

## **4. GERÄTE UND MATERIALEN**

### **4.1. SPME-FASERN UND HALTER**

Für die Methodenvalidierungen kamen die kommerziell im Handel erhältlichen SPME-Fasern sowie die manuellen Faserhalterungen von der Firma Supelco (Deisenhofen) zum Einsatz (siehe auch Abb. 2). Als Faserbeschichtungen zur Extraktion wurden PDMS in verschiedenen Schichtdicken (100  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ ), PA sowie CW-DVB verwendet. Vor der Erstbenutzung wurden die Fasern nach Herstellerempfehlung konditioniert.

### **4.2. APPARATE**

Zur Extraktion wird eine Apparatur verwendet, die simultan die Bearbeitung von bis zu 24 Proben zulässt (Abb. 2). Zunächst wurden jeweils sechs Proben gleichzeitig extrahiert. Dieser einfache Aufbau erlaubt eine wesentliche Erhöhung des Probendurchsatzes der SPME und damit der Wirtschaftlichkeit der Probenaufarbeitung und wurde in dieser oder einer ähnlichen Form bisher noch nicht beschrieben.

Sechs Fasern wurden jedes Mal parallel für 6 Messungen benutzt. Eine spezielle Ausrüstung wurde für dieses Ziel entwickelt. Diese Ausrüstung besteht aus einem einfachen Plastikbrett mit 24 Bohrungen, das zwischen zwei Stativstäben über dem Schüttler gehalten wird. Maximal 24 Fasern können simultan extrahieren, da der Schüttler 24 Plätze hat und die Bohrungen diesen angepasst sind. Die Durchmesser der Bohrungen wurden durch die Durchmesser der manuellen Faserhalter (Supelco) bestimmt.



Abb. 2 SPME-Apparatur zur simultanen Probenextraktion.

Ein Hewlett-Packard (HP) 5890 *series II* Gaschromatograph mit einem NPD und einem split-splitless Injektor wurde für die Analysen genutzt. Die chromatographischen Bedingungen werden in den einzelnen Kapiteln zur Methodvalidierung detailliert beschrieben (Kap. 6). Die HP-GC-Chemstation-Software wurde für die Berechnung der Retentionszeiten, Peak-Breiten und –Flächen genutzt.

Für die Vergleichsmessung mittels der Kombination GC-MS wurden mit folgenden Geräten unter den angegebenen Bedingungen gearbeitet: Für Amitriptylin wurde ein Hewlett-Packard 5890 *series II* Gaschromatograph mit einem Massenselektiven Detektor (5972 MSD) und einem split-splitless Injektor für die Analysen genutzt. Der Injektor arbeitete während der Desorption im splitless Modus bei 260 °C. Für den Ofen wurde ein Temperaturprogramm genutzt ( $T_1 = 140 \text{ °C}$ ,  $\text{Rate}_1 = 30 \text{ °C/min}$ ,  $T_2 = 230 \text{ °C}$ ,  $\text{Rate}_2 = 4 \text{ °C/min}$ ,  $T_3 = 260 \text{ °C}$ ). Als Trennsäule wurde eine HP-5-Kapillarsäule (25 m • 0.22 mm I.D.; 0.33  $\mu\text{m}$  Film) genutzt. Das Trägergas war Helium mit einem Fluss von 1.0 ml /min. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß mit 70 eV. Der Detektor arbeitete im SIM (selective ion monitoring)-Modus ( $m/z = 202$  und 217).

Für Venlafaxin wurde ein Hewlett-Packard 5890 *series* II Gaschromatograph mit einem Massenselektiven Detektor (5989A MS) und einem split-splitless Injektor für die Analysen genutzt. Der Injektor arbeitete während der Desorption im splitless Modus bei 270 °C. Für den Ofen wurde ein Temperaturprogramm genutzt ( $T_1 = 160$  °C,  $Rate_1 = 35$  °C/min,  $T_2 = 230$  °C,  $Rate_2 = 4$  °C/min,  $T_3 = 258$  °C). Als Trennsäule wurde eine HP-5-Kapillarsäule (25 m • 0.22 mm I.D.; 0.33 µm Film) genutzt. Das Trägergas war Helium mit einem Fluss von 1.4 ml /min. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß mit 70 eV. Der Detektor arbeitete im SIM-Modus ( $m/z = 134$  und 58). Die Temperatur der Quelle betrug 220 °C und die des Quadrupols 100 °C.

#### 4.3. REFERENZSUBSTANZEN, CHEMIKALIEN UND BIOLOGISCHES MATERIAL

Eine Übersicht der verwendeten Referenzsubstanzen für die untersuchten Arzneistoffe, ihrer Metabolite und der eingesetzten internen Standards ist in Tabelle 2 enthalten.

Arzneistoff/Metabolit Innerer Standard	Herkunft
Clozapin	Sandoz AG, Schweiz
Clozapin-N-oxid*	RBI Research Biochemicals International, USA
Desmethylclozapin*	RBI Research Biochemicals International, USA
Loxapin*	RBI Research Biochemicals International, USA
Levomepromazin*	Egyt Budapest, Ungarn
Chloramitriptylin*	Lundbeck Laboratorien, Dänemark
Clomipramin*	RBI Research Biochemicals Incorporated
Desmethylclomipramin*	Ciba Geigy, Schweiz
Olanzapin	Eli Lilly and Company
Ethylolanzapin	Eli Lilly and Company
Clomethiazol*	Astra GmbH
5-Methylthiazol	Fluka, Deisenhofen
Amitriptylin*	RBI Research Biochemicals International
Nortriptylin*	RBI Research Biochemicals Incorporated
Desipramin*	RBI Research Biochemicals International
Diazepam	Arzneimittelwerk Dresden
Desmethyldiazepam	Arzneimittelwerk Dresden
Prazepam	Gödecke AG Freiburg
Venlafaxin*	Lederle Laboratories, USA
E-10-Hydroxyamitriptylin	Lundbeck Laboratorien, Dänemark
Haloperidol	RBI Köln
reduziertes Haloperidol	RBI Köln
Chlorhaloperidol	RBI Köln
Mirtazapin	Thiemann Arzneimittelwerk GmbH

Tab. 2 Übersicht der untersuchten Arzneistoffe, ihrer Metabolite sowie interner Standards

\*lagen als Hydrochloride oder Salze vor

Eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien gibt die Tabelle 3.

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>
i-Amylalkohol p.a.	Merck Darmstadt
n-Hexan p.a.	Merck Darmstadt
Methanol p.a.	Merck Darmstadt
Natriumcarbonat-10-Hydrat reinst	Riedel de Haen Deisenhofen
Natriumchlorid p.a.	Laborchemie Apolda
Natriumhydroxid p.a.	Merck Darmstadt
Salzsäure, rauchend p.a.	Merck Darmstadt
Trichloressigsäure p.a.	Merck Darmstadt
Albumin-Infusionslösung (5 Ma-% Albumin)	Bayer AG Leverkusen
Triglyceride (Palmitin-, Linol-, Stearin-)	Sigma Deisenhofen

Tab. 3 Übersicht der genutzten Chemikalien

Das verwendete Reinstwasser wurde durch eine „Milli-Q“-Apparatur von Millipore Eschborn sowie durch eine „EASY pure UV“-Apparatur von Werner Reinstwassersysteme Leverkusen hergestellt. Leerplasma sowie Leerserum wurden von gesunden Probanden gewonnen.

Es wurde von jedem Arzneistoff, Metaboliten und internen Standard eine Stammlösung hergestellt. In der Regel enthielten diese Stammlösungen 100 µg/ml Referenzsubstanz. Die Einwaagen und die verwendeten Lösungsmittel sind im Anhang (I) zusammengefasst.

Die Referenzlösungen für die Herstellung von Kalibrierseren und Präzisionskontrollen wurden durch Verdünnen der Stammlösung (100 µg/ml) mit Wasser hergestellt. Die Referenzlösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Lösung von 1 M NaOH mit 6 % NaCl wurde durch Lösen von 4 g NaOH und 6 g NaCl in 100 ml Wasser erhalten. Gesättigte Dinatriumcarbonatlösung wurde durch Lösen von 22 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> • 10H<sub>2</sub>O in 100 ml Wasser hergestellt. Die Lösungen von 0.1 M und 6 M Trichloressigsäure wurden durch Lösen von 0.4 g sowie 24.5 g in 25 ml Wasser zubereitet. Eine Mischung von 50 %igen Methanol wurde durch Zugabe von 50 ml Methanol zu 50 ml Wasser hergestellt. Die n-Hexan/i-Amylalkohol-Gemische wurden durch anteilige Zugabe von i-Amylalkohol zu n-Hexan erhalten.

Plasma wurde mit den jeweiligen wässrigen Referenzlösungen zur Herstellung von Kalibrierserien und Präzisionskontrollen versetzt. Es wurde dabei beachtet, dass das Volumen des zugegebenen Wassers immer konstant 5 % des Plasmavolumens betrug, um mögliche Messfehler durch unterschiedliche Wasseranteile auszuschließen.