglichte die Kopplung zwischen HPLC und MS mit einer chemischen Ionisierungsquelle bei Atmosphärendruck (APCI).

Erste Arbeiten zur Kopplung der LC-MS wurden Anfang der 1970er von Hornig *et al.*^[26] veröffentlicht. Die konsequente Weiterentwicklung der ersten APCI-Quellen führte 1986 zu einem Prototyp der LC-MS Kopplung von der Gruppe um Henion.^[32] Dieses Gerät nutzte einen 'Heated Nebulizer' als Quelle. Die schematische Darstellung dieser Quelle ist in Abbildung 3 zu sehen.

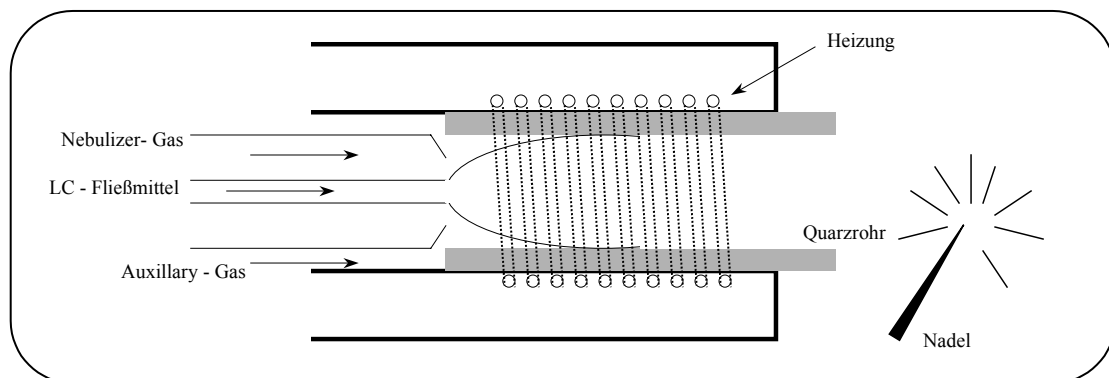


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer 'Heated Nebulizer'-Quelle von Applied Biosystems

Die Quelle besteht aus einer Stahlkapillare, durch die das Fließmittel mit einem Fluß zwischen 0.8 ml/min und 2.0 ml/min fließt. Am Ende der Stahlkapillare wird das Fließmittel mit Stickstoff als Zerstäubergas, genannt 'Nebulizer Gas', zu einem Aerosol versprüht. Übliche Drücke dieses Gases bewegen sich zwischen 60 und 80 psi. Zusätzlich wird ein weiteres Hilfgas (N_2), genannt 'Auxillary Gas' mit Flußraten von bis zu 6 l/min verwendet. Um die dabei entstehende Verdunstungskälte zu kompensieren, wird das Quarzrohr mittels einer Heizspirale erhitzt. Die Temperatur der Heizspirale kann auf bis zu 550°C eingestellt werden, wobei die Temperatur innerhalb des Quarzrohres im Regelfall bei ~ 120 °C liegt. Diese Temperatur reicht aus, um das Fließmittel weitestgehend in den gasförmigen Zustand zu überführen. Nach Austritt aus dem Quarzrohr umströmt das Gasgemisch eine Stahlnadel, die entsprechend der gewünschten Ionisierung mit einer Spannung (3-5 kV) belegt ist. An dieser Stahlnadel finden wie unter 2.2.2.1 beschrieben die primären Ionisierungsreaktionen statt.

2.2.2.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Einleitend zu dem Terminus Elektrospray soll nicht unerwähnt bleiben, daß die in dieser Arbeit verwendeten Ionisierungsquellen, die auf diesem Prinzip beruhen, korrekterweise als IonSpray[®]-Quelle bezeichnet werden müßten. Da in der Literatur die Bezeichnung Elektrospray geläufiger ist, wird sie in dieser Arbeit verwendet.

Das Grundprinzip des Elektrosprays ist seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt. 1917 beschrieb Zelney^[33] das Phänomen, daß Lösungsmittel, die eine Kapillare verlassen, an der ein elektrisches Potential angelegt wird, in kleine geladene Tröpfchen übergehen, die sich weiter verkleinern, bis einzelne geladene Teilchen entstehen. Die theoretische

Beschreibung des Zerstäubungsprozesses ist sehr komplex und wird nur in groben Zügen angerissen. Genaue Betrachtungen finden sich bei Kelly^[34] und Kebarle.^[35]

Obwohl der Prozeß lange bekannt war, wurde er erst in den späten 1960ern von Dole *et al.*^[36] für die Kopplung mit einem Massenspektrometer untersucht. 1985 führten die Arbeiten von Yamashita und Fenn zu einem ersten LC-MS-Interface, welches Flußraten im $\mu\text{l}/\text{min}$ Maßstab zuließ.^[37] Wie bereits unter 2.2.1 angerissen, wurden Hilfsgase eingesetzt, um den Zerstäubungsprozeß bzw. die Vernebelung der mobilen Phase zu unterstützen. Dieser Ansatz führte zu einem pneumatisch unterstützten Elektrospray, genannt IonSpray, welches von Bruins *et al.* 1987 vorgestellt wurde.^[38] Mit dieser Modifizierung konnten Flußraten bis zu $200 \mu\text{l}/\text{min}$ bei der Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie gehandhabt werden. Zusätzliche Wärme mittels eines geheizten Hilfsgases auf das entstehende Aerosol, genannt Turbo-IonSpray, führte zur Handhabung noch größerer Flußraten. Der schematische Aufbau ist in der Abbildung 4 gezeigt.

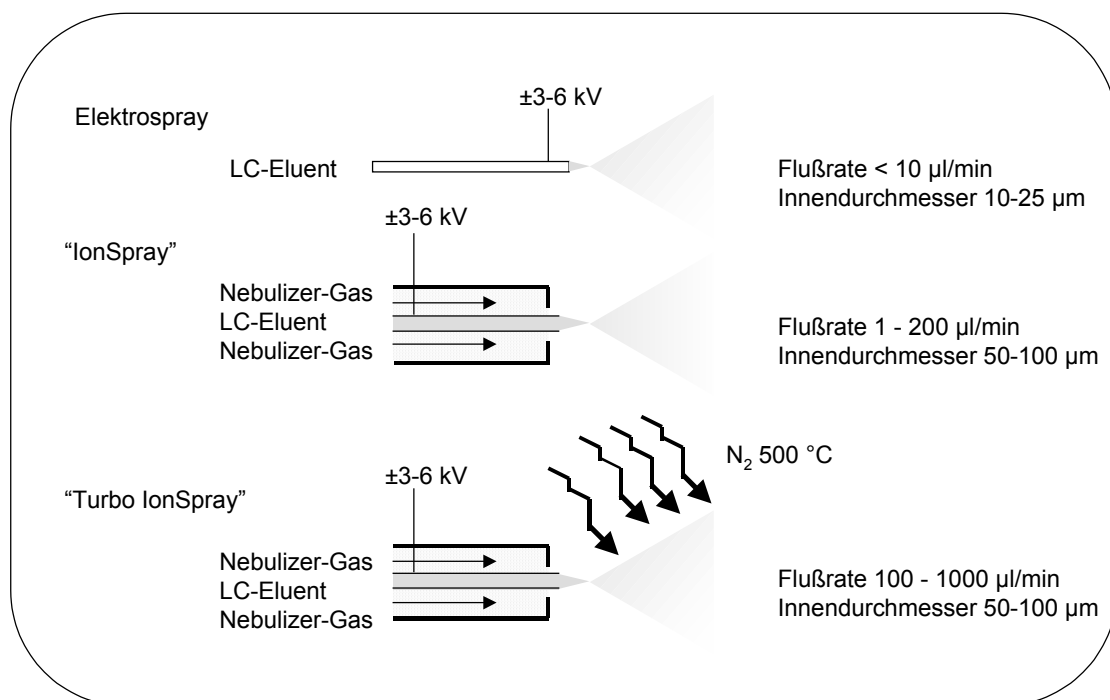


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Varianten von Elektrosprays unter Angabe der Flußraten

Der instrumentelle Aufbau einer Elektrospray-Quelle mit Turbo ist exemplarisch für das eingesetzte Gerät in Abbildung 5 gezeigt. Geräte anderer Hersteller bedienen sich anderer geometrischer Anordnungen von Kapillare und Mikroöffnung in das Vakuum. So befinden sich bei der Firma Micromass zwei Mikroöffnungen mit einem zwischengeschalteten

Vorvakuum geometrisch so zur ursprünglichen Flußrichtung angeordnet, daß von einem Z-Spray gesprochen wird.

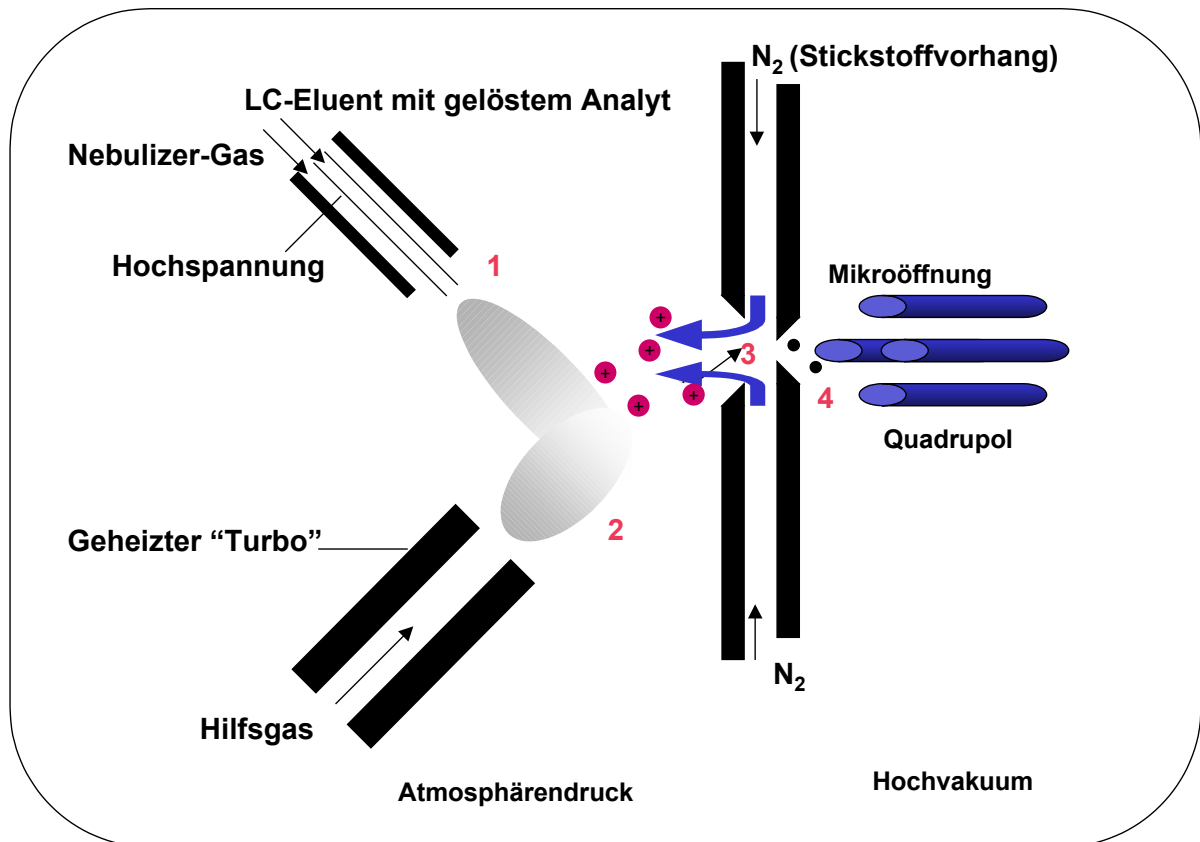


Abbildung 5: Schematische Darstellung der eingesetzten Elektrospray-Quelle.

Wie in der Abbildung 5 gezeigt, verläßt der Eluent durch die angelegte Spannung als geladenes Aerosol die Kapillare (1). Um den Prozeß der Bildung von geladenen Analytmolekülen zu optimieren, wird ein Hilfsgas erhitzt auf das Aerosol geblasen (2). Die sich bildenden Molekülionen (3) werden durch den Stickstoffvorhang in den Massenanalysator durch Anlegen geeigneter Potentialdifferenzen geführt (4).

Im einzelnen soll der Sprühprozeß und die Bildung der Ionen noch einmal näher betrachtet werden.

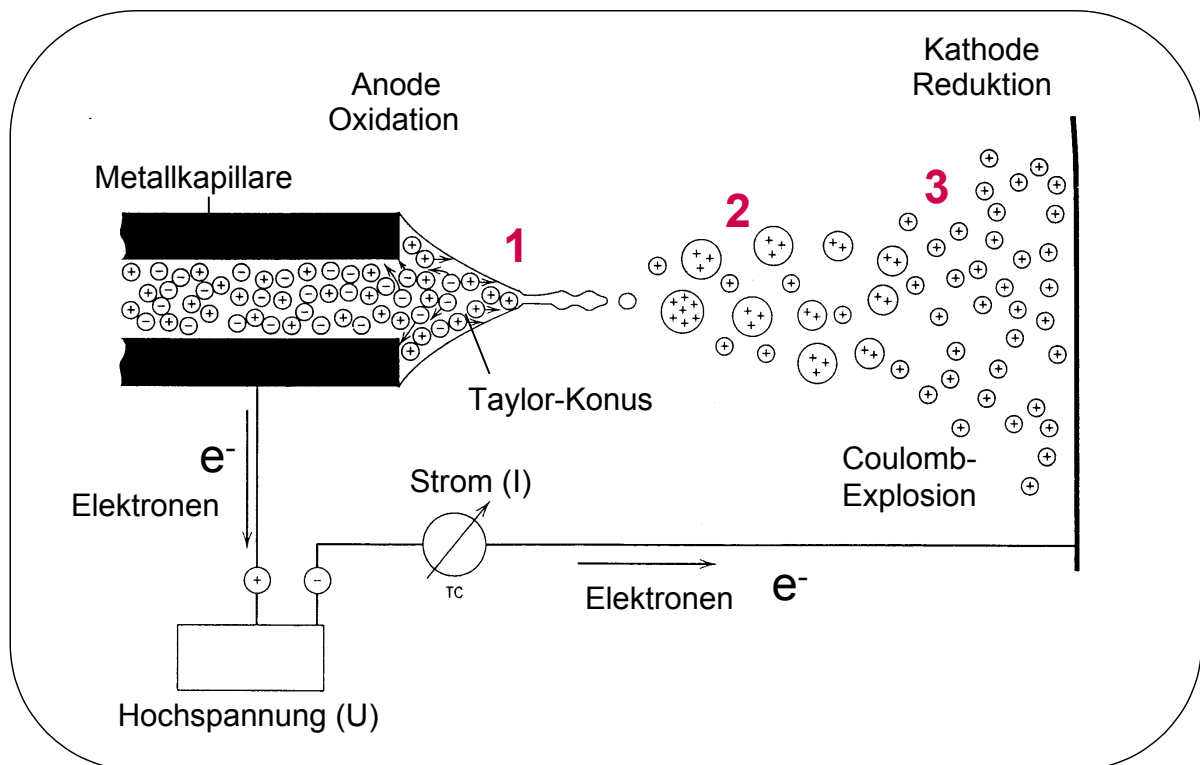


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bildung von positiv geladenen Ionen in der Gasphase mittels Elektrospray.

Die Bildung der Ionen kann in drei Stufen unterteilt werden. (1) Die Bildung der geladenen Lösungsmitteltröpfchen am Ende der Kapillare. (2) Reduzierung der Größe der Lösungsmitteltröpfchen und (3) die Bildung von freien Ionen in der Gasphase.

Wie in der Abbildung 6 gezeigt, liegt eine Hochspannung zwischen dem Ende der Kapillare und der Mikroöffnung an, welche 2-3 kV beträgt. Diese dient neben der Ionisierung der mobilen Phase zur Kompensation der endothermen Reaktion beim Ausdehnen der Flüssigkeit am Ende der Kapillare.^[39] Im Falle der Erzeugung von positiv geladenen Ionen, dient die Kapillare als Anode. An ihrem Ende werden die negativ geladenen Ionen oxidiert, während die positiv geladenen Ionen sich an der Flüssigkeitsoberfläche ansammeln. Die Abstoßungskräfte der positiv geladenen Ionen überwinden die Oberflächenspannung und es bildet sich ein Taylor-Konus, der bei geeignetem Spannungsfeld in einen kleinen Flüssigkeitsstrahl mündet. Die positiv geladenen Tröpfchen werden durch den elektrophoretischen Mechanismus zur Kathode gezogen, wobei die Tröpfchen weiter schrumpfen. Die Ionen in dem jeweiligen Tröpfchen sind nicht verdampfbar, wodurch das elektrische Feld der Tröpfchenoberfläche kontinuierlich ansteigt. Bei einem gegebenen Verhältnis von Ladung zur Oberfläche kommt es erneut zur Überwindung der Oberflächenspannung und es bilden sich

durch eine *Coulomb-Explosion* direkt freie Ionen in der Gasphase oder kleinere Tröpfchen, die wiederum schrumpfen, bis sie erneut im Volumen reduziert werden. Eine umfangreiche Beschreibung der Elektrospray-Technik findet sich bei Cole^[40], in der auch näher auf die thermodynamischen Prozesse und physikalischen Grundlagen eingegangen wird. Die hier beschriebene Bildung stellt ein derzeit gängiges und gut verstandenes Modell dar. Weitere theoretische Beschreibungen werden bis dato in der Literatur ebenso angesprochen wie sie diskutiert werden.^[41,42,43,44]

Die Elektrospray-Quelle zeichnet sich dadurch aus, daß sie wie die APCI-Quelle eine weiche Ionisierungsmethode ist und hauptsächlich Molekülonen erzeugt. Sie kann jedoch auch Ionen von nicht verdampfenden Substanzen erzeugen, die neben einfachen auch multiple Ladungen enthalten können. Daher fallen sehr viele Moleküle mit hohem Molekulargewicht in den m/z-Bereich der meisten verwendeten Massenspektrometer. Die Quelle findet dadurch im Bereich der Bioanalytik von Proteinen in den letzten Jahren zunehmendes Interesse.

2.2.3 Massenanalysatoren

Die Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung der Eigenschaften von den fünf am häufigsten verwendeten Massenanalysatoren. Die Sektorfeldgeräte sind von den aufgeführten schon am längsten in Gebrauch. Mit ihnen und der Elektronenstoßionisierung wurden umfangreiche Spektrenbibliotheken etabliert. Zur Kopplung mit der HPLC eignet sich dieser Massenanalysator jedoch nur in sehr geringem Umfang. Nicht zuletzt haben die hohen Kosten und die kritische Handhabung des Vakuums dazu geführt, daß Sektorfeldgeräte keine Rolle bei der Kopplung von LC und MS spielen. Gleiches gilt für Fourier-Transformations- (FT)- bzw. Ionen-Cyclotron-Resonanz-(ICR)-Geräte. Ihre Kosten und die derzeit noch kritische Handhabung machen diese Technik noch nicht universell einsetzbar.

Eigenschaft	Sektorfeld	Quadrupol	Ionenfalle	Time-of-flight	FT-ICR
Scannen		schnell	schnell	sehr schnell	Schnell
Vakuum	kritisch	gering	sehr gering	-	Extrem kritisch
Massenbereich	10000	4000	2000	kein Limit	5000
Auflösung	hoch	1 u	1 u	niedrig	Sehr hoch
Kosten	hoch	mittel	niedrig	niedrig	Sehr hoch

Tabelle 2: Vergleich von Massenanalysatoren

Die Literatur und die Applikationen umfassen hauptsächlich die drei verbleibenden Massenanalysatoren. Alle eignen sich zur Kopplung mit Ionisierungstechniken bei Atmosphärendruck. In der Praxis zeigen sich jedoch bei Verwendung von Ionenfallen zur quantitativen Analyse Nachteile gegenüber den anderen beiden Techniken. So kann die Zeit zum Sammeln der Ionen und Fokussieren auf den Detektor bei der Analyse von mehreren Analyten, die zur gleichen Zeit retenieren, nicht gering genug eingestellt werden, um genügend Datenpunkte zu erhalten. Daneben verschmutzt die Ionenfalle zunehmend bei Proben mit hoher Matrixbelastung, was zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen kann. Die qualitativen Möglichkeiten zur Strukturaufklärung hingegen übertreffen die Möglichkeiten der anderen Massenanalysatoren um ein Vielfaches.

Als erfolgreichste Massenanalysatoren zur quantitativen Analyse haben sich die Quadrupole durchgesetzt. Von den vier parallel angeordneten zylindrischen oder hyperbolischen Stäben werden auf zwei gegenüberliegenden Stäbe eine positive bzw. negative Gleichspannung angelegt. Darüber oszilliert eine Wechselspannung wie in Abbildung 7 abgebildet. Dadurch kann bei fest eingestellten Spannungen ein Feld erzeugt werden, in dem nur bestimmte Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse in einer stabilen Flugbahn zwischen den Quadrupolstäben gehalten werden.

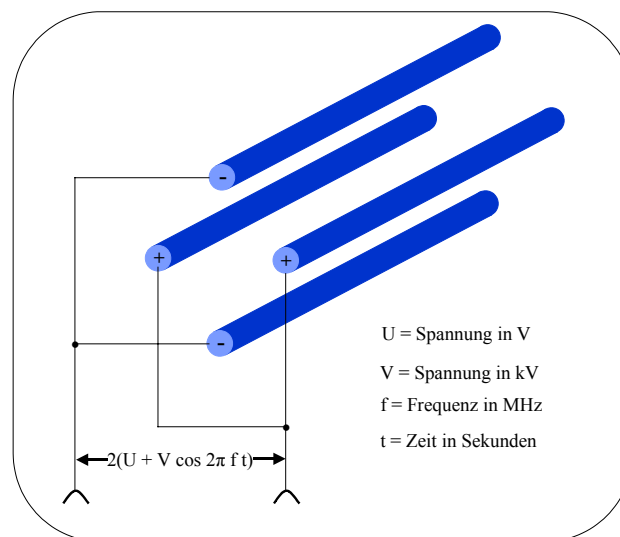


Abbildung 7: Schema eines Quadrupol-Massenanalysators.

Alle anderen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse erleiden eine instabile Flugbahn und werden abgelenkt.^[7] Neben der festen Einstellung der Spannungen können diese auch kontinuierlich verändert werden und somit ein Massenbereich abgescannt werden (50 - 4000 u). Die Auflösung beträgt dabei ca. 1 u bei halber Peakbreite, womit

Quadrupolgeräte zu den geringauflösenden Geräten gehören. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, werden in der quantitativen Analytik zwei Quadrupole hintereinander geschaltet (Tandem-Massenspektrometrie). Im ersten Quadrupol wird die Masse des Molekülon oder eines Addukts, das durch die weiche Ionisierung bei Atmosphärendruck gebildet wurde, herausgefiltert. Bevor das Molekül in den zweiten Quadrupol gelangt, passiert es eine Kollisionszelle, in der sich ein Stoßgas befindet. Das primär gebildete Molekülon zerfällt nach einem Stoß mit dem Kollisionsgas in ein Fragment (Produkt-Ion), welches im zweiten Quadrupol erneut gefiltert wird. Als Kollisionsgase werden inerte Gase (Ar, N₂) eingesetzt. Dadurch wird eine Übertragung der Ladung verhindert. In der Regel führt der Stoß zum Verlust eines Neutralteilchens, aber auch die Bildung von Radikalen ist möglich. Das entstehende Produkt-Ion hängt maßgeblich von der Stoßenergie ab, die durch die Beschleunigung der Molekülonen und der Teilchendichte des Kollisionsgases beeinflusst werden können. So sind diese Parameter zu optimieren, um eine hohe Ionenausbeute an Produkt-Ionen und somit ein optimales Quantifizierungslimit zu gewährleisten.

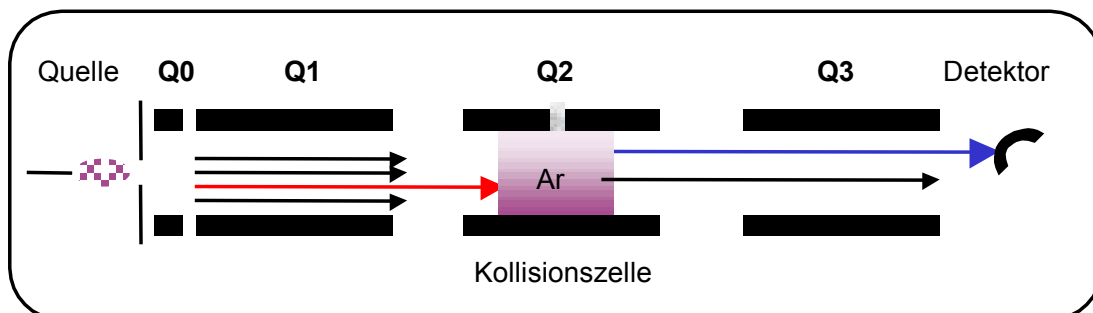


Abbildung 8: Darstellung des Prinzip eines Tandem-Massenspektrometers.

Die Abbildung 8 zeigt noch einmal das Prinzip eines Tandem-Massenspektrometers. Die in der Quelle gebildeten Ionen werden durch einen Quadrupol (Q0) fokussiert und wie beschrieben im Quadrupol (Q1) gefiltert. In der Kollisionszelle, die auch als Quadrupol (Q2) konzipiert werden kann, trifft das herausgefilterte Molekülon auf das Inertgas, in diesem Fall Argon. Dieser Vorgang, bei dem ein Produkt-Ion gebildet wird, wird als Kollisions-Induzierte-Dissoziation (CID) bezeichnet. Im zweiten Quadrupol (Q3) wird das Produkt-Ion von den restlichen Fragmenten gefiltert, um detektiert zu werden. Werden definierte Spannungswerte für Quelle und die jeweiligen Quadrupole angegeben, können Analyten, die zur gleichen Zeit retenieren über die Massenfilter getrennt und unabhängig voneinander quantitativ bestimmt werden. Die Robustheit und einfache Handhabung im

Dauerbetrieb bieten einen großen Vorteil gegenüber den anderen angesprochen Techniken der Massenanalyse.

Weiterer Vorteil bei den Quadrupolgeräten ist die geringe Weglänge, die die Ionen zurückzulegen haben. So sind die Anforderungen, um eine ausreichend freie Weglänge für die Ionen zu erreichen, gering. Das Vakuum muß nicht mit aufwendigen und kostspieligen Techniken erzeugt werden, was die Anschaffungskosten für diese Geräte interessant macht. Dennoch ergaben sich anfangs Schwierigkeiten, auf die im folgenden Kapitel 2.2.4 eingegangen wird.

Die Entwicklung in der Bioanalytik, speziell die Analytik von Proteinen und Peptiden, fordert einen maximalen Massenbereich. Obwohl durch die Ionisierungstechniken Mehrfachladungen auf die Moleküle gebracht werden und somit die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse zu geringeren Massendetektionsbereichen hin verschoben werden, decken einfache Quadrupolgeräte diese Massenbereiche nicht ausreichend ab. Hierzu werden Geräte mit Time-of-Flight-Massenfiltern (TOF) eingesetzt, die häufig auch zur Ionisierung die Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) einsetzen. Die speziellen Anforderungen dieser Techniken finden sich in den Artikeln von Fenselau und Demirev^[45], sowie Godovac-Zimmermann und Brown^[46] und werden hier nicht weiter diskutiert.

2.2.4 Verwendete Massenspektrometer

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (ehemals PE Sciex) verwendet. Beides sind Triple-Quadrupolgeräte, die beide mit den vorgestellten Quellen zur Ionisierung bei Atmosphärendruck ausgestattet sind, und sich grundsätzlich nur durch die Erzeugung des Vakuums unterscheiden. Das jüngere Gerät (API 3000) zeichnet sich daneben durch eine Reihe von zusätzlichen Quadrupolen aus, die eine Optimierung der Ionenausbeute auf dem Detektor bewirken, was jedoch keinen Einfluß auf die grundsätzliche Meßtechnik, wie sie unter 2.2.3 beschrieben wurde, hat.

Das API III Plus erzeugt das Vakuum durch Ausfrieren aller Substanzen und Atome bei ca. 17–21 Kelvin. Zur Übertragung der Temperatur wird flüssiges Helium verwendet, welches durch Kompressoren im flüssigen Zustand gehalten wird. Als Reaktantgas in der Kollisionszelle muß somit ein Gas verwendet werden, welches bei den gegebenen Temperaturen flüchtig ist. Diese Anforderungen erfüllt Argon. Die Technik des Ausfrierens beinhaltet mehrere Nachteile. Zuerst werden hohe Anforderungen an die verwendeten Gase (Hilfsgase und Vorhanggas) gestellt, die möglichst keine Verunreinigungen enthalten

sollten. Hier empfiehlt es sich, auf Stickstoff der Reinheit 5.0 zurückzugreifen. Daneben kann das Gerät nicht kontinuierlich betrieben werden. Die ausgefrorenen Substanzen und Atome stören die Temperaturübertragung, so daß die Temperatur im Massenanalysator kontinuierlich steigt, wodurch die Empfindlichkeit abnimmt. Daneben verursachen die Teilchen ein immer größeres Grundrauschen, was zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Das API III Plus muß daher in regelmäßigen Abständen aufgetaut werden. Ein Zyklus zur Entfernung der ausgefrorenen Substanzen dauert dabei mindestens 10 Stunden. Dieser Vorgang muß je nach verwendeter Methode alle 24 bis 72 Stunden wiederholt werden.

Das zweite Gerät, das API 3000 erzeugt das Vakuum mit Turbopumpen. Vorteil ist der kontinuierliche Betrieb bei Raumtemperatur. Daneben sind die Anforderungen an die Hilfsgase und das Vorhanggas nicht so hoch wie beim API III Plus, da die enthaltenen Verunreinigungen durch die Turbopumpen mit entfernt werden und sich nicht im Massenanalysator anreichern. Zur Betreibung des API 3000 kann Stickstoff aus einem Stickstoffgenerator verwendet werden. Als Reaktantgas der Stoßzelle wird ebenfalls Stickstoff verwendet. Daneben enthält das API 3000 entsprechend der Zeit der Herstellung keine manuelle Regelung der Gase, sondern diese werden elektronisch eingestellt. Dies wird sich bei der Angabe der massenspektrometrischen Bedingungen widerspiegeln. So werden beim API III Plus reale Volumina pro Zeiteinheit oder Drücke angegeben, während beim API 3000 nur ein einfacher Zahlenwert ohne Einheit für die Hilfsgase und für das Kollisionsgas angegeben wird.

2.3 Probenvorbereitung und Injektionsvarianten

Mit Einführung der LC-MS/MS-Technik haben sich die Anforderungen an die Probenvorbereitung gegenüber der Detektionsmethode mit HPLC-UV-, Fluoreszenz-Detektoren oder elektrochemischen Detektionsverfahren deutlich geändert. An die Aufreinigungsmethoden werden weniger Anforderungen gestellt, da der Detektor eine hohe Selektivität garantiert. Dennoch muß eine Aufreinigung erfolgen, um störende Matrixbestandteile abzutrennen, die wie bereits unter 2.1 angesprochen, unerwünschte Effekte auf der Trennsäule verursachen können, und somit die Lebensdauer der Säule und die Peak-symmetrie des Analytensignals negativ beeinflussen. Nicht abgetrennte Matrixbestandteile können neben einem erheblichen Verlust an Signal-Rausch-Verhältnis auch den Ionisierungsprozeß negativ beeinflussen. Diese Aufreinigung kann jedoch in der Regel deutlich geringer ausfallen als bei den oben genannten Detektionsmethoden.

Die zeitlichen Anforderungen durch die kürzeren Analysezeiten bei der Detektion mit einem Massenspektrometer sind dagegen stark gewachsen, was zu neuen zeitsparenden Techniken geführt hat.

Das Prinzip der Probenvorbereitung als solches hat sich hingegen nicht verändert. Noch immer müssen störende Matrixbestandteile effektiv abgetrennt werden oder soweit in der Probenlösung reduziert sein, daß sie wie erwähnt keinen Einfluß auf das Meßergebnis haben. Hierzu steht die Möglichkeit der Verdünnung der Probe zur Verfügung, oder wenn die Empfindlichkeit des Detektors dafür nicht ausreichend ist, die Konzentrierung der Probe.

Der erste Fall kommt bei der quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen mit der LC-MS/MS-Technik vor, die in verhältnismäßig großen Mengen appliziert werden. Die Ansprüche an die Aufarbeitungstechnik sind gering. Ein Hauptaugenmerk wird daher auf die Anzahl der aufzuarbeitenden Proben gelegt. Die LC-MS/MS-Technik mit ihren kurzen Analysenzeiten hat die Probenvorbereitung zum Flaschenhals der Analytik von Wirkstoffen in belasteten Matrices werden lassen. Daher wird versucht, Robotersysteme einzusetzen, um manuelle Schritte zu ersetzen. Dies führte zu einem standardisierten Format für die Probengefäße. Heute übliche Robotersysteme arbeiten mit kleinen rechteckigen Platten, auf denen sich 96 (8 x 12) Gefäße befinden, die bis zu 2 ml Volumen beinhalten.

Die Probenaufarbeitung aus Plasma erfolgt im einfachsten Falle durch Präzipitation mit einem organischen Lösungsmittel oder einer Säure. Durch Zentrifugieren des Pellets kann die überstehende Lösung, direkt oder nach weiterem Verdünnen in ein Probengebergefäß zur Injektion bereitgestellt werden. Dabei kann durch geeignete Wahl eines Nachverdünnungspuffers und des organischen Lösungsmittels die fertige Probe in ihrer Zusammensetzung der des chromatographischen Fließmittels angeglichen werden. Dies hat den Vorteil, daß nach der Injektion kein Gradient auf der Trennsäule entsteht. Ebenfalls kann der umgekehrte Effekt herbeigeführt werden, so daß der Wirkstoff bei hohem wässrigen Anteil nach der Injektion auf einer Umkehrphase zuerst stark retiniert wird und anschließend langsam von einem hohen organischen Anteil im Fließmittel eluiert wird. Dies ist der wohl einfachste Weg eines schnellen Gradienten mit einem isokratischen Fließmittel.

Bei Urin, der eine hohe Wirkstoffkonzentrationen enthält, ist häufig eine einfache Verdünnung mit Fließmittel oder einem Puffer ausreichend. Ist der Verdünnungsfaktor jedoch gering, können die hohen Salzanteile (nicht verdampfbar) des Urins zu einer Beeinträchtigung der Trennleistung der Säule führen oder zu einem Versalzen der Quelle, da die Salze sich dort anreichern. Gleiches gilt für Dialysatproben. In diesen Fällen eignet sich eine Trennung der Analyten von den störenden Matrixbestandteilen.

Als mögliche Trennungen können die Flüssig-Flüssig-Extraktion oder eine Festphasenextraktion zum Einsatz gebracht werden. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion besteht die Möglichkeit, den Analyten in die organische Phase zu überführen oder bei einer ionischen Struktur, ihn in der wässrigen Phase zu belassen und die lipophilen Bestandteile der Matrix zu eliminieren. Die extrahierte Phase kann dann eingeengt werden (maximal bis zur Trockene) und der Analyt kann im gewünschten Lösungsmittel auf ein definiertes Volumen aufgefüllt (re-eluiert) werden. Häufig sind einfache Extraktionsschritte nicht ausreichend, um den Analyten quantitativ in das Extraktionsmittel zu überführen oder die Menge an Lösungsmittel muß so groß sein, daß der Verbrauch einen merklichen Einfluß auf die Kosten der Aufarbeitung nimmt. Bei zwei- oder mehrfacher Extraktion und dem Einengen des Lösungsmittels ergeben sich die bereits angesprochenen zeitlichen Probleme. Daher ist eine Flüssig-Flüssig-Extraktion nur bei einfachen Extraktionen mit geringem Lösungsmittelverbrauch sinnvoll. Können störende Matrixbestandteile durch andere Probenvorbereitungen jedoch nicht abgetrennt werden, bietet die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit ihren sehr reinen Extrakten eine Alternative. Zusätzlich kann der Analyt mit diesem

Verfahren angereichert werden und somit eine geringe Bestimmungsgrenze erreicht werden.

Die zweite Methode zur Trennung des Analyten von der Matrix ist die bereits oben erwähnte Festphasenextraktion. Diese Methode bedient sich wie auch die unter 2.1 beschriebene Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie einer stationären Phase. Diese kann wie bei der Flüssigkeitschromatographie je nach Anforderung beliebig gewählt werden. Für lipophile Wirkstoffe eignen sich Umkehrphasen, wohingegen für ionische Verbindungen Anionen- oder Kationenaustauscher-Säulenmaterialien eingesetzt werden können. Das Angebot erstreckt sich dabei über die gleiche Spannweite wie in der Flüssigkeitschromatographie.^[47] Auch in diesem Teilbereich hat sich aufgrund der zeitlichen Anforderung das roboterfähige 96-Format gegenüber einzelnen Kartuschen durchgesetzt. Dies war durch den Einsatz von kleinen sphärischen Materialien möglich. Zwar können alle Materialien weiterhin in einzelnen Kartuschen erhalten werden, was besonders bei großen Probenvolumina erforderlich ist, jedoch sind die Kapazitäten der Festphasenmaterialien im 96-Format ausreichend für pharmazeutische Zwecke.^[48] Durch die Wahl der stationären Phase, geeigneter Waschlösungen und des Elutionsmittels können saubere Extrakte erhalten werden, die direkt aus dem Auffanggefäß injiziert werden können.

Wie auch bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion kann die Festphasenextraktion zusätzlich zur Trennfunktion zum Anreichern des Analyten verwendet werden. Neben dem Einengen des erhaltenen Eluats und erneutem Re-eluieren, kann das Volumen so gering gewählt werden, daß ein Einengen des Eluats nicht notwendig wird, um eine Anreicherung des Analyten zu erhalten. Hierin liegt neben dem zeitlichen Aspekt der Vorteil der Festphasenextraktion gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Eine weitere Methode ist die direkte Aufgabe der Probe mit einem Fließmittel A auf eine HPLC-Säule, die als Extraktionssäule verwendet wird. Auf dieser wird der Analyt retiniert und störende Bestandteile abgetrennt. Das Fließmittel A wird dabei verworfen. Nachdem die störenden Bestandteile eluiert wurden, wird mit einem Fließmittel B aus umgekehrter Richtung der Analyt von der Extraktionssäule eluiert und über eine analytische Säule zum Massenspektrometer gebracht.^[49,50] Diese Methode, für die es eigens hergestellte Säulen fertig zu kaufen gibt, eignet sich jedoch hauptsächlich für weniger stark belastete Proben als Plasma. Nachteil ist die begrenzte Kapazität der Extraktionssäule. Die hier angeführte Methode eignet sich beispielsweise gut zur Qualitätssicherung bei den Herstellungs-

prozessen von Arzneistoffen. Bei stark matrixbelasteten Proben empfiehlt es sich, einzelne Extraktionssäulen zu verwenden. Dies kann wie oben beschrieben im 96-Format offline geschehen^[51] oder mit einem Gerät zur automatischen Festphasenextraktion im online-Betrieb.^[52] Hier können mehrere Geräte parallel arbeiten, um einen möglichst großen Probendurchsatz zu ermöglichen. Durch entsprechende Säulenschaltungen können die Proben ebenfalls parallel auf mehrere analytische Säulen injiziert werden und der Eluent nur zur Zeitspanne, in der der Analyt eluiert in das Massenspektrometer eingebracht werden.^[53,54]

Dem Umstand von hoher Matrixbelastung der Probe bei direkter Aufgabe kann entweder durch direkte Probenaufgabe auf eine analytische Säule, die zur Festphasenextraktion und analytischen Trennung dient,^[55] oder durch die Turbulent-Flow-Technik Rechnung getragen werden.^[56,57,58] Mit diesen Säulen können Plasmaproben direkt aufgegeben werden. Jedoch ist auch die Kapazität dieser Säulen begrenzt. Ob sich dabei ein Vorteil der Technik gegenüber einer von der Injektion getrennten Probenvorbereitung ergibt, muß abgewogen werden.

Bei der Probenvorbereitung muß anhand der chemischen Struktur des Analyten und der Matrix der Probe sowie des vorhandenen Probenvolumens entschieden werden, welche Methode der Probenvorbereitung am effektivsten zum gewünschten Ziel führt. So kann eine aufwendige manuelle Flüssig-Flüssig-Extraktion möglicherweise ein analytisches Ergebnis erzielen, welches durch eine vollautomatisierte Probenvorbereitung mit Festphasenextraktion nicht erhalten werden kann. Für den jeweiligen Fall muß ein Kompromiß zwischen dem betriebenen Aufwand der Probenvorbereitung, den daraus resultierenden Kosten und dem analytischen Ergebnis gefunden werden.

2.4 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik befasst sich mit der zeitlichen Änderung der Konzentration eines Pharmakons im Organismus. Dabei kann sich das Pharmakon in verschiedenen Kompartimenten verteilen. Auf die unterschiedlichen kinetischen Modelle wird kurz innerhalb der einzelnen Kapitel zu den Substanzen eingegangen, da die unterschiedlichen Substanzen und Applikationsformen hier nicht im Vorfeld besprochen werden können. Grundlage ist ein einfaches Kinetikmodell bei einmaliger oraler Gabe, bei welchem Resorptions-, Verteilungs- und Eliminationsprozesse nebeneinander ablaufen. Das Modell besteht aus einem Eingangskompartiment, das das Substanzdepot enthält. Ihm angeschlossenen wird ein Einkompartiment-Modell, wie es bei einer i.v. Applikation Anwendung findet. Dieses Modell kann bei rascher Verteilung gegenüber der Resorption als ausreichend angesehen werden.

Im folgenden werden die in dieser Arbeit bestimmten Parameter kurz erläutert. Eine Übersicht pharmakokinetischer Betrachtungen findet sich bei Cawello.^[59]

$AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ - Fläche unter der Kurve zwischen den Zeitpunkten $t=0$ und $t = \text{letztem Probenahmezeitpunkt}$ [Zeit · Masse/Volumen]

Die Fläche wurde mit der linearen Trapezregel berechnet. Die tatsächliche Fläche wird dabei bei oraler Applikation und Kinetik 1. Ordnung (unter Vernachlässigung von Resorptionsphänomenen) zuerst unterschätzt (konkaver Kurvenverlauf) und ab 2fachem t_{max} überschätzt (konvexer Kurvenverlauf). Bei der Gesamtfläche gleichen sich diese Abweichungen jedoch nahezu aus.

$$AUC_{(t_{i-1} \rightarrow t_i)} = \frac{1}{2} (t_i - t_{i-1})(C_{i-1} + C_i)$$

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ - Fläche unter der Kurve zwischen den Zeitpunkten $t=0$ und $t = \infty$ [Zeit · Masse/Volumen]

Dieser Wert ist aus den erhobenen Datenpunkten nicht direkt ermittelbar und kann nur durch Extrapolation erhalten werden.

$$AUC_{(0 \rightarrow \infty)} = AUC_{(0 \rightarrow \text{last})} + AUC_{(tz \rightarrow \infty)}$$

Für die meisten Wirkstoffe erfolgen Verteilung und Elimination mit konstanten Raten, sie besitzen somit eine ‚lineare Pharmakokinetik‘. Unter dieser Annahme

kann in der terminalen Phase ein monoexponentieller Kurvenverlauf angenommen werden. Mit einer ausreichenden Menge an Datenpunkten kann über eine log-lineare Regression die terminale Geschwindigkeitskonstante λ_Z berechnet werden. Unter diesen Bedingungen ergibt sich die Restfläche ($AUC_{(t_z \rightarrow \infty)}$) wie folgt:

$$(AUC_{(t_z \rightarrow \infty)}) = C_Z / \lambda_Z$$

wobei $C_Z = C(t_z)$ die letzte quantifizierbare Konzentration ist.

$AUC_{t_z \rightarrow \infty}$ - Differenzfläche (Restfläche) zwischen $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ und $AUC_{0 \rightarrow \infty}$
[Zeit · Masse/Volumen]

AUMC - Fläche unter der ersten Momentkurve [Zeit² · Masse / Volumen]

Die erste Momentkurve entspricht der Auftragung des Produkts aus Plasmakonzentration und Zeit gegen die Zeit. Diese wird zur Berechnung der mittleren Verweildauer benötigt. Setzt man die gleiche Interpolationsfunktion für die Konzentration an, die auch zur Berechnung der AUC verwendet wurde, so erhält man nach Dunne und King^[60] die folgende Berechnungsformel:

$$AUMC_{(t_{i-1}-t_i)} = \frac{1}{6} (t_i - t_{i-1})(C_{i-1}(2 t_{i-1} + t_i) + C_i(t_{i-1} + 2 t_i))$$

wobei: t_i = Probeabnahmezeitpunkt zur Zeit i ; t_{i-1} = Probeabnahmezeitpunkt zur Zeit $i-1$; C_i = Plasmakonzentration zum Zeitpunkt i ; C_{i-1} = Plasmakonzentration zum Zeitpunkt $i-1$

Über den letzten Zeitpunkt t_z der letzten quantifizierbaren Probe muß erneut extrapoliert werden. Die $AUMC(t_z - \infty)$ kann nach Yamaoka *et al.*^[61] wie folgt berechnet werden:

$$AUMC_{(t_z - \infty)} \approx \frac{C_z}{\lambda_z} \left(t_z + \frac{1}{\lambda_z} \right)$$

Da bei der Berechnung der AUMC die Konzentrationsdaten mit der Zeit multipliziert werden, kommt den Datenpunkten der terminalen Phase eine noch größere Bedeutung zu als bei der Berechnung der AUC. Eine erhöhte Probenanzahl in dieser Phase gegenüber der Berechnung der AUC ist daher wünschenswert.

λ_z - terminale Geschwindigkeitskonstante [Zeit⁻¹]

Die Berechnung erfolgt über die halblogarithmische Darstellung der Konzentration gegen die Zeit. Hierfür wird der terminale Abschnitt betrachtet, aus dem sich eine Ausgleichgerade mit der Steigung $-\lambda_z$ ergibt. Mathematisch läßt sich die terminale Geschwindigkeitskonstante nach Sachs^[62] wie folgt berechnen:

$$\lambda_z = [n \sum t_i \ln C_i - \sum t_i \sum \ln C_i] / [n \sum t_i^2 - (\sum t_i)^2]$$

wobei n = Anzahl der Datenpunkte ist; t_i die entsprechenden Zeitpunkte und $\ln C_i$ die korrespondierenden Plasmakonzentrationen zur Basis e (e = Eulersche Zahl).

$A_e(t)$ - Menge des renal ausgeschiedenen Arzneimittels bis zum Zeitpunkt (t)
[Masse]

CL - Gesamtkörperclearance [Volumen/Masse/Zeit]

Die Gesamtkörperclearance stellt sich als Extraktionsgeschwindigkeit dA/dt und der Wirkstoffkonzentration dar.

Extraktionsgeschwindigkeit = $CL \cdot C(t)$;

$$\frac{dA}{dt} \cdot dt = CL \cdot C(t) \cdot dt$$

Integriert man die Gleichung, die nur einen Bruchteil der Konzentrations-Zeit-Kurve darstellt, so erhält man die Gesamtkörperclearance als Verhältnis von applizierter Dosis und AUC.

$$\text{Dosis} = CL \cdot \int_0^{\infty} C(t) dt ; \quad CL = \frac{\text{Dosis}}{\text{AUC}}$$

Diese Parameter sind experimentell leicht zugänglich, womit die Gesamtkörperclearance gut aus den Wirkstoffkonzentrationen zu bestimmen ist, wenn das Zeitintervall so gewählt wurde, daß die terminale Halbwertszeit ausreichend gut bestimmt wurde. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß die Gesamtkörperclearance nur nach i.v Gabe bzw. bei bekannter Bioverfügbarkeit mit entsprechender Korrektur bestimmt werden kann.

Die Gesamtkörperclearance setzt sich additiv aus den einzelnen Clearances der Eliminationsorgane zusammen:

$$CL = CL_R + CL_H + CL_X$$

Wobei die CL_R renale, CL_H die hepatische und CL_X sonstige Clearances (z.B. über die Darmschleimhaut oder Lunge, sowie über Sekrete von Speichel-, Milch-, Tränen- und Schweißdrüsen) darstellen. In den meisten Fällen können die sonstigen Clearances gegenüber der renalen und hepatischen vernachlässigt werden.

CL_R - Renale Körperclearance [Volumen/Masse/Zeit]

Bei gleichzeitiger Messung des unveränderten Wirkstoffs in Plasma und Urin kann die renale Clearance analog zur Gesamtkörperclearance wie folgt bestimmt werden:

$$CL_R = \frac{Ae}{AUC}$$

Hierbei ist darauf zu achten, daß das Zeitintervall für die Sammelperiode groß genug gewählt wird, was durch ein fünffaches der terminalen Halbwertszeit gewährleistet ist.

CL_{nR} - nicht renale Körperclearance [Volumen/Masse/Zeit]

Die nicht renale Körperclearance besteht aus der hepatischen und den sonstigen Clearances. Wie bereits erwähnt, können die sonstigen Clearances vernachlässigt werden. Zusätzlich sind sie schwer experimentell zugänglich. Daher wird die nicht renale Clearance durch einfache Subtraktion der renalen von der Gesamtkörperclearance bestimmt. In ihr enthalten ist hauptsächlich die hepatische Clearance.

C_{max} - Die maximale Konzentration in der untersuchten Matrix [Masse/Volumen]

Die Bestimmung dieses Wertes ist abhängig vom Design der Studie. Je mehr Werte in kleinen Zeitabständen um das Maximum der Konzentration-Zeit-Kurve bestimmt werden können, desto genauer kann C_{max} bestimmt werden.

MRT - mittlere Verweilzeit [Zeit]

Bei der Bestimmung der MRT wird primär nicht zwischen Elimination, Exkretion und Elimination durch Metabolisierung unterschieden. Unter der Annahme, daß alle Moleküle gleichzeitig zum Zeitpunkt 0 in das System eingeführt werden (i.v. Bolusgabe), ergibt sich MRT mit N_i Molekülen, die eine Aufenthaltszeit t_i haben, wie folgt:

$$\text{MRT} = \frac{\sum (N_i \cdot t_i)}{\sum N_i}$$

Die Anzahl der eliminierten Wirkstoffmoleküle in der Zeitspanne t_{i-x} bis t_{i+x} ist proportional zur eliminierten Wirkstoffmenge $dA(t_i)$, wenn x eine kurze Zeitspanne ist. Wird vorausgesetzt, daß jedes in das System eingeführte Molekül dieses wieder verläßt gilt:

$$\sum N_i = \int_0^{\text{Dosis}} dA(t) = \text{Dosis}$$

Für den Zähler aus obiger Gleichung gilt demnach:

$$\sum (N_i \cdot t_i) = \int_0^{\text{Dosis}} t \, dA(t)$$

Da üblicherweise systemische Konzentrationen gemessen werden und die genaue Anzahl der Moleküle des Wirkstoffes im Körper nicht bekannt sind, wird für die Herleitung der Berechnungsformel die Wirkstoffkonzentration im Plasma angenommen und von einer Kinetik erster Ordnung ausgegangen (Vernachlässigung von Verteilungsphänomenen). Mit der Annahmen $dA/dt = CL \cdot C(t)$, die bei der Clearance bereits besprochen wurde, ergibt sich:

$$\text{MRT} = \frac{\int_0^{\infty} t \frac{dA}{dt} dt}{\int_0^{\infty} \frac{dA}{dt} dt} = \frac{\int_0^{\infty} t C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}}$$

Das Konzept der MRT wird auf Rescigno und Serge^[63] zurückgeführt und gilt nur unter folgenden Einschränkungen:

1. Es muß eine lineare Pharmakokinetik vorliegen, bei der alle Moleküle im System konzentrationsunabhängig eliminiert werden.
2. Die Clearance ist konstant ohne Veränderung im zeitlichen Ablauf (stationäre Pharmakokinetik).
3. Die Elimination erfolgt ausschließlich aus dem Kompartiment, aus dem die Proben zur Konzentrationsbestimmung entnommen werden (zentrales Kompartiment).
4. Die Applikation erfolgt als Bolus in das zentrale Kompartiment.

t_{\max} - Zeit, bis nach Arzneimittelgabe die maximale Konzentration in der untersuchten Matrix erreicht ist [Zeit]

Die Bestimmung dieses Wertes ist ebenfalls abhängig vom Design der Studie. Je mehr Werte in kleinen Zeitabständen um das Maximum der Konzentrations-Zeit-Kurve bestimmt werden können, desto genauer kann t_{\max} bestimmt werden.

$t_{1/2}$ - Halbwertszeit aus der terminalen Steigung λ_z einer halblogarithmischen Konzentrations-Zeit-Kurve [Zeit]

Die Halbwertszeit in der Pharmakokinetik ist in der Regel durch Transportvorgänge 1. Ordnung bestimmt. Im Falle der Elimination aus einem zentralen Kompartiment kann die Abnahme der Wirkstoffkonzentration wie folgt bestimmt werden:

$$\frac{dC(t)}{dt} = -k \cdot C(t) \quad k = \text{Eliminationskonstante}$$

Die hier als k bezeichnete Eliminationskonstante ist identisch mit der oben beschriebenen terminalen Geschwindigkeitskonstanten λ_z . Die unterschiedliche Bezeichnung folgt den üblichen Bezeichnungen der ursprünglichen Ansätze, die im Falle der Halbwertszeitberechnung der Physik (nuklearer Zerfall) herrührt, wohingegen der Begriff der terminalen Geschwindigkeitskonstanten eng mit der Pharmakokinetik verbunden ist.

Durch Integration erhält man die folgende Exponentialfunktion:

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad C_0 = \text{Initialkonzentration}$$

Diese wird nach Logarithmieren zu:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - k \cdot t$$

Bei Berechnung von $\ln C(t)$ zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 mit $t_2 > t_1$ erhält man:

$$\ln 2 = k (t_2 - t_1) = k \Delta t$$

Die Halbwertszeit ergibt sich somit zu:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

Die Berechnung von λ_z wurde bereits ausführlich besprochen.

V_{ss} - scheinbares Verteilungsvolumen im Steady-State (Fließgleichgewicht)
[Volumen] oder [Volumen/Masse]

Das Verteilungsvolumen stellt ein hypothetisches Volumen der Körperflüssigkeit dar, welches benötigt wird, um die Gesamtmenge des Wirkstoffs aufzunehmen. Dabei kann der erhaltene Wert über dem Gesamtvolumen des Körpers liegen, was für ein Eindringen des Wirkstoffs in tiefere Kompartimente spricht. Für das Verteilungsvolumen im Gleichgewicht (Ein- und Ausstrom des Wirkstoffs halten sich die Waage) kann folgende Beziehung zur Berechnung von V_{ss} verwendet werden:

$$V_{ss} = CL \cdot MRT = \frac{D \cdot AUMC}{AUC^2}$$

Die entsprechenden Parameter sind bereits besprochen worden.

2.5 Validierung

In diesem Abschnitt soll der Begriff Validierung definiert und eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente gegeben werden. Die Validierung der einzelnen Methoden variiert dabei aufgrund der unterschiedlichen Fragestellungen und der angewendeten Aufarbeitungstechniken.

Am Anfang einer Validierung steht die Definition eines zu erreichenden Ziels. Ist dieses Ziel eindeutig definiert, kann eine Methode festgelegt werden, die geeignet ist, die benötigten Daten zu ermitteln. Die bei der Durchführung von Laborexperimenten ermittelten Daten werden zur Beurteilung der Methode herangezogen. Eine Methode kann als validiert betrachtet werden, wenn die ermittelten Daten die Akzeptanzkriterien erfüllen.^[64]

Dies entspricht dem Entwurf der DIN ISO/IEC 17025:1998-10, in dem es heißt:

“Die Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, daß die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden.”

Im Fall dieser Arbeit ist das Ziel die Quantifizierung von Wirkstoffen in biologischen Matrices. Zur Ermittlung der Daten sollen LC-MS/MS-Methoden zum Einsatz gebracht werden.

Für diese Methodenart werden Leistungsmerkmale und Akzeptanzkriterien festgelegt, die eine Beurteilung des zu validierenden Verfahrens möglich machen. Für andere Fragestellungen oder andere Methoden können sich diese Leistungsmerkmale und Akzeptanzkriterien deutlich von den hier vorgestellten unterscheiden.

2.5.1 Referenzmaterialien

Die verwendeten Referenzmaterialien sollen in einer handelsüblichen Form (freie Base oder Säure, Salz, Ester etc.) vorliegen und mit einem Reinheitsfaktor versehen sein. Mit diesem kann eine Stammlösung genau definierter Konzentration ermittelt und hergestellt werden.

Für einen Validierungstag werden zwei unabhängige Stammlösungen (für Kalibriergeraden (CR) und Qualitätskontrollproben (QC)) von zwei unterschiedlichen Personen frisch hergestellt.

2.5.2 Spezifität der Methode

Die Spezifität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit, einen Analyten neben weiteren Komponenten quantitativ zu analysieren.^[65] Dabei können sich die weiteren Komponenten gegenseitig beeinflussen, während eine selektive Methode verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung erfassen und identifizieren muß. Die Spezifität der verwendeten Methoden wird durch Injektion von mit und ohne internem Standard aufgearbeiteter Leermatrix (Matrix ohne zugesetzten Wirkstoff) bestimmt. Zur Retentionszeit der zu messenden Wirkstoffe dürfen keine signifikanten Störungen zu erkennen sein. Sollten mehr als 10 % der Leerwerte signifikante Störungen aufweisen, muß die Methode umgestellt werden, um die Kriterien zu erfüllen.

2.5.3 Validierung des dynamischen Messbereichs (Konzentrationsbereich)

Zur Validierung des Konzentrationsbereichs wird an mindestens drei Tagen mindestens eine Kalibriergerade aus der Stammlösung (CR) in der biologischen Leermatrix hergestellt. Der größte Kalibrierstandard (L1) wird dabei direkt aus der Stammlösung hergestellt. Die folgenden Kalibrierstandards (L_n) werden dabei aus dem jeweils größeren Kalibrierstandard (L_{n-1}) nach einem Pipettierschema wie es in Tabelle 3 vorgestellt ist, hergestellt.

Die Anzahl der notwendigen Kalibrierstandards für eine lineare Abhängigkeit beträgt dabei mindestens drei. Um eine Krümmung festzustellen, bedarf es eines Minimums von mindestens fünf unterschiedlichen Konzentrationen (ICH-Richtlinien), kann aber wie in dieser Arbeit, deutlich darüber hinaus gehen. Bei pharmakokinetischen Untersuchungen erstreckt sich der Konzentrationsbereich der Wirkstoffe in der Regel über mehrere Potenzen und beinhaltet eine Krümmung. Die Anpassung an die Geradengleichung

$$y = a + bx$$

erfolgt mittels gewichteter linearer Regression, bei der Meßpunkte mit kleineren Abweichungen stärker berücksichtigt werden,^[66] wobei y das Peakflächenverhältnis, x die theoretische Analytkonzentration, b die Steigung und a der y -Achsenabschnitt ist. Zur Berechnung der Kalibrierfunktion werden bei der Verwendung eines internen Standards nicht die Flächen des Analyten herangezogen, sondern die Peakflächenverhältnisse.

Zusätzlich beinhalten die Kalibriergeraden einen Leerwert ohne internen Standard (L0) und einen Leerwert mit internem Standard (L0 + IS). Diese werden nicht zur statistischen Auswertung mit herangezogen.

Neben dem y-Achsenabschnitt (a) und der Steigung (b) wird der Korrelationskoeffizient (r) bestimmt. Dieser ist ein Maß für den Grad der Anpassung des verwendeten mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte. Je höher sein Wert ist, desto größer ist die Korrelation zwischen x und y . Dies muß nicht notwendigerweise mit der Linearität übereinstimmen. Bei einer stetigen Zunahme von x kann es durchaus mal zu einer stärkeren und mal zu einer weniger starken Zunahme von y kommen. Als Ergebnis wird ein hoher Korrelationskoeffizient einer Kurve erhalten.

Der Korrelationskoeffizient errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

wobei x_i die Einzelwerte der Konzentrationen, y_i die Einzelwerte der Peakflächenverhältnisse und \bar{x} bzw. \bar{y} jeweils die gemittelten Werte sind.

Als Akzeptanzkriterium für die Bestimmungsgrenze wird folgendes Kriterium vorgegeben:

- das Signal-Rausch-Verhältnis muß mindestens den Wert 5 aufweisen

Als Akzeptanzkriterien für die Linearität werden folgende Kriterien vorgegeben:

- Genauigkeit des kleinsten Kalibrierstandards ± 20 % vom theoretischen Wert
- Genauigkeit aller Kalibrierstandards außer des kleinsten ± 15 % vom theoretischen Wert
- mindestens vier von sechs Kalibrierstandards müssen innerhalb der oben genannten Grenzen liegen
- der kleinste und größte Kalibrierstandard müssen in der Kalibrierung enthalten sein
- der Korrelationskoeffizient muß ≥ 0.95 sein

Die Abweichungen von 20 % für den kleinsten Kalibrierstandard und 15 % für alle anderen wurde von Shah *et al.*^[67] 1992 für Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzstudien veröffentlicht und sind als obere Grenzwerte anzusehen. Liegen die erhaltenen Werte der Validierungsexperimente außerhalb dieser Kriterien, können mit der Methode keine pharmakokinetischen Daten erhoben werden.

2.5.4 Validierung der Präzision und Genauigkeit der Methode durch Qualitätskontrollproben (QC)

Präzision als Maß für die Streuung von Analysenergebnissen einer Methode ist das Resultat zufälliger Fehler. In ihnen enthalten ist neben der Meßpräzision die Methodenpräzision. Zur Bestimmung der Präzision sollten mindestens fünf einzelne Werte verwendet werden. Die Meßpräzision sollte dabei in einer Validierung nicht mehr explizit überprüft werden,^[64] sondern ist Bestandteil der Methodenentwicklung. Unter 2.5.4.1 – 2.5.4.7 sind die Versuche aufgeführt, die zur Bestimmung der Methodenpräzision in dieser Arbeit herangezogen wurden. Sie stellen einen Auszug aus den möglichen Experimenten dar, die zur Validierung einer LC-MS/MS-Methode herangezogen werden können und richten sich weitgehend nach den Anforderungen der Food and Drug Administration.

Als Streuungsmaß werden die Standardabweichung (s) und die relative Standardabweichung, die identisch mit dem Variationskoeffizient (CV) ist, verwendet. Diese ergeben sich aus den folgenden Gleichungen:

$$s = \left(\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

x_i = Einzelwert
 \bar{x} = Mittelwert
 n = Anzahl der Messungen

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Als weiteres Maß für die Übereinstimmung der gemessenen Werte mit den richtigen Werten wird die Genauigkeit ermittelt. Diese wird ebenfalls anhand von fünf Werten überprüft. Die Differenz des sich aus den fünf einzelnen Werten ergebenden Mittelwerts zum richtigen Wert beschreibt die Richtigkeit der Methode und wird in der statistischen Auswertung angegeben.

Als Akzeptanzkriterien für die Präzision und Genauigkeit werden folgende Kriterien vorgegeben:

- Der Variationskoeffizient über alle Validierungstage muß $\leq 15\%$ (für den kleinsten QC $\leq 20\%$) sein.
- Die Genauigkeit muß $\pm 15\%$ (für den kleinsten QC $\pm 20\%$) sein.

Konzentrationen der Qualitätskontrollproben

Die Konzentrationen der Qualitätskontrollproben sollen den dynamischen Meßbereich abdecken. Dabei sollen mindestens drei verschiedene Konzentrationen zur Kontrolle verwendet werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden enthalten wie bereits erwähnt, einen großen dynamischen Meßbereich, daher wurden vier oder mehr Konzentrationen verwendet, um den gesamten Meßbereich abzudecken.

Zur Überprüfung des unteren Meßbereichs dient eine Qualitätskontrolle an der Bestimmungsgrenze. Eine weitere liegt um einen Faktor 2 bis 3 über der Bestimmungsgrenze (QC niedrig) und eine Qualitätskontrolle entspricht mindestens 75 % des höchsten Kalibrierstandards (QC hoch). Die weiteren Qualitätskontrollproben liegen zwischen dem hohen und dem niedrigen QC.

Bei pharmakokinetischen Studien können die Konzentrationsunterschiede der Proben den dynamischen Bereich überschreiten.

In diesem Fall werden die Proben mit einem entsprechenden Volumen an Leermatrix vorverdünnt. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, werden Qualitätskontrollproben hergestellt, deren Konzentration größer als der größte Kalibrierstandard ist. Diese Proben werden wie auch die Studienproben vorverdünnt.

Die Qualitätskontrollproben werden analog der Kalibrierstandards aus der Stammlösung (QC) nach dem Pipettierschema wie es in Tabelle 3 wiedergegeben ist, hergestellt.

Im folgenden werden die Experimente, die zur Validierung der Methode durchgeführt wurden, näher vorgestellt.

2.5.4.1 Präzision von Tag zu Tag

An jedem Validierungstag werden Qualitätskontrollproben frisch hergestellt und jede Konzentration fünf mal gemessen.

Der Variationskoeffizient jeder Konzentration über alle Validierungstage wird errechnet. Ebenso wird die Genauigkeit für jede Probe ermittelt, und die Richtigkeit (RE) für jede Konzentration angegeben.

2.5.4.2 Präzision innerhalb eines Tages

An einem Tag wird der Variationskoeffizient jeder Konzentration und die Genauigkeit errechnet. Die Richtigkeit (RE) wird angegeben.

2.5.4.3 Präzision von hämolytischem Plasma

An einem Validierungstag werden Qualitätskontrollproben (QC HEMO) in hämolytischem Plasma frisch hergestellt. Hämolytisches Plasma wird durch Zusetzen von 1 % Vollblut zu der Leermatrix hergestellt. Die Konzentration der hämolytischen Qualitätskontrollproben wird individuell bei der jeweiligen Methode angesprochen.

Der Variationskoeffizient und die Genauigkeit werden errechnet. Die RE wird angegeben.

2.5.4.4 Validierung der Aufarbeitungsstabilität

An einem Validierungstag werden zusätzliche Qualitätskontrollproben hergestellt und aufgearbeitet. Die erhaltenen Proben jeder Konzentration werden vereinigt und erneut auf die Probengefäße verteilt. Diese werden gelagert (Lagerungsbedingungen werden bei den jeweiligen Methoden genannt) und an den folgenden Validierungstagen gemessen und ausgewertet.

2.5.4.5 Validierung der Stabilität bei Raumtemperatur

An einem Validierungstag werden 10 Qualitätskontrollproben (Konzentrationen werden bei den jeweiligen Methoden genannt) hergestellt und bei -70 °C eingefroren. Am folgenden Validierungstag werden fünf Proben jeder Konzentration zu einem bei den jeweiligen Methoden genannten Zeitpunkt aufgetaut und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die weiteren fünf Proben werden zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut und ebenfalls bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben werden zu einem definierten Zeitpunkt mit den Proben des aktuellen Validierungstages aufgearbeitet und gemessen. Der Variationskoeffizient und die Genauigkeit werden errechnet.

2.5.4.6 Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen

An einem Validierungstag werden 15 Qualitätskontrollproben (Konzentrationen werden bei den jeweiligen Methoden genannt) hergestellt und bei -70 °C eingefroren. Alle Proben werden nach 12 - 24 Stunden aufgetaut und fünf Proben werden am aktuellen Validierungstag aufgearbeitet und gemessen. Die restlichen 10 Proben werden wieder eingefroren. Nach 12 - 24 Stunden werden diese erneut aufgetaut und fünf Proben werden am aktuellen Validierungstag aufgearbeitet und gemessen. Die restlichen fünf Proben werden für weitere 12 - 24 Stunden eingefroren und am folgenden Validierungstag aufgearbeitet und gemessen. Die statistische Auswertung bezieht sich auf die am Tag der Herstellung gemessenen Qualitätskontrollproben der jeweiligen Konzentration. Der Variationskoeffizient wird errechnet.

2.5.4.7 Validierung einer Langzeitstabilität

An einem Validierungstag werden 60 Qualitätskontrollproben (Konzentrationen werden bei den jeweiligen Methoden genannt) hergestellt und bei -20 °C bzw. -70 °C eingefroren. Die Proben werden nach festgelegten Zeitabständen aufgetaut, aufgearbeitet und gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade gemessen. Der Variationskoeffizient wird errechnet.

2.5.5 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert (RW) des Analyten in der Probe.:

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{gemessener Mittelwert}}{\text{richtiger Wert}} \cdot 100\%$$

Der gemessene Mittelwert ergibt sich aus den Werten der Qualitätskontrollproben. Problematisch ist die Erzeugung eines richtigen Wertes. Wie im Kapitel 2.2 erläutert, ist der gemessene Wert abhängig von der Ionisierung und damit von der Matrixzusammensetzung in der Quelle. Die Herstellung eines richtigen Wertes muß daher gewährleisten, daß die Matrixbedingungen der zu vergleichenden Proben möglichst identisch sind. Dies wird erreicht, indem der Analyt und der interne Standard zu einer aufgearbeiteten Leermatrix zugesetzt werden. Die genaue Herstellung des richtigen Wertes wird bei den jeweiligen Methoden näher beschrieben.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate werden von jeder Konzentration der Qualitätskontrollproben richtige Werte hergestellt und je fünfmal gemessen. Die Mittelwerte der

Flächen werden normalisiert, indem sie durch die theoretische Konzentration der Proben dividiert werden. Die Wiederfindungsrate für jede Konzentration wird bestimmt, ebenso die Wiederfindungsrate über den gesamten Konzentrationsbereich. Für den internen Standard entfällt die Normalisierung der Flächen, da die Wiederfindungsrate nur bei der in der Methode verwendeten Konzentration bestimmt wird. Die erhaltenen Flächen können direkt miteinander verglichen werden, solange der richtige Wert in der Konzentration der aufgearbeiteten Proben hergestellt wird.

3 Geräte und Materialien

Im folgenden sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Geräte und Materialien aufgeführt. Bei den einzelnen Methoden wird auf die verwendeten Geräte hingewiesen. Wird bei einer Methode nicht ein Gerätetyp modellspezifisch erwähnt, so ist dieses innerhalb der Methode austauschbar. Als Beispiel seien hier die HPLC-Pumpen genannt, die generell eingesetzt werden konnten, da es sich bei den Methoden um isokratische Bedingungen handelte. Reinsubstanzen, Fließmittel, Pufferlösungen und Säulen werden gesondert bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle vom Hersteller direkt verwendeten Lösungsmittel und Feststoffe wurden entsprechend den angegebenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt und bis zum Verfallsdatum verwendet. Fließmittel- und Pufferlösungen wurden maximal bis 14 Tage nach ihrer Herstellung verwendet. Eventuelle Abweichungen werden bei den Methoden beschrieben. Für die hergestellten Stammlösungen der Substanzen werden die Lagerungsbedingungen angegeben.

3.1 Geräte und Materialien

HPLC-Pumpen:	L-7100 Lichrograph (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); L-6000 Lichrograph (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); L-6200A Lichrograph (E. Merck, Darmstadt, Deutschland)
Autosampler:	L-7250 LaChrom (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); CTC Analytics PAL System, (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz)
Massenspektrometer:	PE Sciex API III Plus (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada); PE SCIEX API 3000 (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada)
Zentrifugen:	GPR Zentrifuge (Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland); Allegra 6R Kühlzentrifuge GPR Model (Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland); Biofuge B, (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)
Analytische Waage:	Mettler AT261 Delta Range FACT (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)
Pipettierroboter:	Multimek™ Automated 96-Channel Pipettor (Beckmann Coulter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)
Ultraschallbad:	Sonorex Super RK 255 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)

Probenkonzentrierer:	Micro - DS96 (Porvair Scienses Ltd., Shepperton, United Kingdom); N-EVAP TM Stickstoff Evaporator, Organomation Ass., Berlin, Massachusetts, USA
Festphasen-extraktionsplatte:	3M Empore [®] C8 SD 96-well plates, (3M, Zwijndrecht, Belgien)
Festphasen-extraktionshülse:	C8 Isolute, 100 mg, 1 ml Reservoir, ICT GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Vakumstation:	VAC ELUT SPS, ICT GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Pipetten:	Eppendorf Reference 10 µl – 100 µl und Pipettenspitzen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland); Eppendorf Reference 100 µl - 1000 µl und Pipettenspitzen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland); Eppendorf Reference 50 µl – 200 µl und Pipettenspitzen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland); Eppendorf Multipette Plus und Combitips, (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland); Transferpipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); Pipettenspitzen SAGIAN TYPE, 200 µl Capacity (Beckmann, Unterschleißheim, Deutschland)
Schüttler:	Heidolph REAX 2000 (Heidolph-Elektro GmbH, Kehlheim, Deutschland); Multitube Vortexer (VWR Scientific South Plainfield, NJ, USA)
Kühlgeräte:	4 °C, nicht höher als 10 °C (AEG, Nürnberg, Deutschland); -30 °C, nicht höher als -20 °C (AEG, Nürnberg, Deutschland); -70 °C, nicht höher als -65 °C (AEG, Nürnberg, Deutschland)
Gefäße:	Röhre 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); Röhre 13 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); Röhre 3.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); 13 ml Reagenzglas (Laborcenter, Nürnberg, Deutschland); 3.5 ml Reagenzglas (Laborcenter, Nürnberg, Deutschland); Meßkolben (Laborcenter, Nürnberg, Deutschland); Bechergläser (Laborcenter, Nürnberg, Deutschland); Mikro-Schraubgefäße 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland);

	Reaktionsgefäße 1.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); Reaktionsgefäße 0.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Mikrotiterplatten:	PP square well, 1 ml (Porvair Sciences Ltd, Shepperton, United Kingdom); PP square well, 2 ml (Porvair Sciences Ltd, Shepperton, United Kingdom)
Primavette [®] :	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Transferpipetten:	Transferpipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen:	SAGIAN TYPE, 200 µl Capacity (Beckmann, Unterschleißheim, Deutschland)
Lösungsmittel:	Trifluoressigsäure, p. A. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Ameisensäure, p. A. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Essigsäure, p. A. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Acetonitril, HPLC-grade (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Großbritannien); Methanol, HPLC-grade (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Großbritannien); Ethanol, absolut (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Dichlormethan (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Cyclohexan, HPLC-grade (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland); Ethylacetat, HPLC-grade (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland); Wasser, Milli-Q system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA); Isotone Natriumchloridlösung 0.9 % (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Reagenzien:	Triethylamin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland); Hydroxylaminhydrochlorid, ACS 99 % (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland); Ammoniumformiat, p. A. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland); Ammoniumacetat, p. A. (E. Merck, Darmstadt, Deutschland)
Reinstgase:	Stickstoff 5.0 (Linde AG Werksgruppe technische Gase, Nürnberg, Deutschland); Argon 5.0 (Linde AG Werksgruppe technische Gase, Nürnberg, Deutschland); Helium 5.0 (Linde AG Werksgruppe technische Gase, Nürnberg, Deutschland)

3.2 Software

Sample Control Version 1.4 (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada)

MacQuan Version 1.6 (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada)

Microsoft Office (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)

MultiPettePro (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)

Multiview Version 1.4 (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada)

Mac Spec 3.3 (PE Sciex, Toronto, Ontario, Kanada)

4 Cisaprid

Cisaprid (CIS) ist ein substituiertes Piperidinyl-benzamid, chemisch verwandt zum Metoclopramid, und ein prokinetischer Wirkstoff. Im Unterschied zu den Wirkstoffen Metoclopramid, Bromoprid und Domperidon wirkt Cisaprid nicht nur im oberen Gastrointestinaltrakt, sondern auch am Kolon. Seine Wirkung beruht auf einer verstärkten Freisetzung von Acetylcholin im Auerbach-Plexus (*Plexus myentericus*).

Chemie

Cisaprid, (3*R*4*S*, 3*S*4*R*)-4-Amino-5-chlor-*N*-{1-[3-(4-fluorphenoxy)propyl]-3-methoxy-piperidyl}-2-methoxybenzamid, ist ein Racemat der cis-Form am 3,4-disubstituierten Piperidinring. Es ist ein weißes, kristallines Pulver, welches handelsüblich ein Molekül Kristallwasser enthält. Der Schmelzpunkt liegt bei 109.8 °C und die Substanz ist praktisch unlöslich in Wasser, aber gut löslich in Dichlormethan. Die Löslichkeit in Methanol wird mit 100 mg/ml angegeben.^[68] Stabilitätsuntersuchungen zeigen eine ausreichende Stabilität über 90 Tage von Cisaprid in löslichen Dosierungsformen bei 4 °C. Die Struktur des Racemats ist in Abbildung 9 gezeigt.

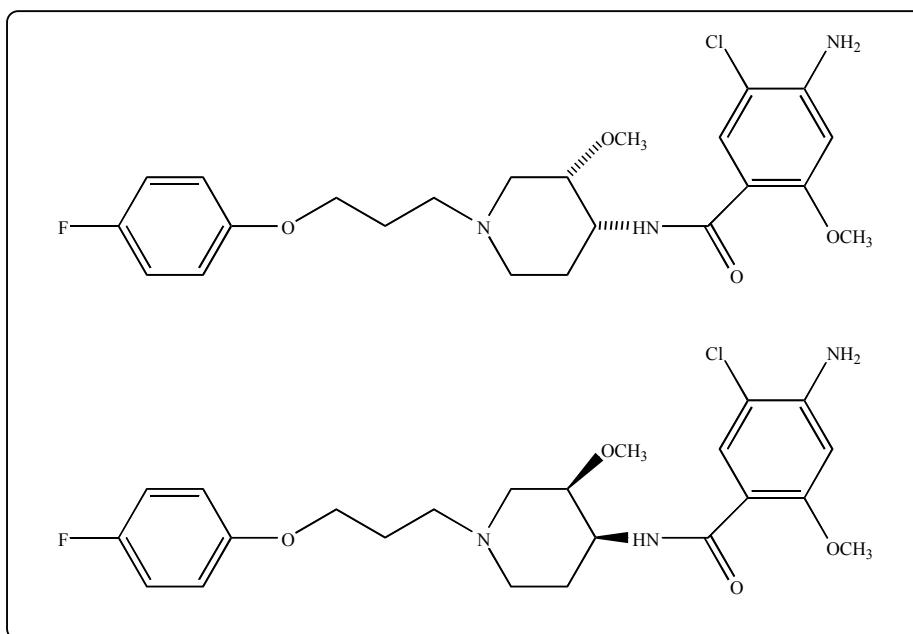


Abbildung 9: Cisaprid (C₂₃H₂₉ClFN₃O₄, Mw: 465.95 g/mol).

Pharmakokinetische Daten

Maximale Plasmakonzentrationen werden bei gesunden Probanden 1 - 2 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 5 - 20 mg Cisaprid erreicht. Eine Steigerung um ca. 20 % bei Einnahme nach der Mahlzeit konnte beobachtet werden. Mittlere Maximalplasmakonzentrationen (C_{\max}) nach einmaliger oraler Gabe einer 10 mg Tablette 15 Minuten vor einer Mahlzeit betragen 45 bis 65 ng/ml. Nach Gabe von 10 mg Tabletten 3 mal täglich über mehrere Tage liegen die Maximalplasmakonzentrationen (C_{\max}) bei 60 bis 80 ng/ml.^[69]

Maya *et al.*^[70] fanden 1998 nach einer einmaligen Dosierung von 20 mg Cisaprid als Tablette (2 • 10 mg) folgende Mittelwerte: C_{\max} (52.8 ng/ml); $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (329 ng • h/ml); t_{\max} (1.26 h); $t_{1/2}$ (4.08 h). Hingegen fanden Hedner *et al.*^[71] 1990 nach einmaliger Dosierung von 15 mg höhere Mittelwerte für C_{\max} (74.3 ng/ml) und $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (855 ng • h/ml). Die Zeit bis zur Maximalkonzentration war vergleichbar (t_{\max} (1.5 h)), jedoch lag die Halbwertszeit ($t_{1/2}$ (9.8 h)) deutlich über der von Maya *et al.*^[70] ermittelten Werten.

Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt aufgrund eines First-Pass-Effektes nur 40 - 50 %.^[69] Die Bindung an Plasmaproteine *in vitro* wurde zu 98 % bestimmt.^[72]

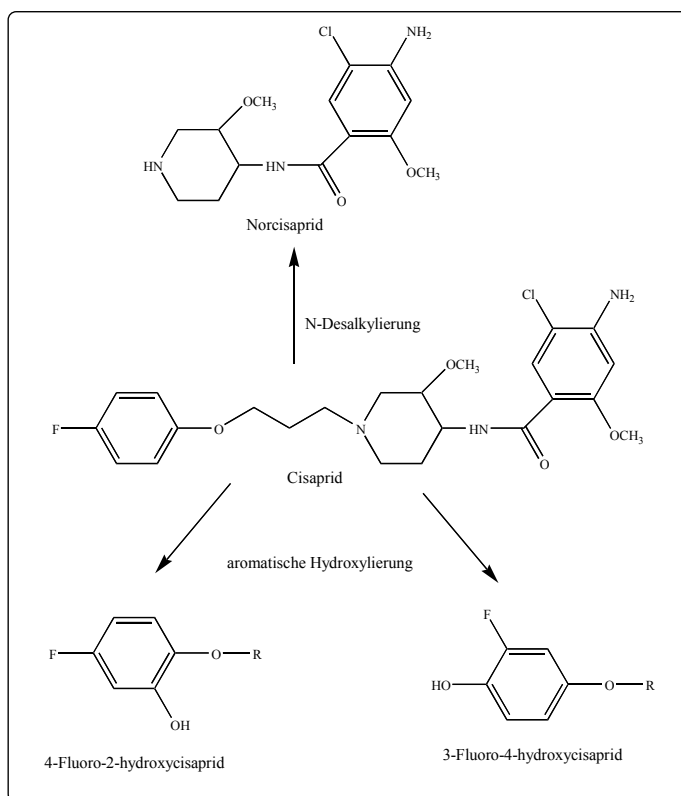


Abbildung 10: Metabolisierung von Cisaprid

Die Metabolisierung erfolgt wie in Abbildung 10 gezeigt, zum einen über eine oxidative N-Desalkylierung zu dem Hauptmetaboliten Norcisaprid und zum anderen über eine aromatische Hydroxylierung zu 3-Fluoro-4-hydroxycisaprid und 4-Fluoro-2-hydroxycisaprid. Eine genaue Betrachtung der verschiedenen Biotransformationsreaktionen von Cisaprid wurde von Meuldermans *et al.*^[72] erstellt. Die pharmakologische Aktivität der Metaboliten ist allerdings zu vernachlässigen; so beträgt sie bei Norcisaprid etwa ein sechstel der Muttersubstanz.^[73]

Die Eliminierung von Cisaprid erfolgt zu gleichen Teilen über Urin und Fäzes, wobei nur ca. 1 % über Urin und 4-6 % über Fäzes unverändert als Cisaprid ausgeschieden werden. Durch radioaktives Cisaprid konnte die Menge an Norcisaprid zu 41-45 % der oral verabreichten Dosis bestimmt werden.^[72]

Die Plasmahalbwertszeit beträgt 7 – 10 Stunden und ist bei Patienten mit Hepatitis und älteren Menschen verlängert.^[69] Üblicherweise wird drei mal täglich eine 5 mg Tablette mindestens 15 Minuten vor einer Mahlzeit eingenommen. Die Dosis kann auf drei Tabletten á 10 mg mit einer zusätzlichen 10 mg Dosis für die Nacht gesteigert werden. Eine therapeutische Konzentration von 60 – 80 ng/ml wurde vorgeschlagen.^[74, 75]

Zielsetzung

Zur Bestimmung von Cisaprid, nach einmaliger oraler Gabe von 20 mg sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, mit der die Plasmakonzentrationen bis 36 Stunden nach Gabe gemessen werden kann. Diese sollte nach GLP-Standard validiert und zur Bestimmung der Plasmakonzentration von 24 Probanden zur Anwendung gebracht werden.

Bei zu erwartenden maximalen Plasmakonzentrationen von ca. 35 ng/ml und einer Halbwertszeit von 7 – 10 Stunden ist ein unteres Quantifizierungslimit von 1 ng/ml, wie von Woestenborghs *et al.*^[76] 1988 beschrieben, als ausreichend anzusehen.

4.1 Geräte und Materialien

- Cisaprid von Novartis (Morepan Lab. Ltd.), Indien, Charge: CIS 7043, Reinheitsgrad: 96.32 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C.
- Fluoxetin Hydrochlorid von Gedeon Richter, Budapest, Ungarn, Charge: H92069 N, Reinheitsgrad: 99.9 % als Fluoxetin-Hydrochlorid, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C.
- Nachverdünnungslösung: 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser: 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 1 ml Ameisensäure zupipettiert.
- 2 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser für Probengeberspülflüssigkeit: 980 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 20 ml Ameisensäure zupipettiert.
- Fließmittel: 550 ml 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser und 450 ml Acetonitril wurden zusammengegeben und gut gemischt. Danach wurde das Fließmittel im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
- Probengeberspülflüssigkeit: 50 ml 2 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser und 450 ml Acetonitril wurden zusammengegeben und gut gemischt. Danach wurde die Probengeberspülflüssigkeit im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
- Fluoxetin-interne Standardstammlösung, 82.6 µg/ml: 2.24 ± 0.05 mg Fluoxetinhydrochlorid wurden zu 25 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -20 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- Fluoxetin-interne Standardarbeitslösung, 413.0 ng/ml: 0.500 ml der Fluoxetin interner Standardstammlösung (82.6 µg/ml) wurden zu 100 ml mit Milli-Q[®]-Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur maximal 3 Tage gelagert.
- Cisaprid-Stammlösung-CR, 200.0 µg/ml: 10.38 mg Cisaprid wurden zu 50 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.
- Cisaprid-Stammlösung-QC, 960 µg/ml: 9.97 mg Cisaprid wurden zu 10 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.
- HPLC-Säule, YMC ODS-AQ, 3.0 µm, 50 x 4.0 mm (YMC Europe GmbH, Schermbeck/Weselerwald, Deutschland).
- PE SCIEX API 3000 (Perkin Elmer, Toronto, Ontario, Kanada).

4.2 Methodenentwicklung und Vorversuche

Wie unter 2.5 beschrieben sollen die Versuche zur Validierung einer LC-MS/MS-Methode für die Bestimmung von Cisaprid in Humanplasma durchgeführt werden.

Einer Methodvalidierung sind, falls nicht bereits eine bestehende Methode existiert, umfangreiche Versuche vorgeschaltet, um eine Methode zu entwickeln, die den späteren Anforderungen der Messung von Plasmaproben in einem hohen Umfang entspricht. In der Regel müssen die Bedingungen für die massenspektrometrische Detektion sowie die chromatographischen Bedingungen und die Aufarbeitung optimiert werden. Die Optimierung einer Bedingung kann dabei zu einer Inkompatibilität mit anderen Bedingungen führen. Wie im theoretische Teil beschrieben, sind nicht flüchtige Puffer in der Massenspektrometrie unerwünscht, was bei der Optimierung der HPLC-Methode beachtet werden muß und diese damit bereits einschränkt.

Für die Entwicklung der Methode wurde eine Cisaprid-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg Cisaprid ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in 1.00 ml Acetonitril eingewogen und auf fünf Aliquote à 200 µl aufgeteilt. Diese wurden bei - 70 °C aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt, wobei ein einmal entnommenes Aliquot nicht erneut eingefroren wurde, jedoch bei + 4 °C maximal über 48 Stunden zum Einsatz kam.

4.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurde die Cisaprid-Stammlösung (1.00 mg/ml) volumetrisch mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (50/50, v/v) auf eine Konzentration von 1.00 µg/ml verdünnt. Diese wurde über eine Spritzenpumpe mit einer Flußrate von 10 µl/min infundiert. Die unten gezeigten Spektren sind mit einer Einheitsmassenauflösung und einer Peakbreite von 0.7–0.9 u bei halber Peakhöhe im MCA Modus (10 scans) am API 3000 aufgenommen.

Niggebruegge *et al.*^[77] benutzten zur Erzeugung der Ionen von Cisaprid das Elektrospray-Interface als Quelle. Versuche zur Empfindlichkeit des Detektors mit der APCI- und Elektrospray-Quelle ergaben ebenfalls höhere Ionenausbeuten mit der Elektrospray-Quelle.

Da es sich bei Cisaprid um ein basisches Molekül handelt, wurden die massenspektrometrischen Aufnahmen im positiven Modus durchgeführt.

Mit der Elektrospray-Quelle wurden im Anschluß Spektren des protonierten Moleküls und der Produkt-Ionen aufgenommen.

Aufgrund des im Cisaprid enthaltenen Chloratoms findet sich neben dem Basispeak (m/z 466), welcher der nominalen Masse von Cisaprid entspricht, auch ein protoniertes Molekülion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 468, welches das ^{37}Cl -Isotop enthält. Das Q1-Spektrum der protonierten Molekülionen von Cisaprid ist in Abbildung 11 zu sehen.

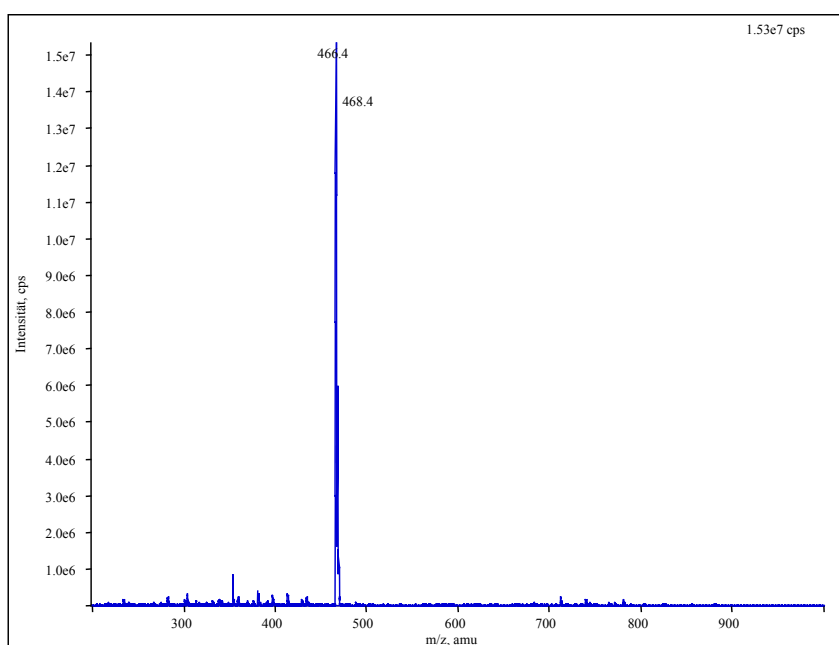


Abbildung 11: Q1-Spektrum von Cisaprid.

Für den erhaltenen Basispeak wurden die Bedingungen optimiert um ein Produkt-Ion zu erhalten. Neben dem Produkt-Ion von m/z 234 konnte ein Produkt-Ion mit m/z von 184 erhalten werden, welches dem Produkt-Ion, das von Niggebruegge *et al.*^[77] verwendet wurde, entspricht. Die Abbildung 12 zeigt die aus dem Molekülion m/z 466 entstehenden Produkt-Ionen.

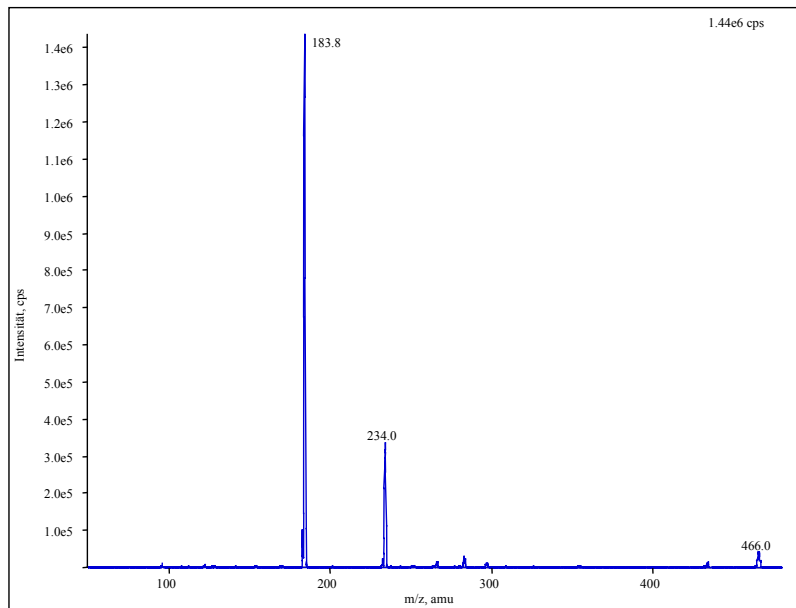


Abbildung 12: Produkt-Ionen-Spektrum von Cisaprid entstehend aus dem Molekülion m/z 466.

Diese Informationen wurden für die weitere Methodenentwicklung und zur Erstellung eines selektiv überwachten Reaktions-Modus (SRM-Modus) verwendet.

Im Laufe der Methodenentwicklung zeigte sich jedoch, daß die Störungen, die bei der Auswertung der Peakfläche unter Verwendung eines Übergangs von m/z 466 → m/z 184 (Molekülion → Produkt-Ion) auftraten, groß waren. Als Alternative wurde die Optimierung des Molekülions m/z 468 und das daraus entstehende Produkt-Ion m/z 186 vorgenommen. Die Abbildung 13 zeigt die Produkt-Ionen entstehend aus dem Molekülion m/z 468.

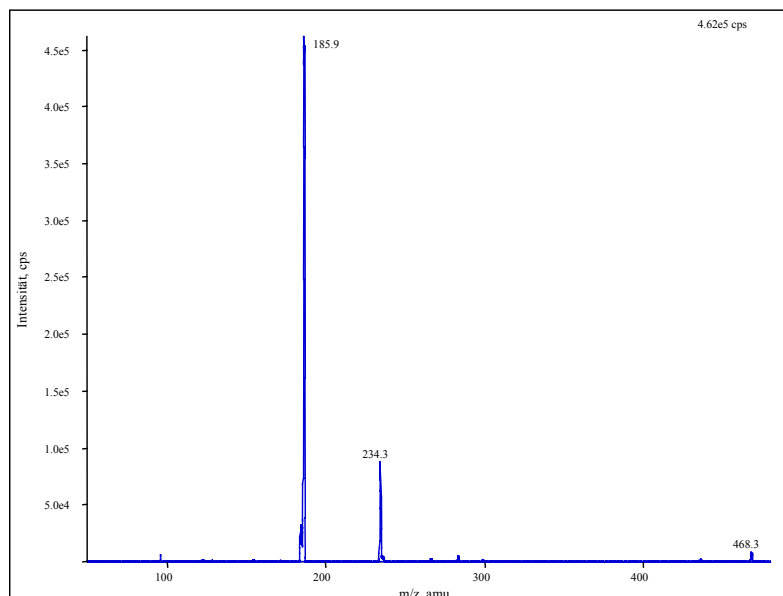


Abbildung 13: Produkt-Ionen-Spektrum von Cisaprid entstehend aus dem Molekülion m/z 468.

Anhand der beiden Produkt-Ionen-Spektren ist zu erkennen, daß in beiden das Produkt-Ion m/z 234 enthalten ist, nicht aber ein Signal bei m/z 236. Dies ist ein eindeutiges Zeichen, daß dieses Fragment kein Chloratom mehr enthält. Ein mögliches Fragmentierungsschema von Cisaprid ist in Abbildung 14 aufgezeigt.

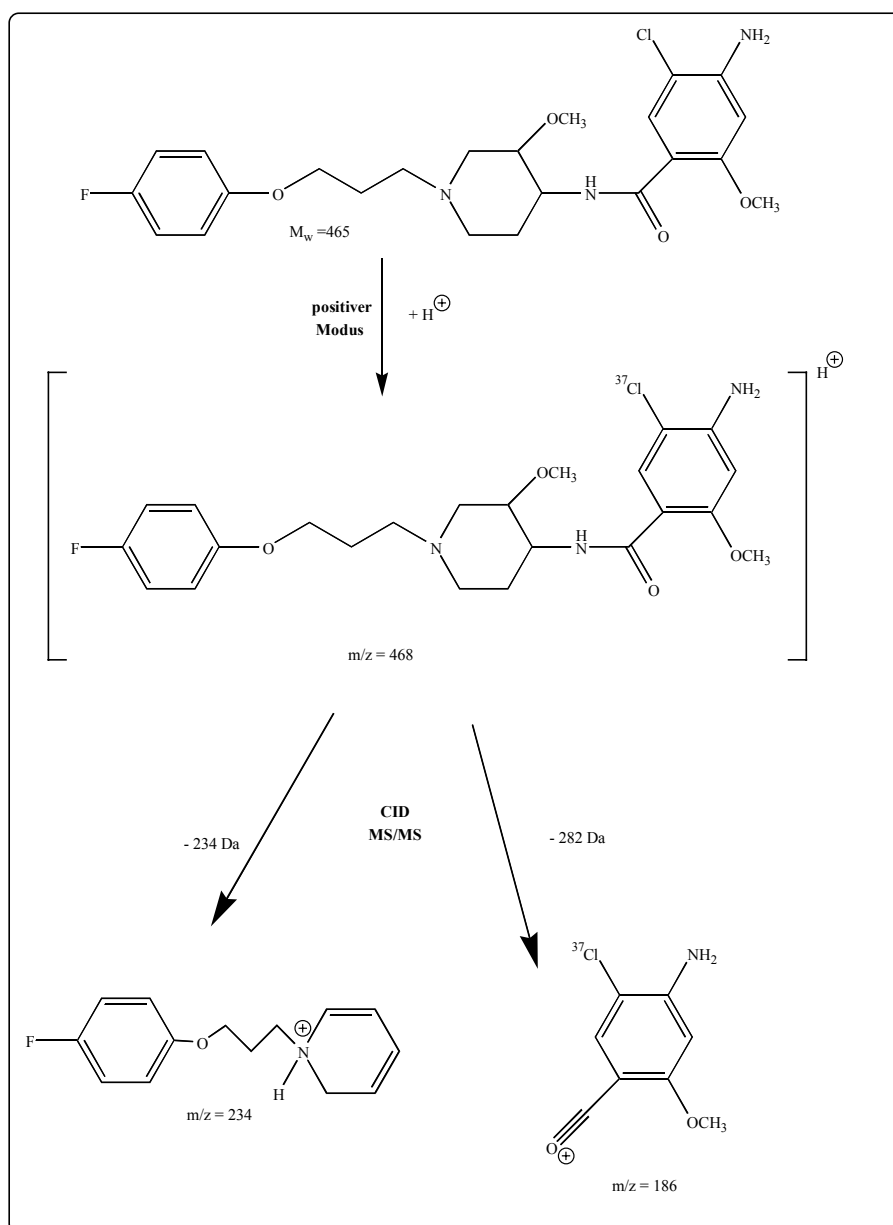


Abbildung 14: Fragmentierungsschema ausgehend vom ^{37}Cl -Isotop enthaltenden Cisaprid.

Die weiteren Versuche mit dem Übergang von m/z 468 \rightarrow m/z 186 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion) zeigten einen effektiven Gewinn an Empfindlichkeit gegenüber dem Übergang von m/z 466 \rightarrow m/z 184 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion). Während zuvor ein Grundrauschen von durchschnittlich 150 cps zu verzeichnen war, konnte dieses auf nahezu Null reduziert

werden. Die Abnahme der absoluten Empfindlichkeit hingegen entsprach der Isotopenverteilung des Chlors.

Nach Beendigung der Optimierung von Aufarbeitung und chromatographischen Bedingungen wurde die Aufnahme der Spektren unter den später zum Einsatz kommenden Bedingungen erneut optimiert.

Nach Auswahl von Fluoxetin als internen Standard (Abbildung 15) wurden dessen Molekül- und Produkt-Ionenspektren aufgenommen (Abbildungen 16 und 17). Die Verweilzeit für den selektiv überwachten Reaktions-Modus wurde anhand der chromatographischen Bedingungen festgelegt und sichert eine Aufnahme von mindestens 15 Datenpunkten pro Substanz und Peak.^[78]

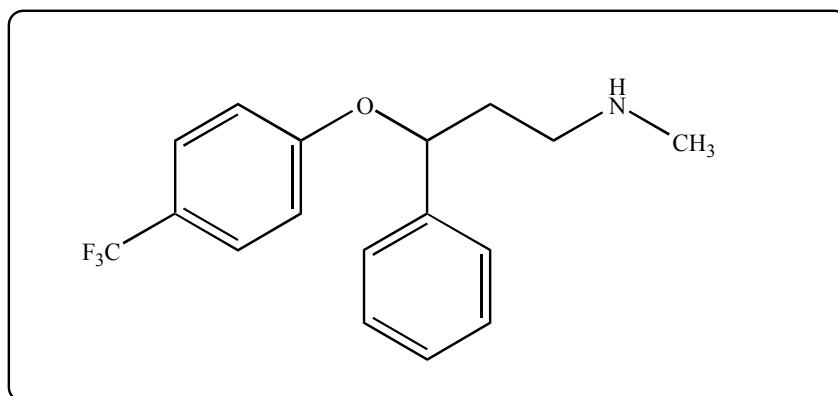


Abbildung 15: Fluoxetin ($C_{17}H_{18}F_3NO$, Mw: 309.33 g/mol).

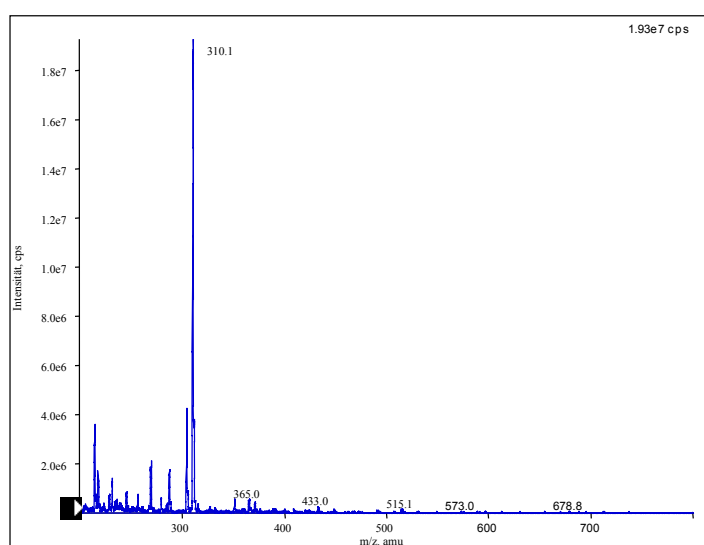


Abbildung 16: Q1-Spektrum von Fluoxetin.

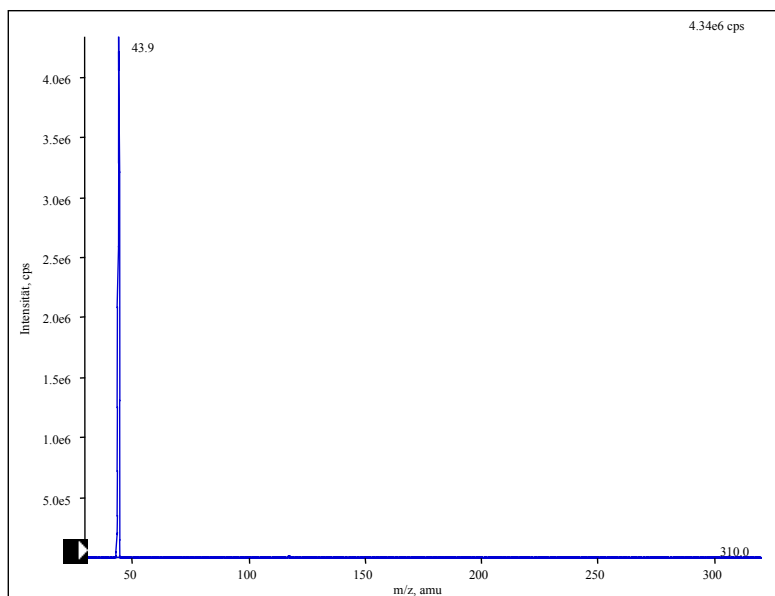


Abbildung 17: Produkt-Ionen-Spektrum von Fluoxetin entstehend aus dem Molekülion m/z 310.

Die sich ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen sind wie folgt:

Ionisierungsmodus: positiv Turbo-Elektrospray; Gasvorhang: 8; Zerstäubergas: 10; Hilfsgas: 7.0 l/min; Kollisionsgas: 6; Temperatur-Turbo: 300 °C; ISV: 3200 V; OR: 52 V; RNG: 200 V; R02: -46 V; ST3: -58 V; R03: -48 V; Verweilzeit: 250 ms; Zeit-Pause: 2 ms; Massenübergang Cisaprid: m/z 468 \rightarrow m/z 186; Massenübergang Fluoxetin: m/z 310 \rightarrow m/z 44.

4.2.2 Chromatographische Bedingungen

In der Literatur finden sich verschiedene HPLC-Bedingungen mit denen Cisaprid aus unterschiedlichen Matrices quantifiziert wurde. In den Methoden sind UV- oder Fluoreszenz-Dektoren eingesetzt worden. Die entsprechend verwendeten Fließmittel enthalten nicht verdampfbare Puffersalze wie Phosphat-Puffer. Gemein ist ihnen die Einstellung der Puffer im sauren Bereich und die Verwendung von C_8 - oder C_{18} -Materialien von unterschiedlichen Herstellern. Die Retentionszeiten unterschreiten dabei nicht 4 Minuten. Prechagoon und Charles^[79] geben an, daß sich die Laufzeiten durch Herabsetzung des pH-Wertes verringern lassen: hier liegt der pH-Wert bei 5.2 und die Retentionszeit bei 5 Minuten. Cisternino *et al.*^[68] haben den pH-Wert auf 2.2 gesenkt und damit die Laufzeit um 17.5 % (beinhaltet die unterschiedliche Flußrate), bei vergleichbarer Säule, reduziert.

Die Vorgabe der LC-MS-Kopplung ermöglichen nicht die Verwendung der in den HPLC-Methoden beschriebenen Puffer, jedoch kommt die Einstellung des pH-Wertes im sauren Bereich der Aufnahme der Spektren im positiven Modus entgegen.

Niggebruegge *et al.*^[77] verwendeten im Fließmittel 0.04 mol/l Ammoniumacetat-Puffer und ebenfalls ein C₁₈-Material. Die Gesamtlaufzeit konnte mit einer 50 mm langen Säule auf 2.5 Minuten reduziert werden.

Bei der eingesetzten Quelle ist, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, die Menge an Puffersalzen möglichst gering zu wählen. Der Analyt muß jedoch weiter in ionisierter Form vorliegen. Mit den gegebenen Informationen wurde als chromatographische Anfangsbedingung ein Gemisch aus 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q®-Wasser/Acetonitril (50/50, v/v) und eine Säule mit Umkehrphasenmaterial (C₁₈) als stationäre Phase gewählt. Die Verwendung von geringen Prozentsätzen an organischen Säuren ohne Puffer zeigten in Vorversuchen Vorteile in der Chromatographie gegenüber der Verwendung von Puffern. Die Säure senkt dabei den pH-Wert ausreichend, um Cisaprid in Lösung zu ionisieren. Das Injektionsvolumen lag bei 30 µl. Die Chromatographie zeigte zufriedenstellende Retentionszeiten und eine ansprechende Peakform.

Weitere Versuche wurden mit aufgearbeiteten Plasmaproben durchgeführt. Eine Erhöhung des Ameisensäureanteils in der wäßrigen Phase führte weder zu einer Verbesserung der Chromatographie noch zu einer Empfindlichkeitszunahme. Versuche mit unterschiedlichen Plasmaproben gleicher Konzentration ergaben keinen Einfluß auf Chromatographie oder Empfindlichkeit bei Verwendung von 0.1 % Ameisensäure in der wäßrigen Phase. Die Einstellung der aufgearbeiteten Probe mit höherem Säureanteil oder gar Puffern war nicht notwendig, um eine Stabilität in der Quelle zu erhalten. Die mobile Phase wurde auf einen wäßrigen Anteil von 55 Volumenprozent erhöht und es wurde eine Säule mit C₁₈-Umkehrphasenmaterial (Korngröße 3.0 µm, endcapped) verwendet. Entsprechend der Elektrospray-Quelle wurde die in das Interface gelangende Fließmittelmenge auf 0.4 ml/min reduziert. Eine größere Menge an Fließmittel führte zu verringerter Empfindlichkeit des Systems. Die Verwendung eines Splits wurde somit nicht erforderlich.

Unter den erhaltenen massenspektrometrischen und chromatographischen Bedingungen wurde als interner Standard Fluoxetin verwendet. Seine Retentionszeit liegt gegenüber Cisaprid (1.7 min) bei 2.1 min und seine Aminofunktion ermöglicht die Ionisierung unter den verwendeten Fließmittelbedingungen. Eine vollständige Basislinientrennung von Cisaprid und Fluoxetin, wie sie bei UV- und Fluoreszenz-Detektoren notwendig wäre, ist

nicht erforderlich, da diese durch den Massenanalysator getrennt aufgenommen werden können (Abbildung 18).

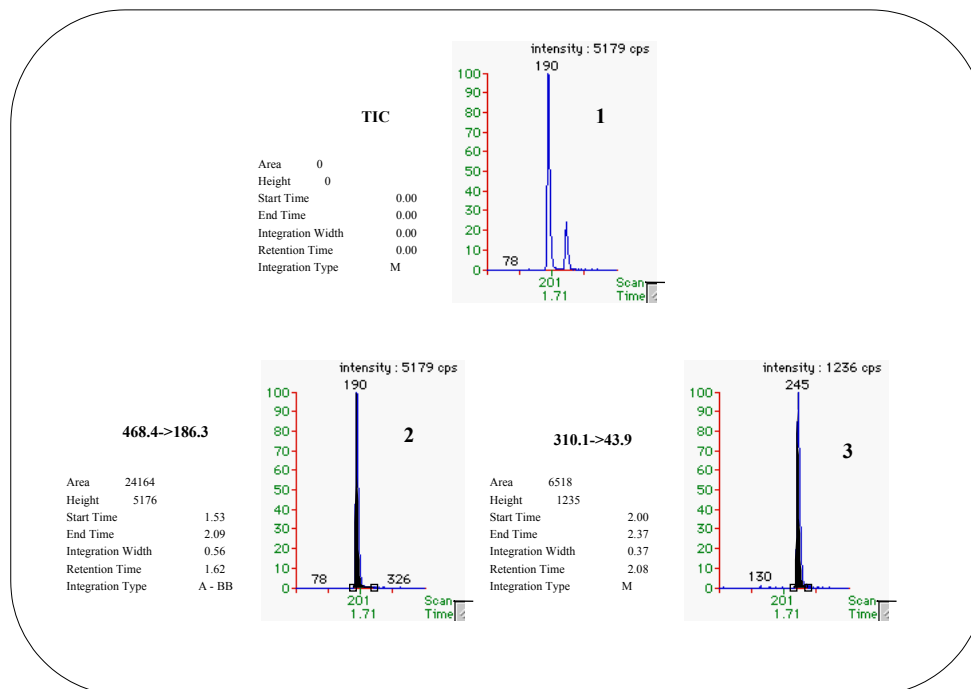


Abbildung 18: Chromatogramme der Cisapridmethode. Die gesamt aufgenommenen Ionen (1) entsprechend einer UV-Detektion und nach massenspektrometrischen Trennung in die Komponenten Cisaprid (2) und Fluoxetin (3).

Kontaminationsprobleme bei der Messung können am Injektionsventil und der Injektionspritze des Probengebers auftreten. Um sicherzustellen daß keine Rückstände aus einer der vorherigen Proben in die aktuell zu messende Probe gelangten, wurden aufgearbeitete Proben mit maximaler Konzentration injiziert. Anschließend wurde ein aufgearbeiteter Leerwert injiziert. Die Bedingungen der Spülflüssigkeit des Probengebers und die entsprechenden Spülschritte wurden so gewählt, daß keine Kontamination im Chromatogramm des Nullwertes zu erkennen war. Dazu wurde der Anteil an Ameisensäure auf 2 % in der wäßrigen Phase erhöht und diese auf 10 Volumenprozent herabgesetzt.

Die sich daraus ergebenden chromatographischen Bedingungen sind wie folgt:

Analytische Säule:	YMC ODS-AQ, 3.0 µm, 50 x 4.0 mm	
Mobile Phase:	0.1 % Ameisensäure in Milli-Q [®] -Wasser, Acetonitril (550 ml : 450 ml)	
Säulentemperatur :	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	30 µl	
Flußrate:	0.4 ml/min	
Probengeberspülflüssigkeit:	2 % Ameisensäure in Milli-Q [®] -Wasser, Acetonitril (50 ml : 450 ml)	
Laufzeit:	3.4 Minuten	
Retentionszeiten:	Cisaprid	ca. 1.7 min
	Fluoxetin	ca. 2.1 min

4.2.3 Aufarbeitung

Bei der einmaligen oralen Gabe von 20 mg Cisaprid sind Konzentrationsbereiche in Humanplasma zwischen 1 – 80 ng/ml zu erwarten. Um Schwankungen bei den Maximalwerten zu berücksichtigen, wurde als oberster Kalibrierpunkt 200.0 ng/ml gewählt.

Die Probenaufarbeitung mußte den Anforderungen wie unter 2.5 beschrieben entsprechen. Ausschlaggebend für die Wahl der zur Verfügung stehenden Aufarbeitungsmethoden ist das Quantifizierungslimit und die Menge an zur Verfügung stehendem Probenvolumen.

So konnten Woestenborghs *et al.*^[76] bereits 1988 Cisaprid bis zu einem Detektionslimit von 1 ng/ml mit einem HPLC-UV-System messen, benötigten dazu jedoch 2 ml Plasma unter Verwendung einer aufwendigen zweifachen Flüssig-Flüssig-Extraktion. Cisternino *et al.*^[68] setzten 10 Jahre später 200 µl Plasma ein und extrahierten mit Festphasenextraktionshülsen. Das Quantifizierungslimit von 10 ng/ml entspricht dem von Woestenborghs *et al.*^[76]

Für die Aufarbeitung der Probandenproben standen keine 2 ml Plasma zur Verfügung. Weiterhin sollte eine zeitraubende und kostenintensive Aufarbeitung vermieden werden, um bei geringem finanziellen Aufwand einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen. Als einfachste Aufarbeitungsmethode von Humanplasma dient dabei die Proteinpräzipitation. Vorteil dieser Technik ist die Erfüllung der o. g. Anforderungen. Nachteilig wirkt sich die Verdünnung der Probe aus, sowie ihre Unsauberkeit. Neben der Verdünnung können in der Probe verbliebene Komponenten die Ionisierung des Analyten unterdrücken. Um sicher-

zustellen, daß das Quantifizierungslimit von 1 ng/ml erreicht wird, wurden mit Cisaprid dotierte Plasmen durch Proteinpräzipitation aufgearbeitet und gemessen.

In ersten Versuchen wurden 100 µl Plasma mit 200 µl Acetonitril, das den internen Standard Fluoxetin enthält, präzipitiert und 15 Sekunden intensiv geschüttelt. Die Probe wurde 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) zentrifugiert und der Überstand anschließend mit 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser weiterverdünnt. Diese Verdünnung erfolgte in den Verhältnissen 1/1, 1/2 und 1/3 (Überstand/0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser, v/v). Die erhaltenen Peakflächen nahmen dabei entsprechend mit höherer Verdünnung ab. Eine effektive oder sogar absolute Steigerung der Empfindlichkeit durch die höhere Verdünnung, und damit verbunden eine Verringerung der Ionensuppression, konnte nicht beobachtet werden. Die Versuche zeigten, daß das Quantifizierungslimit von 1 ng/ml zu erreichen war.

Die Nachverdünnung im Verhältnis 1/1 (v/v) wurde intensiver getestet (*Aufarbeitungsmethode 1*). Die Ergebnisse eines Robustheitstest (Tabellen 4 und 5) werden unter 4.2.3 mit den weiteren *Aufarbeitungsmethoden 2* und *3* verglichen.

Um die Effizienz der Aufarbeitung weiter zu steigern, wurden Versuche mit einem Pipettierroboter unternommen. Dieser pipettiert Proben im 96er Mikrotiterplattenformat. Dazu mußte die Zugabe des internen Standards geändert werden, da die Zugabe aus einer offenen Vorratswanne erfolgt. Bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel bestand die Gefahr einer Konzentrierung des internen Standards durch Verdampfen des Lösungsmittels.

Die Aufarbeitung wurde wie folgt geändert (*Aufarbeitungsmethode 2*):

100 µl mit Cisaprid dotiertem Humanplasma wurden mit 50 µl Milli-Q[®]-Wasser, das den internen Standard Fluoxetin enthält, versetzt. Die Proteinpräzipitation erfolgte durch Zugabe von 300 µl Acetonitril. Die Proben wurden 30 Sekunden intensiv geschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min (1920 g) zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden mit 150 µl 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser verdünnt und erneut intensiv geschüttelt.

Trotz der höheren Verdünnung und der geringeren Drehzahl der Zentrifuge (bedingt durch die Verwendung der Titerplatten) konnte das gewünschte Quantifizierungslimit erreicht bzw. unterschritten werden. Die Ergebnisse des Robustheitstests sind in den Tabellen 6 und 7 unter 4.2.4 aufgeführt. Da sich bislang keine Anzeichen ergaben, daß eine

Ionensuppression vorlag, wurde ein weiterer Versuch unternommen, das Quantifizierungs-limit zu senken.

Die Aufarbeitung wurde wie folgt erneut modifiziert (*Aufarbeitungsmethode 3*):

100 µl mit Cisaprid dotiertem Humanplasma wurden mit 50 µl Milli-Q[®]-Wasser, das den internen Standard Fluoxetin enthält, versetzt. Die Proteinpräzipitation erfolgte durch Zugabe von 300 µl Acetonitril. Die Proben wurden 30 Sekunden intensiv geschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min (1920 g) zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden entnommen und bei 25 °C unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl mobiler Phase aufgenommen, intensiv geschüttelt und injiziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 aufgeführt und werden unter 4.2.4 besprochen.

Für die Validierung und die Studie wurde die *Aufarbeitungsmethode 2* verwendet.

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion der Vorversuche

Zur Untersuchung der Stabilität des Systems wurden über einen Zeitraum von 7 Stunden und 40 Minuten insgesamt 65 Proben mit einer Konzentration von 20 ng/ml (Poolproben) injiziert. Dieser Zeitraum entspricht der Länge einer in der Studie zu messenden Sequenz. Um die Gesamtlaufzeit zu erreichen, wurden zwischen den Poolproben Tests injiziert, die, wie oben angeführt, verschieden nachverdünnt wurden. Den Verlauf der absoluten Peakflächen zeigt die Abbildung 19. Anhand dieser ist keine Abnahme der absoluten Konzentration zu erkennen. Die Statistik der Peakflächen zeigt einen Variationskoeffizienten von 3.4 % für Cisaprid (max. Differenz 18.3 %) und 3.0 % für Fluoxetin (max. Differenz 20.0 %). Die maximalen Differenzen liegen damit im Bereich von 15 % um den Mittelwert und zeigen keinen Trend zu abnehmender oder zunehmender Intensität. Dies entspricht den Anforderungen, die während der Validierung zu Grunde gelegt werden. Die statistische Auswertung der Peakflächenverhältnisse ergab analog zu den Einzelflächen einen Variationskoeffizienten von 3.2 % mit einer maximalen Differenz des kleinsten zum größten gemessenen Peakflächenverhältnis von 16.8 %.

Der Wert des Variationskoeffizienten der Peakflächenverhältnisse wurde als ausreichend angesehen, um weitere Systemüberprüfungen durchzuführen.

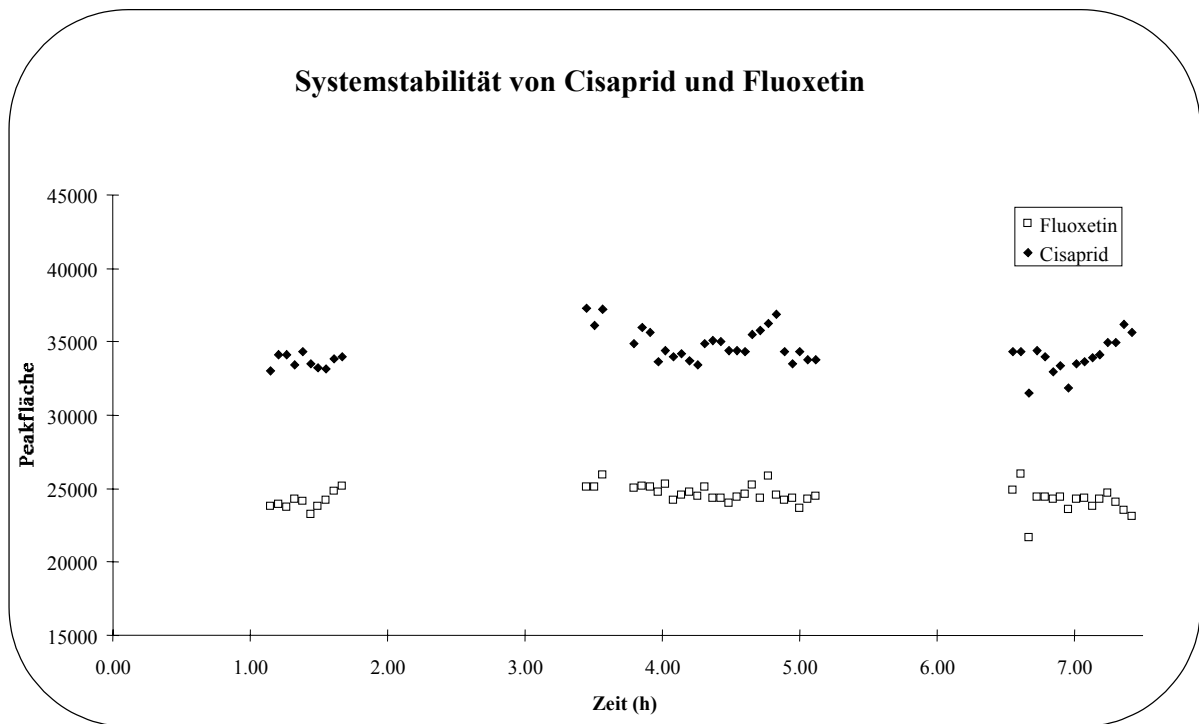


Abbildung 19: Systempräzision von Cisaprid über 7 h 40 min.

Im folgenden wurde die Robustheit des gesamten Systems überprüft. Dazu wurden 3 Kalibriergeraden (CR) und 5 Sätze Qualitätskontrollproben (QC) aus den unter 4.1 aufgeführten Stammlösungen nach dem Pipettierschema aus Tabelle 3 hergestellt und nach *Aufarbeitungsmethode 1* aufgearbeitet. Um das Quantifizierungslimit zu ermitteln, wurde eine Konzentration von 0.5000 ng/ml als kleinster Kalibrierstandard hergestellt.

Konzentration Cisaprid (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
2000	LV	CIS-SL-CR	0.010	0.990
200.0	L1	LV	0.200	1.800
160.0	L2	L1	1.500	0.375
80.00	L3	L2	0.900	0.900
40.00	L4	L3	0.850	0.850
20.00	L5	L4	0.800	0.800
10.00	L6	L5	0.700	0.700
2.000	L7	L6	0.400	1.600
1.000	L8	L7	1.100	1.100
0.7500	L9	L8	1.200	0.400
0.5000	L10	L9	0.600	0300
9600	QCV	CIS-SL-QC	0.020	1.980
160.0	QC1	QCV	0.025	1.475
40.00	QC2	QC1	0.450	1.350
4.000	QC3	QC2	0.220	1.980
1.000	QC4	QC3	0.575	1.720
0.5000	QC5	QC4	0.7500	0.750

Tabelle 3: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Insgesamt wurden 61 Proben gemessen. Jede Kalibriergerade wurde einzeln über eine gewichtete lineare Regression (Wichtungsfaktor 1/Konzentration) erstellt, und die Qualitätskontrollproben über die jeweilige der drei Kalibriergeraden ausgewertet.

Kalibrier- standard No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%)			Mittel- wert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
1	200.0	97.0	93.1	NU*	95.1	2.8	2.9	-4.9
2	160.0	96.2	97.3	93.7	95.7	1.8	1.9	-4.3
3	80.00	101.3	101.7	98.9	100.6	1.5	1.5	0.6
4	40.00	104.3	99.6	99.6	101.2	2.7	2.7	1.2
5	20.00	95.8	101.9	102.7	100.1	3.8	3.8	0.1
6	10.00	101.2	103.5	104.5	103.1	1.7	1.6	3.1
7	2.000	102.0	101.3	102.0	101.8	0.4	0.4	1.8
8	1.000	103.5	106.8	100.5	103.6	3.2	3.0	3.6
9	0.7500	102.4	96.1	97.4	98.6	3.3	3.4	-1.4
10	0.5000	96.1	98.7	100.7	98.5	2.3	2.3	-1.5

*NU: nicht für Kalkulation verwendet, Abweichung größer 10 %

Tabelle 4: Präzision der Kalibrierstandards von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 1*.

Qualitäts- kontroll- probe No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%) über			Mittel- wert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
1	160.0	103.2	103.0	102.0				
1	160.0	94.0	93.8	92.9				
1	160.0	95.9	95.7	94.8				
1	160.0	98.8	98.6	97.6				
1	160.0	98.7	98.5	97.6	97.7	3.3	3.3	-2.3
2	40.00	104.7	104.3	103.4				
2	40.00	103.4	103.1	102.2				
2	40.00	98.8	98.4	97.6				
2	40.00	109.0	108.6	107.7				
2	40.00	102.1	101.7	100.8	103.1	3.5	3.4	3.1
3	4.000	103.8	101.4	101.3				
3	4.000	100.1	97.7	97.6				
3	4.000	92.7	90.2	90.2				
3	4.000	101.5	99.1	99.0				
3	4.000	105.4	102.9	102.8	99.0	4.7	4.8	-1.0
4	1.000	100.3	91.0	93.6				
4	1.000	106.8	97.4	99.9				
4	1.000	94.8	85.4*	88.1*				
4	1.000	93.1	83.8*	86.4*				
4	1.000	104.7	95.3	97.9	94.6	6.9	7.2	-5.4
5	0.5000	114.7	96.1	102.1				
5	0.5000	118.1*	99.5	105.5				
5	0.5000	104.8	86.3	92.3				
5	0.5000	108.6	90.1	96.1				
5	0.5000	105.6	87.1	93.2	100.0	9.6	9.6	0.0

* Werte liegen außerhalb der Qualitätskriterien des Robustheitstest

Tabelle 5: Präzision der Qualitätskontrollproben von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 1*; Auswertung über Kalibriergerade 1 (CR1) bis Kalibriergerade 3 (CR3).

Als Qualitätskriterien wurden, entgegen den späteren Qualitätskriterien für die Validierung Abweichungen von 10 % bei allen Proben, außer bei denen mit der kleinsten Konzentration zugelassen. Dort wurde als Qualitätskriterium eine Abweichung von 15 % zugelassen. Kalibrierstandards, die außerhalb der Kriterien lagen, wurden zur Bestimmung der Kalibriergeraden nicht verwendet. Hingegen wurden alle Werte der Qualitätskontrollproben zur statistischen Auswertung verwendet, wie in den späteren Messungen der Studienproben. Die Auswertung ergab einen Variationskoeffizienten für die Kalibriergeraden mit einem relativen Fehler zwischen -4.9 % und 3.6 % (Tabelle 4). Ein Kalibrierstandard der dritten Kalibriergeraden wurde nicht mit zur Auswertung herangezogen. Das angestrebte Quantifizierungslimit von 1.00 ng/ml konnte um den Faktor zwei auf 0.5000 ng/ml gesenkt

werden. Für die Qualitätskontrollproben ergaben sich Werte zwischen 3.3 % und 9.6 % für den Variationskoeffizienten mit einem relativen Fehler zwischen -5.4 % und 3.1 % (Tabelle 5). Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Werte liegen außerhalb der Qualitätskriterien für den Robustheitstest. Insgesamt sind dies fünf Werte für die Qualitätskontrollproben. Neben zwei Werten des QC4 liegt ein weiterer Wert (QC5) außerhalb der Kriterien. Mit den erhaltenen Werten wären die Qualitätskriterien für eine Validierung bzw. der Messung der Studienproben erfüllt und die Methodenentwicklung abgeschlossen.

Wie unter 4.2.3 angeführt, wurde die Aufarbeitungsmethode automatisiert und dadurch die Aufarbeitungsmethode geändert. Der Robustheitstest wurde erneut durchgeführt.

Die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben verlief vergleichbar dem oben gezeigten Pipettierschema (Tabelle 3). Die Konzentrationen der Kalibriergeraden wurden beibehalten, die der Qualitätskontrollproben geändert. Es wurden Qualitätskontrollproben (QC D5) hergestellt, deren Konzentration über dem Quantifizierungslimit lagen. Diese wurden bei der Aufarbeitung mit Leermatrix vorverdünnt, so daß die resultierende Konzentration innerhalb des Konzentrationsbereichs lag.

Wie oben angesprochen wurden erneut 3 Kalibriergeraden und 5 Sätze Qualitätskontrollproben nach den *Aufarbeitungsmethoden 2* und *3* aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Auswertung zeigen die Tabellen 6 bis 9. Die Auswertung der Kalibriergeraden erfolgte erneut mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}$. Eine Auswertung mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}^2$ ergab keinen höheren Wert für den Korrelationskoeffizienten.

Kalibrierstandard No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%)			Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
1	200.7	97.4	101.3	99.5	99.4	2.0	2.0	-0.6
2	160.6	103.0	100.9	101.2	101.7	1.1	1.1	1.7
3	80.29	99.6	96.3	97.9	97.9	1.7	1.7	-2.1
4	40.15	100.6	99.4	102.2	100.7	1.4	1.4	0.7
5	20.07	102.1	94.2	99.2	98.5	4.0	4.1	-1.5
6	10.04	100.4	101.7	100.7	100.9	0.7	0.7	0.9
7	2.007	98.4	109.6	102.1	103.4	5.7	5.5	3.4
8	1.004	100.6	92.9	100.1	97.9	4.3	4.4	-2.1
9	0.7527	101.6	102.9	102.3	102.3	0.7	0.6	2.3
10	0.5018	96.3	100.7	94.8	97.3	3.1	3.2	-2.7

Tabelle 6: Präzision der Kalibrierstandards von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 2*.

Qualitäts- kontroll- probe No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%) über			Mittel- wert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
D 5	96.09	103.4	102.1	105.5	105.8	2.4	2.3	5.8
D 5	96.09	108.0	106.6	110.2				
D 5	96.09	104.6	106.0	109.6				
D 5	96.09	107.4	103.3	106.8				
D 5	96.09	104.1	102.8	106.2				
1	160.1	109.4	108.0	111.6	105.5	3.1	2.9	5.5
1	160.1	105.8	104.4	107.9				
1	160.1	104.2	102.8	106.3				
1	160.1	105.5	104.2	107.7				
1	160.1	101.4	100.1	103.5				
2	16.01	105.2	104.1	107.4	105.0	3.4	3.3	5.0
2	16.01	105.2	104.1	107.4				
2	16.01	107.3	106.2	109.5				
2	16.01	106.7	105.6	108.9				
2	16.01	98.8	97.8	100.8				
3	2.002	103.4	104.5	105.9	104.9	1.8	1.8	4.9
3	2.002	102.1	103.2	104.5				
3	2.002	106.1	107.2	108.7				
3	2.002	104.3	105.4	106.8				
3	2.002	102.4	103.5	104.9				
4	0.5005	77.8	86.6	81.1	105.3	14.8	14.0	5.3
4	0.5005	99.8	108.3	103.5				
4	0.5005	99.9	108.4	103.6				
4	0.5005	108.8	117.2	112.7				
4	0.5005	119.8	128.0	123.9				

Tabelle 7: Präzision der Qualitätskontrollproben von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 2*; Auswertung über Kalibriergerade 1 (CR1) bis Kalibriergerade 3 (CR3).

Kalibrier- standard No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%)			Mittel- wert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
1	200.7	97.5	88.4	98.7	94.9	5.6	5.9	-5.1
2	160.6	100.6	110.7	101.5	104.3	5.6	5.4	4.3
3	80.29	102.3	98.4	99.5	100.1	2.0	2.0	0.1
4	40.15	101.7	113.1	96.2	103.7	8.6	8.3	3.7
5	20.07	105.2	107.8	106.4	106.5	1.3	1.2	6.5
6	10.04	105.6	105.7	110.2	107.2	2.6	2.5	7.2
7	2.007	105.4	104.7	97.4	102.5	4.4	4.3	2.5
8	1.004	87.9	101.7	93.5	94.4	6.9	7.4	-5.6
9	0.7527	96.9	85.6	109.4	97.3	11.9	12.2	-2.7
10	0.5018	97.0	84.0	87.3	89.4	6.8	7.6	-10.6

Tabelle 8: Präzision der Kalibrierstandards von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 3*.

Qualitäts-Kontroll-Probe No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%)			Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
D 5	96.09	106.9	99.7	100.7				
D 5	96.09	125.1	116.8	117.9				
D 5	96.09	122.9	114.7	115.8				
D 5	96.09	115.1	107.4	108.5				
D 5	96.09	115.0	107.4	108.4	112.2	7.4	6.6	12.2
1	160.1	106.2	99.2	100.1				
1	160.1	122.8	114.7	115.8				
1	160.1	113.7	106.2	107.2				
1	160.1	108.4	101.2	102.2				
1	160.1	120.7	112.7	113.8	109.7	7.4	6.7	9.7
2	16.01	126.7	117.6	119.3				
2	16.01	126.0	116.8	118.6				
2	16.01	127.5	118.3	120.0				
2	16.01	123.7	114.8	116.5				
2	16.01	124.5	115.5	117.2	120.2	4.3	3.6	20.2
3	2.002	125.0	109.5	116.3				
3	2.002	129.9	114.1	121.0				
3	2.002	103.8	89.7	96.3				
3	2.002	127.7	112.0	118.8				
3	2.002	117.8	102.7	109.5	112.9	11.4	10.1	12.9
4	0.5005	146.2	107.2	131.5				
4	0.5005	111.6	75.0	99.0				
4	0.5005	120.0	82.8	106.9				
4	0.5005	125.2	87.7	111.8				
4	0.5005	140.2	101.7	125.9	111.5	20.5	18.4	11.5

Tabelle 9: Präzision der Qualitätskontrollproben von Cisaprid nach *Aufarbeitungsmethode 3*; Auswertung über Kalibriergerade 1 (CR1) bis Kalibriergerade 3 (CR3).

Die absoluten Flächen liegen bei der *Aufarbeitungsmethode 3* im Durchschnitt um den Faktor vier höher. Dieser müßte durch die geringere Verdünnung während der Aufarbeitung theoretisch neun betragen. Dies kann als Anzeichen für eine Ionensuppression, die sich durch die effektive Verringerung der Peakflächen ausdrückt, gewertet werden. Die angestrebte Herabsetzung des Quantifizierungslimits aufgrund der Peakflächen wurde möglich, da sich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern ließ.

Die Ergebnisse (Tabellen 6 bis 9), bei der alle Werte zur statistischen Auswertung verwendet wurden, zeigt jedoch eine deutliche Zunahme der Varianz mit der *Aufarbeitungsmethode 3*. Eine Erweiterung des dynamischen Bereichs aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses ist zwar möglich, eine Verwendung der *Aufarbeitungsmethode 3* würde aber eine nicht zu akzeptierende Erweiterung der Qualitätskriterien erfordern.

Die Werte des QC4 in Tabelle 7 zeigten einen hohen Variationskoeffizienten von 14.0 %, an dem ebenfalls die Grenzen des Systems erkennbar wurden.

Das Quantifizierungslimit von 0.5000 ng/ml wurde als ausreichend für die Quantifizierung der Studienproben betrachtet und die Validierung wurde im Konzentrationsbereich von 0.5000 ng/ml bis 200.0 ng/ml angestrebt.

4.3 Ergebnisse der Methodvalidierung von Cisaprid in Humanplasma

Die Validierung der LC-MS/MS-Methode für Cisaprid in Humanplasma wurde, wie unter 2.5 beschrieben, durchgeführt.

Alle Blutproben wurden mit Heparin zur Vermeidung der Blutgerinnung versetzt, abzentrifugiert und das Plasma gewonnen. Dieses wurde bis zu seiner Verwendung bei ≤ 18 °C eingefroren.

Alle Proben wurden nach der *Aufarbeitungsmethode 2* aufgearbeitet und mit den unter 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Bedingungen gemessen.

4.3.1 Spezifität der Methode

Es wurden 6 verschiedene Leerplasmen von Männern und Frauen getestet. Das Plasma wurde jeweils mit und ohne internen Standard aufgearbeitet. Eine Störung zu einer der Retentionszeiten von Cisaprid und Fluoxetin konnte nicht festgestellt werden.

4.3.2 Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)

Zur Validierung des Konzentrationsbereichs wurde an fünf Tagen eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 200.0, 160.0, 80.00, 40.00, 20.00, 10.00, 2.000, 1.000, 0.7500 und 0.5000 ng/ml analog dem Pipettierschema (Tabelle 3) frisch hergestellt, aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte über lineare Regression mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}$.

Kalibrier-Standard No.	Gemessene Konzentration an Cisaprid (%)					Theor. Konz. (ng/ml)	Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5					
1	101.2	95.0	98.1	99.0	99.9	200.0	98.6	2.3	2.4	-1.4
2	99.5	104.8	103.0	102.9	99.5	160.0	101.9	2.4	2.3	1.9
3	100.5	103.9	100.0	99.5	101.2	80.00	101.0	1.8	1.7	1.0
4	99.9	99.7	99.6	96.8	101.2	40.00	99.4	1.6	1.6	-0.6
5	91.7	95.8	99.6	94.5	98.4	20.00	96.0	3.1	3.3	-4.0
6	95.5	101.4	93.6	101.2	100.4	10.00	98.4	3.6	3.7	-1.6
7	97.4	94.7	100.7	93.9	95.2	2.000	96.4	2.8	2.9	-3.6
8	104.9	96.0	100.5	98.6	104.6	1.000	100.9	3.8	3.8	0.9
9	100.7	105.4	96.9	99.6	100.2	0.7500	100.6	3.1	3.1	0.6
10	108.6	103.2	108.1	114.0	99.6	0.5000	106.7	5.5	5.2	6.7
y-Achsenabschnitt	-0.0002	0.0009	0.0008	0.0004	0.0005					
Steigung	0.0075	0.0079	0.0065	0.0066	0.0077					
Korr.-Koeffizient	0.9998	0.9990	0.9997	0.9997	1.0000					

Tabelle 10: Statistik der Kalibriergeraden von Cisaprid in Humanplasma.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 16 , womit die Akzeptanzkriterien für die Bestimmungsgrenze erfüllt wurden. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Validierung des Konzentrationsbereiches. Von keinem Kalibrierstandard lag die Genauigkeit außerhalb der gesetzten Kriterien und alle wurden zur Berechnung der Kalibriergeraden verwendet. Die sich daraus ergebenden Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.999 , somit wurden die Akzeptanzkriterien für die Linearität des dynamischen Bereichs (0.5000 ng/ml – 200.0 ng/ml) erfüllt.

Die relativen Standardabweichungen mit Werten zwischen 1.6 % und 5.5 % und die Richtigkeit mit Werten zwischen – 4.0 % und 6.7 % zeigen eine ausreichend hohe Präzision des gesamten Systems.

4.3.3 Präzision von Tag zu Tag

Zur Validierung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden an fünf Tagen jeweils fünf Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 960.0, 160.0, 16.00, 2.000, 0.5000 ng/ml nach dem Pipettierschema (Tabelle 11) hergestellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an diesem Tage gemessene Kalibriergerade.

Konzentration Cisaprid (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stamm-lösung oder Qualitäts-kontrollprobe für die Herstellung	Pipetiertes Volumen der Stammlösung oder der Qualitäts-kontrollprobe (ml)	Pipetiertes Volumen an Leermatrix (ml)
9600	QCV	CIS-SL-QC	0.020	1.980
960.0	QC D5	QCV	0.100	0.900
160.0	QC1	QC D5	0.275	1.375
16.00	QC2	QC1	0.165	1.485
2.000	QC3	QC2	0.225	1.575
0.5000	QC4	QC3	0.350	1.050

Tabelle 11: Pipettierschema für die Herstellung der Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Qualitätskontrollprobe Gemessen am Tag	Gemessene Konzentration von Cisaprid in Humanplasma (%)				
	QC D5	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4
1	93.1	97.3	98.0	103.1	120.8
	91.7	98.0	94.3	100.9	111.0
	89.5	94.7	91.7	108.3	104.3
	92.0	92.2	92.9	93.4	107.0
	90.3	93.9	91.6	105.8	111.1
2	92.3	104.9	98.3	99.3	94.5
	96.3	98.5	98.7	108.1	95.2
	100.0	100.2	101.9	98.2	80.2
	97.7	101.8	97.9	98.5	91.0
	94.6	98.0	98.6	95.1	90.1
3	96.4	100.8	102.8	91.2	93.2
	95.8	100.4	100.2	88.9	92.6
	104.7	98.9	99.6	97.8	102.1
	106.5	101.6	102.9	98.3	80.7
	100.5	102.8	101.2	101.7	90.6
4	101.1	101.3	100.3	100.4	106.7
	97.8	100.2	105.2	98.5	86.3
	103.2	104.9	103.1	102.0	112.9
	106.9	105.9	105.4	104.2	108.9
	101.4	103.9	103.7	100.9	102.9
5	98.6	101.6	103.1	96.7	109.9
	99.1	100.8	103.9	99.0	89.3
	100.8	103.7	98.2	107.7	105.6
	100.2	100.7	96.5	102.4	98.0
	98.2	90.5	96.6	91.7	113.2
Theor. Konz. (ng/ml)	960.0	160.0	16.00	2.000	0.5000
Mittelwert (%)	98.0	99.9	99.5	99.7	99.9
s (%)	4.8	3.9	4.0	5.1	10.9
CV (%)	4.9	3.9	4.0	5.1	10.9
RE (%)	-2.0	-0.1	-0.5	-0.3	-0.1

Tabelle 12: Präzision der Qualitätskontrollproben von Cisaprid in Humanplasma an fünf Validierungstagen.

Die Ergebnisse der Tabelle 12 zeigen die Erfüllung der Akzeptanzkriterien für die Qualitätskontrollproben 1-3 und D5. Der erste Wert für den QC 4 liegt mit 120.8 % außerhalb der Kriterien. Dennoch erfüllt die Qualitätskontrollprobe 4 wie auch die anderen Qualitätskontrollproben die Kriterien für den Variationskoeffizienten.

Bei den späteren Messungen der Studienproben müssen 50 % der Qualitätskontrollproben die Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit erfüllen. Wird diese Annahme zu Grunde gelegt würde ein einzelner Wert einer Qualitätskontrollprobe nicht zum Abbruch der Messung führen. In diesem konkreten Fall wurde die Validierung mit dem zweiten Validierungstag fortgesetzt und besondere Aufmerksamkeit auf die Qualitätskontrollprobe 4 und damit auf die Bestimmungsgrenze gelegt. An den folgenden vier Tagen wurden die Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit erfüllt, die Streuung für die Qualitätskontrollprobe 4 blieb jedoch hoch, was anhand des Variationskoeffizienten von 10.9 % zu erkennen ist, der mehr als doppelt so hoch ist wie die der anderen Qualitätskontrollproben. Die Richtigkeit der Qualitätskontrollproben liegt mit Werten zwischen 98.0 % und 99.9 % für alle Konzentrationen sehr nah am theoretischen Wert. Die große Streuung der Qualitätskontrollproben 4 zeigt die Grenzen des Systems auf. Eine weitere Senkung der Bestimmungsgrenze war nicht möglich.

4.3.4 Präzision innerhalb eines Tages

Zur Validierung der Präzision innerhalb eines Tages wurden am dritten Tag die Qualitätskontrollproben mit Hilfe der an diesem Tag gemessene Kalibriergerade ausgewertet.

Qualitätskontrollprobe No.	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Cisaprid in Humanplasma (%)					Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
QC D5	960.0	96.4	95.8	104.7	106.5	100.5	100.8	4.8	4.8	0.8
QC 1	160.0	100.8	100.4	98.9	101.6	102.8	100.9	1.4	1.4	0.9
QC 2	16.00	102.8	100.2	99.6	102.9	101.2	101.4	1.5	1.5	1.4
QC 3	2.000	91.2	88.9	97.8	98.3	101.7	95.6	5.3	5.6	-4.4
QC 4	0.5000	93.2	92.6	102.1	80.7	90.6	91.9	7.6	8.3	-8.1

Tabelle 13: Präzision der Qualitätskontrollproben von Cisaprid in Humanplasma innerhalb des dritten Validierungstages.

Anhand der Tabelle 13 ist ebenfalls zu erkennen, daß zur Bestimmungsgrenze hin die Variation der Werte zunimmt. Neben der größeren Streuung der Genauigkeit, zeigen sowohl die Richtigkeit als auch der Variationskoeffizient bei den Konzentrationen 2.000 ng/ml und 0.5000 ng/ml erhöhte Werte gegenüber den Qualitätskontrollproben mit höheren Konzentrationen auf.

4.3.5 Präzision von hämolytischem Plasma

Zur Präzision von hämolytischem Plasma wurden an einem Tag jeweils fünf Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 160.0 ng/ml (HEMO hoch) und 2.000 ng/ml (HEMO niedrig) analog dem Pipettierschema (Tabelle 11) in hämolytischem Plasma frisch hergestellt, aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an diesem Tage gemessene Kalibriergerade.

Qualitätskontrollprobe HEMO hoch	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Genauigkeit (%)
A	160.0	170.8	106.7
B	160.0	172.8	108.0
C	160.0	170.3	106.5
D	160.0	175.1	109.4
E	160.0	173.3	108.3
Mittelwert		172.5	107.8
<i>s</i>		1.944	1.2
CV			1.1

Tabelle 14: Präzision von Cisaprid in hämolytischem Humanplasma bei hoher Konzentration.

Die Tabellen 14 und 15 zeigen einen geringen Variationskoeffizienten von 1.1 % bzw. 2.1 % mit einer Genauigkeit innerhalb der Akzeptanzkriterien. Anhand der Richtigkeit von 107.8 % bzw. 108.1 % konnte kein Einfluß von hämolytischem Plasma erkannt werden.

Qualitäts-kontroll-probe HEMO niedrig	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Genauigkeit (%)
A	2.000	2.159	108.0
B	2.000	2.227	111.4
C	2.000	2.101	105.0
D	2.000	2.176	108.8
E	2.000	2.147	107.3
Mittelwert		2.162	108.1
s		0.04594	2.3
CV			2.1

Tabelle 15: Präzision von Cisaprid in hämolytischem Humanplasma bei niedriger Konzentration

4.3.6 Validierung der Aufarbeitungsstabilität

Zur Validierung der Aufarbeitungsstabilität wurden am zweiten Tag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 160.0 ng/ml und 2.000 ng/ml jeweils 30 Proben zusätzlich hergestellt und aufgearbeitet. 15 Proben jeder Konzentration wurden bei Raumtemperatur und 15 Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in den Probengebergefäßen gelagert und nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an dem Tag gemessenen Kalibriergerade.

Qualitäts-kontroll-probe	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 24 h (ng/ml)	Stabilität nach 24 h (%)	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 48 h (ng/ml)	Stabilität nach 48 h (%)	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 72 h (ng/ml)	Stabilität nach 72 h (%)
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	160.0	153.7	96.0	154.2	96.4	152.5	95.3
B	160.0	159.2	99.5	151.8	94.9	151.8	94.9
C	160.0	153.1	95.7	148.3	92.7	159.4	99.6
D	160.0	161.2	100.8	145.8	91.1	157.7	98.5
E	160.0	157.2	98.3	145.1	90.7	151.4	94.6
Mittelwert		156.9	98.0	149.1	93.2	154.5	96.6
s		3.514	2.2	3.907	2.4	3.697	2.3
CV			2.2		2.6		2.4

Tabelle 16: Aufarbeitungsstabilität von Cisaprid (160.0 ng/ml) in Humanplasma bei Raumtemperatur.

Qualitäts-Kontroll-probe	Theoretische Konzentration an Cisaprid	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 24 h	Stabilität nach 24 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 48 h	Stabilität nach 48 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 72 h	Stabilität nach 72 h
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	2.000	1.974	98.7	1.710	85.5	2.051	102.5
B	2.000	1.912	95.6	1.831	91.6	2.017	100.8
C	2.000	1.881	94.0	1.687	84.4	2.008	100.4
D	2.000	1.971	98.5	2.051	102.6	2.222	111.1
E	2.000	2.013	100.7	2.330	116.5	2.018	100.9
Mittelwert		1.950	97.5	1.922	96.1	2.063	103.2
s		0.05302	2.7	0.2700	13.5	0.09023	4.5
CV			2.7		14.1		4.4

Tabelle 17: Aufarbeitungsstabilität von Cisaprid (2.000 ng/ml) in Humanplasma bei Raumtemperatur.

Qualitäts-kontroll-probe	Theoretische Konzentration an Cisaprid	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 24 h	Stabilität nach 24 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 48 h	Stabilität nach 48 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 72 h	Stabilität nach 72 h
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	160.0	153.4	95.9	151.6	94.7	146.7	91.7
B	160.0	159.0	99.4	150.5	94.1	150.4	94.0
C	160.0	160.7	100.4	153.1	95.7	152.8	95.5
D	160.0	158.4	99.0	147.2	92.0	146.0	91.2
E	160.0	156.7	97.9	148.8	93.0	145.6	91.0
Mittelwert		157.6	98.5	150.2	93.9	148.3	92.7
s		2.769	1.7	2.318	1.4	3.162	2.0
CV			1.8		1.5		2.1

Tabelle 18: Aufarbeitungsstabilität von Cisaprid (160.0 ng/ml) in Humanplasma bei – 20 °C.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Cisaprid	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 24 h	Stabilität nach 24 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 48 h	Stabilität nach 48 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 72 h	Stabilität nach 72 h
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	2.000	2.051	102.5	1.896	94.8	2.087	104.3
B	2.000	2.004	100.2	1.927	96.3	1.994	99.7
C	2.000	1.915	95.7	1.775	88.8	2.209	110.5
D	2.000	1.820	91.0	1.979	98.9	1.841	92.0
E	2.000	2.007	100.3	1.922	96.1	2.049	102.5
Mittelwert		1.959	98.0	1.900	95.0	2.036	101.8
s		0.09215	4.6	0.07582	3.8	0.1348	6.7
CV			4.7		4.0		6.6

Tabelle 19: Aufarbeitungsstabilität von Cisaprid (2.000 ng/ml) in Humanplasma bei – 20 °C.

Die in den Tabellen 16 bis 19 dargestellten Werte zeigen keine Instabilität der Proben innerhalb von 72 Stunden unter den oben genannten Lagerungsbedingungen. Einzig die 48 Stunden Werte für die Qualitätskontrollprobe 3 bei Raumtemperatur weisen eine geringe Genauigkeit und einen hohen Variationskoeffizienten auf. Die Richtigkeit liegt mit 96.1 % in einem zu erwartenden Bereich. Da die 72 Stunden Werte eine hohe Genauigkeit und einen geringen Variationskoeffizienten, sowie eine zu erwartende Richtigkeit aufweisen, wurden stabile Lagerungsbedingungen über 72 Stunden bei Raumtemperatur als validiert betrachtet. Die erhaltenen Werte der Qualitätskontrollprobe 1 untermauern diese Annahme.

4.3.7 Validierung der Stabilität bei Raumtemperatur

Zur Validierung der Aufarbeitungsstabilität wurden am zweiten Tag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 160.0 ng/ml und 2.000 ng/ml jeweils 10 Proben zusätzlich hergestellt und bei –70 °C eingefroren.

Am folgenden Validierungstag wurden fünf Proben jeder Konzentration 4 Stunden vor Beginn der Aufarbeitung aufgetaut und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die restlichen fünf Proben jeder Konzentration wurden 2 Stunden vor Beginn der Aufarbeitung aufgetaut und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die gesamten Proben wurden mit den Proben des aktuellen Validierungstages aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an diesem Tage gemessene Kalibriergerade.

Qualitäts- kontroll- probe	Theoretische Konzentration an Cisaprid	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 2 h	Stabilität nach 2 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 4 h	Stabilität nach 4 h
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	160.0	170.1	106.3	169.1	105.7
B	160.0	164.2	102.6	173.8	108.6
C	160.0	168.9	105.5	172.1	107.6
D	160.0	165.0	103.1	164.9	103.1
E	160.0	169.2	105.7	168.0	105.0
Mittelwert		167.5	104.7	169.6	106.0
<i>s</i>		2.690	1.7	3.496	2.2
CV			1.6		2.1

Tabelle 20: Raumtemperaturstabilität von Cisaprid (160.0 ng/ml) in Humanplasma.

Qualitäts- kontroll- probe	Theoretische Konzentration an Cisaprid	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 2 h	Stabilität nach 2 h	Gemessene Konzentration an Cisaprid nach 4 h	Stabilität nach 4 h
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	2.000	2.193	109.7	2.183	109.2
B	2.000	1.897	94.8	2.173	108.6
C	2.000	2.107	105.3	1.945	97.2
D	2.000	2.122	106.1	2.022	101.1
E	2.000	2.175	108.8	1.992	99.6
Mittelwert		2.099	104.9	2.063	103.1
<i>s</i>		0.1185	5.9	0.1087	5.4
CV			5.6		5.3

Tabelle 21: Raumtemperaturstabilität von Cisaprid (2.000 ng/ml) in Humanplasma.

Die Werte, die in den Tabelle 20 und 21 dargestellt sind, zeigen keine Instabilität der Proben, nachdem sie bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die Genauigkeit der Konzentrationen ist gegeben und die Variationskoeffizienten liegen innerhalb der Akzeptanzkriterien. Die Werte der Qualitätskontrollproben 3 spiegeln erneut wider, daß die Varianz mit sinkender Konzentration größer wird.

4.3.8 Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen

Zur Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen wurden am zweiten Tag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 160.0 ng/ml und 2.000 ng/ml jeweils 15 Proben zusätzlich hergestellt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die weitere Vorgehensweise der Proben geht aus 2.5.4.6 hervor.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an dem Tag gemessenen Kalibriergerade.

Qualitätskontrollprobe QC 1	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)				Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	nicht eingefroren	einmal eingefroren	zweimal eingefroren	dreimal eingefroren			
A	167.9	166.7	170.0	171.2			
B	157.6	161.7	170.0	178.4			
C	160.4	161.7	169.2	177.6			
D	162.9	161.3	164.4	162.0			
E	156.8	162.0	168.8	162.5			
Mittelwert (ng/ml)	161.1	162.7	168.5	170.3	165.7	5.940	3.6
s (ng/ml)	4.503	2.275	2.335	7.883			
CV (%)	2.8	1.4	1.4	4.6			

Tabelle 22: Stabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (160.0 ng/ml) in Humanplasma nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen.

Qualitätskontrollprobe QC 3	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)				Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	nicht eingefroren	einmal eingefroren	zweimal eingefroren	dreimal eingefroren			
A	1.985	2.020	2.117	2.282			
B	2.162	1.927	2.119	2.330			
C	1.965	1.825	2.210	2.152			
D	1.971	1.856	1.937	2.226			
E	1.901	2.013	2.088	2.342			
Mittelwert (ng/ml)	1.997	1.928	2.094	2.266	2.071	0.1551	7.5
s (ng/ml)	0.09777	0.08877	0.09910	0.07870			
CV (%)	4.9	4.6	4.7	3.5			

Tabelle 23: Stabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (2.000 ng/ml) in Humanplasma nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen.

Die Werte der Tabellen 22 und 23 zeigen keine Instabilität der Proben nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen. Die Variationskoeffizienten der einzelnen

Tage zeigen eine gute Präzision des Systems und die Variationskoeffizienten der Proben untereinander zeigen mit 3.6 % bzw. 7.5 % keine Abweichungen außerhalb der Akzeptanzkriterien. Auffallend ist der Anstieg der Konzentrationen nach mehrmaligem Auftauen. Dies läßt sich nur durch die Variation bei der Herstellung der Qualitätskontrollproben am Tag Null oder der Kalibriergeraden an den folgenden Tagen erklären. Ein Anstieg der Cisapridkonzentration in der Probe kann ausgeschlossen werden, da es in keinem Fall zu einer Konzentrierung der Probe kam. Ebenfalls unwahrscheinlich ist ein Konzentrationsgefälle in der Probe, da diese vor ihrer Aufarbeitung durch intensives Schütteln homogenisiert wurde.

4.3.9 Validierung einer Langzeitstabilität

Zur Validierung einer Langzeitstabilität wurden am zweiten Tag zusätzlich 60 Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 160.0 ng/ml und 2.000 ng/ml hergestellt. 30 Qualitätskontrollproben einer Konzentration wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Jeweils fünf Qualitätskontrollproben einer Konzentration und Lagerungstemperatur wurden nach 6 Tagen und 3 Wochen aufgetaut, aufgearbeitet und gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an dem Tag gemessenen Kalibriergerade.

Qualitätskontrollprobe QC 1	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)			Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	6 Tage	3 Wochen			
A	155.7	149.8	141.1			
B	156.9	154.8	166.5			
C	151.4	154.3	164.4			
D	147.5	150.7	146.5			
E	150.2	149.3	164.2			
Mittelwert (ng/ml)	152.4	151.8	156.6	153.6	2.615	1.7
s (ng/ml)	3.877	2.584	11.81			
CV (%)	2.5	1.7	7.5			

Tabelle 24: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (160.0 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Qualitäts- kontroll- probe QC 3	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)			Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	6 Tage	3 Wochen			
A	2.061	1.992	1.895			
B	2.019	1.998	1.998			
C	2.166	2.033	1.931			
D	1.868	1.954	1.760			
E	2.115	1.938	2.166			
Mittelwert (ng/ml)	2.046	1.983	1.950	1.993	0.04875	2.4
s (ng/ml)	0.1138	0.03755	0.1488			
CV (%)	5.6	1.9	7.6			

Tabelle 25: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (2.000 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Qualitäts- kontroll- probe QC 1	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)			Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	6 Tage	3 Wochen			
A	155.7	149.4	142.6			
B	156.9	149.0	166.1			
C	151.4	147.4	173.8			
D	147.5	151.8	145.1			
E	150.2	148.1	173.3			
Mittelwert (ng/ml)	152.4	149.2	160.2	153.9	5.684	3.7
s (ng/ml)	3.877	1.687	15.25			
CV (%)	2.5	1.1	9.5			

Tabelle 26: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (160.0 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Qualitäts- kontroll- probe QC 1	Gemessene Konzentration an Cisaprid (ng/ml)			Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	6 Tage	3 Wochen			
A	2.061	1.979	1.821			
B	2.019	2.123	1.961			
C	2.166	1.976	2.130			
D	1.868	2.055	1.797			
E	2.115	2.101	1.848			
Mittelwert (ng/ml)	2.046	2.047	1.912	2.001	0.07783	3.9
s (ng/ml)	0.1138	0.06778	0.1373			
CV (%)	5.6	3.3	7.2			

Tabelle 27: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Cisaprid-Qualitätskontrollproben (160.0 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Werte der Tabellen 24 bis 27 zeigen Variationskoeffizienten von 1.7 % - 3.7 % und eine Richtigkeit der Proben nach 3 Wochen anhand derer keine Instabilität festgestellt werden konnte.

4.3.10 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die richtigen Werten für die Qualitätskontrollproben 1 – 4 hergestellt. Es wurde eine entsprechende Menge an Leermatrix ohne internen Standard aufgearbeitet. Mit dieser aufgearbeiteten Leermatrix wurden Proben hergestellt, die die doppelte Konzentration der Qualitätskontrollproben enthielten. Ebenso wurde eine aufgearbeitete Leerprobe mit der doppelten Konzentration des internen Standards, wie er nach der Aufarbeitung vorliegt, versetzt. Für jede Konzentration wurden die Proben 1/1 (v/v) versetzt, so daß die resultierende Konzentration den Qualitätskontrollproben entsprach.

Die Tabelle 28 zeigt die erhaltenen Peakflächen der Qualitätskontrollproben (QC) und der richtigen Werte (RW). Die daraus resultierenden Mittelwerte wurden wie unter 2.5.5 beschrieben normalisiert und die Wiederfindungsrate wurde sowohl für die einzelnen Konzentrationen als auch über den gesamten Konzentrationsbereich bestimmt (Tabelle 29).

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Peakfläche von Cisaprid in Humanplasma					Mittelwert Peakfläche	Mittelwert normalisierte Peakfläche
		A	B	C	D	E		
QC 1	160	100383	97171	93987	95026	97395	96792	605
QC 2	16.0	9927	9517	9510	9978	9526	9692	606
QC 3	2.00	1176	1135	1236	1234	1262	1209	604
QC 4	0.500	352	354	375	315	341	347	695
RW 1	160	91244	92753	88664	90499	91847	91001	569
RW 2	16.0	10496	9692	8795	8217	8563	9153	572
RW 3	2.00	1165	1209	1233	1266	1191	1213	606
RW 4	0.500	325	345	319	344	355	338	675

Tabelle 28: Peakflächen von Cisaprid bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate.

Qualitätskontrollprobe No.	Mittelwert normalisierte Peakfläche QC	Mittelwert normalisierte Peakfläche RW	Wiederfindungsrate (%)
1	605	569	106.4
2	606	572	105.9
3	604	606	99.7
4	695	675	102.9
Mittelwert (%)			103.7
s (%)			3.1
CV (%)			3.0

Tabelle 29: Wiederfindungsrate von Cisaprid.

Für den internen Standard sind die Mittelwerte der Peakflächen der einzelnen Konzentrationen aufgeführt (Tabelle 30). Eine Normalisierung wurde, wie unter 2.5.5 beschrieben, nicht notwendig.

Qualitäts- kontroll- probe	Mittelwert Peakfläche QC	Mittelwert Peakfläche RW	Wieder- findungs- rate (%)
1	92535	100633	92.0
2	91599	94263	97.2
3	91778	99415	92.3
4	91980	102195	90.0
Mittelwert (%)			92.9
s (%)			3.0
CV (%)			3.3

Tabelle 30: Wiederfindungsrate von Fluoxetin.

Die Wiederfindungsraten der einzelnen Konzentrationen von Cisaprid liegen zwischen 99.7 % und 106.4 %. Die resultierende Wiederfindungsrate über den gesamten Konzentrationsbereich beträgt 103.7 %. Das ein Wert über 100 % ermittelt wurde, liegt im Bereich der Meß- und Methodenpräzision.

Die Wiederfindungsrate des internen Standards liegt bei der verwendeten Konzentration bei 92.9 %. Die erhaltenen Wiederfindungsraten zeigen eine effektive Aufarbeitungsmethode und garantieren eine ausreichende Bestimmungsgrenze.

4.4 Diskussion der Validierungsergebnisse

An sechs Validierungstagen konnten die unter 2.5 gesetzten Akzeptanzkriterien erfüllt werden. Die Spezifität der Methode konnte mit sechs verschiedenen Plasmen nachgewiesen werden. Der Konzentrationsbereich war bei Auswertung mit Hilfe einer gewichteten linearen Regression (1/Konzentration) in einem Bereich von 0.5000 ng/ml – 200.0 ng/ml linear. Das minimale Signal-Rausch-Verhältnis betrug 16 und lag damit um einen Faktor drei über dem geforderten Maß. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden lagen über 0.95 und der größte, sowie der kleinste Kalibrierstandard waren in allen gemessenen Kalibriergeraden enthalten. Die Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben konnten an jedem Tag eingehalten werden und die Variationskoeffizienten der Qualitätskontrollproben über die ersten fünf Validierungstage lagen mit Werten zwischen 3.9 % und 10.9 % ebenfalls innerhalb der geforderten Grenzen.

Darüber hinaus konnte kein Einfluß von hämolytischem Plasma und eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen nachgewiesen werden. Stabilitäten für die Aufarbeitung konnten über 72 Stunden erhalten werden. Eine Raumstabilität über 4 Stunden konnte ebenso erhalten werden wie eine Langzeitstabilität über 3 Wochen.

Die Wiederfindungsrate für Cisaprid lag mit 103.7 % über den gesamten Konzentrationsbereich bei einem Wert, der einer vollständigen Wiederfindung entspricht. Ein Wert von 92.9 % für Fluoxetin bei der Arbeitskonzentration zeigt ein ähnliches Verhalten während der Aufarbeitung. Die chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften von Fluoxetin machen diese Substanz zu einem geeigneten internen Standard.

Der Einsatz eines Pipettierroboters ermöglicht die Aufarbeitung von bis zu 384 Proben täglich durch eine Person, die bei einer Laufzeit von 3.4 Minuten zu einer Auslastung des LC-MS/MS-Systems führen.

Die validierte Methode ist geeignet, um die Plasmakonzentrationen von Cisaprid in einem Konzentrationsbereich von 0.5000 ng/ml – 1000 ng/ml sicher und effizient zu bestimmen.

Dieser Konzentrationsbereich deckt die Plasmakonzentrationsspiegel bei den angewandten Applikationen von Cisaprid ausreichend ab.

4.5 Bioäquivalenzstudie

Die unter 4.3 validierte Methode wurde zur Messung von Cisaprid in Humanplasma in einer Bioäquivalenzstudie angewendet.

4.5.1 Studiendesign und Probanden

Zur Überprüfung einer Formulierung A wurde diese mit zwei weiteren Formulierungen B und C an 26 Probanden (16 männlich und 10 weiblich) oral verabreicht. Die Formulierungen wurden an einem Studienort zu drei verschiedenen Zeitpunkten randomisiert mit einer Auswaschphase zwischen den jeweiligen Verabreichungen von sieben Tagen, gegeben. Dabei wurden die Formulierungen über die drei Studienphasen verteilt gegeben, um so eventuelle Schwankungen zwischen den drei Studienphasen auszugleichen.

Jede der Formulierungen bestand aus einer Tablette, die 20.8 mg Cisaprid-Monohydrat (äquivalent zu 20 mg Cisaprid) enthielt und wurde mit 240 ml Mineralwasser eingenommen.

Für die Auswertung wurden 24 Probanden (16 männlich und 8 weiblich) verwendet. Ihre demographischen Daten sind wie folgt:

Alter:	26 ± 4 Jahre
Größe:	172 ± 4 cm
Gewicht:	69.2 ± 10.5 kg

Die Blutabnahme erfolgte zu den folgenden Zeitpunkten:

Direkt vor der Gabe und nach 0.33, 0.67, 1.0, 1.33, 1.67, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 16.0, 24.0, und 36.0 Stunden.

Am Morgen jeder Studienphase wurde den Probanden eine Stunde vor der Gabe ein Katheter in die Vene des Unterarms gelegt und die Blutproben in heparinierten Primavetten[®] gesammelt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 6 ml entnommen, vorsichtig in der Primavette[®] geschwenkt und bei 3.600 U/min (3280 g) 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde in zwei Mikro-Schraubgefäße abgefüllt und sofort bei < -18 °C eingefroren. Für die Blutabnahmen nach 24 und 36 Stunden wurden frische Katheter gelegt. Die Plasmaproben wurden bei < -18 °C vom Studienort zum Analyselabor transportiert und dort unter gleichen Bedingungen bis zum Beginn der Aufarbeitung gelagert.

Die Randomisierung wurde weder den Probanden noch dem Analytiker bis zum Abschluß der Analytik mitgeteilt.

Nach Messung der Proben wurden folgende pharmakokinetischen Parameter bestimmt:

C_{\max} , $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, t_{\max} , Restfläche (%) und $t_{1/2}$.

4.5.2 Ergebnisse und Diskussion der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben während der Studie

Die Studienproben wurden nach ihren Phasen in insgesamt 13 Sequenzen gemessen. Jede Sequenz enthielt neben der Kalibriergeraden drei Sätze an Qualitätskontrollproben (letzte Sequenz enthielt nur zwei Sätze Qualitätskontrollproben). Diese wurden vor Meßbeginn einmalig hergestellt und während der Messungen unter den gleichen Bedingungen wie die Studienproben gelagert. Die Tabelle 31 zeigt die statistische Auswertung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben der Studie.

Qualitätskontrollprobe bzw. Kalibrierstandard	Theoretische Konzentration an Cisaprid (ng/ml)	Anzahl der Proben	Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)
L1	200.0	13	99.1	1.4	1.4
L2	160.0	13	99.9	1.0	1.0
L3	80.00	13	102.1	3.8	3.7
L4	40.00	13	100.7	3.0	3.0
L5	20.00	13	100.0	4.2	4.2
L6	10.00	13	100.5	5.2	5.2
L7	2.000	12	98.9	3.3	3.3
L8	1.000	12	99.1	3.8	3.8
L9	0.7500	13	99.5	5.6	5.6
L10	0.5000	13	100.1	6.4	6.4
QC 1	160.3	38	98.5	7.8	4.9
QC 2	20.04	38	97.8	1.1	5.4
QC 3	7.514	38	98.3	0.5	7.0
QC 4	1.503	38	99.6	0.1	7.6

Tabelle 31: Statistische Auswertung der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben während der Studie.

Die Werte bestätigen die in der Validierung erhaltenen Ergebnisse. Die Richtigkeit der hergestellten Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben ist an den geringen Abweichungen zum theoretischen Wert zu erkennen. Die Standardabweichungen zeigen eine hohe Präzision und daraus folgend sind die Variationskoeffizienten gering. Die Abbildung 20 zeigt die graphische Darstellung der Qualitätskontrollproben 1 mit Abweichungen von $\pm 10\%$ und zweifacher bzw. dreifacher Standardabweichung.

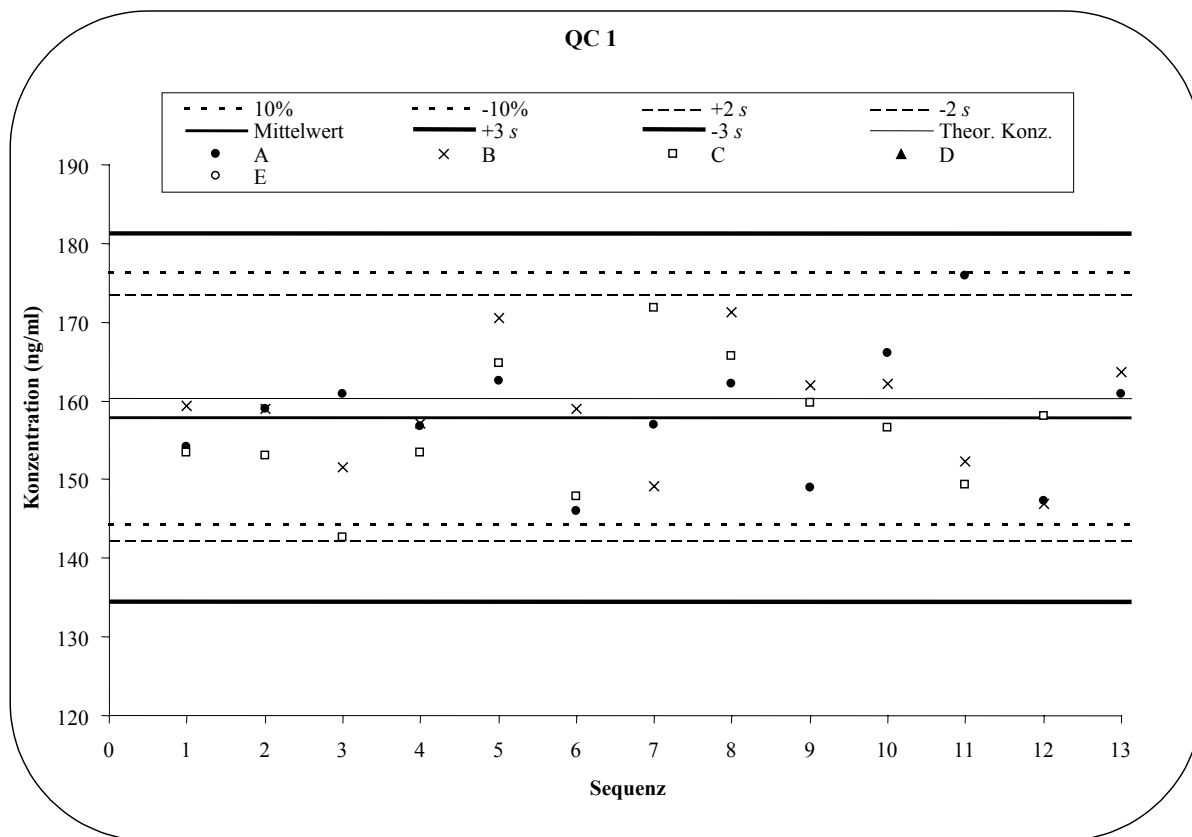


Abbildung 20: Graphische Darstellung aller in der Studie gemessener Qualitätskontrollproben der Konzentration 160.3 ng/ml.

Anhand der Graphik ist zu erkennen, daß bis auf zwei Qualitätskontrollproben alle eine Genauigkeit von $\pm 10\%$ aufweisen. Die unter 2.5 gesetzten Akzeptanzkriterien wurden somit während der Studie deutlich erfüllt.

Insgesamt wurden 1296 Probandenplasmaproben analysiert. Diese Gesamtanzahl an gemessenen Proben inklusive aller Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben belief sich auf 1795. In keiner der Plasmaproben, die vor der Gabe entnommen wurden, fanden sich Störungen zu den Retentionszeiten von Cisaprid oder Fluoxetin. Die Selektivität konnte somit anhand der 24 teilnehmenden Probanden weiter unter Beweis gestellt werden. Von allen gemessenen Proben waren zwei Proben nach der Verabreichung unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die kleinste gemessene Cisapridkonzentration im Plasma betrug 0.5099 ng/ml. Die höchste Cisapridkonzentration wurde mit 134.3 ng/ml bestimmt. Proben die überhalb des dynamischen Bereichs lagen, wurden nicht gemessen. Eine Verdünnung war nicht notwendig. Die Werte zeigen eine gute Wahl des dynamischen Bereichs mit dem 99.84 % aller Proben bestimmt werden konnten.

Während der Messung wurden weder Systemausfälle an dem Pipettierroboter noch an dem LC-MS/MS-System registriert, durch die eine zweite Messung einer Probe notwendig geworden wäre. Die Methode zeigte über eine Messung von sechs Tagen eine hohe Robustheit und Zuverlässigkeit.

4.5.3 Ergebnisse und Diskussion der Formulierung C

Wie unter 4.5.2 angesprochen konnten nahezu alle Proben quantifiziert werden. Innerhalb der Formulierung C galt dies für 100 % der nach der Verabreichung gemessenen Proben. Die sich daraus ergebenden Mittelwerte für die einzelnen Zeitpunkte sind in der Tabelle 32 aufgelistet.

Zeitpunkt	Anzahl	Mittelwert	s	CV	Maximum	Minimum
(h)		(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(ng/ml)
0.00	*	*	*	*	*	*
0.33	24	12.14	10.63	87.5	45.24	1.344
0.67	24	40.60	19.98	49.2	83.03	5.179
1.00	24	52.65	20.77	39.4	100.8	9.806
1.33	24	50.41	17.11	33.9	78.23	9.893
1.67	24	48.08	17.73	36.9	86.40	9.904
2.00	24	44.34	17.47	39.4	97.48	10.14
2.50	24	40.10	14.10	35.2	76.41	5.854
3.00	24	37.76	13.14	34.8	74.04	5.704
3.50	24	33.26	11.98	36.0	67.74	4.328
4.00	24	31.83	11.32	35.6	62.76	5.129
5.00	24	27.46	9.775	35.6	56.74	4.130
6.00	24	24.75	8.958	36.2	50.26	3.132
8.00	24	18.32	7.292	39.8	40.77	2.208
12.00	24	11.40	4.822	42.3	26.33	2.066
16.00	24	9.262	4.379	47.3	20.25	2.401
24.00	24	5.959	4.967	83.4	26.44	1.819
36.00	24	2.199	1.532	69.7	7.478	0.6557

Tabelle 32: Ermittelte Cisapridkonzentrationen der Formulierung C von 24 Probanden.

Eine graphische Darstellung der Daten verdeutlicht eine Kinetik 1. Ordnung (Abbildungen 21 und 22).

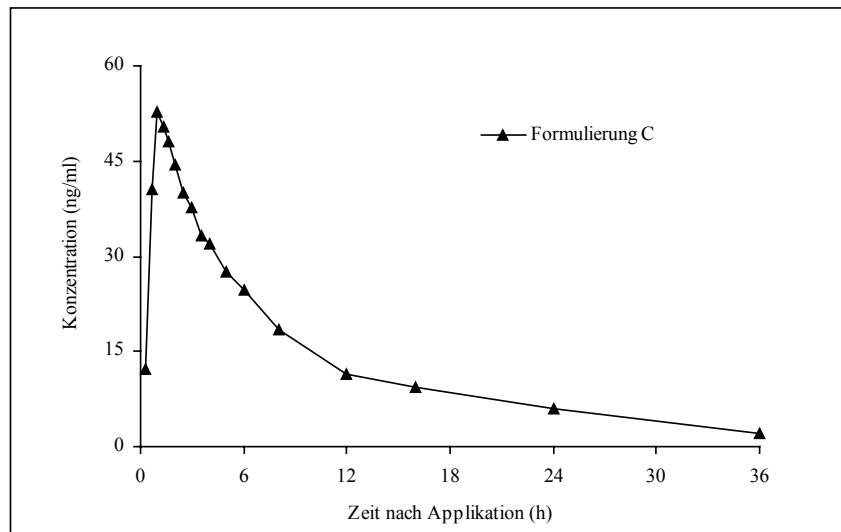


Abbildung 21: Lineare graphische Darstellung der Cisapridkonzentration in Humanplasma.

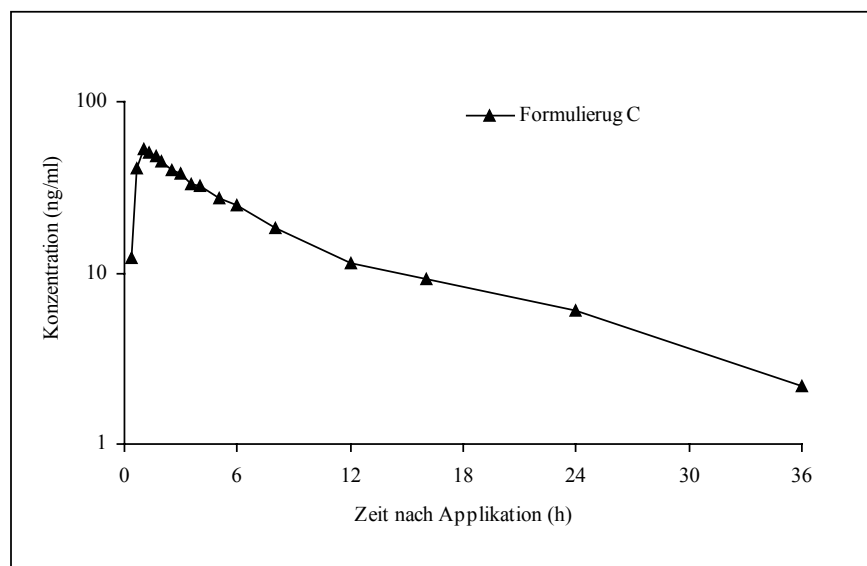


Abbildung 22: Halblogarithmische graphische Darstellung der Cisapridkonzentration in Humanplasma.

In Tabelle 32 sind die maximalen und minimalen Cisapridkonzentrationen angegeben aus denen deutlich wird, daß hohe interindividuelle Schwankungen zwischen den Probanden vorhanden sind. Um diesen Umstand zu verdeutlichen, wurden von sechs Probanden die Cisapridkonzentrationen in den Abbildungen 23 und 24 sowohl linear als auch halb-logarithmisch aufgetragen.

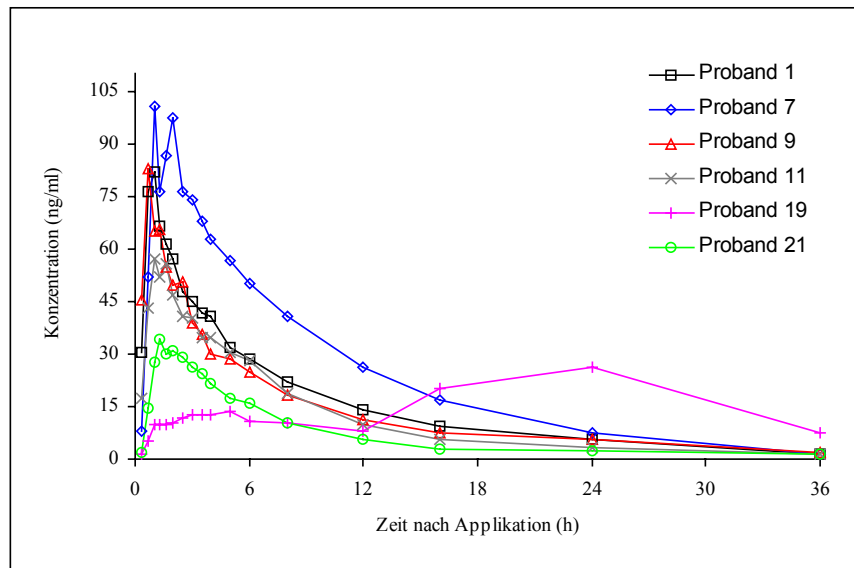


Abbildung 23: Lineare graphische Darstellung der Cisapridkonzentration in Humanplasma von sechs Probanden.

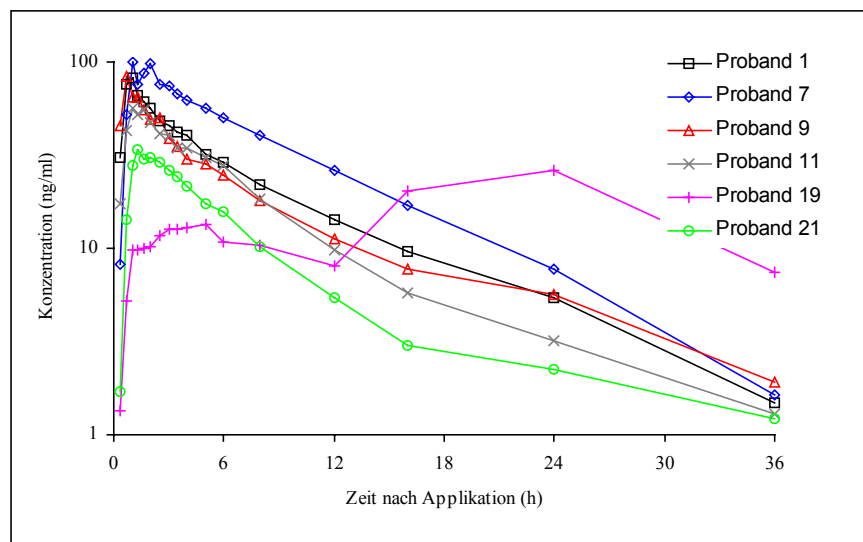


Abbildung 24: Halblogarithmische graphische Darstellung der Cisapridkonzentration in Humanplasma von sechs Probanden.

Proband 1 und 7 repräsentieren dabei Probanden, deren Maximalkonzentrationen deutlich über dem Mittelwert liegen. Während Proband 1 ab dem 20 Minuten-Wert eine hohe Konzentration zeigt, ist der Wert von Proband 7 nach 20 Minuten nicht außergewöhnlich hoch, steigt jedoch dann nach 60 Minuten auf einen Maximalwert von 100.8 ng/ml, welcher das Maximum aller in der Formulierung C gemessenen Werte darstellt, an. Zu den folgenden Zeitpunkten ist ein geringer Abfall der Cisapridkonzentrationen zu verzeichnen. Beide Probanden behalten bis zu 36 Stunden nach der Medikation vergleichsweise hohe

Konzentrationen. Die Probanden 9 und 11 sind stellvertretend für den Durchschnitt dargestellt. An ihnen finden sich keine nennenswerten Abweichungen zu den berechneten Mittelwerten. Die Probanden 19 und 21 hingegen zeigen geringe Maximalkonzentrationen. Während sich bei Proband 21 dies nur in einem geringen Wert für die $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ auswirkt, zeigt sich für Proband 19 eine verspätete t_{max} bei 24.00 Stunden. Dieser sehr späte Wert war nicht zu erwarten und liegt im Bereich der statistischen Ausreißer. Er führt zu einem Anstieg der Cisapridkonzentrationen für die letzten drei Werte, so daß die Berechnung für $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, der Restfläche und der $t_{1/2}$ nicht durchgeführt wurde. Anhand dieses Wertes ist gut zu erkennen wie unterschiedlich ein Wirkstoff im Körper verschiedener Personen resorbiert werden kann, obwohl es sich bei Cisaprid um einen Wirkstoff mit relativ geringen Abweichungen von den pharmakokinetischen Mittelwerten handelt.

Die Tabelle 33 zeigt die pharmakokinetischen Daten der Formulierung C aller 24 Probanden.

Proband	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	AUC _{0->last} (ng•h/ml)	AUC _{0->∞} (ng•h/ml)	Restfläche (%)	t _{1/2} (h)
1	82.00	1.00	545	561	2.8	7.39
2	78.23	1.33	522	540	3.5	8.26
3	37.93	1.33	477	516	7.6	8.88
4	68.49	1.00	606	690	12.2	14.13
5	52.85	1.00	364	431	15.5	15.77
6	47.45	2.50	493	605	18.6	15.50
7	100.8	1.00	853	867	1.6	5.86
8	54.40	1.67	442	457	3.3	7.22
9	83.03	0.67	489	516	5.2	9.74
10	74.23	1.00	477	497	4.1	9.25
11	57.07	1.00	420	438	4.0	9.28
12	77.32	1.00	380	430	11.7	18.57
13	59.58	0.67	407	424	4.2	8.71
14	45.76	1.00	335	341	1.8	6.40
15	49.14	1.33	390	409	4.6	8.81
16	24.89	0.67	107	119	9.8	11.13
17	63.84	1.67	577	610	5.5	9.20
18	52.63	1.33	378	384	1.6	6.66
19	26.44	24.00	568	-	-	-
20	49.19	1.33	514	541	4.9	7.76
21	34.20	1.33	246	272	9.6	15.00
22	48.14	1.33	530	562	5.8	8.50
23	48.78	1.00	438	456	4.0	8.03
24	63.40	1.00	468	495	5.4	8.84
Anzahl	24	24	24	23	23	23
Mittelwert	57.49	2.13	459	485	6.4	9.95
s	18.6	4.67	138	146	4.5	3.42
CV (%)	32.4	219.2	30.1	30.0	70.3	34.4
Minimum	24.89	0.67	107	119	1.6	5.86
Maximum	100.8	24.00	853	867	18.6	18.57

Tabelle 33: Pharmakokinetische Daten der Formulierung C von 24 Probanden.

Anhand der Tabelle 33 wird die stark verzögerte t_{max} des Probanden 19 noch einmal deutlich. Dieser Wert führt zu einer deutlichen Erhöhung der gesamtresultierenden t_{max} von 2.13 ± 4.67 Stunden. Die hohe Standardabweichung von ca. 220 % trägt diesem Umstand Rechnung. Ohne Einbeziehung des Probanden 19 läge die t_{max} bei 1.18 ± 0.40 Stunden. Dieser Wert liegt näher an dem von Maya *et al.*^[70] gefundenen Wert von 1.26 Stunden mit einem CV-Wert von 22 %. Vergleichbare Werte für t_{max} wurden von Gross *et al.*^[80] mit 1.26 ± 0.36 Stunden und Kivistö *et al.*^[81] mit 1.5 Stunden gefunden.

Die ermittelte terminale Halbwertszeit von 9.95 ± 3.42 Stunden deckt sich mit den in der Literatur publizierten Daten von Hedner *et al.*^[71] und McCallum *et al.*^[69]

Die Werte für die Maximalkonzentration decken sich mit den Werten, die von Maya *et al.*^[70] bei der oralen Gabe von 20 mg Cisaprid erhalten wurden. Hingegen fanden Hedner *et al.*^[71] Werte von 74.3 ± 18.4 ng/ml bei einer Gabe von 15 mg und Gross *et al.*^[80] Werte von 65.0 ± 38.8 ng/ml bei einer Gabe von 10 mg Cisaprid.

Die Daten für die $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ mit 459 ± 138 ng•h/ml und $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ mit 485 ± 156 ng•h/ml ergeben eine Restfläche von 6.4 % bei einem Variationskoeffizienten von 70.3 %. Damit sind die Bedingungen des Committee for Proprietary Medical Products (CPMP) erfüllt.^[82] Die geringe Restfläche zeigt ebenfalls an, daß sowohl die Bestimmungsgrenze als auch die Dauer der Abnahmezeitpunkte ausreichend gewählt wurden.

4.6 Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Cisaprid in Humanplasma

Die entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Cisaprid in Humanplasma eignet sich um effizient die Cisapridkonzentrationen in einem dynamischen Meßbereich von 0.5000 ng/ml bis 200.0 ng/ml zu bestimmen. Dieser liegt unterhalb der bislang verwendeten Bestimmungsgrenze von Woestenborghs *et al.*^[76] Hinzu kommt eine einfache Aufarbeitung. Auch neuere Arbeiten von Gross *et al.*^[80] oder Kivistö *et al.*^[81] greifen auf alte Methoden zurück, die eine Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktion beinhalten. Diese entweder zeitaufwendigen oder kostenintensiven Techniken werden für eine hohe Reinheit der Probe sowie ihrer Konzentrierung benötigt, um sie anschließend via UV- oder Fluoreszenzdetektion zu bestimmen. Dabei werden mit eingesetzten Volumina von 100 µl Bestimmungsgrenzen von 5 ng/ml erreicht.^[79]

Eine weitere Methode ist die Verwendung von Säulenschaltungen um eine Aufarbeitung der Probe zu umgehen. Lee *et al.*^[83] erreichen so eine Bestimmungsgrenze von 5 ng/ml, benötigen jedoch eine Gesamtlaufzeit für eine Probe von 18 Minuten.

Die hier verwandte Methode bedient sich einer einfachen Proteinpräzipitation mit Nachverdünnung des Überstandes. Dieser Vorgang kann von einem Roboter im 96er Mikrotiterplattenformat durchgeführt werden und ist somit wenig arbeits- und zeitaufwendig. Vergleicht man die so erhaltene Bestimmungsgrenze von 0.5 ng/ml mit den UV- und Fluoreszenzmethoden ergibt sich ein absoluter Intensitätszugewinnfaktor von 10. Berücksichtigt man die Aufarbeitung vergrößert sich dieser um ein vielfaches abhängig von den jeweiligen Methoden.

Die halbautomatische Aufarbeitung und die kurzen Laufzeiten machten die Messung von insgesamt 1795 Proben innerhalb eines Zeitraums von sechs Tagen möglich. Somit wurden pro Tag ca. 300 Proben ohne Störungen am System aufgearbeitet und gemessen.

Die erhaltenen Werte der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben zeigen eine hohe Präzision und Robustheit für die Messung von Cisaprid in Humanplasma. Die Selektivität konnte während der Messung anhand der Probanden weiter bestätigt werden.

Der Umstand, daß bis auf zwei Proben alle mit dem verwendeten dynamischen Bereich bestimmt werden konnten, beweist die richtige Wahl des Meßbereiches.

Die hier entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Cisaprid in Humanplasma hat während einer vollständigen Validierung und anschließend in einer Bioäquivalenzstudie ihre Einsetzbarkeit bewiesen. Mit der eingesetzten Technik konnten sowohl die Bestimmungsgrenze als auch die Laufzeit gegenüber bekannten Methoden herabgesetzt werden. Eine weitere Senkung der Bestimmungsgrenze kann durch die Aufarbeitung erreicht werden. Um die Laufzeit noch zu verkürzen, kann ein höherer Fluß mit anschließendem Nachsäulensplit eingesetzt werden. Dies beinhaltet jedoch einen Mehraufwand bei der Aufarbeitung und eine zusätzliche Fehlerquelle am System und war für die Bestimmung der Cisapridkonzentrationen nach oraler Gabe von 20 mg nicht notwendig.

5 SC-72393

SC-72393 ist ein neuro-aktives Steroid, welches vermutlich keine weiteren steroiden Hormonaktivitäten besitzt. Es war in der Entwicklung als Medikament mit sedativen und hypnotischen Eigenschaften. Die toxikologischen, physikalischen und anderen potentiellen Gefahren, die von dieser Substanz ausgehen, sind nicht vollständig charakterisiert worden. Nachdem es in Tierversuchen Wirkung zeigte, wurde es bis zu einem Stadium entwickelt, in der es oral in Phase-I-Studien an männlichen Probanden getestet wurde. Aufgrund negativer Ergebnisse bei der Wirkung am Menschen wurde die weitere Entwicklung eingestellt.

Chemie

SC-72393 (3- α -Hydroxy-3- β -trifluoromethyl-5- β -19-nor-pregnan-20-one) liegt als weißes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 151.5 - 153 °C vor. Es ist zu 116.6 mg/ml in Ethanol löslich und ist bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck stabil. Eine Bestimmung des pK_a -Wertes fand nicht statt.

Die Struktur zeigt die Abbildung 25.

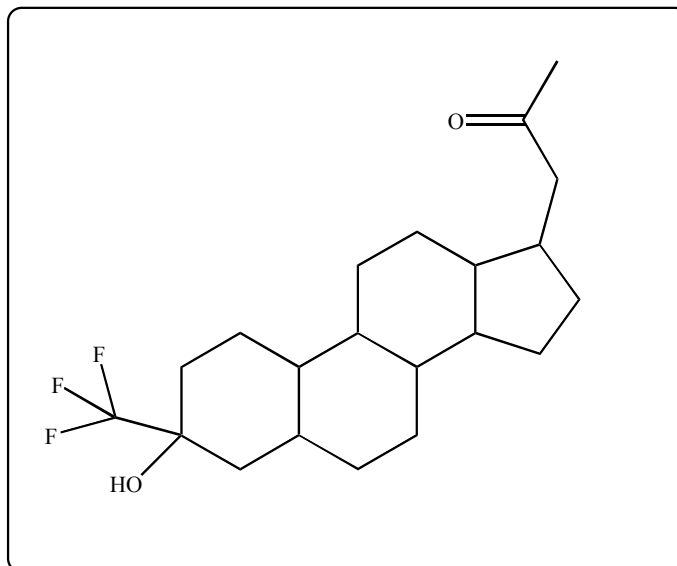


Abbildung 25: SC-72393 (C₂₁H₃₁F₃O₂, Mw: 372.47 g/mol).

Pharmakologische Daten

Klinische Tierversuche ergaben eine letale Dosis von 100 mg/kg bei Ratten und 400 mg/kg bei Mäusen. Vor dem Tod konnten bei den Tieren Anzeichen von Entkräftung, flache Atmung, sowie Hyperaktivität und Unterkühlung festgestellt werden.

Bei Mortalitätsstudien mit Dosen von 50 mg/kg und höher pro Tag an weiblichen Ratten konnten Erstarrungszustände und Unterkühlung vor Eintritt des Todes festgestellt werden. Bei überlebenden Tieren (Dosis 25 mg/kg/Tag) wurden neben der verringerten Körpertemperatur eine reduzierte Aktivität sowie Bewegungsstörungen festgestellt.

In einer weiteren dreitägigen Studie an Hunden konnte nach Applikation von 30 mg/kg/Tag und höher ebenfalls eine Unterkühlung und Erstarrungszustände vor Eintritt des Todes festgestellt werden. Bei überlebenden Tieren (Dosis 15 mg/kg/Tag) wurden wie schon bei den Ratten leichte Unterkühlung, abnehmende Aktivität und Bewegungsstörungen beobachtet.

Die gleichen Symptome wurden bei einer dreitägigen Studie an Rhesusaffen bei Dosen von 60 mg/kg/Tag bzw. 120 mg/kg/Tag beobachtet.

Die reduzierte Aktivität, die Bewegungsstörungen und die verringerten Körpertemperatur konnten auf die pharmakologischen Eigenschaften von SC-72393 zurückgeführt werden. Daneben trat in den Studien bislang keine Mutagenität auf.

In zweiwöchigen Studien an Ratten konnten bei Applikation von 5 mg/kg/Tag bei weiblichen Tieren und 40 mg/kg/Tag an männlichen Tieren die bereits oben beschriebenen Symptome beobachtet werden, ohne daß Tiere dabei verstarben.

Gleiches wurde bei einer zweiwöchigen Studie an Hunden bei einer Dosis von 2.5 mg/kg/Tag beobachtet. Neben den Befunden, hervorgerufen durch die pharmakologischen Eigenschaften von SC-72393, konnten keine Todesfälle beobachtet werden.

Zielsetzung

Zur Bestimmung pharmakokinetischer Daten sollte eine in den USA validierte LC-MS/MS-Methode auf die gegebenen Räumlichkeiten übertragen werden und unabhängig validiert werden. Nach Abschluß der unabhängigen Laborvalidierung sollte die Methode in drei Pharmakokinetikstudien zur Anwendung gebracht werden.

5.1 Geräte und Materialien

- SC-72393 von Searle, Skokie, Illinois, USA, Charge: E90086, Reinheitsgrad: 99.78 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- E-02916 von Searle, Skokie, Illinois, USA, Charge: 00003043, Reinheitsgrad: 100 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- Hydroxylaminhydrochlorid, A.C.S. Reagenz: 99 % (Sigma-Adrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
- Hydroxylamin-Derivatisierungsreagenz: 100 mg \pm 2 mg Hydroxylaminhydrochlorid wurde eingewogen und mit 10 ml Methanol vollständig gelöst.
- Triethylamin 2 %: 200 μ l Triethylamin wurden mit 2.0 ml Milli-Q[®]-Wasser, 8.0 ml Methanol und 80 μ l Essigsäure zusammengegeben und gut gemischt.
- Milli-Q[®]-Wasser, Methanol: 500 ml Milli-Q[®]-Wasser und 500 ml Methanol wurden unter Rühren zusammengegeben.
- 20 % Acetonitril in Milli-Q[®]-Wasser: 800 ml Milli-Q[®]-Wasser und 200 ml Acetonitril wurden unter Rühren zusammengegeben.
- Mobile Phase: 200 ml Ethylacetat, 60 ml Cyclohexan und 0.1 ml Trifluoressigsäure wurden unter Rühren zusammengegeben.
- E-02916 interne Standardstammlösung, 1.00 mg/ml: 10.00 \pm 0.02 mg E-02916 wurden zu 10.0 ml absolutem Ethanol gelöst. Die Lösung wurde bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C maximal 1 Monat verwendet.
- E-02916 verdünnte interne Standardlösung, 10.0 μ g/ml: 0.050 ml der E-02916 interner Standardstammlösung (1.00 mg/ml) wurden mit absolutem Ethanol zu 5.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C maximal 1 Monat verwendet.
- E-02916 interne Standardarbeitslösung, 5.00 ng/ml: 0.025 ml der E-02916 verdünnten interne Standardlösung (10.0 μ g/ml) wurden mit Milli-Q[®]-Wasser zu 50.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur maximal 1 Woche gelagert.
- SC-72393 Stammlösung (1°), 1.00 mg/ml: 9.98 mg SC-72393 wurden zu 10.0 ml mit absolutem Ethanol gelöst. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.

-
- SC-72393 Stammlösung (2°), 100 µg/ml: 1.00 ml der SC-72393 Stammlösung (1°) wurden mit absolutem Ethanol zu 10.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.
 - SC-72393 Stammlösung (3°), 10.0 µg/ml: 1.00 ml der SC-72393 Stammlösung (2°) wurden mit absolutem Ethanol zu 10.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.
 - SC-72393 Stammlösung (4°), 1.00 µg/ml: 1.00 ml der SC-72393 Stammlösung (3°) wurden mit absolutem Ethanol zu 10.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.
 - SC-72393 Stammlösung (5°), 0.100 µg/ml: 1.00 ml der SC-72393 Stammlösung (4°) wurden mit absolutem Ethanol zu 10.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.
 - SC-72393 Stammlösung (6°), 0.100 µg/ml: 1.00 ml der SC-72393 Stammlösung (5°) wurden mit absolutem Ethanol zu 10.0 ml verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 20 °C maximal 1 Monat gelagert.
 - PE Sciex API III Plus Massenspektrometer (Perkin Elmer, Toronto, Ontario, Kanada).
 - HPLC-Säule, YMC-Pack PVA-SIL 120A S-5 Cartridge, 50x4.0 mm (YMC, Schermbeck, Deutschland).

5.2 Methodenentwicklung und Vorversuche

In diesem speziellen Fall der unabhängigen Laborvalidierung wurden die vorgegebenen Bedingungen aus der originalen Validierung als Grundlage verwendet.^[84] Daher kann in diesem Fall nicht von einer Methodenentwicklung gesprochen werden, sondern es muß von einer Methodenübertragung die Rede sein.

Für die Methodenübertragung wurde eine SC-72393-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg SC-72393 ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in 1.00 ml Ethanol hergestellt und auf fünf Aliquote à 200 µl aufgeteilt. Diese wurden bei - 70 °C aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenübertragung durchgeführt.

5.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen

Die Übertragung der massenspektrometrischen Bedingungen konnte im Verhältnis 1:1 erfolgen, da ein baugleiches Massenspektrometer zur Verfügung stand. Wie aus der Struktur in Abbildung 25 hervorgeht, fehlt dem Molekül eine geeignete funktionelle Gruppe oder ein geeignetes Heteroatom, um es zu ionisieren. Aus diesem Grunde wurde die Substanz im alkalischen Milieu mit Hydroxylaminhydrochlorid zum Oxim umgesetzt und somit ein Stickstoffatom zur Optimierung der Ionisierung eingeführt. Die Reaktion ist in Abbildung 26 gezeigt.

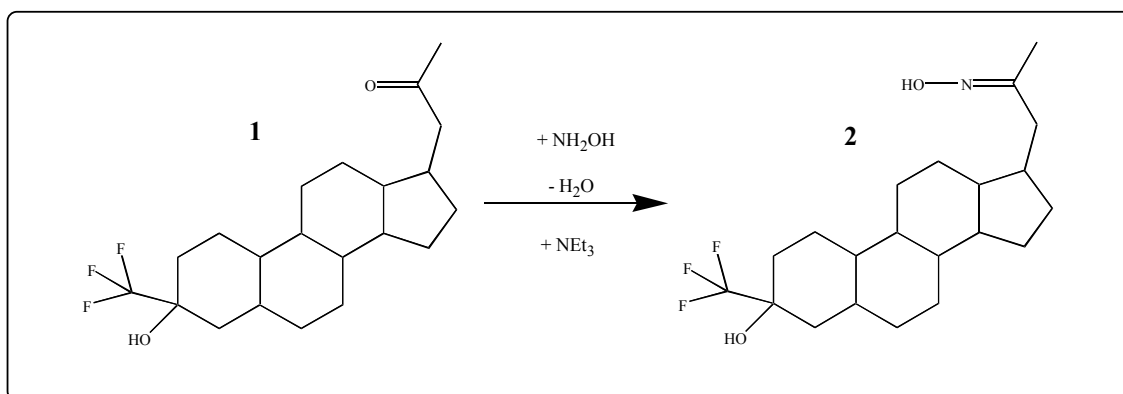


Abbildung 26: Umsetzung vom SC-72393 (1) zum Oxim (2).

Durch die Umsetzung erhöht sich die Masse des Analyten um 15 u auf 387 g/mol. Die hohe Lipophilie der Ausgangssubstanz bleibt hingegen erhalten, so daß sich als Ionisierungsquelle die APCI-Quelle eignet.

Am Gerät wurden die originalen Einstellungen verwendet und diese anhand aufgearbeiteter Proben überprüft. Neben einem Plasma, dem SC-72393 zugesetzt wurde, wurde dasselbe Plasma ohne Zusatz von SC-72393 aufgearbeitet. Die Abwesenheit eines Signals beim SC-72393-freien Plasma und das Signal beim zugesetzten Plasma bestätigten positiv die Übertragung der ursprünglichen massenspektrometrischen Einstellungen. Selbiges wurde parallel mit dem internen Standard (E-02916) vollzogen, sowie mit beiden Substanzen zusammen in einem Plasma. Die gewählten Einstellungen konnten als genügend empfindlich bestimmt werden, um das angestrebte Quantifizierungslimit der Methode zu erhalten.

Die Ionisierung fand durch Zusatz an Trifluoressigsäure im organischen Fließmittel im positiven Modus statt. Ein mögliches Fragmentierungsschema zeigt die Abbildung 27. Anhand dieser Abbildung ist zu erkennen, daß sich als Produkt-Ion ein Molekül mit dem geraden Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 86 bildet, welches demnach das Stickstoffatom enthalten muß.

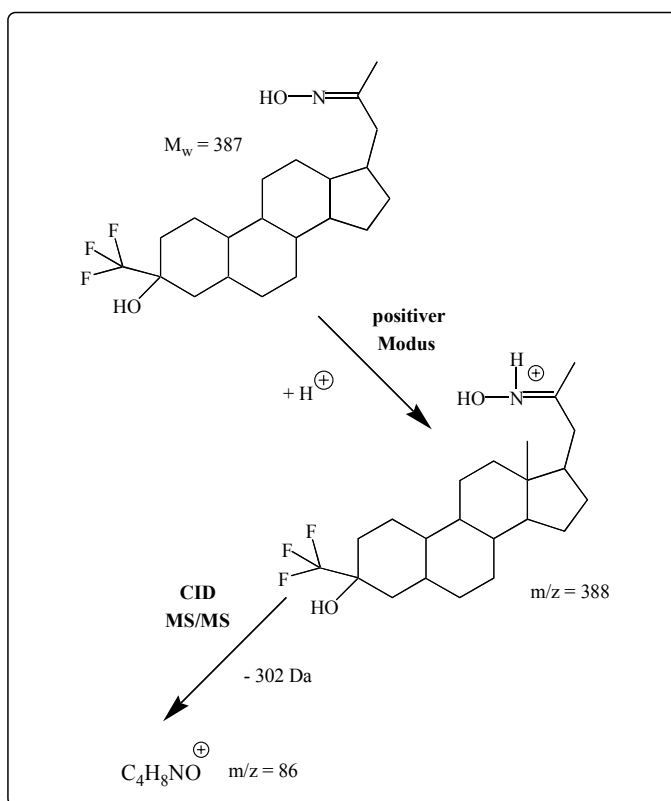


Abbildung 27: Theoretisches Fragmentierungsschema von SC-72393.

Dieses Produkt-Ion bildet sich ebenfalls beim internen Standard (E-02916), der in der Abbildung 28 gezeigt ist. Durch die Umsetzung zum Oxim wird die Masse auf 333 g/mol erhöht. Der sich bei positiver Ionisierung ergebende Massenübergang von m/z 334 \rightarrow m/z 86 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion) konnte wie bereits erwähnt mit ausreichender Empfindlichkeit gemessen werden.

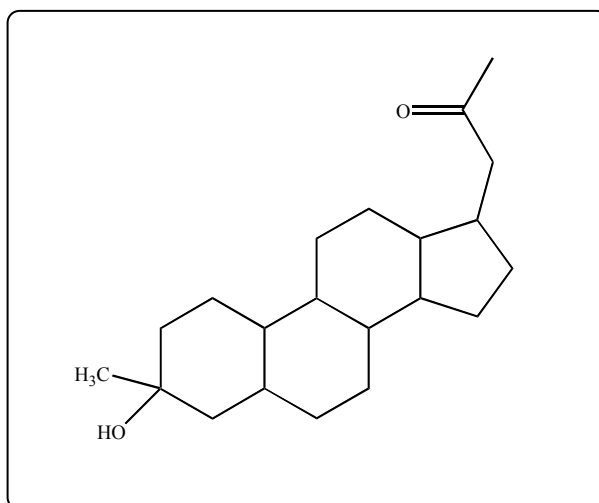


Abbildung 28: E-02916 ($C_{21}H_{34}O_2$, Mw: 318.50 g/mol).

Die sich ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen sind wie folgt:

Ionisierungsmodus: positiv APCI; Gasvorhang: 0.8 ml/min; Zerstäubergas: 40 psi; Hilfsgas: 2.0 l/min; Kollisionsgas: 300×10^{13} Atome/cm²; Temperatur Heizspirale: 525 °C; Nadelspannung: 4.5 kV; Temperatur-Interfaceplatte: 55 °C; OR: 70 V; L7: 6 V; R2: 0 V; Rx: -10 V; R3: -7 V; Verweilzeit: 200 ms; Zeit-Pause: 25 ms; Massenübergang SC-72393: m/z 388 \rightarrow m/z 86; Massenübergang E-02916: m/z 334 \rightarrow m/z 86.

5.2.2 Chromatographische Bedingungen

Die HPLC-Bedingungen wurden analog den massenspektrometrischen Bedingungen exakt übernommen und mittels aufgearbeiteter Proben überprüft. Die lipophilen Oximderivate wurden mit einer Normalphasencharakter-Säule, die Polyvinylalkohol als stationäre Phase gebunden an Kieselgel als Basismaterial (YMC-PVA-Sil, Korngröße 5.0 μ m) enthält, chromatographiert. Das hierzu verwendete Fließmittel bestand aus einer Mischung von Ethylacetat und Cyclohexan mit einem geringen Zusatz an organischer Säure.

Die Chromatogramme der Oximderivate von SC-72393 und E-02916 sind in der Abbildung 29 gezeigt. In den Chromatogrammen **1** und **3**, bei denen im Plasma weder SC-72393 noch E-02916 enthalten war, konnten keine signifikanten Störungen zu den Retentionszeiten der jeweiligen Oximderivate gefunden werden. Die Störungen, die im

Chromatogramm des internen Standards (2) zu erkennen sind, liegen ausreichend weit abgetrennt von dem Signal des E-02916-Oximderivat. Das Chromatogramm 2 zeigt das Signal für das E-02916-Oximderivat bei der Konzentration, bei der es als interner Standard verwendet wurde.

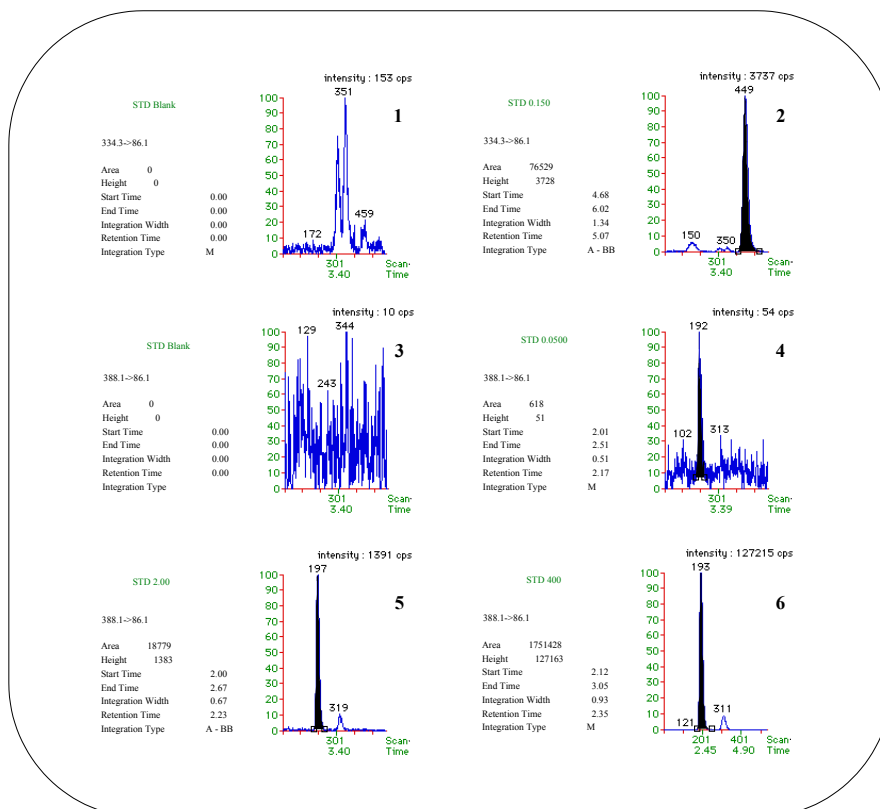


Abbildung 29: Chromatogramme der E-02916- und SC-72393-Oximderivate nach Plasmaaufarbeitung; Chromatogramme ohne (1) und mit (2) Zusatz von E-02916 in Plasma, sowie Chromatogramme ohne (3) und mit Zusatzkonzentrationen an SC-72393 von 50.0 pg/ml (4), 2.00 ng/ml (5) und 400 ng/ml (6) in Plasma.

Die Chromatogramme 4 – 6 zeigen die Signale für das SC-72393-Oximderivat bei den erwarteten Konzentrationen an SC-72393 im Plasma.

Die adaptierten chromatographischen Bedingungen sind wie folgt:

Analytische Säule:	YMC-Pack PVA-Sil, 50 x 4.0 mm, 120A S-5	
Mobile Phase:	Ethylacetat/Cyclohexan/Trifluoressigsäure (60 ml : 200 ml : 0.1 ml)	
Säulentemperatur:	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	50 µl	
Flußrate:	1.0 ml/min	
Probengeberspülflüssigkeit:	Ethylacetat	
Laufzeit:	6.5 Minuten	
Retentionszeiten:	SC-72393	ca. 2.2 min
	E-02916	ca. 5.1 min

5.2.3 Aufarbeitung

Bei der Probenvorbereitung mußten zwei Probleme gelöst werden: Zum einen mußte der Analyt von störenden Matrixbestandteilen befreit werden, und zum anderen mußte eine neue funktionelle Gruppe eingeführt werden, um die Ionisierung zu optimieren. Zusätzlich sollte ein sehr geringes Quantifizierungslimit erreicht werden. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, wurde der Analyt zuerst mittels Festphasenextraktion von den störenden Matrixbestandteilen befreit und gleichzeitig konzentriert. In einem zweiten Schritt wurde der gereinigte Extrakt mit Hydroxylaminhydrochlorid zum Oxim umgesetzt. Nachdem die Validierung durchgeführt wurde und die ersten Messungen von Studienproben stattfanden, zeigte sich, daß eine Erniedrigung der Bestimmungsgrenze notwendig wurde. Die Plasmaplasma menge wurde von 600 ml auf 1000 ml erhöht ohne weitere Veränderungen der Methode.

Von Proben mit Konzentrationen oberhalb des größten Kalibrierstandards wurden Verdünnungen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 50 µl der Probe mit 950 µl Leerplasma aufgefüllt, um ein Ausgangsvolumen von 1000 µl zu erreichen. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte analog den unverdünnten Proben.

Plasmaaufarbeitung:

Das Plasma wurde bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut, geschüttelt und anschließend bei 3600 U/min (2300 g) für 5 Minuten zentrifugiert. 1000 µl der Probe wurden mit 300 µl E-02916 interner Standardarbeitslösung versetzt und stark durchmischt.

Zur Aktivierung des Festphasensäulenmaterials wurden die Festphasenkartuschen zuerst mit jeweils zwei mal 1 ml Acetonitril und anschließend mit zwei mal 1 ml Wasser konditioniert. Die Fließgeschwindigkeit wurde durch Anlegen eines geringen Unterdrucks auf ca. 1ml/min eingestellt. Ein Trockenlaufen der Säule wurde dabei vermieden. Die Plasma-proben wurden auf die Festphasenkartuschen gegeben und das Plasma mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1ml/min eluiert.

Die Festphasenkartuschen wurden mit 1 ml Acetonitril/Wasser (20/80; v/v) nachgewaschen und anschließend für 20 Sekunden durch Anlegen eines Unterdrucks getrocknet. Die Elution der Proben erfolgte mit 500 µl Acetonitril in ein Glasreagenzglas. In diesem wurde das Eluat zur Trockene mit Stickstoff bei 35 °C eingeengt. Zu jedem Glasreagenzglas wurden 100 µl Methanol, 10 µl Hydroxylamin-Reagenz (1 % in Methanol) und 10 µl Triethylamin-Reagenz zugesetzt. Die Proben wurden für 10 Sekunden intensiv geschüttelt und für 30 Minuten auf eine Temperatur von 60 °C erwärmt. Im Anschluß an die Derivatisierung wurden die Proben erneut unter Stickstoff zur Trockene eingeengt und in das Reagenzglas 100 µl Fließmittel zugegeben. Die erhaltenen Oxim-Derivate gingen dabei in Lösung und konnten als Überstand von nicht gelösten Bestandteilen in ein Proben-gebergeläß mittels Pipette überführt werden. Der Probengeber injizierte anschließend 50 µl der Lösung.

5.3 Ergebnisse der unabhängigen Methodvalidierung von SC-72393 in Humanplasma

Die unabhängige Methodvalidierung der LC-MS/MS-Methode für SC-72393 in Humanplasma wurde anhand von ausgewählten Experimenten, wie unter 2.5 beschrieben, durchgeführt.

5.3.1 Spezifität der Methode:

Es wurden je 6 verschiedene Leerplasmen von Männern und Frauen getestet. Das Plasma wurde jeweils mit und ohne internen Standard aufgearbeitet. Eine Störung zu einer der Retentionszeiten von SC-72393 und E-02916 konnte nicht festgestellt werden.

5.3.2 Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)

Zur Validierung des Konzentrationsbereichs wurde an sechs Tagen eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 2.00, 1.50, 1.00, 0.500, 0.300, 0.200, 0.150, 0.100 und 0.0500 ng/ml aus den SC-72393 Stammlösungen 1° - 6° frisch hergestellt, aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte über lineare Regression mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}^2$. Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 11 , womit die Akzeptanzkriterien für die Bestimmungsgrenze erfüllt wurden.

Am zweiten Tag lag die Genauigkeit des kleinsten und am sechsten Tag des zweitkleinsten Kalibrierstandards außerhalb der gesetzten Kriterien und diese wurden zur Berechnung der Kalibriergeraden nicht herangezogen. Die Auswertung der Qualitätskontrollproben war trotz dieses Umstandes an allen sechs Tagen gewährleistet. Die sich ergebenden Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.996 , womit die Akzeptanzkriterien für die Linearität des dynamischen Bereichs (0.0500 ng/ml – 2.00 ng/ml) erfüllt wurden. Die Abbildung 30 zeigt die Kalibriergerade vom vierten Validierungstag.

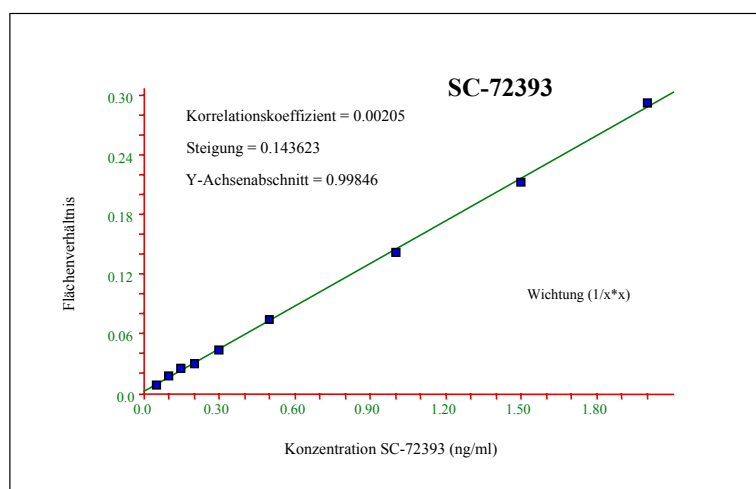


Abbildung 30: Kalibriergerade vom vierten Validierungstag SC-72393 (dynamischer Bereich 0.0500 ng/ml – 2.00 ng/ml).

Die Werte der relativen Standardabweichungen und die Richtigkeit zeigten eine ausreichend hohe Präzision, um Plasmaproben im validierten Konzentrationsbereich quantifizieren zu können.

Bei Verwendung von 600 µl Plasma lag der dynamische Konzentrationsbereich zwischen 0.300 ng/ml – 400 ng/ml. Die Erhöhung der eingesetzten Plasmamenge um 400 µl (66.6 %) rechtfertigt nicht die Reduzierung des Quantifizierungslimits um einen Faktor 6 auf 0.05 ng/ml. Dieser konnte erreicht werden, da zusätzlich das Signal-Rausch-Verhältnis an der Bestimmungsgrenze nicht mehr ca. 40 sondern nur noch ≥ 11 betrug und somit noch einmal ein Faktor von vier gewonnen wurde.

Die Kalibriergeraden im dynamischen Bereich zwischen 0.300 ng/ml – 400 ng/ml zeigten vergleichbare Werte für den Korrelationskoeffizienten (≥ 0.996) und die einzelnen Kalibrierstandards besaßen eine ausreichend hohe Präzision und Genauigkeit, so daß alle gemessenen Kalibrierstandards zur Erstellung der Kalibriergeraden herangezogen werden konnten. Die Abbildung 31 zeigt eine ausgewählte Kalibriergerade für den originalen dynamischen Bereich von 0.300 ng/ml – 400 ng/ml.

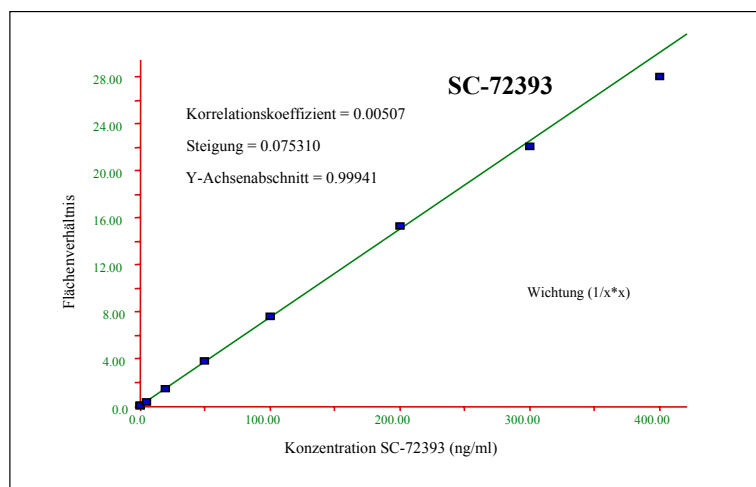


Abbildung 31: Kalibriergerade vom vierten Validierungstag SC-72393 (dynamischer Bereich 0.300 ng/ml – 400 ng/ml).

3.3.3 Präzision von Tag zu Tag

Zur Validierung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden an sechs Tagen Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 1.50, 0.500, 0.200, 0.100 und 0.0500 ng/ml SC-72393 derselben Stammlösungen 1° - 6° hergestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an diesem Tag gemessenen Kalibriergeraden und ergab die in Tabelle 34 angegebenen Konzentrationen.

Qualitätskontrollprobe gemessen am Tag	Gemessene Konzentration von SC-72393 in Humanplasma (ng/ml)				
	QC 0.0500	QC 0.100	QC 0.200	QC 0.500	QC 1.50
A	0.0574	0.108	0.239	0.528	1.66
B	*	0.104	0.205	0.506	1.65
C	0.0498	0.0926	0.214	0.497	1.50
D	0.0595	0.0912	0.222	0.554	1.54
E	0.0421	0.105	0.211	0.495	1.54
F	0.0450	0.0917	0.218	0.501	1.61
Theor. Konz. (ng/ml)	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.50
Mittelwert (%)	0.0507	0.0987	0.218	0.514	1.58
<i>s</i>	0.00756	0.00772	0.0115	0.0232	0.0638
CV (%)	14.9	7.82	5.27	4.52	4.03
RE (%)	1.0	-2.3	9.0	3.0	6.0

* Qualitätskontrollprobe wurde nicht quantifiziert, aufgrund fehlenden untersten Kalibrierstandard an diesem Tag

Tabelle 34: Präzision der Qualitätskontrollproben von SC-72393 in Humanplasma an sechs Validierungstagen.

Die Ergebnisse der Tabelle 34 zeigen die Erfüllung der Akzeptanzkriterien für die Qualitätskontrollproben. Es zeigt sich wie zu erwarten bei kleineren Konzentrationen ein Trend zu einem höheren Variationskoeffizient. Für die kleinste Qualitätskontrollprobe liegt dieser bei 14.9 %. Eine weitere Verringerung der Bestimmungsgrenze würde an einen Grenzbereich gelangen, bei dem nicht mehr gesichert wäre, daß die Richtigkeit des Meßwerts gewährleistet ist.

Die Werte der Richtigkeit der bestimmten Qualitätskontrollprobe verhalten sich hingegen nach keinem Trend. Hier zeigt sich am Beispiel der kleinsten Qualitätskontrollprobe, daß der Mittelwert immer im Zusammenhang mit den Standardabweichungen zu betrachten ist. Ohne den Korrelationskoeffizienten würde die Schlußfolgerung nahe liegen, die kleinste Qualitätskontrollprobe ist am exaktesten gemessen worden, obwohl sich der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen aus eher ungenauen Einzelmessungen zusammensetzt.

5.3.4 Präzision innerhalb eines Tages

Zur Validierung der Präzision innerhalb eines Tages wurden an einem Tag zusätzlich fünf Qualitätskontrollproben aufgearbeitet und mit Hilfe der an diesem Tag gemessenen Kalibriergeraden ausgewertet.

Qualitätskontrollprobe No.	Theoretische Konzentration an SC-72393 (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an SC-72393 in Humanplasma (ng/ml)					Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)	RE (%)
QC 1.50	1.50	1.14	1.32	1.31	1.40	1.43	1.37	0.0574	4.2	-8.5
QC 0.500	0.500	0.514	0.529	0.468	0.458	0.446	0.483	0.0360	7.5	-3.4
QC 0.200	0.200	0.204	0.209	0.188	0.190	0.202	0.199	0.00906	4.6	-0.7
QC 0.100	0.100	0.114	0.0964	0.109	0.0999	0.114	0.107	0.00809	7.6	7.0
QC 0.0500	0.0500	0.0485	0.0569	0.0573	0.0575	0.0593	0.0559	0.00426	7.6	12

Tabelle 35: Präzision der Qualitätskontrollproben von SC-72393 in Humanplasma innerhalb eines Validierungstages.

Die Tabelle 35 zeigt, daß innerhalb eines Validierungstages kein deutlicher Trend zur kleinsten Qualitätskontrolle und einem größeren Variationskoeffizienten zu erkennen war. Dies läßt den Schluß zu, daß die Varianz weniger innerhalb eines Tages als vielmehr zwischen den Tagen zu suchen ist. Für die höheren Konzentrationen ist dieser Effekt weniger ausgeprägt und es konnte anhand der Daten eine vergleichbare Varianz innerhalb und zwischen den Tagen festgestellt werden.

5.3.5 Präzision von hämolytischem Plasma

Zur Überprüfung der Präzision von hämolytischem Plasma wurden an jedem Tag jeweils fünf Qualitätskontrollproben mit der Konzentration 10.0 ng/ml in hämolytischem Plasma frisch hergestellt, aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an diesem Tage gemessenen Kalibriergeraden.

Qualitätskontrollprobe gemessen am Tag	Gemessene Konzentration von SC-72393 in hämolytischen Humanplasma (ng/ml)						Mittelwert	s	CV (%)
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6			
	10.1	9.31	8.06	9.76	9.89	10.2	9.52	0.795	8.35
	11.7	9.01	8.51	8.94	10.2	10.1	9.69	1.17	12.1
	10.6	9.16	8.26	8.89	10.2	9.68	9.43	0.866	9.18
	10.0	8.75	8.76	9.66	10.8	10.2	9.67	0.817	8.45
	10.1	9.08	8.43	9.50	10.4	9.78	9.53	0.715	7.50
	10.8	8.99	8.67	9.80	11.1	10.3	9.90	0.975	9.85
Mittel-	10.5	9.05	8.44	9.42	10.4	10.0	9.61	0.810	8.43
s	0.647	0.188	0.259	0.409	0.444	0.253			
CV (%)	6.16	2.08	3.07	4.34	4.27	2.53			

Tabelle 36: Präzision zwischen und innerhalb der Validierungstage der hämolytischen Qualitätskontrollproben von SC-72393 in Humanplasma an sechs Validierungstagen.

Die in Tabelle 36 gezeigten Meßdaten lassen keinen Schluß auf einen Einfluß an hämolytischem Plasma auf die Quantifizierung der Proben zu. Die Variationskoeffizienten innerhalb eines Tages liegen mit maximal 6.2 % in dem Bereich, der für die Validierung in nicht hämolytischem Plasma gefunden wurde. Die leicht höheren Werte zwischen den Tagen zeigen den Einfluß der Herstellung der Proben. So liegen die Werte am dritten Tag im Durchschnitt 15 % unter dem theoretischen Wert. Da die Kalibriergerade an diesem Tag keine Abweichung in der Steigung aufweist und auch die normalen, nicht hämolytischen Qualitätskontrollproben statistisch um ihre theoretischen Werte verteilt sind, muß von einer Pipettierungenauigkeit bei der Herstellung der hämolytischen Qualitätskontrollprobe am dritten Validierungstag ausgegangen werden, die um ca. 10 % größer ist als an den übrigen Tagen der Validierung, da hier die Abweichung vom theoretischen Wert um ca. 5 % streut.

5.3.6 Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen

Zur Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen wurden am ersten Tag von der Qualitätskontrollprobe mit der Konzentration 10.0 ng/ml jeweils 6 Proben zusätzlich hergestellt und bei - 70 °C eingefroren. Diese wurden anschließend zweimal aufgetaut und erneut eingefroren. Nach dem dritten Auftauen wurden die Proben aufgearbeitet und quantifiziert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an dem Tag gemessenen Kalibriergeraden.

Qualitätskontrollprobe theoretische Konzentration (10 ng/ml)	Gemessene Konzentration an SC-72393 (ng/ml) dreimal eingefroren
A	8.96
B	8.95
C	10.2
D	9.34
E	9.70
F	9.61
Mittelwert (ng/ml)	9.46
s (ng/ml)	0.491
CV (%)	5.18

Tabelle 37: Stabilitätsuntersuchung von SC-72393-Qualitätskontrollproben (10.0 ng/ml) in Humanplasma nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen.

Die Werte der Tabelle 37 zeigten keine Instabilität der Proben nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen. Der Variationskoeffizient entspricht mit 5.2 % dem der Validierung in diesem Konzentrationsbereich.

5.3.7 Validierung einer Langzeitstabilität

Zur Validierung einer Langzeitstabilität wurden am ersten Tag zusätzlich Qualitätskontrollproben mit der Konzentration 10.0 ng/ml hergestellt. Diese wurde bei - 70 °C eingefroren und jeweils sechs Qualitätskontrollproben wurden nach 6, 9 und 56 Tagen aufgetaut, aufgearbeitet und gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der an dem Tag gemessenen Kalibriergeraden.

Qualitätskontrollprobe theoretische Konzentration (10.0 ng/ml)	Gemessene Konzentration an SC-72393 (ng/ml)			Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	6 Tage	9 Tage	56 Tage			
A	9.44	8.47	10.4	9.40	0.965	10.3
B	9.68	8.92	10.4	9.65	0.740	7.67
C	9.11	8.80	11.3	9.68	1.36	14.0
D	9.24	8.85	10.2	9.41	0.695	7.39
E	9.16	9.03	11.1	9.72	1.16	11.9
F	9.92	8.85	10.8	9.82	0.977	10.0
Mittelwert (ng/ml)	9.42	8.82	10.7	9.62	0.960	10.0
s (ng/ml)	0.321	0.189	0.438			
CV (%)	3.41	2.14	4.09			

Tabelle 38: Langzeitstabilitätsuntersuchung von SC-72393-Qualitätskontrollproben (10.0 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von - 70 °C.

Wie schon bei der Präzision von hämolytischem Plasma zeigen die Werte der Tabelle 38 einen höheren Variationskoeffizienten zwischen den Tagen (14.0 %) als innerhalb eines Tages (4.1 %). Dieser Vergleich spiegelt den bereits gefundenen Trend wider, und muß obwohl nur drei Datenpunkte für den Variationskoeffizient zwischen den Tagen vorhanden sind, als Trend betrachtet werden. Durch weitere Messungen zu späteren Zeitpunkten könnte dieser Trend gefestigt werden. Dabei würde jedoch zu berücksichtigen sein, daß sich der Variationskoeffizient durch einen Abbau des Analyten im Plasma zusätzlich erhöhen könnte. Bei den drei untersuchten Zeitpunkten kann nach 9 Tagen ein bereits eintretender Abbau vermutet werden. Die Messung nach 8 Wochen hingegen zeigt, daß sich der Analyt nicht abgebaut hat. Die ermittelten Daten lassen somit keinen Rückschluß

auf eventuelle Instabilitäten des Analyten im Plasma bei einer Lagertemperatur von - 70 °C innerhalb von 8 Wochen zu.

5.4 Zusammenfassung und Diskussion der Validierungsergebnisse

An sechs Validierungstagen konnte eine unabhängige Validierung der Methode zur Messung von SC-72393 erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurden nicht alle Versuche, wie unter 2.5 angegeben, durchgeführt. Eine Wiederfindungsrate wurde beispielsweise nicht erneut bestimmt, da diese bereits bekannt war und bei der Methodenübertragung keine Veränderungen vorgenommen wurden.

Die durchgeführten Versuche erfüllten die unter 2.5 gesetzten Akzeptanzkriterien. Die Spezifität der Methode konnte mit sechs männlichen und weiblichen Plasmen nachgewiesen werden. Der ursprüngliche Konzentrationsbereich von 0.300 ng/ml – 400 ng/ml erwies sich während der Messung der Probandenproben als nicht ausreichend. Durch Erhöhung des eingesetzten Plasmavolumens von 600 µl auf 1000 µl konnte die Bestimmungsgrenze auf 50 pg/ml gesenkt werden. Dies war nur möglich, da das Signal-Rausch-Verhältnis bei 0.300 ng/ml um 40 lag und bei der verringerten Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von ≥ 11 akzeptiert wurde. Der validierte Konzentrationsbereich war bei der Auswertung mit Hilfe einer gewichteten linearen Regression ($1/\text{Konzentration}^2$) in einem Bereich von 0.0500 ng/ml – 2.00 ng/ml linear. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden lagen über 0.996. Mit der Konzentration von 50 pg/ml ist die Bestimmungsgrenze ausgeschöpft, was sich am Umstand zeigt, daß an einem Tag dieser Wert nicht mehr mit ausreichender Präzision bestimmt werden konnte. Eine weitere Absenkung der Bestimmungsgrenze ohne Erhöhung der eingesetzten Plasmamenge war somit nicht gegeben.

Die Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben konnten an jedem Tag eingehalten werden und die Variationskoeffizienten der Qualitätskontrollproben über die Validierungstage lagen mit Werten zwischen 4.0 % und 14.9 % ebenfalls innerhalb der geforderten Grenzen.

Darüber hinaus konnte kein Einfluß von hämolytischem Plasma und eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Langzeitstabilität über 8 Wochen erhalten werden.

Die durchgeführten Versuche können für eine erfolgreiche Übertragung der Methode als ausreichend betrachtet werden. Durch einfache Erhöhung der eingesetzten Plasmamenge und Akzeptanz eines geringeren Signal-Rausch-Verhältnisses konnte die Bestimmungsgrenze um einen Faktor sechs auf 50 pg/ml gesenkt werden. Die Präzision in diesem Bereich zeigt eine deutlich höhere Varianz als bei dem ursprünglichen Quantifizierungs-limit. Eine weitere Absenkung der Bestimmungsgrenze könnte nur durch Erhöhung der Plasmamenge oder eine veränderte Aufarbeitung erfolgen. Eine Volumenreduktion des Endvolumens kommt zur Absenkung der Bestimmungsgrenze nicht in Betracht. Es besteht die Gefahr, den Analyten bzw. sein Oximderivat nicht vollständig in Lösung zu bekommen. Zusätzlich müßte mehr als die Hälfte des Endvolumens auf die Säule injiziert werden, was bei kleinen Volumina technisch schwerer zu realisieren ist.

Ein theoretischer Ansatzpunkt könnte der Austausch der Ionisierungsquelle zu einem konzentrationsabhängigen Detektor sein. Praktische Untersuchungen in diese Richtung wurden jedoch nicht durchgeführt, da dies eine Abweichung von der unabhängigen Methodvalidierung bedeutet hätte.

Die validierte Methode mit dem reduzierten Quantifizierungs-limit ist geeignet, um die Plasmakonzentrationen von SC-72393 in einem Konzentrationsbereich von 0.0500 ng/ml - 2.00 ng/ml sicher und effizient zu bestimmen. Der Versuch, den gesamten Konzentrationsbereich von 0.0500 ng/ml - 400 ng/ml mit einer Kalibriergeraden zu bestimmen wurde nicht durchgeführt.

5.5 Studien zur oralen Applikation von SC-72393

5.5.1 Studiendesign und Probanden

Die Methode wurde zur Messung von drei Studien angewandt, an denen ausschließlich junge männliche Probanden teilnahmen. Die drei Studien teilten sich wie folgt auf:

1. Eine am Tage durchgeführte Studie, in der entweder eine Einzeldosis SC-72393 oder ein Placebo, zum Zwecke der Prüfung auf Verträglichkeit, Sicherheit und zur Erstellung pharmakokinetischer Parameter oral verabreicht wurde.

2. Eine am Tage durchgeführte Studie, in der SC-72393 oder Placebo als Einzeldosen über mehrere Tage, zum Zwecke der Prüfung auf Verträglichkeit, Sicherheit und zur Erstellung pharmakokinetischer Parameter oral verabreicht wurden. Die Applikation von SC-72393 und des Placebos wurde randomisiert verabreicht.
3. Eine in der Nacht durchgeführte Studie, in der entweder eine Einzeldosis SC-72393 oder ein Placebo, zum Zwecke der Prüfung auf einen hypnotischen Effekt, Ermittlung der therapeutischen Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit oral verabreicht wurde.

In allen drei Studien waren sowohl die Probanden als auch die Analytiker nicht über die Randomisierung unterrichtet und somit doppelblind. Zusätzlich wurde das analytische Labor nicht über die Zeitpunkte der Applikation und der Blutentnahme unterrichtet. Aus diesem Grund konnten für die Studien keine pharmakokinetischen Parameter berechnet werden.

Im folgenden sollen die erhaltenen Daten der Qualitätskontrollproben, die während der Messung der Studienproben erhalten worden sind, vorgestellt und diskutiert werden.

5.5.2 Ergebnisse und Diskussion der Qualitätskontrollproben während der Studien

Die Probandenproben der drei Studien wurden in insgesamt 15 Sequenzen gemessen. Jede Sequenz enthielt neben der Kalibriergeraden zwei Sätze an Qualitätskontrollproben (die letzte Sequenz enthielt nur einen Satz Qualitätskontrollproben). Diese wurden vor Meßbeginn einmalig hergestellt und während der Messungen unter den gleichen Bedingungen wie die Studienproben gelagert.

Die Tabelle 39 zeigt die statistische Auswertung der Qualitätskontrollproben der Studien.

Qualitäts- kontrollprobe Sequenz	Gemessene Konzentration an SC-72393 (ng/ml)				
	QC 0.0500	QC 0.100	QC 0.200	QC 0.500	QC 1.50
A	0.0555 0.0489	0.111 0.102	0.217 0.213	0.561 0.532	1.65 1.50
B	0.0527 0.0510	0.0872 0.0920	0.186 0.161	0.453 0.431	1.45 1.38
C	0.0560 0.0470	0.0915 0.0961	0.202 0.206	0.524 0.467	1.64 1.52
D	SE 0.0416	0.117 0.0958	0.185 0.198	0.544 0.501	1.61 1.52
E	0.0569 0.0427	0.103 0.0903	0.209 0.194	0.473 0.472	1.49 1.25
F	0.0489 0.0463	0.0950 0.0971	0.196 0.213	0.450 0.450	1.46 1.42
G	0.0480 0.0435	0.114 0.112	0.202 0.181	0.502 0.444	1.50 1.30
H	n.q. n.q.	n.q. n.q.	0.187 0.189	0.476 0.522	1.48 1.41
I	0.0574 0.0494	0.0974 0.108	0.219 0.220	0.540 0.517	1.57 1.50
J	0.0590 A-SPE	0.108 0.108	0.214 0.208	0.510 0.464	1.56 1.48
K	0.0590 0.0584	0.105 0.107	0.210 0.229	0.530 0.546	1.65 1.62
L	0.0515 0.0509	0.118 0.113	0.241 0.197	0.573 0.495	1.60 1.45
M	0.0561 0.0472	0.0956 0.0872	0.205 0.216	0.573 0.468	1.55 1.50
N	0.0530 0.0485	0.119 0.114	0.205 0.206	0.529 0.515	1.67 1.53
O	0.0477	0.0925	0.191	0.487	1.58
Mittelwert (ng/ml)	0.0511	0.103	0.203	0.502	1.51
s (ng/ml)	0.00517	0.00993	0.0160	0.0401	0.100
CV (%)	10.1	9.64	7.87	7.99	6.62
Anzahl	25	27	29	29	29
Theor. Konz. (ng/ml)	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.50
Genauigkeit (%)	102.2	103.0	101.5	100.4	100.7

Tabelle 39: Statistische Auswertung der Qualitätskontrollproben während der Studien.
SE: Systemfehler; A-SPE: Aufarbeitungsfehler; n.q.: nicht quantifizierbar

Die Werte in der Tabelle 39 bestätigen die in der Validierung erhaltenen Ergebnisse. Zwei Qualitätskontrollproben konnten aufgrund eines Aufarbeitungsfehlers während der Festphasenextraktion (A-SPE) und eines Systemfehlers des Probengebers (SE) nicht in die Statistik mit einfließen. Daneben wurden in der Sequenz H nur die Kalibrierstandards bis zu einer Konzentration von 0.150 ng/ml zur Erstellung der Kalibriergeraden herangezogen. Aus diesem Grunde konnten die Qualitätskontrollproben der unteren beiden Konzentrationen nicht quantifiziert werden. Diesem Umstand wurde bei den Probandenproben Rechnung getragen, indem alle an diesem Tage gemessenen Proben, die unter dem Quantifizierungslimit lagen, an einem der folgenden Tage erneut aufgearbeitet wurden. Die möglichen, nicht quantifizierten Proben, deren Konzentration zwischen 0.0500 ng/ml und 0.150 ng/ml lag, konnten somit an einem der folgenden Tage quantifiziert werden.

Die Steigung und der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden der Sequenz H unterschieden sich nicht signifikant von den Werten, die während der anderen Sequenzen berechnet wurden. Dieser Umstand und die Werte der Qualitätskontrollproben 0.200, 0.500 und 1.50 ng/ml bestätigen, daß die Konzentrationen oberhalb von 0.150 ng/ml mit guter Genauigkeit und Präzision bestimmt wurden und kein Anlaß bestand, alle Probandenproben dieser Sequenz wiederholt aufzuarbeiten.

Die Richtigkeit der hergestellten Qualitätskontrollproben ist an den geringen Abweichungen zum theoretischen Wert zu erkennen.

Die Standardabweichungen zeigen eine hohe Präzision und daraus folgend liegen die Variationskoeffizienten in den zu erwartenden Größenordnungen von bis zu 10 %. Da alle Qualitätskontrollproben einer Konzentration gleichzeitig hergestellt wurden, zeigt der Variationskoeffizient ausschließlich die Varianz des Systems und nicht die der Herstellung, die während der Validierung zusätzlich Einfluß auf den Variationskoeffizienten hatte. Der daraus zu erwartende geringere Variationskoeffizient innerhalb der Studie konnte jedoch nur für die kleinste Konzentration der Qualitätskontrollproben gefunden werden. Für die höheren Konzentrationen liegt der Variationskoeffizient bei der Validierung unterhalb der Variationskoeffizienten der Studie.

Dieser Umstand ändert sich auch nicht, wenn bei den einzelnen Konzentrationen die maximal abweichenden Werte in der Statistik unberücksichtigt bleiben. Demnach steigt die Varianz des Systems. Dies kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen ist die Anzahl an gemessenen Qualitätskontrollproben deutlich erhöht gegenüber der Validierung und somit erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit von Extremwerten in der

Statistik. Zum anderen wurde während der Validierung an einem nicht veränderten System gemessen. Dies trifft für die gemessenen Qualitätskontrollproben der Studien nicht zu. Das System wurde zwischen den einzelnen Messungen für andere Zwecke genutzt. Die dadurch entstandene zusätzliche Varianz kann jedoch nicht quantifiziert werden und ist durch eine Validierung auch nicht oder nur schwer zu simulieren. Ein Ansatz ist die Langzeitstabilitätsmessung, in der neben den Stabilitätsproben frisch hergestellte Qualitätskontrollproben gemessen werden. Werden diese zur Validierung gehörenden Messung mit der Messung der Studienproben koordiniert, ist dies ein möglicher Ansatz, um die Varianz des Systems nach Umbau bzw. anderweitiger Verwendung zu quantifizieren.

5.6 Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von SC-72393 in Humanplasma

Der unpolare Analyt SC-72393, der keine funktionelle Gruppe enthält, die sich mit den einsetzbaren Ionisierungsmethoden gut ionisieren ließ, wurde nach einer Festphasenextraktion mit Hydroxylaminhydrochlorid zu einem gut ionisierbaren Oxim umgesetzt und mittels LC-MS/MS quantitativ bestimmt. Als interner Standard diente E-02916, welches anstelle einer Trifluormethyl- eine einfache Methylgruppe am C-3 des Steroidgerüsts enthielt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einem Normalphasenmaterial mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan unter Zugabe von Trifluoressigsäure zur Protonierung des Oxims. Als Ionierungsquelle wurde die APCI-Quelle verwendet.

Die Versuche der unabhängigen Laborvalidierung ergaben eine hohe Spezifität für die Methode und einen validen Konzentrationsbereich von 0.0500 ng/ml bis 2.00 ng/ml nachdem die Bestimmungsgrenze durch die Erhöhung des eingesetzten Plasmas von 0.300 ng/ml auf 50 pg/ml gesenkt wurde. Die Qualitätskontrollproben konnten in Versuchen innerhalb und zwischen den Tagen präzise bestimmt werden. Die Variationskoeffizienten lagen innerhalb der unter 2.5 geforderten Werte, zeigten jedoch einen klaren Trend zu einer höheren Varianz an der Bestimmungsgrenze. An dieser zeigten sich die Grenzen der Methode. Neben einem untersten Kalibrierpunkt während der Validierung konnten auch während der Messung der Studienproben in einer Sequenz die beiden unteren Kalibrierstandards nicht zur Erstellung der Linearität verwendet werden.

Versuche, einen Effekt von hämolytischem Plasma oder dem mehrmaligen Einfrieren und Auftauen des Plasmas zu bestimmen, ergaben keinen Einfluß auf die Präzision der Meßmethode.

Die während der Messung der Studienproben erhaltenen Werte der Qualitätskontrollproben zeigten eine höhere Varianz, als die in der Validierung. Dabei konnte nicht nachgewiesen werden, daß dies auf einen mehrmaligen Umbau des Systems zurückzuführen war.

Die originale Methode konnte nach der Absenkung der Bestimmungsgrenze durch unabhängige Versuche erfolgreich validiert werden. Die weiterentwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von SC-72393 in Humanplasma eignet sich, um effizient die Konzentrationen SC-72393 in einem dynamischen Meßbereich von 0.0500 ng/ml bis 2.00 ng/ml zu bestimmen.

6 Haloperidol

Haloperidol gehört zu den hochpotenten Neuroleptika der Butyrophenongruppe. Seine Wirkstärke liegt ca. 50fach über der des Chlorpromazins, dessen neuroleptische Potenz als Referenz verwendet wird. Seine hohe neuroleptische Potenz geht einher mit starken extrapyramidal motorischen Nebenwirkungen. Die sedierende Wirkung und vegetativen Effekte hingegen sind geringer als bei schwachpotenten Neuroleptika. Neben seiner antipsychotischen Wirkung besitzt es einen ausgeprägten antiemetischen Effekt.

Der Wirkmechanismus der Butyrophenone ist nicht vollständig aufgeklärt. Gezeigt werden konnte die Blockierung der D₂-Rezeptoren in kortikalen und limbischen dopaminergen Neuronen.

Bei der Anwendung der Neuroleptika zeigen sich starke individuelle Schwankungen, so daß die Einstellung der Medikation für die Patienten individuell erfolgt. Haloperidol wird sowohl bei akuter als auch bei chronischer Schizophrenie eingesetzt.^[85] Bei anhaltender Behandlung kann es zu erhöhter Ansprechbarkeit kommen. Eine Reduktion der Dosis kann dadurch erforderlich werden.

Chemie

Haloperidol, *4-[4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxy-1-piperidino]-4'-fluorbutyrophenon* ist ein weißes, amorphes oder kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt zwischen 148.0 - 149.4 °C (Merck Index). Seine Löslichkeit in Wasser beträgt 14 mg/l. Die Löslichkeit in Methanol liegt bei 50 µg/l (DAB). Es ist wenig hygroskopisch und unter Ausschluß von Lichteinwirkung sowohl als Feststoff wie auch in Lösung über mindestens fünf Jahre stabil. Sein *pK_a*-Wert beträgt 8.3. Haloperidol ist eine sehr lipophile Substanz. Die Abbildung 32 zeigt die Struktur von Haloperidol.

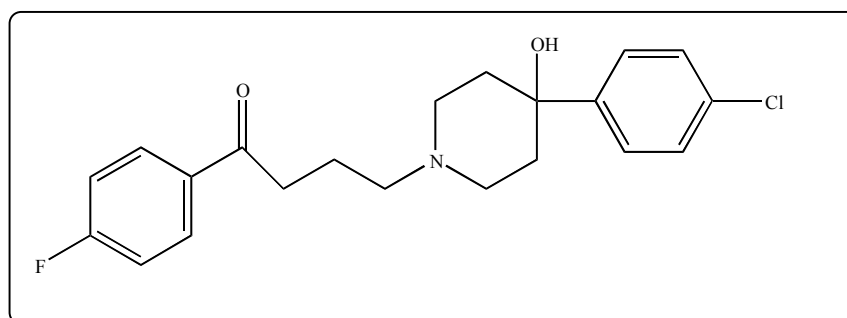


Abbildung 32: Haloperidol (C₂₁H₂₃ClFNO₂, Mw: 375.87 g/mol).

Das Decanoat von Haloperidol ist eine klare, leicht gelb gefärbte ölige Flüssigkeit, die in organischen Lösungsmitteln meist gut löslich ist. In Wasser beträgt die Löslichkeit ca. 10 µg/l. Die Injektionslösungen werden in Sesamöl hergestellt und mit Benzylalkohol stabilisiert.

Pharmakokinetische Daten

Die Plasmakonzentrationen von oral verabreichten Haloperidol unterliegen hohen interindividuellen Schwankungen.^[86] Die Maximalkonzentrationen in Plasma liegen zwischen 1.7 und 6.1 Stunden und die Halbwertszeit bei 36.7 ± 14.6 Stunden. Gleiche interindividuelle Schwankungen wurden ebenfalls für die AUC gefunden. Bei der oralen Gabe von 5 mg Haloperidol wurde ein Mittelwert von 43.73 ± 26.60 ng • h/ml gefunden, wobei die Spanne der bestimmten Fläche von 14.89 – 120.96 ng • h/ml reichte und einen Variationskoeffizienten von 58.5 % beinhaltete.^[86] Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Dosis und der Plasmakonzentration wurde von van Putten *et al.* gefunden.^[87] Die Plasma-eiweißbindung wird mit ~ 90 % angegeben.^[88,89] Haloperidol wird in der Leber stark metabolisiert, wodurch nur ca. 1 % als Muttersubstanz mit dem Urin ausgeschieden werden.^[90] Die Metabolisierung erfolgt durch Reduktion der benzyllischen Carbonylgruppe zum Alkohol und deren Rückoxidation, oxidative N-Dealkylierung, Oxidation zu Pyridin Metaboliten und dem Glucoronid.^[91]

Haloperidol-Decanoat

Nachdem Haloperidol-Decanoat aus dem intramuskulären Depot austritt, wird es zum Haloperidol und der entsprechenden Säure hydrolysiert (Abbildung 33). Die pharmakokinetischen Eigenschaften sind ähnlich denen des Haloperidols selbst. Der Austritt erfolgt langsam und gleichmäßig. Innerhalb eines Tages sind erste Haloperidolplasmakonzentrationen zu beobachten, die bis zum 9. Tag ein Maximum erreichen können. Bei monatlicher Injektion werden Steady-State Bedingungen nach etwa 3 Monaten erreicht. Die Konzentrationen sind dabei vergleichbar mit denen, die bei täglicher oraler Gabe erhalten werden.^[92] Bei der intramuskulären Injektion von Haloperidol-Decanoat (äquivalent zu 100 mg Haloperidol) wurde ein Through-Wert (Konzentrationsangabe am Ende eines Dosierungsintervalls, üblicherweise im Steady-State) von 2 ng/ml nach der ersten Injektion und ein Wert von 4 ng/ml im Steady-State gefunden.^[93] Die Konzentrationen sind dabei

linear und proportional zu den gegebenen Dosierungen. Interindividuelle Schwankungen und sogar intraindividuelle Schwankungen treten dabei auf.

Das Decanoat wird in einer 20fach höheren Dosierung (1 mal monatlich) als täglich oral verabreichtes Haloperidol gegeben.^[94] Da die Bioverfügbarkeit von oral verabreichtem Haloperidol bei ca. 60 % (bedingt durch einen hohen First-pass-Effekt) liegt,^[95,96] entspricht die Menge des intramuskulär verabreichten Haloperidol-Decanoats der oralen Gabe. Die Eliminierung des Haloperidol erfolgt schneller als die Freisetzung des Decanoats aus dem Depot. Der geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Verfügbarkeit ist daher die Freisetzung des Decanoats.^[97]

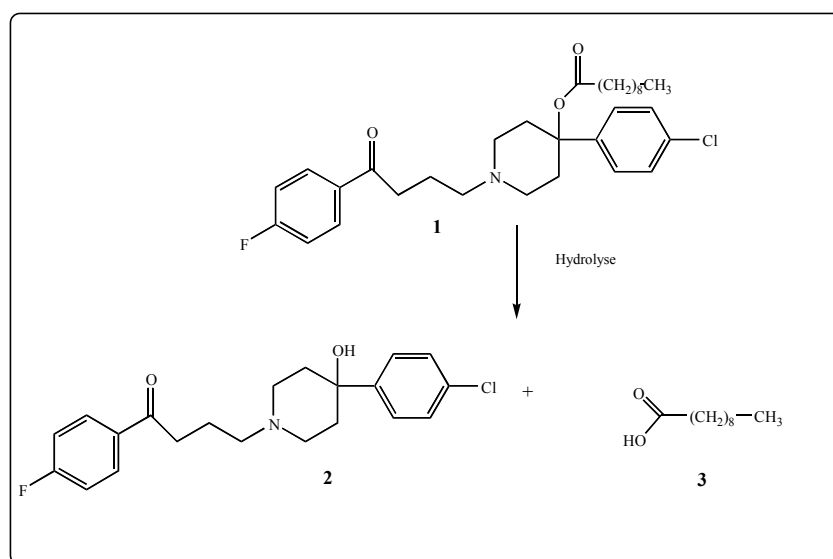


Abbildung 33: Umsetzung von Haloperidol-Decanoat (1) zu Haloperidol (2) und Decanoatsäure (3).

Zielsetzung

Nach intramuskulärer Injektion von 0.5 ml einer 35.26 mg Haloperidol-Decanoat (äquivalent zu 25 mg Haloperidol) enthaltenden Lösung und 1.0 ml einer 70.52 mg Haloperidol-Decanoat (äquivalent zu 50 mg Haloperidol) enthaltenden Lösung soll Haloperidol im Plasma bis 18 Wochen nach der Injektion bestimmt werden. Die zu erwartenden Konzentrationen im Picogramm-Bereich sind mit bis dato vorhandenen Methoden der HLPC-UV-Detektion nicht zu bestimmen oder würden ein zu hohes Volumen an Plasma benötigen, daher sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, die Plasmakonzentrationen in dem genannten Konzentrationsbereich unter Verwendung von 500 µl Plasma bestimmen kann. Mit der entwickelten Methode sollten die Plasmakonzentration von 8 Probanden bestimmt werden.

6.1 Geräte und Materialien

- Haloperidol von Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Charge: 084H0721, Reinheitsgrad: 99.00 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- Loratadin von Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland, Charge: R029.47A, Reinheitsgrad: 99.93 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- Fließmittelpuffer: 0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.0
0.77 ± 0.01 g Ammoniumacetat wurden eingewogen, mit 2000 ml Milli-Q[®]-Wasser vollständig gelöst und der pH-Wert wurde auf 3.0 mit Essigsäure eingestellt.
- Aufarbeitungspuffer: 0.1 mol/l Ammoniumacetatpuffer
7.70 ± 0.1 g Ammoniumacetat wurden eingewogen, mit 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser vollständig gelöst.
- Waschlösung: 0.1 % Trifluoressigsäure in Milli-Q[®]-Wasser
Zu 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser wurde unter Rühren 1.0 ml Trifluoressigsäure zupipettiert.
- Waschlösung: 10 % Acetonitril in Milli-Q[®]-Wasser
Zu 180 ml Milli-Q[®]-Wasser wurde unter Rühren 20 ml Acetonitril zugegeben.
- Elutionslösung: Acetonitril mit 0.75 % Trifluoressigsäure
Zu 100 ml Acetonitril wurde unter Rühren 750 µl Trifluoressigsäure zugegeben.
- Fließmittel: 0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.0, Acetonitril (1000 ml + 1000 ml)
1000 ml 0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.0 und 1000 ml Acetonitril wurden zusammengegeben. Danach wurde das Fließmittel für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.
- Haloperidol-Stammlösung-CR, 500 µg/ml
12.38 mg ± 0.05 mg Haloperidol wurden zu 25.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasreagenzgläsern gelagert.
- Haloperidol-Stammlösung-SQC, 400 µg/ml
9.90 mg ± 0.05 mg Haloperidol wurden zu 25.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasreagenzgläsern gelagert.

- Interne Standardlösung Loratadin, 1.00 mg/ml
10.0 ± 0.1 mg Loratadin wurden zu 10.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasreagenzgläsern gelagert.
- Interne Standardlösung Loratadin, 10.0 µg/ml
0.010 ml der Loratadin interner Standardstammlösung (1.00 mg/ml) wurden zu 0.990 ml Milli-Q[®]-Wasser, pipettiert und gut gemischt.
- Interne Standardarbeitslösung Loratadin, 7.50 ng/ml
0.075 ml interne Standardlösung (10.0 µg/ml) wurde mit 0.1 mol/l Ammoniumacetatpuffer zu 100.0 ml aufgefüllt.
- Probenkonzentrierer, Micro - DS96, Porvair Scienses Ltd., Shepperton, UK.
- 3M Empore[®] C8 SD 96-well plates, 3M, Zwijndrecht, Belgien.
- PE Sciex API III Plus Massenspektrometer, Perkin Elmer, Toronto, Ontario, Kanada.
- HPLC-Säule, LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Grom HPLC und Analytik GmbH, Herrenberg-Kayh, Deutschland.

6.2 Methodenentwicklung

Für die Entwicklung der Methode wurde eine Haloperidol-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg Haloperidol ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in 1.00 ml Acetonitril eingewogen und auf fünf Aliquote à 200 µl aufgeteilt. Diese wurden bei -20 °C und unter Lichtschutz aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt, wobei ein einmal entnommenes Aliquot nicht erneut eingefroren wurde, jedoch bei +4 °C und unter Lichtschutz bis zu seinem Verbrauch verwendet wurde. Alle folgenden Versuche wurden unter Ausschluß von Tageslicht durchgeführt.

6.2.1 Massenspektrometische Bedingungen

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurde die Haloperidol-Stammlösung (1.00 mg/ml) volumetrisch mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (50/50, v/v) auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Diese wurde über eine Spritzenpumpe mit einer Flußrate von 10 µl/min infundiert. Die unten gezeigten Spektren sind mit einer Einheitsmassenauflösung und einer Peakbreite von 0.7 – 0.9 u bei halber

Peakhöhe im MCA Modus (10 scans) am API III Plus aufgenommen. Zur Erzeugung der Ionen wurde wie auch von Hempenius *et al.*^[98] die Elektrospray-Quelle im positiven Modus verwendet. Bei Verwendung von 0.1 % Ameisensäure anstelle von Wasser konnte die Intensität um ca. 50 % erhöht werden. Der Anteil an Ameisensäure stellte dabei sicher, daß Haloperidol protoniert in Lösung vorlag und unterstütze die Ionisierung. Die entstehenden Molekülionenpeaks (Abbildung 34) zeigen neben dem Basispeak m/z 376 (nominale Masse) wie schon bei Cisaprid (Kap. 4) einen weiteren Peak bei m/z 378, der das ^{37}Cl -Isotop enthält.

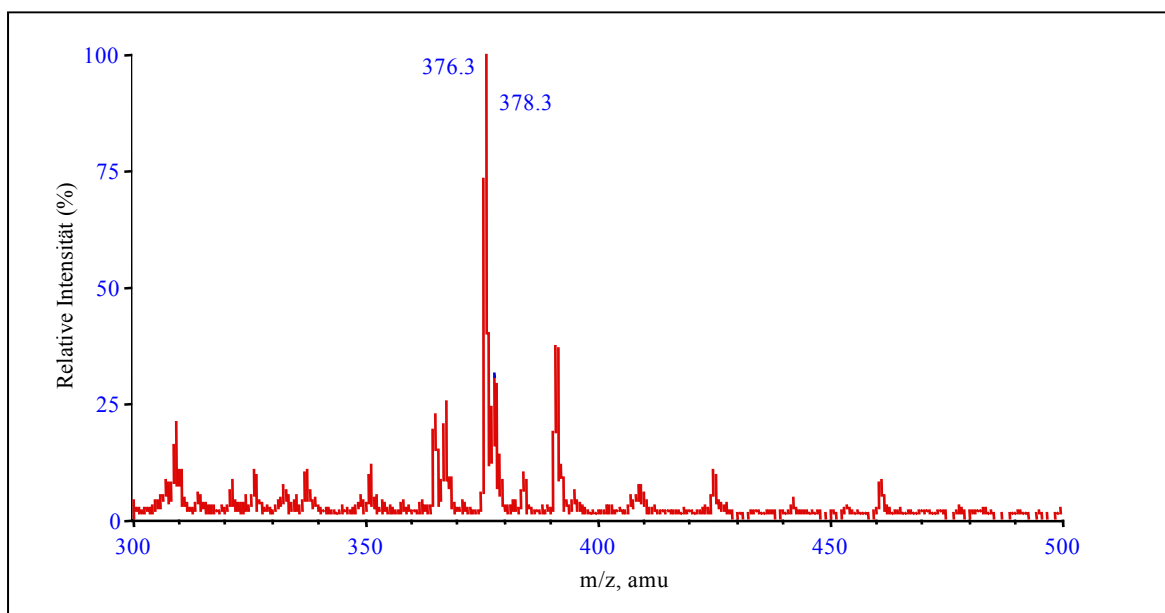


Abbildung 34: Q1-Spektrum von Haloperidol.

Die Optimierung der Produkt-Ionen wurde ausgehend vom Basispeak durchgeführt. Es konnten drei Hauptprodukt-Ionen erhalten werden, die identisch mit den Produkt-Ionen sind, die Hoja *et al.*^[99] zur Charakterisierung von Haloperidol verwendeten. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen die Intensitätsverschiebungen der Produkt-Ionen m/z 165 und m/z 123 bei unterschiedlichen Kollisionsenergien.

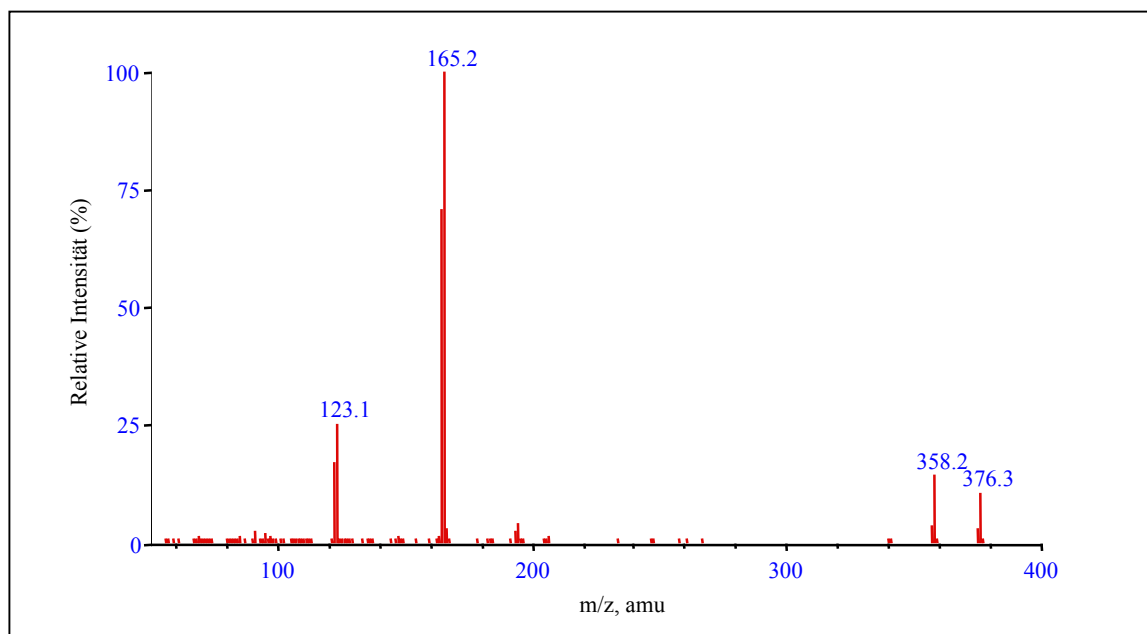


Abbildung 35: Produkt-Ionen-Spektrum von Haloperidol entstehend aus dem Molekülion m/z 376 bei einer Kollisionsenergie von 45 eV.

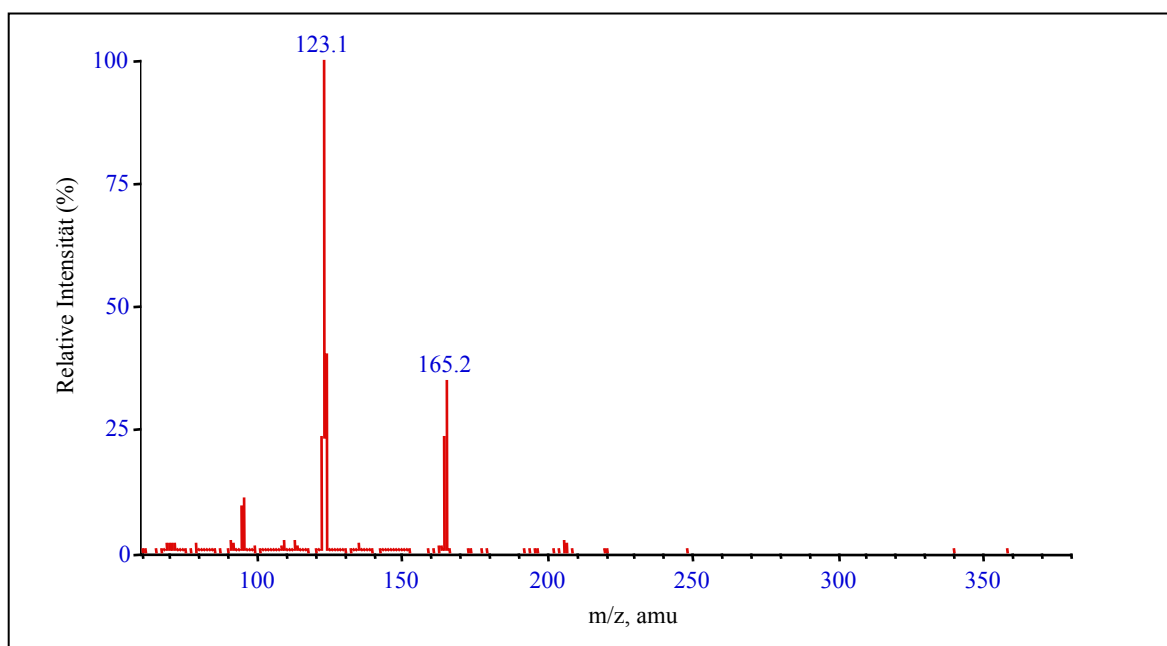


Abbildung 36: Produkt-Ionen-Spektrum von Haloperidol entstehend aus dem Molekülion m/z 376 bei einer Kollisionsenergie von 60 eV.

Die absolute Empfindlichkeit des Produkt-Ion m/z 165 war unter optimierten Bedingungen doppelt so hoch wie die des Produkt-Ion m/z 123. Die massenspektrometrischen Bedingungen wurden auf den Übergang von m/z 376 → m/z 165 (Molekülion → Produkt-Ion) abgestimmt und eine Methode für einen SRM-Modus erstellt. Das Produkt-Ion m/z 165

wurde von Seno *et al.*^[100] als Produkt-Ion von vier Butyrophenone verwendet und bildet sich, wie von Tomlison *et al.*^[101] gezeigt, durch Spaltung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung. Der Stickstoff enthaltende Rest verläßt dabei das Molekül als Neutralteilchen. Das Produkt-Ion m/z 123 wird beschrieben als $[F-C_6H_4-C\equiv O]^+$ (Abbildung 37). Ob eine direkte Spaltung der α -Kohlenstoff-Bindung der Ketofunktion oder ein Abbau der Kohlenstoffkette nach der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung stattfindet, konnte nicht eindeutig aufgeklärt werden. Das in Abbildung 35 zu sehende Produkt-Ion m/z 358 entsteht bei geringen Kollisionsenergien durch Abspaltung der Hydroxylgruppe als Wasser. Die Fragmentierung von Haloperidol läßt den Schluß zu, daß die Protonierung beim Molekülion sowohl am Stickstoffatom als auch an der Hydroxygruppe stattfindet. Das Fragmentierungsschema von Haloperidol zeigt die Abbildung 37.

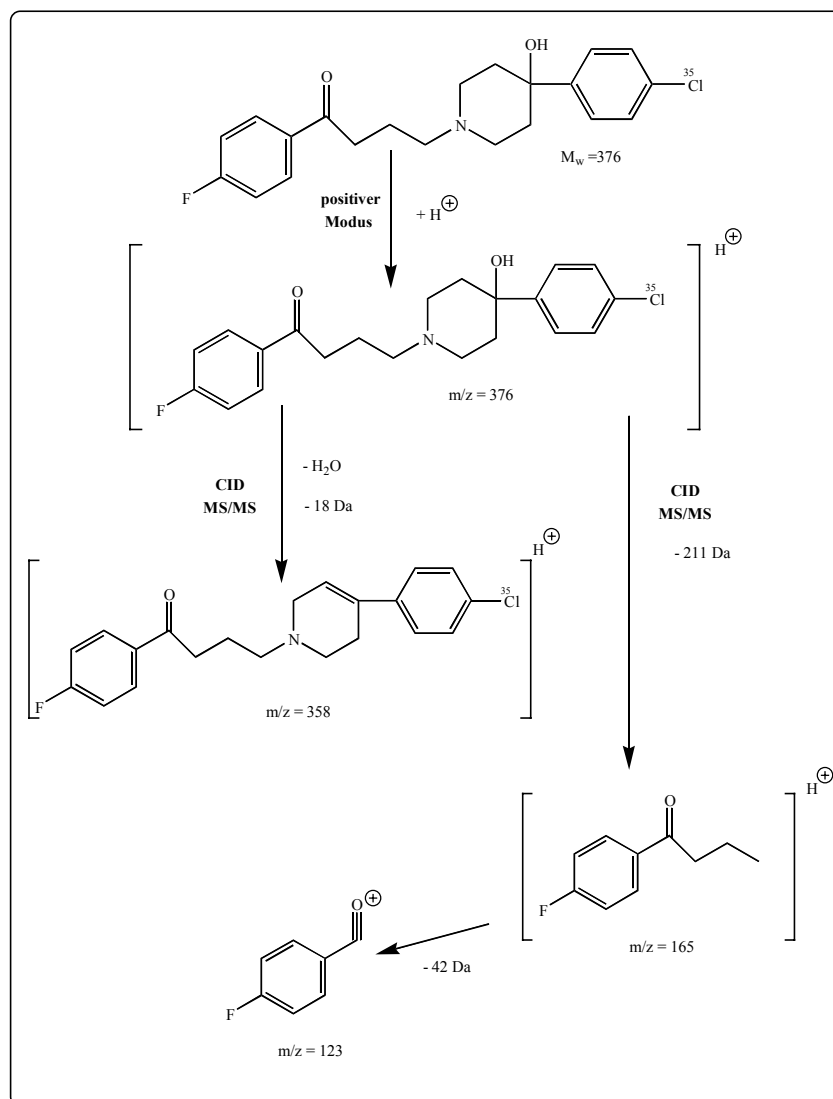


Abbildung 37: Fragmentierungsschema ausgehend vom ³⁵Cl-Isotop enthaltenden Haloperidol.

Die Messungen von aufgearbeiteten Plasmaproben zeigten keine wesentlichen Störungen bei Verwendung des Übergangs von m/z 468 \rightarrow m/z 186 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion), die die Wahl eines anderen Übergangs hätte nötig werden lassen. Es konnte der Übergang vom intensivsten Molekülion auf das intensivste Produkt-Ion verwendet werden.

Die sich daraus ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen für das API III Plus sind wie folgt:

Ionisierungsmodus: positiv Turbo-Elektrospray; Gasvorhang: 1.0 ml/min; Zerstäubergas: 60 psi; Hilfsgas: 6.0 l/min; Kollisions-Gas: 280×10^{13} Atome/cm²; Temperatur-Turbo: 500 °C; ISV: 4500 V; OR: 55 V; Temperatur-Interfaceplatte: 60 °C; L7: 15 V; R2: 10 V; Rx: 0 V; R3: 5 V; Verweilzeit: 200 ms; Zeit-Pause: 2 ms; Massenübergang Haloperidol: m/z 376 \rightarrow m/z 165; Massenübergang Loratadin: m/z 383 \rightarrow m/z 337.

Der Massenübergang m/z 383 \rightarrow m/z 337 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion) entspricht dem Übergang, der für Loratadin (Interner Standard) gefunden wurde. Die Wahl für Loratadin wurde aufgrund der chromatographischen Bedingungen und anhand der Aufarbeitungstechnik getroffen.

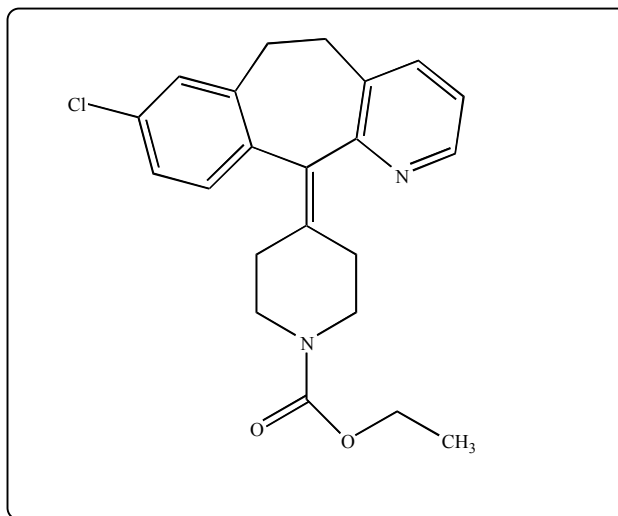


Abbildung 38: Loratadin (C₂₂H₂₃ClN₂O₂, Mw: 382.89 g/mol).

Die Struktur von Loratadin (Abbildung 38) enthält wie Haloperidol ein Chloratom. Dadurch finden sich im Massenspektrum (Abbildung 39) erneut zwei Molekülionen bei m/z 383 (nominale Masse) und bei + 2 u das weitere Chlorisotop.

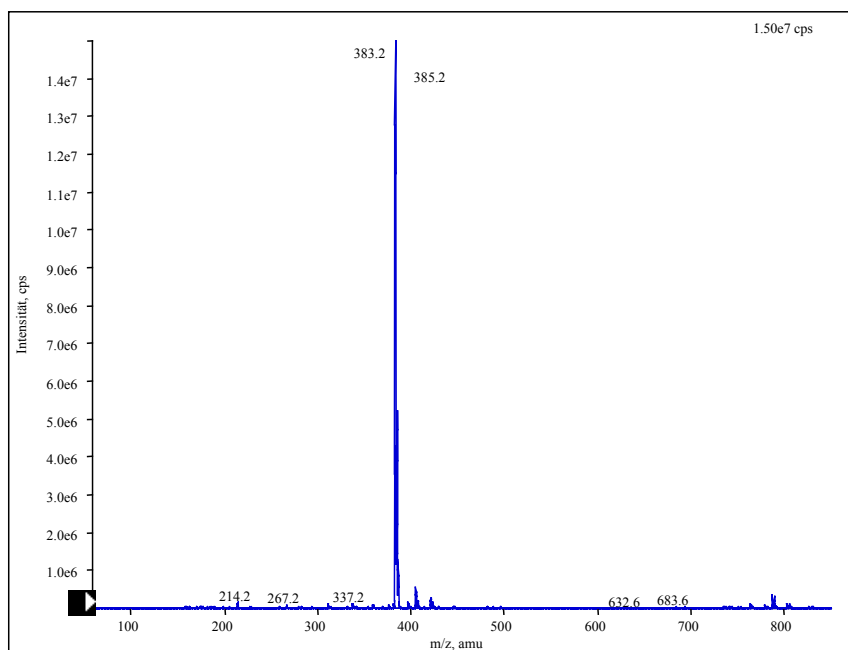


Abbildung 39: Q1-Spektrum von Loratadin.

Die gezeigten Spektren des Loratadins wurde vor dem Beginn der Methodenentwicklung des Haloperidols am API 3000 mit dem Elektrospray-Interface aufgenommen. Eine 1.00 $\mu\text{g/ml}$ Loratadinlösung bestehend aus 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser/Acetonitril wurde mittels einer Havardpumpe infundiert. Die Spektren von Loratadin in Abbildungen 39 und 40 wurden unter optimierten Bedingungen für Loratadin aufgenommen. Diese fanden nach dem Wechsel auf das API III Plus Massenspektrometer anschließend keine Verwendung.

Nach Aufarbeitung von Proben mit Loratadin als internen Standard konnte mit den Einstellungen am API III Plus ein ausreichendes Signal für den Übergang des Molekülions von Loratadin (m/z 383) auf das Produkt-Ion (m/z 337; Abbildung 40) erhalten werden. Der Massenübergang des Loratadins wurde der bestehende Methode hinzugefügt und die Konzentration der internen Standardarbeitslösung so gewählt, daß ein Signal ausreichender Intensität erhalten wurde. Auf eine Spektrenaufnahme des Loratadins am API III Plus wurde verzichtet.

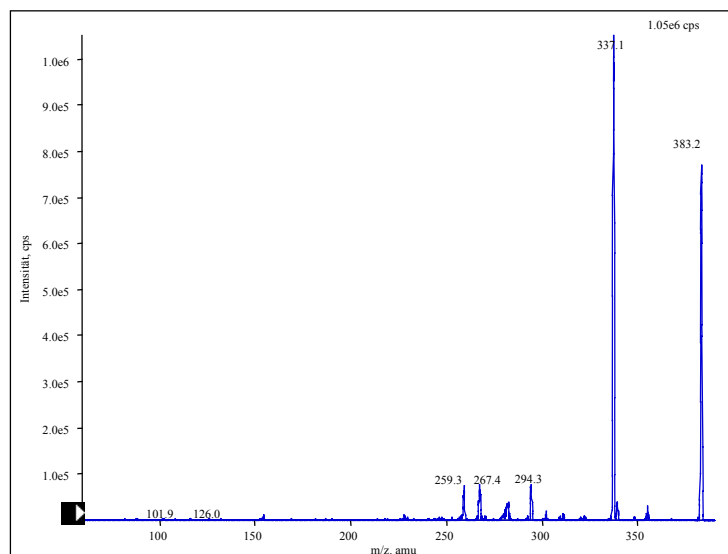


Abbildung 40: Produkt-Ionen-Spektrum von Loratadin entstehend aus dem Molekülion m/z 383.

6.2.2 Chromatographische Bedingungen

Haloperidol wurde seit Anfang der 1980er Jahre unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen gemessen.^[102,103] Dabei wurden hauptsächlich Umkehrphasenmaterialien eingesetzt aber auch Säulen mit Mischcharakter, eine Kombination aus Ionenaustauschersäulen- und Umkehrphasenmaterialien. Die Fließmittelzusammensetzungen waren bei gleicher Säule zum Teil sehr unterschiedlich. So verwendeten Walter *et al.*^[104] auf einer Hypersil Cyanopropyl-Kieselgelsäule ein Gemisch aus Acetonitril/Methanol/0.1 mol/l Ammoniumacetat-Puffer/Triethylamin (920/110/30/0.05; v/v/v/v), während Boehme und Strobel^[105] bei der gleichen Säule ein Gemisch aus Acetonitril/0.01 mol/l Ammoniumacetat-Puffer (67/33; v/v; pH 5.4) verwendeten. Überwiegend wurde die Trennung jedoch mit reinen Umkehrphasenmaterialien durchgeführt.^[99,100]

Als Startbedingungen für die Chromatographie wurden ein Gemisch aus 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser/Acetonitril (50/50; v/v) und Säulen mit C₁₈-Materialien getestet. Nach ersten chromatographischen Versuchen mit aufgearbeiteten Proben mußte anstelle der organischen Säure Ammoniumacetat als Puffer eingesetzt werden, um die Ionisierung zu stabilisieren. Optimale Bedingungen konnten mit einer Säule, die C₁₈-Umkehrphasenmaterial (YMC-ODS-AM, Korngröße 3.0 µm, endcapped) als stationäre Phase enthielt, und einer Fließmittelzusammensetzung aus 0.005 mol/l Ammoniumacetat-Puffer/Acetonitril (50/50; v/v; pH 3.0) erhalten werden (Abbildung 41). Es zeigte sich jedoch bei der

verwendeten Aufarbeitungsmethode ein hoher Druckanstieg nach ca. 50-60 injizierten Proben, einhergehend mit einem Verlust in der Peaksymmetrie (Abbildung 41).

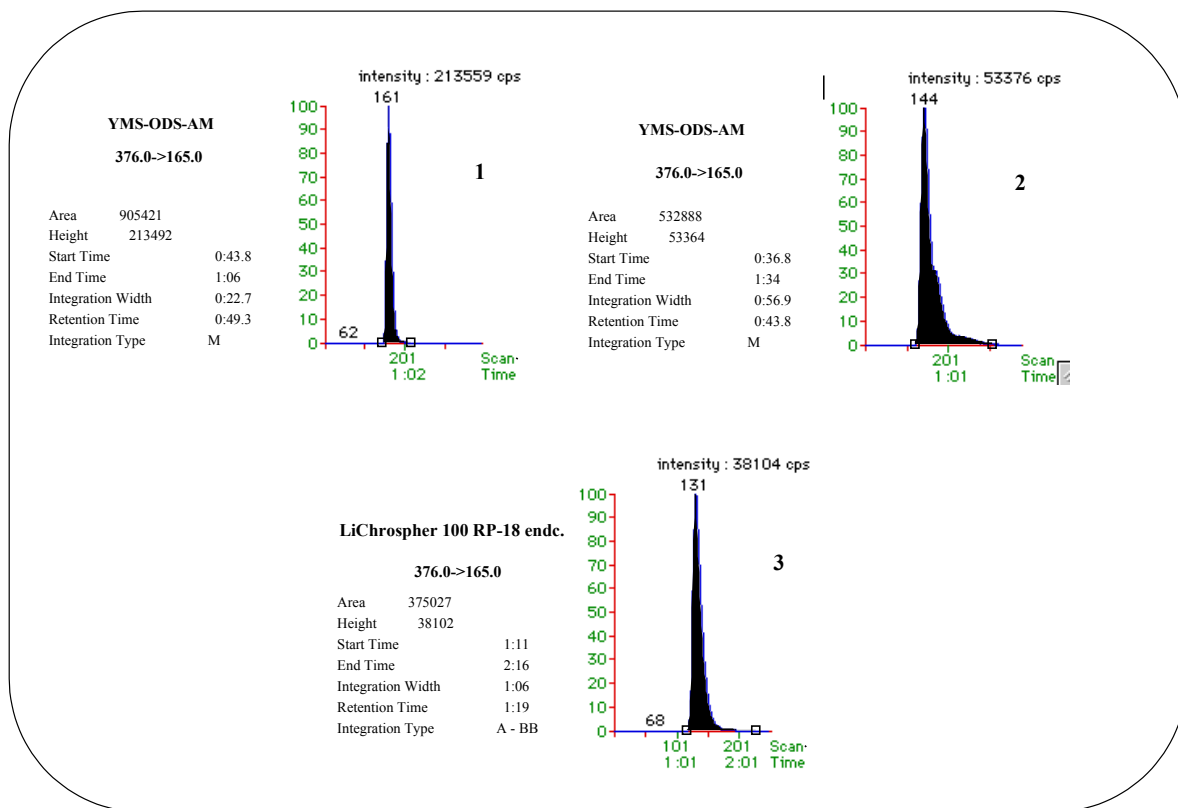


Abbildung 41: Chromatographie von Haloperidol mit einer YMC-ODS-AM-Säule nach 10 Injektionen (1) und nach 65 Injektionen (2), sowie mit einer LiChrospher 100 RP-18 endcapped-Säule (3).

Eine zweite Säule mit C₁₈-Umkehrphasenmaterial (LiChrospher 100 RP-18, Korngröße 5.0 µm, endcapped) hingegen zeigte während 100 Injektionen keinen Druckanstieg, so daß die Laufzeitverlängerung um 25 % und die breitere Peakform gegenüber der YMC-ODS-AM-Säule akzeptiert wurden. Eine Änderung der Fließmittelzusammensetzung durch die Verwendung der LiChrospher-Säule wurde nicht notwendig. Die Flußrate wurde auf 0.8 ml/min eingestellt und ein Nachsäulensplit eingesetzt, von dem aus 0.15 ml/min des Eluenten in die Quelle gelangten.

Loratadin und Clindamycin wurden als interner Standard mit der YMC-ODS-AM-Säule getestet. Clindamycin retinierte unter den für Haloperidol optimierten Bedingungen sehr kurz nach dem theoretischen Totvolumen (Abbildung 42). Eine Meßpräzision von 74 Proben über fünf Stunden zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 9.4 % bei einer maximalen Abweichung von 52 % zwischen der kleinsten und der größten Peakfläche. Der Versuch, Clindamycin zu späteren Retentionszeiten hin zu verschieben und damit weg von

möglichen Störungen in oder direkt nach der Lösungsmittelfront, führte zu einer Laufzeitverlängerung um ca. 50 %. Loratadin hingegen zeigte bei einer zweiten Meßpräzision über 59 Proben einen Korrelationskoeffizienten von 5.1 % bei einer maximalen Abweichung von 20 % zwischen der kleinsten und der größten Peakfläche. Eine Änderung des Fließmittels war nicht erforderlich, um eine ausreichende Peakform zu erhalten (Abbildung 42).

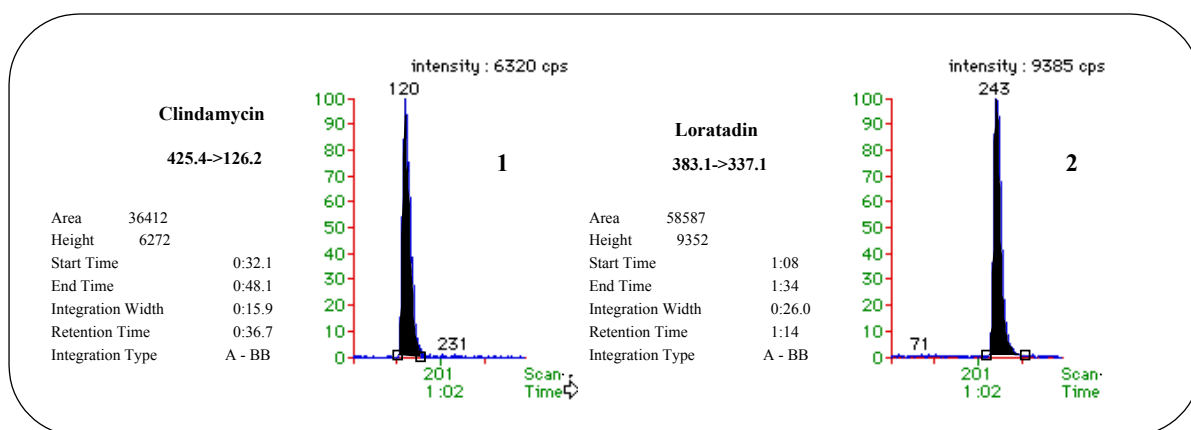


Abbildung 42: Chromatographie von Clindamycin (1) und Loratadin (2).

Bei Verwendung der LiChrospher-Säule verhielt sich Loratadin vergleichbar zu Haloperidol. Die Retentionszeit verlängerte sich von ca. 1.3 min auf ca. 1.6 min. Kontaminationsprobleme durch den Probengeber (L-7250 LaChrom) konnten bei Verwendung von mobiler Phase als Spülflüssigkeit nicht beobachtet werden.

Die sich daraus ergebenden chromatographischen Bedingungen sind wie folgt:

Analytische Säule:	LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5.0 µm, 50 x 4.6 mm	
Mobile Phase:	0.005 mol/l Ammoniumacetat pH 3.0, Acetonitril (500 ml : 500 ml)	
Säulentemperatur :	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	50 µl	
Flußrate:	0.8 ml/min, Split: 0.15 ml/min	
Probengeber-Spülflüssigkeit:	mobile Phase	
Laufzeit:	2.5 Minuten	
Retentionszeiten:	Haloperidol	ca. 1.3 min
	Loratadin	ca. 1.6 min

6.2.3 Aufarbeitung

Bei der gegebenen Medikation sind obere Plasmaspiegel bis in den einstelligen Nanogramm pro Milliliter-Bereich zu erwarten. Das untere Quantifizierungslimit sollte möglichst weit im unteren Picogramm-Bereich liegen. Eine Konzentrierung der Probe während der Aufarbeitung war notwendig, um ein möglichst geringes Quantifizierungslimit zu erreichen.

Anfang der 1980er Jahre wurde Haloperidol mit Flüssig-Flüssig-Extraktionen und einer HPLC Trennung bis zu einem Quantifizierungslimit von 500 pg/ml bestimmt.^[106] Die verwendeten Volumina an Plasma lagen bei 1 ml oder 2 ml.^[107,108] An diesen Bestimmungsgrenzen hat sich bis Ende der 1990er Jahre nicht viel geändert. Walter *et al.*^[104] setzten 1 ml Serum ein und erhielten mit UV-Detektion ein Quantifizierungslimit von 300 pg/ml. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion steht heute für die Konzentrierung der Proben die Festphasenextraktion zur Verfügung. Bei Verwendung von 96er Mikrotiterplatten kann der Probendurchsatz deutlich höher liegen als bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen. Zusätzlich ist der Verbrauch an Lösungsmitteln geringer.

Bei der Aufarbeitung von Haloperidol mittels einer Festphasenextraktion stehen zwei Möglichkeiten der Retention auf dem Festphasenmaterial zur Verfügung. Die erste besteht darin, das Molekül im sauren pH-Bereich auf einer Ionenaustauschersäule oder einer Mischphase zu binden und von dieser im Alkalischen zu lösen.^[109] Daraus ergeben sich Nachteile, die eine weitere Bearbeitung der Probe nötig machen. Bei Verwendung von nicht flüchtigen Puffern zum Eluieren erhält man die Probe in einer für die LC-MS/MS ungeeigneten Matrix. Und bei Verwendung flüchtiger Puffer muß die Probe anschließend angesäuert werden, um sie mit der Elektrospray-Quelle im positiven Modus optimal zu ionisieren. Dabei kommt es unweigerlich zu einer hohen Gesamtionenkonzentration, welche die Ionisierung wiederum nachteilig beeinflussen kann.

Als zweite Möglichkeit kann Haloperidol auf einer Umkehrphase gehalten werden und mit organischen Lösungsmitteln eluiert werden. Die entstehende Probe kann direkt oder nach Eindampfen und erneutem Lösen verwendet werden.^[98,100] Die Einstellung der Ionenstärke und die Zusammensetzung der Phasen in der die Probe für die Injektion gelöst ist, können dabei leichter kontrolliert werden.

Die Aufarbeitung wurde mittels Festphasenextraktion in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Erste Versuche mit Haloperidol in wäßriger Matrix zeigten eine ausreichende Retention auf Umkehrphasenmaterialien. Plasma wurde mit Haloperidol versetzt (5 ng/ml) und die Aufarbeitung sowohl mit C₂- als auch mit C₈-Materialien getestet (beide Materialien 3M Empore[®]).

Die Plasmaproben wurden geschüttelt und für 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) zentrifugiert. 500 µl jeder Probe wurden mit 300 µl interner Standardlösung (7.5 ng/ml Loratadin) versetzt und 10 Sekunden geschüttelt.

Die Festphasenmaterialien wurden mit 2 x 100 µl Acetonitril und 2 x 100 µl Milli-Q[®]-Wasser aktiviert, dabei wurde darauf geachtet, daß die Festphasenmaterialien durch das angelegte Vakuum nicht trocken gesaugt wurden. Die Probe wurde auf die Festphase aufgebracht und durch Anlegen eines Vakuums hindurchgesaugt. Die Festphase wurde mit 500 µl 0.1 % Trifluoressigsäure in Milli-Q[®]-Wasser, dann mit 1000 µl Milli-Q[®]-Wasser und zuletzt mit 500 µl 10 % Acetonitril in Milli-Q[®]-Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Festphase durch Anlegen des Vakuums für zwei Minuten trocken gezogen. Die Proben wurden mit 500 µl 0.75 % Trifluoressigsäure in Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde bei 40 °C im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 200 µl mobiler Phase aufgenommen. Die Proben wurden in 0.5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und mit der Biofuge B für fünf Minuten bei 11000 U/min (3000 g) zentrifugiert. 90 µl des Überstands wurden in ein weiteres 0.5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und 50 µl mit dem Probengeber injiziert.

Die absoluten Peakflächen mit dem C₈-Material lagen um einen Faktor vier höher als die des C₂-Materials. Ein weiterer Versuch mit C₁₈-Material ergab keinen Gewinn an Empfindlichkeit. Für die Methode wurde das C₈-Material verwendet. Die Menge an einzusetzendem Plasma war mit 500 µl erschöpft und konnte nicht weiter erhöht werden.

6.2.4 Prüfung auf Validität der Methode

Zur Untersuchung der Stabilität des Systems wurden 30 Proben mit einer Konzentration von 2.00 ng/ml (Poolproben) injiziert. Der Variationskoeffizient der Peakflächen von Haloperidol betrug 3.1 % mit einer maximalen Differenz zwischen der größten und der kleinsten Fläche von 14.7 %. Für Loratadin lag der Variationskoeffizient bei 2.6 % mit einer maximalen Differenz von 13.1 %. Der Variationskoeffizient der Peakflächenverhältnisse betrug 3.3 % mit einer maximalen Differenz von 14.6 %. Ein Trend in den absoluten Flächen war nicht zu verzeichnen.

Im folgenden wurde die Robustheit des gesamten Systems überprüft. Dazu wurden 3 Kalibriergeraden (CR) und 5 Sätze Qualitätskontrollproben (QC) aus den unter 6.1 aufgeführten Stammlösungen hergestellt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß nach einer möglichen höheren Dosierung bei anderen Studien die Plasmakonzentrationen bis in einen mittleren Nanogramm-Bereich gemessen werden können.

Die theoretischen Konzentrationen für die Kalibriergerade betragen: 49.7, 39.8, 29.9, 19.8, 1.95, 0.477, 0.189, 0.142, 0.0951, 0.0710, 0.0472 ng/ml.

Die theoretischen Konzentrationen für die Qualitätskontrollproben betragen: 36.4, 10.8, 3.60, 0.175, 0.0874 ng/ml.

Die frisch hergestellten Proben wurden wie unter 6.2.3 beschrieben aufgearbeitet.

Insgesamt wurden 64 Proben gemessen. Die Auswertung wurde sowohl unter Berücksichtigung aller Kalibrierstandards durchgeführt (dynamischer Bereich 0.472–49.7 ng/ml), als auch mit den unteren 8 Kalibrierstandards (dynamischer Bereich 0.472–19.8 ng/ml). Jede Kalibriergerade wurde einzeln mittels gewichteter linearer Regression (Wichtungsfaktor 1/Konzentration) erstellt, und die Qualitätskontrollproben mit Hilfe der drei Kalibriergeraden ausgewertet. Es zeigte sich für beide Konzentrationsbereiche ein linearer Bereich. Bei Verwendung aller Kalibrierstandards lag die Standardabweichung für den kleinsten Kalibrierstandard bei 11.2 % mit einem Variationskoeffizienten von 11.3 %. Hingegen lag die Standardabweichung für den kleinsten Kalibrierstandard bei Verwendung der unteren 8 Kalibrierstandards bei nur 6.4 % mit einem Variationskoeffizienten von 6.3 %. Da für die Messung der Studienproben keine Konzentrationen über 10 ng/ml zu erwarten waren, wurde der Robustheitstest nur über die unteren 8 Kalibrierstandards und die unteren vier Qualitätskontrollproben ausgewertet.

Die Richtigkeit zeigte sich für die Kalibriergeraden anhand der maximalen Abweichungen von - 2.5 % bis 5.0 % und - 4.9 % bis 3.9 % für die Qualitätskontrollproben. Die Standardabweichung für die Qualitätskontrollproben lagen zwischen 3.1 % und 7.1 % mit Variationskoeffizienten zwischen 3.0 % und 7.4 %. Die Genauigkeit der Proben war bei den unter 2.5 gegebenen Akzeptanzkriterien vorhanden.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 13 , womit die Akzeptanzkriterien für die Bestimmungsgrenze erfüllt wurden. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.999 , somit wurden die Akzeptanzkriterien für die Linearität des dynamischen Bereichs (0.0472 ng/ml – 19.8 ng/ml) erfüllt.

Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurden Leerplasmen von sechs verschiedenen Männern und Frauen getestet. Das Plasma wurde jeweils mit und ohne internem Standard aufgearbeitet. Eine Störung zu einer der Retentionszeiten von Haloperidol oder Loratadin konnte nicht festgestellt werden.

Die erhaltenen Daten wurden für valide erachtet und mit der Messung der Studienproben begonnen.

6.3 Studie

6.3.1 Studiendesign und Probanden

Es wurden zwei Formulierungen von Haloperidol-Decanoat intramuskulär injiziert. Formulierung A bestand aus 0.5 ml einer 35.26 mg Haloperidol-Decanoat (äquivalent zu 25 mg Haloperidol) enthaltenden Lösung. Formulierung B bestand aus 1.0 ml einer 70.52 mg Haloperidol-Decanoat (äquivalent zu 50 mg Haloperidol) enthaltenden Lösung. Die Formulierungen A und B wurden insgesamt an acht Patienten (7 männlich, 1 weiblich) verabreicht. Die demographischen Daten der Patienten gehen aus der Tabelle 40 hervor.

Geschlecht	männlich	weiblich
Alter	24 ± 4 Jahre	
Gewicht	74.7 ± 10.4 kg	71.0 kg
Größe	176.3 ± 4.5 cm	173.0 cm

Tabelle 40: Demographische Daten der an der Haloperidolstudie teilgenommen Patienten.

Die Blutabnahme erfolgte zu den folgenden Zeitpunkten:

Direkt vor der Gabe und nach 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 Stunden, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24 Tagen, sowie nach 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 Wochen.

Die Anzahl der Blutproben betrug 37 pro Patient während der Studie.

Die Blutentnahme erfolgte mit einem Katheter, der in die Vene des Unterarms gelegt wurde. Die Blutproben wurden in heparinierten Primavetten[®] gesammelt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 7 ml entnommen, wobei die Gesamtmenge an entnommenem Blut 309 ml nicht überschritt. Die Blutproben wurden vorsichtig in der Primavette[®] geschwenkt und bei 3.600 U/min (3280 g) 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde in zwei Mikro-Schraubgefäße abgefüllt und sofort bei < -18 °C eingefroren. Die Plasma-proben wurden bei < -18 °C vom Studienort zum Analyselabor transportiert und dort unter gleichen Bedingungen bis zum Beginn der Aufarbeitung gelagert.

Nach Messung der Proben wurden folgende pharmakokinetischen Parameter bestimmt:

C_{\max} , $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, t_{\max} , Restfläche (%) und $t_{1/2}$

6.3.2 Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben

Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden unter Verwendung der unter 6.1 genannten Stammlösungen und nach dem Pipettierschema aus Tabelle 41 hergestellt.

Anschließend wurden die Proben bei ≤ -18 °C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Konzentration Haloperidol (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrierstandard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipetiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitätskontrollprobe (ml)	Pipetiertes Volumen an Leermatrix (ml)
2500	LV	HAL-SL-CR	0.050	9.950
10.0	L1	LV	0.020	4.980
8.00	L2	L1	3.000	0.750
5.00	L3	L2	2.000	1.200
2.00	L4	L3	1.500	2.250
1.00	L5	L4	2.100	2.100
0.750	L6	L5	2.700	0.900
0.500	L7	L6	2.000	1.000
0.250	L8	L7	1.500	1.500
0.100	L9	L8	1.500	2.250
0.750	L10	L9	2.100	0.700
0.0500	L11	L10	1.000	0.500
2000	OCV	HAL-SL-OC	0.050	9.950
8.00	OC1	OCV	0.020	4.980
2.00	OC2	OC1	1.000	3.000
0.500	OC3	OC2	1.000	3.000
0.125	OC4	OC3	0.750	2.250

Tabelle 41: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

6.3.3 Ergebnisse und Diskussion der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben während der Studie

Die Studienproben wurden nach Patienten in insgesamt vier Sequenzen gemessen. Jede Sequenz enthielt neben der Kalibriergeraden zwei Sätze an Qualitätskontrollproben. Die Tabelle 42 zeigt die statistische Auswertung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben während der Studie.

Qualitätskontrollprobe bzw. Kalibrierstandard	Theoretische Konzentration an Haloperidol (ng/ml)	Anzahl der Proben	Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)
L1	9.99	2	104.5	7.7	7.3
L2	7.99	4	98.2	5.5	5.6
L3	5.33	4	101.0	2.1	2.1
L4	2.66	4	96.0	5.6	5.8
L5	1.33	4	99.4	8.7	8.8
L6	0.666	3	95.1	1.3	1.3
L7	0.444	4	98.4	6.6	6.7
L8	0.222	4	94.0	6.4	6.8
L9	0.0888	3	100.2	4.8	4.8
L10	0.0666	3	108.6	2.9	2.6
L11	0.0444	4	107.7	10.8	10.0
QC 1	8.03	8	104.7	7.4	7.1
QC 2	1.61	8	101.3	9.0	8.9
QC 3	0.402	8	107.5	10.7	10.0
QC 4	0.121	7	113.1	12.7	11.3

Tabelle 42: Statistische Auswertung der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben von Haloperidol während der Studie.

Insgesamt wurden 380 Proben gemessen, von denen 296 Probandenproben waren. Die Selektivität der Methode konnte anhand der Plasmaproben, die vor der Gabe entnommen wurden, durch Abwesenheit von Störungen zu den Retentionszeiten von Haloperidol und Loratadin gezeigt werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 15 und bestätigt den bei den Vorversuchen erhaltenen Wert. Die Kalibriergeraden erfüllten, die unter 2.5 gestellten Anforderungen für eine Validierung, sowie für die Studie. Es wurden in keiner Kalibriergeraden mehr als zwei Kalibrierpunkte herausgelassen.

Wurde der kleinste Kalibrierstandard aus der Kalibriergeraden herausgelassen, so erhöhte sich das Quantifizierungslimit und alle Proben, die unterhalb des dadurch entstehenden Quantifizierungslimits lagen, wurden erneut gemessen, da diese innerhalb des Bereichs zwischen dem regulären Quantifizierungslimit und dem erhöhten Quantifizierungslimit liegen konnten. Dies war jedoch nicht der Fall, und auch bei den Kalibriergeraden, bei denen der größte Kalibrierstandard nicht verwendet wurde, lagen keine Werte oberhalb des entstehenden Quantifizierungslimits. Eine zweite Messung von Proben wurde daher nicht

notwendig. Die Genauigkeit der Kontrollproben lag innerhalb der gesetzten Kriterien, und die Variationskoeffizienten lagen mit 7.1 % bis 11.3 % in einem akzeptablen Bereich.

6.3.4 Pharmakokinetische Ergebnisse und Diskussion der Haloperidolstudie

Von den zu bestimmenden 296 Proben konnten 225 quantifiziert werden. Die restlichen Proben waren unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0.0444 ng/ml. Die kleinste quantifizierbare Probe wurde zu 0.0445 ng/ml bestimmt. Aus der Graphik in Abbildung 43 ist zu ersehen, daß nur die Werte zwischen dem 48 und dem 1680 Stundenwert der Formulierung A für einen Mittelwert herangezogen werden konnten. Hingegen konnten für die Formulierung B die Werte von 12 bis 2352 Stunden zur Auswertung verwendet werden. Die höchste gemessene Probe wurde zu 3.46 ng/ml bestimmt.

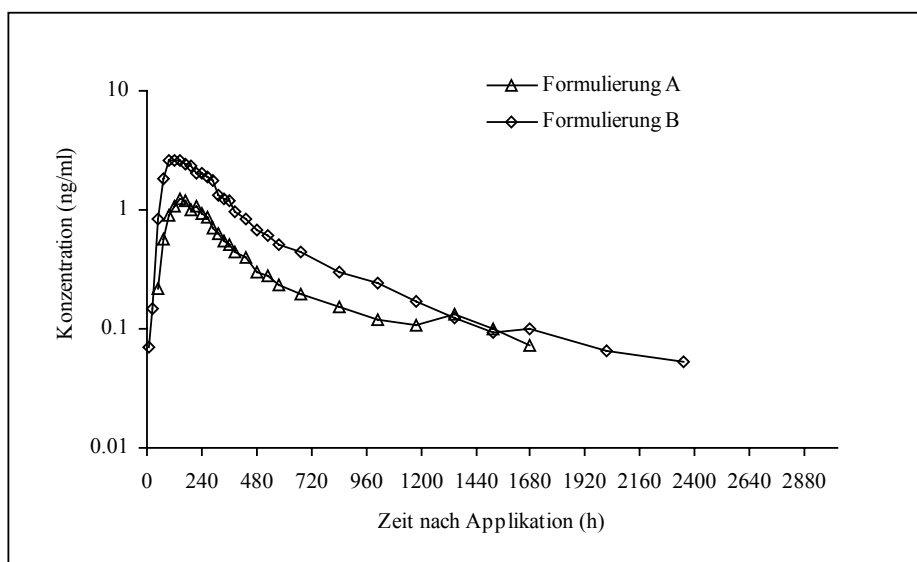


Abbildung 43: Halblogarithmische graphische Darstellung der Haloperidolkonzentrationen der Formulierungen A und B in Humanplasma.

Anhand der Graphiken (Abbildungen 44 und 45) zeigen sich die individuellen Schwankungen in den Plasmakonzentrationen der einzelnen Probanden. Diese sind bei der Formulierung A ausgeprägter als bei der Formulierung B.

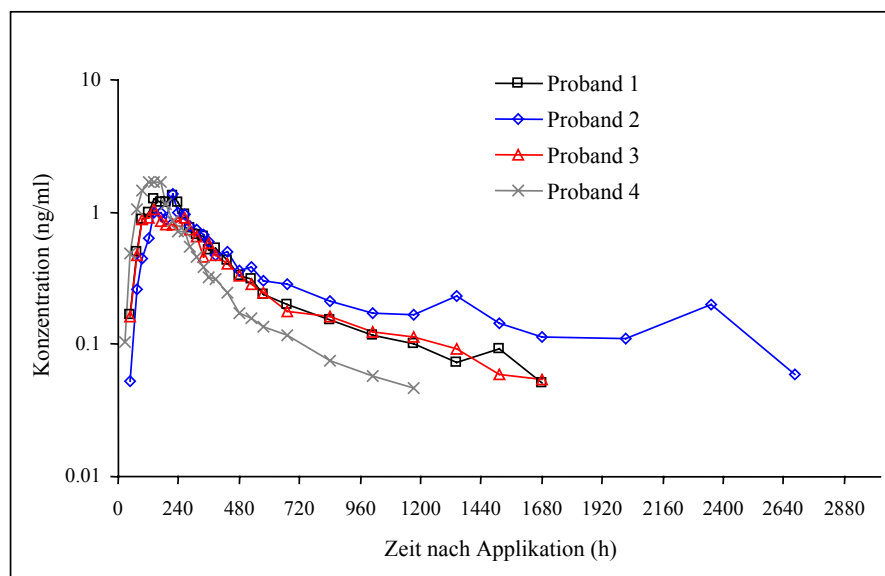


Abbildung 44: Halblogarithmische graphische Darstellung der Haloperidolkonzentrationen der einzelnen Probanden der Formulierung A in Humanplasma.

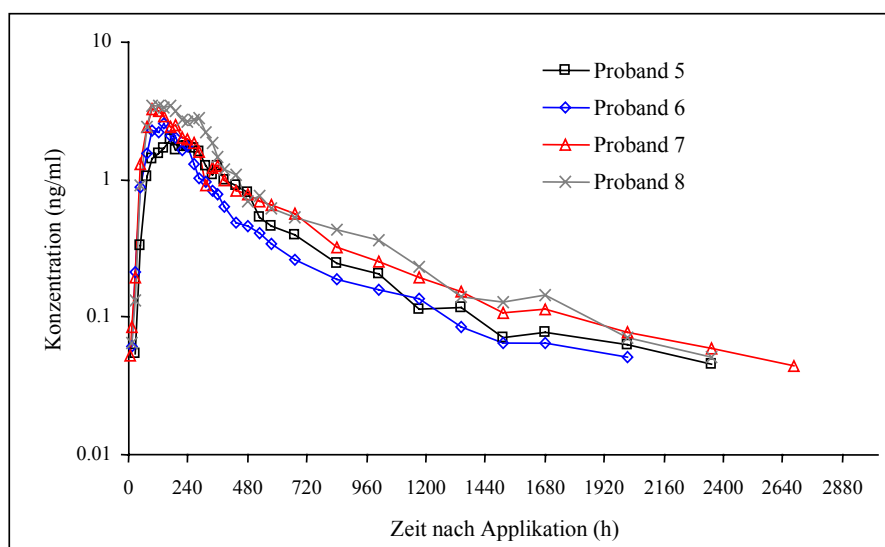


Abbildung 45: Halblogarithmische graphische Darstellung der Haloperidolkonzentrationen der einzelnen Probanden der Formulierung B in Humanplasma.

Besonders der Proband 2 zeigt einen abweichenden Trend mit einer deutlich höheren Halbwertszeit als die anderen Probanden. Dieser Umstand spiegelt sich auch in den pharmakokinetischen Daten der einzelnen Probanden wider. Der Wert für die Halbwertszeit des Probanden 2 liegt ca. doppelt so hoch wie der der anderen Probanden. Die weiteren Daten der einzelnen Probanden gehen aus Tabellen 43 und 44 hervor.

Proband	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	AUC _{0->last} (ng•h/ml)	AUC _{0->∞} (ng•h/ml)	Restfläche (%)	t _{1/2} (h)
1	1.34	216	504	545	7.5	553
2	1.39	216	684	794	13.8	1270
3	1.04	144	447	486	8.0	505
4	1.69	168	407	433	6.0	380
Mittelwert	1.36	186	511	565	8.85	677
s	0.265	36	122	160	3.4	402
CV (%)	19.4	19.4	24.0	28.3	38.8	59.4
Minimum	1.04	144	407	433	6.00	380
Maximum	1.69	216	684	794	13.8	1270

Tabelle 43: Pharmakokinetische Daten von Proband 1-4 der Formulierung A.

Proband	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	AUC _{0->last} (ng•h/ml)	AUC _{0->∞} (ng•h/ml)	Restfläche (%)	t _{1/2} (h)
5	1.95	168	883	930	5.1	530
6	2.59	144	808	851	5.1	591
7	3.27	96	1211	1263	4.1	799
8	3.46	96	1445	1489	2.9	587
Mittelwert	2.82	126	1087	1133	4.29	627
s	0.690	36	296	297	1.0	118
CV (%)	24.5	28.6	27.3	26.2	23.8	18.8
Minimum	1.95	96	808	851	2.93	530
Maximum	3.46	168	1445	1489	5.1	799

Tabelle 44: Pharmakokinetische Daten von Proband 5-8 der Formulierung B.

Die Daten zeigen ein t_{max} bei der Formulierung A bei 186 Stunden entsprechend 7.75 Tagen. Hingegen liegt das Maximum bei der Formulierung B früher bei 5.25 Tagen. Diese Werte liegen in den genannten Bereichen für die Maximalkonzentrationen von intramuskulär injiziertem Haloperidol-Decanoat. Unterschiede zeigen sich auch bei den Maximalkonzentrationen. Entsprechend der Dosierung liegt das Maximum der Formulierung B im Mittel ca. doppelt so hoch wie das der Formulierung A, was einer linearen Abhängigkeit zwischen Dosierung und Plasmakonzentration entspricht. Zusätzlich ist bei t_{max} eine Gruppierung der jeweils ersten und letzten beiden Probanden pro Formulierung zu erkennen, die Unterschiede betragen bei der Formulierung A ca. 40 % und bei Formulierung B ca. 60 %. Bei diesen Ergebnissen muß berücksichtigt werden, daß ihnen nur Werte von je vier Probanden pro Formulierung zu Grunde liegen. Nimmt man die einzelnen Werte, so zeigt sich die bereits angesprochene hohe interindividuelle

Schwankung. Proband 4 hat bei den genannten Parametern t_{\max} und C_{\max} nahezu die gleichen Werte des Probanden 5. Geringer fallen die Schwankungen bei den berechneten Flächen aus. Hier ist sowohl im Mittel als auch bei den individuellen Werten der Unterschied zwischen den beiden Formulierungen klarer zu erkennen. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen den Formulierungen.

Bei der intramuskulären Gabe von Haloperidol-Decanoat sind die erhaltenen Werte nach einem Monat von besonderem Interesse, da die Injektionen in diesen Abständen gegeben werden. Die Werte für die Haloperidolkonzentrationen nach 28 Tagen liegen für die Formulierung A bei 0.197 ng/ml und für die Formulierung B bei 0.438 ng/ml. Auch hier zeigt sich etwa ein doppelter Wert für die Formulierung B gegenüber der Formulierung A. Bei Betrachtung der Halbwertszeiten wird deutlich, daß diese sich in einem gleichen Rahmen bewegen. Die hohen Werte von über 624 Stunden oder 26 Tagen entsprechen dem Modell von der Freisetzung des Decanoats aus dem Gewebe als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.^[110] Die hier als terminale Halbwertszeit bezeichnete Größe gibt Auskunft über die Resorption des Wirkstoffes und nicht, wie üblich, über die Elimination. Dieser Fall wird auch als Flip-Flop-Fall bezeichnet, in dem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Resorption des Wirkstoffs ist und nicht seine Elimination (Eliminationsgeschwindigkeitskonstante > Resorptionsgeschwindigkeitskonstante).

Die Variationskoeffizienten zeigen die größeren Streuungen der Formulierung A, welche wie schon angesprochen hauptsächlich auf den Probanden 2 zurückzuführen sind.

Der Vergleich der $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ ergibt wieder den Faktor zwei zwischen den Formulierungen. Die erhalten Restflächen zu der $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ zeigen mit Werten von 4.29 % für die Formulierung B und 8.85 % für die Formulierung A an, daß, obwohl nur ca. 80 % der Proben quantifiziert werden konnten, die Bestimmungsgrenze ausreichend war.

6.4 Zusammenfassung und Diskussion der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Haloperidol in Humanplasma

Zur Bestimmung von Haloperidol nach intramuskulärer Injektion von Haloperidol-Decanoat mußte eine Methode entwickelt werden, die sehr geringe Mengen an Haloperidol quantitativ im Plasma nachweisen kann. Dazu wurde eine Konzentrierung des Analyten unumgänglich. Anstelle einer Flüssig-Flüssig-Extraktion, die einen hohen Aufwand an Personal und Lösungsmitteln bedeutet, konnte die Konzentrierung mit einer Festphasen-

extraktion in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Eine Sequenz enthielt 95 Proben und lastete eine Festphasenplatte nahezu voll aus. Mit einem C₈-Material konnte eine ausreichende Retention erhalten werden. Der Verbrauch an Lösungsmitteln für eine Probe lag bei 750 µl Acetonitril und 2150 µl Milli-Q[®]-Wasser. Diese Werte entsprechen denen von Hempenius *et al.*^[98], in deren Methode 1275 µl Methanol und 1225 µl Milli-Q[®]-Wasser verwendet wurde. Die Zusätze an Feststoffen und organischen Säuren bzw. Basen sind in beiden Fällen zu vernachlässigen. Hingegen verwendeten Hoja *et al.*^[99] und Walter *et al.*^[104] bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen mehr als 14 ml organische Lösungsmittel pro Probe.

Mit dem zur Verfügung stehenden Volumen an Plasma (500 µl) konnte eine Bestimmungsgrenze von 50 pg/ml erreicht werden. Diese entspricht den 100 pg/ml von Hempenius *et al.*^[98], die 250 µl Plasma und als Detektor ein Massenspektrometer im SRM-Modus eingesetzt haben.

Eine weitere Verringerung der Bestimmungsgrenze der entwickelten Methode könnte durch die Erhöhung des Plasmavolumens erreicht werden. Bei einer Verdoppelung des Plasmavolumens und der Lösung des eingedampften Eluats in 100 µl Fließmittel anstelle von 200 µl kann ein theoretischer Faktor von 4 gewonnen werden. Zu berücksichtigen ist dabei die Matrix, die bei einer größeren Menge an Plasma ebenfalls konzentriert wird und die Probe höher belastet. Diese Matrixbelastung könnten sich negativ bei der Messung der Proben auswirken (Verlust der Peaksymmetrie oder eine Abnahme der Ionenausbeute in der Quelle).

Ist die Erhöhung des Plasmavolumens ausgeschlossen, könnte der Einsatz von Säulen mit einem geringeren Säulendurchmesser eine Verringerung der Bestimmungsgrenze bewirken. Die sich daraus ergebenden Probleme in Bezug auf die Haltbarkeit der Säule wurde in Kapitel 2.1 bereits angesprochen. Eine Abwägung von der Notwendigkeit geringere Konzentrationen als 50 pg/ml zu messen und den daraus entstehenden Aufwand muß anhand der Aufgabenstellung getroffen werden. Nicht zuletzt wurde Haloperidol an einem API III Plus gemessen. Mit dem API 3000 steht ein Gerät neuerer Generation zu Verfügung, mit dem ein Gewinn an Empfindlichkeit zu erwarten ist.

Um eine höhere Präzision zu erhalten, kann als interner Standard eine Substanz verwendet werden, die dem Haloperidol näher kommt als es Loratadin ist. Optimal wäre ein Isotopenstandard (D_4 -Haloperidol) wie er von Hempenius *et al.*^[98] verwendet wurde. Jedoch zeigt sich auch unter Verwendung dieses Isotopenstandards ein Variationskoeffizient von 13.7 % an der Bestimmungsgrenze von 100 pg/ml.

Der Variationskoeffizient, der in dieser Arbeit entwickelten Methode liegt für 121 pg/ml bei 11.3 % und ist vergleichbar dem von Hempenius *et al.*^[98] erhaltenem. Die Wahl von Loratadin als interner Standard kann anhand dieser Werte als geeignet bezeichnet werden.

Die entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Haloperidol in Humanplasma eignet sich, um bei Einsatz von 500 μ l Plasma die Haloperidolkonzentrationen in einem dynamischen Meßbereich von 45.0 pg/ml bis 10.0 ng/ml zu bestimmen. Darüber hinaus kann der Meßbereich zu einer oberen Grenze von 50.0 ng/ml erweitert werden. Die Methode ist der HPLC-UV-Methode mit dem effektivsten Quotienten aus Plasmamenge und Quantifizierungslimit von Walter *et al.*^[104] um einen Faktor 12 überlegen. Absolut ist der Faktor sechs bezogen auf das Quantifizierungslimit. Die Abbildung 46 zeigt als Vergleich die Haloperidolkonzentrationen der Formulierung B, wenn diese unter optimalen Bedingungen von Walter *et al.*^[104] bestimmt worden wären. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Menge der zu bestimmenden Zeitpunkte nicht ausreichend ist, um eine Extrapolation der Restflächen vorzunehmen, wobei die Differenz der Restfläche zur Fläche bis zum letzten Zeitpunkt kleiner 20 % beträgt. Noch einmal geringer wären die zu bestimmenden Zeitpunkte geht man davon aus, daß in beiden Fällen maximal 500 μ l Plasma einzusetzen sind. Im Fall der Formulierung A könnten unter diesen Annahmen nur die Werte zwischen dem fünften und elften Tag bestimmt werden, wohingegen mit der vorgestellten Methode die Werte bis 70 Tage nach Applikation bestimmt wurden.

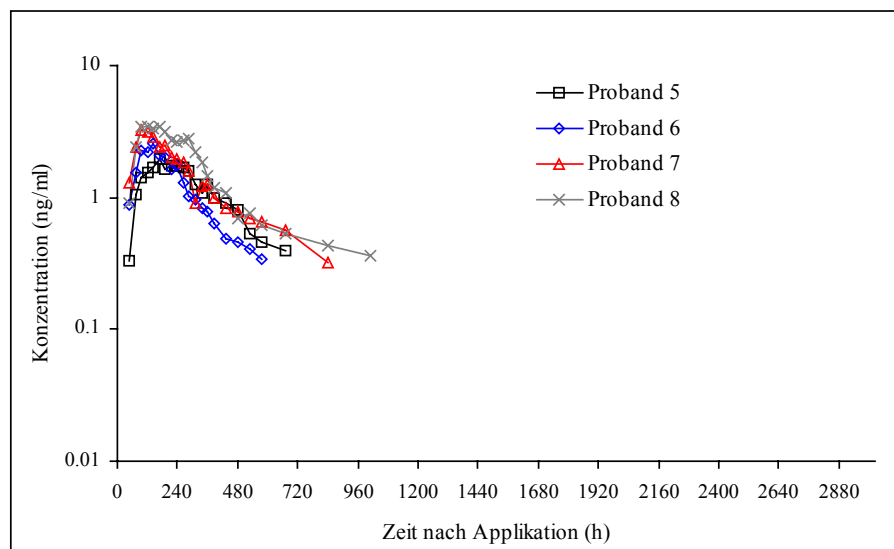


Abbildung 46: Halblogarithmische graphische Darstellung der Haloperidolkonzentrationen der einzelnen Probanden der Formulierung B in Humanplasma unter Annahme der optimalen Bedingungen von Walter *et al.*^[104]

Darüber hinaus konnte eine hohe Probenanzahl mit geringem Lösungsmittelverbrauch durch den Einsatz einer Festphasenextraktion bei guter Präzision erhalten werden. Die Messung der Studienproben zeigt eine ausreichende Bestimmungsgrenze für die in der Studie gegebenen Medikationen. Dennoch konnten nur ca. 80 % der Proben quantifiziert werden. Bei einer weiteren Reduzierung der Medikation ist die Senkung der Bestimmungsgrenze, wie oben besprochen, abzuwägen.

Wie bereits unter 6.3.4 angesprochen konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen den beiden Formulierungen A und B gefunden werden. Die Mittelwerte täuschen jedoch über die hohen individuellen Schwankungen hinweg. So bilden sich bei den 8 Probanden vier Zweierpärchen (1 und 2; 3 und 4; 5 und 6 sowie 7 und 8). Dies wird deutlich bei t_{\max} , aber auch bei den Flächen ist die Paarbildung zu erkennen. Auffällig dabei ist, daß die t_{\max} -Werte der Probanden 3 und 4 (Formulierung A) mit denen der Probanden 5 und 6 (Formulierung B) identisch sind. Die Eliminierung des Wirkstoffes erfolgt ab diesem Zeitpunkt schneller als die Freisetzung. Zieht man in Betracht, daß bei der Formulierung B die doppelte Menge Haloperidol-Decanoat appliziert wurde, so muß ebenso ein Faktor von zwei zwischen den Geschwindigkeitskonstanten (Absorption oder Eliminierung) bei diesen Paaren vorhanden sein. Die Flächen und auch die Maximalkonzentrationen hingegen zeigen

deutlich die Applikation der doppelten Menge des Wirkstoffes auf. Relativ konstant zeigen sich auch die Halbwertszeiten mit ca. 4 Wochen.

Wie bereits angesprochen sind die Haloperidolkonzentrationen nach 1 Monat von Bedeutung. Wie in der Beschreibung des Haloperidol-Decanoats am Anfang dieses Kapitels erwähnt, liegt der Literaturwert nach intramuskulärer Applikation von 100 mg Haloperidol nach 4 Wochen bei 2 ng/ml. Die gefundenen Werte von 0.438 ng/ml (Applikation von 50 mg) und 0.197 ng/ml (Applikation von 25 mg) liegen somit ca. einen Faktor zwei unter dem Literaturwert. Eine abschließende Beurteilung, ob die Linearität zwischen Dosis und Haloperidolwert nach 4 Wochen bis zur Applikation von 100 mg gegeben ist, konnte anhand der erhobenen Daten nicht getroffen werden. Eine Bestätigung der ermittelten Parameter durch eine höhere Anzahl an Probanden wäre in diesem Zusammenhang wünschenswert.

7 Linezolid

Oxazolidinone sind eine neue Klasse antibakteriell wirksamer Substanzen, die grampositive Erreger abtöten können. Dabei zeigen sie Wirkung gegen Organismen, die bereits Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika entwickelt haben.^[111,112] Sie hemmen die bakterielle Proteinsynthese durch Bindung an die ribosomale 50 S-Untereinheit. Dadurch wird für *N*-Formylmethionin-transfer RNS die Bindungsstelle blockiert und der 70 S-Initialkomplex kann nicht ausgebildet werden.^[113,114,115] Aufgrund dieses bisher einzigartigen Wirkmechanismus bei humanmedizinisch verwendeten Chemotherapeutika sind keine Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotika bekannt. Nachdem sich die Toxizität von DuP721 herausstellte, wurden Versuche mit analogen Wirkstoffen durchgeführt. Linezolid (LZD) ist als erster Vertreter dieser Klasse in der Humanmedizin zum Einsatz gekommen. Phase-II-Studien zeigten eine gute Verträglichkeit und akzeptable Sicherheit für die Patienten.^[116]

Chemie

Linezolid, (S)-*N*-{{3-{3-Fluoro-4-(4morpholinyl)phenyl}-2-oxo-5-oxazolidinyl}methyl}acetamid ist ein weißes bis cremefarbenes, kristallines Pulver. Seine Kristallform verändert sich bei 155 °C und es schmilzt bei 179 °C. Die Aufbewahrung der Kristallform bei Raumtemperatur ist unproblematisch. Linezolid löst sich in Wasser zu 3.2 µg/l bei pH 6.8. Die Anwesenheit von 100 mmol/l Puffer senkt diesen Wert auf 2.9 µg/l (pH 5.0). Zwischen pH 9.0 und pH 5.0 ist die Löslichkeit unabhängig vom pH-Wert. Unterhalb pH 3.0 steigt die Löslichkeit an. Temperaturerhöhung führt zu erhöhter Löslichkeit. Wäßrige Lösungen sind zwischen pH-Werten von 3.0 – 7.0 bei Raumtemperatur stabil. Abbildung 47 zeigt die Struktur von Linezolid.

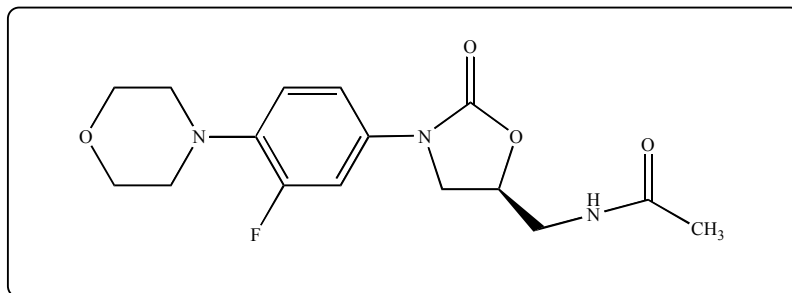


Abbildung 47: Linezolid (C₁₆H₂₀FN₃O₄, Mw: 337.35 g/mol).

Die Messung des Verteilungskoeffizienten ($\log P$ 0.55) zwischen n-Octanol und Wasser ist in einem pH Bereich von 5.0 – 9.0 unabhängig und nimmt unterhalb pH 3.0 ab. Linezolid ist mit einem pK_a -Wert von 1.8 eine schwache Base und liegt im Plasma und Urin ungeladen vor.

Pharmakokinetische Daten

Bei oraler Gabe wird Linezolid schnell und komplett absorbiert. Seine mittlere absolute Bioverfügbarkeit beträgt 103 %^[117] und die Maximalkonzentrationen treten 1 bis 2 Stunden nach der Applikation auf. Nahrungsaufnahme beeinflusst die Resorption nicht signifikant, die Geschwindigkeit der Resorption ist jedoch verzögert.^[118] Die Maximalkonzentrationen bei Einfach- und Mehrfachgabe steigen linear mit der Dosierung an. Die Halbwertszeit wurde von Stalker *et al.*^[117] mit 5.5 Stunden angegeben und ist dosisunabhängig. Bei intravenöser Gabe reduziert sich diese auf 4.5 Stunden.^[119] Die Proteinbindung wird mit 31 % angegeben.

Die C_{\min} -Werte nach multipler Gabe (i.v.) von 500 mg und 625 mg Linezolid (Dosierungsintervall 12 Stunden) liegen bei 3.51 und 3.84 $\mu\text{g/ml}$ und damit nahe dem MHK_{90} -Wert (4 $\mu\text{g/ml}$) von Staphylokokken.^[120]

Die Linezolidkonzentrationen lagen dabei 9-10 Stunden über dem Wert von 4 $\mu\text{g/ml}$.

Sisson *et al.*^[121] testeten die einmalige orale Gabe von 600 mg Linezolid an unterschiedlichen Altersgruppen und Geschlechtern. Ihre erhaltenen pharmakokinetischen Daten finden sich in Tabelle 45 wieder.

Parameter	männlich, jung	männlich, alt	weiblich, jung	weiblich, alt
Anzahl (n)	8	6	7	8
Alter (Jahre)	30 ± 7	70 ± 3	30 ± 6	70 ± 3
C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	12 ± 2	12 ± 3	16 ± 1	16 ± 2
T_{\max} (h)	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.7
$T_{1/2}$ (h)	5.3 ± 1.7	4.6 ± 1.3	4.8 ± 1.5	5.3 ± 2.2

Tabelle 45: Pharmakokinetische Parameter (Mittelwert ± s) nach Gabe von 600 mg Linezolid (oral) nach Sisson *et al.*^[121]

Linezolid wird hauptsächlich auf renalem Wege eliminiert. Die Ausscheidung wurde durch radioaktives Linezolid zu 92-95 % bestimmt. Davon wurde der größte Teil innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden (Halbwertszeit 5-7 Stunden). 80-85 % finden sich im Urin und

7-12 % in Fäzes wieder. Die Wiederfindungsraten sind unterschiedlich bei Männern und Frauen. Neben Linezolid finden sich zwei Hauptmetaboliten im Urin wieder, deren Ausscheidungsraten in Tabelle 46 dargestellt ist.^[122]

Substanz	Ausscheidungsrate männlich (%)	Ausscheidungsrate weiblich (%)
LZD	31	58
PNU-142586	36	16
PNU-142300	9	7

Tabelle 46: Ausscheidungsraten männlicher und weiblicher Probanden von Linezolid und seiner Hauptmetaboliten über den Urin nach einmaliger oraler Gabe von 500 mg.

Die Strukturen der beiden Hauptmetaboliten gehen aus der Abbildung 48 hervor. Beide enthalten eine Carbonsäurefunktion, die durch Oxidation des Morpholin-Rings entsteht.^[123] Sie haben eine geringere antibakterielle Wirksamkeit als die Muttersubstanz. In Fäzes finden sich hauptsächlich die Metaboliten wieder.^[124]

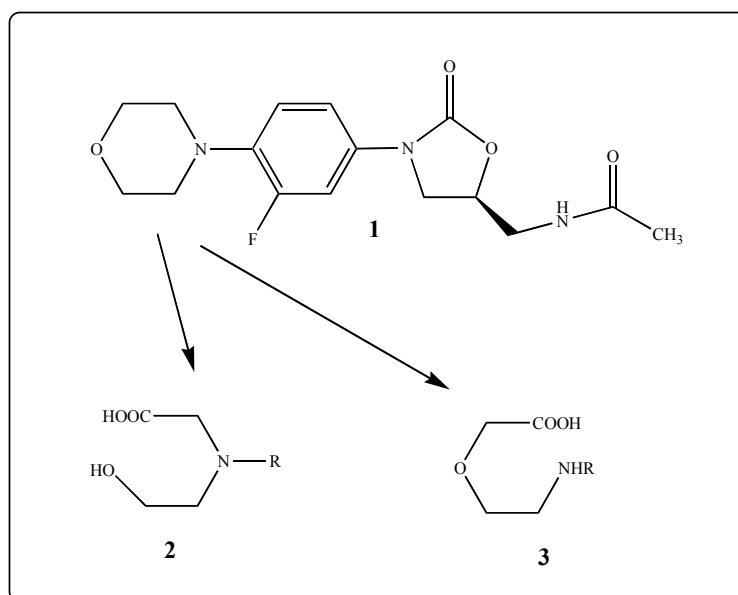


Abbildung 48: Linezolid (1) und die beiden Hauptmetaboliten PNU-142586 (2) und PNU-142300 (3).

Die Clearance (CL) wird dabei von Diekema und Jones^[119] mit 100 – 200 ml/min angegeben, wobei die renale Clearance (CL_R) mit 30 – 50 ml/min und die nicht-renale Clearance (CL_{nR}) mit 70 - 150 ml/min angegeben wird. Das sich ergebende Verteilungsvolumen (V_{SS}) geben Diekema und Jones^[119] mit 40 – 50 l an. Diese Werte werden von

Sisson *et al.*^[121] bestätigt. Hier wurde die Clearance zu 121 ± 34 ml/min und das Verteilungsvolumen zu 42.3 ± 6.7 l bestimmt.

Zielsetzung

Nach oraler Applikation von 600 mg Linezolid (Filmtablette) soll Linezolid mit einer LC-MS/MS-Methode im Plasma und Urin bestimmt werden. Die Plasmakonzentrationen sollen bis 24 Stunden und die Urinkonzentrationen bis 120 Stunden nach der Applikation bestimmt werden. Bestimmungsmethoden mit einfachen UV-Detektoren^[121] bedurften bislang aufwendigen und dadurch teuren Probenvorbereitungen und hatten zusätzlich verhältnismäßig lange Laufzeiten. Diese Probleme sollten durch den spezifischen Detektor und durch Einsatz kurzer Säulen umgangen werden. Eine einfache und günstige Aufarbeitung sowie der Einsatz eines robusten chromatographischen Systems für beide Matrices mit kurzen Laufzeiten, welches eine hohe Anzahl an Proben bewältigen kann, war primäres Ziel des analytischen Teils der Studie. Die Bestimmungsgrenze sollte so gewählt werden, daß zu erwartende Plasma- und Urinkonzentrationen ausreichend zu bestimmen sind.

Eine Validierung der Methode findet nicht statt. Die Überprüfung anhand einer Systemstabilität und eines Robustheitstests wurde für ausreichend befunden.

7.1 Geräte und Materialien

- Linezolid von Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland, Charge: 10301WPP, Reinheitsgrad: 99.60 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- D₃-Linezolid von Pharmacia & Upjohn, Kalamaroo, Michigan, USA, Charge: (D2)28596-DMK-41, Reinheitsgrad: 100.00 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- Nachverdünnungspuffer: 0.001 M Ammoniumacetatpuffer: 0.077 ± 0.002 g Ammoniumacetat wurden eingewogen und mit 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser vollständig gelöst.
- Fließmittelpuffer: 0.001 M Ammoniumacetatpuffer: 0.077 ± 0.01 g Ammoniumacetat wurden eingewogen und mit 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser vollständig gelöst.
- Mobile Phase: 700 ml 0.001 M Ammoniumacetatpuffer und 300 ml Acetonitril wurden zusammengegeben. Danach wurde das Fließmittel im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

- Probengeberspülflüssigkeit: 500 ml Milli-Q[®]-Wasser und 500 ml Acetonitril wurden zusammengegeben. Danach wurde die Probengeberspülflüssigkeit im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
- D₃-Linezolid-interne Standardstammlösung, 100 µg/ml: 2.00 ± 0.2 mg D₃-Linezolid wurden zu 20.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -20 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- D₃-Linezolid-interne Standardarbeitslösung für Plasma, 250 ng/ml: 0.050 ml der D₃-Linezolid-interner Standardstammlösung (100 µg/ml) wurden zu 20.0 ml mit Acetonitril verdünnt.
- Linezolid-Stammlösung-CR, 500 µg/ml: 10.04 mg Linezolid wurden zu 20.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -20 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- Linezolid-Stammlösung-QC, 400 µg/ml: 10.04 mg Linezolid wurden zu 20.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -20 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- D₃-Linezolid-interne Standardarbeitslösung für Urin, 50 ng/ml: 0.050 ml der D₃-Linezolid-internen Standardstammlösung (100 µg/ml) wurden zu 100.0 ml mit mobiler Phase verdünnt.
- HPLC-Säule, Luna[®] C8(2), 3.0 µm, 50 x 4.6 mm (Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland).
- PE SCIEX API 3000 mit Turbo-IonSpray Interface (Perkin Elmer, Thornhill, Ontario, Kanada).

7.2 Methodenentwicklung

Für die Entwicklung der Methode wurde eine Linezolid-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg Linezolid ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in 1.00 ml Acetonitril eingewogen. Diese wurde bei -20 °C aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt.

7.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurde die Linezolid-Stammlösung (1.00 mg/ml) volumetrisch mit einer Mischung aus Acetonitril und 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser/Acetonitril (50/50, v/v) auf eine Konzentration von 1.00 µg/ml verdünnt. Diese wurde über eine Spritzenpumpe mit einer Flußrate von 10 µl/min infundiert. Die unten gezeigten Spektren sind mit einer Einheitsmassenauflösung und einer Peakbreite von 0.7 –0.9 u bei halber Peakhöhe im MCA Modus (10 scans) am API 3000 aufgenommen. Zur Erzeugung der Ionen wurde die Elektrospray-Quelle im positiven Modus verwendet. Die Spektren wurden ohne vorherige Reinigung des Gerätes aufgenommen.

Die Optimierung der Ionisierungsparameter ergab eine maximale Ionenausbeute bei Verwendung des Turbo-Elektrosprays mit einem Gasfluß von 7.0 l/min und einer Temperatur von 300 °C. Die erhaltenen Spektren der Molekülionen von Linezolid und des Internen Standards D₃-Linezolid sind in den Abbildung 49 und 50 zu sehen.

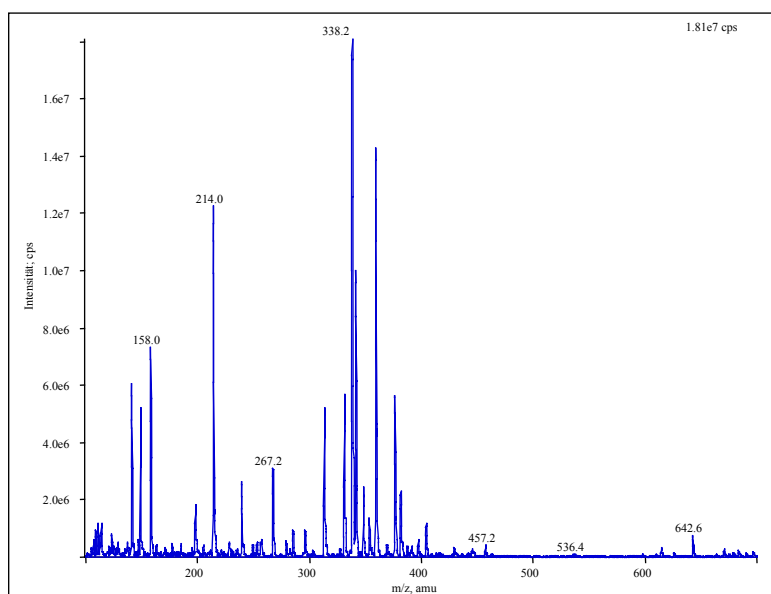


Abbildung 49: Q1-Spektrum von Linezolid.

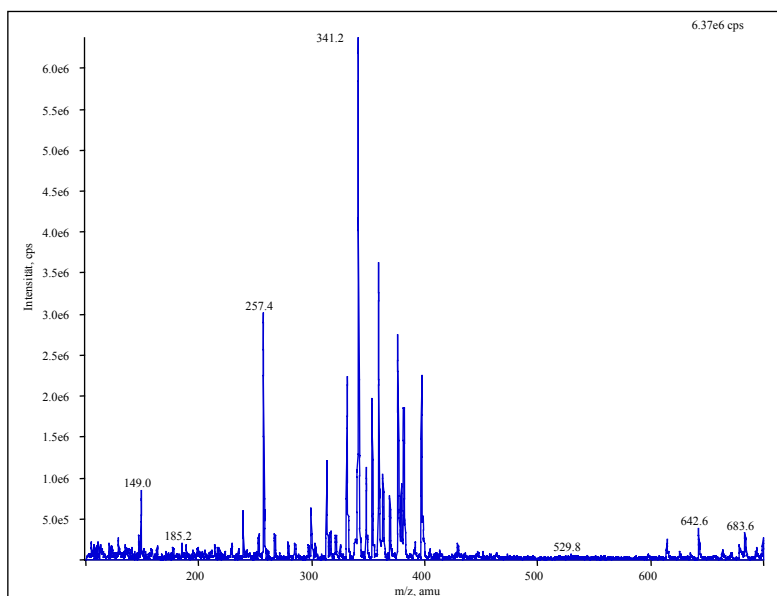


Abbildung 50: Q1-Spektrum von D₃-Linezolid.

Das Spektrum des internen Standards wurde mit dem Turbo-Elektrospray unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen, hingegen wurde das Spektrum von Linezolid selbst ohne Einsatz des Turbos erzeugt. Da beide Konzentrationen gleich waren, jedoch die absoluten Intensitäten sich um einen Faktor drei unterscheiden, kann dieser Gewinn in der Empfindlichkeit eindeutig auf den Einsatz des Turbos und die damit verbundene Optimierung des Ionisierungsprozeß, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, zurückgeführt werden. Neben den Molekülonen von Linezolid (m/z 338) und D₃-Linezolid (m/z 341) sind eine große Anzahl von Störungen im Spektrum zu erkennen. Diese stammen von vorherigen Messungen und wurden während der Methodenentwicklung nicht entfernt. Eine Beeinflussung auf die Präzision oder Empfindlichkeit konnte dadurch nicht festgestellt werden. Mit den so erhaltenen Einstellungen der Quelle wurden die Produkt-Ionen der Substanzen bestimmt (Abbildungen 51 und 52).

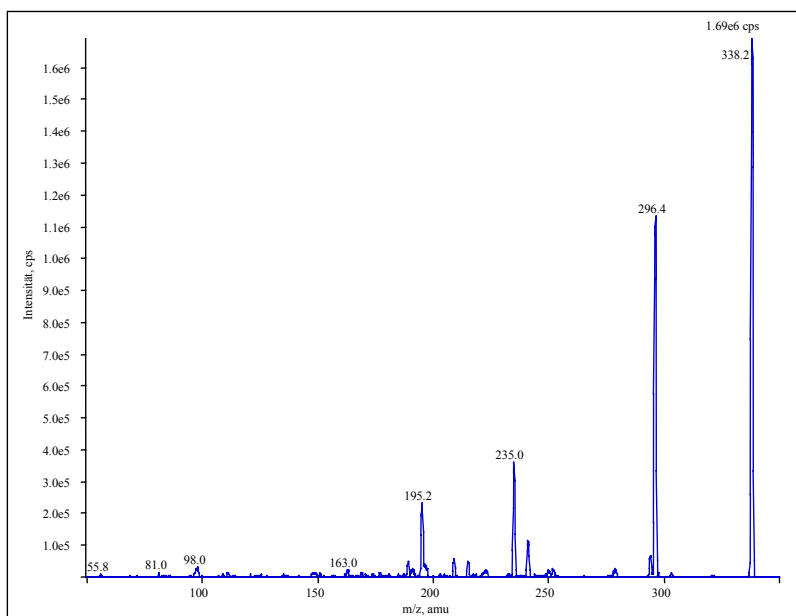


Abbildung 51: Produkt-Ionen-Spektrum von Linezolid.

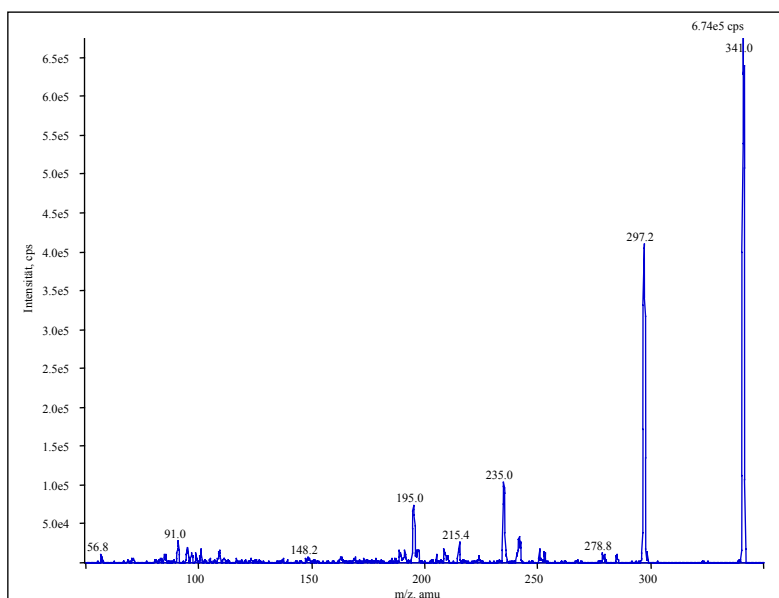


Abbildung 52: Produkt-Ionen-Spektrum von D₃-Linezolid.

Durch Verlust von $[O=C=CH_2]$ bildet sich das Fragment-Ion m/z 296. Das gerade Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 296 spricht für den Verbleib aller drei Stickstoffatome im Fragmentmolekül von Linezolid. Die Bildung des Fragment-Ions m/z 297 des internen Standards würde bei Verlust aller drei Deuterium-Atome für eine gerade Anzahl von Stickstoff-Atomen sprechen. Dies würde jedoch einen unterschiedlichen Zerfall der beiden Moleküle bedeuten. Da angenommen werden muß, daß sich beide Moleküle gleich

verhalten, kann von einer Umlagerung eines Deuterium an die terminale Aminfunktion ausgegangen werden (Abbildung 53).

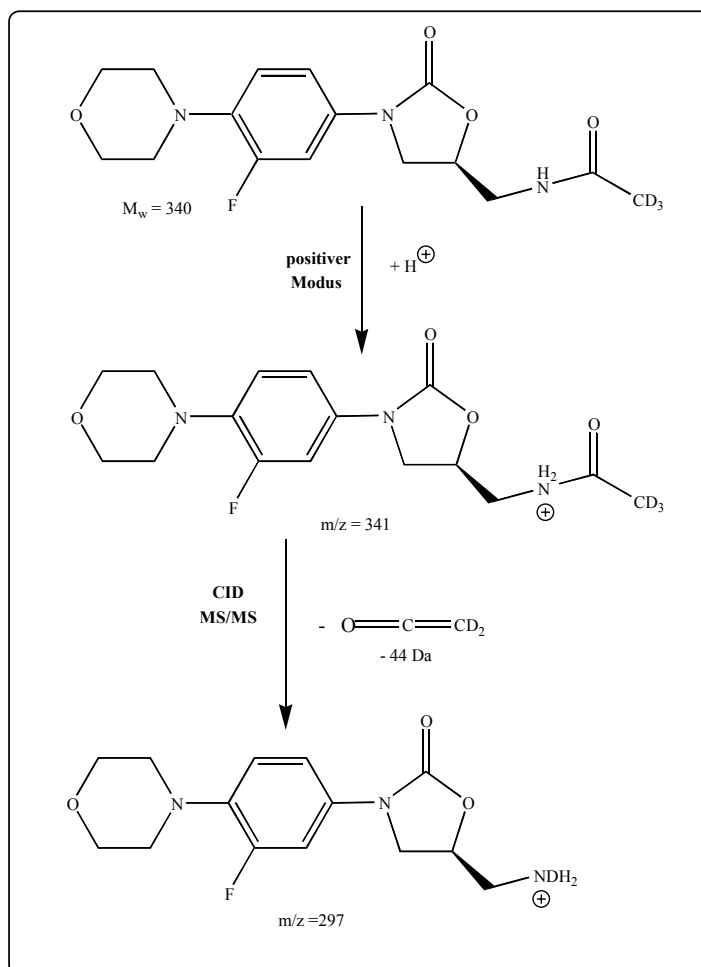


Abbildung 53: Fragmentierung von Linezolid anhand von D₃-Linezolid (C₁₆H₁₇D₃FN₃O₄, Mw: 340.35 g/mol) mit der Umlagerung eines Deuteriums.

Die Fragment-Ionen m/z 296 (Linezolid) und m/z 297 (D₃-Linezolid) waren die empfindlichsten Fragmente und wurden zur Erstellung eines SRM-Modus verwendet. Das Fragment-Ion von Linezolid wurde auch in der kürzlich veröffentlichten Methode von Phillips *et al.*^[125] verwendet und stellt ein geeignetes Fragment zur Erstellung eines SRM-Modus dar.

Die Messungen von aufgearbeiteten Proben zeigten keine wesentlichen Störungen bei Verwendung der Übergänge von m/z 338 → m/z 296 (Molekülion → Produkt-Ion) von Linezolid und m/z 341 → m/z 297 (Molekülion → Produkt-Ion) von D₃-Linezolid. Der Massenunterschied von 3 u stellte sicher, daß keine gegenseitige Beeinflussung der beiden Moleküle stattfand.

Die sich daraus ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen für das API 3000-Gerät sind wie folgt:

Ionisierungsmodus: positiv Turbo-Elektrospray; Gasvorhang: 10; Zerstäubergas: 10; Hilfsgas: 7.0 l/min; Kollisions-Gas: 4; Temperatur-Turbo: 300 °C; ISV: 5500 V; OR: 46 V; RNG: 210 V; R02: -66 V; ST3: -56 V; R03: -38 V; Verweilzeit: 200 ms; Zeit-Pause: 2 ms; Massenübergang Linezolid: m/z 338 \rightarrow m/z 296; Massenübergang D₃-Linezolid: m/z 341 \rightarrow m/z 297.

7.2.2 Chromatographische Bedingungen

Linezolid wurde von Sisson *et al.*^[121] mit einer Umkehrphase, die an Zorbax als Basismaterial (Korngröße 5 μ m) chemisch gebundenes, sterisch geschütztes Diisopropyl-n-octyl als stationäre Phase verwendet, chromatographisch getrennt. Dabei wurde neben Trifluoressigsäure und Tetrahydrofuran ein Methanol/Wasser Verhältnis von ca. 1/3 (v/v) verwendet. Die Detektion mittels UV-Detektor war im Bereich 0.0100-25.0 μ g/ml linear. Die Retentionszeiten von Linezolid lagen bei 7.0 Minuten. Wynalda *et al.*^[123] verwendeten zur chromatographischen Trennung eine Säule, die als stationäre Phase eine Diisopropylcyanopropyl-Gruppe gebunden an Zorbax als Basismaterial (Korngröße 5 μ m) besitzt und einen Gradienten, der von 90 % wäßriger Phase auf 90 % Methanol überging. Die Detektion mittels ¹⁴C markiertem Kohlenstoff oder massenspektrometrisch im einfachen MS-Modus konnte nach ca. 13.5 Minuten durchgeführt werden.

Die chromatographischen Bedingungen sollten es ermöglichen, Linezolid sowohl im Plasma als auch im Urin zu bestimmen. Dazu wurde Puffer im Fließmittel eingesetzt. Die Menge an Puffer wurde aus den unter 2.2.2 erwähnten Gründen möglichst gering gehalten, jedoch ausreichend, um gleichbleibende Bedingungen innerhalb der Quelle während des gesamten chromatographischen Trennvorgangs zu gewährleisten. Auf die Verwendung einer Säule mit Mischphasencharakter wie von Wynalda *et al.*^[123] wurde verzichtet. Gute chromatographische Ergebnisse konnten mit C₈- und C₁₈-Umkehrphasenmaterialien unterschiedlicher Hersteller erhalten werden. Zur Anwendung kam eine Umkehrphase mit C₈-Material (Korngröße 3.0 μ m, Kohlenstoffbelegung 13.5 %, Oberfläche 400 m²/g, Porengröße 100 Å), die bei früheren Anwendungen eine hohe Lebensdauer gezeigt hatte. Die Mobile Phase wurde zu Beginn mit 0.01 mol/l Ammoniumacetatpuffer/Acetonitril (50/50; v/v) angesetzt und auf einen wäßrigen Anteil von 70 % erhöht, um ein Optimum zwischen Peakform und Laufzeit (2 Minuten) zu erhalten. Nachdem sowohl Plasma als auch

Urinproben aufgearbeitet zur Verfügung standen, wurde die Pufferstärke im Fließmittel sukzessive herabgesetzt. Die Pufferstärke konnte ohne Verlust an Intensität oder auftretenden Stabilitätsproblemen des Systems bis zu einer Konzentration von 1 mmol/l gesenkt werden. Bei der Aufarbeitung von Leerwerten mit internem Standard konnte eine ausreichend hohe Reinheit des internen Standards festgestellt werden, um kein Signal für Linezolid zu erhalten. Die Flußrate wurde auf 1.0 ml/min eingestellt und ein Nachsäulensplit eingesetzt, von dem aus 0.4 ml/min in die Quelle gelangten.

Das Injektionsvolumen konnte auf 10 µl für aufgearbeitete Plasmaproben und 50 µl für aufgearbeitete Urinproben ermittelt werden. Kontaminationsprobleme durch den Probengeber konnten bei Verwendung von Milli-Q®-Wasser/Acetonitril (50/50, v/v) als Spülflüssigkeit vermieden werden.

Die sich daraus ergebenden chromatographischen Bedingungen sind wie folgt:

Analytische Säule:	Luna® C ₈ , 3.0 µm, 50 x 4.6 mm	
Mobile Phase:	0.001 mol/l Ammoniumacetat , Acetonitril (700 ml : 300 ml)	
Säulentemperatur:	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	10 µl (Plasma), 50 µl (Urin)	
Flußrate:	1.0 ml/min, Split: 0.4 ml/min	
Probengeber-Spülflüssigkeit:	50 % Acetonitril in Milli-Q®-Wasser	
Laufzeit:	2.0 Minuten	
Retentionszeiten:	Linezolid	ca. 1.2 min
	D ₃ -Linezolid	ca. 1.2 min

7.2.3 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung gliederte sich in die zwei Bereiche der unterschiedlichen Matrices. An beide waren hinsichtlich des Quantifizierungslimits keine besonderen Anforderungen gestellt. So konnte mit einer einfachen Verdünnung des Urins und einer Präzipitation des Plasmas gearbeitet werden. Eine Konzentrierung der Proben wie von Peng *et al.*^[126] durchgeführt, war nicht notwendig. Die Aufarbeitung bedurfte auch keiner weiteren Aufreinigung der Probe. Die Chromatogramme zeigten keine signifikanten Störungen bei den verwendeten Massenübergängen von Linezolid und des internen Standards (Abbildung 54).

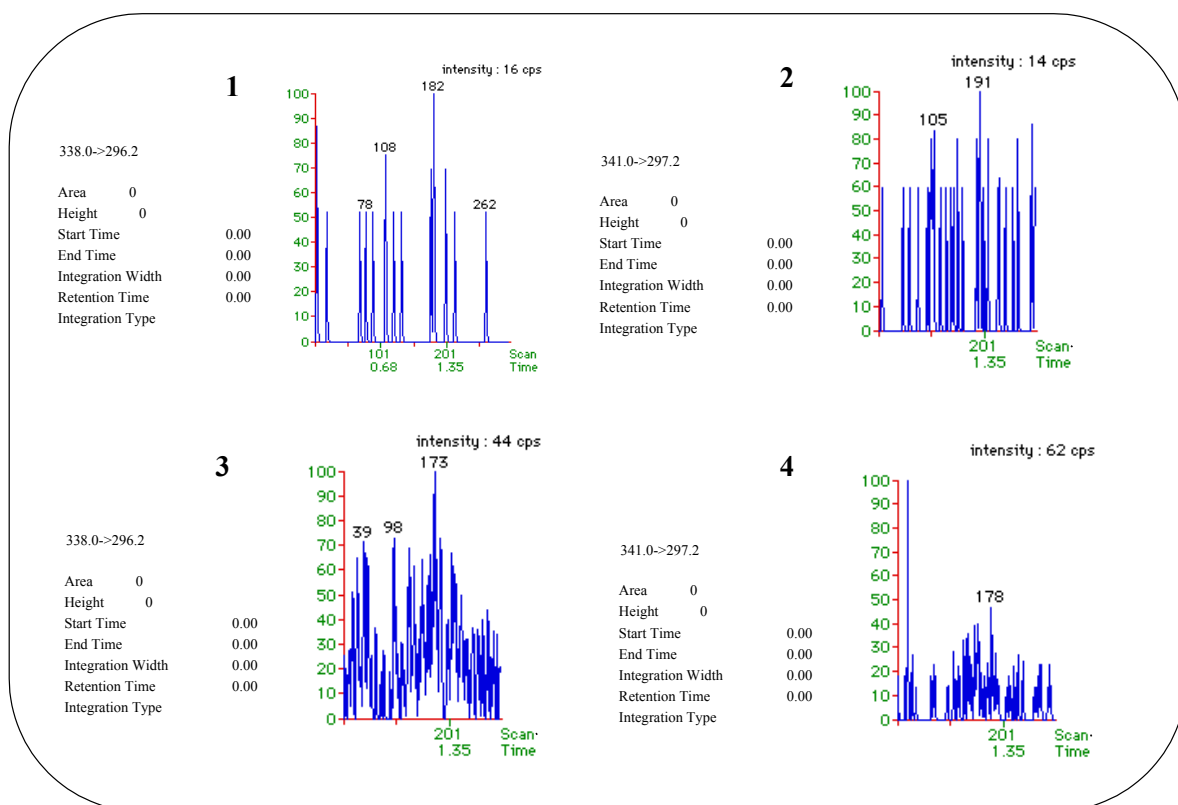


Abbildung 54: Leerwerte von Linezolid nach Aufarbeitung aus Plasma (1) und Urin (3) und D₃-Linezolid nach Aufarbeitung aus Plasma (2) und Urin (4).

Die Chromatogramme der Urinproben zeigen ein leicht erhöhtes Grundrauschen, welches jedoch eine Umstellung der Aufarbeitung nicht erforderte.

Urinaufarbeitung

Der Urin wurde bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut, gut geschüttelt und 50 µl in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 450 µl mobile Phase, die den internen Standard enthielt, pipettiert. Die Probe wurde 10 Sekunden gevortext und 50 µl injiziert. Mit dieser Aufarbeitung konnte ein dynamischer Meßbereich von 0.0100 – 10.0 µg/ml abgedeckt werden. Das untere Quantifizierungslimit wurde als ausreichend angesehen. Für Proben, die über dem Wert von 10 µg/ml lagen, wurden weitere Verdünnungsschritte durchgeführt.

50 µl der Probe wurden mit 450 µl mobiler Phase zusammengegeben und geschüttelt. Dieser Vorgang wurde entsprechend der gewünschten Verdünnung bis zu zweimal wiederholt. Von diesen Vorverdünnungen wurden 50 µl entnommen und mit 450 µl

mobiler Phase, die den internen Standard enthielt, zusammenpipettiert. Dadurch konnte der Meßbereich auf 100 bzw. 1000 µg/ml ausgedehnt werden.

Plasmaaufarbeitung:

Das Plasma wurde bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut, geschüttelt und anschließend bei 3600 U/min (2300 g) für 10 Minuten zentrifugiert. 50 µl der Probe wurden mit 200 µl Acetonitril, das den internen Standard D₃-Linezolid enthielt, versetzt. Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden mit 300 µl 1 mmol/l Ammoniumacetatpuffer verdünnt und gevortext. 10 µl jeder Probe wurden injiziert. Mit der Aufarbeitung konnten die Proben in einem dynamischen Meßbereich von 0.0250 – 25.0 µg/ml bestimmt werden. Eine weitere Senkung des Quantifizierungslimits war nicht notwendig, könnte jedoch durch eine geringere Verdünnung während der Aufarbeitung ermöglicht werden. Abbildung 55 zeigt ausgewählte Chromatogramme für Linezolid bei unterschiedlichen Konzentrationen und aus verschiedenen Matrices.

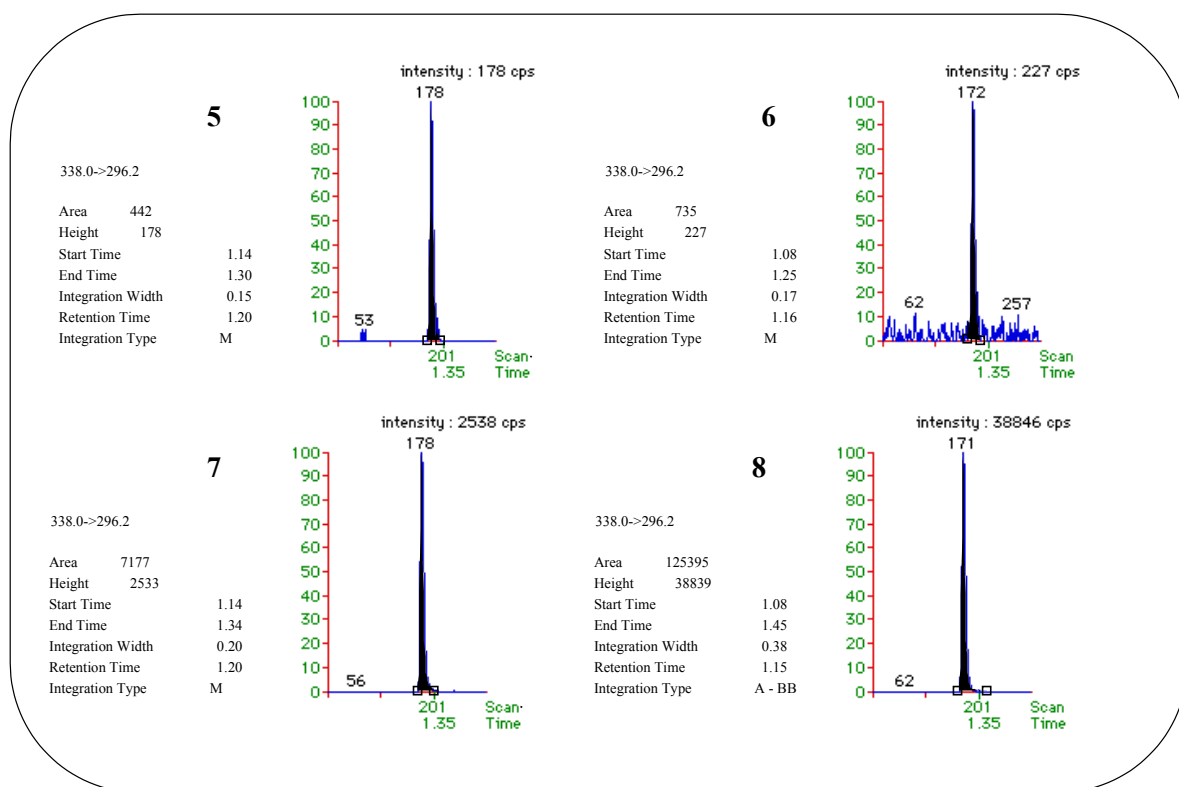


Abbildung 55: Chromatogramme von Linezolid nach Aufarbeitung aus Plasma (5 u. 7) und Urin (6 u. 8).

Die Chromatogramme 5 und 6 entsprechen jeweils dem kleinsten Kalibrierstandard der jeweiligen Kalibriergeraden. Das Chromatogramm 7 zeigt den Kalibrierstandard 6 der

Plasmakalibriergeraden mit einer Konzentration von 0.500 µg/ml. Das Chromatogramm 8 zeigt den Kalibrierstandard 4 der Urinkalibriergeraden mit einer Konzentration von 2.00 µg/ml. Bei den Chromatogrammen 5 und 7 sind die Retentionszeiten um ca. 0.05 Minuten verschoben. Dies ist auf die hohe Verdünnung mit Puffer zurückzuführen. Daraus resultierend wird Linezolid nach der Injektion bei einem höheren wäßrigen Anteil auf der Säule stärker retiniert. Die Peakbreite im Chromatogramm 5 ist mit 0.15 Minuten angegeben. Dies entspricht 9 Sekunden. Eine Verweilzeit von 200 ms mit einer Pause von 2 ms bedeutet ein Maximum von 2.4 Aufnahmepunkten pro Sekunde. Bei einer Peakbreite von 9 Sekunden werden somit mindestens 20 Datenpunkte aufgenommen und der Peak ist ausreichend definiert. Eine weitere Erhöhung der Verweilzeit konnte nicht vorgenommen werden.

7.2.4 Prüfung auf Validität der Methode

Die Chromatogramme 1 und 3 zeigen stellvertretend die Spezifität der Methode. Es wurden in den weiteren Versuchen keine Plasmen oder Urine aufgearbeitet, die eine signifikante Störung zu den Retentionszeiten von Linezolid oder des internen Standards aufwiesen.

Die Systempräzision und Stabilität wurden anhand von jeweils 25 aufgearbeiteten Urin- und Plasmaproben ermittelt. Für Urin lag der Variationskoeffizient der Peakflächen von Linezolid bei 7.4 % mit einer maximalen Differenz zwischen der größten und der kleinsten Fläche von 31.3 %. Für D₃-Linezolid lag der Variationskoeffizient bei 6.5 % mit einer maximalen Differenz von 29.8 %. Der Variationskoeffizient der Peakflächenverhältnisse betrug 2.2 % mit einer maximalen Differenz von 7.9 %. Hier zeigt sich der Vorteil des isotonenmarkierten Linezolid als internem Standard. Obwohl die absoluten Flächen eine Schwankung um 30 % aufzeigen, liegt der Wert für die Peakflächenverhältnisse bei 7.9 %. Der interne Standard verhält sich chemisch gleich zum Linezolid. Die Schwankungen der Einzelflächen sind bei denselben Proben zu verzeichnen. Die Werte der Peakflächenverhältnisse stellen eine Präzision der Aufarbeitung dar, die Differenz zu den Einzelflächen muß als Meßungenauigkeit des Systems betrachtet werden.

Für die Plasmaproben wurden vergleichbare Werte erhalten. Der Variationskoeffizient der Peakflächen von Linezolid lag bei 7.1 % mit einer maximalen Differenz zwischen der größten und der kleinsten Fläche von 29.0 %. Für D₃-Linezolid lag der Variationskoeffizient bei 5.1 % mit einer maximalen Differenz von 21.8 %. Der Variationskoeffizient der Peakflächenverhältnisse betrug 2.7 % mit einer maximalen Differenz von 10.1 %.

Ein Trend in den absoluten Flächen war nicht zu verzeichnen.

Zur weiteren Überprüfung des Systems wurde ein Robustheitstest in Plasma durchgeführt. Es wurden aus den Stammlösungen drei Kalibriergeraden (CR) und sechs Sätze an Qualitätskontrollproben (QC) hergestellt und frisch aufgearbeitet. Die Konzentrationen der Proben gehen aus den Tabellen 47 und 48 hervor.

Insgesamt wurden 63 Proben aufgearbeitet und gemessen. Jede Kalibriergerade wurde einzeln mit Hilfe einer gewichtete lineare Regression (Wichtungsfaktor 1/Konzentration) erstellt, und die Qualitätskontrollproben wurden über die jeweilige der drei Kalibriergeraden ausgewertet.

Kalibrier-Standard No.	Theoretische Konzentration von Linezolid (µg/ml)	Gemessene Konzentrationen von Linezolid in Humanplasma (%)			Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
		CR1	CR2	CR3				
1	25.0	99.3	100.4	101.3	100.3	1.0	1.0	0.3
2	20.0	100.0	99.4	98.9	99.4	0.6	0.6	-0.6
3	10.0	101.2	100.1	99.7	100.3	0.8	0.8	0.3
4	5.00	102.6	101.4	100.3	101.4	1.2	1.1	1.4
5	1.00	93.2	90.8	90.7	91.6	1.4	1.5	-8.4
6	0.500	98.8	102.9	103.1	101.6	2.4	2.4	1.6
7	0.100	103.3	105.8	99.2	102.8	3.3	3.2	2.8
8	0.0750	95.1	101.1	101.3	99.2	3.5	3.6	-0.8
9	0.0500	96.5	100.4	104.9	100.6	4.2	4.2	0.6
10	0.0375	102.9	95.4	100.7	99.7	3.9	3.9	-0.3
11	0.0250	107.2	102.2	99.9	104.7	3.7	3.6	4.7

Tabelle 47: Präzision der Kalibrierstandards von Linezolid.

Qualitäts- Kontroll Probe	Theoretische Konzentration von Linezolid	Gemessene Konzentrationen von Linezolid in Humanplasma (%) über			Mittel- wert	s	CV	RE
		CR1	CR2	CR3				
1	20.0	103.5	102.9	101.7	105.4	2.3	2.2	5.4
1	20.0	107.8	107.2	105.9				
1	20.0	104.7	104.2	102.9				
1	20.0	108.8	108.3	106.9				
1	20.0	104.4	103.9	102.6				
1	20.0	108.2	107.7	106.3	101.2	2.2	2.2	1.2
2	2.00	100.4	99.7	98.7				
2	2.00	104.1	103.5	102.4				
2	2.00	99.2	98.6	97.6				
2	2.00	103.2	102.6	101.5				
2	2.00	100.7	100.0	99.0	100.1	4.1	4.1	0.1
2	2.00	104.5	103.8	102.8				
3	0.200	99.3	97.8	98.7				
3	0.200	104.0	102.5	103.3				
3	0.200	94.9	93.4	94.4				
3	0.200	107.4	105.8	106.6	102.3	4.6	4.5	2.3
3	0.200	101.0	99.5	100.4				
3	0.200	98.5	97.0	97.9				
4	0.0500	96.0	91.6	99.0				
4	0.0500	105.8	101.4	108.4				
4	0.0500	102.6	98.2	105.4	102.3	4.6	4.5	2.3
4	0.0500	105.8	101.4	108.4				
4	0.0500	101.6	97.2	104.4				
4	0.0500	105.2	100.8	108.0				
4	0.0500	105.2	100.8	108.0				

Tabelle 48: Präzision der Qualitätskontrollproben von Linezolid; Auswertung über Kalibriergerade 1 (CR1) bis Kalibriergerade 3 (CR3).

Die Genauigkeit der Kalibrierstandards war in einem Bereich von $\pm 10\%$ gegeben. Die sich daraus ergebende Richtigkeit mit Abweichungen zwischen -8.4 und 4.7% lag in einem akzeptablen Bereich. Der Variationskoeffizient entsprach mit Werten von $\leq 4.2\%$ den Anforderungen. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.9999 , somit wurden die Akzeptanzkriterien für die Linearität des dynamischen Bereichs ($0.0250\ \mu\text{g/ml}$ – $20.0\ \mu\text{g/ml}$) erfüllt.

Das gleiche Bild zeigte sich für die Qualitätskontrollproben. Die Genauigkeit für alle gemessenen Proben lag unter 10% mit einem Variationskoeffizienten von $\leq 4.5\%$ bei einer

maximalen Standardabweichung von 4.6 %. Die Abweichungen von den theoretischen Werten lag nicht über ± 5.4 %.

Aufgearbeitete Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben aus Urin zeigten vergleichbare Werte. Die Durchführung eines Robustheitstest mit Urinproben wurde nicht durchgeführt. Die Auswertung der während der Entwicklung der Aufarbeitung erstellten Kalibriergeraden erfolgte bei den Urinproben jedoch über eine gewichtete lineare Regression mit einem Wichtungsfaktor von $1/\text{Konzentration}^2$.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 10 für Urin und ≥ 6 für Plasma, womit die Akzeptanzkriterien für die Bestimmungsgrenze erfüllt wurden.

7.2.5 Diskussion

Auf eine umfangreiche Validierung der Methoden wurde verzichtet, da die entwickelten Methoden den Schluß zu ließen, die Anforderungen, die an das System gestellt wurden, im vollen Umfang abzudecken. Die erhaltenen Werte des Robustheitstest, sowie seine praktische Handhabung ließen nicht erkennen, daß sich bei den folgenden Messungen Probleme ergeben könnten. Eine Untersuchung der Stabilitäten der Proben im Plasma wurde bereits von Peng *et al.*^[126] durchgeführt. Hierbei handelte es sich jedoch um tierische Matrices. Dennoch konnten bei seinen Versuchen keine Instabilitäten bei einem Zyklus von dreimaligem Auftauen und Einfrieren der Proben, bzw. nach Stehenlassen der Plasma-proben über 24 Stunden bei Raumtemperatur gefunden werden. Daher waren Instabilitäten in den zu untersuchenden Matrices nicht zu erwarten. Dies bestätigen ebenfalls die Ergebnisse von Phillips *et al.*^[125], welche eine Stabilität in Plasma bei Raumtemperatur über 10 Tage angeben.

Bei dem gegebenen Studiendesign (siehe 7.3.1) sind die erreichten Quantifizierungslimits als ausreichend anzusehen gewesen. Wie bereits erwähnt, liegen die Maximalkonzentrationen bei ca. $12 \mu\text{g/ml}$ mit einer Halbwertszeit von 4 - 5 Stunden. Die resultierenden Linezolidplasmakonzentrationen sollten somit über dem Quantifizierungslimit liegen. Eine weitere Reduzierung des Quantifizierungslimits könnte durch eine geringere Verdünnung des Überstands der präzipitierten Probe erfolgen. Eine Konzentrierung der Probe war nicht erforderlich.

7.3 Studie

Harnwegsinfektionen sind eine der häufigsten bakteriellen Erkrankungen. Dabei kann ein weites Spektrum an Krankheitserregern gefunden werden. Die antimikrobiellen Wirkstoffe sollten daher einen großen Teil des Bakterienspektrums abdecken. Aufgrund ihres großen Wirkspektrums sind Fluorquinolone dabei wirksame Mittel. Ciprofloxacin (CIP) ist in der Behandlung von Harnwegserkrankungen dabei sehr effektiv (Heilungsraten von ca. 90 %). Die Häufigkeit der Infektionen durch Gram-positive Bakterien nimmt jedoch weiter zu,^[127,128,129,130] daher müssen neue Wirkstoffe gefunden werden, die gegen Gram-positive Bakterien hoch wirksam sind. Linezolid als Vertreter der Oxazolidinone erfüllt diese Anforderung. Um zu untersuchen, ob Linezolid als Antibiotikum zur Behandlung von Harnwegserkrankungen geeignet ist, wurde es mit Ciprofloxacin verglichen.

Primäres Ziel der Studie war es, die Wirksamkeit gegen Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken zu testen. Daneben sollten die Konzentrationen in den Matrices Plasma und Urin und die renale Ausscheidung bestimmt werden.

Der in dieser Arbeit geleistete Beitrag beschränkte sich auf die Bestimmung der Linezolidkonzentrationen im Plasma und Urin. Neben den sich daraus ergebenden pharmakokinetischen Parametern (C_{\max} , t_{\max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, Restfläche (%), MRT, CL, CL_R , CL_{nR} und Ae) von Linezolid werden zum graphischen Vergleich die in dieser Studie erhaltenen Ciprofloxacinkonzentrationen dargestellt. Eine ausführliche Betrachtung der Ciprofloxacinkonzentrationen wird nicht durchgeführt.

7.3.1 Studiendesign

Die vergleichende Phase-I-Studie wurde mit 12 Probanden (6 männliche und 6 weibliche) als eine offene, randomisierte und in einem Zweifach-Crossover-Design-Studie an einem Ort durchgeführt. Die Probanden waren von guter Gesundheit, zwischen 18-45 Jahre und besaßen ein Gewicht von Körpergröße (cm) -100 ± 20 %. Bei 183 cm Körpergröße also ein Gewicht von 83 ± 16.6 kg.

Nach einer 12 stündigen Fastenperiode wurde den Probanden entweder eine 600 mg Linezolid enthaltende Filmtablette oder eine 500 mg Ciprofloxacin enthaltende Filmtablette oral verabreicht. In den folgenden 24 Stunden durften keine alkoholischen oder xanthinhaltigen Lebensmittel eingenommen werden. Frühstück wurde nach zwei eine weitere

Mahlzeit nach fünf Stunden serviert. Während der Studienphase mußten 1.5 Liter Flüssigkeit zu sich genommen werden.

24 Stunden vor der Medikation wurde auf antimikrobielle Aktivität im Urin getestet. Bei positivem Befund wurde die Person ausgeschlossen.

Der Urin wurde in folgenden Intervallen in Plastikgefäßen gesammelt:

vor der Applikation: -12 - 0 Stunden

nach der Applikation: 0-6, 6-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-72, 72-96 und 96-120 Stunden.

Die Urinproben wurden nach Ablauf des Sammelintervalls bei $< -18\text{ °C}$ eingefroren.

Das Plasma wurde zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

Direkt vor der Gabe und nach 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 Stunden.

Die Blutentnahme erfolgte mit einem Katheter, der in die Vene des Unterarms gelegt wurde. Die Blutproben wurden in heparinierten Primavetten[®] gesammelt. Die Blutproben wurden vorsichtig in der Primavette[®] geschwenkt und bei 3.600 U/min (3280 g) 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde in zwei Mikro-Schraubgefäße abgefüllt und sofort bei $< -18\text{ °C}$ eingefroren.

Die Proben wurden anschließend bei $< -18\text{ °C}$ vom Studienort zum Analyselabor transportiert und dort unter gleichen Bedingungen bis zum Beginn der Aufarbeitung gelagert. Die Auswaschphase betrug mindestens sieben Tage.

7.3.2 Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben

Zur Herstellung der Kalibrierstandards und der Qualitätskontrollproben wurden die Stammlösungen nach dem Pipettierschema aus Tabellen 49 und 50 hergestellt und bei $\leq -18\text{ °C}$ bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Konzentration Linezolid (µg/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
25.0	L1	LZD-SL-CR	0.250	4.750
20.0	L2	L1	1.600	0.400
10.0	L3	L2	0.900	0.900
5.00	L4	L3	0.750	0.750
1.00	L5	L4	0.370	1.480
0.500	L6	L5	0.850	0.850
0.100	L7	L6	0.620	2.480
0.0750	L8	L7	2.100	0.700
0.0500	L9	L8	1.600	0.800
0.0375	L10	L9	1.350	0.450
0.0250	L11	L10	0.700	0.350
20.0	QC1	LZD-SL-QC	0.250	4.750
2.00	QC2	QC1	0.250	2.250
0.200	QC3	QC2	0.250	2.250
0.0500	QC4	QC3	0.500	1.500

Tabelle 49: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Konzentration Linezolid (µg/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
10.0	L1	LZD-SL-CR	0.100	4.900
8.00	L2	L1	1.600	0.400
4.00	L3	L2	0.900	0.900
2.00	L4	L3	0.750	0.750
0.400	L5	L4	0.370	1.480
0.200	L6	L5	0.850	0.850
0.0400	L7	L6	0.620	2.480
0.0300	L8	L7	2.100	0.700
0.0200	L9	L8	1.600	0.800
0.0150	L10	L9	1.350	0.450
0.0100	L11	L10	0.700	0.350
40.0	QC D10	LZD-SL-QC	0.500	4.500
8.00	QC1	QC D10	0.650	2.600
2.00	QC2	QC1	0.600	1.800
0.100	QC3	QC2	0.160	3.040
0.0250	QC4	QC3	0.550	1.650

Tabelle 50: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanurin.

Die 96 Plasmaproben und 108 Urinproben wurden jeweils in einer Sequenz gemessen. In keiner der Probandenleerwerte konnte eine Störung zu den Retentionszeiten von Linezolid oder des internen Standards gefunden werden, wodurch die Selektivität anhand von 6 männlichen und 6 weiblichen Plasmen und Urinen nachgewiesen werden konnte. Die Signal-Rausch-Verhältnisse des kleinsten Kalibrierstandards lagen für Urin bei 8 und für Plasma bei 10. Die Kalibriergeraden wurden mit einer gewichteten linearen Regression ausgewertet (Wichtung $1/\text{Konzentration}$ für Plasma und $1/\text{Konzentration}^2$ für Urin) und besaßen Korrelationskoeffizienten von 0.9999 für Plasma und 0.9985 für Urin. In beiden Fällen lag die Genauigkeit des Kalibrierstandards 10 außerhalb der 15 % Grenze und wurde daher nicht mit zur Auswertung herangezogen. Für die Qualitätskontrollproben konnte nur eine Präzision innerhalb der Sequenzen durchgeführt werden. Alle Qualitätskontrollproben lagen innerhalb der unter 2.5 gesetzten Kriterien. Die Tabelle 51 zeigt die Präzision innerhalb der Sequenzen.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Linezolid ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl der Proben	Mittelwert ($\mu\text{g/ml}$)	s ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
QC1 (Plasma)	20.0	5	20.3	0.408	2.0
QC2 (Plasma)	2.00	5	1.99	0.0357	1.8
QC3 (Plasma)	0.200	5	0.198	0.00526	2.7
QC4 (Plasma)	0.0500	5	0.0521	0.00326	6.2
QC D10 (Urin)	4.00	3	4.00	0.0228	0.6
QC1 (Urin)	8.00	3	7.59	0.145	1.9
QC2 (Urin)	2.00	3	1.94	0.0613	3.2
QC3 (Urin)	0.100	3	0.0956	0.00520	5.4
QC4 (Urin)	0.0250	3	0.0257	0.00263	10.2

Tabelle 51: Statistische Auswertung der Qualitätskontrollproben von Linezolid in Plasma während der Studie.

7.3.3 Studienergebnisse

Die Ergebnisse in Plasma und Urin werden erneut am Beispiel von sechs Probanden dargestellt.

7.3.3.1 Ergebnisse im Plasma

Nach oraler Gabe von 600 mg Linezolid wurden die zu erwartenden pharmakokinetischen Daten erhalten. Tabelle 52 zeigt die Werte für sechs Probanden.

Proband	C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	t_{\max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	Restfläche (%)
1	15.6	1.00	6.45	159	173	8.2
2	14.8	2.00	5.72	114	120	5.3
3	13.9	2.00	4.35	81.9	83.6	2.0
4	12.3	1.00	8.68	134	159	15
5	14.4	1.00	4.29	111	114	2.1
6	10.7	2.00	6.70	89.0	97.1	8.4
Anzahl	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	13.5	1.41	5.85	112	120	5.4
S	1.80	0.55	1.65	28.6	34.9	5.1
CV (%)	13.3	38.7	28.1	25.5	29.0	94
Minimum	15.6	2.00	8.68	159	173	15
Maximum	10.7	1.00	4.29	81.9	83.6	2.0

Tabelle 52: Pharmakokinetische Daten (Teil I) nach einmaliger oraler Gabe von Linezolid.

Diese stimmen weitgehend mit den von Sisson *et al.*^[121] gefundenen Daten überein. Die Darstellung der Plasmakonzentrationen der einzelnen Probanden in Abbildung 56 spiegelt die relativ geringen Standardabweichungen wider. Keiner der Probanden zeigte eine signifikante Abweichung von den erhaltenen Mittelwerten.

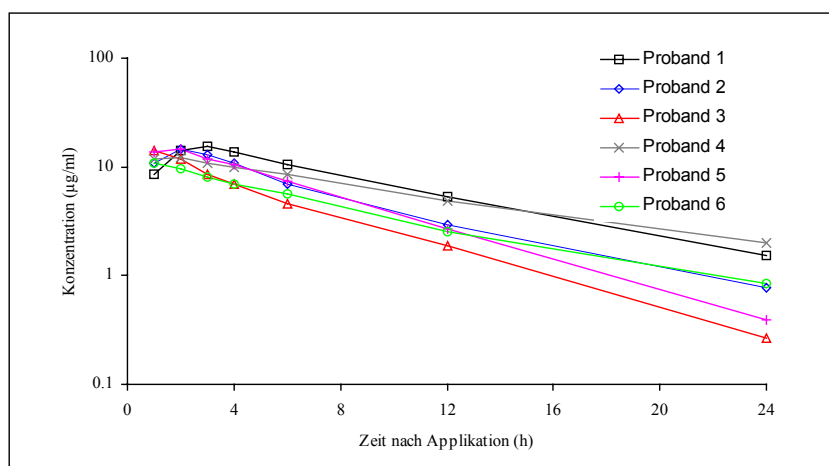


Abbildung 56: Halblogarithmische Darstellung der Linezolidkonzentration in Humanplasma von sechs Probanden.

Von Bedeutung ist der 12 Stundenwert, da bei täglich zweimaliger oraler Gabe dieser über der MHK_{90} der wichtigsten Bakterien des Wirkungsspektrums liegen sollte. Abbildung 57 zeigt die resultierende Kurve der sechs Probanden und die MHK_{90} -Werte von

Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken. Zum Vergleich wurden die in dieser Studie erhaltenen Ciprofloxacinkonzentrationen (Mittelwerte der gleichen sechs Probanden) mit in die Graphik aufgenommen.

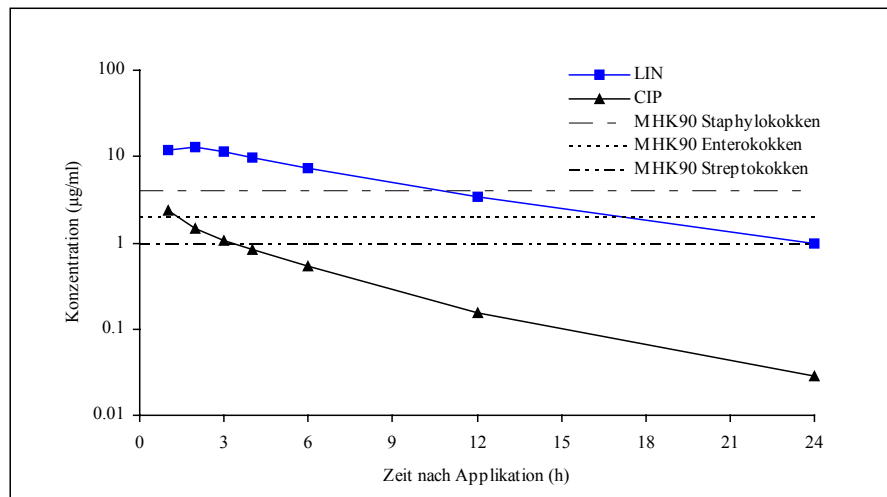


Abbildung 57: Halblogarithmische Darstellung der Linezolid- und Ciprofloxacinkonzentrationen von sechs Probanden (Mittelwerte) in Humanplasma.

Es ist gut zu erkennen, daß der 12 Stundenwert nahe der 4 µg/ml-Grenze (MHK₉₀ Staphylokokken) liegt. Der genaue Wert wurde zu 3,38 µg/ml ± 1,41 µg/ml berechnet und zeigte eine Konzentrationsspanne bei den Probanden zwischen 1,90 µg/ml und 5,39 µg/ml. Da es sich hier um eine einmalige Dosis handelt, kann davon ausgegangen werden, daß sich der Through-Wert im Steady-State-Zustand noch erhöht und damit eine ständig wirksame Konzentration bei der oralen Applikation von 600 mg Linezolid zweimal täglich erreicht werden kann. Dies zeigen auch die Ergebnisse von Hamel *et al.*^[131], bei denen die Konzentration im Steady-State nicht unter 4 µg/ml sinkt. Ebenfalls liegen die Maximalkonzentrationen um ca. 4-5 µg/ml höher als nach einmaliger Gabe von 600 mg Linezolid. Hingegen liegen die Ciprofloxacinkonzentrationen (Mittelwert 0,156 ± 0,0646 µg/ml) nach zwölf Stunden deutlich unter denen des Linezolid, womit die MHK₉₀-Werte bei der Applikation von 500 mg unterschritten sind. Die hier ermittelten Maximalkonzentrationen von 2,37 ± 0,435 µg/ml stimmen mit denen von Vance-Brayn *et al.*^[132] überein. Diese fanden auch nach zweimal täglicher Gabe von 500 mg Ciprofloxacin nur eine Konzentrationserhöhung von ca. 50 %, so daß die dargestellten Verhältnisse zwischen den Linezolid- und Ciprofloxacinkonzentrationen in Abbildung 57 als repräsentativ angesehen werden können.

7.3.3.2 Ergebnisse im Urin

Ebenfalls ein einheitliches Bild ergaben die Einzelwerte der Linezolidkonzentrationen der sechs Probanden im Urin. Abbildung 58 zeigt die halblogarithmische Darstellung der Linezolidkonzentration. Wie schon beim Plasma zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden. Dennoch muß beachtet werden, daß es sich bei der Graphik um eine halblogarithmische Auftragung eines großen Konzentrationsbereiches handelt. So liegen z.B. die Urinkonzentrationen des Probanden 4 nach 72 Stunden um einen Faktor von 25 über der des Probanden 3.

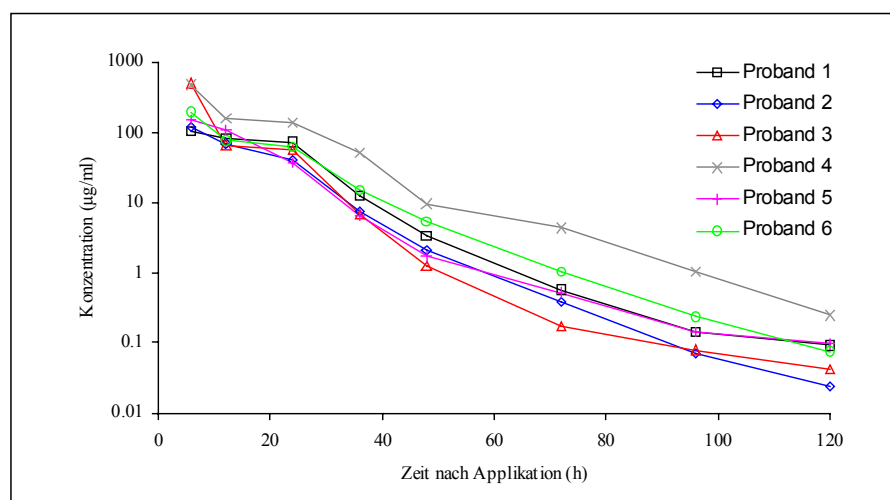


Abbildung 58: Halblogarithmische Darstellung der Linezolidkonzentration im Urin von sechs Probanden.

Die resultierende Kurve aus den Mittelwerten ist erneut mit den in dieser Studie erhaltenen Ciprofloxacinkonzentrationen und den MHK_{90} -Werten von Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken in Abbildung 59 dargestellt.

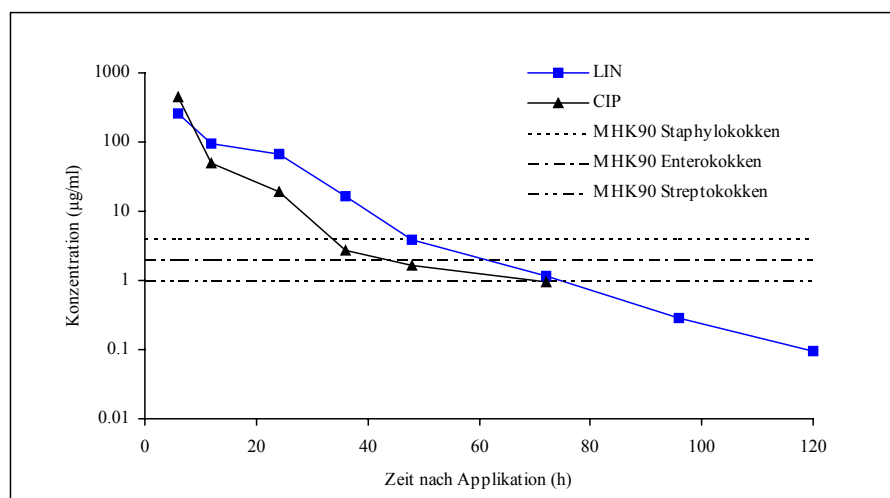


Abbildung 59: Halblogarithmische Darstellung der Linezolid- und Ciprofloxacinkonzentrationen von sechs Probanden (Mittelwerte) im Urin.

Erneut ergaben sich höhere Linezolid- als Ciprofloxacin-Konzentrationen. Jedoch liegen die Urinkonzentrationen beider Wirkstoffe bis ca. 36 Stunden nach der Applikation über den MHK_{90} -Werten von Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken.

Wie unter 7.3 angezeigt, wurde die Clearance bestimmt. Dies war möglich, da die Bioverfügbarkeit wie beschrieben 100 % beträgt. Dennoch ist die Bestimmung aus einer oralen Applikation nicht mit einer intravenösen Gabe des Pharmakons gleich zu setzen. Die in der Literatur angegebenen und bereits erwähnten Werte konnten dennoch weitestgehend bestätigt werden. So liegt die erhaltene Clearance, die in Tabelle 53 mit 83 ± 23 ml/min angegeben ist, zwar am unteren Rand der Literaturwerte, gibt aber dennoch den Größenbereich wieder. Gleiches gilt für die renale und nicht-renale Clearance. Die ermittelten Werte von 34 ± 8 ml/min und 48 ± 20 ml/min sind ebenfalls an der unteren Grenze oder sogar unter den von Diekema und Jones^[119] angegebenen Werten.

Proband	MRT (h)	CL (ml/min)	CL _R (ml/min)	CL _{nR} (ml/min)	AE (%)	V _{ss} (l)
1	9.77	57.8	26.4	31.3	46.6	33.9
2	7.87	83.3	31.4	51.8	37.4	39.3
3	6.11	120	33.6	86.1	28.2	43.9
4	12.91	63.1	30.4	32.7	47.2	48.8
5	6.46	87.8	40.9	46.9	46.8	34.1
6	9.24	103	47.8	55.2	46.8	57.1
Anzahl	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	8.44	83.1	34.4	47.7	41	42.1
S	2.51	23.5	7.86	19.9	7.84	9.06
CV (%)	30	28	23	42	19	22
Minimum	12.9	120	47.8	86.1	47.2	57.1
Maximum	6.11	57.8	26.4	31.3	28.2	33.9

Tabelle 53: Pharmakokinetische Daten (Teil II) nach einmaliger oraler Gabe von Linezolid.

Die Ausscheidungsrate von 41 ± 8 % hingegen spiegelt den theoretischen Mittelwert von männlicher und weiblicher Ausscheidungsrate, wie sie von Feenstra *et al.*^[122] angegeben wurde, wider. Ebenso verhält es sich mit dem Verteilungsvolumen, das mit 42 ± 9 l den Literaturwerten entspricht. Anhand der Werte in Tabelle 53 zeigt sich, daß auch nach einmaliger oraler Gabe von 600 mg Linezolid eine Berechnung dieser Werte mit akzeptablen Ergebnissen erzielt werden kann.

7.4 Diskussion und Zusammenfassung

Die entwickelte und vorgestellte LC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von Linezolid in Plasma und Urin zeichnet sich insbesondere durch ihre einfache Aufarbeitung aus. Eine aufwendige Probenvorbereitung wie sie von Phillips *et al.*^[125] durchgeführt wurde, scheint nicht gerechtfertigt. Die entstehenden Kosten durch Einsatz der Festphasenextraktion mit dem Quantifizierungslimit von 100 ng/ml können durch die hier entwickelte Methode der Proteinpräzipitation deutlich, bei einem um den Faktor 10 verringertem Quantifizierungslimit von 10 ng/ml reduziert werden. Das Quantifizierungslimit kann auf die Verwendung der Elektrospray-Quelle zurückgeführt werden. Das Fließmittel von Phillips *et al.*^[125] mit dem Ammoniumacetat-Puffer enthält keine Säure, die stark genug wäre, bei Verwendung der APCI-Quelle das Analytmolekül quantitativ in der Gasphase zu protonieren. Daher ist der unter 2.2.2.2 beschriebene Prozeß der Elektrospray-Quelle geeigneter, um Linezolid zu protonieren. Die Zielsetzung des analytischen Teils der Studie konnte somit erfüllt werden. Eine weitere Verringerung des Quantifizierungslimit ist nicht zwingend notwendig, jedoch wie bereits erwähnt durch einen geringeren Grad der Verdünnung des Überstandes von der Proteinpräzipitation oder durch Verringerung des Säulendurchmessers möglich.

Aufgrund des primären Ziels der Studie wurden die Abnahmezeitpunkte für die Kinetik nicht optimal um C_{\max} gelegt, jedoch konnten die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter die bereits in der Literatur gefundenen bestätigen. Ebenfalls zeigen die geringen prozentualen Anteile der Restflächen der Plasmakurven ein ausreichend langes Abnahmeintervall zur Bestimmung der Parameter.

Die mit dieser Methode bestimmten Konzentrationen lassen auf eine effektive Behandlung von bakteriellen Harnwegserkrankungen Gram-positiver Erreger schließen. Die Linezolidkonzentration im Plasma liegt nach 12 Stunden (übliches Applikationsintervall) über den MHK_{90} -Werte der untersuchten Erregern (Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken). Gleichfalls verhält es sich im Urin, bei dem sowohl im Zeitintervall 12 - 24 Stunden als auch im 24 - 36 Stundenintervall, die Linezolidwerte über den MHK_{90} -Werten von Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken liegen.

Bei der Anwendung von Linezolid sollte jedoch stets darauf geachtet werden, daß es nur in Fällen zum Einsatz gegen Gram-positive Erreger gebracht wird, bei denen sich bereits

Resistenzen gegen andere Wirkstoffe gebildet haben. Dadurch wird eine breite Anwendung vermieden und einer sich möglicherweise neubildenden Resistenz vorgebeugt.

8 Methotrexat

Methotrexat (MTX), ein Folsäureantagonist, besitzt eine größere Affinität zur Dihydrofolat-Reduktase als Dihydrofolsäure und verdrängt diese dadurch vom Enzym. Somit wird die Bildung der Tetrahydrofolsäure gehemmt, die als Überträgersubstanz für Hydroxymethylgruppen und Formylgruppen dient. Da die C1-Kohlenstofffragmente für die Nucleinsäuresynthese benötigt werden, ist diese gestört. Durch die Blockade der DNS-Synthese verzögert Methotrexat das Wachstum aller rasch proliferierenden Zellen. Methotrexat kann in der Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden, da es phasenspezifisch in der S-Phase der Zellreplikation wirkt.

Chemie

Methotrexat, 4-Amino-10-methylfolsäure ist ein gelbes Pulver. Es schmilzt bei 189 °C. Die Substanz ist unter Lichtschutz bei Raumtemperatur wenigstens vier Jahre stabil. In der handelsüblichen Form enthält sie bis zu 12 % Kristallwasser. Die Struktur ist in Abbildung 60 dargestellt.

Methotrexat besitzt als Folsäureantagonist ebenfalls zwei Carbonsäurefunktionen, die die Substanz zu einer schwachen Säure machen. Die pK_a -Werte werden wie folgt angegeben: γ -CO₂H: 4.70; α -CO₂H: 3.36.

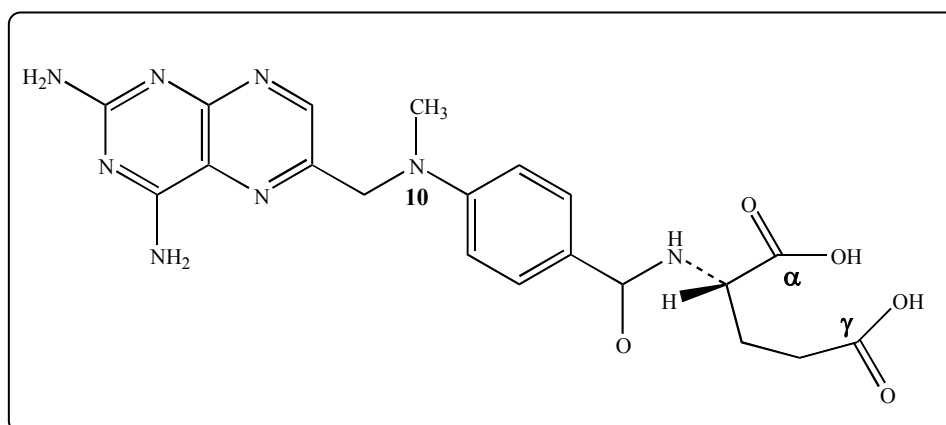


Abbildung 60: Methotrexat (C₂₀H₂₂N₈O₅, Mw: 454.45 g/mol).

Methotrexat löst sich zu 50.0 mg/ml in 2 mol/l Natriumhydroxidlösung. Das Natriumsalz hingegen ist in Wasser gut löslich. In wässrigen Lösungen bei pH 7.0 gilt die Substanz als stabil. In alkalischen Lösungen zersetzt sich Methotrexat nach Kinetik 1. Ordnung zu N¹⁰-

Methylfolsäure durch Hydrolyse. Oberhalb pH 9 nimmt die Zersetzung rapide zu.^[133] In Lösungen liegt es ionisiert vor und ist dadurch bei physiologischen pH-Werten lipid-unlöslich.^[134] Bei Lichteinwirkung baut sich Methotrexat radikalisch zu den Produkten 2,4-Diamino-6-pteridincaraldehyd, 2,4-Diamino-6-pteridincarbonsäure und p-Aminobenzoylglutaminsäure ab. Durch Ausschluß von UV-Strahlung kann der Abbau der Substanz verringert werden. Ab einer Temperatur von 21 °C tritt Zerfall zur N¹⁰-methylpteroylglutamatsäure ein.^[133]

Pharmakokinetische Daten

Methotrexat wird nach oraler Gabe schnell und vollständig resorbiert. Dabei wurden große Varianzen gefunden, die dosisabhängig waren. Ab einer Applikationsrate von 80 mg/m² erfolgt ein eindeutiger Abfall der Bioverfügbarkeit, die ca. 50 % beträgt. Nahrungsaufnahme verzögert die Resorption und führt zu geringeren Maximalspiegeln, die innerhalb der ersten zwei Stunden erhalten werden. Auch hier ist eine hohe Varianz zu verzeichnen, so daß Maximalspiegel bis zu 4 Stunden gemessen wurden. In einem Bereich von 1 - 100 ng/ml liegt Methotrexat zu 50 % an Proteinplasma, hauptsächlich Albumin, gebunden vor.

Die Verteilung im intrazellulären Raum geschieht bis zu einer Konzentration von 0.1 µg/ml durch aktiven Transport und darüber hinaus durch passive Diffusion. Die Verteilung ins Gewebe ist ausgeprägt. Das an die Dihydrofolat-Reduktase gebundene Methotrexat bzw. seine Polyglutamate in Leber, Milz und Niere stellen ein tiefes Kompartiment dar. Die Eliminierung erfolgt erst nach Wochen oder Monaten und bedingt eine wesentliche Zunahme der Toxizität bei wiederholter Anwendung.

Nach intravenöser Gabe fällt die Methotrexatkonzentration im Plasma in einem biexponentiellen Verlauf ab. Die erste Phase (Initial- oder Verteilungsphase) wird mit Halbwertszeiten zwischen 1.5 – 3.5 Stunden und die zweite Phase mit Halbwertszeiten von 8 - 15 Stunden angegeben.

Die Elimination erfolgt schnell und fast ausschließlich über die Nieren. Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden von Seideman *et al.*^[135] über 80 % als Muttersubstanz und ca. 3 % als 7-Hydroxy-Methotrexat im Urin wiedergefunden.

Nach intravenöser Gabe werden sogar bis zu 92 % innerhalb der ersten 24 Stunden als Muttersubstanz im Urin wiedergefunden. In den folgenden Tagen liegt die Ausscheidung bei 1 - 2 % pro Tag.^[93] Eine deutlich langsamere Eliminierung bei oraler Gabe konnte nicht

nachgewiesen werden jedoch wurden nach oraler Gabe auch Ausscheidungsraten von ca. 48 % nach 5 Tagen gefunden, wobei ca. 15 % innerhalb des ersten Tages ausgeschieden wurden. Die Ausscheidung über den Fäzes ist ebenso abhängig von der Applikationsart und liegt nach intravenöser Gabe (0.1 - 10 mg/kg) bei 2 – 5 %. Methotrexat unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf.^[136]

Neben dem zweiphasigen Model wurden auch Modelle mit mehreren Phasen erstellt.

So wurden mittlere terminale Halbwertszeiten von ca. 27 Stunden dem enterohepatischen Kreislauf und der Rückverteilung aus dem Gewebe zugeordnet.^[137] Die Halbwertszeiten schwankten dabei zwischen 6 und 69 Stunden.

Zielsetzung

Um Methotrexat in Kaninchenplasma bestimmen zu können, sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, die in der Lage war, den speziellen Anforderungen des limitierten Plasmavolumens und der Versuchsanordnung Rechnung zu tragen. Dabei war ein sehr großer dynamischer Konzentrationsbereich zu erwarten, der von anderen Detektionssystemen (UV-Systemen) nur unzureichend abgedeckt werden kann. Eine umfangreiche Validierung der Methode nach GLP Richtlinien war nicht gefordert, da die Ergebnisse nicht für eine einzureichende Studie, sondern für Forschungszwecke verwendet wurden. Die Validität der Methode wurde während der Messung durch begleitende Qualitätskontrollproben sichergestellt.

8.1 Geräte und Materialien

- Methotrexat von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, Charge: 08985CW, Reinheitsgrad: 87.60 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- Pipemidsäure von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, Charge: 115H0439, Reinheitsgrad: 83.50 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C
- 1 mol/l Ammoniumhydroxidlösung: 4.0 ml 25 % Ammoniumhydroxidlösung wurden zu 100 ml mit Milli-Q[®]-Wasser verdünnt.
- 0.3 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser für interne Standardlösung: 3.0 ml Ameisensäure wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser verdünnt.
- 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser für mobile Phase: 1.0 ml Ameisensäure wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser verdünnt.

-
- Mobile Phase: 800 ml 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser und 200 ml Acetonitril wurden zusammengegeben. Danach wurde das Fließmittel im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
 - Probengeberspülflüssigkeit: 800 ml 0.3 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser, und 200 ml Acetonitril wurden zusammengegeben. Danach wurde die Probengeberspülflüssigkeit im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
 - Methotrexat Stammlösung-CR, 100 µg/ml: 11.53 mg Methotrexat wurden zu 100.0 ml mit 1 mol/l Ammoniumhydroxidlösung gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
 - Methotrexat Stammlösung-QC, 100 µg/ml: 11.53 mg Methotrexat wurden zu 100.0 ml mit 1 mol/l Ammoniumhydroxidlösung gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
 - Pipemidsäure-interne Standardstammlösung, 3.00 mg/ml: 35.17 mg Pipemidsäure wurden zu 10.0 ml mit 1 mol/l Ammoniumhydroxidlösung gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
 - Pipemidsäure–verdünnte-interne Standardstammlösung, 5 µg/ml: 0.025 ml der Pipemidsäure-interner Standardstammlösung (3.00 mg/ml) wurden zu 15.0 ml mit Milli-Q[®]-Wasser verdünnt.
 - Pipemidsäure-interne Standardarbeitslösung, 50 ng/ml: 0.100 ml der Pipemidsäure-verdünnte-interne Standardstammlösung (5.00 µg/ml) wurden zu 10.0 ml mit 0.3 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser verdünnt.
 - HPLC-Säule: Waters Symmetry[®] C₁₈, 3.5 µm, 50 x 2.1 mm (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland).
 - PE SCIEX API 3000 mit Turbo-IonSpray Interface (Perkin Elmer, Thornhill, Ontario, Kanada).

8.2 Methodenentwicklung

Für die Entwicklung der Methode wurde eine Methotrexat-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg Methotrexat ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in 1.00 ml Acetonitril eingewogen. Diese wurde bei -20 °C aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt.

Aufgrund fehlender Leermatrix von Kaninchen wurde die Entwicklung der Methode mit Humanplasma durchgeführt.

8.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurde die Methotrexat-Stammlösung (1.00 mg/ml) volumetrisch mit einer Mischung aus Acetonitril und 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q®-Wasser (50/50, v/v) auf eine Konzentration von 1.00 µg/ml verdünnt. Diese wurde über eine Spritzenpumpe mit einer Flußrate von 10 µl/min infundiert. Die weiter unten gezeigten Spektren sind mit einer Einheitsmassenauflösung und einer Peakbreite von 0.7 - 0.9 u bei halber Peakhöhe im MCA Modus (10 scans) am API 3000 aufgenommen.

Da es sich bei Methotrexat um ein polares Molekül handelt, ist die Ionisierung mit der APCI-Quelle ungeeignet für eine hohe Ionenausbeute. Es wurde daher zur Erzeugung der Ionen die Elektrospray-Quelle im positiven Modus verwendet. Steinborner und Henion^[138] verwendeten dieselbe Quelle zur massenspektrometrischen Bestimmung von Methotrexat und seines Hauptmetaboliten 7-Hydroxy-Methotrexat aus Humanplasma, sowie Turci *et al.*^[139] zur Bestimmung von Methotrexat aus Urin.

Es konnte das protonierte Molekülion von Methotrexat (m/z 455) erhalten werden (Abbildung 61). Optimale Ionenausbeuten ergaben sich unter Einsatz des Turbo-Elektrosprays mit einem Gasfluß von 7.0 l/min und einer Temperatur von 325 °C.

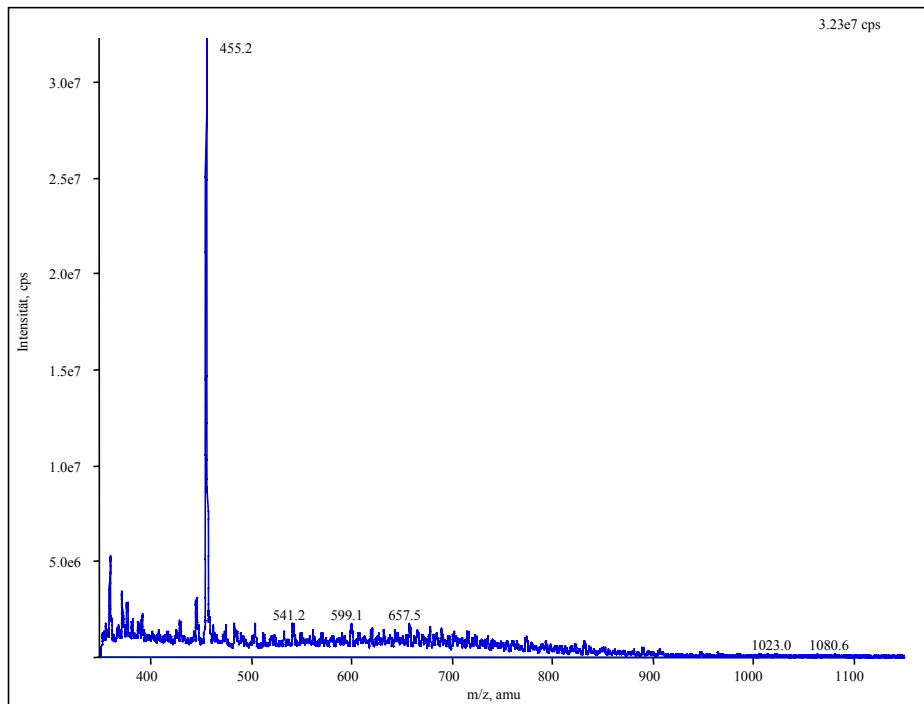


Abbildung 61: Q1-Spektrum von Methotrexat.

Die Ionisierungsspannung wurde nach der endgültigen Festlegung der mobilen Phase auf 4500 V ermittelt. Mit den erhaltenen Werten wurde das Produkt-Ionenspektrum von Methotrexat aufgenommen (Abbildung 62).

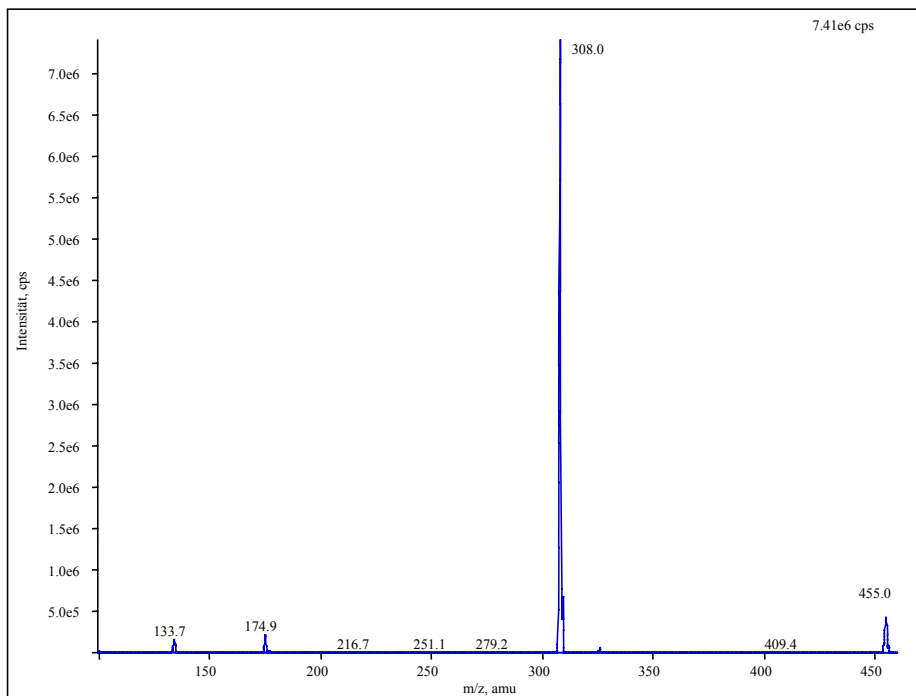


Abbildung 62: Produkt-Ionen-Spektrum von Methotrexat.

Es zeigt sich als Fragment ein Ion bei m/z 308. Dies wurde auch von Steinborner und Henion^[138] sowie Turci *et al.*^[139] verwendet und stellt das Hauptfragment aus Methotrexat dar. Es bildet sich durch die Spaltung der Amidbindung wie in Abbildung 63 gezeigt.

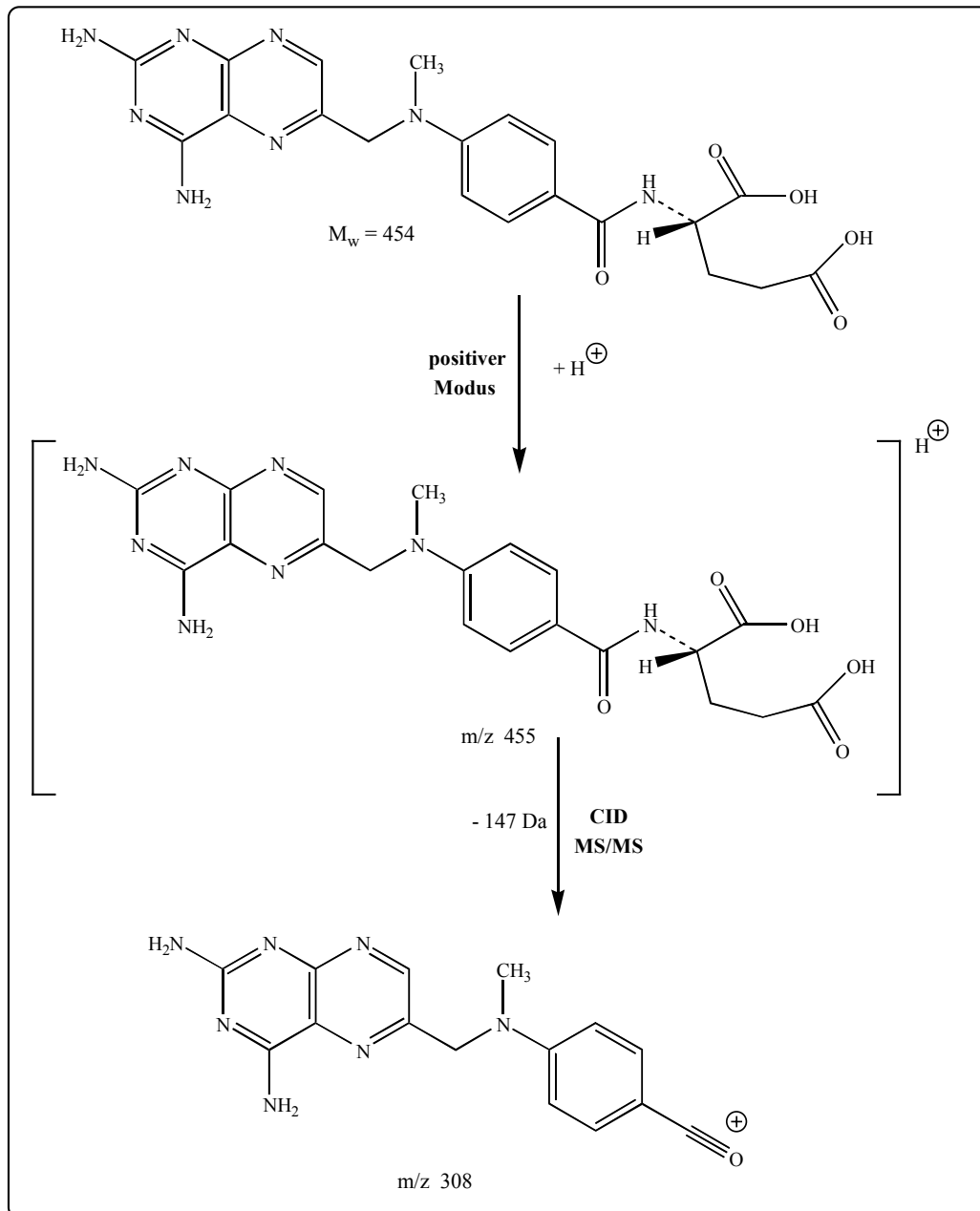


Abbildung 63: Fragmentierung von Methotrexat zu dem Fragment-Ion m/z 308.

Die sich daraus ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen für das API 3000 sind wie folgt:

Ionisierungsmodus: positiv Turbo-Elektrospray; Gasvorhang: 10; Zerstäubergas: 10; Hilfsgas: 7.0 l/min; Kollisions-Gas: 4; Temperatur-Turbo: 325 °C; ISV: 4500 V; OR: 31 V; RNG: 220 V; R02: -38 V; ST3: -58 V; R03: -40 V; Verweilzeit: 200 ms; Zeit-Pause: 2 ms; Massenübergang Methotrexat: m/z 455 \rightarrow m/z 308; Massenübergang Pipemidsäure: m/z 304 \rightarrow m/z 217.

Der Massenübergang m/z 304 \rightarrow m/z 217 (Molekülion \rightarrow Produkt-Ion) entspricht dem Übergang der Pipemidsäure, die als interner Standard verwendet wurde. Die Struktur ist in Abbildung 64 zu sehen. Es handelt sich ebenfalls um ein polares Molekül. Wie auch für Methotrexat ist die Elektrospray-Quelle geeignet, um Pipemidsäure zu ionisieren.

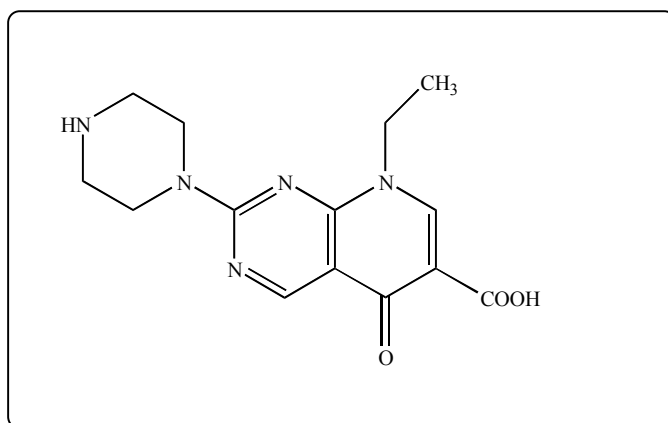


Abbildung 64: Pipemidsäure ($C_{14}H_{17}N_5O_3$, Mw: 303.32 g/mol).

Die Abbildung 65 zeigt das protonierte Molekülion von Pipemidsäure bei m/z 304 unter den oben genannten massenspektrometrischen Bedingungen.

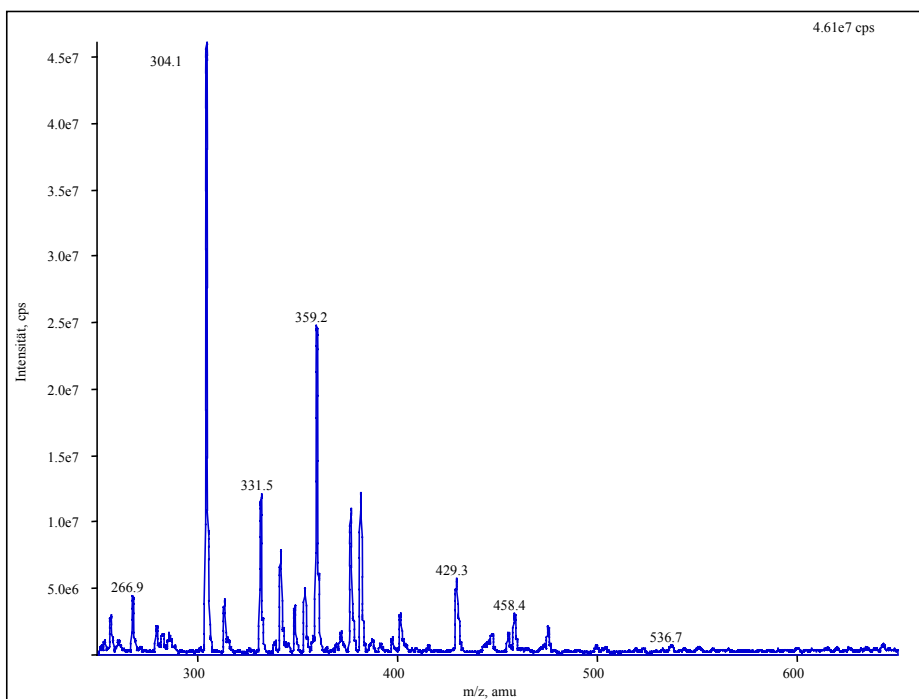


Abbildung 65: Q1-Spektrum von Pipemidsäure.

Das Spektrum der Produkt-Ionen (Abbildung 66) zeigt neben dem Fragment m/z 286, welches durch Abspaltung von Wasser an der Carboxygruppe entsteht, ein Hauptfragment bei m/z 217. Dieses muß, da sein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ungerade ist, eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen verloren haben.

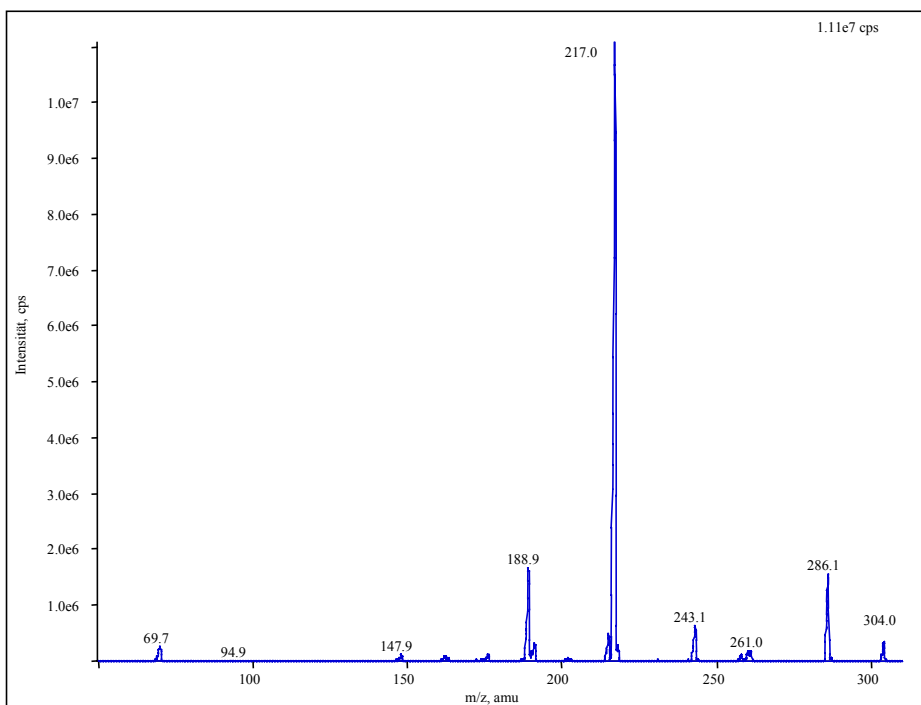


Abbildung 66: Produkt-Ionen-Spektrum von Pipemidsäure.

Neben dem Verlust an Wasser, wird vermutlich der Piperazinring gespalten, woraus das Fragment m/z 261 entsteht bzw. bei Spaltung des Rings und gleichzeitigem Verlust an Wasser das Fragment m/z 243.

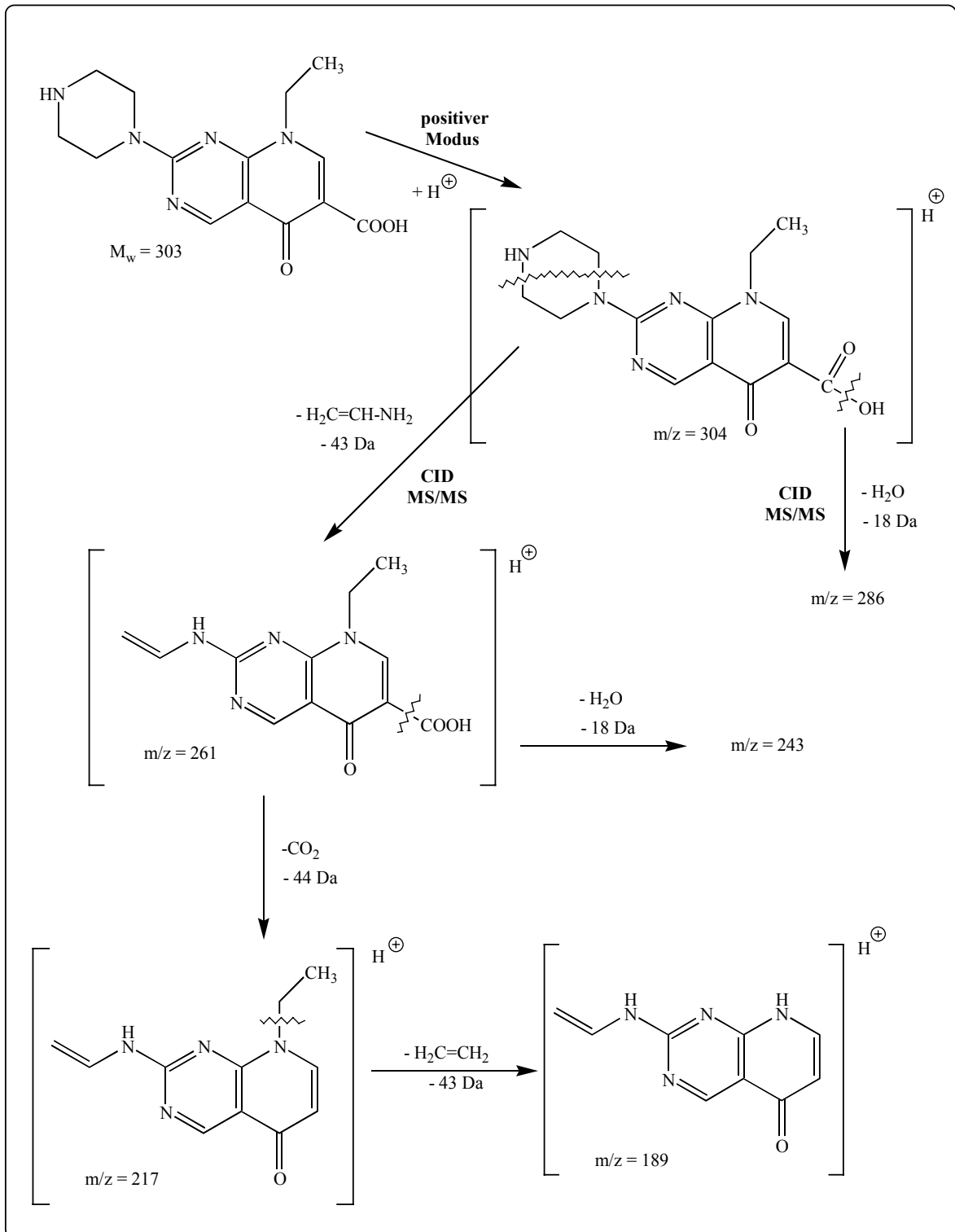


Abbildung 67: Fragmentierungsschema von Pipemidsäure zu den erhaltenen Fragment-Ionen aus Abbildung 66.

Daneben ergibt die Abspaltung von Kohlendioxid aus der Säurefunktion bei gleichzeitiger Spaltung des Piperazinrings das Hauptfragment m/z 217. Aus diesem kann sich durch Verlust der Ethylgruppe des Fragment m/z 189 bilden. Das mögliche Fragmentierungsschema ist in Abbildung 67 dargestellt. Diese Fragmentierung legt den Schluß nahe, daß die Protonierung sowohl am Piperazinring, als auch an der Säuregruppe stattfindet.

Die massenspektrometrischen Bedingungen wurden für die weitere Methodenentwicklung und zur Erstellung eines selektiv überwachten Reaktions-Modus verwendet.

8.2.2 Chromatographische Bedingungen

Da Methotrexat seit den 1950er Jahren klinisch angewandt wird, sind zahlreiche chromatographische Methoden beschrieben. Ende der 1970er mit der Etablierung der HPLC wurden die ersten relevanten Methoden für die chromatographische Trennung nach heutigen Maßstäben publiziert. Watson *et al.*^[140] verwendeten Anionenaustauschersäulen, während Chen und Chiou^[141] die Polarität umdrehten und Kationenaustauschersäulen verwendeten. Jedoch fanden sehr schnell Umkehrphasenmaterialien Anwendung, wie von Nelson *et al.*^[142] und Cairnes und Evans^[143] gezeigt. Die in jüngster Zeit verwendeten Methoden von Florida *et al.*^[144] und Turci *et al.*^[139,145] sowie Steinborner und Henion^[138] bedienen sich alle Umkehrphasenmaterialien. Isokratische Fließmittelbedingungen gehen von einem hohen wässrigen und einem geringen Prozentsatz an organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril aus.^[146]

Entsprechend der Literaturmethoden wurden die chromatographischen Anfangsbedingungen mit einer Fließmittelzusammensetzung von 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser/Acetonitril (70/30, v/v) begonnen. Als Säulenmaterial wurden unterschiedliche Umkehrphasenmaterialien (C₈ und C₁₈) von verschiedenen Hertsellern (Phenomenex, YMC und Waters) benutzt. Die Fließmittelzusammensetzung wurde auf einen organischen Anteil von 20 % gesenkt und eine Säule mit sphärischen Basismaterial (Korngröße 3.5 µm) bei einer Belegung von 19 % Kohlenstoff in Form von C₁₈-Material (endcapped) verwendet. Die Flußrate lag bei 1.0 ml/min und die Laufzeit bei zwei Minuten. Ein Nachsäulensplit ließ 0.4 ml/min des Eluenten in die Quelle gelangen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, wurde die Flußrate auf 0.4 ml/min gesenkt und ohne Split gearbeitet. Um die dadurch entstandene Peakverbreiterung und Laufzeitverlängerung zu kompensieren wurde eine dünnere Säule (2.1 mm Durchmesser) zum Einsatz gebracht, die mit geringeren Flußraten ohne die oben genannten Nachteile betrieben werden konnte. Die Flußrate wurde

nochmals um 50 % auf 0.2 ml/min gesenkt und somit eine Verdoppelung des Signal-Rausch-Verhältnisses im Vergleich zur dickeren Säule erreicht. Die Laufzeit von zwei Minuten konnte beibehalten werden. Das Injektionsvolumen wurde auf 10 µl optimiert. Höhere Injektionsvolumina führten zu einem Verlust der Peaksymmetrie. Um Kontaminationsproblemen durch den Probengeber (L-7250 LaChrom) vorzubeugen, wurde als Spülflüssigkeit die mobile Phase mit einem erhöhten Ameisensäureanteil von 0.3 % verwendet.

Die sich daraus ergebenden chromatographischen Bedingungen sind wie folgt:

Analytische Säule:	Symmetry C ₁₈ , 3,5µ, 2.1x50 mm	
Mobile Phase:	0.1 % Ameisensäure in Milli-Q [®] -Wasser, Acetonitril (800 ml:200 ml)	
Säulentemperatur:	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Flußrate:	0.2 ml/min	
Probengeber-Spülflüssigkeit:	0.3 % Ameisensäure in Milli-Q [®] -Wasser, Acetonitril (800 ml:200 ml)	
Laufzeit:	2.0 Minuten	
Retentionszeiten:	Methotrexat	ca. 0.8 min
	Pipemidsäure	ca. 0.8 min

8.2.3 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung war durch die vorhandenen Mengen an Plasma limitiert. So standen maximal 75 µl Kaninchenplasma zur Verfügung. Um ein Quantifizierungslimit von 1 ng/ml zu erreichen, wurden Versuche mit Proteinpräzipitation durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß ein Quantifizierungslimit von 1 ng/ml so nicht zu erreichen war. Somit wurde auf eine Extraktionsmethode zurückgegriffen. Die Ergebnisse der Proteinpräzipitation ließen den Schluß zu, daß das angestrebte Quantifizierungslimit ohne eine Konzentrierung des Analyten zu erreichen ist. Eine Festphasenextraktion wie sie von Hirai *et al.*^[147] mit Normalphasencharakter oder Aboleneen *et al.*^[148] mit Umkehrphasencharakter verwendet wurden, wurde zurückgestellt.

Eine Präzipitation mit folgender Flüssig-Flüssig-Extraktion versprach eine einfache Aufarbeitungsmethode, eine hohe Probenreinheit und eine geringe bis keine Verdünnung. Dabei sollte der Analyt nicht wie bei Assadullahi *et al.*^[149] in eine organische Phase über-

führt werden, sondern in der wäßrigen Phase bleiben.^[138] Eine Automatisierung wurde aufgrund der geringen Anzahl der Proben nicht angestrebt.

75 µl Plasma wurden mit 100 µl 0.3 % Ameisensäure in Milli-Q®-Wasser, das den internen Standard Pipemidsäure enthielt, versetzt. Die Proteinpräzipitation erfolgte durch Zugabe von 300 µl Acetonitril. Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 750 µl 4 °C kalten Dichlormethan gegeben. Die Lösung wurde 30 Sekunden geschüttelt und 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) und 4 °C zentrifugiert. 75 µl des wäßrigen Überstands wurden in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl jeder Probe wurden mit dem Probengeber injiziert. Mit der Aufarbeitung konnten die Proben bis zu einem Quantifizierungslimit von 1 ng/ml bestimmt werden. Eine Konzentrierung der Proben durch Eindampfen der wäßrigen Phase war nicht notwendig.

Die erhaltenen Chromatogramme 1 und 2 in Abbildung 68 zeigten keine Störungen zu den Retentionszeiten von Methotrexat und des internen Standards auch Aufarbeitung von Leerplasma. Daneben sind in der Abbildung 68 das Chromatogramm des internen Standards (3) und der Kalibrierstandards L11 (4) und L4 (5) abgebildet. Die Konzentrationen ergeben sich aus der Tabelle 54.

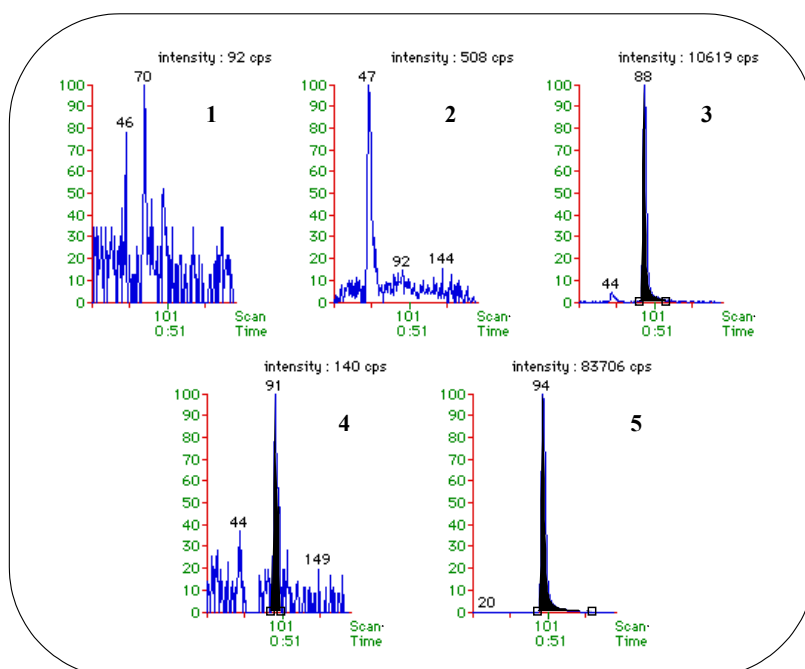


Abbildung 68: Chromatogramme von Methotrexat nach Aufarbeitung aus Plasma. Leerwerte von Methotrexat (1) und internem Standard (2), sowie der interne Standard (3) und die Kalibrierstandards 11 und 4 (4 und 5) von Methotrexat.

8.2.4 Prüfung auf Validität der Methode

Eine Validierung nach GLP Richtlinien wurde wie bei der Zielsetzung angegeben nicht durchgeführt. Die während der Methodenentwicklung erhaltenen Kalibriergeraden waren, bei der Auswertung mittels linear gewichteter Regression (Wichtung 1/Konzentration), in einem Bereich von 1 - 1000 ng/ml linear. Die Selektivität konnte für Humanplasma erhalten werden (Abbildung 68) und eine Systempräzision über 20 Proben ergab einen Variationskoeffizienten von 7.8 % für die Peakflächenverhältnisse.

Die erhaltenen Daten wurden für ausreichend erachtet, um die vergleichende Messung von Methotrexat in Kaninchenplasma durchzuführen. Dabei wurde in Kauf genommen, daß der absolute Wert der Plasmakonzentrationen möglicherweise ungenau bestimmt wurde, da gegen Kalibrierstandards in Humanplasma ausgewertet wurde. Dies stellte jedoch kein Hindernis bei der gegebenen Aufgabenstellung dar, die einen reinen Vergleich zu Studienzwecken vorsah.

8.3 Studie

Bei der Entfernung der Harnblase aufgrund eines Urothelkarzinoms erhalten Patienten unter anderem ein Ileumconduit (künstlicher Harnableitungsweg). In den folgenden zwei Jahren erleiden viele Patienten, die bei lokal begrenztem Harnblasenkarzinomen zystektomiert wurden, ein Rezidiv und müssen chemotherapiert werden. Methotrexat wird in diesem Bereich als Chemotherapeutikum eingesetzt.

Bei der Behandlung von Patienten, die wegen eines Tumorprogresses mit Methotrexat behandelt wurden, wurden erhöhte und verzögerte Serumspiegel gegenüber Patienten mit normal ableitenden Harnwegen gefunden. Dies wurde in Verbindung mit einer Rückresorption von Methotrexat über das Ileumconduit gesetzt.^[150]

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden standardisierte Bedingungen geschaffen, um die Resorption von Methotrexat nach einer Blasenaugmentation mit normal ableitenden Harnwegen zu vergleichen.

Auch hier wurde ausschließlich der analytische Teil des Versuchs durchgeführt. Alle klinischen Anteile dieser Studie wurde von Frau Dr. Krege an der Uniklinik Essen durchgeführt.

8.3.1 Studiendesign

Zur Untersuchung wurde bei 10 männlichen Neuseeland Kaninchen (VI-XV) die Blase mit Darm vergrößert. Die Tiere waren vor Beginn der Operation 10 Monate alt und hatten ein Gewicht von 2.0 - 2.5 kg. Die artgerechte Haltung während der Studie war gewährleistet. Zur Kontrolle dienten 5 weitere Kaninchen (I-V).

Untersuchungszeitpunkte 1, 4 und 12 Monate postoperativ:

Die Tiere wurden narkotisiert und ein Ballonkatheter in die Blase gelegt. Die Blase wurde entleert und 6 ml einer MTX-Fertiglösung (entsprechend 30 mg) in die Harnblase instilliert. Die Hinterbeine der Tiere wurden regelmäßig bewegt und die Blasenregion leicht massiert, um eine gleichmäßige Verteilung des Instillates zu gewährleisten.

Die Blutabnahme erfolgte arteriell nach 15, 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten.

Innerhalb von 2 Stunden mußte die Blase der Kaninchen entleert werden, und wurde daher nach 30, 60 und 90 Minuten über den Katheter entleert. Um einen Verdünnungseffekt zu vermeiden wurde neues Instillat eingefüllt. Nach 120 Minuten wurde die Blase entleert und

die Narkose beendet, die letzte Blutentnahme erfolgte am erwachten Tier. Die Blutproben wurden nach Entnahme unmittelbar zentrifugiert und das Plasma bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Untersuchungszeitpunkte 9 Monate postoperativ:

Die Tiere wurden narkotisiert und ein Blasenkatheter wurde in die Blase gelegt, so daß die Blase kontinuierlich geleert wurde. Die Medikation erfolgte intravenös, wobei die gleiche Menge an Methotrexat (30 mg) gegeben wurde. Die Blutabnahme erfolgte nach 5, 15, 30, 45, 60, 120 und 240 Minuten arteriell. Die Blutproben wurden nach Entnahme unmittelbar zentrifugiert und das Plasma bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Bei beiden Versuchsanordnungen wurde ein Leerwert vor Versuchsbeginn entnommen.

Die Proben wurden bei $< -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Analyselabor verschickt und dort bei gleicher Temperatur bis zur Messung gelagert.

8.3.2 Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben

Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden nach dem Pipettierschema aus Tabelle 54 hergestellt und bei $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Konzentration Methotrexat ($\mu\text{g/ml}$)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
8.98	L1	MTX-SL-CR	0.200	1.800
4.49	L2	MTX-SL-CR	0.100	1.900
1.80	L3	MTX-SL-CR	0.100	4.900
0.898	L4	MTX-SL-CR	0.050	4.950
0.674	L5	L4	1.500	0.500
0.225	L6	L5	0.750	1.500
0.112	L7	L6	1.000	1.000
0.0561	L8	L7	1.000	1.000
0.0225	L9	L8	1.000	1.500
0.00898	L10	L9	1.000	1.500
0.00449	L11	L10	1.000	1.000
0.00180	L12	L11	1.000	1.500
0.00135	L13	L12	1.200	0.400
0.000898	L14	L13	0.600	0.300
0.717	QC1	MTX-QC-SL	0.040	4.960
0.179	QC2	QC1	0.750	2.250
0.0359	QC3	QC2	0.500	2.000
0.00359	QC4	QC3	0.200	1.800

Tabelle 54: Pipettierschema zur Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Die Studienproben wurden in insgesamt sieben Sequenzen gemessen. Da der Konzentrationsbereich der Proben sehr groß war und den dynamischen Bereich des Detektors überschritt, wurden insgesamt 14 Kalibrierstandards verwendet und der gesamte Kalibrierbereich in zwei dynamische, sich überschneidende Bereiche geteilt. Die Auswertung erfolgte entweder über die Kalibrierstandards L1 – L10 oder über L4 – L14. In keinem der gemessenen Leerwerte konnten Signale zu den Retentionszeiten von Methotrexat oder des internen Standards registriert werden, wodurch sich die Spezifität der Methode für Kaninchenplasma zeigte. Für alle verwendeten Kalibriergeraden lagen die Korrelationskoeffizienten ≥ 0.9986 .

Tabelle 55 zeigt die statistische Auswertung der Kalibriergeraden ausgewertet, über die Kalibrierstandards L1 – L10 und die zugehörigen Qualitätskontrollproben der Studie.

Qualitäts-Kontroll-Probe bzw. Kalibrier-Standard	Theoretische Konzentration an Methotrexat ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl der Proben	Mittelwert ($\mu\text{g/ml}$)	s ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
L1	8.98	3	9.25	0.440	4.8
L2	4.49	3	4.61	0.151	3.3
L3	1.80	3	1.78	0.0252	1.4
L4	0.898	3	0.881	0.0478	5.4
L5	0.674	3	0.673	0.0465	6.9
L6	0.225	3	0.218	0.00799	3.7
L7	0.112	3	0.107	0.00104	1.0
L8	0.0561	3	0.0547	0.00154	2.8
L9	0.0225	3	0.0220	0.00127	5.8
L10	0.00898	3	0.00982	0.000797	8.1
QC 1	0.717	8	0.716	0.0389	5.4
QC 2	0.179	8	0.172	0.00953	5.5
QC 3	0.0359	8	0.0353	0.00247	7.0

Tabelle 55: Statistische Auswertung der Kalibrierstandards L1 – L10 und der Qualitätskontrollproben von Methotrexat während der Studie.

Die Auswertung erfolgte über eine gewichtete lineare Regression (Wichtung $1/\text{Konzentration}$). Alle Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben waren innerhalb einer Genauigkeit von $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ für den kleinsten Kalibrierstandard). Die Mittelwerte weichen nur gering von den theoretischen Konzentrationen ab und die Variations-

koeffizienten sind mit 1.0 % - 8.1 % für die Kalibrierstandards und 5.4 % - 7.0 % für die Qualitätskontrollproben in einem für diese Technik üblichen Bereich.

Tabelle 56 zeigt die statistische Auswertung der Kalibriergeraden, ausgewertet über die Kalibrierstandards L4 – L14 und die zugehörigen Qualitätskontrollproben der Studie.

Qualitätskontrollprobe bzw. Kalibrierstandard	Theoretische Konzentration an Methotrexat (µg/ml)	Anzahl der Proben	Mittelwert (µg/ml)	s (µg/ml)	CV (%)
L4	0.898	6	0.901	0.0173	1.9
L5	0.674	5	0.673	0.0161	2.4
L6	0.225	6	0.226	0.00959	4.2
L7	0.112	6	0.111	0.00668	6.0
L8	0.0561	6	0.0552	0.00238	4.3
L9	0.0225	6	0.0214	0.00105	4.9
L10	0.00898	6	0.00839	0.000344	4.1
L11	0.00449	6	0.00455	0.000271	5.9
L12	0.00180	4	0.00187	0.000144	7.7
L13	0.00135	5	0.00133	0.0000887	6.7
L14	0.000898	6	0.000990	0.0000411	4.2
QC1	0.717	17	0.737	0.0518	7.0
QC2	0.179	17	0.174	0.0132	7.6
QC3	0.0359	17	0.0354	0.00318	9.0
QC4	0.00359	17	0.00363	0.000480	13.2

Tabelle 56: Statistische Auswertung der Kalibrierstandards L4 – L14 und der Qualitätskontrollproben von Methotrexat während der Studie.

Die Auswertung der Kalibrierstandards L4 – L14 erfolgte ebenfalls über eine gewichtete lineare Regression (Wichtung 1/Konzentration). Bis auf drei Kalibrierstandards lag die Genauigkeit bei $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ für den kleinsten Kalibrierstandard). Das minimale Signal-Rausch-Verhältnis an der Bestimmungsgrenze lag bei 9. Die Genauigkeit der Qualitätskontrollproben war für alle bis auf vier Proben gegeben. Die Variationskoeffizienten für die Kalibriergeraden lagen mit Werten von 1.9 % - 7.7 % in einem vergleichbaren Rahmen wie die Werte bei Tabelle 55. Hingegen zeigten die Qualitätskontrollproben mit Variationskoeffizienten von 7.0 % - 13.2 % höhere Werte.

Die Tatsache, daß aus dem unteren Bereich der Kalibriergeraden Kalibrierstandards nicht verwendet werden konnten, zeigt die Grenzen der Methode auf. Die Variations-

koeffizienten der Qualitätskontrollproben zeigen ebenfalls die größere Varianz an der Bestimmungsgrenze und damit die Grenzen der Methode.

Anhand der Gegenüberstellung der Qualitätskontrollproben 1 - 3 kann eine Abschätzung erfolgen, wie groß die durch die unterschiedlichen dynamischen Bereiche entstehenden Ungenauigkeiten sind. Die Tabelle 57 zeigt die Mittelwerte der Qualitätskontrollen 1 - 3, ausgewertet über die Kalibrierstandards L1 - L10 oder L4 - L14 und die Differenz zwischen beiden.

Qualitätskontrollprobe bzw. Kalibrierstandard	Theoretische Konzentration an Methotrexat (µg/ml)	Auswertung über L1-L10 (µg/ml)	Auswertung über L4-L14 (µg/ml)	Differenz (%)
QC1	0.717	0.716	0.737	2.8
QC2	0.179	0.172	0.174	1.1
QC3	0.0359	0.0353	0.0354	0.3

Tabelle 57: Vergleich der Qualitätskontrollproben 1-3 nach Auswertung über die Kalibrierstandards L1 - L11 oder L4 - L14 und die sich ergebende Differenz.

Die Differenzen von $\leq 2.8\%$ zeigen die Berechtigung, die Proben entweder über die Kalibrierstandards L1 - L10 oder L4 - L14 auszuwerten. Die sich daraus ergebenden Unterschiede haben keine Auswirkung auf das Ergebnis der Studienproben.

8.3.3 Studienergebnisse

Von den theoretisch 435 zu entnehmenden Blutproben konnten 26 aufgrund der Zustände der Kaninchen nicht entnommen werden und entziehen sich somit der Analytik. Die restlichen 409 Proben wurden mit der unter 8.2 beschriebenen Methode quantitativ bestimmt, wobei die Gesamtzahl der gemessenen Proben inklusive Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben 639 betrug.

Wie unter 8.3 erläutert, sollte ein Vergleich der Resorption von Methotrexat zwischen Kaninchen mit Blasenaugmentation und ohne vorherige Behandlung stattfinden. Eine Kinetik wurde für die Versuche 1, 4 und 12 Monate nach der Operation nicht durchgeführt. Die Abbildung 69 zeigt einen Vergleich der erhaltenen Plasmaspiegel nach den unter 8.3.1 beschriebenen Versuchen.

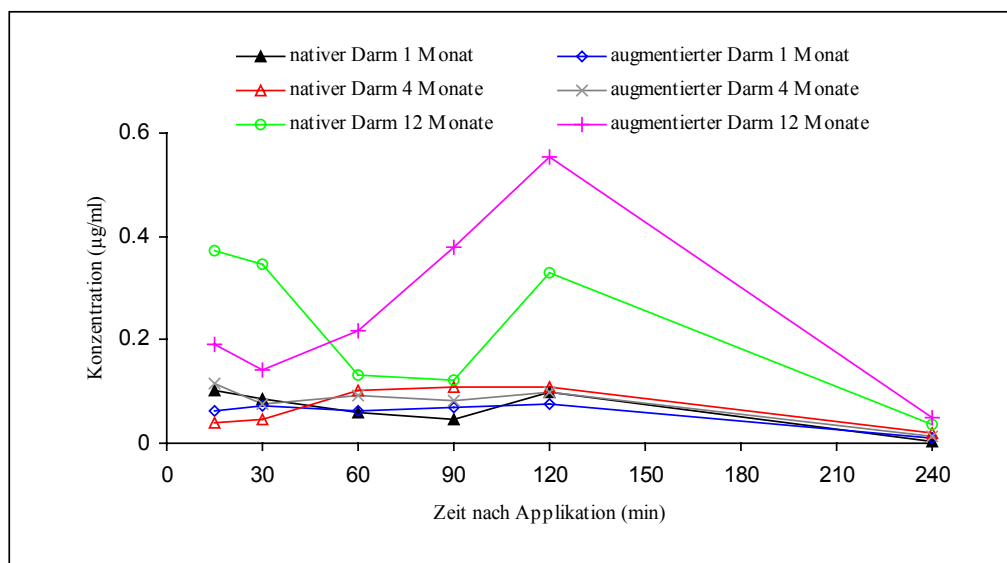


Abbildung 69: Graphische Darstellung der Methotrexatkonzentrationen nach den Versuchen 1, 4 und 12 Monate postoperativ.

Aus der Abbildung 69 ist zu erkennen, daß kein ausgeprägter Unterschiede zwischen den Tieren mit nativem und augmentiertem Darm besteht. Die Werte für die Versuche nach 1 und 4 Monaten nach der Operation liegen alle sehr nah zusammen. Hingegen wurden deutlich höhere Konzentrationen nach 12 Monaten gefunden. Der Anstieg der Konzentrationen erfolgte jedoch sowohl bei den Tieren mit nativem als auch mit augmentiertem Darm. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen diesen Gruppen auch hier nicht festgestellt werden. Die hier gezeigten Konzentrationen enthalten keine Berücksichtigung der Resorptionsfläche. Eine Auswertung der Oberfläche der Organe und die sich ergebenden Korrekturfaktoren finden sich bei Krege.^[151] So muß davon ausgegangen werden, daß eine doppelte Resorptionsfläche auch zu einer erhöhten Methotrexatkonzentration führt, sollte die Theorie der Resorption über die ersetzte Blase erfolgen. Für den Versuch nach 9 Monaten zeigt die Abbildung 70 die sich ergebende Graphik.

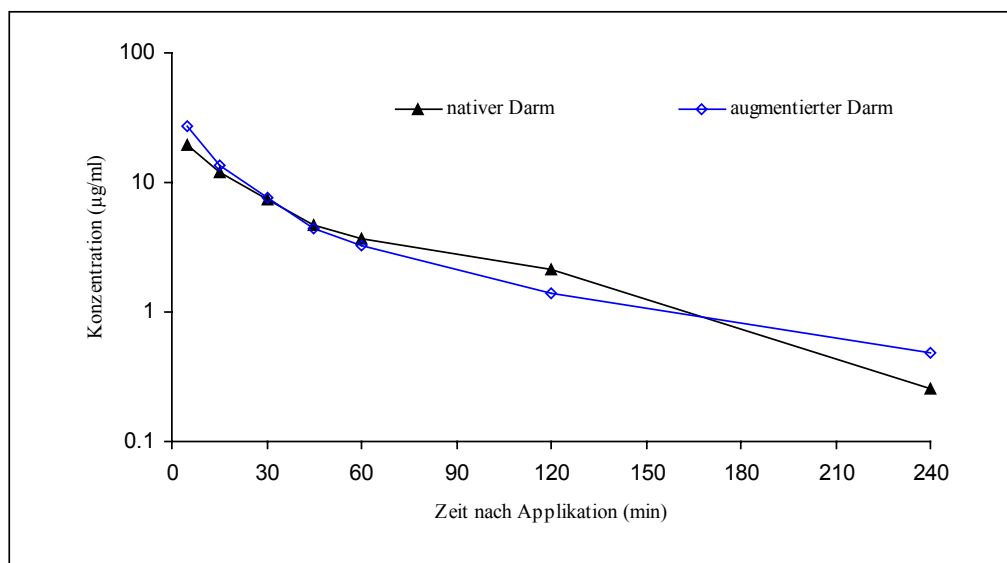


Abbildung 70: Halblogarithmische graphische Darstellung der Methotrexatkonzentrationen nach dem Versuch 9 Monate postoperativ.

Auch anhand der Daten des Versuchs 9 Monate nach der Operation sind keine signifikanten Unterschiede in den Methotrexatkonzentrationen zu erkennen. Eine Berechnung der AUC wurde nicht durchgeführt, da die Blutentnahme nur bis vier Stunden nach der Applikation erfolgte. Dieser Zeitraum deckt weitestgehend nur die erste Phase der Eliminierung (Verteilungsphase) ab. Dies wird auch durch die sich ergebenden Halbwertszeiten erkennbar. Für die augmentierten Kaninchen ergibt sich eine Halbwertszeit von 70 Minuten und für die nicht operierten Kaninchen von 50 Minuten.

Aufgrund dieses Versuches muß davon ausgegangen werden, daß die Resorption von Methotrexat nach einer Blasenaugmentation vergleichbar mit der von normal ableitenden Harnwegen ist. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen erhöhten und verzögerten Serumspiegeln von Patienten, die ein Ileumconduit eingesetzt bekommen haben und anschließend wegen eines Tumorprogresses mit Methotrexat behandelt wurden, gegenüber Patienten mit normal ableitenden Harnwegen kann durch diesen Versuch nicht erhärtet werden.

8.4 Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Methode wurde direkt auf die Anforderungen der zu messenden Proben hin entwickelt. Eine weitere Verringerung der Nachweisgrenze ist nicht notwendig gewesen und somit konnte die Aufarbeitung weitestgehend kosten- und zeitgünstig

entwickelt werden. Die polare Molekülstruktur ermöglichte den Verbleib des Analyten nach einer Proteinpräzipitation in der wässrigen Phase. Der organische Anteil konnte mittels Dichlormethan extrahiert und der Analyt direkt aus der wässrigen Phase analysiert werden. Die einzusetzende Ionisierungsquelle war aufgrund der polaren Molekülstruktur auf die Elektrospray-Quelle reduziert.

Eine weitere Reduzierung der Nachweisgrenze könnte mittels Konzentrierung des Analyten während der Aufarbeitung erfolgen. Da die einzusetzende Menge an Kaninchenplasma mit 75 µl jedoch begrenzt war und der Analyt nach einer Konzentrierung erneut gelöst werden müßte (ca. 100 µl Minimum), kann dadurch maximal ein Faktor zwei an Empfindlichkeit gegenüber der entwickelten Methode erzielt werden. Der dadurch entstehende Mehraufwand an Zeit und Material rechtfertigte dies nicht. Da die eingesetzte Ionisierungsmethode wie in 2.2.2.2 gezeigt konzentrationsabhängig ist, kann durch eine Konzentrationserhöhung des Analyten in der Quelle die Nachweisgrenze herabgesetzt werden. Der Einsatz einer Säule mit 2.1 mm Durchmesser konnte bei gleichbleibender Meßzeit einen Intensitätsgewinn von 2 gegenüber einer Säule mit 4.6 mm Durchmesser erzielen, wobei die Flußrate des Eluenten um die Hälfte reduziert wurde. Dies war nur möglich, da die Probe durch die Proteinpräzipitation und anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion weitestgehend aufgereinigt wurde und sich keine Matrixeinflüsse in der Quelle negativ auswirkten. Somit konnte mit dem gegebenen Volumen an Plasma eine optimale Aufarbeitung für die gegebenen Anforderungen entwickelt werden.

Bei der Messung der Plasmaproben zeigte sich die Methode als robust und den Anforderungen hinsichtlich Präzision und Genauigkeit als ausreichend. Das Problem, einen sehr großen Linearitätsbereich abzudecken, konnte durch die Teilung der Kalibriergeraden in zwei sich überschneidende dynamische Bereiche gelöst werden. Anhand der Qualitätsproben, die mit Hilfe beider Kalibriergeraden quantitativ bestimmt wurden, konnte gezeigt werden, daß die Teilung des Meßbereichs keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Studie hatten. Die Abweichungen lagen wie unter 8.3.2 gezeigt bei $\leq 2.8\%$.

Die erhaltenen Konzentrationspiegel der Kaninchenplasmen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den augmentierten und den unbehandelten Tieren in beiden Versuchsanordnungen. Aufgrund der ermittelten Konzentrationen konnte die Theorie einer Rückresorption von Methotrexat über das Ileumconduit gegenüber normal ableitenden Harnwegen nicht erhärtet werden.

9 Ketoprofen

Ketoprofen (KEP) wurde 1967 in den Laboren von Rhône-Poulenc in Frankreich synthetisiert und 1973 auf den Markt gebracht. Es erweitert die Gruppe der nicht-steroiden Antiphlogistika (NSAR). Seine pharmakologischen Eigenschaften sind denen anderer NSAR's vergleichbar.

Ketoprofen wird als entzündungshemmender Wirkstoff bei rheumatischen und anderen schmerzhaften Gelenkerkrankungen, bei postoperativen oder posttraumatischen Schmerzen sowie bei Zahn- und Kopfschmerzen eingesetzt.

Sein Wirkmechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist der Eingriff in die Prostaglandinsynthese. Dabei wird die Cyclooxygenase gehemmt. Die Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist dabei für die entzündungshemmende, schmerzstillende und anti-pyretische Wirkung ausschlaggebend. Die Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) ist Ursache der unerwünschten Nebenwirkungen.

Chemie

Ketoprofen (R,S)-2-(3-Benzoylphenyl)-propionsäure liegt als weißes bis hellgelbes Pulver vor. Bei Raumtemperatur ist die Substanz stabil. Der Schmelzpunkt wird mit 94 °C angegeben. Die Substanz ist sehr unpolar und löst sich nicht in Wasser. Der Verteilungskoeffizient von Octanol/Wasser wurde zu 0.105 ermittelt. Die Acidität der Säure wurde daher für Gemische aus organischen Lösungsmitteln und wäßriger Phase angegeben. Die ermittelten pK_a -Werte für die saure Gruppe liegen zwischen 5 und 7, müssen jedoch als Schätzungen angesehen werden. Die Substanz ist in Ethanol zu 50 mg/ml löslich. In unpolaren Lösungsmitteln wie Diisopropylether, Chloroform bis hin zu polaren organischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid ist Ketoprofen leicht löslich. Abbildung 71 zeigt die Struktur von Ketoprofen mit dem gekennzeichneten Chiralitätszentrum.

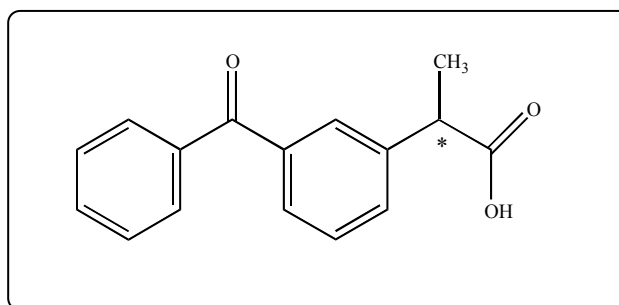


Abbildung 71: Ketoprofen (C₁₆H₁₄O₃, Mw:254.29 g/mol).

Pharmakokinetische Daten

Ketoprofen wird nach oraler Gabe rasch und vollständig vom Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die maximalen Wirkstoffkonzentrationen treten nach 0.5 bis 2.5 Stunden auf. Die Resorptionsgeschwindigkeit wird durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme reduziert, nicht jedoch die Bioverfügbarkeit, welche bei 92 % liegt.^[152] Die pharmakologische Aktivität wird dabei auf das S(+)-Enantiomer zurückgeführt.^[153]

Nach einer einzelnen oralen Dosis von 50 mg Ketoprofen ohne Nahrungsmittelaufnahme liegen die Maximalkonzentrationen nach 1 Stunde bei durchschnittlich 4.1 µg/ml im Plasma. Mit Nahrungsaufnahme nach 2 Stunden bei 2.4 µg/ml.^[93]

In einem Bereich von 75 - 200 mg bei oraler Gabe verläuft die Fläche-unter-der-Konzentrations-Zeit-Kurve in einer linearen Abhängigkeit zur Dosierung. Die Werte unterliegen jedoch inter- und intraindividuellen Schwankungen.

Der therapeutische Konzentrationsbereich im Plasma wurde nicht eindeutig bestimmt, wurde aber mit 0.4-6.0 µg/ml vorgeschlagen.

Die Substanz ist zu 99 % an Plasmaeiweiße vorwiegend Albumin gebunden.^[154]

Die Verteilung von Ketoprofen in das Gewebe ist nicht vollständig untersucht. In der Synoviaflüssigkeit finden sich ca. 30 % der Plasmakonzentration wieder. Nach einigen Stunden übersteigt die Konzentration in Synovia die im Plasma, da hier die Halbwertszeit höher liegt als im Plasma. Plasmakonzentrationen nach einer Applikation von 50 mg betragen nach 3 Stunden ca. 0.9 µg/ml. Die Plasmahalbwertszeit beträgt bei einfacher oraler Gabe 1 bis 4 Stunden und ist bei älteren Menschen verlängert. Durch Retardtabletten kann diese auf über 5 Stunden anwachsen, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht mehr die eigentliche Eliminierung, sondern die Freisetzung der Substanz aus der Tablettenmatrix ist. Ketoprofen wird in der Leber an Glukonsäure konjugiert. Weitere Metaboliten konnten bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Die Eliminierung findet vorwiegend renal statt. Nach einfacher Gabe wurden in gesunden Erwachsenen zwischen 50-90 % der Dosis im Urin und zwischen 1-8 % im Fäzes wiedergefunden. Die maximale Metabolitenkonzentration wurde im Urin innerhalb der ersten 24 Stunden und in der Fäzes zwischen 24-48 Stunden gefunden. Der Anteil der Muttersubstanz liegt dabei < 1 %.

Zielsetzung

Zur Bestimmung von Ketoprofen nach topischer und intramuskulärer Applikation sollten flüssigkeitschromatographische Methoden entwickelt werden, mit denen die Wirkstoffkonzentration in Plasma und in Dialysat bestimmt werden können. Die bis dato publizierten Methoden, die sich der UV-Detektion bedienen, erreichten ein Quantifizierungslimit von 20 ng/ml.^[155] Dieses wurde für die Quantifizierung von Ketoprofen nach topischer und intramuskulärer Applikation als nicht ausreichend angesehen, um die Ketoprofenkonzentrationen zu bestimmen. Um das Quantifizierungslimit gegenüber Methoden mit UV-Detektion zu senken, sollte als Detektor ein MS/MS-Detektor eingesetzt werden. Für die unterschiedlichen Matrices sollten entsprechende Aufarbeitungs-, Trenn- und Detektionsmethoden ermittelt werden. Eine Trennung der Enantiomere wie sie von Hoke *et al.*^[156] aus Humanplasma mittels superkritischen Flüssigkeits-Chromatographie mit angeschlossener LC-MS/MS-Detektion oder von Carr *et al.*^[157] aus Humanplasma und Urin mittels HPLC-UV-Detektion durchgeführt wurden, war nicht gefordert, daher wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen. Die Methoden zur quantitativen Bestimmung von Ketoprofen sollten nach GLP-Standard validiert werden und zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von 12 Probanden in den Matrices zur Anwendung gebracht werden, daher war die Entwicklung einer robusten und sensitiven Analytik notwendig.

9.1 Geräte und Materialien

- Ketoprofen von Procter & Gamble, Mason, Ohio, USA, Charge: RS-1892, Reinheitsgrad: 99.55 %, Lagerbedingungen: bei ca. 4 °C,
- [¹³C²H]-Ketoprofen von Procter & Gamble, Mason, Ohio, USA
- PE SCIEX API 3000 (Perkin Elmer, Toronto, Ontario, Kanada).

9.1.1 Geräte und Materialien für die Methode in Plasma

- Waschlösung: 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser: 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 1 ml Ameisensäure zupipettiert.
- Waschlösung: 10 % Acetonitril in Milli-Q[®]-Wasser: 900 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 100 ml Acetonitril zupipettiert.
- 0.1 % Essigsäure in Milli-Q[®]-Wasser für Elutionslösung: 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 1 ml Essigsäure zupipettiert.
- Fließmittelpuffer: 0.0075 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.5: 0.58 ± 0.01 g Ammoniumacetat wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure auf 3.5 eingestellt.
- Puffer für Probengeberspülflüssigkeit: 0.02 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0: 1.54 ± 0.02 g Ammoniumacetat wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure auf 5.0 eingestellt.
- Puffer für interne-Standardarbeitslösung, 0.1 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 2.5: 7.71 ± 0.05 g Ammoniumacetat wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Ameisensäure auf 2.5 eingestellt.
- Fließmittel: 350 ml 0.0075 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.5, 350 ml Acetonitril und 300 ml Methanol wurden zusammengegeben und durchmischt. Danach wurde das Fließmittel im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
- Elutionslösung: 650 ml Acetonitril und 350 ml 0.1 % Essigsäure in Milli-Q[®]-Wasser wurden zusammengegeben und durchmischt.
- Probengeberspülflüssigkeit: 400 ml 0.02 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0 und 600 ml Acetonitril wurden zusammengegeben und durchmischt.
- Ketoprofen Stammlösung-CR, 50.0 µg/ml: 10.05 mg Ketoprofen wurden zu 200.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.
- Ketoprofen Stammlösung-QC, 800 µg/ml: 16.07 mg Ketoprofen wurden zu 20.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. -70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.

- [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-interne-Standardstammlösung, 1.00 mg/ml: 1.00 \pm 0.02 mg [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen wurden zu 1.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. - 70 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-verdünnte-interne-Standardstammlösung, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 0.010 ml der [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-interner-Standardstammlösung (1.00 mg/ml) wurden zu 1.00 ml mit Acetonitril verdünnt. Die Lösung wurde bei ca. - 70 °C in 2 ml Mikro-Schraubgefäßen gelagert.
- [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-interne-Standardarbeitslösung, 50.0 ng/ml: 0.250 ml der [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-verdünnten-internen-Standardlösung (10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden zu 50.0 ml mit 0.1 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 2.5 verdünnt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur maximal 24 Stunden gelagert.
- HPLC-Säule, Grom-SIL 80 Amino-3 CP, 5 μm , 40 x 4.6 mm (Grom, Herrenberg-Kayh, Deutschland).

9.1.2 Geräte und Materialien für die Methode in Dialysat

- 0.1 % Essigsäure in Milli-Q[®]-Wasser für Fließmittel: 1000 ml Milli-Q[®]-Wasser wurden genau abgemessen und unter Rühren 1 ml Essigsäure zupipettiert.
- Puffer für Probengeberspülflüssigkeit, 0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0: 0.38 \pm 0.02 g Ammoniumacetat wurden zu 1000 ml mit Milli-Q[®]-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure auf 5.0 eingestellt.
- Fließmittel: 500 ml Acetonitril und 500 ml 0.1 % Essigsäure in Milli-Q[®]-Wasser wurden zusammengegeben und durchmischt. Danach wurde das Fließmittel im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.
- Probengeberspülflüssigkeit: 480 ml 0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0 und 520 ml Acetonitril wurden zusammengegeben und durchmischt.
- Ketoprofen Stammlösung-CR, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 10.05 mg Ketoprofen wurden zu 50.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. - 70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.
- Ketoprofen Stammlösung-QC, 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 9.04 mg Ketoprofen wurden zu 50.0 ml mit Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde bei ca. - 70 °C in 3.5 ml Glasgefäßen gelagert.

- [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen–interne-Standardarbeitslösung, 50.0 ng/ml: 0.125 ml [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen-verdünnten-internen-Standardlösung (10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden zu 50.0 ml mit Fließmittel verdünnt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur maximal 24 Stunden gelagert.
- HPLC-Säule, Luna[®] C8(2), 3.0 μm , 50 x 4.6 mm (Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland).

9.2 Methodenentwicklung

Der Methodenentwicklung soll an dieser Stelle keine besondere Bedeutung beigemessen werden. Ketoprofen als Substanz wird seit der vollständigen Etablierung der HPLC chromatographisch von unterschiedlichen biologischen Matrices, wie Plasma und Urin getrennt. So haben Farinotti und Mahuzier^[158] sowie Bannier *et al.*^[159] Ketoprofen Ende der 1970er bzw. Anfang der 1980er aus biologischen Matrices nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Umkehrphasen chromatographisch quantifiziert. Seit dieser Zeit haben sich keine wesentlichen Neuerungen bei der chromatographischen Trennung ergeben. Neue Säulenmaterialien ließen die Trennung der Enantiomeren zu, wie von Carr *et al.*^[157] und Lovlin *et al.*^[160] berichtet. Diese HPLC-UV-Methoden erreichten mit eingesetzten 500 μl Plasma Bestimmungsgrenzen von 50 ng/ml unter Verwendung von Flüssig-Flüssig-Extraktionen. Vergleichbare Bestimmungsgrenzen wurden von Hirai *et al.*^[161] mit normaler Festphasenextraktion und von Boisvert *et al.*^[162] mit Umkehrfestphasenextraktion erhalten. Bei der gegebenen Aufgabenstellung sollten jedoch Plasmaspiegel deutlich unterhalb von 50 ng/ml bestimmt werden. Als Bestimmungsgrenze wurden 0.500 ng/ml angestrebt. Die Arbeit von Leis *et al.*^[163] zeigte, daß mit der Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie Bestimmungsgrenzen von 1.01 ng/ml mit einem eingesetzten Volumen von 1 ml Plasma erreicht werden können. Das Molekül mußte dazu jedoch derivatisiert werden.

Mit dem zur Verfügung stehenden LC-MS/MS-System sollten Bestimmungsgrenzen von 0.500 ng/ml nach Konzentrierung der Proben mittels Festphasenextraktion zu bestimmen sein.

Für die Entwicklung der Methode wurde eine Ketoprofen-Stammlösung (1.00 mg/ml) durch Einwaage von 1.00 mg Ketoprofen ohne Berücksichtigung des Reinheitsgrades in

1.00 ml Acetonitril hergestellt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die weiteren Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt.

9.2.1 Massenspektrometrische Bedingungen

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurde die Ketoprofen-Stammlösung (1.00 mg/ml) volumetrisch mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (50/50, v/v) bis zu einer Konzentration von $10.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Diese wurde über eine Spritzenpumpe mit einer Flußrate von 0.05 ml/min und dem Fließmittel mit einer Flußrate von 0.95 ml/min über ein T-Stück infundiert. Die unten gezeigten Spektren sind mit einer Einheitsmassenauflösung und einer Peakbreite von $0.7 - 0.9\text{ u}$ bei halber Peakhöhe im MCA-Modus (10 scans) am API 3000 aufgenommen.

Aufgrund der lipophilen Struktur des Moleküls und des pK-Wertes wurden die Spektren der Substanz im sauren Mileu mit der APCI-Quelle aufgenommen. Der Vergleich der Aufnahmen im positiven und negativen Modus zeigte, daß höhere Empfindlichkeiten im negativen Modus erhalten werden. Das entstehende deprotonierte Molekülion $[\text{M-H}]^{-}$ ist in Abbildung 72 zu sehen.

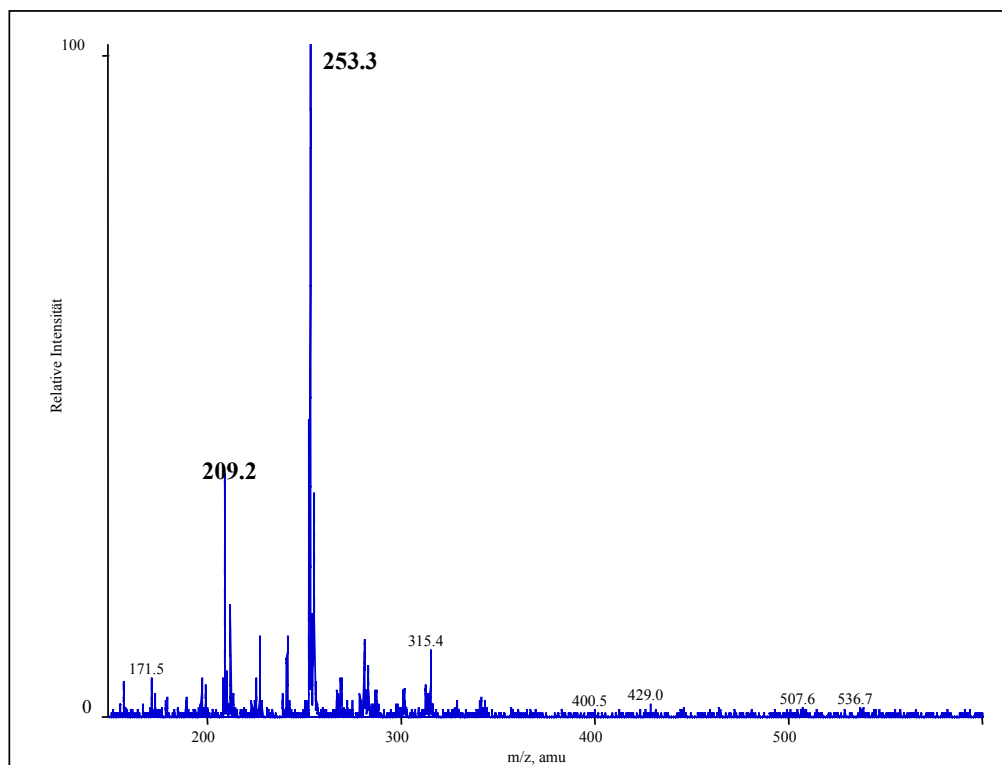


Abbildung 72: Q1-Spektrum von Ketoprofen.

Neben dem Molekülion m/z 253 ist ein Signal bei m/z 209 zu sehen. Dieses konnte durch Aufnahme der Produkt-Ionen als das Hauptfragment von Ketoprofen ermittelt werden (Abbildung 73). Die Massendifferenz von m/z 44 entspricht dem Verlust von Kohlendioxid aus der Carbonsäure.

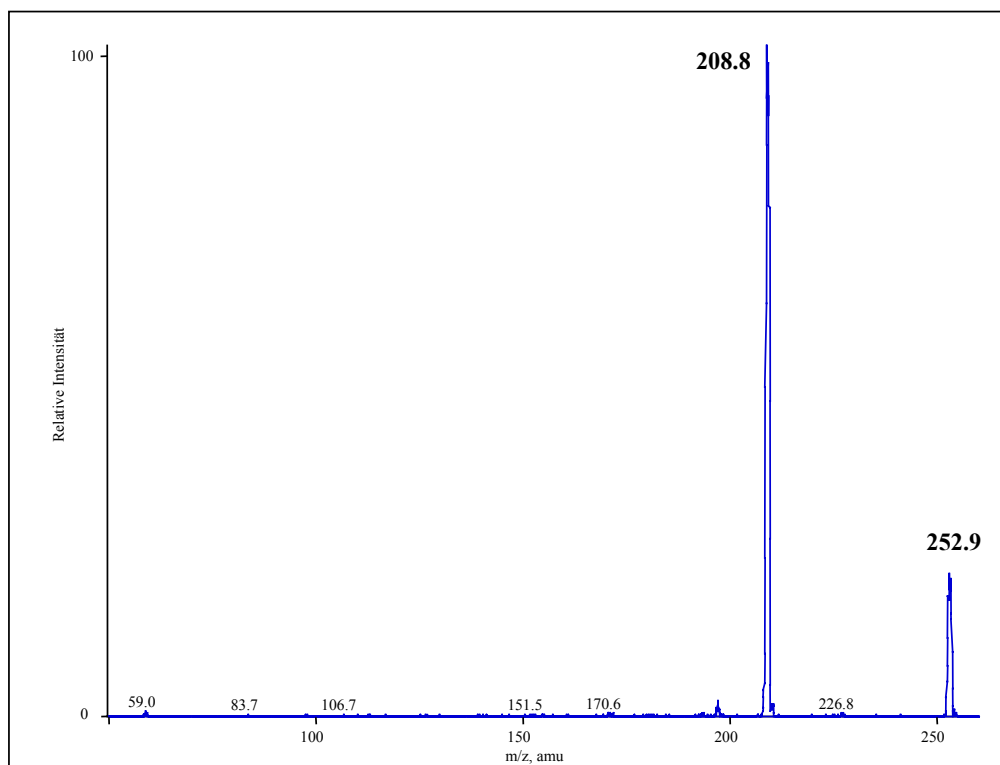


Abbildung 73: Produkt-Ionen-Spektrum von Ketoprofen entstehend aus dem Molekülion m/z 253.

Als interner Standard stand $[^{13}\text{C}^2\text{H}]$ -Ketoprofen zur Verfügung wie es in Abbildung 74 gezeigt ist.

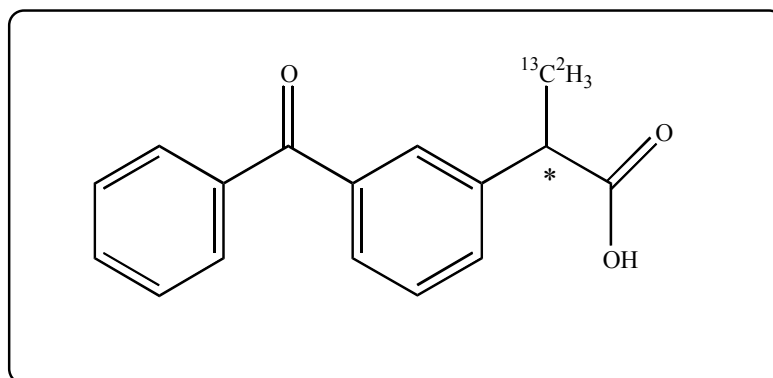


Abbildung 74: $[^{13}\text{C}^2\text{H}]$ -Ketoprofen ($^{13}\text{CC}_{15}\text{H}_3\text{H}_{11}\text{O}_3$, Mw:258.29 g/mol).

Die erhaltenen Spektren zeigten, wie zu erwarten, ein deprotoniertes Molekülion bei m/z 257, aus dem das Fragment m/z 44 abgespalten wurde und das Produkt-Ion m/z 213 bildete.

Nachdem die Fließmittelbedingungen für die beiden Matrices unterschiedlich waren, wurden die Spektren mit dem jeweiligen Fließmittel erneut aufgenommen.

Die sich daraus ergebenden massenspektrometrischen Bedingungen für die Methode in Plasma sind:

Ionisierungsmodus: negative APCI; Gasvorhang: 8; Zerstäubergas: 80 psi; Hilfgas: 10; Kollisions-Gas: 4; Temperatur Heizspirale: 500 °C; Nadelspannung: 4 kV; OR: -6 V; RNG: -100 V; R02: 20 V; ST3: 36 V; R03: 22 V; Verweilzeit: 200 ms; Zeit-Pause: 2 ms; Massenübergang Ketoprofen: m/z 253 → m/z 209; Massenübergang [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen: m/z 257 → m/z 213.

Für die Methode im Dialysat wurden bis auf die Spannung an der Mikroöffnung alle Werte gleich gehalten. Die Spannung an der Mikroöffnung betrug: OR: -11 V

9.2.2 Chromatographische Bedingungen

Die Bedingungen für die chromatographische Trennung wurden mit einem Gemisch aus Ammoniumacetatpuffer und Acetonitril auf Umkehrphasenmaterialien begonnen. Nach ersten Erfolgen mit der Substanz im Fließmittel zeigte sich ein Störpeak bei der Retentionszeit von Ketoprofen in der aufgearbeiteten Plasmaprobe. Dieser ließ sich durch die Verwendung einer Amino-Säule mit Kieselgel als Basismaterial abtrennen. Für die Trennung auf der Aminosäule wurden Teile von Acetonitril durch schwächer eluierendes Methanol ersetzt, um eine isokratische Trennung durchzuführen. Hingegen konnte der Puffer vollständig aus dem Fließmittel für die Dialysatproben entfernt werden und die Trennung mit einem Gemisch aus 0.1 % Essigsäure in Milli-Q[®]-Wasser und Acetonitril auf einer Umkehrphase mit C₈-Material durchgeführt werden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 75 dargestellt.

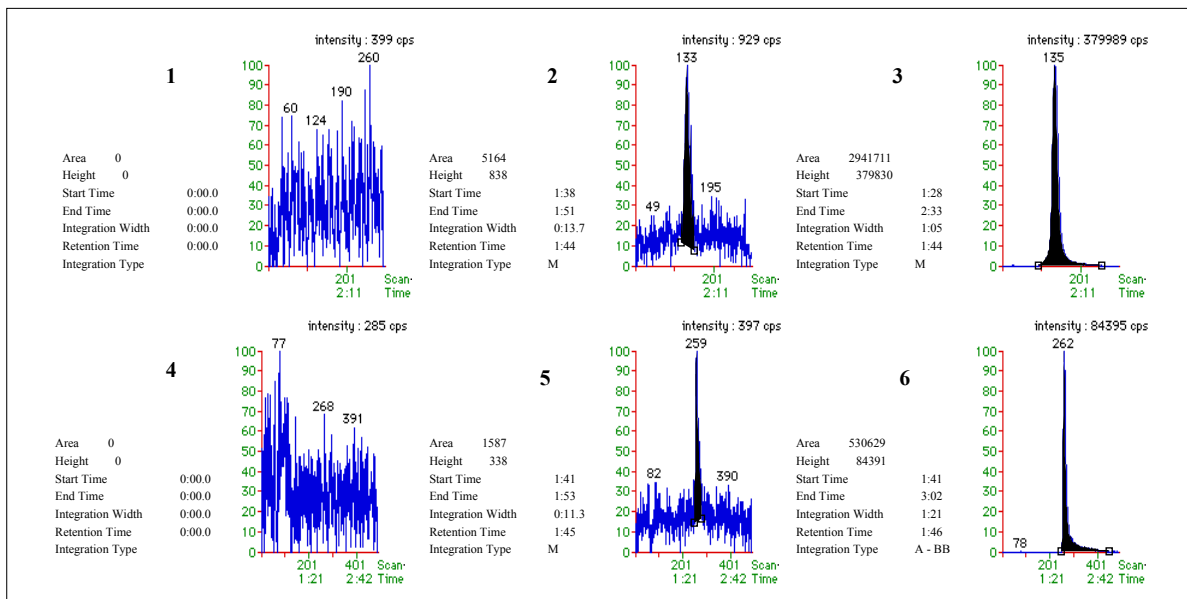


Abbildung 75: Chromatogramme von Ketoprofen in Plasma (1-3) und Dialysat (4-6). Von links nach rechts jeweils ein Leerwert, der kleinste und der größte Kalibrierstandard.

Die sich ergebenden chromatographischen Bedingungen für die Methode in Plasma sind wie folgt:

- Analytische Säule: Grom-SIL 80 Amino-3 CP, 5 µm, 40 x 4.6 mm
- Mobile Phase: 0.0075 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 3.5, Acetonitril, Methanol (350 ml : 350 ml : 300 ml)
- Säulentemperatur: Raumtemperatur
- Injektionsvolumen: 40 µl
- Flußrate: 1.0 ml/min
- Probengeber-Spülflüssigkeit: 0.02 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0, Acetonitril, (400 ml : 600 ml)
- Laufzeit: 2.8 Minuten
- Retentionszeiten: Ketoprofen ca. 1.7 min
¹³C²H]-Ketoprofen ca. 1.7 min

Die sich ergebenden chromatographischen Bedingungen für die Methode aus dem Dialysat sind wie folgt:

Analytische Säule:	Luna [®] C8(2), 3.0 µm, 50 x 4.6 mm	
Mobile Phase:	Acetonitril, 0.1 % Essigsäure in Milli-Q [®] -Wasser (500 ml : 500 ml)	
Säulentemperatur:	Raumtemperatur	
Injektionsvolumen:	45 µl	
Flußrate:	1.0 ml/min	
Probengeber-Spülflüssigkeit:	0.005 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 5.0, Acetonitril, (480 ml : 520 ml)	
Laufzeit:	3.3 Minuten	
Retentionszeiten:	Ketoprofen	ca. 1.9 min
	[¹³ C ² H]-Ketoprofen	ca. 1.9 min

9.2.3 Aufarbeitung

Zur Konzentrierung der Plasmaproben wurde wie bereits angesprochen eine Festphasenextraktion mit C₈-Umkehrphasenmaterial verwendet.

Die Plasmaproben wurden nach dem Auftauen geschüttelt und für 10 Minuten bei 3600 U/min (2300 g) zentrifugiert. 200 µl jeder Probe wurden mit 100 µl interner Standardarbeitslösung für Plasmaproben versetzt und 10 Sekunden geschüttelt. Die Festphasenmaterialien wurden mit 2 x 100 µl Acetonitril und 2 x 100 µl 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser aktiviert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Festphasenmaterialien durch das angelegte Vakuum nicht trocken gesaugt wurden. Die Probe wurde auf die Festphase aufgebracht und durch Anlegen eines Vakuums hindurchgesaugt. Die Festphase wurde mit 500 µl 0.1 % Ameisensäure in Milli-Q[®]-Wasser, dann zweimal mit 500 µl Milli-Q[®]-Wasser und zuletzt mit 500 µl 10 % Acetonitril in Milli-Q[®]-Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Festphase durch Anlegen des Vakuums für fünf Minuten trocken gezogen. Auf das Festphasenbett wurden 200 µl Elutionslösung gegeben, und 10 Sekunden inkubiert. Danach wurde Vakuum angelegt und die Proben in 1 ml Mikrotiterplatten eluiert. Die Proben wurden in 0.5 ml Reaktionsgefäße überführt und von dem Probengeber (L-7250 LaChrom) injiziert.

Von den Dialysatproben standen maximal 20 µl zur Verfügung, um ein möglichst geringes Quantifizierungslimit zu erreichen. Eine Flüssig-Flüssig-Extraktion würde nach einem Eindampfen die erneute Lösung des Extraktes mit sich führen. Das dazu erforderliche Volumen müßte größer sein als das eingesetzte Ausgangsvolumen. Gleiche Probleme ergeben sich bei Verwendung einer Festphasenextraktion. Das Volumen zum Eluieren des Analyten würde eine Verdünnung bedeuten und nach Eindampfen des Eluats entstünden die gleichen Probleme wie bei einer Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die einfachste Lösung war, ein möglichst geringes Volumen mit internem Standard zuzugeben und die gesamte Lösung zu injizieren.

Von den Proben wurden nach dem Auftauen 20 µl in ein 0.5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit 50 µl der internen Standardarbeitslösung für Dialysat versetzt. Die Proben wurden geschüttelt und von dem Probengeber injiziert.

9.2.4 Ergebnisse der Vorversuche

Auf die Vorversuche wurde weitgehend verzichtet. Die während der Methodenentwicklung erhaltenen Daten der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben gaben keinen Hinweis auf eventuell größere Störungen bei der Validierung. Nach einer Systempräzision über 24 Proben in Plasma wurde direkt mit der Validierung der beiden Matrices begonnen. Diese ergab einen Variationskoeffizienten von 4.2 % für Ketoprofen und 4.3 % für den internen Standard, bei maximalen Differenzen von ca. 20 % für beide Substanzen. Der sich daraus ergebende Variationskoeffizient für das Flächenverhältnis lag bei 1.0 mit einer maximalen Differenz von 3.8 %.

9.3 Ergebnisse der Methodvalidierung von Ketoprofen

Die beiden Matrices wurden unabhängig voneinander validiert. Die Validierung der LC-MS/MS-Methode für Ketoprofen in Humanplasma wurde, wie unter 2.5 beschrieben, durchgeführt. Aufgrund fehlender Leermatrix konnte die Validierung der LC-MS/MS-Methode für Ketoprofen in Dialysat nicht entsprechend der unter 2.5 angeführten Versuche durchgeführt werden. Die vorgenommen Änderungen werden unter 9.3.2 näher erläutert.

9.3.1 Methodenvalidierung von Ketoprofen in Humanplasma

Alle Blutproben wurden mit Heparin zur Vermeidung der Blutgerinnung versetzt, zentrifugiert und das Plasma gewonnen. Dieses wurde bis zu seiner Verwendung bei ≤ -18 °C eingefroren.

9.3.1.1 Spezifität der Methode

Es wurden sechs verschiedene Leerplasmen von Männern und Frauen getestet. Das Plasma wurde jeweils mit und ohne internen Standard aufgearbeitet. Eine Störung zu einer der Retentionszeiten von Ketoprofen und [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen konnte nicht festgestellt werden.

9.3.1.2 Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)

Zur Validierung des Konzentrationsbereichs wurde an vier Tagen eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 500, 400, 240, 96.0, 48.0, 24.0, 9.60, 4.80, 1.920, 0.960, 0.720 und 0.480 ng/ml analog dem Pipettierschema (Tabelle 58) frisch untersucht.

Die Auswertung erfolgte über lineare Regression mit einer Wichtung von 1/Konzentration.

Konzentration Ketoprofen (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
500	L1	KEP-SL-CR	1.9800	0.0200
400	L2	L1	0.5600	0.1400
240	L3	L2	0.3600	0.2400
96.0	L4	L3	0.2400	0.3600
48.0	L5	L4	0.3000	0.3000
24.0	L6	L5	0.3000	0.3000
9.60	L7	L6	0.2400	0.3600
4.80	L8	L7	0.2800	0.2800
1.92	L9	L8	0.2600	0.3900
0.960	L10	L9	0.3500	0.3500
0.720	L11	L10	0.3750	0.1250
0.480	L12	L11	0.2000	0.1000

Tabelle 58: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Neben den vier Kalibriergeraden, die für die Validierung verwendet wurden, sind in der Tabelle 59 drei weitere Kalibriergeraden angegeben, die zur Überprüfung der Langzeitstabilitäten verwendet wurden. Durch unterschiedliche Einwaagen der Stammlösungen ergaben sich an den verschiedenen Tagen unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Kalibrierstandards. Diesem Umstand wurde durch Normalisierung der einzelnen Werte Rechnung getragen. Die Normalisierung erfolgte durch Dividieren der theoretischen Konzentration durch die gemessene und berechnete Konzentration.

Kalibrierstandard No.	Gemessene Konzentration an Ketoprofen							Mittelwert	s (%)	CV (%)	RE (%)
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7				
1	0.970	0.991	0.994	1.005	0.978	0.989	1.002	0.990	1.3	1.3	-1.0
2	1.005	1.014	0.977	0.989	1.007	0.994	1.000	0.998	1.2	1.2	-0.2
3	1.031	0.972	1.028	1.016	1.012	1.017	0.992	1.010	2.1	2.1	1.0
4	1.022	1.046	1.035	1.008	1.028	1.015	1.017	1.024	1.3	1.2	2.4
5	1.047	1.028	1.036	0.970	1.049	1.037	1.014	1.026	2.7	2.7	2.6
6	1.017	1.053	1.017	0.969	1.038	1.029	0.974	1.014	3.2	3.1	1.4
7	1.059	0.918	0.917	0.960	0.980	1.002	0.955	0.970	5.0	5.1	-3.0
8	0.943	1.001	1.069	0.963	0.961	1.019	0.918	0.982	5.1	5.2	-1.8
9	0.936	0.913	0.995	1.091	1.032	1.018	0.959	0.992	6.1	6.2	-0.8
10	0.974	1.018	1.016	1.002	0.963	0.931	0.974	0.983	3.1	3.2	-1.7
11	0.948	0.996	0.945	1.117	0.995	1.026	1.073	1.014	6.3	6.3	1.4
12	1.047	1.051	0.972	0.911	0.957	0.923	1.122	0.998	7.8	7.8	-0.2
y-Achsenabschnitt	0.0064	0.0074	0.0264	0.0074	0.0052	0.0015	0.0030				
Steigung	0.0926	0.0593	0.0592	0.0668	0.0583	0.0448	0.0805				
Korr.-Koeffizient	0.9997	0.9997	0.9997	0.9999	0.9998	0.9999	1.0000				

Tabelle 59: Statistik der Kalibriergeraden von Ketoprofen in Humanplasma.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 30 , womit die Akzeptanzkriterien für die Bestimmungsgrenze erfüllt wurden. Tabelle 59 zeigt die Ergebnisse der Validierung des Konzentrationsbereiches. Bei keinem Kalibrierstandard lag die Genauigkeit außerhalb der gesetzten Kriterien und alle wurden zur Berechnung der Kalibriergeraden verwendet. Die sich daraus ergebenden Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.999 . Somit wurden die Akzeptanzkriterien für die Linearität des dynamischen Bereichs (0.480 ng/ml – 500 ng/ml) erfüllt. Die relativen Standardabweichungen mit Werten zwischen 1.2 % und 7.8 % und die Richtigkeit mit Abweichungen von – 3.0 % bis

2.4 % zeigen eine ausreichend hohe Präzision des gesamten Systems. Die Abbildung 76 zeigt die erhaltene Kalibriergerade für den vierten Validierungstag.

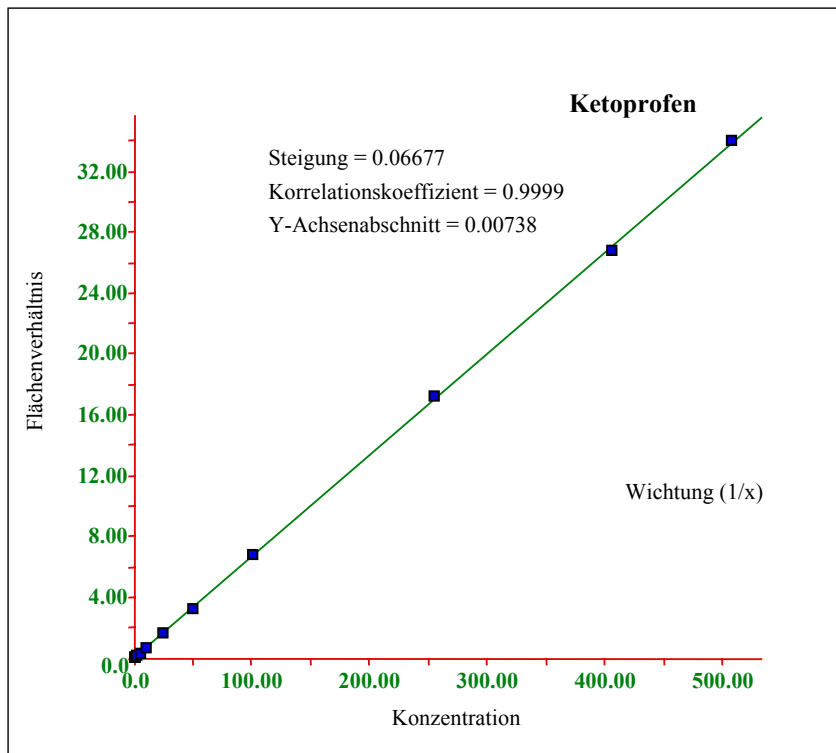


Abbildung 76: Kalibriergerade von Ketoprofen vom vierten Validierungstag.

9.3.1.3 Präzision von Tag-zu-Tag

Zur Validierung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden an den ersten vier Tagen jeweils fünf und an den folgenden drei Tagen jeweils zwei Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 8000, 400, 30.0, 1.20, 0.500 ng/ml nach dem Pipettierschema (Tabelle 60) hergestellt.

Die Auswertung erfolgte über die an diesem Tage gemessene Kalibriergerade. Die Werte wurden wie schon unter 9.3.1.2 beschrieben normalisiert.

Konzentration Ketoprofen (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung oder der Qualitätskontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
8000	OC D20	KEP-SL-OC	0.0200	1.9800
400	OC1	OC D20	0.1800	3.4200
30.0	OC2	OC1	0.2400	2.9600
1.20	QC3	QC2	0.1600	3.8400
0.500	OC4	OC3	1.2000	1.6800

Tabelle 60: Pipettierschema für die Herstellung der Qualitätskontrollproben in Humanplasma.

Qualitätskontrollprobe Gemessen am Tag	Gemessene Konzentration von Ketoprofen in Humanplasma				
	QC D20	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4
1	0.9560	0.9628	0.9125	1.1345	0.9878
	0.9772	1.0183	1.0109	1.0211	1.0416
	0.9860	1.0436	1.0001	1.0762	0.8629
	0.9474	1.0395	1.0083	1.0083	0.9831
	0.9602	1.0219	0.9846	1.0868	1.0816
2	0.9599	1.0313	1.0237	0.9560	1.0006
	1.0027	1.0343	1.0494	0.9544	1.0374
	0.9931	1.0096	0.9504	1.0080	1.0946
	0.9693	1.0068	0.9358	1.0869	1.0548
	0.9767	0.9980	0.9604	1.0754	1.0122
3	1.0074	1.0046	1.0493	0.9919	0.9604
	0.9877	1.0503	0.9968	1.0418	0.9878
	0.9725	0.9455	0.9240	1.1233	0.9349
	0.9818	0.9928	0.9947	0.9660	1.1083
	1.0385	1.0256	0.9663	1.0910	0.8654
4	1.0031	1.0434	0.9721	0.9774	1.0781
	0.9938	1.0022	0.9974	0.9375	0.9836
	0.9709	1.0185	1.0174	0.9071	1.0678
	1.0138	1.0314	0.9837	1.0041	1.0422
	0.9917	1.0447	0.9790	1.0864	1.0717
5	1.0051	1.0368	1.0400	0.9263	0.9322
	1.0103	1.0724	1.0467	0.9793	1.0203
6	0.9322	1.0384	1.0606	0.9725	1.0966
	0.9588	1.0258	1.0513	0.9572	1.0465
7	0.9687	0.9945	0.9850	1.0615	1.1225
	0.9454	1.0033	0.9766	1.0260	1.0736
Mittelwert	0.9812	1.0191	0.9953	1.0176	1.0211
s (%)	2.5	2.7	4.0	6.4	6.9
CV (%)	2.5	2.7	4.1	6.3	6.8
RE (%)	-1.9	1.9	-0.5	1.8	2.1

Tabelle 61: Präzision der Qualitätskontrollproben von Ketoprofen in Humanplasma an insgesamt sieben Validierungstagen.

Die Ergebnisse der Tabelle 61 zeigen eine Genauigkeit der Proben, die die unter 2.5 gestellten Akzeptanzkriterien voll erfüllen. Die Abweichungen der Richtigkeit von – 1.9 bis 2.1 % weisen eine präzise Herstellung, Aufarbeitung und Messung nach. Anhand der Korrelationskoeffizienten ist erneut zu erkennen, daß diese zu kleineren Konzentrationen hin zunehmen. In diesem Fall kontinuierlich von 2.5 % für den QC D20 hin zu 6.8 % für den QC 4. Mit dem QC D20 konnte nachgewiesen werden, daß Proben deren Konzentration über dem dynamischen Meßbereich liegen, durch einfache Verdünnung mit Leermatrix in den dynamischen Meßbereich verschoben werden können und dadurch quantifizierbar sind.

Die Proben der Tage 5–7 wurden in Abständen von mehreren Tagen bzw. Wochen hergestellt und gemessen. Zwischen diesen Zeiträumen wurde das bestehende System vollständig umgebaut und für andere Methoden verwendet. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien, nachdem das System neu aufgebaut wurde, zeigt eine hohe Robustheit der gesamten Methode.

9.3.1.4 Präzision innerhalb eines Tages

Zur Validierung der Präzision innerhalb eines Tages wurden am zweiten Tag die Qualitätskontrollproben über die an diesem Tag gemessene Kalibriergerade ausgewertet.

Qualitätskontrollprobe No.	Theoretische Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)	Gemessene Konzentrationen an Ketoprofen in Humanplasma					Mittelwert (%)	s (%)	CV (%)	RE (%)
QC D20	8148	96.0	100.3	99.3	96.9	97.7	98.0	1.8	1.8	-2.0
QC 1	403	103.1	103.4	101.0	100.7	99.8	101.6	1.6	1.5	1.6
QC 2	29.8	102.4	104.9	95.0	93.6	96.0	98.4	5.0	5.0	-1.6
QC 3	1.17	95.6	95.4	100.8	108.7	107.5	101.6	6.3	6.2	1.6
QC 4	0.484	100.1	103.7	109.5	105.5	101.2	104.0	3.7	3.6	4.0

Tabelle 62: Präzision der Qualitätskontrollproben von Ketoprofen in Humanplasma innerhalb des zweiten Validierungstages.

Tabelle 62 bestätigt die guten Präzisionsdaten, die schon bei der Tag-zu-Tag-Präzision erhalten wurden. Die Proben liegen nahe dem richtigen Wert mit einer maximalen Abweichung von 4.0 % und die Variationskoeffizienten liegen mit Werten von 1.5 bis 6.2 % im Bereich der Kriterien. Entgegen dem kontinuierlichen Trend über alle Validierungstage, liegen die Werte verstreut. So liegt die größte relative Standardabweichung bei dem QC 3.

9.3.1.5 Präzision von hämolytischem Plasma

Zur Präzision von hämolytischem Plasma wurden am vierten Tag fünf Qualitätskontrollproben (Bezeichnung HEMO) mit der Konzentration 29.5 ng/ml analog dem Pipettierschema (Tabelle 60) in hämolytischem Plasma frisch untersucht.

Die Auswertung erfolgte über die an diesem Tage gemessene Kalibriergerade.

Qualitäts- kontroll- probe HEMO	Theoretische Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)	Genauigkeit (%)
A	29.5	28.5	96.5
B	29.5	29.5	99.9
C	29.5	30.7	104.2
D	29.5	30.2	102.3
E	29.5	28.4	96.4
Mittelwert		29.5	99.9
<i>s</i>		1.01	3.4
CV			3.5

Tabelle 63: Präzision von Ketoprofen in hämolytischem Humanplasma.

Die Genauigkeit von 99.9 % aus Tabelle 63 läßt keine Rückschlüsse über einen Einfluß von hämolytischem Plasma auf die Quantifizierung der Proben zu. Der Variationskoeffizient von 3.5 % bestätigt die gute Methodenpräzision.

9.3.1.6 Validierung der Aufarbeitungsstabilität

Zur Validierung der Aufarbeitungsstabilität wurden am ersten Tag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 400 ng/ml und 1.20 ng/ml jeweils 20 Proben zusätzlich hergestellt und aufgearbeitet. 10 Proben jeder Konzentration wurden bei Raumtemperatur und 10 Proben bei – 20 °C in den Probengebergefäßen gelagert und nach 24 und 48 Stunden gemessen.

Die Auswertung erfolgte über die jeweilige an dem Tag gemessene Kalibriergerade.

Qualitäts- kontroll- probe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 24 h	Stabilität nach 24 h	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 48 h	Stabilität nach 48 h
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	399	402	100.8	407	102.0
B	399	398	99.7	400	100.4
C	399	420	105.4	409	102.6
D	399	390	97.8	409	102.6
E	399	395	99.1	412	103.3
Mittelwert		401	100.6	407	102.2
<i>s</i>		11.5	2.9	4.42	1.1
CV			2.9		1.1

Tabelle 64: Aufarbeitungsstabilität von Ketoprofen (399 ng/ml) in Humanplasma bei Raumtemperatur.

Qualitäts- kontroll- probe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 24 h	Stabilität nach 24 h	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 48 h	Stabilität nach 48 h
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	1.14	1.22	106.6	1.22	106.4
B	1.14	1.10	96.2	1.19	104.5
C	1.14	1.22	106.4	1.20	104.9
D	1.14	1.22	107.1	1.08	94.7
E	1.14	1.03	90.5	1.25	109.5
Mittelwert		1.16	101.3	1.19	104.0
<i>s</i>		0.0866	7.6	0.0635	5.6
CV			7.5		5.3

Tabelle 65: Aufarbeitungsstabilität von Ketoprofen (1.14 ng/ml) in Humanplasma bei Raumtemperatur.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 24 h	Stabilität nach 24 h (%)	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 48 h	Stabilität nach 48 h (%)
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)		(ng/ml)	
A	399	393	98.5	408	102.3
B	399	402	100.8	400	100.4
C	399	396	99.3	404	101.2
D	399	400	100.3	407	102.1
E	399	404	101.4	396	99.2
Mittelwert		399	100.0	403	101.0
<i>s</i>		4.60	1.2	5.17	1.3
CV			1.2		1.3

Tabelle 66: Aufarbeitungsstabilität von Ketoprofen (399 ng/ml) in Humanplasma bei – 20 °C.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 24 h	Stabilität nach 24 h (%)	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 48 h	Stabilität nach 48 h (%)
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)		(ng/ml)	
A	1.14	1.29	113.2	1.22	107.0
B	1.14	1.25	109.9	1.23	107.6
C	1.14	1.22	106.5	1.28	112.3
D	1.14	1.17	102.7	1.19	104.4
E	1.14	1.18	103.7	1.22	106.9
Mittelwert		1.22	107.2	1.23	107.7
<i>s</i>		0.0497	4.4	0.0329	2.9
CV			4.1		2.7

Tabelle 67: Aufarbeitungsstabilität von Ketoprofen (1.14 ng/ml) in Humanplasma bei – 20 °C.

Anhand der Werte der Tabellen 64 bis 67 konnte keine Instabilität bei Lagerung der Proben in den Probengeberggefäßen bei Raumtemperatur und bei – 20 °C innerhalb von 48 Stunden erkannt werden. Die Stabilitäten lagen mit maximalen Abweichungen von 7.7 % vom theoretischen Wert des Herstellungstages in einem Bereich, in dem die Probe als stabil bezeichnet werden muß. Die Variationskoeffizienten zwischen 1.1 % und 7.5 % weisen die Systempräzision nach.

9.3.1.7 Validierung der Raumstabilität

Zur Validierung der Raumstabilität wurden am ersten Validierungstag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 400 ng/ml und 1.20 ng/ml jeweils 10 Proben zusätzlich hergestellt und bei – 70 °C eingefroren.

Am folgenden Validierungstag wurden fünf Proben jeder Konzentration 4 Stunden vor Beginn der Aufarbeitung aufgetaut und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die restlichen fünf Proben jeder Konzentration wurden 2 Stunden vor Beginn der Aufarbeitung aufgetaut und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die gesamten Proben wurden mit den Proben des aktuellen Validierungstages aufgearbeitet und gemessen.

Die Auswertung erfolgte über die an diesem Tage gemessene Kalibriergerade.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 2 h	Stabilität nach 2 h (%)	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 4 h	Stabilität nach 4 h (%)
QC 1	(ng/ml)	(ng/ml)		(ng/ml)	
A	399	391	97.9	394	98.9
B	399	401	100.5	393	98.6
C	399	402	100.9	404	101.4
D	399	412	103.4	410	102.9
E	399	366	91.7	412	103.2
Mittelwert		394	98.9	403	101.0
<i>s</i>		17.9	4.5	8.57	2.1
CV			4.5		2.1

Tabelle 68: Raumtemperaturstabilität von Ketoprofen (400 ng/ml) in Humanplasma.

Qualitätskontrollprobe	Theoretische Konzentration an Ketoprofen	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 2 h	Stabilität nach 2 h	Gemessene Konzentration an Ketoprofen nach 4 h	Stabilität nach 4 h
QC 3	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
A	1.14	1.25	109.2	1.23	107.4
B	1.14	1.22	106.4	1.18	102.9
C	1.14	1.31	114.6	1.23	108.1
D	1.14	1.19	104.1	1.20	105.1
E	1.14	1.20	105.0	1.19	104.1
Mittelwert		1.23	107.9	1.21	105.5
<i>s</i>		0.0485	4.2	0.0248	2.2
CV			3.9		2.1

Tabelle 69: Raumtemperaturstabilität von Ketoprofen (1.14 ng/ml) in Humanplasma.

Die Werte der Tabellen 68 und 69 zeigten mit Abweichungen von – 2.2 % bis 7.9 % keine Instabilität der Proben, nachdem sie bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die erhöhten Werte der Qualitätskontrollprobe 3 deckten sich mit den Werten für diese Konzentration am ersten Validierungstag. Dort lag der Wert für die Qualitätskontrollprobe 3 bei einer Richtigkeit von 106.5 %. Diese Abweichung kann auf die Herstellung zurückzuführen sein. Die Werte von 107.9 % und 105.5 % am zweiten Validierungstag zeigten im Bezug auf den Wert vom ersten Tag keine Instabilität. Der Wert von der am zweiten Tag hergestellten Qualitätskontrollprobe 3 mit 101.6 % erhärtet die Theorie, daß die Abweichung der am ersten Tag hergestellten Qualitätskontrollprobe 3 durch die Herstellung zustande kommt.

9.3.1.8 Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen

Zur Validierung eines dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen wurden am ersten Tag von den Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 400 ng/ml und 1.20 ng/ml jeweils 15 Proben zusätzlich hergestellt und bei – 70 °C eingefroren. Die weitere Vorgehensweise der Proben geht aus 2.5.4.6 hervor.

Die Auswertung erfolgte über die jeweilige an dem Tag gemessene Kalibriergerade.

Qualitäts- kontroll- probe QC 1	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	nicht eingefroren	einmal eingefroren	zweimal eingefroren	dreimal eingefroren			
A	384	407	403	409			
B	406	405	415	400			
C	416	405	407	419			
D	415	405	415	407			
E	408	409	411	414			
Mittelwert (ng/ml)	406	406	410	410	408	7.49	1.8
s (ng/ml)	12.9	1.83	5.19	7.00			
CV (%)	3.2	0.5	1.3	1.7			

Tabelle 70: Stabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (400 ng/ml) in Humanplasma nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen.

Qualitäts- kontroll- probe QC 3	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	nicht eingefroren	einmal eingefroren	zweimal eingefroren	dreimal eingefroren			
A	1.30	1.12	1.10	1.25			
B	1.17	1.26	1.11	1.13			
C	1.23	1.10	1.05	1.30			
D	1.15	1.29	1.24	1.12			
E	1.24	1.22	1.25	1.16			
Mittelwert (ng/ml)	1.22	1.20	1.15	1.19	1.19	0.0769	6.5
s (ng/ml)	0.0587	0.0862	0.0910	0.0772			
CV (%)	4.8	7.2	7.9	6.5			

Tabelle 71: Stabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (1.14 ng/ml) in Humanplasma nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen.

Nach einem dreifachen Zyklus von Einfrieren und Auftauen konnten anhand der Werte in den Tabellen 70 und 71 keine Instabilitäten erkannt werden. Die Variationskoeffizienten der Proben untereinander zeigten mit 1.8 % bzw. 6.5 % ausreichend gute Präzision. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Tage liegen bei der Qualitätskontrollprobe 3 höher als bei der Qualitätskontrollprobe 1. Die Werte bestätigen jedoch die innerhalb der

gesamten Validierung gefundenen Variationskoeffizienten von 2.7 % für den QC 1 und 6.3 % für die Qualitätskontrollprobe 3 (siehe Tabelle 61). Der Mittelwert von 1.19 ng/ml für die Qualitätskontrollprobe 3 entspricht 104.4 % der theoretischen Konzentration. Der Wert zeigte eine hohe Präzision der Methode, lag jedoch erneut über dem theoretischen Wert und unterstützt somit die bereits gestellte Annahme eines leichten Herstellungsfehlers der Qualitätskontrollprobe 3 am ersten Validierungstag.

9.3.1.9 Validierung einer Langzeitstabilität

Zur Validierung einer Langzeitstabilität wurden am vierten Tag zusätzlich 60 Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 400 ng/ml und 1.20 ng/ml hergestellt und je zur Hälfte bei – 20 °C und – 70 °C eingefroren.

Jeweils fünf Qualitätskontrollproben gleicher Konzentration und Lagerungstemperatur wurden nach 2 und 11 Tagen sowie nach 5 Wochen aufgetaut, aufgearbeitet und gegen eine frisch hergestellte Kalibriergerade gemessen.

Die Auswertung erfolgte über die jeweilige an dem Tag gemessene Kalibriergerade.

Qualitätskontrollprobe QC 1	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	2 Tage	11 Tage	5 Wochen			
A	411	410	391	371			
B	395	411	402	382			
C	402	404	394	382			
D	407	415	395	379			
E	412	399	403	382			
Mittelwert (ng/ml)	405	408	397	379	397	13.0	3.3
s (ng/ml)	7.07	6.37	5.08	4.64			
CV (%)	1.7	1.6	1.3	1.2			

Tabelle 72: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (400 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von – 20 °C.

Qualitäts- kontroll- probe QC 3	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	2 Tage	11 Tage	5 Wochen			
A	1.09	1.03	1.22	1.01			
B	1.04	1.13	1.10	1.15			
C	1.01	1.21	1.01	1.17			
D	1.12	1.26	1.05	1.22			
E	1.21	1.11	1.17	1.13			
Mittelwert (ng/ml)	1.09	1.15	1.11	1.14	1.12	0.0251	2.2
s (ng/ml)	0.0767	0.0888	0.0854	0.0780			
CV (%)	7.0	7.7	7.7	6.9			

Tabelle 73: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (1.20 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Qualitäts- kontroll- probe QC 1	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	2 Tage	11 Tage	5 Wochen			
A	411	407	397	379			
B	395	405	393	383			
C	402	410	402	377			
D	407	408	395	378			
E	412	403	400	375			
Mittelwert (ng/ml)	405	407	397	378	397	13.0	3.3
s (ng/ml)	7.07	2.69	3.57	2.92			
CV (%)	1.7	0.7	0.9	0.8			

Tabelle 74: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (400 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Qualitäts- kontroll- probe QC 3	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)				Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
	Nullwert	2 Tage	11 Tage	5 Wochen			
A	1.09	1.21	1.15	1.15			
B	1.04	1.17	1.05	1.08			
C	1.01	1.16	1.06	1.18			
D	1.12	1.20	1.07	1.26			
E	1.21	1.04	1.18	1.17			
Mittelwert (ng/ml)	1.09	1.16	1.10	1.17	1.13	0.0377	3.3
s (ng/ml)	0.0767	0.0687	0.0602	0.0653			
CV (%)	7.0	5.9	5.5	5.6			

Tabelle 75: Langzeitstabilitätsuntersuchung von Ketoprofen-Qualitätskontrollproben (1.20 ng/ml) in Humanplasma bei einer Lagerungstemperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Werte der Tabellen 72 bis 75 zeigten für die Proben untereinander Variationskoeffizienten von 2.2 % - 3.3 %. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Tage waren wie bereits angesprochen bei den Qualitätskontrollproben 3 höher als bei den Qualitätskontrollproben 1, jedoch in dem Bereich, der bereits durchgeführten Experimente. Desweiteren zeigte sich kein Trend nach fünf Wochen, der auf eine Reduzierung des Analyten in der Probe hinweist. Zwar nahmen die Konzentrationen für die Qualitätskontrollprobe 1 bei einer Lagertemperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geringfügig von 408 auf 379 ng/ml ab. Diese Abnahme liegt jedoch im Bereich der Meßungenauigkeit und läßt keinen eindeutigen Rückschluß auf eine Instabilität zu. Die Werte für eine Lagertemperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ entsprechen denen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für die Qualitätskontrollprobe 3 hingegen zeigte sich bei beiden Lagertemperaturen kein Trend. Eine Instabilität konnte anhand der ermittelten Werte nicht festgestellt werden.

9.3.1.10 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden am vierten Validierungstag die richtigen Werten für die Qualitätskontrollproben 1 – 3 hergestellt. Die Herstellung der Qualitätskontrollproben wurde analog der Untersuchung zur Tag-zu-Tag-Präzision durchgeführt. Die gefundene Wiederfindungsrate für Ketoprofen in Humanplasma wurde über den gesamten Konzentrationsbereich zu 83.3 % bestimmt. Dieser Wert wurde als ausreichend erachtet, da durch eine Steigerung der Wiederfindungsrate keine wesentliche Erweiterung

des Quantifizierungslimits zu erwarten war. Dies wäre durch die Erhöhung der eingesetzten Plasmamenge möglich.

9.3.2 Methodvalidierung von Ketoprofen im Dialysat

Für die Validierung von Ketoprofen in Dialysat stand nicht genügend Dialysatmatrix ohne Wirkstoff (Leermatrix) zur Verfügung, um entsprechend Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben herstellen zu können. Daher wurden für die Validierung Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in anderen Leermatrizes verwendet. Diese wurden zur Überprüfung des Systems herangezogen. Um sicherzustellen, daß mit den hergestellten Kalibriergeraden die Dialysatproben richtig quantifiziert wurden, wurden zusätzlich an drei Validierungstagen Qualitätskontrollproben in Dialysat untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der an diesem Tag verwendeten Kalibriergeraden in der entsprechenden Matrix. So konnte sichergestellt werden, daß die Dialysatproben bei Verwendung einer Kalibriergeraden, die in einer anderen Matrix hergestellt wurde, quantifiziert werden konnten. Als vergleichbare Matrizes wurden 0.9 %ige Natriumchloridlösung, wie sie auch für die Dialyse verwendet wurde, und Ultrafiltrat, welches aus Plasma gewonnen wurde, verwendet.

9.3.2.1 Spezifität der Methode

Die Spezifität der Methode konnte mit den Matrizes Ultrafiltrat und 0.9 %iger Natriumchloridlösung durch Abwesenheit von Störungen zu den Retentionszeiten von Ketoprofen und [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-Ketoprofen nachgewiesen werden.

9.3.2.2 Validierung des dynamischen Meßbereichs (Konzentrationsbereich)

Zur Validierung des Konzentrationsbereichs in 0.9 %iger Natriumchloridlösung wurde an drei Tagen eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 200, 100, 50.0, 25.0, 10.0, 5.00 und 2.50 ng/ml nach dem Pipettierschema (Tabelle 76) frisch hergestellt und aufgearbeitet.

An dem ersten Validierungstag wurde ebenfalls zur Validierung des Konzentrationsbereichs in Ultrafiltrat eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen 200, 100, 50.0, 25.0, 10.0, 5.00 und 2.50 ng/ml nach dem Pipettierschema (Tabelle 76) frisch hergestellt, aufgearbeitet und in der gleichen Sequenz gemessen.

Konzentration Ketoprofen (ng/ml)	Bezeichnung der Probe	Stammlösung, Kalibrier- standard- oder Qualitätskontrollprobe für die Herstellung	Pipettiertes Volumen der Stammlösung, des Arbeitsstandards oder der Qualitäts- kontrollprobe (ml)	Pipettiertes Volumen an Leermatrix (ml)
2000	LV	KEP-SL-CR	0.0200	1.9800
200	L1	LV	0.1000	0.9000
100	L2	L1	0.1000	0.1000
50.0	L3	L2	0.1000	0.1000
25.0	L4	L3	0.1000	0.1000
10.0	L5	L4	0.1000	0.1500
5.00	L6	L5	0.1000	0.1000
2.50	L7	L6	0.1000	0.1000

Tabelle 76: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in 0.9 %iger Natriumchloridlösung und Ultrafiltrat.

Die Auswertung beider Kalibriergeraden erfolgte über lineare Regression mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}$. Beide erfüllten die Akzeptanzkriterien für den dynamischen Bereich. Die Auswertung der Qualitätskontrollproben zeigte jedoch eine höhere Präzision bei Verwendung der Kalibriergeraden in 0.9 %iger Natriumchloridlösung. Ultrafiltrat wurde zur Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben nicht weiter verwendet und alle weiteren Experimente mit 0.9 %iger Natriumchloridlösung als Leermatrix durchgeführt. Die Tabelle 77 zeigt die Werte der Kalibriergeraden der ersten drei Validierungstage. Die Werte sind erneut normalisiert.

Kalibrier- standard No.	Gemessene Konzentration an Ketoprofen			Mittel- wert	s (%)	CV (%)	RE (%)
	Tag 1	Tag 2	Tag 3				
1	0.995	1.020	1.029	1.015	1.7	1.7	1.5
2	1.007	0.990	0.983	0.993	1.2	1.2	-0.7
3	1.032	0.965	0.959	0.985	4.0	4.1	-1.5
4	0.983	0.963	0.923	0.956	3.0	3.2	-4.4
5	0.901	0.967	0.950	0.939	3.4	3.7	-6.1
6	0.958	0.988	1.010	0.985	2.6	2.7	-1.5
7	1.125	1.108	1.146	1.126	1.9	1.7	12.6
y-Achsen- abschnitt	-0.0079	-0.0127	-0.0117				
Steigung	0.0162	0.0157	0.0159				
Korr.- koeffizient	0.9997	0.9997	0.9992				

Tabelle 77: Statistik der Kalibriergeraden von Ketoprofen in 0.9 %iger Natriumchloridlösung.

Die Werte zeigen eine vollständige Erfüllung der unter 2.5 gesetzten Akzeptanzkriterien. Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug ≥ 50 und die Korrelationskoeffizienten lagen bei ≥ 0.9992 . Die Genauigkeitskriterien wurden von allen Kalibrierstandards erfüllt, so daß jeder Kalibrierstandard zur Berechnung der Kalibriergeraden herangezogen werden konnte. Ein dynamischer Bereich von 2.50 – 200 ng/ml wurde somit validiert. Mit diesen Kalibriergeraden wurden die in Mikrodialysat hergestellten Qualitätskontrollproben bestimmt.

Da jedoch mit sehr geringen Konzentrationen zu rechnen war und eine weitere Absenkung des Quantifizierungslimits aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnis möglich schien, wurde der dynamische Bereich bis auf 0.625 ng/ml erweitert. An den Tagen 4 - 6 wurde die Kalibriergerade um zwei Kalibrierstandards der Konzentrationen 1.25 ng/ml und 0.625 ng/ml erweitert. Die Herstellung erfolgte analog dem Pipettierschema (Tabelle 76) und wird an dieser Stelle nicht explizit aufgeführt. Die Tabelle 78 zeigt die erhaltenen Werte für die erweiterte Kalibriergeraden des 4. – 6. Tages. Die Auswertung der Kalibriergeraden erfolgte weiterhin über lineare Regression mit einer Wichtung von $1/\text{Konzentration}$.

Kalibrier- standard No.	Gemessene Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)			Mittel- Wert	s (%)	CV (%)	RE (%)
	Tag 4	Tag 5	Tag 6				
1	1.000	0.999	0.995	0.998	0.2	0.2	-0.2
2	0.987	1.009	1.009	1.002	1.3	1.3	0.2
3	1.043	0.999	1.027	1.023	2.2	2.2	2.3
4	0.936	0.992	0.976	0.968	2.9	3.0	-3.2
5	1.122	1.007	0.976	1.035	7.7	7.5	3.5
6	0.962	0.917	0.924	0.935	2.4	2.6	-6.5
7	0.901	0.930	0.914	0.915	1.5	1.6	-8.5
8	0.954	1.023	1.049	1.009	4.9	4.9	0.9
9	1.095	1.124	1.129	1.116	1.9	1.7	11.6
y-Achsen- abschnitt	-0.0050	-0.0048	-0.0043				
Steigung	0.0304	0.0282	0.0279				
Korr.- koeffizient	0.9995	0.9999	0.9998				

Tabelle 78: Statistik der erweiterten Kalibriergeraden von Ketoprofen in 0.9 %iger Natriumchloridlösung.

Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards betrug nach der Erweiterung noch ≥ 19 wodurch die Bestimmungsgrenze gewährleistet war. Die Korrelationskoeffizienten lagen mit Werten ≥ 0.9995 über dem geforderten Maß. Die Genauigkeit aller Kalibrierstandards war gegeben und die Variationskoeffizienten lagen mit Werten zwischen 0.2 % und 7.5 % im Normbereich. Der erweiterte dynamische Bereich von 0.625 – 200 ng/ml erfüllte alle unter 2.5 geforderten Akzeptanzkriterien.

9.3.2.3 Präzision von Tag zu Tag

Zur Validierung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden an den ersten drei Tagen jeweils fünf Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 180, 30.0, 5.00 ng/ml in 0.9 %iger Natriumchloridlösung hergestellt. Zusätzlich wurden an diesen Tagen jeweils drei Qualitätskontrollproben mit den Konzentrationen 180, 30.0, 5.00 ng/ml in Mikrodialysat hergestellt. Die Herstellung erfolgte aus der unter 9.1.2 genannten Stammlösung für die Qualitätskontrollproben analog dem Pipettierschema Tabelle 60. Die Auswertung erfolgte über die an diesem Tage gemessene Kalibriergerade in 0.9 %iger Natriumchloridlösung. Die angegebenen Werte wurden normalisiert.

Qualitäts- kontrollprobe Gemessen am Tag	Gemessene Konzentration von Ketoprofen in					
	0.9 %iger Natriumchloridlösung			Mikrodialysat		
	QC 1	QC 2	QC 3	QC 1	QC 2	QC 3
1	1.021	0.922	1.025	1.060	1.000	1.020
	1.033	0.985	1.036	1.022	0.975	0.969
	1.005	0.992	1.074	1.048	0.973	0.954
	1.019	0.949	0.940			
	1.013	0.981	0.926			
2	1.035	0.969	1.040	1.051	1.018	1.027
	1.019	0.938	1.066	1.034	1.036	0.981
	1.018	1.008	1.105	1.037	1.000	1.057
	1.032	0.961	1.100			
	1.021	1.016	0.969			
3	1.008	0.979	1.008	1.093	1.004	1.086
	0.975	0.980	1.091	1.044	0.999	1.085
	1.034	0.984	1.049	1.079	0.986	1.081
	0.982	1.019	1.024			
	1.008	1.065	1.012			
Mittelwert	1.015	0.983	1.031	1.052	0.999	1.029
s (%)	1.8	3.5	5.4	2.2	2.0	5.2
CV (%)	1.7	3.6	5.3	2.1	2.0	5.0
RE (%)	1.5	-1.7	3.1	5.2	-0.1	2.9

Tabelle 79: Präzision der Qualitätskontrollproben von Ketoprofen in 0.9 %iger Natriumchloridlösung und Mikrodialysat.

Wie in der Tabelle 79 zu sehen, zeigten die Qualitätskontrollproben der in 0.9 %iger Natriumchloridlösung hergestellten Proben eine hohe Genauigkeit mit geringen Standardabweichungen von 1.8 % bis 5.4 % und Variationskoeffizienten von 1.7 % bis 5.3 %. Das System konnte somit als ausreichend genau und präzise betrachtet werden.

Anhand der Genauigkeit der Qualitätskontrollproben, die in Mikrodialysat hergestellt wurden, läßt sich die Quantifizierung der Proben mit einer in 0.9 %iger Natriumchloridlösung hergestellten Kalibriergeraden rechtfertigen. Die Präzision zeigte sich durch die geringen Variationskoeffizienten und die maximale Abweichung von 5.2 % vom theoretischen Wert.

An den Validierungstagen 4 - 6 stand nicht genügend Leermatrix zur Verfügung, um Qualitätskontrollproben im Mikrodialysat herzustellen. Die in 0.9 %iger Natriumchloridlösung hergestellten Qualitätskontrollproben zeigten vergleichbare Werte zu den in Tabelle 79 erhaltenen Werten. Die Genauigkeit aller Proben war gegeben und die Variations-

koeffizienten lagen zwischen 2.6 % und 7.0 %. Die maximale Abweichung vom theoretischen Wert betrug 5.5 %.

Auf die statistische Darstellung der Präzision innerhalb eines Tages wird verzichtet. Diese war bei den Matrices Mikrodialysat und 0.9 %iger Natriumchloridlösung an allen Tagen und bei allen Qualitätskontrollen gegeben.

9.4 Diskussion der Validierungsergebnisse

Die Validierung gliederte sich in zwei Bereiche, die durch die unterschiedlichen Matrices zustande kamen. Bei der Validierung in Humanplasma konnte an insgesamt sieben Tagen ein dynamischer Bereich von 0.480 - 200 ng/ml mit jeweils zwölf Meßpunkten validiert werden. Alle aufgenommenen Werte konnten zur Berechnung der Kalibriergeraden herangezogen werden, wodurch sich maximale relative Standardabweichungen von 1.2 - 7.8 % mit einer Richtigkeit von (- 3.0) – 2.4 % ergaben. Der Korrelationskoeffizient lag für alle Kalibriergeraden ≥ 0.9997 . Die Spezifität der Methode konnte mit männlichem sowie weiblichem Humanplasma nachgewiesen werden. Die gemessenen Qualitätskontrollproben lagen sowohl für die Tag-zu-Tag-Präzision, als auch für die Präzision innerhalb eines Tages alle in den geforderten Grenzen und konnten zur statistischen Auswertung herangezogen werden. Eine Qualitätskontrollprobe, deren Konzentration über dem dynamischen Meßbereich lag, konnte durch Verdünnen mit Leermatrix in den dynamischen Meßbereich verschoben werden, womit gewährleistet wurde, Konzentrationen bis zu 8000 ng/ml quantifizieren zu können. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, daß hämolytisches Plasma keine Einwirkung auf die Meßergebnisse hat. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Proben ohne nachweisbaren Verlust des Analyten nach der Aufarbeitung in den Probengebergefäßen sowohl bei -20°C als auch bei Raumtemperatur bis zu 48 Stunden gelagert werden können.

Das mehrmalige Auftauen und erneute Einfrieren (max. 3 mal) der Proben hatte ebenso wenig Einfluß auf die Proben wie eine kurzzeitige Lagerung (max. 4 Stunden) der Proben im Plasma bei Raumtemperatur. Bei einer Lagerung der Proben im Plasma bei -20°C und -70°C konnte nach 5 Wochen kein Verlust an Analyt erkannt werden. Alle ermittelten Werte wiesen eine hohe Präzision und Genauigkeit auf, wodurch sich die Methode als geeignet zur Bestimmung von Ketoprofen erwies.

Die Wiederfindungsrate lag mit $> 80\%$ in einem akzeptablen Bereich. Vergleichbare Wiederfindungsraten konnten von Carr *et al.*^[157] mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Hirai *et al.*^[161] mittels Normalphasenfestphasenextraktion erhalten werden. Eine Verbesserung hin zu einer Wiederfindungsrate von 100% wie von Rifai *et al.*^[164] angegeben, wurde nicht als notwendig erachtet, da der dynamische Bereich die zu erwartenden Konzentrationsbereiche abdeckte und somit das Quantifizierungslimit als ausreichend angesehen wurde.

Der Umstand, daß die Methode nach elf Tagen bzw. fünf Wochen nach vollständigem Umbau des Systems erneut präzise und genaue Werte produzierte, zeigte, daß es sich bei der entwickelten Methode um eine robuste und gut einsetzbare Methode handelt.

Im Fall der Validierung der Methode in Mikrodialysat mußte ein Umweg über eine weitere Matrix gewählt werden, da vom Mikrodialysat nicht genügend Leermatrix vorhanden war, um eine vollständige Validierung durchzuführen. Als alternative Matrizes wurden Ultrafiltrat und eine 0.9% ige Natriumchloridlösung verwendet. Beide wiesen keine Störungen zur Retentionszeit des Analyten und des internen Standard auf, wodurch sich die Spezifität zeigte. Nach dem ersten Validierungstag, in dem Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben in beiden Matrizes hergestellt wurden, zeigte sich eine höhere Präzision für 0.9% ige Natriumchloridlösung als Matrix. Die weiteren Validierungstage wurden somit ausschließlich mit 0.9% iger Natriumchloridlösung als Matrix durchgeführt. Es zeigte sich an den folgenden beiden Tagen in Analogie zu den Ergebnissen mit Plasma eine hohe Präzision und Genauigkeit sowohl für die Kalibriergeraden als auch für die Qualitätskontrollproben. Der dynamische Bereich von $2.50 - 200\text{ ng/ml}$ sollte jedoch nach unten erweitert werden, da die zu erwartenden Konzentrationen im Mikrodialysat sehr gering waren. An drei weiteren Validierungstagen wurde der dynamische Meßbereich auf 0.625 ng/ml um einen Faktor von vier herabgesenkt. Das Signal-Rausch-Verhältnis des kleinsten Kalibrierstandards war mit ≥ 19 immer noch ausreichend und der Korrelationskoeffizient lag mit ≥ 0.9995 über dem geforderten Maß. Um zu gewährleisten, daß die Probandenproben richtig quantifiziert wurden, wurden an den ersten drei Validierungstagen Qualitätskontrollproben in Mikrodialysat hergestellt und über die Kalibriergeraden in 0.9% iger Natriumchloridlösung ausgewertet. Die Ergebnisse (siehe 9.3.2.3) rechtfertigten die Annahme, daß Mikrodialysatproben unter Verwendung von 0.9% iger Natriumchloridlösung zur Herstellung von Kalibriergeraden quantifiziert werden können.

Die hier validierten Methoden zur Bestimmung von Ketoprofen in Humanplasma und Mikrodialysat zeichneten sich durch eine hohe Präzision und Genauigkeit, sowie durch eine große Robustheit aus, und sind daher gut geeignet, um Ketoprofen innerhalb ihrer dynamischen Bereiche in den validierten Matrices zu quantifizieren.

9.5 Studie

Bei Einnahme von Ketoprofentabletten können vor allem gastrointestinale Beschwerden und auch andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten. Mit dem Ziel Nebenwirkungen zu vermeiden, wurde von einem Arzneimittelhersteller eine lokale Formulierung in Form einer Salbe entwickelt. Hiermit sollten lokal wirksame Konzentrationen z.B. in der Muskulatur erreicht werden, wobei systemische Nebenwirkungen weitestgehend vermieden werden sollten.

Die unter 9.3 validierten Methoden wurden zur Messung von Ketoprofen in Humanplasma und Mikrodialysat angewendet. Nach Messung der Proben sollten folgende pharmakokinetische Parameter bestimmt werden:

C_{\max} , t_{\max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ und der Restfläche (%)

9.5.1 Studiendesign und Probanden

Bei der Phase-I-Pharmakokinetik-Studie sollte untersucht werden, ob bei Anwendung von Ketoprogel auf der Haut in der darunterliegenden Muskulatur ausreichende Gewebekonzentrationen erreicht werden. Die Gewebekonzentrationen nach topischer Anwendung sollten mit denen nach intramuskulärer Injektion verglichen werden. Zur Überprüfung der Ketoprofenkonzentrationen wurden Blut- und Mikrodialysatproben entnommen.

Die Studie wurde randomisiert, nicht verschlüsselt, in drei Perioden mit drei Applikationen an gesunden Probanden durchgeführt. Jeder Proband erhielt während der drei Perioden jede Formulierung (Crossover-Design). Um keinen Effekt einer Medikation in die kommende Periode zu erhalten, wurde die Auswaschphase auf mindestens 14 Tage angesetzt. An der Studie nahmen 12 männliche Probanden im Alter zwischen 18-50 Jahren teil.

Die Formulierungen bestanden aus einer Injektionslösung von 1.0 ml (äquivalent zu 50 mg Ketoprofen) und aus einem Ketoprogel, welches 20 mg Ketoprofen pro Gramm Gel enthielt. Für die lokalen Applikationen wurden 1.25 g Gel (äquivalent zu 25 mg Ketoprofen) und 2.5 g Gel (äquivalent zu 50 mg Ketoprofen) verwendet.

Die Medikation erfolgte per Injektion intramuskulär in den kontralateralen Oberschenkelmuskel oder durch Einmassieren eines 10 x 10 cm großen Hautbereichs des Oberschenkels, an dem ein Dialysesystem saß, wobei über die Stelle der Punktur eingerieben wurde. Es wurde darauf geachtet, daß während des Auftragens des Gels keine Hautrötung auftrat.

Blutentnahme:

Zur Blutentnahme wurde ein Katheter in eine Vene des rechten oder linken Arms gelegt. Die Blutproben wurden in Primavetten[®] abgenommen (10 ml), vorsichtig in der Primavette[®] geschwenkt und bei 3.600 U/min (3280 g) 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde in zwei Mikro-Schraubgefäße abgefüllt und sofort bei < - 18 °C eingefroren. Die Plasmaproben wurden anschließend bei < - 18 °C vom Studienort zum Analyselabor transportiert und dort unter gleichen Bedingungen bis zum Beginn der Aufarbeitung gelagert. Die Blutproben wurden wie folgt entnommen:

nach topischer Medikation:

0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 26, 30, 34, 50 Stunden ab Beginn der Medikation.

nach intramuskulärer Medikation:

0, 0.17, 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 Stunden ab Beginn der Medikation.

Dialysatentnahme:

Eine Mikrodialysatsonde wurde in den mittleren Oberschenkelmuskel gelegt, nachdem dieser lokal betäubt wurde. Dieser wurde mit einem 2 cm² großen sterilen Pflaster abgedeckt, um eine direkte Kontamination zu vermeiden. Die Flußrate der Mikrodialysatanlage betrug 2 µl/min und wurde mit 0.9 %iger Natriumchloridlösung betrieben. Vor der Medikation wurde eine 20 Minuten Probe als Leerwert genommen.

Abgenommen wurden Dialysatproben alle 30 Minuten bis 8 Stunden nach der Medikation. Das erhaltene Dialysat wurde in Mikro-Schraubgefäße abgefüllt und sofort bei < - 18 °C eingefroren. Die Dialysatproben wurden anschließend bei < - 18 °C vom Studienort zum Analyselabor transportiert und dort unter gleichen Bedingungen bis zum Beginn der Aufarbeitung gelagert.

Herstellung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben:

Die Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben wurden analog denen der Validierung vor Beginn der Studie hergestellt und bis zu ihrer Verwendung bei < - 18 °C eingefroren. Die Konzentrationen gehen aus der Tabelle 80 hervor.

9.5.2 Ergebnisse der Dialysatproben von Ketoprofen

9.5.2.1 Ergebnisse der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben

Die Proben wurden in insgesamt sieben Sequenzen gemessen. Die Anzahl aller gemessenen Proben betrug 846. Die Tabelle 80 zeigt die daraus erhaltenen Werte für die Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben.

Qualitätskontroll- Probe bzw. Kalibrier- standard	Theoretische Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)	Anzahl der Proben	Mittel- wert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
L1	187	7	189	3.57	1.9
L2	93.5	7	93.0	3.46	3.7
L3	46.5	7	46.2	2.03	4.4
L4	23.3	7	22.6	0.864	3.8
L5	9.32	7	9.04	0.361	4.0
L6	4.66	7	4.48	0.199	4.4
L7	2.32	7	2.37	0.165	7.0
L8	1.17	5	1.25	0.0710	5.7
L9	0.590	4	0.625	0.0672	10.8
QC 1	173	26	177	7.49	4.2
QC 2	29.0	26	29.6	1.20	4.1
QC 3	4.75	26	4.82	0.277	5.7
QC 2 MD	28.4	13	27.6	2.55	9.3

Tabelle 80: Konzentration von Ketoprofen in Dialysatproben.

Die ersten drei Sequenzen wurden mit den Kalibrierstandards 1 bis 7 gemessen. In der vierten Sequenz wurde die Kalibriergerade um den Kalibrierstandard 8 und ab der fünften Sequenz um den Kalibrierstandard 9 erweitert. Alle Kalibrierstandards wurden zur Auswertung verwendet. Der Korrelationskoeffizient lag bei ≥ 0.999 und die Variationskoeffizienten erfüllten die Akzeptanzkriterien. Ebenso lagen alle Qualitätskontrollproben innerhalb der erforderlichen Genauigkeit. Die als QC 2 MD bezeichnete Qualitätskontrollprobe wurde in Mikrodialysat hergestellt und zur Überprüfung verwendet. Alle im Mikrodialysat hergestellten Qualitätskontrollproben lagen innerhalb der erforderlichen Genauigkeit, wodurch auch während der Messung der Mikrodialysatproben bestätigt werden konnte, daß die verwendete Matrix für die Kalibriergeraden (0.9 %ige Natriumchloridlösung) geeignet ist.

9.5.2.2 Ergebnisse der Probandenproben

Von den insgesamt 846 gemessenen Proben waren 598 Dialysatproben von den Probanden. Von vierzehn Abnahmezeitpunkten standen keine Proben zur Verfügung. Acht Proben der lokalen Formulierung von 25 mg Ketoprofen und jeweils drei Proben der anderen beiden Formulierungen konnten nicht entnommen werden.

Die Dialysatkonzentrationen der lokalen Anwendungen waren sehr gering. So konnten von 196 vorhandenen Proben nur 52 bei der topischen Applikation von 25 mg Ketoprofen im Dialysat quantitativ bestimmt werden (entsprechend 25 %). Von den 201 Proben nach topischer Applikation von 50 mg Ketoprofen konnten 66 Proben (entsprechend 32 %) quantitativ bestimmt werden. Mit den erhaltenen Daten konnten keine aussagefähigen pharmakokinetischen Daten berechnet werden. Hinzu kamen nicht zu erklärende Proben mit sehr hohen Werten. Die Tabelle 81 zeigt beispielhaft die für die Probanden 1 und 5 bestimmten Werte.

Zeitpunkt (h)	Ketoprofenkonzentration in ng/ml nach lokaler Medikation von			
	25 mg		50 mg	
	Proband 1	Proband 5	Proband 1	Proband 5
0.00	1.55	1.28	-/-	-/-
0.50	-/-	0.600	1.95	0.641
1.00	-/-	-/-	1.45	-/-
1.50	-/-	1.06	-/-	-/-
2.00	-/-	1.36	-/-	-/-
2.50	-/-	-/-	-/-	-/-
3.00	-/-	-/-	-/-	-/-
3.50	-/-	0.643	1.22	-/-
4.00	-/-	0.705	1.64	-/-
4.50	-/-	0.827	1.93	-/-
5.00	-/-	2.57	2.06	-/-
5.50	-/-	0.662	2.77	-/-
6.00	-/-	1.29	3.11	-/-
6.50	-/-	262	1.52	-/-
7.00	-/-	2.90	1.46	-/-
7.50	-/-	1.27	1.76	-/-
8.00	-/-	1.83	1.54	-/-

-/-: nicht zu quantifizieren

Tabelle 81: Konzentration von Ketoprofen in Dialysatproben.

Die Konzentrationen des Probanden 1 konnte bei der 25 mg Dosis nicht quantifiziert werden. Ungewöhnlich ist der Wert für den 0.00-Stundenwert, der keine Konzentration enthalten sollte. Bei der 50 mg Dosierung konnte die überwiegende Zahl der Proben quantifiziert werden. Fragwürdig bleiben die Zeitpunkte zwischen 1.50 und 3.00 Stunden in denen kein Ketoprofen nachgewiesen werden konnte. Entgegen der zu erwartenden Zunahme der Konzentrationen an Ketoprofen bei dem Probanden 5, konnten bei der 50 mg Dosierung keine Konzentrationen nachgewiesen werden. Herausstechend ist der 6.50 Stundenwert, der mit 262 ng/ml deutlich über allen gemessenen Werten in Dialysat bei lokaler Applikation lag. Eine mögliche Erklärung könnte eine Kontamination der Probe sein.

Entgegen den geringen Werten für die topische Applikation, konnten von den 201 zu analysierenden Proben bei der intramuskulären Injektion 163 quantitativ bestimmt werden (entsprechend 81 %). Mit diesen Werten konnten die pharmakokinetischen Parameter bestimmt werden. Die Tabelle 82 zeigt die Daten für die Probanden 1, 4, 5, 8, 11 und 12.

Proband	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{0->last} (ng•h/ml)	AUC _{0->∞} (ng•h/ml)	Restfläche (%)
1	13.5	1.50	3.51	39.1	54.0	27.6
4	8.16	3.00	2.41	32.9	40.6	18.9
5	26.5	2.00	1.54	83.4	90.0	7.3
8	24.6	1.00	2.43	62.3	71.1	12.4
11	16.1	1.50	2.58	34.1	45.0	24.3
12	17.3	1.50	3.70	46.7	61.0	23.3
Anzahl	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	17.7	1.75	2.70	49.8	60.3	19.0
s	6.88	0.69	0.80	19.7	18.2	7.8
CV (%)	38.8	39.4	29.6	39.6	30.2	40.9
Minimum	8.16	1.00	1.54	32.9	40.6	7.3
Maximum	26.53	3.00	3.70	83.4	90.0	27.6

Tabelle 82: Pharmakokinetische Parameter nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen (Dialysat).

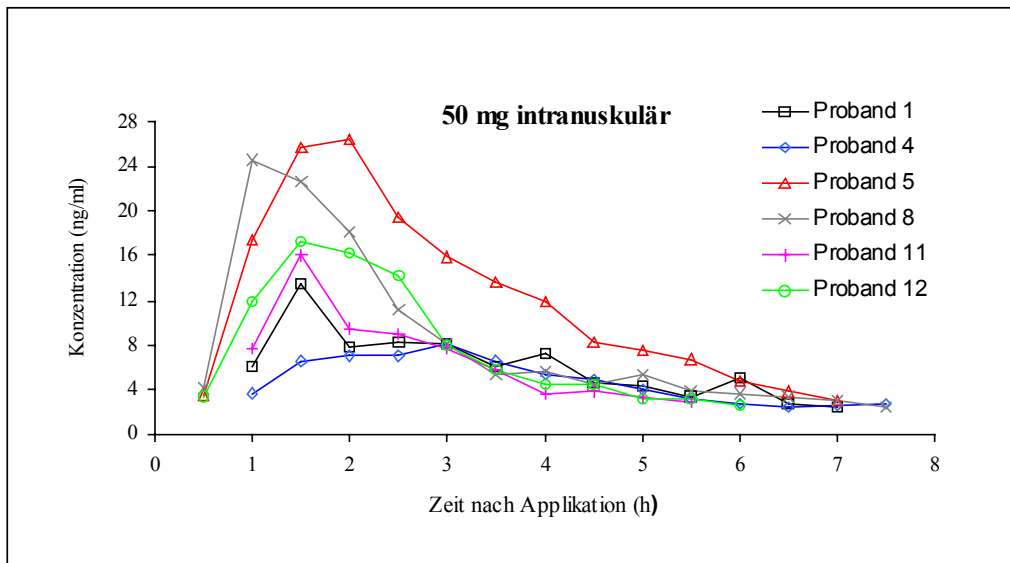


Abbildung 77: Darstellung der Ketoprofenkonzentration im Mikrodialysat von sechs Probanden nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen.

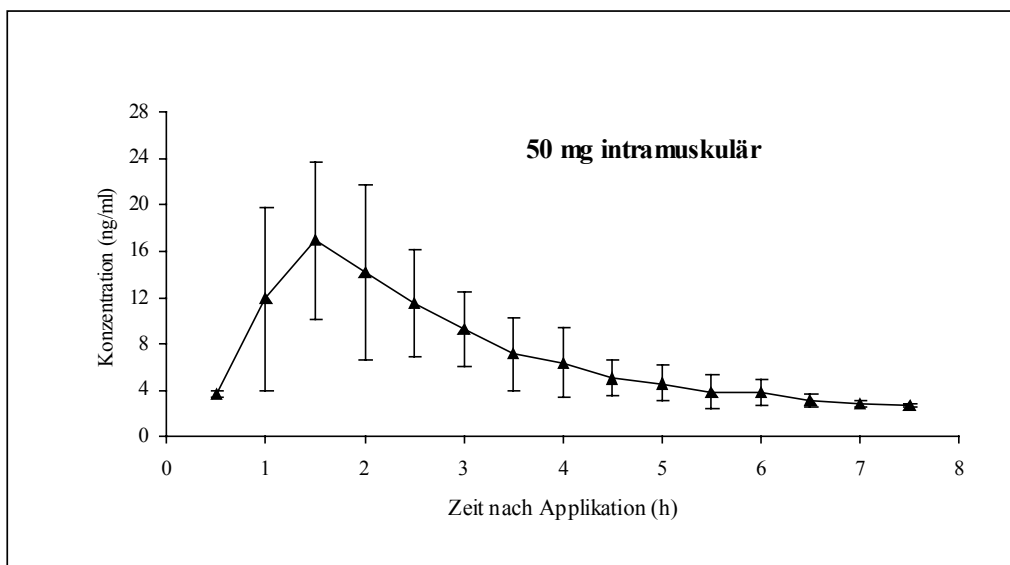


Abbildung 78: Darstellung der Ketoprofenkonzentration (Mittelwerte \pm s) im Mikrodialysat von sechs Probanden nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen.

Die Abbildung 77 zeigt noch einmal die Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden auf. So ist die maximale Konzentration des Probanden 5 etwa um drei höher als die des Probanden 4. Es zeigt sich ebenfalls eine Verschiebung der t_{max} , die bei Proband 4 mit 3.00 Stunden eine Stunde über der des Probanden 5 und zwei Stunden über der des Probanden 8 liegt. Hingegen sind die terminalen Halbwertszeiten nur im geringeren Maße unterschiedlich. Auch hier bildet der Proband 5 mit einer terminalen Halbwertszeit von ca.

1.5 Stunden gegenüber den anderen Probanden mit einer durchschnittlichen terminalen Halbwertszeit von nahezu 3 Stunden eine Ausnahme. Dies führt dazu, daß die Konzentration nach 7.00 Stunden bei allen Probanden nahezu gleich ist.

Bei der Berechnung der terminalen Halbwertszeiten von Proband 1 und 4 wurden die letzten drei Datenpunkte nicht verwendet, da diese im Falle des Probanden 4 einen geringen Anstieg zeigten und der 6.00-Stundenwert des Probanden 1 (drittletzter Datenpunkt) einen sehr hohen Wert aufwies. Mit diesem würde eine terminale Halbwertszeit von 0.96 Stunden berechnet werden. Daher wurden für den Probanden 1 der viertletzte anstelle des drittletzten Datenpunkts zur Berechnung verwendet. Im Falle des Probanden 4 wurden die Datenpunkte der Zeitpunkte 5.50 – 6.50 verwendet, bis zu denen ein kontinuierlicher Abfall der Analytkonzentrationen zu verzeichnen war.

Die $AUC_{0 \rightarrow last}$ des Probanden 5 gegenüber der des Probanden 4 ist ebenfalls etwa um drei höher. Dies läßt den Schluß zu, daß der Proband 4 den Wirkstoff nicht nur langsamer sondern auch im geringeren Maße resorbiert hat als der Proband 5. Die weiteren Probanden liegen zwischen den beiden Extremwerten der oben besprochenen Probanden 4 und 5. Anhand der Standardabweichungen vom Mittelwert in Abbildung 78 zeigt sich eine relativ geringe Varianz zwischen den einzelnen Probanden, die mit zunehmender Zeit nach der Applikation geringer wird. Der Vergleich der $AUC_{0 \rightarrow last}$ und der $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ zeigt eine Restfläche von durchschnittlich 19 % an. Dieser Wert ist noch ausreichend, um eine Extrapolation vorzunehmen.

9.5.3 Ergebnisse der Plasmaproben von Ketoprofen

9.5.3.1 Ergebnisse der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben

Die Proben wurden in insgesamt sieben Sequenzen gemessen. Die Anzahl aller gemessenen Proben betrug 688. Tabelle 83 zeigt die daraus erhaltenen Werte für die Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben.

Qualitätskontrollprobe bzw. Kalibrierstandard	Theoretische Konzentration an Ketoprofen (ng/ml)	Anzahl der Proben	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	CV (%)
L1	506.7	7	511.0	10.19	2.0
L2	406.5	7	402.9	6.104	1.5
L3	254.3	7	253.5	4.423	1.7
L4	101.3	7	102.3	2.052	2.0
L5	50.51	7	50.61	0.8593	1.7
L6	25.28	7	24.71	0.6962	2.8
L7	10.06	7	9.702	0.4659	4.8
L8	5.019	7	4.900	0.1768	3.6
L9	2.008	7	1.949	0.08957	4.6
L10	1.007	6	1.023	0.04894	4.8
L11	0.7593	6	0.8163	0.02516	3.1
L12	0.5068	7	0.5193	0.05147	9.9
QC D20	8145	20	8473	412.9	4.9
QC 1	394.3	20	396.2	12.59	3.2
QC 2	28.50	20	28.13	1.486	5.3
QC 3	1.113	20	1.075	0.08356	7.8

Tabelle 83: Statistische Auswertung der Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben von Ketoprofen in Plasma.

Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben erfüllten die Anforderung zur Messung von biologischen Proben in Humanplasma. Der Korrelationskoeffizient lag bei ≥ 0.9993 und die Variationskoeffizienten zeigen mit Werten zwischen 1.5 % und 9.9 % die gute Qualität der Kalibriergeraden. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Validierung konnte bestätigt werden, ebenso die Selektivität anhand der 12 verschiedenen Probandenplasmen. Mit Werten für den Variationskoeffizient von 3.2 % bis 7.8 % zeigen die Qualitätskontrollproben ein hohes Maß an Präzision. Abweichungen von maximal 4.0 % vom theoretischen Wert zeigen eine hohe Genauigkeit für die Qualitätskontrollproben.

9.5.3.2 Ergebnisse der Probandenproben

Von den 688 Proben wurden 431 Probandenplasmaproben in den sieben Sequenzen gemessen. Der 50.00-Stundenwert von einem Probanden fehlte. Auch bei den Plasma-proben zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Dialysatproben. Von den theoretisch zu bestimmenden 132 Proben der jeweiligen topischen Applikation, konnten bei der 25 mg

Dosis 44 % und bei der 50 mg Dosis 53 % der Proben quantitativ bestimmt werden. Da die quantifizierten Proben jedoch nicht, wie beim Dialysat zeitlich verstreut lagen, machte dies eine pharmakokinetische Auswertung der Proben möglich. Die Ergebnisse gehen aus Tabelle 84 hervor.

Dosis	C_{\max} (ng/ml)	t_{\max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ (ng•h/ml)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng•h/ml)	Restfläche (%)
25 mg	5.62 ± 5.51	26.67 ± 1.63	13.96 ± 6.13	112 ± 95.6	168 ± 139	18.6 ± 8.1
50 mg	10.6 ± 8.32	20.67 ± 8.26	14.48 ± 5.35	207 ± 155	303 ± 207	20.3 ± 10.7

Tabelle 84: Pharmakokinetische Parameter (Mittelwerte ± s) nach topischer Applikation von Ketoprofen von sechs Probanden (Plasma).

Die hohen Standardabweichungen zeigten eine große Variation der Ergebnisse. Dies spiegelt sich auch in den Graphiken für die einzelnen Probanden wider (Abbildung 79). Dabei liegen die erhaltenen Einzelwerte nicht unbedingt signifikant auseinander. Werden jedoch die pharmakokinetischen Daten wie AUC nur mit vier Meßpunkten bestimmt (Proband 8), liegt der erhaltene Wert dadurch schon um einen erheblichen Teil unter einem Wert, der mit mehr Meßpunkten bestimmt werden konnte (Proband 12; 7 Meßpunkte). In dem genannten Beispiel liegt ca. ein Faktor zwei zwischen den berechneten Werten für $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ (Proband 8 mit 44.0 ng•h/ml und Proband 12 mit 92.7 ng•h/ml). Hinzu kommen noch die interindividuellen Schwankungen der Probanden; so liegen die Plasmakonzentrationen der Probanden 4 und 5 um Faktor 3 – 5 höher als von Proband 12, was zu einer um Faktor 2 – 3 höheren $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ führt (Proband 4 mit 174 ng•h/ml und Proband 5 mit 274 ng•h/ml). Dadurch ergaben sich zwischen der geringsten und größten bestimmten $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$ ein Faktor von ca. 8, der die großen Standardabweichungen erklären kann. Gering fallen die Standardabweichungen lediglich bei der Bestimmung von t_{\max} aus, da diese weitgehend übereinstimmen. Die erhaltenen Werte müssen jedoch kritisch gesehen werden, da die Menge an Datenpunkten nicht als optimal zur Bestimmung der in Tabelle 84 angegebenen Parameter angesehen werden kann. So wurde der Proband 1 mit nur drei Datenpunkten nicht für die Berechnung der Mittelwerte verwendet, da die Aussagekraft der pharmakokinetischen Daten dieses Probanden nicht durch genügend Datenpunkte untermauert ist.

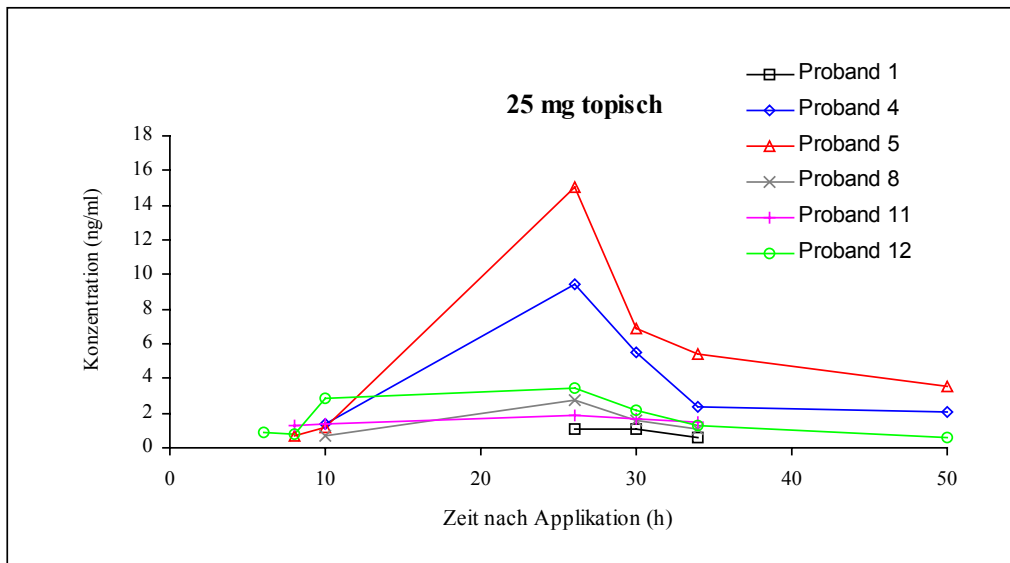


Abbildung 79: Darstellung der Ketoprofenkonzentration im Plasma von sechs Probanden nach topischer Gabe von 25 mg Ketoprofen.

Hingegen konnten für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter bei der Applikation von 50 mg Ketoprofen (topisch) alle sechs Probanden verwendet werden. Abbildung 80 zeigt den Verlauf der Plasmakonzentrationen.

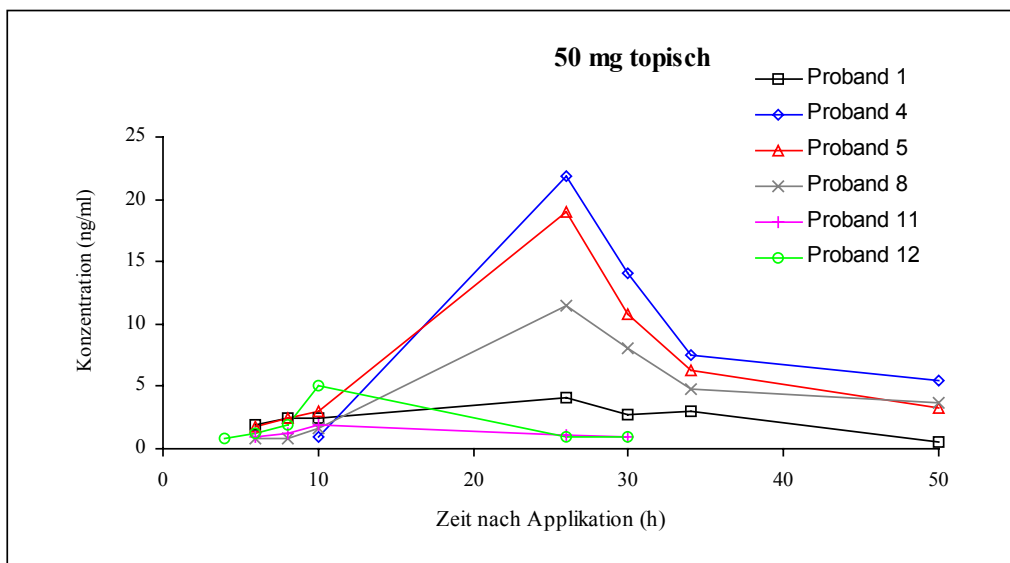


Abbildung 80: Darstellung der Ketoprofenkonzentration im Plasma von sechs Probanden nach topischer Gabe von 50 mg Ketoprofen.

Die erhaltenen Werte zeigten für eine Verdoppelung der Dosis weitestgehend den erwarteten Verlauf. So lagen die Konzentrationen der Probanden 4 und 5 erneut am höchsten und zeigten einen Konzentrationsabfall nach dem 26.00-Stundenwert. Kleine Ver-

schiebungen zeigten sich bei anderen Probanden. Hier liegen die Plasmakonzentrationen des Probanden 1 über denen der Probanden 11 und 12.

Die pharmakokinetischen Parameter spiegeln trotz der geringen Datenmenge sehr gut die Verdoppelung der Dosis wider.

Wie auch schon bei den Dialysatproben konnten wesentlich höhere Konzentration nach der intramuskulären Injektion erhalten werden. Von den theoretischen 132 zu quantifizierenden Proben konnten 131 quantifiziert werden. Einzig eine Probe war unterhalb der Bestimmungsgrenze. Mit den erhaltenen Werten konnten die pharmakokinetischen Parameter bestimmt werden. Tabelle 85 zeigt die Ergebnisse der sechs Probanden.

Proband	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{0->last} (ng•h/ml)	AUC _{0->∞} (ng•h/ml)	Restfläche (%)
1	1802	1.00	3.11	5750	6006	4.3
4	1728	0.67	3.96	5345	5841	8.5
5	4205	0.67	2.31	9124	9349	2.4
8	3363	0.67	2.14	7985	8188	2.5
11	2693	0.67	2.32	5452	5541	1.6
12	3524	0.33	2.57	7623	7889	3.4
Anzahl	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	2886	0.67	2.74	6880	7136	3.8
s	993	0.21	0.69	1580	1553	2.5
CV (%)	34.4	31.7	25.2	23.0	21.8	66.0
Minimum	1728	0.33	2.14	5345	5541	1.6
Maximum	4205	1.00	3.96	9124	9349	8.5

Tabelle 85: Pharmakokinetische Parameter nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen (Plasma).

Bei diesen Daten waren die individuellen Schwankungen wesentlich geringer, was sich sowohl in den Standardabweichungen zeigt, respektive in den Variationskoeffizienten, aber auch anhand der Graphiken sichtbar wird. Die Abbildungen 81 und 82 zeigen analog zu den Abbildungen 77 und 78 des Dialysats die Werte der einzelnen Probanden und daraus entstehend die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

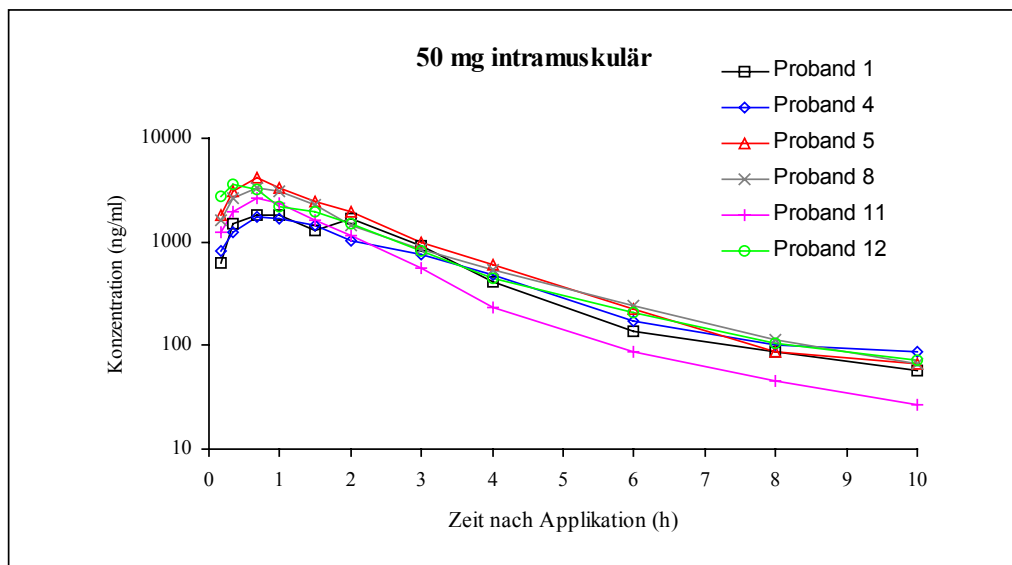


Abbildung 81: Halblogarithmische Darstellung der Ketoprofenkonzentration im Plasma von sechs Probanden nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen.

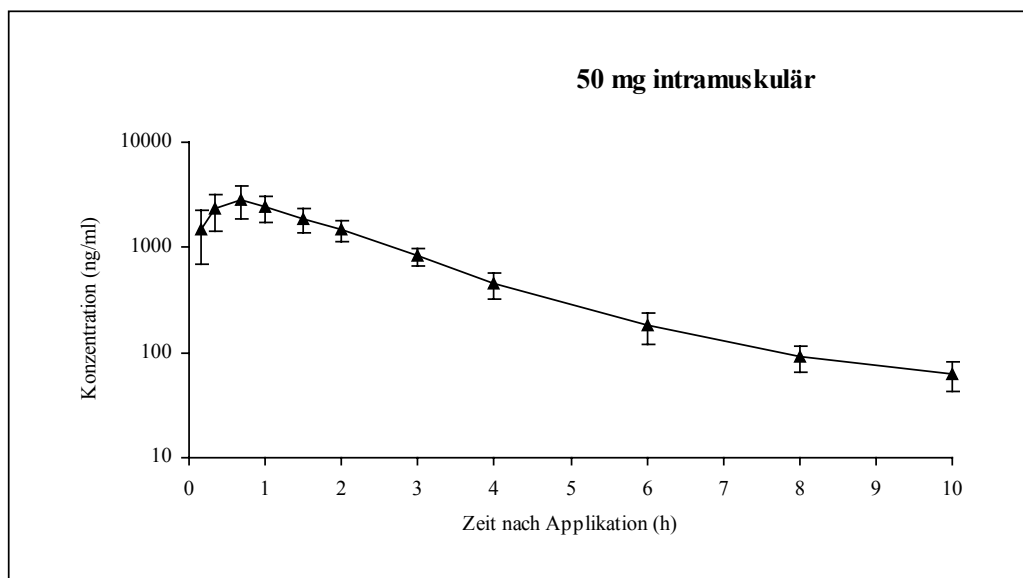


Abbildung 82: Halblogarithmische Darstellung der Ketoprofenkonzentration (Mittelwerte $\pm s$) im Plasma von sechs Probanden nach intramuskulärer Gabe von 50 mg Ketoprofen.

9.5.4 Diskussion der Ergebnisse aus der Studie

Auf eine ausführliche Diskussion der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Es zeigte sich aus den Ergebnissen der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben im Dialysat (9.5.2.1) und Plasma (9.5.3.1) jeweils eine gute Präzision und eine ausreichende Genauigkeit, die die Ergebnisse der Validierung während der Messung der Studienproben bestätigten.

Sowohl die topische Applikation von 25 mg, als auch von 50 mg Ketoprogel zeigten deutlich geringere Plasmakonzentrationen als nach intramuskulärer Injektion von 50 mg Ketoprofen, womit ein Ziel des Versuches, systemische Nebenwirkungen zu vermeiden, erreicht wurde. Die erhaltenen Konzentrationen im Dialysat zeigen jedoch, daß die Konzentration an der lokalen Behandlungsstelle nach topischer Applikation so gering sind, daß ein therapeutischer Erfolg ausblieb. Um ausreichend hohe Konzentrationen an die zu therapierende Körperstelle zu bringen, reichten die verwendeten Formulierungen nicht aus. Daneben muß davon ausgegangen werden, daß die Plasmakonzentration bei einer Erhöhung der lokalen Applikation ebenfalls ansteigt. Würden therapeutische Konzentration an der lokalen Behandlungsstelle durch ein Gel, wie es in der Studie verwendet wurde, erreicht, wären die Plasmakonzentrationen erneut in einem Bereich, indem das Problem der Nebenwirkungen auftritt. Der Versuch durch eine lokale Applikationsform die Konzentration von Ketoprofen an der Behandlungsstelle in einen therapeutisch wirksamen Konzentrationsbereich zu bringen ohne dabei Plasmaspiegel von herkömmlichen Applikationsformen (intramuskulär) zu erreichen, kann anhand der ermittelten Dialysat- und Plasmakonzentrationen als misslungen betrachtet werden.

Probleme zeigten sich zusätzlich bei dem Design der topischen Applikation des Ketoprogels und der anschließenden Abnahme des Mikrodialysats. Die bestimmten Konzentrationen zeigten ein uneinheitliches Bild. Dies gilt sowohl für die ermittelten Werte innerhalb einer Applikation (siehe Proband 5; 25 mg topisch), bei dem neben dem Maximalwert bei 6.50 Stunden kein kontinuierlicher Verlauf der Ketoprofenkonzentration zu erkennen war, als auch für die Applikationen untereinander. So sind bei dem genannten Probanden bei höherer Dosierung keine Ketoprofenkonzentrationen nachzuweisen gewesen. Geht man davon aus, daß es während der Durchführung der Applikation und der Dialysatentnahme zu Kontaminationen gekommen ist, läßt sich der hohe Wert von 262 ng/ml (Proband 5; 25 mg topisch; 6.50 Stunden) erklären. Diesem Gedankengang folgend kann nicht ausgeschlossen werden, daß die weiteren Werte auch kontaminiert wurden. Hat diese Kontamination bei der zeitlich versetzten Applikation von 50 mg Ketoprofen (topisch) nicht stattgefunden, kann ein Ausbleiben der Ketoprofenkonzentration im Dialysat bei Proband 5 erklärt werden. Da dies jedoch nicht eindeutig bewiesen werden konnte, bleibt offen, welche Werte valide sind. Nimmt man an, es handle sich nicht um eine Kontamination, so bleibt weiter festzuhalten, daß eine Verringerung des Quantifizierungslimits bei der Bestimmung des Dialysats aus analytischer Sicht anzustreben wäre, um

Konzentrationen unterhalb von 0.590 ng/ml zu bestimmen, obwohl darauf hingewiesen werden soll, daß dieser Konzentrationsbereich therapeutisch irrelevant ist.

Eine Reduzierung des Quantifizierungslimits bei den Dialysatproben kann aufgrund der geringen Probenvolumina nicht durch Konzentration des Analyten erreicht werden. Eine theoretische Möglichkeit bietet ein Wechsel der Ionenquelle und eine Verringerung des Säulendurchmessers. Jedoch zeigten die Versuche während der Methodenentwicklung keine guten Ionenausbeuten mit der Elektrospray-Quelle und auch neueste Arbeiten wie von Abdel-Hamid *et al.*^[165] verwenden die APCI-Quelle zur Ionisierung im negativen Modus von NSAR Schmerzmittel. Hingegen wurde von Eichhold *et al.*^[166] im April 2000 der oben genannte Gedanke umgesetzt, und Ketoprofen wurde mit der Turbo-Elektrospray-Quelle gemessen. Der Ionisierungsmodus war entgegen des hier vorgestellten Modus positiv. Die Verwendung einer chiralen Trennsäule mit 2.0 mm Innendurchmesser ermöglichte ein Quantifizierungslimit der Enantiomere von 50 pg/ml bei eingesetzten 1.0 ml Plasma. Die Aufreinigung erfolgte im 96er-Mikrotiterplatten-Format mit einer absolute Wiederfindungsrate von 75 % und liegt im selben Bereich wie die in dieser Arbeit vorgestellten.

Das Fehlen aussagekräftiger Dialysatkonzentrationen bei den topischen Applikationen führt dazu, daß kein analytisch eindeutiges Ergebnis der Studie erhalten werden konnte. So läßt sich feststellen, daß die Plasmakonzentrationen von Ketoprofen nach topischer Gabe von 50 mg Ketoprofen in Form eines Gels doppelt so hoch waren wie nach Gabe von 25 mg. Die Maximalkonzentrationen in Plasma nach intramuskulärer Injektion (50 mg Ketoprofen) lagen um einen Faktor ~250 über der topischen Applikation und die Werte für die $AUC_{0 \rightarrow last}$ lagen um einen Faktor ~25 darüber. Dies zeigt deutlich die hohen Ketoprofenkonzentrationen im Plasma nach intramuskulärer Injektion gegenüber der topischen Applikation. Ohne die entsprechenden Ketoprofenkonzentrationen im Gewebe der zu behandelnden lokalen Stelle kann jedoch keine quantitative Aussage darüber getroffen werden, wie sich die beiden Applikationsformen an der lokalen Stelle unterscheiden.

So konnten pharmakokinetische Parameter für die intramuskuläre Injektion von 50 mg Ketoprofen im Dialysat bestimmt werden, jedoch nicht für die topischen Applikationen.

9.6 Zusammenfassung der LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Ketoprofen in Plasma und Mikrodialysat

Neben der Bestimmung der Ketoprofenkonzentration im Plasma mit einer LC-MS/MS-Methode wurde diese auch im Mikrodialysat nachgewiesen. Für beide Matrizes wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt, validiert und zur Anwendung gebracht. Für die Validierung von Ketoprofen im Dialysat stand nicht genügend Leermatrix zur Verfügung. Daher wurden als vergleichbare Matrizes 0.9 %ige Natriumchloridlösung, wie sie auch für die Dialyse verwendet wurde, und Ultrafiltrat, welches aus Plasma gewonnen wurde, auf die Anwendbarkeit für die Bestimmung der Ketoprofenkonzentrationen hin untersucht. Es zeigte sich, daß 0.9 %ige Natriumchloridlösung geeignet zur Bestimmung der Ketoprofenkonzentrationen in Dialysatproben war. Die Ergebnisse der Validierungen im Plasma und im Dialysat entsprachen den gesetzten Anforderungen von einem Signal-Rausch-Verhältnis > 5 und maximalen Abweichungen von $\pm 20\%$ des theoretischen Werts der Qualitätskontrollproben und des kleinsten Kalibrierstandards. Die restlichen Kalibrierstandards besaßen eine maximale Abweichung von $\pm 15\%$ vom theoretischen Wert. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden war ≥ 0.95 und während der Anwendung der Methoden konnten die erhaltenen Validierungsdaten bestätigt werden. Die entwickelten Methoden erwiesen sich als robust und leicht anzuwenden. Die quantitative Bestimmung der Dialysatproben beinhaltete einige Probleme. So wurden wie bei den Ergebnissen der Dialysatproben (9.5.2.2) dargestellt nicht zu erklärende Konzentrationen bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die schwankenden Daten nicht auf die analytische Methode zurückzuführen waren. Daher wurde die Möglichkeit einer Kontamination während des klinischen Teils der Studie nicht ausgeschlossen. Die technische Umsetzung der Entnahme von Dialysat an der applizierten Stelle des Körpers gestaltet sich schwierig und beinhaltet die Möglichkeit der Kontamination. Eine Beurteilung des klinischen Teils der Studie würde jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, der sich mit dem analytischen Teil auseinandersetzt. Dennoch sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die Analytik mit der Probennahme beginnt. Da der Analytiker häufig dieser nicht beiwohnen kann, steht dieser bei unregelmäßigen oder wie in diesem Fall unerklärlichen Meßergebnissen vor der Frage, ob die Probennahme Ursache der unregelmäßigen oder unerklärlichen Meßergebnisse ist, oder ob das analytische Verfahren

Schwächen enthält. Letzterer Fall konnte für die Messung der Ketoprofenkonzentrationen ausgeschlossen werden.

Legt man die erhaltenen Dialysatkonzentration für die intramuskuläre Injektion von 50 mg Ketoprofen zugrunde, die bestimmt werden konnten, muß die Aussage getroffen werden, daß die topische Applikation derselben Menge an Ketoprofen als Gel zu geringeren Dialysatkonzentrationen führt. Eine quantitative Aussage kann wie bereits erwähnt aufgrund fehlender Daten nicht eindeutig getroffen werden. Jedoch zeigten die erhobenen Daten, daß die topischen Applikationsformen nicht zu therapeutisch wirksamen Ketoprofenkonzentrationen an der lokalen Stelle geführt haben. Sie führten vielmehr zu einer Plasmakonzentration, von der aus extrapoliert werden kann, daß die zu vermeidenden Nebenwirkungen, bei erreichen wirksamer Ketoprofenkonzentrationen an der lokal zu therapierenden Körperstelle, eintreten könnten.

Die hier entwickelten LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung der Ketoprofenkonzentrationen in Plasma und Mikrodialysat sind geeignet, um schnell und effizient die Wirkstoffkonzentration bis zu einem Quantifizierungslimit von 500 pg/ml zu bestimmen. Sie zeichnen sich durch ihre leichte Anwendbarkeit aus und durch eine hohe Robustheit, die sich innerhalb der Validierungen und der Messung der Probandenproben gezeigt hat. Das erreichte Quantifizierungslimit konnte aus pharmakologischer Sicht als ausreichend angesehen werden. Wäre dennoch eine Reduzierung des Quantifizierungslimit gewünscht, müßten die dargestellten Methoden geändert werden. So wäre eine Reduzierung um einen Faktor 10 wie von Eichhold *et al.*^[166] erreicht, nur über die Erhöhung der einzusetzenden Plasmamenge auf 1.0 ml zu erreichen. Das Quantifizierungslimit könnte somit auf 100 pg/ml reduziert werden, jedoch ist aus den angesprochenen Gründen eine Volumenerhöhung bei den Dialysatproben nicht möglich. Eine weitere Reduzierung des Quantifizierungslimit würde nur über den Wechsel zu einer Elektrospray-Quelle und der Reduzierung des Säuleninnendurchmessers erfolgen können. Geht man davon aus, daß die Reduzierung des Säuleninnendurchmessers auf 2.0 mm einen Faktor von zwei bewirkt, erhält man ein Quantifizierungslimit von 50 pg/ml bei Einsatz von 1.0 ml Plasma. Da in der vorgestellten Methode die Enantiomere nicht getrennt wurden, ergibt sich ein weiterer Faktor von zwei, welcher den Gewinn an Empfindlichkeit der Elektrospray-Quelle, wie von Eichhold *et al.*^[166] verwendet, gegenüber der in dieser Arbeit vorgestellten Methode mittels APCI-Quelle, entspricht.

10 Zusammenfassung

Zur Bestimmung von geringen Wirkstoffkonzentrationen in biologischen, speziell humanbiologischen Matrices wie Blut, Urin oder Mikrodialysat bedarf es einer Analysetechnik, die den Wirkstoff mit einem Höchstmaß an Selektivität, Spezifität und Präzision bestimmen kann. Daneben muß die verwendete Methode eine hohe Geschwindigkeit aufweisen und sehr robust sein, da bei der heutigen marktwirtschaftlichen Lage Analysensysteme eine optimale Auslastung erfahren müssen. Aus diesem Grund ist der Umbau oder die Umstellung der Methode von einem zum anderen Wirkstoff ohne nennenswerten Zeitverlust ein maßgeblicher Faktor. Als Technik, die diese Anforderungen optimal erfüllt, hat sich in den letzten Jahren die LC-MS/MS-Technik etabliert. Sie ist den bislang überwiegender Methoden, wie GC-MS-Techniken oder HPLC-UV-Detektion bzw. Fluoreszenztechniken in Bezug auf die oben genannten Parameter deutlich überlegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für sechs verschiedene Wirkstoffe LC-MS/MS-Methoden entwickelt oder via unabhängiger Laborvalidierung auf die lokalen Gegebenheiten transferiert und zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter zur Anwendung gebracht.

Ziel der Methodenentwicklung war es die hohe Selektivität und Empfindlichkeit des Detektors zu nutzen, um bei geringen Probenvolumina eine Bestimmungsgrenze zu erreichen, die es ermöglichte ausreichend viele Meßwerte zu bestimmen, um die pharmakokinetischen Parameter der Wirkstoffe zu berechnen. Zusätzlich wurde eine Maximierung des Probendurchsatzes und eine Minimierung des personellen und materiellen Aufwandes angestrebt ohne dabei einen Qualitätsverlust der Methode zu erleiden. Eine gelungene Methodenentwicklung bedurfte daher der Optimierung der Probenaufarbeitung, die sich neben den chemisch-physikalischen Eigenschaften des Wirkstoffes hauptsächlich an der Menge der zur Verfügung stehenden Probe orientierte. Das chromatographische System hingegen hing weitestgehend von den chemischen Eigenschaften des Analyten und von den massenspektroskopischen Bedingungen ab, die verdampfbare Puffer im Fließmittel erforderten. Diese drei zu optimierenden Teilbereiche, die miteinander interagieren, wurden jeweils sorgsam aufeinander abgestimmt, um eine Methode zu entwickeln, die die zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen in der jeweiligen Matrix sicher und robust bis hin zum Quantifizierungslimit bestimmen konnte.

Cisaprid konnte nach umfangreicher Validierung der entwickelten Methode mit einem halbautomatischen Robotersystem und Fluoxetin als internen Standard aus Humanplasma bestimmt werden. Dabei wurden 100 µl Plasma präzipitiert und der Überstand wurde mit Puffer nachverdünnt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Säule mit C₁₈-Umkehrphasenmaterial mit einer Gesamtlauzeit von 3.4 Minuten und einer Flußrate von 0.4 ml/min. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels Elektrospray-Quelle bei einem Massenübergang von m/z 468 → 186. Mit dieser Methode konnten Cisapridkonzentrationen von 0.500 – 200 ng/ml im Plasma bestimmt werden. Die maximale Anzahl an Proben pro Person und Tag wurde mit 384 ermittelt. In der sich anschließenden Studie konnte ein Tagesdurchsatz von durchschnittlich 300 Proben realisiert werden. Damit war die entwickelte und zum Einsatz gebrachte Technik sowohl in Bezug auf die Bestimmungsgrenze (Faktor 10) als auch auf die Laufzeit gegenüber bekannten Methoden überlegen. Während der Studie wurde eine Tablette, die 20.8 mg Cisaprid-Monohydrat enthielt, an 24 Probanden getestet. Die gefundenen Plasmakonzentrationen zeigten teilweise hohe interindividuelle Schwankungen. So wurde für einen einzelnen Probanden eine t_{max}-Verschiebung von 1.18 auf 2.13 Stunden gefunden. Die weiteren pharmakokinetischen Parameter von t_{1/2} = 9.95 Stunden, C_{max} = 57.49 ng/ml und AUC_{0->∞} = 485 ng•h/ml deckten sich weitestgehend mit den bereits publizierten Daten. Die ermittelte Restfläche zwischen AUC_{0->last} und AUC_{0->∞} war mit 6.4 % gering, so daß das verwendete Quantifizierungslimit als ausreichend angesehen werden konnte.

Im Falle des SC-72393 fehlte dem Molekül eine geeignete funktionelle Gruppe oder ein geeignetes Heteroatom, um es zu ionisieren. Daher wurde ein Stickstoffatom zur Optimierung der Ionisierung durch Umsetzung zum Oxim eingeführt. Die lipophilen Oximderivate wurden mit einer Normalphasen-Säule, die aus Polyvinylalkohol als stationäre Phase gebunden an Kieselgel als Basismaterial bestand, innerhalb von 6.5 Minuten chromatographiert. Das hierzu verwendete organische Fließmittel enthielt einen geringen Zusatz an organischer Säure, um eine optimale Ionisierung in der APCI-Quelle zu gewährleisten. Als interner Standard wurde das Steroid E-02916 eingesetzt. Die Aufarbeitung aus 1000 µl Humanplasma erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Matrix auf einer SPE-Säule weitestgehend abgetrennt, um anschließend die Umsetzung zum Oxim-Derivat durchzuführen. Somit konnte ein dynamischer Bereich von 50 – 2000 pg/ml abgedeckt werden. Durch Verdünnung der Probe konnte dieser bis zu

400 ng/ml nach oben erweitert werden. In einer unabhängigen Laborvalidierung konnte die ursprüngliche Methode bestätigt werden und die originale Bestimmungsgrenze um einen Faktor 6 gesenkt werden. In den folgenden Messungen der Studienproben zeigte sich die Methode als äußerst robust und zeigte mit maximalen Abweichungen von 3 % vom theoretischen Wert bei einer relativen Standardabweichung von $\leq 10\%$ eine hohe Genauigkeit.

Für das Neuroleptika Haloperidol wurde eine Methode entwickelt, die den Wirkstoff in Plasma über einen Konzentrationbereich von 45 pg/ml – 10 000 pg/ml aus einem Probenvolumen von 500 μ l bestimmen konnte. Dazu wurde der Wirkstoff aus dem Plasma durch Festphasenextraktion in 96er Mikrotiterplatten abgetrennt und zusätzlich konzentriert. Optimale chromatographische Bedingungen konnten mit C₁₈-Umkehrphasenmaterialien erhalten werden. Das Fließmittel, bestehend aus einem Acetonitril-Puffer-Gemisch, war zusätzlich auf die Erzeugung der Ionen in der Elektrospray-Quelle abgestimmt. Bei einer Flußrate von 0.8 ml/min konnte mit Loratadin als internen Standard die Laufzeit auf 2.5 Minuten bestimmt werden. Die hohe Präzision mit maximalen Abweichungen von den theoretischen Werten der Qualitätskontrollproben ($\leq 13\%$) und Kalibriergeraden ($\leq 9\%$) zeigte die erfolgreiche Etablierung der Methode. Bei der Studie wurden Haloperidol-Decanoat in Dosen von 25 bzw. 50 mg Haloperidol intramuskulär injiziert.

Die pharmakokinetischen Daten zeigten im Mittel die zu erwartende Verdoppelung der Maximalkonzentration und der Fläche unter der Kurve zwischen den Dosierungen. Die Plasmakonzentrationen nach vier Wochen, die von besonderem Interesse waren (Injektionsintervall), zeigten mit 0.197 ng/ml (25 mg Haloperidol) und 0.438 ng/ml (50 mg Haloperidol) ebenfalls einen Faktor von ca. zwei.

Für Linezolid, einem Oxazolidinon, wurden einfache und effiziente Methoden zur Bestimmung aus Humanplasma und Urin entwickelt. Sowohl die chromatographischen, als auch die massenspektrometrischen Bedingungen konnten dabei für beide Matrices verwendet werden. Als interner Standard diente der Isotopenstandard D₃-Linezolid. Nach einfachem Verdünnen des Urins bzw. Proteinpräzipitation des Plasmas und Nachverdünnen des Überstandes konnte Linezolid mit einer Umkehrphase mit C₈-Material chromatographiert werden. Bei einer Flußrate von 1.0 ml/min wurde ein Nachsäulensplit eingesetzt und 0.4 ml/min in die Elektrospray-Quelle geleitet. Somit konnten dynamische Konzen-

trationsbereiche für Linezolid von 25 ng/ml – 25.0 µg/ml in Plasma und 10 ng - 10 µg/ml in Urin bestimmt werden. In der Studie wurde eine 600 mg Linezolid enthaltende Filmtablette oral verabreicht und Urinkonzentrationen bis 120 Stunden, sowie Plasmakonzentrationen bis 24 Stunden nach der Applikation untersucht. Die gefundenen pharmakokinetischen Werte in Plasma ($C_{\max} = 13.5 \mu\text{g/ml}$, $t_{1/2} = 5.85 \text{ h}$ und $\text{AUC}_{0-\infty} = 120 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ bei einer Restfläche von 5.4 %) stimmten mit den in der Literatur gefundenen Daten überein. Bei einer zweimal täglichen Gabe von Linezolid wurde der 12 Stundenwert zu $3.38 \mu\text{g/ml} \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$ bestimmt und liegt damit im Bereich von 4 µg/ml, welcher den höchsten MHK₉₀-Wert für die wichtigsten Bakterien des Wirkungsspektrums darstellt. Im Urin liegen die erhaltenen Linezolidkonzentrationen bis zu 36 Stunden nach der Applikation über den MHK₉₀-Werten für Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken. Daneben wurde die Clearance zu $83 \pm 23 \text{ ml/min}$ (renale = $34 \pm 8 \text{ ml/min}$; nicht-renale Clearance = $48 \pm 20 \text{ ml/min}$) bestimmt. Alle drei Werte lagen nur knapp im Bereich der publizierten Werte.

Der Folsäureantagonist Methotrexat sollte in Kaninchenplasma nachgewiesen werden. Bei der Methodenentwicklung mußte zum einem dem Umstand Rechnung getragen werden, daß als Probenvolumen maximal 75 µl zur Verfügung standen. Zum anderen waren durch das Studiendesign Plasmakonzentrationen über einen großen dynamischen Bereich zu erwarten. Das letztere Problem wurde durch die Teilung des gesamten dynamischen Bereichs in zwei sich überschneidende Bereiche gelöst. Qualitätskontrollproben, die mit Kalibriergeraden der beiden dynamischen Bereiche ausgewertet wurden, zeigten Differenzen von $\leq 2.8 \%$. Daraus ergab sich die Berechtigung, die Proben wahlweise über einen der beiden dynamischen Konzentrationsbereiche auszuwerten, ohne Auswirkung auf das Ergebnis der Studienproben. Als Aufarbeitung wurde eine Präzipitation mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion gewählt. Die so erhaltenen Extrakte wurden auf einer Säule mit C₁₈-Material bei einer Flußrate von 0.2 ml/min innerhalb von 2 Minuten chromatographiert. Der gesamte Fluß wurde in die Turbo-Elektrospray-Quelle geleitet und Methotrexat sowie der interne Standard Pipemidsäure wurden ionisiert.

Während der Studie wurde Kaninchen mit natürlicher und künstlicher Harnableitung sowohl Methotrexat direkt in die Blase eingeleitet als auch i.v. appliziert. Die Ergebnisse sollten Aufschluß darüber geben, ob ein künstlicher Harnableitungsweg in Verbindung mit einer Rückresorption von Methotrexat über das Ileumconduit gebracht werden kann und damit zu erhöhten Plasmakonzentrationen. Die gefundenen Plasmakonzentrationen ergaben

keine Unterschiede zwischen den nicht-operierten und zystektomierten Kaninchen und damit keine Anhaltspunkte für eine Rückresorption von Methotrexat über das Ileumconduit.

Ketoprofen, ein nicht-steroides Antiphlogistika (NSAR), hat bei seiner Anwendung teilweise gastrointestinale Nebenwirkungen. Mit dem Ziel diese zu vermeiden und eine ausreichend hohe Ketoprofenkonzentration an einer lokalen Körperstelle zu erreichen, wurden von einem Arzneimittelhersteller zwei Formulierungen (Gel; äquivalent 25 mg und 50 mg Ketoprofen) mit einer intramuskulären Injektion (50 mg Ketoprofen) verglichen. Dabei wurde neben Plasma Mikrodialysat an der entsprechenden Körperstelle entnommen. Für beide Matrices wurde eine Methode entwickelt und umfangreich validiert. Das Plasma (200 µl) wurde mit einer Festphasenextraktion mit C₈-Umkehrphasenmaterial aufgearbeitet. Vom Mikrodialysat standen maximal 20 µl zur Verfügung, daher wurde eine einfache Verdünnung mit einer Lösung, die [¹³C²H]-Ketoprofen als internen Standard enthielt, durchgeführt. Aufgrund fehlender Leermatrix wurde 0.9 %ige Natriumchloridlösung als Vergleichsmatrix für die Dialysatproben verwendet. Durch die unterschiedlichen Extrakte nach der Aufarbeitung ergaben sich unterschiedliche chromatographische Bedingungen. So wurde für die Plasmaextrakte eine Normalphasencharakter-Säule mit einer Aminofunktion verwendet und für die Dialysatextrakte eine Umkehrphase mit C₈-Material eingesetzt. Die Fließmittel setzten sich im Falle der Plasmaextrakte aus einem Ammoniumacetatpuffer-Acetonitril-Methanol-Gemisch und für die Dialysatextrakte aus einem Acetonitril-Wasser-Säure-Gemisch zusammen. Die Flußrate lag jeweils bei 1.0 ml/min und die Laufzeit lag bei 2.8 Minuten (Plasma) bzw. 3.3 Minuten (Dialysat). Für beide Matrices wurde die Ionisierung im negativ-Modus mit der APCI-Quelle durchgeführt. Mit dieser Methode konnten die Konzentrationen von Ketoprofen in Plasma von 0.500 – 500 ng/ml und in Mikrodialysat von 0.590 – 187 ng/ml bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Studie ergaben maximale Plasmakonzentrationen für die lokalen Applikationen von 5.62 ng/ml (25 mg Ketoprofen) bzw. 10.6 ng/ml (50 mg Ketoprofen), sowie AUC_{0-∞}-Werte von 168 ± 139 ng•h/ml (25 mg Ketoprofen) und 303 ± 207 ng•h/ml (50 mg Ketoprofen). Hierbei zeigte sich die Verdoppelung der Dosis deutlich, jedoch zeigen hohe Standardabweichungen von über 68 % und Restflächen von ~ 20 %, daß diese Werte durch weitere Studien untermauert werden müssen. Die Halbwertszeiten lagen mit ca. 14 Stunden bei der topischen Applikation deutlich über den gefundenen der intramuskulären mit 2.7

Stunden. Hingegen lagen die Werte für die $AUC_{0-\infty}$ mit 7136 ng•h/ml um einen Faktor ~ 25 über der topischen Applikation. Die C_{max} -Werte lagen mit 2886 ng/ml sogar um einen Faktor ~ 250 darüber.

Bei der Bestimmung der Dialysatproben fanden sich nur nach der intramuskulären Injektion nennenswerte Ketoprofenkonzentrationen. Nach topischer Applikation konnten keine Ketoprofenkonzentrationen im Dialysat bestimmt werden, die die Berechnung pharmakokinetischer Daten zuließen. Neben unerklärlichen hohen Konzentrationen, die auf Kontaminationen zurückgeführt wurden, konnte daraus geschlossen werden, daß keine therapeutisch wirksamen Ketoprofenkonzentrationen an der lokalen Körperstelle auftraten. Das angestrebte Ziel der Studie wurde somit verfehlt.

11 Summary

In order to quantify low drug concentrations in biological, specifically human matrices as blood, urine or microdialysate it is indispensable to use a technique, that is able to evaluate the drug with a maximum of selectivity, specificity and precision. In addition the used method needs to be fast and robust to meet today's economical requirements. For this reason the used equipment has to be exchangeable within the used methods without any time interruptions worth mentioning. The LC-MS/MS-technique, which has been established as routine technique over the last decade fulfills these requirements. It is superior with regards to selectivity, specificity and precision over methods such as GC-MS or HPLC with UV- or fluorescence-detection.

In this thesis method development, validation or independent laboratory validation was done with LC-MS/MS on six different drugs to determine their concentrations and to calculate pharmacokinetic parameters.

The objective of the method development was to use the high selectivity and sensitivity of the detector to reach a low quantification limit with the limited specimen volumes given. Besides that a maximum throughput of specimens with a minimum of personal expense was aspired without decreasing the quality of the produced data by taking into account the pharmacokinetic parameters to be determined. Therefore an optimum of the work-up procedure as well as the chromatographic and the mass spectrometric conditions has to be developed for the individual drugs with their physicochemical properties. Limitations were frequently given by the availability of the specimen volume. Those three parts, which interact with each other were carefully coordinated to develop a method that quantifies the specific drug concentrations in the individual matrix with good sensitivity and robustness down to the limit of quantification.

A method for cisapride was developed and extensively validated. A semi-automated roboter was used for the determination of cisapride in human plasma with fluoxetine as internal standard. 100 μ L plasma were precipitated with organic solvent and the supernatant was diluted with buffer. HPLC was performed on a column with C₁₈-material reversed phase material. The chromatographic run lasted 3.4 minutes with a flow rate of 0.4 ml/min. Mass detection was done with the electrospray-interface in positive mode on the mass transition of m/e 468 \rightarrow 186. The dynamic range of the cisapride concentration of this method was

0.500 – 200 ng/mL in plasma. A theoretical throughput of 384 specimens was possible per day and person. In reality around 300 specimens were done each day during the study. The developed assay was superior over the published assays as to the quantification limit by a factor of 10 and the run time.

During the study a tablet containing 20.8 mg cisapride-monohydrate was given to 24 subjects. The found plasma concentrations showed high interindividual fluctuation. One subject was responsible for the shift of t_{\max} to 2.13 hours. Without it the t_{\max} was determined to 1.18 hours. The further pharmacokinetic parameters of $t_{1/2} = 9.95$ hours, $C_{\max} = 57.49$ ng/mL and $AUC_{0-\infty} = 485$ ng•h/mL are in correspondence to the published datas. The calculated residual area with 6.4 % showed the sufficiency of the quantification limit for cisapride in plasma at the used study design.

In case of SC-72393 the molecule had no functional group or hetero atom to be ionized with one of the interfaces. Therefore it was derivatized giving its oxime which is characterized by a nitrogen atom which could be ionized. The lipophile oxime-derivative was eluted on a normal phase column, that used polyvinyl alcohol as stationary phase bonded on silica gel resulting in a total run time of 6.5 minutes. To the organic solvent a small amount of organic acid was added for maximum ionisation in the APCI-interface. As internal standard E-02916 was used. SC-72393 was extracted from the matrix out of 1000 μ L human plasma using solid phase extraction and the eluate was derivatized giving its oxime. With this work up procedure concentrations between 50 - 2000 pg/mL could be detected. By diluting the original sample this calibration range was raised up to 400 ng/mL. With an independent laboratory validation the original limit of quantitation was lowered by factor six. The method was still robust and precise with quality control samples showing maximum deviations from theoretical values of less than 3 % with relative standard deviation of ≤ 10 %.

For haloperidol, a butyrophenone-type antipsychotic agent, a method was developed to measure its plasma concentration in human plasma between 45 pg/mL – 10 000 pg/mL. The analyte was extracted and concentrated from 500 μ L human plasma with solid phase extraction using 96-micro well-plates. Best chromatographic conditions were achieved by using C_{18} -reversed phase material. A mobile phase consisting of an acetonitrile-buffer-solution was found to produce best ionisation with the electrospray-interface. The flow rate

of 0.8 ml/min was splitted after the column and 0.15 ml/min were introduced into the interface. With loratadin serving as internal standard the total run time came up to 2.5 minutes. The good precision with maximum deviations from the theoretical value of the quality control samples ($\leq 13\%$) and calibration standards ($\leq 9\%$) demonstrated the successful establishing of the method.

In the study two formulations of haloperidol-decanoate (25 and 50 mg) were injected intramuscular, respectively. The found pharmacokinetic parameters of C_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ had a factor of two between the formulations. Due to the application interval the plasma concentration after four weeks is of special interest. The 25 mg Haloperidol dose resulted in a concentration of 0.197 ng/mL Haloperidol and the 50 mg dose resulted in 0.438 ng/mL. Again a factor of about two was found.

For linezolid an oxazolidinone antibacterial agent, an easy and efficient method for the quantification from human plasma and urine was developed. The chromatographic as well as the mass specific conditions could be used for both matrices. As internal standard an isotopic isomer was used. Urine was simply diluted with buffer and plasma was precipitated using organic solvent. The supernatant was diluted with buffer. In both cases the resulting solutions were eluted using C_8 -reversed phase material. The flow rate was 1.0 ml/min from which 0.4 ml/min were introduced into the electrospray-interface with a post column split. For plasma the calibration range of linezolid was 25 ng/mL – 25.0 μ g/mL and for urine 10 ng - 10 μ g/mL.

In the study a film coated tablet consisting of 600 mg linezolid was given and the urine concentrations were quantified up to 120 hours, plasma concentrations up to 24 hours. The determined pharmacokinetic plasma data ($C_{\max} = 13.5 \mu\text{g/mL}$, $t_{1/2} = 5.85 \text{ h}$ and $AUC_{0-\infty} = 120 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ with a residual area of 5.4 %) corresponded to the published data.

Applying linezolid twice per day the 12 hours trough value is of special interest. It was determined to be $3.38 \mu\text{g/mL} \pm 1.41 \mu\text{g/mL}$ which is close to the highest MIC_{90} (4 ng/mL) for the most important bacteria. In urine the value was above the MIC_{90} for staphylococci, enterococci and streptococci for up to 36 hours. The total clearance was determined to be $83 \pm 23 \text{ ml/min}$ (renal = $34 \pm 8 \text{ ml/min}$; non-renal = $48 \pm 20 \text{ ml/min}$). All three values were at the lower end of the published clearance data. The determined values showed sufficient linezolid concentrations until 12 hours in the studied matrices after application of 600 mg linezolid lying around or above the MIC_{90} for staphylococci, enterococci and streptococci.

For this reason Linezolid can be used for the treatment of urinary tract infections at the dosage of 600 mg given twice per day.

Methotrexate which is a folic acid antagonist had to be quantified in rabbit plasma. During method development two tasks had to be solved. On one hand the maximum specimen volume was 75 μL , on the other hand the study design required a large dynamic range. The second task was solved by splitting the entire dynamic range into two overlapping ranges. Quality controls calculated with both ranges showed differences of $\leq 2.8\%$. These results proved authority of calculating the specimens with the needed calibration range without affecting the study results. The work-up procedure included liquid-liquid-extraction after precipitation using an organic solvent. The obtained extracts were eluted within 2 minutes at a flow rate of 0.2 ml/min on a column containing C_{18} -reversed phase material. The complete eluent was introduced into the turbo-electrospray-interface to ionize the analyte and the internal standard pipimedic acid.

During the study rabbits with natural and urinary diversion were given methotrexate directly into the urinary bladder or intravenous, respectively. Results were supposed to answer whether a urinary diversion is responsible for a re-absorption of methotrexate and for increased methotrexate concentrations over patients with natural urination tracts. The determined methotrexate concentrations showed no differences between the rabbits with an ileal conduit after an operation and rabbits with a natural urination tract. The study gave no evidence that an ileal conduit is responsible for a re-absorption of methotrexate.

The nonsteroidal anti-inflammatory agent (NSAID) ketoprofen can cause gastric effects at its normal application rate. With the goal to minimize those side effects and to reach sufficient ketoprofen concentration at a local body site, two formulations (gel, equivalent to 25 mg and 50 mg ketoprofen) were compared with an intramuscular injection (equivalent to 50 mg ketoprofen). Beside human plasma, human microdialysis fluid was taken at the local body site. For both matrices an extensive validation was performed. Plasma (200 μL) was worked up using solid phase extraction with C_8 -reversed phase material. Microdialysis fluid was simply diluted with buffer containing [$^{13}\text{C}^2\text{H}$]-ketoprofen as internal standard, because maximum volumes of only 20 μL could be used. Because of missing blank microdialysis fluid 0.9 % saline solution was used as standard matrix for quality controls and calibration standards. The different work up procedures resulted in extracts which had

to be eluted on different columns. In case of plasma a normal phase column with an amino-functional-group was used. The microdialysis fluid extracts were eluted on C₁₈-reversed phase material. The mobile phase consisted of an acetonitril-methanol-ammonium acetate buffer-solution for the plasma extracts and an acetonitril-acidic water-solution for the microdialysate extracts. In both cases the flow rate was 1.0 ml/min with a total run time of 2.8 minutes (plasma) and 3.3 minutes (microdialysate), respectively. Ionisation was achieved using the APCI-interface in negative mode. With this method concentrations of 0.500 - 500 ng/mL for plasma and 0.590 – 187 ng/mL for microdialysate could be determined.

Maximum plasma concentrations of the subjects after topical application were found to be 5.62 ng/mL (25 mg dose) and 10.6 ng/mL (50 mg dose). For AUC_{0->∞} values of 168 ± 139 ng•h/mL (25 mg dose) and 303 ± 207 ng•h/mL (50 mg dose) were found. The results showed a factor two between the two dosages. High standard deviations of more than 68 % and residual areas above 20 % made these data insecure and had to be secured by further studies. For the topical application the terminal half time value was ca. 14 hours and therefore clearly above the found terminal half time value of the intramuscular injection (2.7 hours). On the other hand the values of AUC_{0->∞} with 7136 ng•h/mL were by a factor of ~ 25 above the topical application. The factor for C_{max} (~ 250) was even greater.

Microdialysate concentrations worth mentioning could only be found after intramuscular injection. After topical application the found concentrations for microdialysis fluid were insufficient for pharmacokinetic calculations. Beside inexplicable high concentrations, which could be traced back to contaminations, no therapeutical concentrations of ketoprofen were found in the microdialysate. Consequently the goal of the study was missed.

12 Literaturverzeichnis

- [1] M. Tswett, *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **1906**, 24, 384-393.
- [2] R. Kuhn, A. Wintestein, E. Lederer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1931**, 197, 141-145.
- [3] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.*, **1941**, 35, 1358-1364.
- [4] A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **1951**, 48, vii.
- [5] U.D. Neue, *HPLC Columns Theorie, Technology and Practise*, Wiley-VCH, Inc., New York, **1997**.
- [6] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd edn., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1979**.
- [7] W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, 2nd edn., Marcel Dekker, Inc., New York, **1999**.
- [8] T.R. Covey, *The Realities and Misconceptions of Electrospray Ionization and HPLC Flow-rates*, Perkin-Elmer Sciex Ionspray Application Note, Thornhill Ontario, **1993**.
- [9] J.T. Watson, *Introduction to mass spectrometry*, 3rd Ed., *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia, **1997**, 128-132.
- [10] W.A.M. Niessen, U.R. Tjaden, J.van der Greef, *J. Chromatogr.*, **1991**, 554, 3-26.
- [11] M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, *Org. Mass spectrom.*, **1973**, 7, 1111-1119.
- [12] A.P. Bruins, B.F.H. Drenth, *J. Chromatogr.*, **1983**, 271, 71-82.
- [13] W.H. McFadden, H.L. Schwartz, S. Evans, *J. Chromatogr.*, **1976**, 122, 389-396.
- [14] C.S. Creaser, J.W. Stygal, *Analysis*, **1993**, 118, 1467-1480.
- [15] T.A. Beller, T.D. Behymer, W.L. Budde, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1990**, 1, 92-98.
- [16] C.R. Blakley, M.L. Vestal, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 750-754.
- [17] M.L. Vestal, *Mass Spectrom. Rev.*, **1983**, 2, 447-480.
- [18] P.J. Aprino, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **1982**, 251, 153-164.
- [19] F.W. McLafferty, D.B. Stauffer, *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, Wiley, London, **1989**.

-
- [20] A. G. Harrison, *Chemical Ionisation Mass Spectrometry*, 2nd Ed., *CRC Press*, Boca Raton, **1992**.
- [21] C.J. Proctor, J.F.J. Todd, *Org. Mass Spectrom.*, **1983**, *18*, 509-516.
- [22] D.I. Carroll, I. Dzidic, E.C. Horning, R.N. Stillwell, *Appl. Spectros. Rev.*, **1981**, *17*, 337-352.
- [23] H. Kambara, *Anal. Chem.*, **1982**, *54*, 143-146.
- [24] A.P. Bruins, *Mass Spectrom. Rev.*, **1991**, *10*, 53-78.
- [25] A.P. Bruins, *Trends Anal. Chem.*, **1994**, *13*, 37-43.
- [26] E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, *Anal. Chem.*, **1973**, *45*, 936-943.
- [27] A.A. Blinzynuk, H.F. Schaefer, I.J. Amster, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5149-5154.
- [28] J.C. Traeger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, *10*, 119-122.
- [29] G. Bojesen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 5557-5558.
- [30] D.F. Hunt, C.N. McEwen, T.M. Harvey, *Anal. Chem.*, **1975**, *47*, 1730-1734.
- [31] P. Rudewicz, B. Munson, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2903-2907.
- [32] T.R. Covey, E.D. Lee, J.D. Henion, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2453-2460.
- [33] J. Zelney, *Phys. Rev.*, **1917**, *10*, I.
- [34] A.J. Kelly, *J. Appl. Phys.*, **1978**, *49*, 2621-2628.
- [35] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 804-817.
- [36] M. Dole, R.L. Hines, L.L. Mack, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.*, **1969**, *49*, 2240-2249.
- [37] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 675-679.
- [38] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, 2642-2646.
- [39] U. Luetgens, F.W. Roellgen, Electrohydrodynamics disintegration of liquids and ion formation in ESI, Proceedings of the 39th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied topics, Nashville, Tenn., **1991**, 439-440.
- [40] R.B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, **1997**, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 3-63.
- [41] G.J. van Berkel, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 773-783.

-
- [42] M.H. Amad, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke, *J.Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 784-789.
- [43] M. Gamero-Castaño, J.F. de la Mora, *J.Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 790-803.
- [44] J.F. de la Mora, G.J. van Berkel, C.G. Enke, R.B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J.B. Fenn, *J.Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 939-952.
- [45] C. Fenselau, P.A. Demirev, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, 20, 157-171.
- [46] J. Godovac-Zimmermann, L.R. Brown, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, 20, 1-57.
- [47] R.E. Majors, *LC·GC Int., Current Trends and Developments in Sample Preparation*, **September 1998**, 8-16.
- [48] D.A. Wells, *LC·GC Europe*, **1999**, 12, 704-715.
- [49] M. Jemal, *Drug Disc. Devel.*, **July 1999**, 20-22.
- [50] H. Zeng, J.T. Wu, S.E. Unger, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 27, 967-982.
- [51] <http://www.tomtec.com/pages/Q320SPE.html>.
- [52] <http://www.biolab.dk/instruments/aspecxl.html>.
- [53] M. Kollroser, C. Schober, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16, 1266-1272.
- [54] Y. Deng, J.T. Wu, T.L. Lloyd, C.L. Chi, T.V. Olah, S.E. Unger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16, 1116-23.
- [55] Y. Hsieh, M.S. Bryant, J.M. Brisson, K. ng, W.A. Korfmacher, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **2002**, 767, 353-62.
- [56] J.L. Herman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16, 421-426.
- [57] D. Zimmer, V. Pickard, W. Czembor, C. Muller, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 854, 23-35.
- [58] G. Hopfgartner, C. Husser, M. Zell, *Ther. Drug Monit.*, **2002**, 24, 134-143.
- [59] W. Cawello, *Parameter zur modellunabhängigen Pharmakokinetik*, Shaker Verlag Aachen, **1998**.
- [60] A. Dunne, P. King, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1989**, 17, 131-137.
- [61] K. Yamakoaka, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1978**, 6, 547-558.
- [62] L. Sachs, *Angewandte Statistik*, 8. Auflage, Springer Verlag Berlin, **1998**.
- [63] A. Resciglio, G. Sergé, *Drug and Tracer Kinetics*, Blaisdell, Waltham, MA, **1966**.
- [64] S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [65] S.T. Karnes, G. Shiu, V.P. Shah, *Pharm. Res.*, **1991**, 8, 421-426.

-
- [66] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2. Aufl., J. Wiley & Sons, New York, **1988**.
- [67] V.P. Shah, K.K. Midha, S.V. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **1991**, *16*, 249-255.
- [68] S. Cisternino, J. Schlatter, J.L. Saulnier, *J. Chromatogr. B*, **1998**, *714*, 395-398.
- [69] R.W. McCallum, C. Prakash, D.M. Campoli-Richards, K. Goa, *Drugs*, **1988**, *36*, 652-681.
- [70] M.T. Maya, C.R. Domingos, M.T. Guerreiro, A.P. Filipe, J.A. Morais, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **1998**, *23*, 377-381.
- [71] T. Hedner, J. Hedner, A. Gelin-Friberg, M.L. Huang, S. Van de Poel, R. Woestenborghs, A. Van Peer, J. Heykants, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 629-631.
- [72] W. Meuldermans, A. Van Peer, J. Hendrickx, W. Lauwers, E. Swysen, M. Bockx, R. Woestenborghs, J. Heykants, *Drug Metab. Dispos.*, **1988**, *16*, 403-409.
- [73] U. Gladziwa, R. Bares, U. Klotz, K.V. Dakshinamurty, T.H. Ittel, K.U. Seiler, H.G. Sieberth, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1991**, *50*, 673-681.
- [74] R. Corinaldesi, V. Stanghellini, C. Tosetti, E. Rea, C. Corbelli, M. Marengo, N. Monetti, L. Barbara, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1993**, *44*, 429-432.
- [75] S. Mohammad, Z. Zhou, Q. Gong, *Am. J. Physiol.*, **1997**, *273*, 2534-2538.
- [76] R. Woestenborghs, W. Lorreyne, F. Van Rompaey, J. Heykants, *J. Chromatogr.*, **1988**, *424*, 195-200.
- [77] A.E. Niggebruegge, D.J. Lachance, C. Grandmaison, D. Levesque, S. Gagon, F. Deschamps, R. Hambalek, L. Di Donato, R. Masse, Poster Presentation, Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, USA, **1999**.
- [78] J. Henion, Short Course *Practical LC/MS*, 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, Kalifornien, USA, **2000**.
- [79] Y. Prechagoon, B.G. Charles, *J. Chromatogr. B*, **1995**, *670*, 139-143.
- [80] A.S. Gross, Y.D. Goh, R.S. Addison, G.M. Shenfield, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1999**, *65*, 395-401.
- [81] K.T. Kivistö, J.J. Jari, J.T. Lilja, P.J. Neuvonen, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1999**, *66*, 448-453.

-
- [82] Committe for Proprietary Medical Products, Note for Guidance: Investigation on bioavailability and bioequivalence, **1991**.
- [83] H.M. Lee, S.J. Choi, C.K. Jeong, Y.S. Kim, K.C. Lee, H.S. Lee, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 727, 213-217.
- [84] The Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Mass Spectrometric Assay with MS/MS Detection for SC-72393 in Human Plasma for SEARLE at GTF - Gesellschaft für Therapeutische Forschung". Document Number M2097229, October 10, 1997
- [85] R.I. Shader, Approaches to treatment of schizophrenia. In: R.I. Shader, Ed., Manuel of psychiatric therapeutics. 2nd ed., Boston (MA), Little, Brown and Co, 1994, 311-336.
- [86] K.K. Midha, B.S. Chakraborty, D.A. Ganes, E.M. Hawes, J.W. Hubbard, D.L. Keegan, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **1989**, 9, 98-104.
- [87] T. van Putten, S.R. Marder, J. Mintz, R.E. Poland, *Am. J. Psychiatry*, **1992**, 149, 500-505.
- [88] F.J. Rowell, S.M. Hui, A.F. Fairbairn, D. Eccleston, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1981**, 11, 377-382.
- [89] P.L. Morselli, G. Bianchetti, M. Dugas, Morselli PL, *Pediatr. Pharmacol.*, **1983**, 3, 149-156.
- [90] A. Forsman, *Curr. Ther. Res.*, **1977**, 21, 606-617.
- [91] M.W. Tsang, R.I. Shader, D.J. Greenblatt, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **1994**, 14, 159-162.
- [92] R. Deberdt, P Elens, W Berghmans, J Heykants, R Woestenborghs, F Driesens, A Reyntjens, van I Wijngaarden, *Acta Psychiatr. Scand.*, **1980**, 62, 356-363.
- [93] AHFS Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, Maryland, USA, 2001.
- [94] R.K. Nayak, D.R. Doose, N.P. Nair, *J. Clin. Pharmacol.*, **1987**, 27, 144-150.
- [95] A. Forsman, R. Öhman, *Curr. Ther. Res.*, **1976**, 20, 319-336.
- [96] F.O. Holley, J.R. Magliozzi, D.R. Stanski, L. Lombrozo, L.E. Hollister, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1983**, 33, 477-484.
- [97] J. Dreyfuss, J.M. Shaw, R.R. Ross, *J. Pharm. Sci.*, **1976**, 65, 1310-1315.

-
- [98] J. Hempenius, R.J. Steenvoorden, F.M. Lagerwerf, J. Wieling, J.H. Jonkman, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *20*, 889-898.
- [99] H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lofti, J.L. Dupuy, B. Pénicaut, G. Lachâtre, *J. Chromatogr. B*, **1997**, *688*, 275-280.
- [100] H. Seno, H. Hattori, A. Ishii, T. Kumazawa, K. Wantanabe-Suzuki, O. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, **2000**, *746*, 3-9.
- [101] A.J. Tomlison, L.M. Benson, K.L. Johnson, S. Naylor, *J. Chromatogr.*, **1993**, *621*, 239-348.
- [102] M.J. Kogan, D. Pierson, K. Verebey, *Ther. Drug Monit.*, **1983**, *5*, 485-489.
- [103] A.K. Dhar, H. Kutt, *Clin. Chem.*, **1984**, *30*, 1228-1230.
- [104] S. Walter, S. Bauer, I. Roots, J. Brockmoller, *J. Chromatogr. B*, **1998**, *720*, 231-237.
- [105] C.L. Boehme, H.W. Strobel, *J. Chromatogr. B*, **1998**, *718*, 259-266.
- [106] E.R. Korpi, B.H. Phelps, H. Granger, W.H. Chang, M. Linnoila, J.L. Meek, R.J. Wyatt, *Clin. Chem.*, **1983**, *29*, 624-628.
- [107] R.L. Miller, C.L. DeVane, *J. Chromatogr.*, **1986**, *374*, 405-408.
- [108] M.J. Kogan, D. Pierson, K. Verebey, *Ther. Drug Monit.*, **1983**, *5*, 485-489.
- [109] D.W. Hoffman, R.D. Edkins., *Ther. Drug Monit.*, **1994**, *16*, 504-508.
- [110] J.S. Froemming, Y.W. Lam, M.W. Jann, C.M. Davis., *Clin. Pharmacokinet.*, **1989**, *17*, 396-423.
- [111] M.C. Birmingham, G.S. Zimmer, B. Hafkin, M. Todd, D.H. Batts, N.E. Wilks, S. Flavin, J.J. Schentag, Abstract MN-26. In: Abstracts of the 38th Annual ICAAC, San Diego, California, USA, 1998: American Society for Microbiology, 1998.
- [112] R.C. Moellering Jr., *Ann. Intern. Med.*, **1999**, *130*, 155-157.
- [113] A.H. Lin, R.W. Murray, K.R. Marotti, Abstract C-101. In: Abstracts of the 37th Annual ICAAC, Toronto, Ontario, Canada, 1997: American Society for Microbiology, 1997.
- [114] A.H. Lin, R.W. Murray, T.J. Vidmar, K.R. Marotti, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1997**, *41*, 2127-2131.
- [115] S.M. Swaney, H. Aoki, M.C. Ganoza, D.L. Shinabarger, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1998**, *42*, 3251-3255.

-
- [116] N.E. Wilks, Abstract A-1763. In: Abstracts of the 39th Annual ICAAC, San Francisco, California, USA, 1999: American Society for Microbiology, 1999.
- [117] D.J. Stalker, C.P. Wajszcuk, D.H. Batts, Abstract A-115. In: Abstracts of the 37th Annual ICAAC, Toronto, Ontario, Canada, 1997: American Society for Microbiology, 1997.
- [118] F. Sörgel, M. Kinzig-Schippers, S. Steinhauer, J. Bulitta, Chemie und Pharmakokinetik von Linezolid, In: C. v. Eiff, Ed., Oxazolidinone, Wessobrunn, SM Verlagsgesellschaft mbH, 1999.
- [119] D.J. Diekema, R.N. Jones, *Drugs*, **2000**, *59*, 7-16.
- [120] D.J. Stalker, C.P. Wajszcuk, D.H. Batts, Abstract A-116. In: Abstracts of the 37th Annual ICAAC, Toronto, Ontario, Canada, 1997: American Society for Microbiology, 1997.
- [121] T.L. Sisson, G.L. Jungbluth, D. Stalker, N.K. Hopkins, Abstract A-1194. In: Abstracts of the 39th Annual ICAAC, San Francisco, California, USA, 1999: American Society for Microbiology, 1999.
- [122] K.L. Feenstra, J.G. Slatter, D.J. Stalker, I.R. Welshman, M.J. Hauer, K.S. Catcart, M.T. Verburg, M.G. Johnson, B.E. Bothwell, M.D. Koets, G.M. Newcomb, G.W. Peng, R.P. Stryd, P.E. Fagerness, Abstract A-53. In: Abstracts of the 38th Annual ICAAC, San Diego, California, USA, 1998: American Society for Microbiology, 1998.
- [123] M.A. Wynalda, M.J. Hauer, L.C. Wienkers, *Drug. Metab. Dispos.*, **2000**, *28*, 1014-1017.
- [124] K. Chiba, K.L. Feentra, J.G. Slatter, P.T. Daley-Yates, J.N. Duncan, P.E. Fagerness, M.R. Howard, I.J. Martin, N. Ozawa, B.J. Passingham, H.G. Parks, G.W. Peng, R.J. Simmonds, W. Speed, D. Yallop, S. Yamazaki, Abstract A-123. In: Abstracts of the 38th Annual ICAAC, San Diego, California, USA, 1998: American Society for Microbiology, 1998.
- [125] O.A. Phillips, M.E. Abdel-Hamid, N.A. al-Hassawi, *Analyst*, **2001**, *126*, 609-614.
- [126] G.W. Peng, R.P. Stryd, S. Murata, M. Igarashi, K. Chiba, H. Aoyama, M. Aoyama, T. Zenki, N. Ozawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *20*, 65-73.
- [127] P.C. Appelbaum, *Drugs*, **1996**, *51*, 1-5.
- [128] M.G. Cormican, R.N. Jones, *Drugs*, **1996**, *51*, 6-12.

-
- [129] G. French, *Int. J. Clin. Pract.*, **2001**, *55*, 59-63.
- [130] K.T. Bain, E.T. Wittbrodt, *Ann. Pharmacother.*, **2001**, *35*, 566-75.
- [131] J.C. Hamel, D. Stapert, J.K. Moerman, C.W. Ford, *Infection*, **2000**, *28*, 60-64.
- [132] K. Vance-Brayn, D.R.P. Guay, J.C. Rotschafter, *Clin. Pharmacokinet.*, **1990**, *19*, 434-461.
- [133] D.C. Chatterji, J.F. Gallelli, *J. Pharm. Sci.*, **1978**, *67*, 526-531.
- [134] W.A. Bleyer, *Cancer*, **1978**, *41*, 36-51.
- [135] P. Seidemann, O. Beck, S. Eksborg, M. Wennberg, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1993**, *35*, 409-412.
- [136] J. Hendel, H. Brodthagen, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1984**, *26*, 103-107.
- [137] D.D. Shen, D.L. Azarnoff, *Clin. Pharmacokinet.*, **1978**, *3*, 1-13.
- [138] S. Steinborner, J. Henion, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 2340-2345.
- [139] R. Turci, M.L. Fiorentino, C. Sottani, C. Minoia, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14*, 173-179.
- [140] E. Watson, J.L. Cohen, K.K. Chan, *Cancer Treat. Rep.*, **1978**, *62*, 381-387.
- [141] M.L. Chen, W.L. Chiou, *J. Chromatogr.*, **1981**, *226*, 125-134.
- [142] J.A. Nelson, B.A. Harris, W.J. Decker, D. Farquhar, *Cancer Res.*, **1977**, *37*, 3970-3973.
- [143] D.A. Cairnes, W.E. Evans, *J. Chromatogr.*, **1982**, *231*, 103-110.
- [144] L. Floridia, A.M. Pietropaolo, M. Tavazzani, F.M. Rubino, A. Colombi, *J. Chromatogr. B*, **1999**, *726*, 95-103.
- [145] R. Turci, G. Micoli, C. Minoia, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14*, 685-691.
- [146] S. Emara, H. Askal, T. Masujima, *Biomed. Chromatogr.*, **1998**, *12*, 338-342.
- [147] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, *J. Chromatogr. B*, **1997**, *690*, 267-273.
- [148] H. Aboleneen, J. Simpson, D. Backes, *J. Chromatogr. B*, **1996**, *681*, 317-322.
- [149] T.P. Assadullahi, E. Dagli, J.O. Warner, *J. Chromatogr. A*, **1991**, *565*, 349-56.
- [150] S.D. Fossa, A. Heilo, O. Borner, *J. Urol.*, **1990**, *143*, 498-501.
- [151] S. Krege, Habilitationsschrift, Uni Essen.
- [152] F. Jamali, D.R. Brocks, *Clin. Pharmacokinet.*, **1990**, *19*, 197-217.
- [153] A.J. Hutt, J. Caldwell, *Clin. Pharmacokinet.*, **1984**, *9*, 371-373.

-
- [154] R.J. Royer, F. Lopicque, P. Netter, C. Monot, B. Bannwarth, M.C. Cure, *Biomed. Pharmacother.*, **1986**, *40*, 100-105.
- [155] E.G. de Jalon, M. Josa, M.A. Campanero, S. Santoyo, P. Ygarta, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, *870*, 143-149.
- [156] S.H. Hoke, J.D. Pinkston, R.E. Bailey, S.L. Tanguay, T.H. Eichhold, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4235-4241.
- [157] R.A. Carr, G. Caille, A.H. Ngoc, R.T. Foster, *J. Chromatogr. B*, **1995**, *668*, 175-181.
- [158] R. Farinotti, G. Mahuzier, *J. Pharm. Sci.*, **1979**, *68*, 484-485.
- [159] A. Bannier, J.L. Brazier, B. Ribon, C. Quincy, *J. Pharm. Sci.*, **1980**, *69*, 763-65.
- [160] R. Lovlin, M. Vakily, F. Jamali, *J. Chromatogr. B*, **1996**, *679*, 196-198.
- [161] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, *J. Chromatogr. B*, **1997**, *692*, 375-388.
- [162] J. Boisvert, G. Caille, I.J. McGilveray, S.A. Qureshi, *J. Chromatogr. B*, **1997**, *690*, 189-193.
- [163] H.J. Leis, M. Leis, W. Windischhofer, *J. Mass Spectrom.*, **1996**, *31*, 486-492.
- [164] N. Rifai, M. Lafi, M. Sakamoto, T. Law, *Ther. Drug. Monit.*, **1997**, *19*, 175-178.
- [165] M.E. Abdel-Hamid, L. Novotny, H. Hamza, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2001**, *24*, 587-594.
- [166] T.H. Eichhold, R.E. Bailey, S.L. Tanguay, S.H. Hoke, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 504-511.