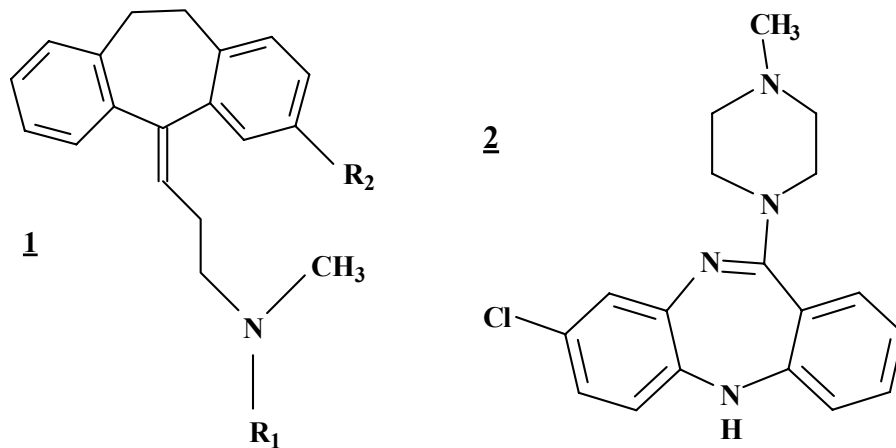


## 5. VORVERSUCHE ZUR METHODENVALIDIERUNG

Als Modellarzneistoffe wurden zunächst Vertreter der trizyklischen Antidepressiva (TZA) und das Neuroleptikum Clozapin ausgewählt (Abb. 3).



	$R_1$	$R_2$
Amitriptylin	$\text{CH}_3$	H
Nortriptylin	H	H

Abb. 3 Chemische Struktur von trizyklischen Antidepressiva (1) und Clozapin (2).

Im Unterschied zur vorangegangenen Arbeit [64] wurde aber von vorn herein auf für das TDM relevante, niedrigere Konzentrationen orientiert. Der Einfluss folgender Parameter auf die Methode wurden untersucht:

- Extraktionsparameter (Zeit, Temperatur, Verfahren u.a.)
- Matrixeffekte (Proteine, Fette, Elektrolyte)
- chromatographische Bedingungen (Injektor, Säule, Desorption u.a.)
- Faserbeständigkeit

## 5.1. OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

### 5.1.1. EXTRAKTIONSZEIT

Die Extraktionskinetik wurde mittels Variation der Extraktionszeit von 5 min bis 24 h in Wasser und in Plasma (drei Messungen pro Zeit) untersucht.

Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der Peakflächen von Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit. Das Gleichgewicht wurde nach ca. 720 min Extraktion einer Plasma-Wasser-Mischung (1 : 7 Volumenanteile) mit einer 100- $\mu$ m-PDMS-Faser erreicht. Als ein Kompromiss zum Zeitaufwand der Methode wurde eine Extraktionszeit von 30 min in weiteren Experimenten genutzt. Der Extraktionsgraph in Wasser ist äquivalent. Allerdings wurde das Gleichgewicht bereits nach 180 min erreicht (Abb. 5).

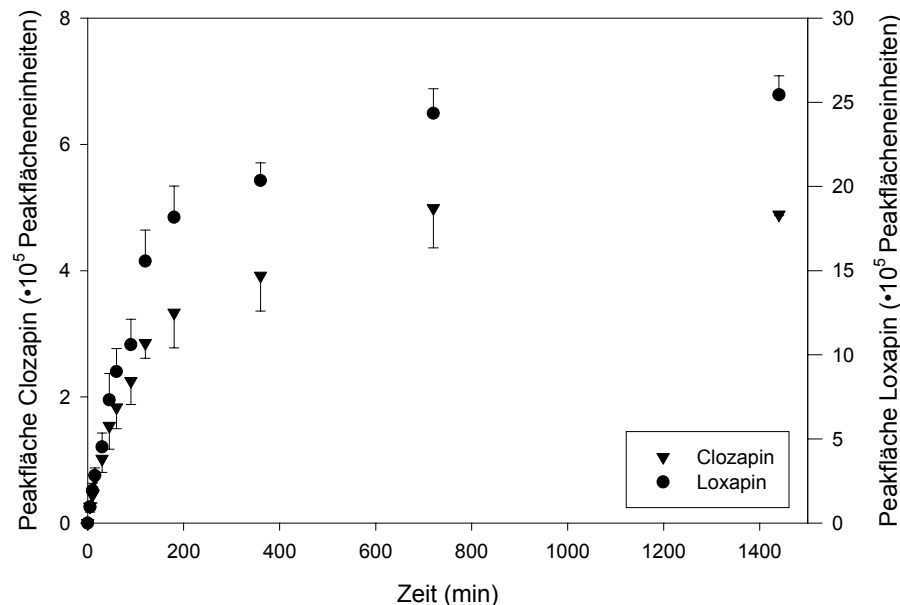


Abb. 4 Abhängigkeit der Peakflächen von Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit in Plasma (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SA), drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 50 ng/ml Analyt im Extraktions-Vial und einem Volumen von 1.5 ml

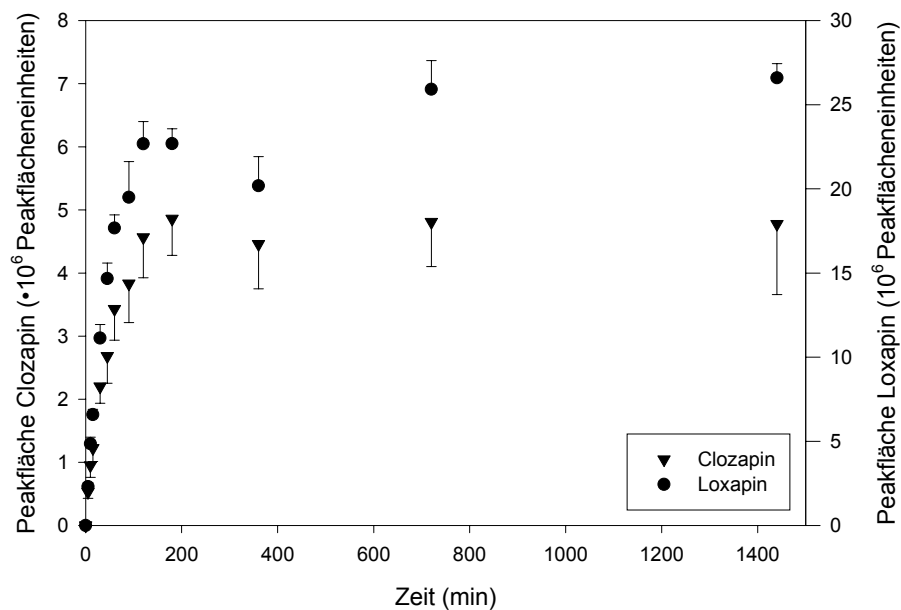


Abb. 5 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Extraktionszeit in Wasser ( $MW \pm SA$ , drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 400 ng/ml Analyt im Extraktions-Vial und einem Volumen von 1.5 ml

### 5.1.2. EXTRAKTIONSTEMPERATUR

Eine eindeutige Temperaturabhängigkeit der Extraktion (niedrigere Verteilungskonstanten bei höheren Temperaturen) wurde nur für Clozapin und die TZA mit tertiärer (Amitriptylin, Clomipramin), nicht aber sekundärer (Nortriptylin, Desipramin) Aminstruktur gefunden (Abb. 6). Mögliche Ursachen sind sekundäre Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen der  $NR_2H$ -Moleküle.

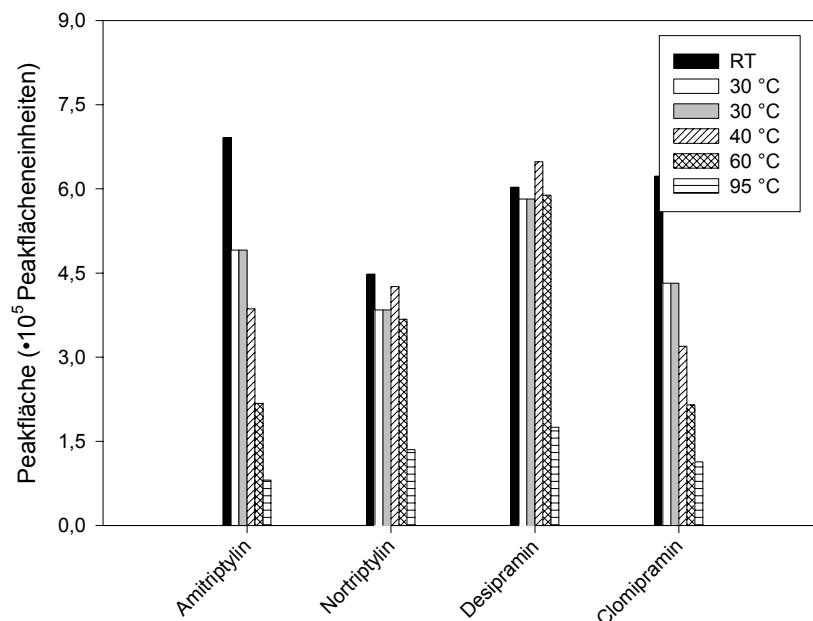


Abb. 6 Abhängigkeit der Peakfläche (im Gleichgewicht) von der Extraktionstemperatur für TZA

Äquivalente Untersuchungen für die Extraktion aus Plasmaproben konnten nicht durchgeführt werden, da die Matrix Proteine enthält, welche bei höheren Temperaturen denaturieren und an der Faser haften bleiben. Die direkte SPME von Plasmaproben wurden bei einer Temperatur von 30 °C und Headspace-Untersuchungen bei Raumtemperatur (RT = 24°C) durchgeführt.

### 5.1.3. EXTRAKTIONSVERFAHREN

#### Direkt- / Headspace-SPME

Für die Extraktion mittels SPME-Fasern bieten sich zwei Verfahren an: die direkte SPME und die SPME aus dem Dampfraum über der Probe (Headspace). Die Headspace-SPME ist gegenüber der direkten Methode schonender und sauberer. Die Faser wird dabei nicht direkt dem zu extrahierenden Medium ausgesetzt, und Kontaminationen und Interferenzen, die aus der Matrix stammen, werden vermieden. Aufgrund der sehr geringen Flüchtigkeit der zu untersuchenden Arzneistoffe scheint der Einsatz der Headspace-Technik ausgeschlossen. Beim Versuch, Clozapin mittels Headspace-SPME aus Wasser zu

extrahieren, konnte auch nach 3 h Extraktionszeit der Analyt auf der Faser nicht nachgewiesen werden. Eine Ausnahme ist das Clomethiazol aufgrund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften. Als lipophiler, leicht flüchtiger und in relativ hohen Konzentrationen im Blut vorliegender Arzneistoff ist es eine optimale Verbindung zur Anwendung der Headspace-SPME. Bisher ist in der Literatur nur wenig über dieses mögliche Verfahren der Arzneimittelanalytik beschrieben [45, 46, 56, 58, 65]. Auf die Untersuchungsergebnisse dazu wird im Kapitel 6.4. der Arbeit eingegangen werden.

#### Agitationsart

Da in der Literatur zur SPME verschiedene Methoden der Probenagitation (Rühren oder Schütteln der Probe, Bewegen der Faser durch Drehen oder Vibration, Ultraschall) beschrieben werden, sollte im Rahmen der Untersuchungen auch die Möglichkeit des Ultraschalls zur Unterstützung der Extraktion getestet werden [5, 34]. Dazu wurden die Probenbehältnisse in ein Ultraschallbad gegeben und über verschiedene Zeiten bei Raumtemperatur extrahiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Plasmaproben auch auf diese Weise extrahiert werden können (Abb. 7). Allerdings ist die Extraktionsausbeute bei Clozapin etwas geringer als bei den geschüttelten Proben. Bei Loxapin fallen die Unterschiede weitaus höher aus. Untersuchungen zur Extraktionskinetik zeigen, dass sich die Einstellung des Gleichgewichts verzögert.

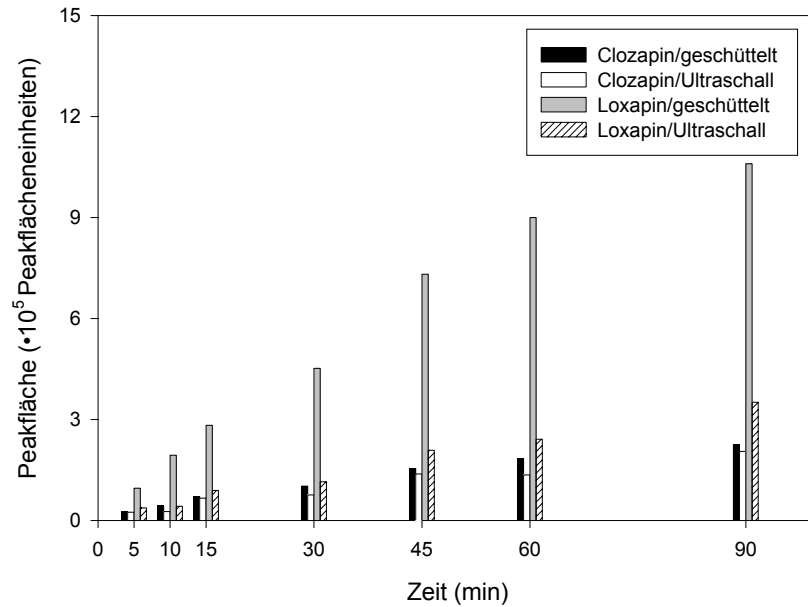


Abb. 7 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Probenagitation

### Schüttelgeschwindigkeit

In der Literatur werden zur Beschreibung der Kinetik zwei Grenzmodelle beschrieben: die statische und die optimal gerührte Lösung (siehe auch Kapitel 3.4.) [110]. Deshalb wurde auch der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Extraktionsausbeute untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Wie erwartet, nehmen die extrahierten Mengen mit steigender Geschwindigkeit zu. Bei einer Geschwindigkeit von 1000 U/min trat jedoch Probenmaterial aus den Gefäßen aus. Deshalb wurde bei weiteren Untersuchungen mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min gearbeitet.

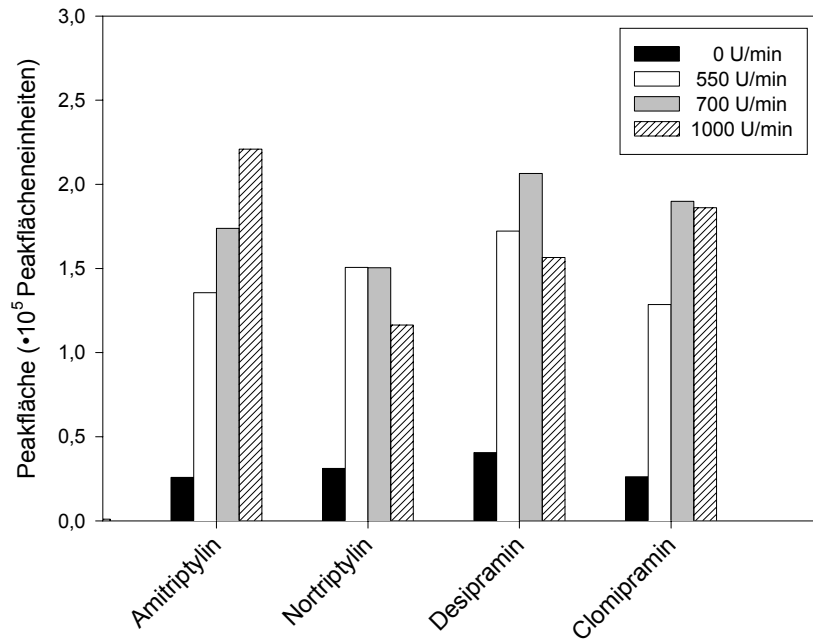


Abb. 8 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Schüttelgeschwindigkeit

#### 5.1.4. WEITERE EXTRAKTIONSPARAMETER

##### Extraktionsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit sollten insbesondere ZNS-wirksame Pharmaka, die stark lipophil sind, untersucht werden. Bei der Auswahl der SPME-Fasern schien die PDMS-Faser besonders geeignet für lipophile Substanzen. Auch ihre Robustheit gegenüber chemischen Einflüssen zeichnet sie gegenüber anderen Fasertypen aus. Zur Untersuchung dieser Aussage wurden wässrige Proben mit PDMS-Faser unterschiedlicher Beschichtungsdicke und mit PA-Faser extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Extraktionsausbeute der TZA aus der Extraktion mit der 100- $\mu\text{m}$ -PDMS-Faser liegt deutlich höher als die mit der PA-Faser. Da die PA-Faser hauptsächlich für die Extraktion polarer Substanzen empfohlen wird (siehe Kap. 3.2.), entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Bei verschiedenen Methodenvalidierungen wurden die PA- und die neueren CW-DVB-Fasern jedoch wiederholt getestet. Die Ergebnisse werden im Kapitel 6. der Arbeit diskutiert.

Die PDMS-Fasern werden vom Hersteller mit unterschiedlichen Beschichtungsdicken für verschiedene Anwendungsgebiete angeboten. In den Vorversuchen sollten diese

Faservarianten auf eine mögliche Nutzung in der Arzneimittelanalytik getestet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Die 100- $\mu\text{m}$ -Fasern ergaben die bessere Sensitivität (Messung im Nichtgleichgewicht bei einer Extraktionszeit von 30 min aus Wasser). Sie wurden, mit Ausnahmen, für weitere Untersuchungen eingesetzt, zumal die Extraktionsausbeute bei Serumproben noch stark zurückgeht.

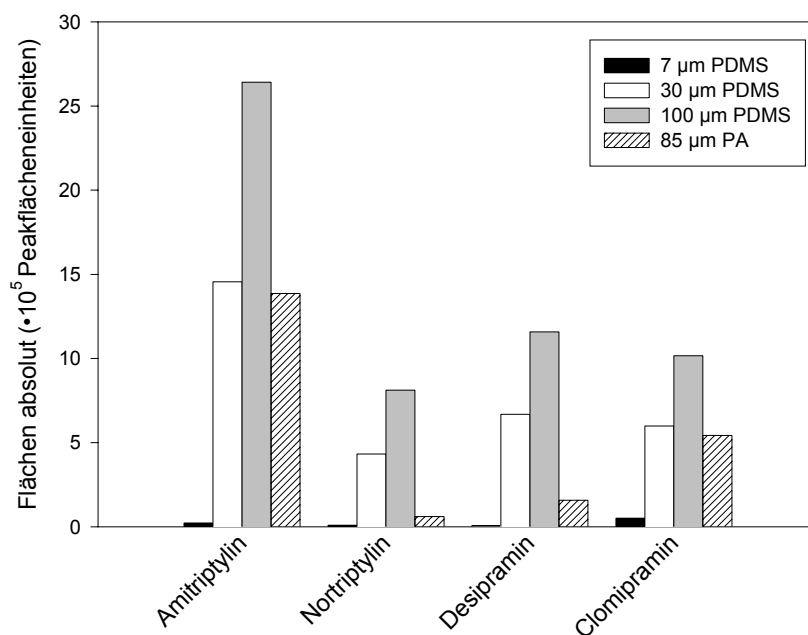


Abb. 9 Abhängigkeit der Peakflächen vom Extraktionsmittel und der Beschichtungsdicke

### Einfluss des pH-Wertes

Es ist aus der Literatur bekannt, dass der pH-Wert der zu extrahierenden Lösung den  $K_{fs}$ -Wert des Analyten beeinflussen kann [108]. Zur Untersuchung dieses Parameters wurden als Modellsubstanz das Benzodiazepin Diazepam und sein Metabolit Nordazepam ausgewählt (siehe Kap. 6.6.). Der Grund für diese Auswahl sind die zwei  $pK_a$ -Werte für das Nordazepam (3.5 und 12.0). Der  $pK_a$ -Wert für Diazepam liegt bei 3.3. Für die Untersuchung wurden Leerplasma und mit den Analyten versetztes Plasma bei verschiedenen pH-Werten mittels PDMS-Faser extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Für Nordazepam entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen. Die besten Extraktionsergebnisse werden bei  $\text{pH} = 8$  erreicht. Für Diazepam liegen die optimalen Extraktionsbedingungen entgegen den Erwartungen bei  $\text{pH} = 13$ . Als Ursache hierfür können die schlechte Löslichkeit in wässrigen und die sehr gute Löslichkeit in



organischen Lösemitteln genannt werden. Dieser Löslichkeitseffekt überlagert vermutlich den Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktion. Interessant ist, dass die Extraktion der matrixbedingten Verunreinigungen (Interferenzen Diazepam) stark vom pH-Wert beeinflusst wird. Die hier dargestellten Ergebnisse sind nur Vorversuche für eine Methodvalidierung. Im Kapitel 6.6. werden die zu diesem Problem weiterführenden Untersuchungen und ihre Ergebnisse diskutiert.

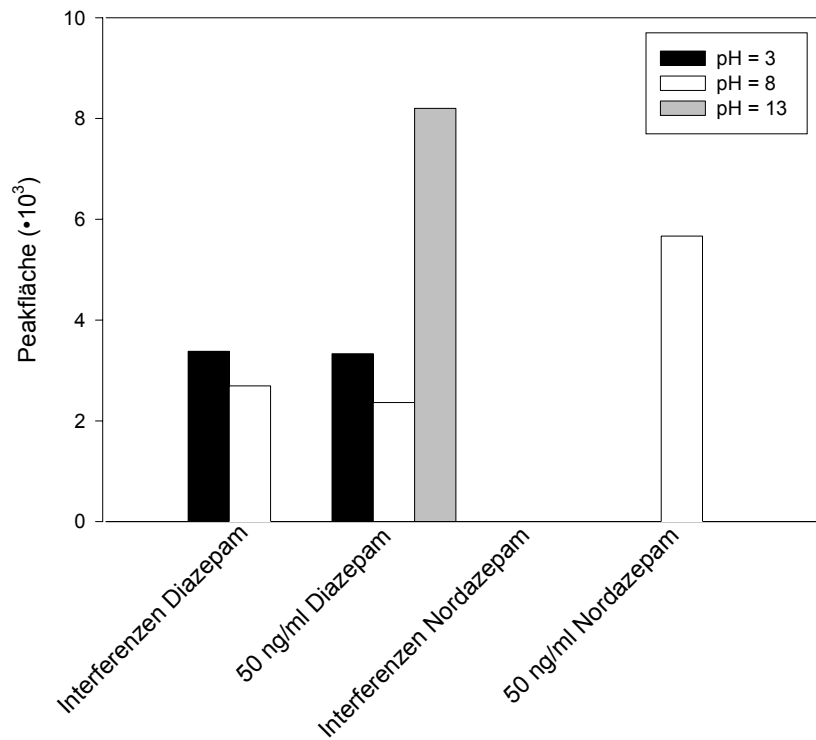


Abb. 10 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute und matrixbedingter Interferenzen vom pH-Wert der Probe (Extraktion aus Plasma mittels PDMS-Faser)

### Extraktionsgefäß

Für die Arzneimittelanalytik in Plasma wird in der Literatur oft die Verwendung von silanisierten Glasgeräten beschrieben [76, 89, 90]. Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses wurden Extraktionen von wässrigen Lösungen aus silanisierten und nicht silanisierten Glas-Vials sowie *ependorf*-Vials aus Polyethylen durchgeführt. Es wurde kein Einfluss des verwendeten Extraktionsgefäßes gefunden (Abb. 11). Zu weiteren Untersuchungen wurden aus praktischen Überlegungen die *ependorf*-Vials

(medizinisches Einwegmaterial) verwendet. Alle weiteren verwendeten Glasgeräte wurden allerdings einer besonderen Reinigung unterzogen [76, 89, 90].

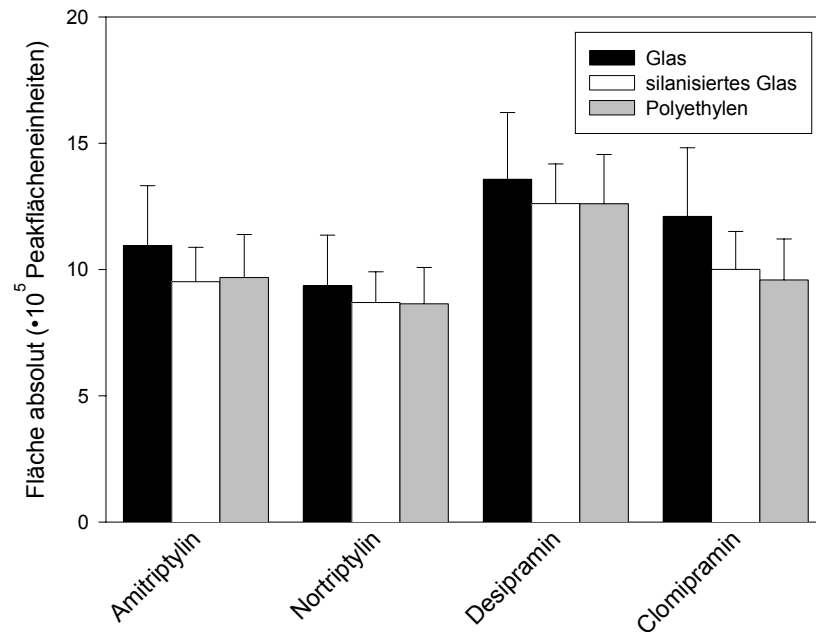


Abb. 11 Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von Material des Extraktionsgefäßes (MW  $\pm$  SA, zehn Bestimmungen pro Messpunkt)

## 5.2. MATRIXEFFEKTE

Es wurde der Einfluss von Änderungen der Matrix untersucht. In Erweiterung zu den entsprechenden Arbeiten bei TZA (Gesamtproteinkonzentration, Konzentration von saurem  $\alpha$ -Glykoprotein) [64] wurden dabei auch Änderungen der Triglycerid- und der Elektrolytkonzentration im Plasma untersucht.

### 5.2.1. PROTEINGEHALT

Mit Clozapin und Loxapin versetztes Humanplasma wurde mit 0 bis 9 Volumenanteilen Wasser verdünnt, um den Einfluss der Plasmaproteine zu untersuchen.

Abbildung 12 zeigt den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Extraktion. Die Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung der Proben mit Wasser geändert. Trotz der sinkenden Analytkonzentration in den verdünnten Proben bleiben die Peakflächen von Clozapin und Loxapin über den untersuchten Messbereich relativ konstant. Das trifft insbesondere auch für die Peakflächenverhältnisse zu. Dagegen steigen die Peakflächen an, wenn die Konzentration der Analyten bei sinkender Proteinkonzentration konstant gehalten wird. Dieser Effekt der Plasmaproteine wurde bereits detailliert in einer früheren Publikation beschrieben [64]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Plasmaproben in weiteren Experimenten 1:7 mit Wasser verdünnt. Somit sollte der Einfluss von Änderungen der Proteinkonzentration auf die Methode verringert werden. Außerdem wurde die Anwendungsdauer der Fasern erhöht, da die Verunreinigung der Faser durch anhaftende Proteine, die während der Desorption bei Temperaturen von 200 °C bis 300 °C in dem Faserfilm fixiert werden, ebenfalls verringert wird.

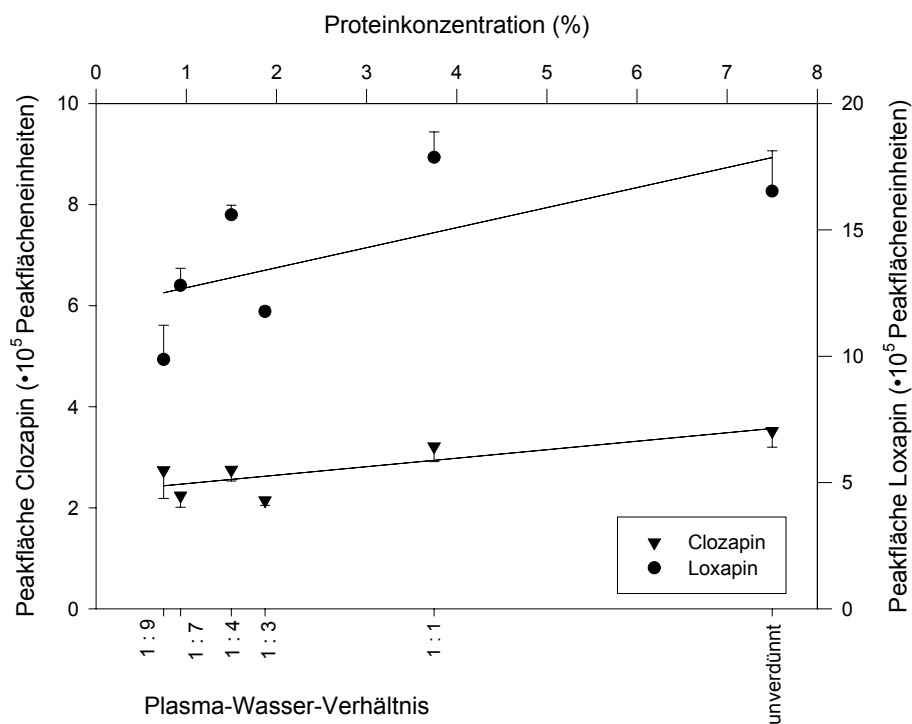


Abb. 12 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Verdünnung der Proben mit Wasser (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 500 ng/ml Analyt in der Probe ohne Verdünnung

## 5.2.2. FETTGEHALT

Ein Einfluss der Triglyceridkonzentration auf die Extraktion wurde angenommen, da die untersuchten Arzneistoffe stark lipophil sind. Es wurde eine Mischung aus wässriger Albuminlösung (5 Ma-% Albumin) mit drei verschiedenen Triglyceriden (Palmitin-, Linol-, Stearintriglycerid) in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0 bis 5 mg/ml Triglyceride) für die Untersuchungen hergestellt. Diese Untersuchungen wurden bei zwei Clozapinkonzentrationen (500 ng/ml und 1 µg/ml) durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt den Zusammenhang zwischen Fettgehalt und den Peakflächen von Clozapin und Loxapin. Trotz einer z.T. großen experimentell bedingten Streuung konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Fettgehalt die Peakflächen von Clozapin und Loxapin sinken (Cloz:  $r = 0.411$ ,  $p = 0.09$ ; Lox:  $r = 0.612$ ,  $p = 0.007$ ; lineares Modell, Software SPSS). Dies lässt sich mit der steigenden Lipophilie der Matrix erklären, die die Extraktion der lipophilen Arzneistoffe senkt. Einschränkend ist aber festzustellen, dass die ansteigende Viskosität der Matrix diesen Effekt ebenfalls erklären könnte, da die Diffusion der Analyten abnimmt und nicht im Gleichgewicht gemessen wurde.

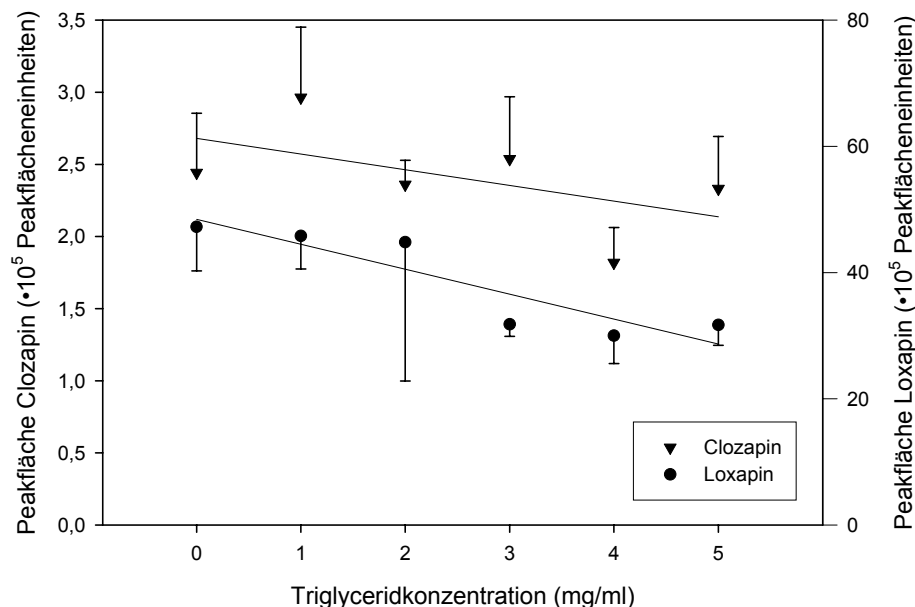


Abb. 13 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Triglyceridkonzentration (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) unter Nutzung der SPME-Standardmethode mit je 500 ng/ml Cloz in der Probe

Die Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  bleiben mit steigendem Fettgehalt insgesamt gleich (Abb. 14). Außerdem muss beachtet werden, dass die physiologische Konzentration von Fetten im Humanplasma sich zwischen 2.4 mg/ml und 4.2 mg/ml bewegt. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die physiologische Variabilität der Matrix (hochlipemisches Plasma eingeschlossen) die Methode nicht beeinflusst, da die Änderungen von  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  innerhalb der Präzision der Methode liegen (siehe Kap. 6.1.).

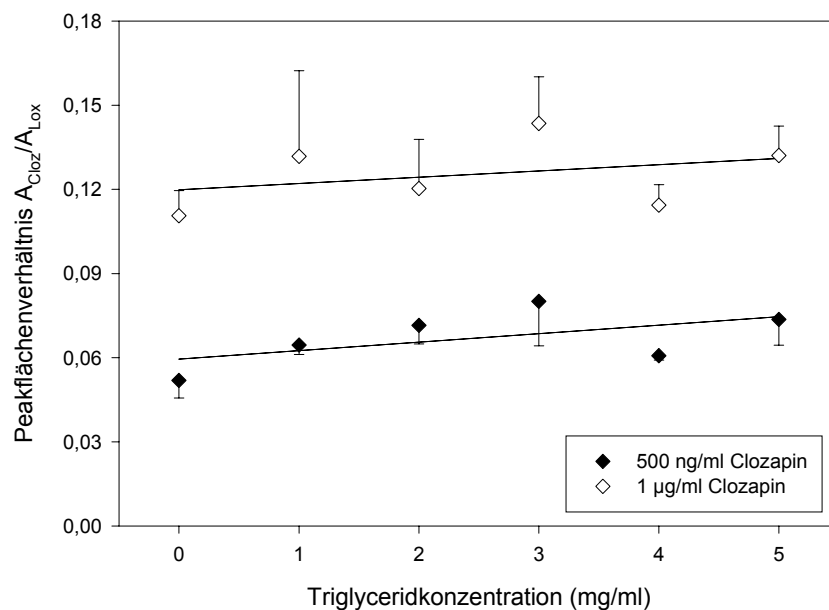


Abb. 14 Abhängigkeit der Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Cloz}}/A_{\text{Lox}}$  bei zwei Clozapinkonzentrationen (500 ng/ml und 1 µg/ml) von der Triglyceridkonzentration (MW  $\pm$  SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) unter Nutzung der SPME-Standardmethode

### 5.2.3. ELEKTROLYTGEHALT

Die NaCl-Konzentration wurde von 0 bis 20 % variiert, um den Aussalzeffekt zu untersuchen.

Abbildung 15 zeigt den Einfluss der Zugabe von NaCl zur Matrix. Die Peakflächen von Clozapin und Loxapin ändern sich im Bereich von 0 bis 8 % NaCl-Gehalt nicht. Bei

höheren Konzentrationen von NaCl (8 % bis 20 %) sinken die Peakflächen. Ein empirisches Modell

$$y = (-b_0x/(b_1-x)) + b_2 \quad (39)$$

(y = Peakflächen, x = Salzkonzentration) wurde an die Daten angepasst und es wurde eine ausreichende Übereinstimmung gefunden (Cloz: r = 0.990, p = 0.029; Lox: r = 0.981, p = 0.057; Software SPSS). Die sinkenden Peakflächen können durch die ansteigende Viskosität der Proben mit steigenden Salzgehalt erklärt werden. Dieser Effekt überlagert das Ansteigen der Peakflächen aufgrund der steigenden Polarität, wie es für lipophile Arzneistoffe bereits untersucht wurde. Die Peakflächenverhältnisse ändern sich mit steigendem Salzgehalt nicht.

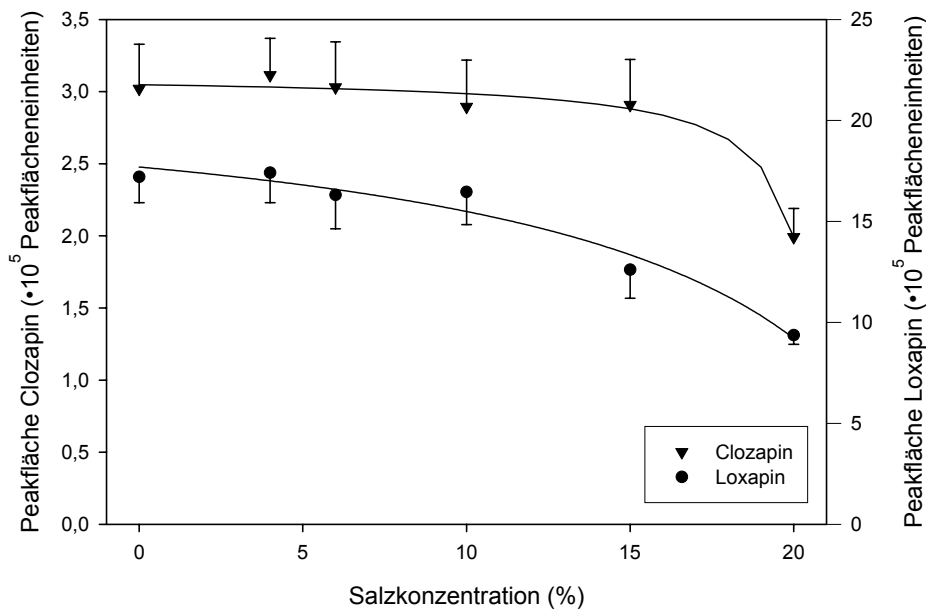


Abb. 15 Abhängigkeit der Peakflächen vom Clozapin und Loxapin von der Salzkonzentration (MW ± SA, drei Bestimmungen pro Messpunkt) mit je 500 ng/ml Analyt in der Probe

Im wesentlichen entspricht der Einfluss der untersuchten Extraktionsparameter den theoretischen Erwartungen und den experimentell aus der Umweltanalytik bekannten Ergebnissen. Einige Besonderheiten ergeben sich aber aus den speziellen chemischen und

physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe. Es wurde gezeigt, dass die (insgesamt geringfügigen) Schwankungen der Zusammensetzung von Plasma keinen Einfluss auf das Analysenergebnis haben. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Matrixänderungen die Peakflächen der Analyten und internen Standards teilweise beeinflussen. Das trifft auch auf die alternative Verwendung von Serum zu, was ebenfalls eine geringfügige Änderung der Matrix darstellt. Die Peakflächenverhältnisse  $A_{\text{Analyt}}/A_{\text{I.S.}}$  bleiben jedoch konstant innerhalb der Präzision der Methode. Aufgrund der niedrigen Wiederfindungsrate der Methode ist es wichtig, diese Matrixeinflüsse auf die Ergebnisse auszuschließen. Die Auswahl des internen Standards ist entscheidend für die Entwicklung einer SPME-Methode in Humanplasma. Im Vergleich zu anderen Gebieten der chemischen Analytik ist es oft einfacher, geeignete interne Standards für die Arzneistoffanalytik zu finden, da bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe eine Vielzahl von ähnlichen Substanzen synthetisiert werden. Da diese dann aber nicht allgemein verfügbar sind, ist ein Auftreten als Verunreinigung in der Matrix ausgeschlossen. Trotzdem kann im Einzelfall auch in der Arzneistoffanalytik die Auswahl eines guten inneren Standards Probleme bereiten.

### **5.3. ENTWICKLUNG DER CHROMATOGRAPHISCHEN METHODE**

Da die SPME ohne notwendige Zusätze mit der Gaschromatographie zusammen genutzt werden kann, sollten SPME-GC-NPD-Methoden für die Bestimmung von Arzneistoffen in Humanplasma entwickelt und untersucht werden. Dazu wurden in verschiedenen Vorversuchen die chromatographischen Bedingungen optimiert.

### 5.3.1. SÄULE

Fünf Kapillarsäulen wurden getestet, um die Trennung und die Sensitivität der Methoden zu optimieren. Eine Übersicht ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Säule	Beschreibung	Maße	Hersteller	Analyten
HP-5	5 % Diphenyl-Dimethyl-polysiloxan	25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film	HP Deutschland	Amitriptylin Clomethiazol Clomipramin Diazepam Mirtazapin Venlafaxin <i>Clozapin</i> <i>Olanzapin</i>
BPX-5	5 % Phenyl (äquivalent) Polysilphenylsiloxan	30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film	SGE Deutschland	Clozapin Haloperidol Levomepromazin Olanzapin <i>Diazepam</i>
DB-35ms	(35 %-Phenyl)-methylpoly-siloxan	25 m • 0.2 mm I.D. 0.3 µm Film	J&W Scientific Deutschland	Amitriptylin
DB-17	(50 %-Phenyl)-methylpoly-siloxan	30 m • 0.25 mm I.D. 0.25 µm Film	J&W Scientific Deutschland	<i>Amitriptylin</i>
HP-1	100 % Polydimethylsiloxan	25 m • 0.32 mm I.D. 0.52 µm Film	HP Deutschland	<i>Amitriptylin</i>

Tab. 4 Übersicht der getesteten Säulen und gemessenen Analyte (*nur getestet*)

Der Versuch, die beim Amitriptylin auftretenden matrixbedingten Interferenzen (siehe Kap. 6.5.) durch eine andere Säule chromatographisch vom Analyten zu trennen, misslang. In Abbildungen 16 ist ein Chromatogramm einer PDMS-Fasern dargestellt, die nach der Konditionierung vor einer ersten Extraktion aufgenommen wurde. Die Trennung erfolgte mit einer HP-5-Säule (25 m • 0.2 mm I.D. 0.33 µm Film) und N<sub>2</sub> (0.7 ml/min, 190 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfsgas N<sub>2</sub> 28 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 300 °C im splitless Modus während der Desorption. Die Messung erfolgte nach der Desorption, und der Split wurde geöffnet. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min auf 260 °C, 4 °C/min auf 280 °C (1 min)).



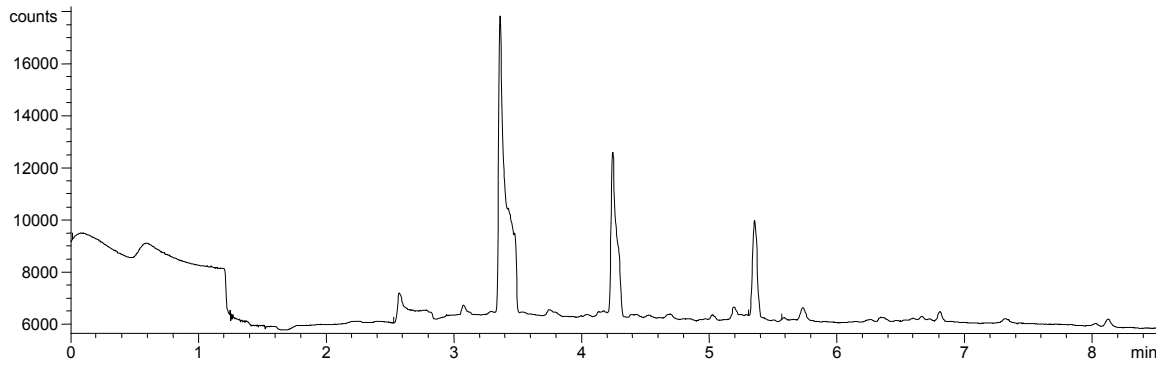


Abb. 16 Leerlauf PDMS-Faser, HP-5

In den Abbildungen 17 und 18 sind Chromatogramme von PDMS- und PA-Fasern dargestellt, die nach der Konditionierung vor einer ersten Extraktion aufgenommen wurden. Die Trennung erfolgte mit einer BPX-5-Säule (30 m • 0.53 mm I.D. 1 µm Film) und N<sub>2</sub> (20 ml/min, 150 kPa) als Trägergas. Die Flussraten der Detektorgase waren: Luft 100 ml/min, H<sub>2</sub> 3 ml/min, Hilfgas N<sub>2</sub> 6 ml/min. Die NPD-Detektor-Temperatur betrug 300 °C. Der NPD arbeitete bei einer Basislinie von 20 pA bis 25 pA. Der Injektor arbeitete bei 260 °C im splitless Modus während der Desorption. Der Ofen arbeitete mit einem Temperaturprogramm (160 °C (0 min), 40 °C/min bis 260 °C, 4 °C/min bis 284 °C (1 min)).

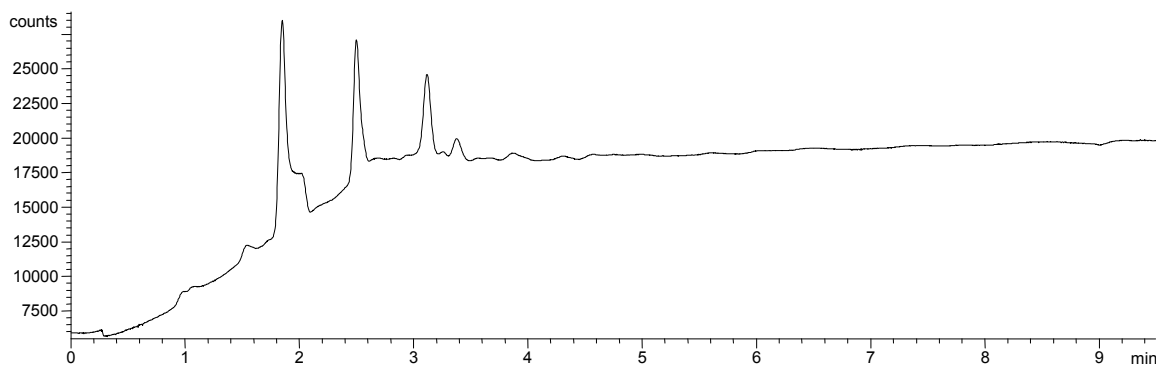


Abb. 17 Leerlauf PDMS-Faser, BPX-5

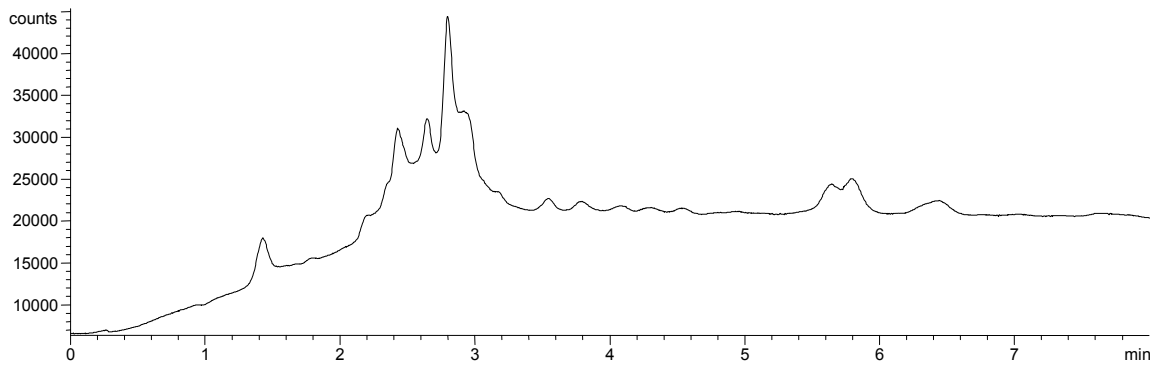


Abb. 18 Leerlauf PA-Faser, BPX-5

Es wurden Peaks, die aus dem Polymer der SPME-Faser stammen, gefunden. Diese Störungen begrenzen die Einsetzbarkeit der SPME, da von nicht zu vernachlässigenden Interferenzen bei der Spurenanalytik ausgegangen werden muss. Somit konzentrierte sich die Auswahl der Säule bei weiteren Methodvalidierungen oft auf die vorausgesetzte Empfindlichkeit der Methoden. Die HP-5- und die BPX-5-Säulen erwiesen sich als am ehesten geeignet, die chromatographischen Ansprüchen zu erfüllen.

### 5.3.2. INJEKTOR

Zur Optimierung der chromatographischen Methode wurden drei Liner und die Injektionstiefe der Faser getestet. Die Liner können wie folgt kurz charakterisiert werden:

- 1) 4 mm I.D., einseitig zulaufend (0.8 mm)
- 2) 2 mm I.D., splitless
- 3) 4 mm I.D., beidseitig zulaufend (0.8 mm)

Für die Untersuchungen wurden wässrige, mit TZA versetzte Proben mittels einer 100- $\mu$ m-PDMS-Faser extrahiert. Die Injektionstiefen wurden an der Faserhalterung eingestellt und arretiert. Die Ergebnisse sind am Beispiel des Amitriptylins in Abbildung 19 dargestellt. schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen wurde für weitere Untersuchungen der Splitless-Liner mit 2 mm Innendurchmesser verwendet.

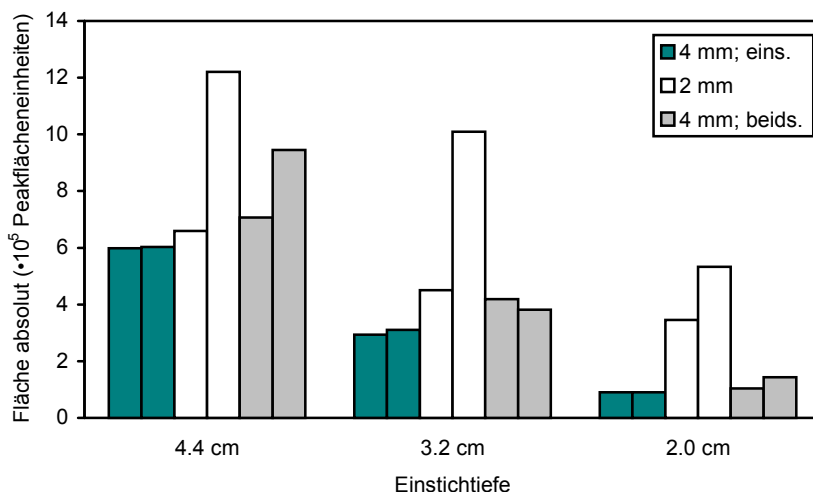


Abb. 19 Abhängigkeit der Peakflächen von der Injektionstiefe der Faser und dem eingesetzten Liner (zwei Parallelbestimmungen pro Messpunkt)

### 5.3.3. DETEKTION

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Arzneimittelbestimmung mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Stickstoff-Phosphor-selektiven Detektor (NPD) beschrieben [46, 57, 64, 70, 86, 89, 90]. Deshalb wurde als Detektor für die zu entwickelnden Methoden ebenfalls der NPD ausgewählt. Zusätzlich wurde zum Vergleich bei einigen Methoden auch das Massenspektrometer, an einen Gaschromatographen gekoppelt, als Detektor herangezogen (siehe Kap. 4.2.). Diese Ergebnisse werden im Kapitel 6 der Arbeit diskutiert.

### 5.3.4. DESORPTION

Verschiedene Vorversuche wurden durchgeführt, um optimale Bedingungen für die Desorption zu finden. Aufgrund der sehr geringen Flüchtigkeit der Arzneistoffe sind hohe Desorptionstemperaturen und relativ lange Desorptionszeiten notwendig (30 s bis 90 s). Der Vorteil besteht aber darin, dass die Fasern nach der Extraktion bis zur Desorption

längere Zeit gelagert werden können. Das ermöglicht auch eine simultane Extraktion (bisher sechs Proben) mit nachfolgender schrittweiser chromatographischer Analyse.

#### Desorptionszeit

Die Desorptionszeit wurde für jeden Analyten bestimmt, um Akkumulationen auf der Faser zu verhindern. Dazu wurde die Desorptionszeit von 10 s bis 90 s variiert. Die Faser wurde danach ein zweites Mal 90 s desorbiert (Postdesorption). Somit konnte der auf der Faser verbleibende Rest nach der ersten Desorption analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Tests sind in den einzelnen Kapiteln zu den Methodenentwicklungen (Kap. 6) dargestellt.

#### Desorptionstemperatur

Die Auswahl der Desorptionstemperatur lehnte sich an die Empfehlungen des Herstellers der Fasern (Tab. 5). Aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Arzneistoffe wurde meist bei der angegebenen höchsten Betriebstemperatur gearbeitet, um die Desorptionszeiten so kurz wie möglich zu halten. Eine Ausnahme stellte das leicht flüchtige Clomethiazol dar (siehe Kap. 6.4.). Einzelne Untersuchungsergebnisse zur Desorptionstemperatur werden in den nachfolgenden Kapiteln zur Methodvalidierung diskutiert.

<b>Fasertyp</b>	<b>Maximaltemperatur</b>	<b>Betriebstemperatur</b>
PDMS 100 µm	280 °C	200 °C-270 °C
PDMS 30 µm	280 °C	200 °C-270 °C
PDMS 7 µm	340 °C	220 °C-320 °C
PA 85 µm	320 °C	220 °C-310 °C
CW-DVB 65 µm	265 °C	200 °C-260 °C

Tab. 5 Empfehlungen des Herstellers über die Betriebstemperaturen der einzelnen Fasertypen

#### 5.4. FASERBESTÄNDIGKEIT

Die Fasern wurden wiederholt genutzt. Die einzelnen Anwendungen fanden aufgrund von Methodvalidierung (Salzkonzentration, Fett, Temperaturen, Extraktionszeiten, Nutzung für andere Methoden) nicht unter gleichbleibenden Bedingungen für die Fasern statt. Die Anzahl der Desorptionen war höher als die der Extraktionen aufgrund von Postdesorptionsuntersuchungen und Faserkonditionierungen. Es wurde von jeder Faser ein „Lebenslauf“ erstellt (Anhang II).

##### Polydimethylsiloxan (PDMS)

Die PDMS-Fasern mit 100 µm Schichtdicke waren die am häufigsten benutzten Fasern im Rahmen dieser Arbeit. Gründe dafür sind die universelle Einsetzbarkeit für verschiedene Analyte sowie ihre Robustheit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Insgesamt wurden 30 Fasern bei den Untersuchungen verbraucht (Anhang II). Die Anzahl der Desorptionen schwankt zwischen 27 und 158 pro Faser (Mittelwert 75 Desorptionen bei 28 Fasern). Der große Unterschied der Anwendungsdauer der Fasern ist damit zu erklären, dass die Fasern bei den Methodvalidierungen häufig sehr unterschiedlichen und zum Teil extremen Einflüssen (Temperatur, pH-Wert u.s.w.) ausgesetzt waren. Der Waschschrift ist bedeutend für die Lebensdauer der Fasern. Zur Untersuchung der „Lebenserwartung“ der Fasern unter Routinebedingungen wurde eine Faser (Faser-Nr. 14) nur unter konstanten Bedingungen (Säule, Detektor, innerer Standard) benutzt. Als Maß der Alterung der Faser wurde die Absolutfläche des inneren Standards Chloramitriptylin gewählt (Abb. 20).

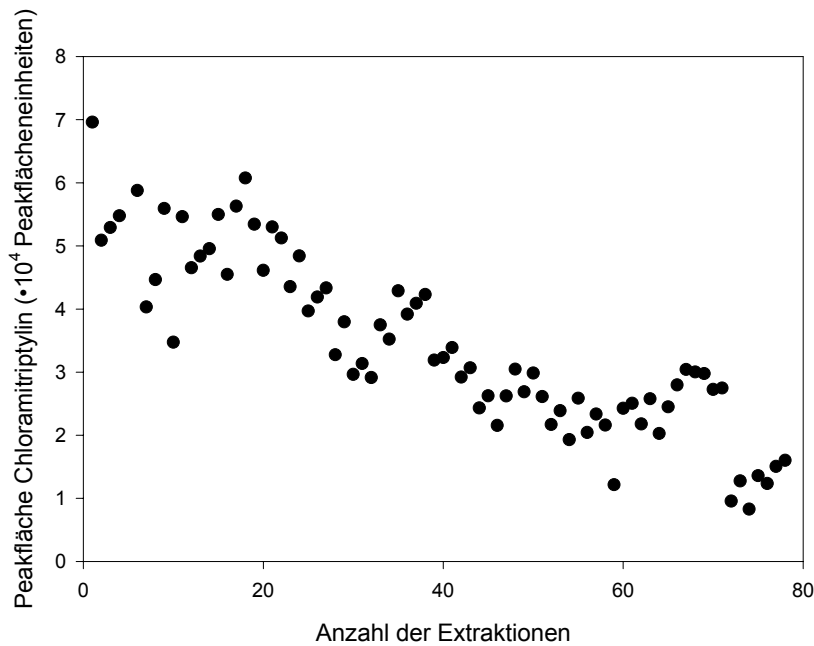


Abb. 20 Verlauf der Peakflächen des inneren Standards von Faser 14 unter konstanten Bedingungen

Nach 116 Extraktionen/Injektionen war bei der Faser Ermüdung erkennbar. Die Leistung der Faser sinkt nach über 50 Extraktionen, das heißt die Peakflächen sinken um den Faktor 2. Darum sinkt die Wiederfindungsrate und die Sensitivität von alten Fasern (siehe 6.1.). Die Verringerung der Peakfläche des internen Standards um die Hälfte kann als Zeichen für den Verbrauch der Faser angesehen werden. Es ist auch möglich, die Extraktionszeit bei älteren Fasern zu erhöhen, um die Sensitivität konstant zu halten. Es muss auch beachtet werden, dass die Präzision einer Methode verbessert werden kann, wenn nur mit einer Faser gemessen wird und nicht mehr als 50 Extraktionen durchgeführt werden. Allerdings können zur Verringerung der Kosten der SPME die Fasern noch häufiger zur Extraktion genutzt werden.

### Polyacrylat (PA)

Im Rahmen der Untersuchungen wurden bisher nur sieben Polyacrylat-Fasern benutzt. Die PA-Fasern eignen sich besonders zur Extraktion polarer Substanzen. Als Nachteil dieser Fasern sind jedoch verstärkt auftretende Interferenzen durch faserinherente Kontaminationen zu nennen (Abb. 18). Nach 21 bis 78 Extraktionen/Desorptionen sind noch keine Ermüdungserscheinungen der Fasern zu erkennen.

### Carbowax-Divinylbenzen (CW-DVB)

Der Einsatz der Carbowax-Divinylbenzen-Fasern erwies sich als äußerst schwierig. Bisher wurden 13 CW-DVB-Fasern benutzt. Die maximale Injektionsanzahl betrug 28. Nach relativ kurzer Zeit kommt es zu Rissen in der Beschichtung, die sich dann nach wenigen weiteren Injektionen vollständig von der Faser löst. Als mögliche Ursachen dieser relativ schnellen Alterung wurden Wasser in der Extraktionslösung und der hohe pH-Wert der Extraktionslösung vermutet. Allerdings wird in der Literatur die Benutzung dieser Fasern in Wasser bei extremen pH-Werten ohne besondere Auffälligkeiten beschrieben [8, 16, 19]. Von HERNANDEZ [33] wurde diese schnelle Alterung der Fasern ebenfalls beschrieben. Untersuchungen dazu zeigten, dass ein hoher Salzgehalt für die geringe Stabilität der Faser verantwortlich ist. Dies könnte auch die Ursache für die schnelle Alterung der hier verwendeten Fasern sein, da die Salzkonzentrationen in der Probe sehr hoch waren.