

ANHANG

I Stammlösungen der Arzneistoffe, ihrer Metabolite und der internen Standards

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

II Faserlebensläufe

1) PDMS-Fasern

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

* Fasern wurden unter extremen Extraktionsbedingungen getestet

** Fasern sind abgebrochen

Fasern noch in Benutzung

2) PA-Fasern

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

** Fasern sind abgebrochen

Fasern noch in Benutzung

3) CW-DVB-Fasern

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

** Fasern sind abgebrochen

* Beschichtung ganz bzw. teilweise ab

Fasern noch in Benutzung

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

1. Kalibrierung

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

2. Präzision in Serie

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

3. Präzision von Tag zu Tag

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

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

4. Nachweisgrenze

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

5. Bestimmungsgrenze

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

6. Richtigkeit

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

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

Validierungsparameter – Verfahrenskontrolle

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

IV SPME-Kurzvorschriften

1) Clozapin

Herstellung der Kalibrierreihe

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

Referenzlösung R1: **R1 Cloz**; 10 μ g/ml Clozapin

Referenzlösung R2: **R2 Cloz**; 20 μ g/ml Clozapin

Extraktion

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

2) Levomepromazin

Herstellung der Kalibrierreihe

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

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

Referenzlösung R2: **R2 Levo**; 2 μ g/ml Levomepromazin

Referenzlösung R3: **R3 Levo**; 4 μ g/ml Levomepromazin

Extraktion

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

3) Clomipramin und Desmethylclomipramin

Herstellung der Kalibrierreihe

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

Referenzlösung R1: **R1 Clomi/DM-Clomi**; je 2.5 μ g/ml Clomipramin und
DM-Clomipramin

Referenzlösung R2: **R2 Clomi/DM-Clomi**; je 5 μ g/ml Clomipramin und
DM-Clomipramin

Extraktion

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

4) Olanzapin

Herstellung der Kalibrierreihe

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

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

Referenzlösung R2: **R2 Ola**; 1 μ g/ml Olanzapin in 10 % MeOH

A Deproteinierung

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

B Extraktion

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

5) Clomethiazol

Herstellung der Kalibrierreihe

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

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

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

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

Extraktion

- 1) 250 µl Serum + 50 µl I.S. (**I.S. 5-MTA**; 0.1 µl/ml 5-Methylthiazol)
in 5-ml-Rollrandgläschen
- 2) +1700 µl Wasser
- 3) +500 µl Na₂CO₃ (22 g in 100 ml H₂O); Teflon-Magnet-Rührer, Laborfolie
- 4) HS-SPME; 100-µm-PDMS-Faser; bei RT 30 min auf Magnetrührer mit Stufe 0.5
rühren
- 5) Faser 90 s bei 250 °C desorbieren

6) Amitriptylin und Nortriptylin

Herstellung der Kalibrierreihe

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

Referenzlösung R1: **R1 Ami/Nor**; je 2.5 μ g/ml Amitriptylin und Nortriptylin

Referenzlösung R2: **R2 Ami/Nor**; je 5 μ g/ml Amitriptylin und Nortriptylin

Extraktion

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

V Retentionszeiten von möglichen interferierenden Arzneistoffen

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

Trägergas: N₂ (20 ml/min, 150 kPa)

Detektorgase: Luft (100 ml/min), H₂ (3 ml/min), Hilfsgas N₂ (6 ml/min)

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

Injektor: 260 °C, im splitless

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

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

VI Retentionszeiten von möglichen interferierenden Arzneistoffen

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

Trägergas: N₂ (0.7 ml/min, 190 kPa)

Detektorgase: Luft (100 ml/min), H₂ (3 ml/min), Hilfgas N₂ (28 ml/min)

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

Injektor: 300 °C, im splitless

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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