

Entwicklung eines neuartigen Kartuschensystems
zur automatisierten Probenvorbereitung bei der
Quantifizierung von Pharmaka mittels
Massenspektrometrie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Heike Burhenne
geboren am 17.05.1980 in Hannover

2010

Referent: Prof. Dr. Volkhard Kaefer

Korreferent: Prof. Dr. Heiner Wolfes

Tag der Promotion: 15.3.2010

Kurzzusammenfassung

Bei Pharmaka mit einer geringen therapeutischen Breite sowie einer variablen Bioverfügbarkeit ist eine regelmäßige Kontrolle der Wirkstoffe z.B. in Plasma oder im Vollblut des Patienten eine sinnvolle therapiebegleitende Maßnahme. Weite Verbreitung hat die sog. therapeutische Arzneimittelüberwachung (*therapeutic drug monitoring* - TDM) in der Routineanalytik der Psychopharmaka, antiretroviralen Pharmaka sowie der Immunsuppressiva gefunden. Generell erfordert das TDM schnelle, robuste sowie ausreichend sensitive Methoden. Aufgrund der verbesserten Selektivität gegenüber Immunoassays werden beim TDM der Immunsuppressiva immer häufiger massenspektrometrische Methoden angewandt. Nachteilig bei allen bisherigen Methoden wirkt sich zum einen die für den Patienten zeitintensive Probenahme als auch eine für das Laborpersonal aufwändige Probenvorbereitung (meist Proteinfällung) aus. Die Bestimmung von Immunsuppressiva aus getrockneten Blutproben (*dried blood spots* - DBS) ist ein möglicher Ansatz, die Probengewinnung zu optimieren. Ein korrekter Probenauftrag (z.B. ausreichendes Probenvolumen) durch den Patienten ist dabei maßgeblich für die exakte Spiegelbestimmung und stellt damit eine beträchtliche Fehlerquelle in der Spiegelbestimmung dar. Methoden zur simultanen Quantifizierung der Immunsuppressiva Cyclosporin A, Tacrolimus, Everolimus und Sirolimus aus DBS sind derzeit nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer neuartigen, massenspektrometrischen Methode zur simultanen Quantifizierung oben genannter Immunsuppressiva, die zum einem dem Patienten eine selbständige Probenahme ermöglicht und zum anderen eine automatisierte Probenvorbereitung erlaubt. Dafür wurde ein in Zusammenarbeit mit der Firma Spark Holland entwickeltes Filterkartuschensystem verwendet. Die entwickelte Methode benötigt ein Probenvolumen von 10 µl und hat eine Gesamtanalysezeit von 9 min. Sie setzt sich aus Festphasenextraktion (SPE), chromatographischer Trennung (HPLC) und massenspektrometrischer Detektion (MS/MS) zusammen. Die entwickelte Methode wurde erfolgreich eingesetzt, Immunsuppressiva in realen Patientenproben aus Vollblut zu quantifizieren. Die ermittelten Konzentrationen stehen dabei in guter Korrelation zu den jeweils in einer etablierten, konventionellen SPE-HPLC-MS/MS-Methode bestimmten Blutspiegeln.

Daneben konnte die Anwendbarkeit der Methode auf Plasma-Proben am Beispiel des Antimykotikums Anidulafungins nachgewiesen werden.

Schlagwörter: therapeutische Arzneimittelüberwachung, Immunsuppressiva, getrocknete Blutproben, selbständige Probenahme, SPE-HPLC-MS/MS

Abstract

A routine measurement of drug levels in patients' blood or plasma is an important procedure to achieve optimum therapeutic efficiency for drugs that show a narrow therapeutic range as well as a variable bioavailability. The so called Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is indicated for example for antipsychotic, as well as antiretroviral and immunosuppressive drugs. It requires fast, robust and sufficiently sensitive methods. In comparison to immunoassays, mass-spectrometric methods show improved selectivity and therefore are widely used for TDM of the immunosuppressive drugs. All existing methods are disadvantageous on the one hand due to the time-consuming blood collection procedure and on the other hand due to elaborate sample preparation steps (e.g. protein precipitation) in the clinical laboratory. The quantitation of immunosuppressive drugs in dried blood spots (DBS) is a promising technique to optimize sample collection. However, accurate sample application on a filter paper is important for precise quantitation of drug levels. As a consequence, in these methods sample application is a serious source of error. Furthermore, no method for the simultaneous determination of the immunosuppressive drugs cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in DBS is described so far.

Therefore, the aim of this thesis was the development of a novel, mass-spectrometric method for the simultaneous determination of the immunosuppressive drugs mentioned above, which enables patients to accomplish self-dependent blood collection integrates of an automated sample preparation system. For this purpose, a filter-cartridge device was used, which was developed in cooperation with the company Spark Holland. The optimized method has a total run time of 9 minutes and consists of a solid phase extraction (SPE) as well as a chromatographic separation step (HPLC) followed by mass-spectrometric detection (MS/MS). A sample volume of only 10 µl was needed. This newly described method was successfully applied for quantitation of immunosuppressive drugs in real patient whole blood samples. The calculated concentrations correlated well with the respective concentrations determined with an established, conventional SPE-HPLC-MS/MS method.

Furthermore, the practicability of the optimized method could be proven for plasma samples containing the antifungal drug anidulafungin.

Keywords: Therapeutic Drug Monitoring, Immunosuppressants, Dried Blood Samples, Self-dependent Sample Collection, SPE-HPLC-MS/MS

Danksagung

Es gibt eine Reihe von Menschen, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können und denen ich hier danken möchte.

Zunächst einmal möchte ich mich bei dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Seifert und seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. Resch bedanken, dass sie diese Arbeit an ihrem Institut ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Volkhard Kaefer, dessen Tür immer für mich offen stand und der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit nach eigenen Vorstellungen zu entwickeln.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich bei Prof. Heiner Wolfes bedanken.

Des Weiteren danke ich der Firma Spark, Holland für die gute Kooperation, in der diese Arbeit entstanden ist, und für die Überlassung und Wartung des Gerätesystems.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, die mir in den vergangenen drei Jahren mit Rat und Tat zur Seite standen.

Großer Dank gilt auch meinem Freund Robin, der besonders in der letzten Phase dieser Arbeit viel Verständnis und Geduld aufgebracht hat.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich ganz besonders für die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir durch mein ganzes Leben hindurch gewährt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	1
2. Einleitung	3
2.1 Immunsuppressiva	3
2.2 Therapeutische Arzneimittelüberwachung (TDM)	6
2.2.1 Allgemeines	6
2.2.2 TDM der Immunsuppressiva	7
2.3 Alternative Probenahmekonzepte	11
2.3.1 Quantifizierung von Pharmaka aus getrockneten Blutproben	11
2.3.1.1 Anidulafungin als Modellsubstanz in Plasma	12
2.3.2 Alternative Probenahme – Konzept der Fa. Spark Holland	14
2.4 Chromatographie	17
2.4.1 Festphasenextraktion (SPE)	17
2.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	18
2.5 Matrixeffekte in der Massenspektrometrie	19
3. Material und Methoden	22
3.1 Allgemeine Chemikalien und Materialien	22
3.2 Verwendete Gerätesysteme	23
3.3 Gewinnung biologischer Matrices	25
3.4 Analytenlösungen und Eichreihen	25
3.4.1 Stammlösungen der Analyten	25
3.4.2 Analytenlösungen	25
3.4.3 Lösungen des internen Standards (IS-Lösung)	26
3.4.4 Eichreihen und Kontrollproben	26
3.4.4.1 Anidulafungin-Eichreihe und Kontrollproben	26
3.4.4.2 Immunsuppressiva-Eichreihe und Kontrollproben	27
3.5 Probenvorbereitung.....	29
3.5.1 Vorbereitung der Filterkartuschen.....	29
3.5.2 Probenauftrag mittels Pipette.....	29
3.5.3 Präparation der Kapillarpipetten mit internem Standard.....	29
3.5.4 Probenauftrag mittels Kapillarpipetten.....	29
3.6 MS/MS-Analytik.....	30
3.6.1 Aufnahme von Q1-Spektren.....	30
3.6.2 Optimierung der Massenübergänge – SRM-Optimierung.....	30

Inhaltsverzeichnis

3.7 Untersuchung des Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten der Analyten.....	31
3.7.1 Fließinjektionsanalyse - FIA	31
3.7.2 Optimierung der Salz- und Säurekonzentration im HPLC-Eluenten.....	31
3.8 Methodenentwicklung.....	32
3.8.1 Quellen- und MS/MS-Parameter in der Methodenentwicklung.....	32
3.8.2 Auswahl des Filtermaterials.....	32
3.8.3 Optimierung des Probentransfers von dem Filtermaterial auf die SPE- Kartusche.....	33
3.8.4 Minimierung von Verschleppungseffekten.....	34
3.8.5 Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule.....	35
3.8.5.1 Elution von der analytischen Säule ohne Fokussierschritt.....	35
3.8.5.2 Optimierung der Elution von der analytischen Säule durch einen Fokussierschritt.....	37
3.8.6 Untersuchung von Matrixeffekten.....	37
3.8.6.1 Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung der chromatographischen Trennung.....	37
3.8.6.1 Untersuchung von Matrixeffekten unter Berücksichtigung der chromatographischen Trennung.....	38
3.9 Anwendung der optimierten Methode.....	40
3.9.1 Einfluss der Trocknungszeit auf die Signalintensitäten.....	40
3.9.2. Analyse von Patientenproben.....	40
3.10 Etablierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Immunsuppressiva und Anidulafungin	41
3.10.1 Probenvorbereitung.....	41
3.10.2 Verwendete Gerätesysteme und MS/MS-Parameter.....	41
4. Ergebnisse	43
4.1 Untersuchung des Ionisierungs- und Fragmentierungsverhaltens.....	43
4.1.1 Q1-Spektren der Analyten.....	43
4.1.2 Identifizierung der Analyten – SRM-Optimierung.....	43
4.1.3 Untersuchungen geeigneter Additive im HPLC-Eluenten.....	45
4.2 Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien.....	47
4.3. Optimierung des Analyttransfers von dem Filtermaterial auf die SPE- Kartusche..	49
4.3.1 Einfluss der Eluentzusammensetzung, des Transfervolumens und der Flussrate auf die Extraktionseffizienz.....	49

Inhaltsverzeichnis

4.3.2 Einfluss der Eluentzusammensetzung, des Transfervolumens und der Flussrate auf Matrixeffekte.....	53
4.3.3 Verringerung von Matrixeffekten – Waschen der SPE-Kartusche.....	55
4.4 Untersuchung von Verschleppungseffekten.....	56
4.5 Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule.....	60
4.6 Die optimierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode.....	63
4.7 Einfluss der Trocknungszeit auf die MS-Signalintensitäten.....	66
4.8. Untersuchung von Matrixeffekten mittels <i>Post-Column</i> -Experimenten.....	69
4.9 Analyse von Eichreihen mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode.....	70
4.9.1 Analyse von Standardeichreihen.....	70
4.9.2 Vergleich von Standard- und Matrixeichreihen.....	72
4.10 Probenauftrag mittels Kapillarpipetten.....	75
4.10.1 Untersuchungen zur Präparation der Kapillarpipetten.....	75
4.10.2 Messung von mittels Kapillarpipette aufgetragenen Eichreihen	77
4.11 Analyse von Patientenproben.....	78
4.11.1 Anidulafungin.....	78
4.11.2 Immunsuppressiva.....	79
4.12 Weitere Optimierungsschritte.....	82
4.12.1 Waschen der SPE-Kartusche mit Isopropanol.....	83
4.12.2 Untersuchung verschiedener SPE-Phasen.....	83
5. Diskussion	86
5.1 Methodenentwicklung.....	87
5.1.1 Untersuchungen zum Fragmentierungs- und Ionisierungsverhalten der Analyten	87
5.1.1.1 Q1-Spektren und SRM-Optimierung von 13c2d4RAD, d12CSA und Anidulafungin.....	87
5.1.1.2 Einfluss der Salz- und Säurekonzentrationen im HPLC-Eluenten auf die Ionisierung der Analyten.....	88
5.1.2 Extraktion – Analyttransfer von der Filterkartusche auf die SPE-Kartusche.....	89
5.1.3 Untersuchung von Verschleppungseffekten.....	91
5.1.4 Optimierung der Peakform.....	91
5.1.5 <i>Post-Column</i> -Infusionsexperimente – Untersuchung von Matrixeffekten.....	91
5.2 Stabilität der Analyten auf dem Filtermaterial.....	94

Inhaltsverzeichnis

5.3. Die optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methoden.....	95
5.3.1 Anidulafungin – Bestimmung von Patientenproben.....	95
5.3.2 Immunsuppressiva.....	96
5.3.2.1 Wahl der internen Standards.....	96
5.3.2.2 Bestimmung von Patientenproben.....	97
6. Schlussfolgerung	99
7. Literaturverzeichnis	100
8. Anhang	108

Abkürzungsverzeichnis

ACE:	Automatischer Kartuschenwechsler (<i>automatic cartridge exchange</i>)
ACN:	Acetonitril
amu:	atomare Masseneinheit (<i>atomic mass unit</i>)
c:	<i>counts</i>
CE:	Kollisionsenergie (<i>collision energy</i>)
CEP:	<i>collision entrance energy</i>
cps:	<i>counts per second</i>
CS	<i>Column Saver</i>
CSA:	Cyclosporin A
CSD:	Cyclosporin D
CXP:	<i>collision exit energy</i>
DBS	<i>dried blood spots</i>
DP:	<i>declustering potential</i>
EP	Eingangspotential (<i>entrance potential</i>)
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
EtOH:	Ethanol
FIA:	Fließinjektionsanalyse (<i>flow injection analysis</i>)
FP:	<i>focussing potential</i>
Hac:	Essigsäure
HPD:	<i>high pressure dispenser</i>
HPLC:	Hochdruckflüssigchromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
I	Intensität
IL	Interleukin
IS	<i>Ion-Spray-Voltage</i>
IS:	interner Standard
i.v.	intervenös
Isopr:	Isopropanol
l:	Liter
LC:	Flüssig-Chromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MeOH:	Methanol
mg:	Milligramm
min:	Minute(n)
MS/MS:	Tandem-Massenspektrometer

Abkürzungsverzeichnis

MS:	Massenspektrometer
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NEB	<i>Nebulizer Gas</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
NH ₄ Oac:	Ammoniumacetat
PW	Peakbreite auf halber Höhe
Q1:	erster Quadrupol des Massenspektrometers
R ²	Korrelationsfaktor
RAD:	Everolimus
RP:	Umkehrphasen-Chromatographie (<i>reversed phase chromatography</i>)
RT:	Raumtemperatur
SG	<i>Security Guard</i>
SIM:	<i>selected ion monitoring</i>
SPE:	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
SRL:	Sirolimus
SRM:	<i>single reaction monitoring</i>
TDM:	therapeutische Arzneimittelüberwachung (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
TIC:	Totalionenchromatogramm (<i>total ion chromatogram</i>)
t _R :	Retentionszeit
TRL:	Tacrolimus
u.a.:	unter anderem
XIC:	ausgewähltes Ionen Chromatogramm (<i>extracted ion chromatogram</i>)
z.B.:	zum Beispiel

1 Zielsetzung

Organtransplantationen sind heute zu etablierten Therapieverfahren geworden, um bei Erkrankungen wie chronischer Niereninsuffizienz, Endzustand von Kardiomyopathien, zystischer Fibrose der Lunge oder im Falle von Leberzirrhose dem Patienten ein langjähriges Überleben zu sichern. Diese Entwicklung ist vor allem einer verbesserten Immunsuppression zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen zu verdanken. Zu den wichtigsten Immunsuppressiva zählen u.a. die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus sowie die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus.

Aufgrund des CYP3A4-Metabolismus' und der engen therapeutischen Breite dieser Pharmaka ist eine lebenslange Arzneimittelüberwachung (TDM) nötig. In der Praxis werden für das TDM der Immunsuppressiva sowohl Immunoassays als auch Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie eingesetzt, wobei in der Regel die Wirkstoffspiegel im Blut direkt vor der Gabe der nächsten Dosis (C0-Spiegel) bestimmt werden. Das Untersuchungsintervall beträgt in der stabilen postoperativen Phase etwa drei Monate, ist jedoch abhängig von dem gesundheitlichen Zustand des Patienten. Auch Änderungen in der Begleitmedikation oder Dosisanpassungen machen zusätzliche Spiegelbestimmungen notwendig. Jede Routineuntersuchung ist dabei mit zwei Arztbesuchen verbunden, da während des ersten Besuchs nur die Blutabnahme durchgeführt wird und erst bei dem zweiten Arztbesuch die Laborergebnisse der Spiegelbestimmung besprochen werden können. Dies hat für den Patienten einen erheblichen Zeitaufwand zur Folge. Besonders stellt dies für schulpflichtige Kinder ein Problem dar, da diese, bedingt durch die Arztbesuche, häufig nicht am Unterricht teilnehmen können.

Die Bestimmung von Immunsuppressiva aus getrockneten Blutproben (DBS) ist ein möglicher Ansatz, die Probengewinnung zu optimieren. Hierbei wird auf einem Filterpapier getrocknetes Kapillarblut (z.B. aus der Fingerbeere) verwendet, welches vom Patienten selbstständig zu Hause abgenommen und an das zuständige Labor verschickt werden kann, so dass zum Arzttermin die Laborergebnisse bereits vorliegen. Ein korrekter Probenauftrag (z.B. ausreichendes Probenvolumen) durch den Patienten ist dabei maßgeblich für die exakte Spiegelbestimmung und stellt damit eine beträchtliche Fehlerquelle in der Spiegelbestimmung dar.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung einer robusten SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur routinemäßigen Bestimmung von Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus) im Rahmen des TDM aus getrockneter Matrix, auf die eine eventuell fehlerhafte Probenahme durch den Patienten einen nur geringen Einfluss hat. Ferner soll eine aufwändige manuelle Probenvorbereitung, wie das Ausstanzen der Probe oder die

Zielsetzung

Extraktion der Analyten von dem Filterpapier, durch eine automatisierte Extraktion ersetzt werden. Dafür wird in Zusammenarbeit mit der Firma Spark Holland ein Kartuschensystem entwickelt. Auf eine spezielle Filterkartusche kann dabei mit einer Kapillarpipette ein definiertes Probenvolumen aufgetragen, getrocknet und anschließend an das Labor verschickt werden. Ein interner Standard wird gemeinsam mit der Probe appliziert und erlaubt so eine vom Probenvolumen unabhängige Auswertung.

Die Methodenoptimierung soll hinsichtlich der eingesetzten Säulen- und Eluentensysteme aufbauend auf der in der Routinediagnostik (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) verwendeten SPE-HPLC-MS/MS-Methode durchgeführt werden.

Im Fokus der Methodenentwicklung stehen zunächst die Extraktion der Analyten von dem Filtermaterial sowie der automatisierte Transfer auf die SPE-Kartusche. Weitere Schritte wie die chromatographische Trennung, sowie Verschleppungs- und Matrixeffekte sollen zusätzlich optimiert werden.

Da in diesem Kartuschensystem nur eine geringe Probenmenge (5 – 10 µl) benötigt wird, könnten Untersuchungen in Kleintiermodellen einen weiteren Einsatzbereich dieses Systems darstellen. Die Möglichkeit, Substanzen auch in Plasma zu quantifizieren, soll mit der Modellsubstanz Anidulafungin, einem neuartigen Antimykotikum, untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Immunsuppressiva

Immunsuppressiva werden in der postoperativen Behandlung organtransplantierte Patienten eingesetzt, um Abstoßungsreaktionen des Körpers gegen das Transplantat zu unterdrücken. Häufig verordnete Pharmaka dieser Gruppe sind Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus. Ihre Molekülstruktur ist in Abbildung 2-1 gezeigt. Cyclosporin A ist ein monozyklisches, unpolares und sehr lipophiles Polypeptid, bestehend aus 11 Aminosäuren^[3]. Synthetisiert wird es von dem Pilz *Hypocladium inflatum*^[4,5].

Tacrolimus ist ein hydrophobes, makrozyklisches Lacton mit einem hemiketal-maskierten α , β -Diketoamid in einem 23-gliedrigen Ring^[4,6], welches aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isoliert werden kann. Sirolimus und Everolimus sind strukturell mit Tacrolimus verwandt. Beides sind 31-gliedrige Makrolactone, die sich voneinander nur durch einen polaren 2-Hydroxyethyl-Substituenten an Position 40 des Sirolimusmoleküls^[7,8,9] unterscheiden.

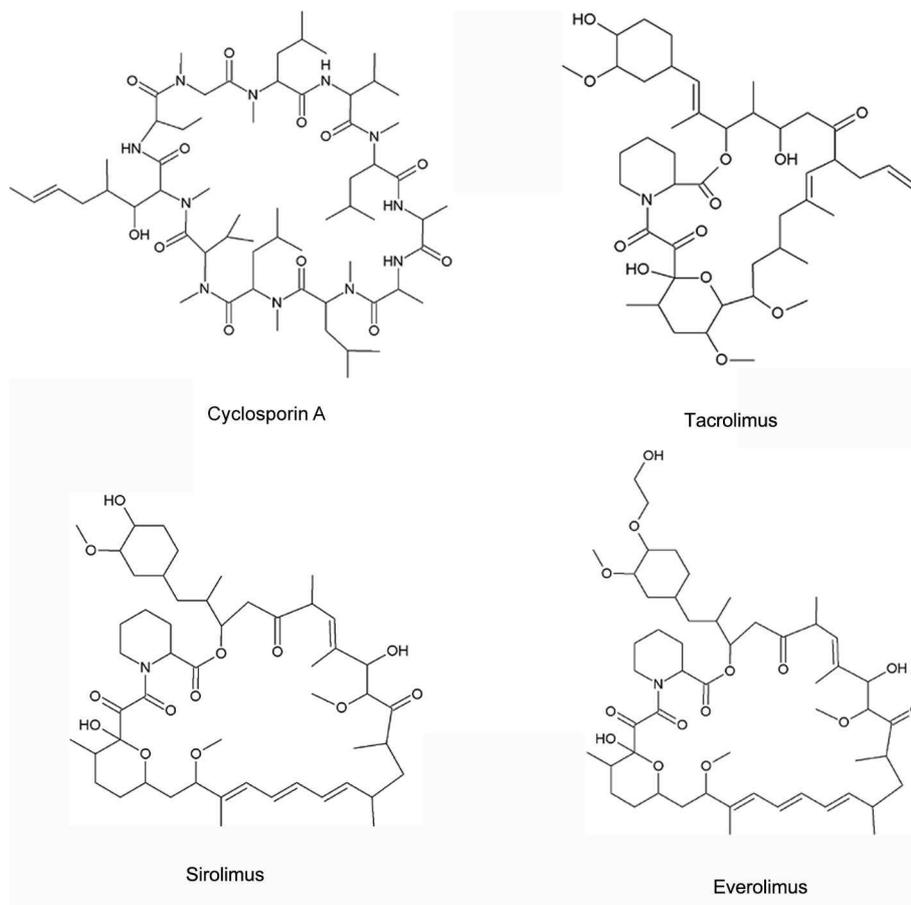


Abbildung 2-1: Strukturformeln der Immunsuppressiva Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus^[63,72,73,74]

Einleitung

Die Immunsuppressiva lassen sich anhand ihres Wirkmechanismus in zwei Gruppen einteilen: die Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A und Tacrolimus) sowie die mTOR-Inhibitoren (Sirolimus und Everolimus).

Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A wird seit den frühen 80er Jahren in der Therapie organtransplantierter Patienten unter dem Handelsnamen Sandimmun[®] eingesetzt^[11,10,12, 4,13]. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin A nach Aufnahme in die T-Lymphozyten mit hoher Affinität an ein zelleigenes, zytosolisches Protein aus der Gruppe der Immunophiline, das Cyclophilin, bindet^[5]. Dieser Cyclosporin A/Cyclophilin-Komplex lagert sich wiederum an die calcium- und calmodulinabhängige Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin an und hemmt deren Phosphataseaktivität^[10,13,14]. Calcineurin wird als ein Schlüsselenzym in T-Lymphozyten angesehen^[15,10]. Es spaltet in T-Zellen zwei Phosphatgruppen vom nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) ab^[5], so dass dieser in der Lage ist, die Kernmembran zu passieren und die Transkription von IL-2, dem Wachstumsfaktor für T-Zellen, zu aktivieren. Durch Hemmung der Phosphataseaktivität von Calcineurin wird dieser Signalweg unterbrochen, es findet keine IL-2-Synthese statt und die Proliferation der Lymphozyten wird unterbunden^[4,10,14].

Trotz fehlender Strukturähnlichkeiten gehört Tacrolimus (früher FK 506; Handelsname: Prograf[®]) wie Cyclosporin A zu den Calcineurin-Inhibitoren, wobei es eine 100-fach höhere Potenz als dieses aufweist^[13,51]. Es bindet an das Immunophilin FK-Bindungsprotein-12 (FKBP-12, Makrophilin). Dieser Komplex hemmt ebenso wie der Cyclosporin A/Cyclophilin-Komplex die Aktivität des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes, was schließlich in einer Unterdrückung der IL-2-Synthese resultiert. Daneben besteht die immunsupprimierende Wirkung von Tacrolimus in einer Hemmung der B-Lymphozyten-Aktivierung durch Blockade der TNF- α -Gentranskription^[4,10,16,13,51].

Strukturell mit Tacrolimus verwandt sind die mTOR-Inhibitoren Sirolimus (Rapamycin; Rapamune[®]) und Everolimus (RAD, Certican[®])^[17,18,9,19,8,7]. Ebenso wie Tacrolimus binden Sirolimus und Everolimus an das FKBP-12^[20,21,22]. Allerdings lagert sich der dabei ausgebildete Komplex nicht an ein Immunophilin an und wirkt daher nicht als Calcineurin-Inhibitor^[22], so dass die Synthese von IL-2 nicht beeinflusst wird. Stattdessen hemmt Sirolimus eine zytosolische Serin-/Threonin-Kinase (mTOR – *mammalian target of rapamycin*). Diese Kinase phosphoryliert die Serin/Threonin-Kinase p70-S6 und ermöglicht so die Translation von Zyklinen, die eine wichtige Rolle in der Steuerung der Zellproliferation spielen. Durch Hemmung von mTor wird nun eine interleukinvermittelte Aktivierung der p70-S6-Kinase unterbunden. Es erfolgt keine Proliferation der T-Zelle, die stattdessen in der G1-Phase arretiert^[21,23,24].

Einleitung

Aufgrund der synergistischen Eigenschaften von Cyclosporin A bzw. Tacrolimus und Sirolimus bzw. Everolimus wird in der Therapie häufig eine Kombination dieser Präparate eingesetzt.

Die orale Bioverfügbarkeit der Immunsuppressiva ist großen inter- und intraindividuellen Schwankungen unterlegen^[4,10,25,6]. Für Cyclosporin A und Tacrolimus liegt sie zwischen 4 % und 89 %^[4,10]. Die Eliminationshalbwertszeit beider Pharmaka beträgt im Mittel 12 Stunden^[6,4]. Für Sirolimus und Everolimus wurden vergleichbare Bioverfügbarkeiten nach oraler Gabe von im Mittel 15 %^[4,26] bzw. 16 %^[9] bestimmt. Allerdings liegt die Eliminationshalbwertszeit von Everolimus mit 18 - 35 Stunden deutlich unter der des Sirolimus (62 Stunden), was eine zweimalige Gabe pro Tag von Everolimus erfordert^[7,9,27].

Die Metabolisierung der Immunsuppressiva Cyclosporin A, Sirolimus, Tacrolimus und Everolimus erfolgt hauptsächlich über das hepatische CYP3A4-System in zahlreiche Metabolite^[16,4,28,51,17,26,29,18,30,31,86]. Ferner sind sie Substrate für das Transportprotein P-Glycoprotein (P-gp). Sowohl CYP3A4 als auch P-gp sind vornehmlich in der Leber und in den Enterozyten des Dünndarms lokalisiert^[32,19,28,33] und interagieren dort auf unterschiedliche Weise. Zum einen transportiert P-gp Pharmaka aus den Enterozyten hinaus und wieder hinein, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, von CYP3A4 metabolisiert zu werden. Zum anderen hält P-gp die intrazelluläre Konzentration der Pharmaka in den Enterozyten im Kapazitätsbereich von CYP3A4^[19] und steigert so dessen Umsatzeffizienz. Es ist bekannt, dass andere Medikamente oder Nahrungsmittel dieses Stoffwechselsystem sowohl aktivieren als auch inhibieren können, was zu schwankenden Wirkstoffspiegeln führt. Antimykotika wie Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol, die bei organtransplantierten Patienten häufig zur Prophylaxe oder Therapie invasiver Pilzinfektionen eingesetzt werden, hemmen CYP3A4 und haben daher erhöhte Wirkstoffspiegel der Immunsuppressiva zur Folge^[34-41]. Auch die Einnahme von Johanniskrautextrakten zur Behandlung leichter Depressionen beeinflusst die Bioverfügbarkeit der Immunsuppressiva. Hypericin, ein Bestandteil dieser Extrakte, ist ein Induktor von CYP3A4 und verringert somit den Wirkstoffspiegel dieser Pharmaka^[42,43]. Auch die gleichzeitige Gabe von Sirolimus bzw. Everolimus und Cyclosporin A kann zu veränderten Wirkstoffspiegeln dieser Pharmaka führen^[9], weshalb Sirolimus (bzw. Everolimus) um vier Stunden zeitversetzt zur Cyclosporin A-Gabe verabreicht wird.

Neben seiner immunsupprimierenden Wirkung sind von Cyclosporin A zahlreiche unerwünschte Wirkungen bekannt. In der Literatur werden dosisabhängige Nephro-, Neuro-, Hepato-, und Kardiotoxizität sowie Tremor, Hirsutismus, Gingivahyperplasie und Ödeme beschrieben^[5,4]. Dabei kommt der Nephrotoxizität die größte Bedeutung zu^[3,12,44,45]. Aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus gleichen die unerwünschten Wirkungen von Tacrolimus

Einleitung

denen des Cyclosporins A, sind jedoch weniger stark ausgeprägt. Gingivahyperplasie und Hirsutismus wurden beim Tacrolimus nicht beobachtet^[4].

Für Sirolimus und Everolimus werden als wichtigste unerwünschte Wirkungen Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, Anämie, Thrombozytopenie, Lymphocele und Wundheilungsstörungen angegeben^[17,24,46].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle hier aufgeführten Immunsuppressiva eine äußerst variable Bioverfügbarkeit aufweisen, was hauptsächlich auf ihre Metabolisierung über das CYP3A4-System zurückzuführen ist. Da die Immunsuppressiva zudem einen relativ engen therapeutischen Bereich haben, ist eine routinemäßige Kontrolle der Blutspiegel dieser Medikamente nötig, für Sirolimus sogar gesetzlich vorgeschrieben^[16,52,47]. Die angestrebten C0-Spiegel, d. h. der Spiegel direkt vor der nächsten Pharmakongabe, der Immunsuppressiva sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Tabelle 2-1: C0-Zielspiegel der Immunsuppressiva (in Vollblut)^[125-128]

	Cyclosporin A	Tacrolimus	Sirolimus	Everolimus
C0-Zielspiegel [ng/ml]	100 – 400	5 – 12	4 – 12	3 – 8

2.2 Therapeutische Arzneimittelüberwachung (TDM)

2.2.1 Allgemeines

Mit der therapeutischen Arzneimittelüberwachung (*therapeutic drug monitoring* - TDM) bezeichnet man die therapiebegleitende Spiegelbestimmung von Medikamenten z. B. in Blut, Plasma oder Serum. Es ist ein wichtiger Bestandteil in der langfristigen Behandlung mit Pharmaka, die ein enges therapeutisches Fenster haben, deren Bioverfügbarkeit großen inter- und/oder intraindividuellen Schwankungen unterliegt oder die Interaktionen mit anderen Medikamenten oder auch Nahrungsmitteln aufzeigen. Durch die Spiegelbestimmung wird eine individuelle Dosisanpassung an bestimmte Zielspiegel ermöglicht, so dass die Therapie optimiert und gleichzeitig das Risiko von unerwünschten Wirkungen minimiert werden kann. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist eine eindeutige Korrelation zwischen dem ermittelten Wirkstoffspiegel und den pharmakologischen bzw. toxischen Effekten. Weite Verbreitung hat das TDM in der Routineanalytik der Immunsuppressiva, antiretroviraler Pharmaka sowie der Antidepressiva gefunden.

Generell erfordert das TDM eine schnelle, einfache und automatisierte Analysemethode, die zudem robust und ausreichend sensitiv ist. Zu diesem Zweck werden häufig Immunoassays eingesetzt. Da diese jedoch den Nachteil haben, dass die verwendeten Antikörper mit den

Analytmetaboliten kreuzreagieren können^[16,51-54], finden immer häufiger chromatographische Methoden wie die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) Verwendung^[1,2].

2.2.2 TDM der Immunsuppressiva

Eine regelmäßige Konzentrationsbestimmung der Immunsuppressiva im Blut ist aus den oben beschriebenen Gründen eine wichtige therapiebegleitende Maßnahme in der postoperativen Phase organtransplantierte Patienten. Da die Immunsuppressiva hauptsächlich in den Erythrozyten vorliegen^[9,26,16,10,53], erfolgt die Spiegelbestimmung dieser Pharmaka in venösem Vollblut, dem EDTA als Antikoagulans zugesetzt wird^[28].

Generell wird bei den Immunsuppressiva der Talspiegel (C0-Spiegel) bestimmt, d. h. die Blutabnahme wird direkt vor der Gabe der nächsten Dosis durchgeführt. Beim Sirolimus, Everolimus und Tacrolimus korreliert dieser Wert gut mit dem pharmakologischen Effekt^[47,16,29,9]. Beim Cyclosporin A konnte eine solche Beziehung bisher nicht nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, dass stattdessen der C2-Wert, d. h. der Wert zwei Stunden nach der letzten Dosis, gut mit der Rate der akuten Transplantatabstoßungen korreliert. Allerdings ist die Abnahme des C2-Wertes schwierig, da bereits Abweichungen von wenigen Minuten zu verfälschten Ergebnissen führen können. In der Praxis wird deshalb auch für Cyclosporin A meist der C0-Spiegel für das TDM herangezogen^[48-50,16].

Den Labors stehen für das TDM der Immunsuppressiva im Wesentlichen zwei verschiedene Messmethoden zur Verfügung. Die Immunoassays^[52-56] auf der einen Seite werden kommerziell hergestellt und sind in hohem Maße automatisiert. Auf der anderen Seite steht die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), die mit einem UV-Detektor oder einem Massenspektrometer^[28] als Detektor gekoppelt wird. Beide Messmethoden haben Vor- und Nachteile, die gegeneinander abzuwägen sind. Immunoassays sind einfach und schnell in der Durchführung. Da sie kommerziell hergestellt werden, obliegt die Qualitätssicherung dem Hersteller. Durch die kommerzielle Herstellung werden jedoch auch die Art des Tests sowie das Spektrum der möglichen Analyten durch den Hersteller vorgegeben. Ein entscheidender Nachteil der Immunoassays ist die Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper mit den Metaboliten und anderen ähnlichen Verbindungen^[16,28]. Cyclosporin-A-Assays zeigen beispielsweise Kreuzreaktivitäten mit einigen Metaboliten dieses Pharmakons^[52-54], was zu einer Überschätzung des Cyclosporinspiegels führt. Gleiches gilt für die Bestimmung von Tacrolimus^[51]. Auch der Immunoassay für Sirolimus bzw. Everolimus zeigt aufgrund der großen Strukturähnlichkeit der beiden Pharmaka Kreuzreaktivitäten mit dem jeweils anderen Pharmakon. Dieses kann vor allem bei der Umstellung von dem einen auf das andere Medikament problematisch werden^[16,83].

Einleitung

Die LC-MS/MS stellt die zeitaufwändigere der beiden Messmethoden dar. Da die Analysemethoden im Allgemeinen im Labor selbst entwickelt werden, ist die Qualität der Messung abhängig vom durchführenden Labor^[57,16]. Auch ist die Erstanschaffung der Geräte teuer^[28]. Ein entscheidender Vorteil der LC-MS/MS ist die hohe Spezifität der Analyse^[57]. Durch chromatographische Trennung der Analyten von deren Metaboliten werden Interferenzen bei der Detektion weitgehend vermieden^[53,54,28]. Zudem können durch geeignete Analysemethoden mehrere Analyten simultan bestimmt und dadurch die Kosten pro Analyse gesenkt werden^[69,31]. Aus diesen Gründen stellt die HPLC-MS/MS eine wichtige Alternative zu den Immunoassays dar.

LC-MS/MS ist bereits seit dem Jahr 1996 als Methode für TDM von Immunsuppressiva erprobt worden^[58,59]. Die Methoden zur Detektion der Einzelsubstanzen^[58-71] sind ebenso beschrieben worden wie die simultane Bestimmung mehrere Immunsuppressiva^[72-84].

Die publizierten Methoden zeigen dabei wenige Unterschiede. Die Methoden bestehen im Wesentlichen aus vier Schritten: der Proteinfällung, der Probenaufreinigung, einer chromatographischen Trennung und schließlich der Detektion.

In dem ersten Schritt, der Proteinfällung, werden 100 – 1000 µl mit EDTA versetztes venöses Vollblut mit einem Fällungsreagenz behandelt. Als Fällungsreagenz finden Methanol, Acetonitril sowie Gemische aus beiden Verwendung. Auch der Zusatz von Zinksulfat wird beschrieben^[58,72-74,63,64,78,79]. Die mit Fällungsreagenz versetzte Probe wird gemischt und anschließend zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung des Überstandes wird mittels Festphasenextraktion (SPE – *solid phase extraction*) realisiert. Die Aufreinigung kann dabei manuell (*offline*) oder automatisiert (*online*) erfolgen. Dabei werden hauptsächlich C8- bzw. C18-SPE-Säulen eingesetzt. Aber auch die Aufreinigung über Kopolymere (Oasis HLB[®]) oder auch über Perfusionen-Säulen (POROS)^[78,81] wird beschrieben. Die chromatographische Trennung erfolgt isokratisch auf einer C8- oder C18-Phase^[58-84] durch Umkehrphasenchromatographie (*reversed phase* – RP). Als Eluent wird 80-97% Methanol eingesetzt. Häufig verwendete Additive sind Natriumformiat^[67,74], Ammoniumformiat^[67,74,83] oder -acetat^[58,59,65,76,79,81], sowie Ameisen^[67,74]- oder Essigsäure^[60,81]. Die Ionisierung der Analyten erfolgt ausnahmslos im positiven Modus, wobei abhängig von der Wahl der Additive Natrium- bzw. Ammoniumaddukte der Analyten gebildet werden. Ältere Publikationen beschreiben die Detektion im SIM-Modus (*selected ion monitoring*), in dem die Analytionen ohne weitere Fragmentierung detektiert werden^[67,69,72,73,74,78]. Mittlerweile hat sich jedoch die Verwendung von Tandem-Massenspektrometern etabliert, so dass die Analyse im SRM-Modus (*single reaction monitoring*) durchgeführt werden kann. In diesem Modus wird zunächst das Vorläuferion des Analyten selektiert, fragmentiert und anschließend das dabei entstehende analytspezifische Fragmention detektiert, wodurch sich

Einleitung

die Selektivität der Messung gegenüber dem SIM-Modus deutlich verbessert^[58,59,64,75,77,79,81,83]. Das hat auch zur Folge, dass Matrixbestandteile gleicher (Vorläuferionen-)Masse von den Analytmassen unterschieden werden können, so dass chromatographische Überlagerungen beider Substanzen nur einen geringeren Einfluss auf das Messergebnis haben. Aus diesem Grund konnten in der Tandem-Massenspektrometrie Probenvorbereitungszeiten sowie die Dauer der Chromatographie deutlich verkürzt werden. Die Verwendung eines internen Standards ist ein wichtiger Bestandteil in der Quantifizierung von Substanzen. Der interne Standard soll mögliche systematische sowie statistische Unregelmäßigkeiten in der Probenvorbereitung und der Messung ausgleichen. Er wird dem Extraktionsreagenz zugesetzt und durchläuft gemeinsam mit den Analyten das gesamte Analyseverfahren. Verbindungen, die als interne Standards in der Quantifizierung der Immunsuppressiva verwendet werden, sind u. a.: 28-O-Acetylsirolimus, 32-Demethoxysirolimus, Cyclosporin D und Ascomycin, die eine ähnliche Struktur wie die Analyten haben (s. Abbildung 2-2)^[58,59,71,70,63]. Daneben wird die Verwendung von isotope markierten Analoga der Analyten (d3-Sirolimus, d12CSA) als interne Standards beschrieben^[71,76,77]. Diese haben den Vorteil, dass sie das gleiche Elutions- und Ionisierungsverhalten wie die jeweiligen Analyten aufweisen, wodurch sich der Einfluss von Matrixeffekten auf das Analyseergebnis minimiert. Die in dieser Arbeit verwendeten internen Standards sind Ascomycin und Cyclosporin D sowie die isotope markierten Analoga des Cyclosporin A (d12CSA) und des Everolimus (13c2d4RAD).

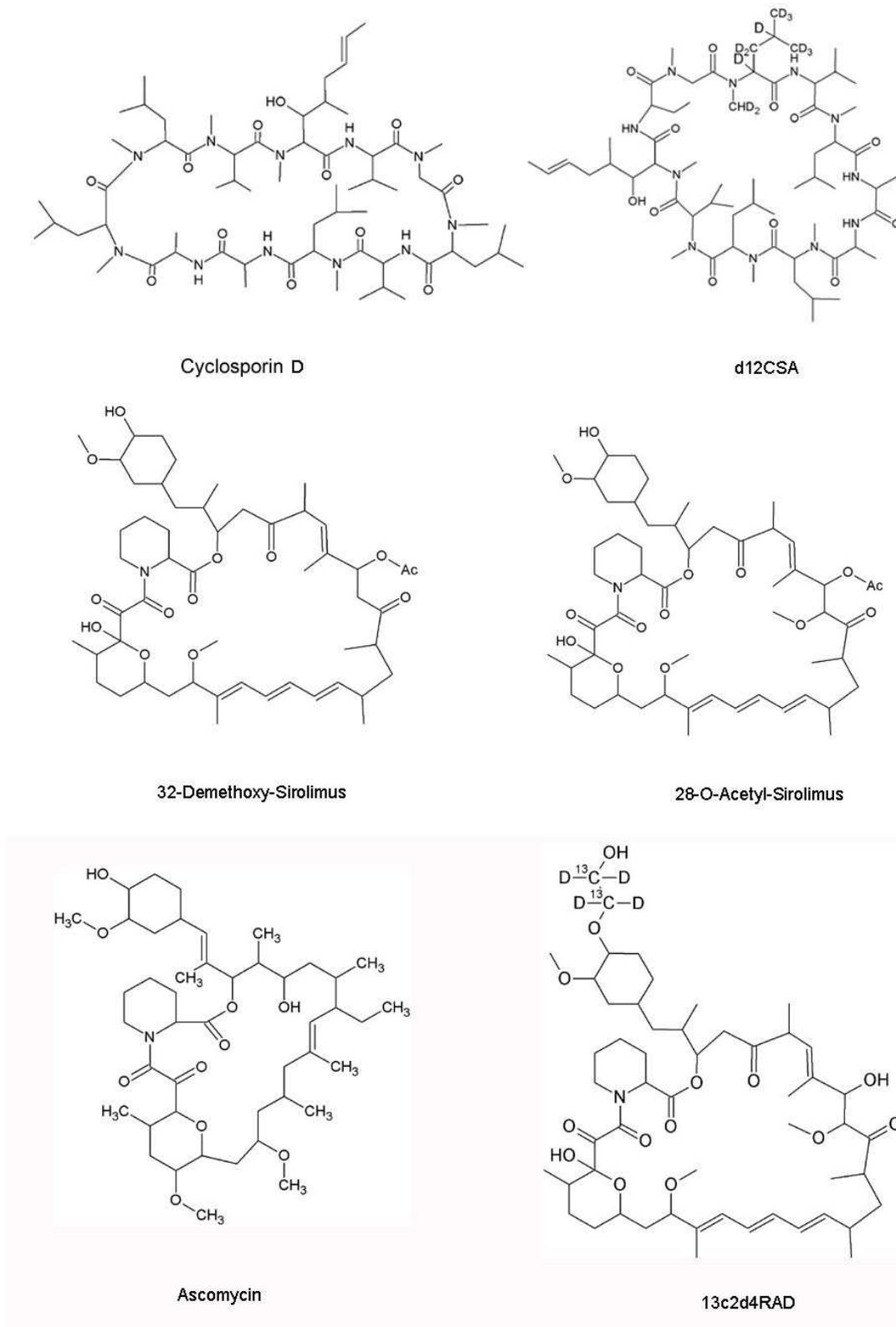


Abbildung 2-2: Strukturformeln der für die Quantifizierung von Immunsuppressiva verwendeten internen Standards – Cyclosporin D, Ascomycin, 32-Demethoxysirolimus, 28-O-Acetylsirolimus^[58,63,74] sowie die isopenmarkierten Analoga d12CSA und 13c2d4RAD^[129,130]

2.3 Alternative Probenahmekonzepte

2.3.1 Quantifizierung von Pharmaka aus getrockneten Blutproben

Die Probenahme in Form von getrockneten Blutproben (*dried blood spots* - DBS) ist ein übliches Verfahren beim Neugeborenenenscreening^[122-124]. Auch im Rahmen des TDM wurden Anwendungen für verschiedene Pharmaka, wie antiretrovirale Pharmaka^[85-88], Antiepileptika^[89] sowie Antituberkulotika^[90] beschrieben.

Bei der Quantifizierung von Pharmaka aus getrockneten Blutproben wird ein Blutstropfen auf eine Filterkarte aufgetragen und auf dieser vollständig getrocknet. Die Filterkarte kann anschließend zur Analyse in einem handelsüblichen Briefumschlag in ein Labor verschickt werden. Im Labor wird für die Analyse eine definierte Fläche aus dem Blutspot ausgestanzt. Die Analyten werden von der Filterkarte mit einem den internen Standard enthaltenen Extraktionsreagenz extrahiert und nach weiterer Aufarbeitung quantifiziert. Die DBS-Methode erfordert ein geringeres Probenvolumen, was prinzipiell die Verwendung von Kapillarblut anstelle von venösem Blut ermöglicht^[85-90].

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen für den Patienten vor allem in der Möglichkeit, die Blutabnahme selbstständig zu Hause durchführen zu können, so dass die Testresultate bei der nächsten Routineuntersuchung dem Arzt bereits vorliegen. Durch die selbstständige Blutabnahme wird zudem die aufwändige Aufnahme von Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) deutlich erleichtert. Des Weiteren wird von den meisten Patienten die Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere oder auch aus dem Ohrläppchen im Vergleich zur venösen Blutabnahme als weniger unangenehm empfunden^[90-92].

Die Bestimmung von Immunsuppressiva aus DBS ist derzeit nur in wenigen Publikationen beschrieben^[92-95,103]. Eine wichtige Voraussetzung für diese Methode ist eine gute Korrelation zwischen den Messergebnissen aus Kapillarblut und venösem Blut. Dieses konnte für Cyclosporin A und Tacrolimus bereits gezeigt werden^[96-102].

Lampe et al. veröffentlichten bereits 1987 eine Methode, die es erlaubte, Cyclosporinkonzentrationen aus getrockneten Kapillarblutproben mittels eines Radioimmunoassays zu bestimmen^[95]. Die erste HPLC-MS/MS-Applikation zur Quantifizierung von Cyclosporin A in getrockneten Blutproben, mit der sich zufriedenstellende Eichreihen (Korrelationsfaktor $R^2 = 0,9957$) erhalten ließ, wurde 2001 von Cooper et al. veröffentlicht^[103]. In einer weiteren Veröffentlichung wurde die Bestimmung von Tacrolimus aus DBS mit anschließender massenspektrometrischer Analyse beschrieben^[92], wobei die Blutabnahme zum einen durch eine Arzthelferin zum anderen von den Patienten selbstständig durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass für beide Fälle vergleichbare Tacrolimusspiegel bestimmt werden konnten^[104]. Ebenso spiegelte die Bestimmung einer AUC_{0-12} die gute Korrelation zwischen venösem und Kapillarblut wider^[105].

Einleitung

Eine validierte Methode zur Quantifizierung von Everolimus aus DBS wurde 2008 publiziert^[93]. Die Behandlung des Filterpapiers mit einer Lösung aus Plasmaprotein, Ammoniumacetat und Ameisensäure erwies sich dabei als vorteilhaft, um unerwünschte Adsorptionseffekte des Analyten an dem Filterpapier zu vermeiden.

Die linearen Bereiche in den veröffentlichten Methoden liegen für Cyclosporin A zwischen 0 und 1500 ng/ml^[103] bzw. 25 und 1440 ng/ml^[94], für Tacrolimus zwischen 1 – 30 ng/ml^[92] und für Everolimus zwischen 2 – 30 ng/ml^[93]. Damit überstreichen sie die vorgegebenen Zielspiegel dieser Pharmaka (vgl. Tabelle 2-1).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine Spiegelbestimmung von Immunsuppressiva aus getrockneter Matrix prinzipiell möglich ist. Ein Nachteil der DBS-Methode ist jedoch, dass bei diesem Verfahren das Probenvolumen für die Analyse durch die Größe der im Labor ausgestanzten Fläche definiert wird. Daher ist es für eine fehlerfreie Bestimmung von Pharmaka aus DBS entscheidend, dass der Patient das Blut korrekt auf die Filterkarte aufträgt. Nur wenn der Blutstropfen einen homogenen und symmetrischen Punkt auf beiden Seiten der Filterkarte bildet, können reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden. Der korrekte Probenauftrag kann in der Praxis für den Patienten jedoch problematisch sein, was verfälschte Spiegelbestimmungen zur Folge hat^[104].

Zudem besteht derzeit keine Methode zur Bestimmung von Sirolimus bzw. zur simultanen Bestimmung der vier Immunsuppressiva aus getrockneten Blutproben. Da in der Therapie aber häufig Kombinationen z. B. von Sirolimus oder Everolimus mit Tacrolimus oder Cyclosporin A zum Einsatz kommen, ist es für das TDM sinnvoll, alle Substanzen aus einer Probe bestimmen zu können.

Ein großer Vorteil bei der Verwendung von getrockneten Blutproben, ist die geringe Probenmenge, die dafür benötigt wird. Diese Methode ist daher auch geeignet, pharmakokinetische Studien in Kleintiermodellen durchzuführen.

2.3.1.1 Anidulafungin als Modellsubstanz in Plasma

Anidulafungin ist ein neues Antimykotikum aus der Klasse der Echinocandine. Es ist indiziert bei Infektionen sowohl mit *Candida spp.* als auch *Aspergillus spp.*, wobei es sich auch gegen solche Stämme wirksam gezeigt hat, die resistent gegen Azole (z.B. Fluconazol) und Polyene (wie Amphotericin) sind^[106,107,108].

Der Wirkmechanismus von Anidulafungin basiert auf einer Hemmung der (1,3)- β -D-glucan-synthase. Da (1,3)- β -D-Glucan ein essentieller Zellwandbestandteil von Pilzen ist, bewirkt eine Hemmung dieses Enzyms einen Stabilitätsverlust der Zellwand, was schließlich zum Zelltod führt^[109].

Einleitung

Anidulafungin ist ein wasserunlösliches, semisynthetisches Derivat des Echinocandin-Kerns. Seine Struktur ist in Abbildung 2-3 gezeigt^[107,110,111,112,141]. Sein relatives Molekulargewicht beträgt 1140.24 Da. Aufgrund seiner geringen Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe wird Anidulafungin parenteral verabreicht^[109].

Pharmakokinetische Studien in Tiermodellen ebenso wie in klinischen Studien deuten darauf hin, dass Anidulafungin eine vorhersagbare dosisabhängige Plasmakonzentration aufweist^[110,113,114]. Des Weiteren scheint es keinen Einfluss auf die Metabolisierung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A zu haben. Für pharmakokinetische Studien wurden sowohl HPLC-UV als auch HPLC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Anidulafungin verwendet. Da Anidulafungin auf einer C18-RP-Säule ein ähnliches Retentionsverhalten wie die Immunsuppressiva zeigt^[unveröffentlichte Daten], diente es in dieser Arbeit als Modellsubstanz für die Quantifizierung von Pharmaka in Plasma.

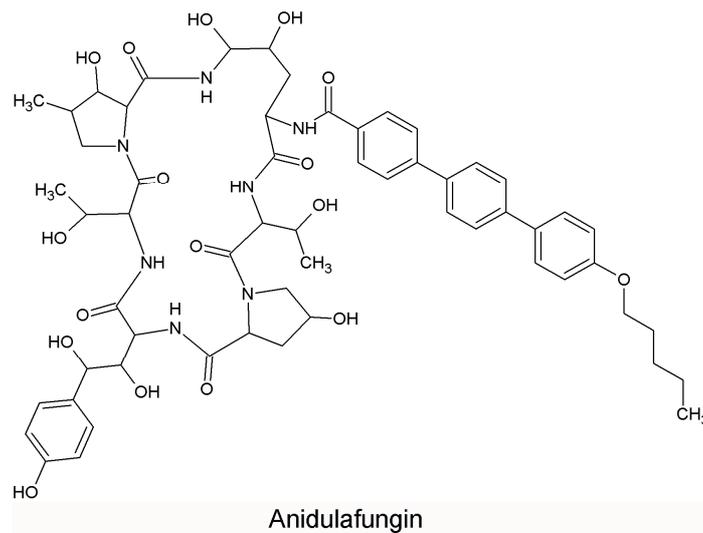


Abbildung 2-3: Strukturformel von Anidulafungin^[113]

2.3.2 Alternative Probenahme - Konzept der Fa. Spark Holland

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit der Firma Spark Holland ein Konzept entwickelt, das mögliche Fehlerquellen bei der Probenahme und der Herstellung von getrockneten Blut- bzw. Plasmaproben minimieren soll. Abbildung 2-4 zeigt den schematischen Aufbau dieses Systems, dessen wesentliche Bestandteile eine mit einem Filtermaterial gefüllte Kartusche sowie eine Kapillarpipette sind.

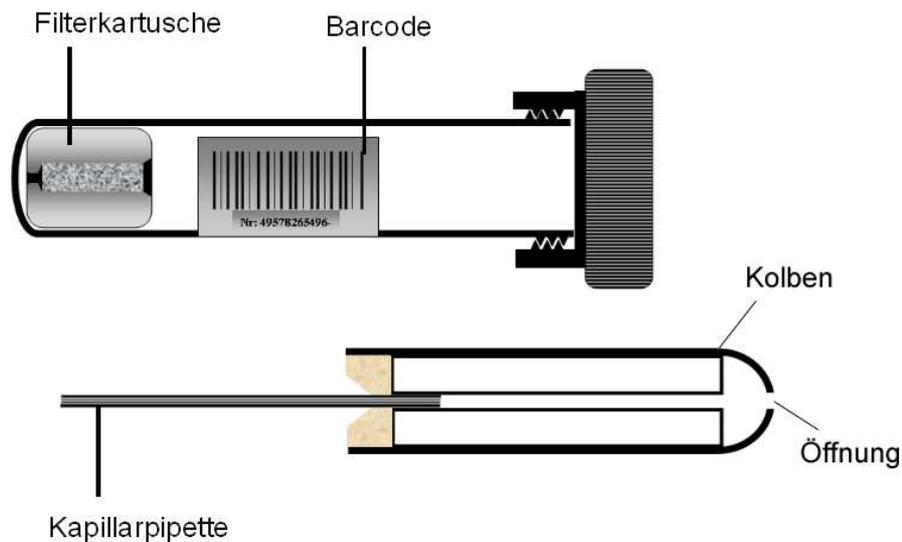


Abbildung 2-4: Aufbau des Probenahmesystems konzipiert in Zusammenarbeit mit der Firma Spark Holland (modifizierte Abbildung der Fa. Spark Holland)

Wie beim DBS kann auch hier die Blutabnahme von dem Patienten selbst durchgeführt werden. Die Probenahme erfolgt in mehreren Schritten (Abbildung 2-5). Zunächst wird durch perkutanes Einstechen in die Fingerbeere oder in das Ohrläppchen mit einer Lanzette ein Blutstropfen gewonnen. Dieser wird von der Kapillare aufgenommen. Anschließend wird das Blut durch Abdecken der Öffnung an der Rückseite des Kolbens auf die Filterkartusche übertragen. Nach Verschließen des Röhrchens kann das komplette System an ein Labor verschickt werden, in dem die Analyse der Blutprobe durchgeführt wird. Ein auf Röhrchen und Filterkartusche aufgebrachter Barcode soll die Erfassung der Patientendaten im Labor vereinfachen und Verwechslungen mit anderen Patientenproben ausschließen.

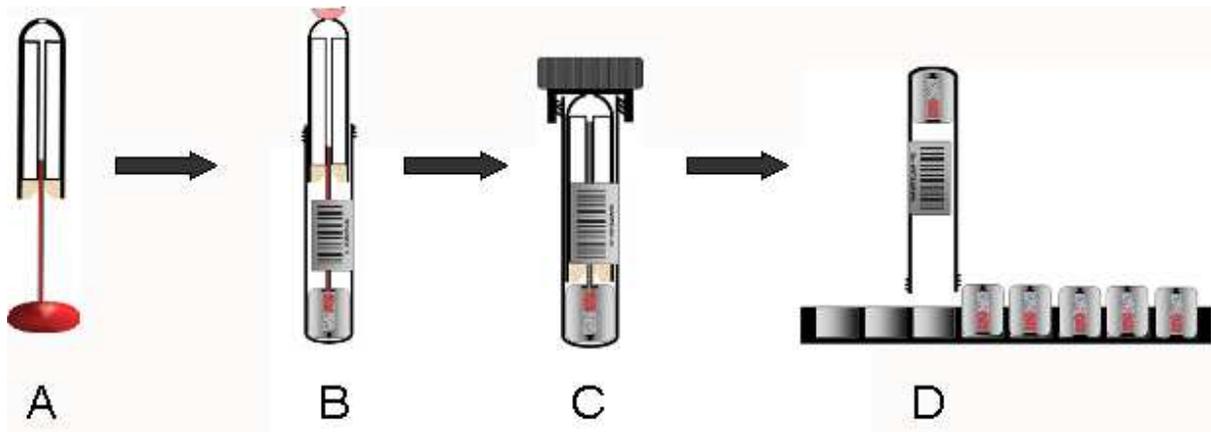


Abbildung 2-5: Schematischer Ablauf der Probengewinnung: (A) das Kapillarblut wird in die Kapillarpipette aufgezogen (B) das Blut wird durch Verschließen der oberen Öffnung und vorsichtiges Herunterdrücken des Kolbens auf die Filterkartusche übertragen (C) das komplette System wird mit einem Deckel verschlossen und in ein Labor verschickt (D) im Labor wird der Barcode eingelese, darauf folgt die Analyse der Probe (modifizierte Abbildung der Fa. Spark Holland)

Das Konzept sieht weiterhin vor, dass der Analyttransfer von der Filterkartusche auf eine SPE-Kartusche *online* erfolgt, so dass keine weiteren manuellen Arbeitsschritte im Labor nötig sind. Dafür stand in dieser Arbeit ein von der Firma Spark Holland vertriebenes Prospekt-2-System zur Verfügung. Das System beinhaltet unter anderem ein Modul, den sog. Kartuschenwechsler (*automated cartridge exchange* – ACE). Filter- und SPE-Kartusche können über diesen sowohl in das Gesamtsystem integriert werden als auch automatisch – nach Beendigung der Analyse – ausgetauscht werden, was eine vollautomatisierte Probenaufreinigung ermöglicht (Abbildung 2-6).

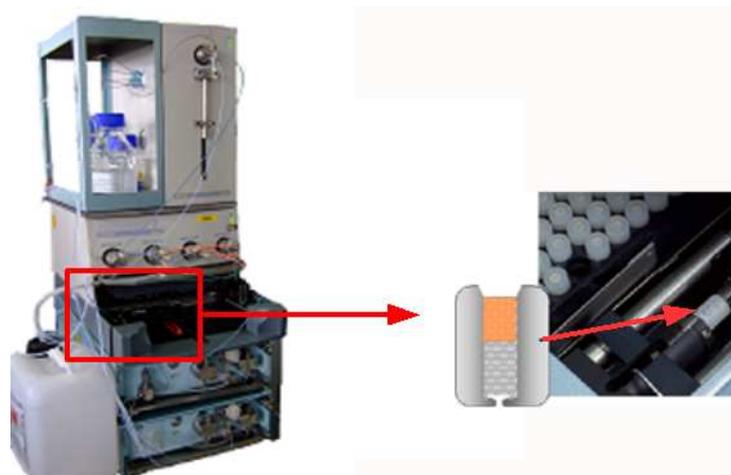


Abbildung 2-6: Darstellung des Prospekt-2-Systems (Fa.:Spark Holland); vergrößert dargestellt ist die Klammer, mit der die Filterkartusche in das Gesamtsystem integriert wird (modifizierte Abbildung der Fa. Spark Holland)

Einleitung

Mit dem ACE ist es zusätzlich möglich, die Analyten direkt von der Filterkartusche auf eine SPE-Kartusche zu transferieren. Die chromatographische Trennung findet dann auf einer HPLC-Säule statt. Abbildung 2-7 veranschaulicht den allgemeinen Versuchsablauf.

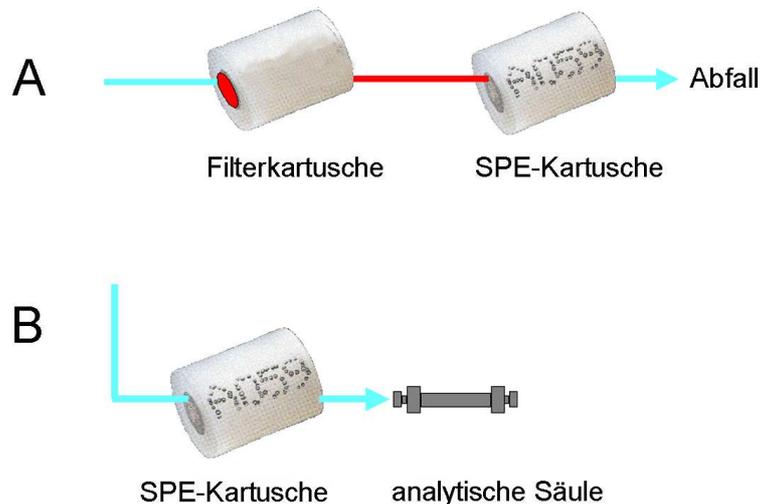


Abbildung 2-7: Schematischer Ablauf der Analyse: (A) die Analyten werden von der Filterkartusche auf die SPE-Kartusche übertragen und auf dieser angereichert (B) Elution der Analyten von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule, auf der die Auftrennung der Analyten erfolgt (modifizierte Abbildung der Fa. Spark Holland)

Ein wesentlicher Unterschied zur herkömmlichen DBS-Methode ist, dass das gesamte Probenvolumen für die Analyse verwendet wird, so dass eine homogene Verteilung der Analyten auf dem Filtermaterial keine Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse darstellt.

Zur Überprüfung des aufgebrauchten Probenvolumens ist die Innenwand der Kapillare mit einem internen Standard ausgekleidet, der sich beim Aufziehen der Blutprobe in dieser löst. Dabei ist die Endkonzentration des Standards in der Probe proportional zur Füllhöhe des Blutes in der Kapillare. Damit gibt er zum einen Aufschluss über das vom Patienten eingesandte Probenvolumen, zum anderen wird so eine korrekte Konzentrationsbestimmung der Immunsuppressiva auch bei nicht vollständig gefüllter Kapillare ermöglicht.

2.4 Chromatographie

2.4.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction* – SPE) ist eine Methode zur Aufreinigung von Proben mittels einer festen, stationären Phase. Hierbei werden die zu extrahierenden Komponenten auf Adsorbentien angereichert und anschließend mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Abhängig von der Beschaffenheit der stationären Phase sowie von der Zusammensetzung des Lösungsmittels ist so eine Abtrennung von Matrixbestandteilen aufgrund unterschiedlicher Polaritäten möglich. In den meisten Fällen besteht das Adsorbens aus einem chemisch modifizierten Kieselgel. C18-, Phenyl-, NH₂- bzw. Aminopropylgruppen finden in der SPE Verwendung. Die Durchführung der SPE ist sowohl automatisch (*online*) als auch manuell (*offline*) möglich. Während bei der *offline*-SPE die Probenaufreinigung in einem von der chromatographischen Analyse getrennten Schritt erfolgt, wird bei der *online*-SPE das SPE-Eluat nach der Aufreinigung über eine geeignete Ventilschaltung direkt in das HPLC-MS/MS-System überführt. Da sich die Analyten auf der SPE-Säule in der Regel im vorderen Teil anreichern, wird die Elution häufig im sog. *Backflush*-Modus, d. h. entgegen der Auftragsrichtung, durchgeführt. Der Hauptvorteil der *online*-SPE liegt in verkürzten Probenvorbereitungszeiten. Des Weiteren kann mit deutlich geringeren Probenvolumina gearbeitet werden, da das gesamte SPE-Eluat, und nicht nur ein geringes Aliquot, wie bei der *offline*-SPE, auf die analytische Säule überführt wird. Problematisch bei beiden SPE-Verfahren ist das Auftreten von sog. Verschleppungseffekten (*carry over*). Unter Verschleppungseffekten versteht man das Vorkommen von falsch positiven Messergebnissen nach mehrmaligem Verwenden derselben SPE-Säule bzw. Apparatur. Sie können dadurch entstehen, dass sich Analyten während einer Messung an die Innenoberflächen z. B. von Kapillaren anlagern und erst mit der darauffolgenden Messung mobilisiert werden und somit das Messergebnis verfälschen. Zur Vermeidung bzw. Minimierung von Verschleppungseffekten sind daher häufig mehrere Spülvorgänge der SPE-Säule sowie der Gesamtapparatur nötig^[131].

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Oasis[®] HLB (2 x 10 mm, 30 µm; Waters Corp., Milford, Massachusetts) als SPE-Phase verwendet. Ihr Material besteht aus einem Copolymer aus Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon, über das sowohl polare als auch unpolare sowie saure, basische und neutrale Analyten aufgetrennt werden können (Abbildung 2-8). Neben dem Oasis[®] HLB-Material wurden verschieden modifizierte Kieselgelphasen (C2 – C18) getestet.

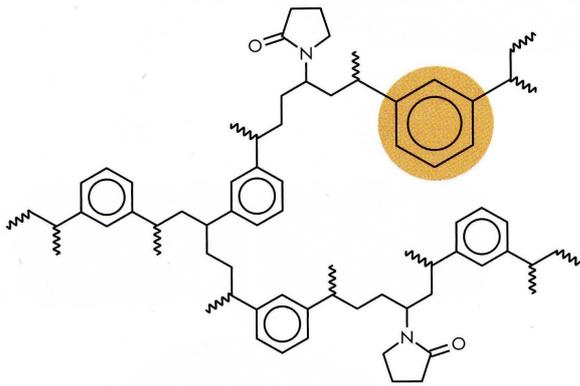


Abbildung 2-8: Trägermaterial der Oasis[®] HLB-SPE-Kartuschen; bestehend aus einem Copolymer aus Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon^[132]

2.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance/pressure liquid chromatography* – HPLC) ist eine Methode zur Trennung und, unter Verwendung eines geeigneten Detektors, zur Quantifizierung von Substanzen. Dabei werden die zu untersuchenden Substanzen in einer mobilen Phase, dem sog. Eluenten, über eine Trennsäule geleitet, die mit einer stationären Phase gepackt ist. Die Verweildauer der Analyten auf der Säule ist dabei abhängig von ihrer Affinität zur stationären Phase. Analyten, die schwach mit dem Trägermaterial wechselwirken, werden demnach schneller die Säule wieder verlassen als solche, die starke Wechselwirkungen eingehen. Abhängig von den Trennbedingungen ergeben sich so analytspezifische Retentionszeiten. Man unterscheidet zwischen Normalphasen- und Umkehrphasen-Chromatographie (*reversed phase chromatography* – RP). Während die Normalphasen-Säule polares Trägermaterial enthält, besteht eine RP-Säule aus einem unpolaren Material. Auf diesem führen hydrophobe Wechselwirkungen des Analyten in einem polaren Lösungsmittel zu einer Retention des Analyten. Die Elution erfolgt durch eine Erhöhung des Anteils eines organischen Lösungsmittels, dessen Moleküle mit den Analytmolekülen um die Bindungsplätze auf dem Trägermaterial konkurrieren.

Als Trägermaterial werden häufig Kieselgele verwendet, die mit Alkylresten unterschiedlicher Länge (C2 – C18) substituiert wurden, wobei der hydrophobe Charakter des Materials mit steigender Länge der Kohlenwasserstoffkette zunimmt^[149].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Nucleodur C18-Gravity (4,6 x 50 mm, 5 µm) zur Auftrennung der Analyten verwendet. Das Trägermaterial dieser Säule besteht aus einer unpolaren, monomeren Octadecylmodifikation in hoher Dichte (Abbildung 2-9). Durch den

Ersatz freier Silanolgruppen durch Trimethylsilylgruppen (*endcapping*) werden polare Wechselwirkungen mit dem Analyten weitgehend unterdrückt, wodurch sich diese Säule zur Auftrennung ionisierbarer und basischer Analyten, wie Immunsuppressiva und Anidulafungin, eignet.

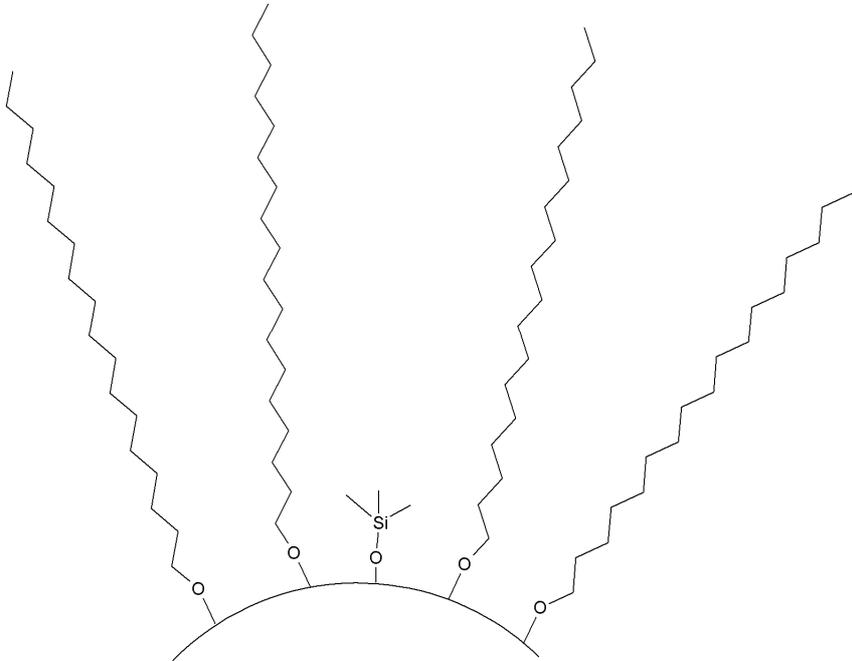


Abbildung 2-9: schematische Darstellung des Trägermaterial der verwendeten Nucleodur C18 Gravity

2.5 Matrixeffekte in der Massenspektrometrie

Ein wichtiges Problem in der Entwicklung einer HPLC-MS/MS-Methode ist das mögliche Auftreten von Matrixeffekten. Unter Matrixeffekten versteht man eine Verminderung oder auch Verstärkung des Analytsignals, hervorgerufen durch koeluiierende Matrixbestandteile^[2,117,120,121].

Untersuchungen zu diesem Thema haben gezeigt, dass Matrixeffekte ihre Ursache im Ionisierungsvorgang in der Quelle des Massenspektrometers haben^[120]. Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) wird die Probenlösung durch eine Kapillare in einer Kammer versprüht. Die Ionen der Analytlösung werden aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes zwischen Kapillare und Kammermantel getrennt. Es bilden sich geladene Tröpfchen, die sich unter Verdampfung des Lösungsmittels im elektrischen Feld in Richtung des Analysators bewegen. Ein Teil der geladenen Analyten tritt dabei in die Gasphase über und gelangt schließlich in den Analysator, wo er detektiert werden kann. Für den Übergang der Analytionen aus der flüssigen in die Gasphase gibt es im Wesentlichen zwei Theorien: Zum

Einleitung

einen wird postuliert, dass das Verdampfen des Lösungsmittels eine Zunahme der Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche bewirkt. Das führt schließlich zu einer sog. Coulomb-Explosion des Tröpfchens, so dass sich sukzessive kleinere Tröpfchen ausbilden, bis schließlich nur noch ein Analytmolekül vorliegt, das dann in die Gasphase übertritt^[116]. Dagegen schlagen Iribarne und Thompson einen Mechanismus vor, in dem Analytionen aus vergleichsweise großen Tröpfchen, die noch viele Analytionen enthalten, direkt in die Gasphase übergehen^[115,116,2].

In beiden Theorien ist jedoch der Übergang der Analytionen aus der flüssigen Phase in die Gasphase entscheidend für die Signalintensitäten. Je leichter Analytionen in die Gasphase eintreten können, desto höhere Intensitäten dieses Analyten können erreicht werden. Nicht flüchtige Substanzen aus der Matrix oder dem Eluenten könnten verhindern (bzw. begünstigen), dass Analytionen von der Flüssig- in die Gasphase übergehen und damit zu einer Signalverminderung (bzw. –erhöhung) führen^[120,2,153].

Matrixeffekte lassen sich durch den Vergleich der Signalintensitäten einer Standardprobe mit einer Matrixprobe, welcher erst nach der Aufarbeitung Analyten zugegeben wurde (*post extraction spike*), abschätzen. Eine weitere Möglichkeit ist die Durchführung eines sog. *Post-Column-Infusionsexperiments*. Hierfür wird eine analytfreie Leer- bzw. Matrixprobe analysiert, während über eine externe Spritzenpumpe kontinuierlich ein Analytstandard direkt in die Quelle des Massenspektrometers infundiert wird^[119]. Der prinzipielle Versuchsaufbau eines solchen Experiments ist in Abbildung 2-10 gezeigt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Matrixeffekte als eine Funktion der Retentionszeit der Analyten beurteilt werden können.

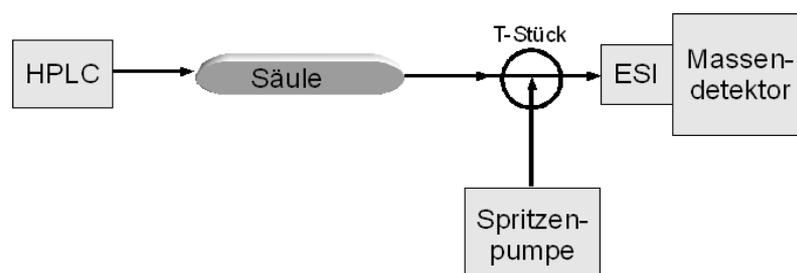


Abbildung 2-10: Aufbau eines *Post-Column-Infusionsexperiments*: Über ein T-Stück wird eine Analytstandardlösung kontinuierlich in die Quelle des Massenspektrometers (ESI) infundiert. Zeitgleich erfolgt über das HPLC-System die Auftrennung einer analytfreien Standard- bzw. Matrixprobe^[119].

Matrixeffekte sind sowohl analyt- als auch matrixabhängig und können zudem zwischen verschiedenen Proben der gleichen Matrix variieren, was die Präzision einer Methode stark beeinträchtigen kann. Da die Bestandteile aus der Matrix, die diese Effekte hervorrufen in

Einleitung

vielen Fällen selbst nicht ionisiert werden, können sie nicht vom Massenspektrometer detektiert werden, was die Identifikation und damit das gezielte Eliminieren solcher Komponenten aus der Probe erschwert.

Für den Umgang mit Matrixeffekten gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist, bereits durch geeignete Probenvorbereitung interferierende Substanzen aus der Matrix zu entfernen, wodurch zusätzlich die Lebensdauer der Säulenmaterialien erhöht wird. Eine andere Möglichkeit ist, diese Substanzen chromatographisch von den Analyten zu trennen, so dass keine Koelution und damit verbundene Beeinflussung der Ionisierung stattfindet. Ferner kann man den Einfluss von Matrixeffekten auf das Messergebnis durch die Wahl eines geeigneten internen Standards minimieren. Dies ist z. B. mit isotoopenmarkierten Analoga der Analyten möglich, da diese ein gleiches Elutions- und Ionisierungsverhalten aufweisen^[119], so dass sie von Matrixbestandteilen gleichermaßen beeinflusst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Chemikalien und Materialien

Wasser	J. T. Baker, HPLC-gradient grade, Deventer, Niederlande
Methanol	J. T. Baker, HPLC-gradient grade, Deventer, Niederlande
Acetonitril	J. T. Baker, HPLC-gradient grade, Deventer, Niederlande
Isopropanol	J. T. Baker, HPLC-gradient grade, Deventer, Niederlande
Ethanol	J. T. Baker, HPLC-gradient grade, Deventer, Niederlande
Essigsäure	Riedel de Haën, Hannover-Seelze, Deutschland
Ammoniumacetat	Fluka, puriss p.a. for mass spectroscopy, Buchs, Schweiz
Zinksulfat (TitriFix®, 0.1 M)	KMF Laborchemie, Lohmar, Deutschland
Tacrolimus	Alexis Cooperation, Farmingdale, New York, USA
Sirolimus	Wyeth Pharma, Madison, New York, USA
Everolimus	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Cyclosporin A	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Ecalta® (Anidulafungin)	Pfizer, New York, NY, USA
Ascomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Cyclosporin D	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
13c2d4RAD	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
d12CSA	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Kapillaren (PEEK; 0,13 mm und 0,25 mm Durchmesser)	YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland
Fittings	YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland
Gewindeflaschen, braun (Glas 1,5 ml)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Verschlusskappen für Gewindeflaschen mit Septum (teflonbeschichtet)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Mikroeinsätze für Gewindeflaschen (Glas; 6 x 30 mm)	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Nucleodur C18 Gravity (50 x 4,6 mm; 5 µ)	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Oasis® HLB (10 x 2 mm; 30 µm)	Waters, Milford, Massachusetts, USA

<i>Method development Kit</i> (SPE-Phasen) (C2SE, C8ECSE, C18HD)	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Filterkartuschen (10 mm); Prototyp	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Filtermaterial 1: R-25449 (100 mm x 2,60 mm; 0,15 g/cm ³) Prototyp	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Filtermaterial 2: R-27784 (100 mm x 2,5 mm; 0,2 g/cm ³) Prototyp	Spark Holland, Emmen, Niederlande
<i>Security Guard Holder</i>	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
<i>Security Guard</i> (C18- Inline Filter; 4 x 2 mm, 4 µm)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
<i>Column Saver</i> (0,45 µm)	YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland

3.2 Verwendete Gerätesysteme

Das für die Methodenentwicklung verwendete SPE-HPLC-MS/MS-Gerätesystem besteht aus einem Prospekt-2-System (Spark Holland, Emmen, Niederlande), einem Säulenofen (Perkin-Elmer, Series 200 *Column Oven*) und einem Tandem-Massenspektrometer mit einer Turbo Ion Spray-Quelle (API 3000TM, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Kanada).

Das Prospekt-2-System ist aus drei Komponenten aufgebaut: einem automatischen Kartuschenwechsler (ACE dual – *automatic cartridge exchange*), einem Hochdruckdispenser (*high pressure dispenser* - HPD MIX) und einem binären Pumpensystem.

Der schematische Aufbau des Ventilsystems des Kartuschenwechslers in Abbildung 3-1 gezeigt.

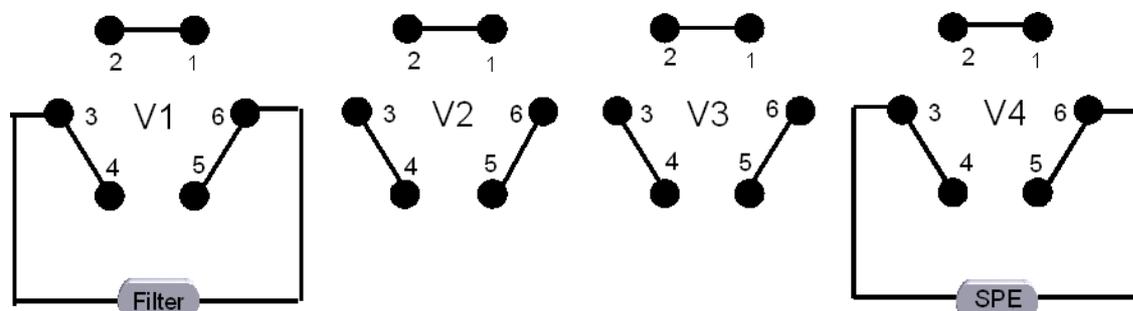


Abbildung 3-1: schematischer Aufbau der Ventile des Kartuschenwechslers (ACE); gezeigt sind die vier Ventile (V1 - V4) sowie die Haltevorrichtungen (Klemmen) für die Filterkartusche (V1) und der SPE-Kartusche (V4)

Material und Methoden

Der Kartuschenwechsler besteht aus zwei Klemmen, in denen die Filterkartuschen sowie die SPE-Kartuschen mittels eines Greifarms in das System eingebracht werden können. Die Klemmen selbst sind jeweils über ein Ventil (V1 bzw. V4) in das Gesamtsystem integriert. Die zwei möglichen Ventilstellungen der 6-Wege-Ventile sind in Abbildung 3-2 gezeigt.

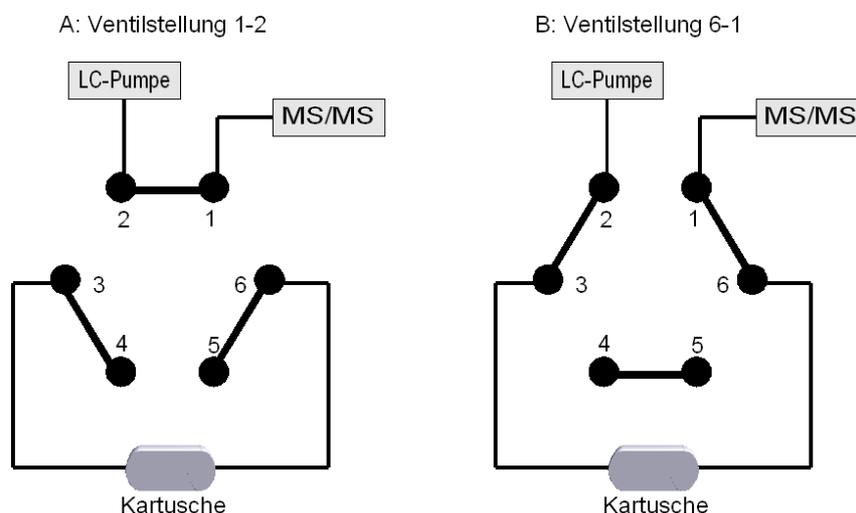


Abbildung 3-2: mögliche Ventilstellungen der 6-Wege-Ventile des ACE; (A) Ventilstellung 1-2: der von der LC-Pumpe kommende Eluent wird direkt in das Massenspektrometer (MS/MS) geleitet; (B) Ventilstellung 6-1, der Eluent passiert zunächst die Kartusche und wird anschließend in das MS/MS geleitet

Eluenten können sowohl über das binäre Pumpensystem als auch über den HPD in das System eingebracht werden.

Da das verwendete HPLC-System über keinen eigenen Probengeber (*autosampler*) verfügt, wurde für Fließinjektionsanalysen ein *autosampler* (Perkin-Elmer Series 200 *autosampler*) mit einer 100 µl Probenschleife sowie einem binären Pumpensystem mit zwei getrennt ansteuerbaren Pumpenköpfen A und B (Perkin-Elmer Series 200 Micro Pump) der Firma Perkin-Elmer (Juegesheim, Deutschland) verwendet.

3.3 Gewinnung biologischer Matrices

Blut

Venöses Vollblut von gesunden Spendern wurde nach deren Einwilligung in EDTA-Monovetten (EDTA KE 7,5 ml; Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland) abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in sterilen Zentrifugengefäßen (15 ml, steril, PP; Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA) bei -20°C gelagert.

Plasma

Venöses Vollblut von gesunden Spendern wurde in EDTA-Monovetten (EDTA KE 7,5 ml; Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland) abgenommen und nach 20-minütigen Abkühlen bei Raumtemperatur bei 3000 rpm für 20 min zentrifugiert (Sigma 3K18, Steinheim, Deutschland). Der Überstand (Plasma) wurde mit einer Pipette abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in sterilen Zentrifugengefäßen (15 ml, steril, PP; Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA) bei -20°C gelagert.

3.4 Analytenlösungen und Eichreihen

3.4.1 Stammlösungen der Analyten

Zur Herstellung von Analytengemischen, Eichreihen, Kontrollproben sowie Lösungen zur Bestimmung der Massenübergänge wurden Stammlösungen der jeweiligen Analyten angesetzt. Von den Reinsubstanzen Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Cyclosporin A, Cyclosporin D, 13c2d4RAD und d12CSA wurden Stammlösungen in Methanol mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml angesetzt.

Anidulafungin (Ecalta[®]) wurde in 40/60 Ethanol/H₂O [v/v] gelöst. Die Endkonzentration betrug 2,4 mg/ml.

Alle Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.2 Analytenlösungen

Zur Methodenentwicklung wurden Analytengemische in Blut, Plasma und Standardlösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) aus den oben genannten Stammlösungen hergestellt. Die Endkonzentration der Analyten betrug 1 µg/ml.

Für die Durchführung von *Post-Column*-Infusionsexperimenten wurden Analytengemische in der mobilen Phase (97/3 MeOH/H₂O [v/v]; 1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac) aus den Stammlösungen hergestellt, so dass die Endkonzentration jeweils 1 µg/ml betrug.

3.4.3 Lösungen des internen Standards (IS-Lösung)

Lösungen internen Standards wurden zur Auswertung von Eichreihen sowie von Patientenproben benötigt. Dafür wurden folgende Lösungen aus den in 3.4.1 beschriebenen Stammlösungen hergestellt.

Für die Auswertung von Anidulafungin (Eichreihe, Kontroll- und Patientenproben) wurden 30 ng/ml Ascomycin in 50/50 MeOH/H₂O [v/v] verwendet.

Die IS-Lösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) für die Auswertung der Immunsuppressiva-Eichreihen enthielt Ascomycin (10 ng/ml), 13c2d4RAD (10 ng/ml), d12CSA (50 ng/ml) und CSD (100 ng/ml).

Zur Präparation der Kapillarpipetten mit internem Standard wurden IS-Gemische sowohl in ACN als auch in MeOH getestet. Die Konzentrationen der internen Standards betragen dabei: Ascomycin (10 ng/ml), 13c2d4RAD (10 ng/ml), d12CSA (50 ng/ml) und CSD (100 ng/ml).

Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten IS-Lösungen.

Tabelle 3-1: Konzentrationen der internen Standards in den verschiedenen Versuchsansätzen

	Matrix	Ascomycin	13c2d4RAD	d12CSA	CSA
Auswertung von Anidulafungin Eichreihen und Patientenproben	50/50 MeOH/H ₂ O [v/v]	30 ng/ml	-	-	-
Auswertung von Immunsuppressiva- Eichreihen	50/50 MeOH/H ₂ O [v/v]	10 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml
Präparation von Kapillarpipetten zur Analyse von Patientenproben (Immunsuppressiva)	ACN bzw. MeOH	10 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml

3.4.4 Eichreihen und Kontrollproben

3.4.4.1 Anidulafungin-Eichreihe und Kontrollproben

Eichreihe

Für die Quantifizierung von Anidulafungin wurde ein Kalibrierbereich von 41-10000 ng/ml bestehend aus sechs Punkten gewählt.

Zunächst wurde eine Verdünnung der Anidulafungin-Stammlösung hergestellt (403 µl Leerplasma + 97 µl Anidulafungin-Stammlösung), so dass eine Endkonzentration von 500 µg/ml Anidulafungin vorlag. Aus dieser Verdünnung wurden wie in Abbildung 3-3 gezeigt die Eichreihe hergestellt, wobei nach jedem Verdünnungsschritt durch 10minütiges Schütteln eine homogene Verteilung des Analyten in der Matrix gewährleistet wurde.

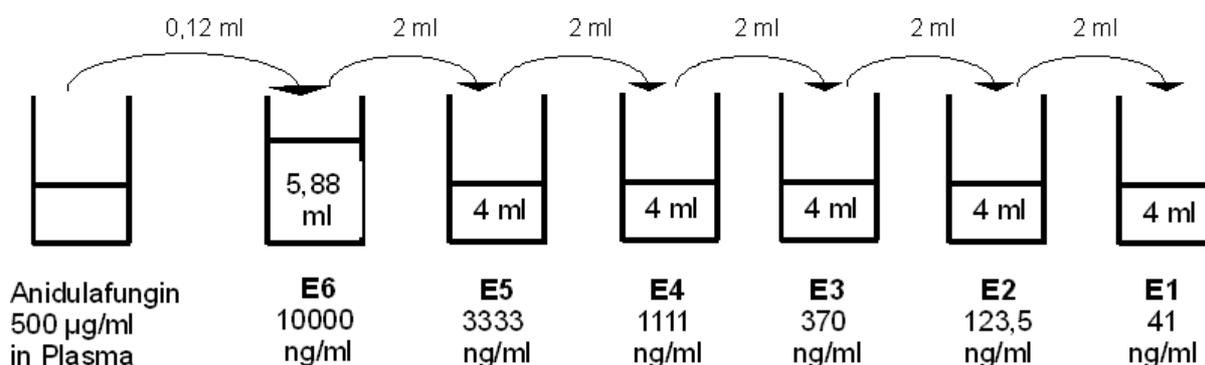


Abbildung 3-3: Pipettierschema zur Herstellung der Anidulafungin-Eichreihe in Plasma; E = Eichreihenpunkt

In gleicher Weise wurde eine Anidulafungin-Eichreihe in Standardlösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) hergestellt. Auf das 10-minütige Schütteln der Probe wurde hier verzichtet.

Kontrollproben

Neben der Eichreihe wurden Kontrollproben in Plasma hergestellt. Dafür wurden 96 µl der Anidulafunginverdünnung (500 µg/ml) in Plasma mit 5904 µl Leerplasma verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 8000 ng/ml vorlag. Diese stellte die Kontrolle höchster Konzentration (*high*) dar. Kontrollen mittlerer (*medium*) und niedriger (*low*) Konzentration wurden durch 1:4- bzw. 1:100-Verdünnungen von Kontrolle high hergestellt (Endkonzentrationen 2000 bzw. 80 ng/ml). Durch 10-minütiges Schütteln wurde eine homogene Analytenverteilung im Plasma erreicht.

Eichreihenpunkte und Kontrollproben wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) zu je 100 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.4.2 Immunsuppressiva-Eichreihe und Kontrollproben

Zur Quantifizierung der Immunsuppressiva in Blut fand die im Institut für Pharmakologie bereits für die Routinediagnostik eingesetzte Eichreihe Verwendung. Der Kalibrierbereich für Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus liegt zwischen 1-100 ng/ml, für Cyclosporin A zwischen 12,5 -1250 ng/ml (Tabelle 3-2).

Material und Methoden

Tabelle 3-2: Konzentrationsbereiche der Immunsuppressiva in Blut

	TRL [ng/ml]	SRL [ng/ml]	RAD [ng/ml]	CSA [ng/ml]
E1	1	1	1	12,5
E2	2	2	2	25
E3	5	5	5	62,5
E4	10	10	10	125
E5	25	25	25	312
E6	50	50	50	625
E7	100	100	100	1250

Kontrollproben (*low, medium und high*) wurden von der Firma Recipe (ClinChek[®]-Control) verwendet. Die Kontrollproben werden in lyophilisierter Form geliefert und wurden nach Vorgabe des Herstellers in H₂O rekonstituiert. Die Konzentrationen der Analyten in den Kontrollproben sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: nominelle Konzentrationen von TRL, SRL, RAD und CSA in den Kontrollproben (Fa. Recipe – ClinChek[®]-Control)

	TRL [ng/ml]	SRL [ng/ml]	RAD [ng/ml]	CSA [ng/ml]
Kontrolle <i>low</i>	3,4	3,6	3,5	57
Kontrolle <i>medium</i>	6,9	11,5	11,2	120
Kontrolle <i>high</i>	14,1	20,2	17,8	245

Ferner wurde eine Eichreihe der Immunsuppressiva in Standardlösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) verwendet, deren Kalibrierbereiche mit denen der Eichreihe in Blut übereinstimmen (Abbildung 3-4).

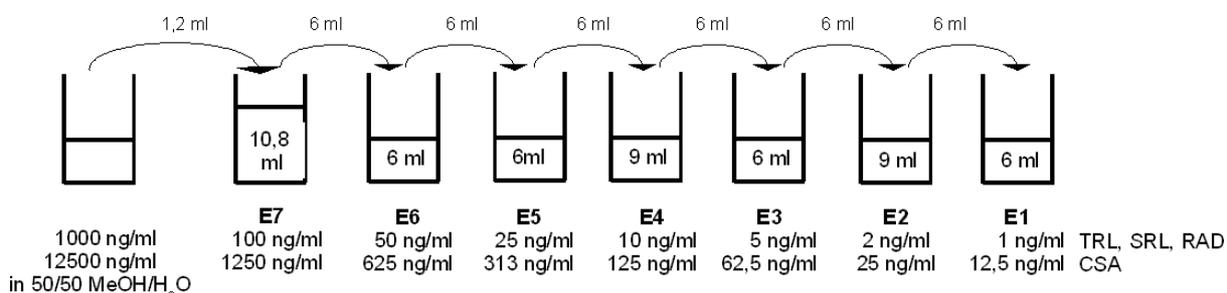


Abbildung 3-4: Pipettierschema zur Herstellung einer Immunsuppressiva-Eichreihe in Standardlösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]); E = Eichreihenpunkt

Die Lagerung der aliquotierten Proben (je 100 µl) erfolgte in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bei -20°C.

3.5 Probenvorbereitung

3.5.1 Vorbereitung der Filterkartuschen

Die Filterkartuschen (Prototypen; Spark Holland, Emmen, Niederlande) wurden nach Benutzung wie folgt regeneriert: Nach dem Entfernen des Filtermaterials wurden die Kartuschen zunächst mit Methanol gewaschen. Anschließend wurden die Kartuschen für 3 min in Wasser ausgekocht. Wasserreste wurden durch zweimaliges Waschen mit Methanol entfernt. Nach vollständigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Kartuschen mit einer definierten Menge neuen Filtermaterials befüllt.

3.5.2 Probenauftrag mittels Pipette

Für die Methodenentwicklung wurde das entsprechende Probenvolumen mittels Pipette auf das Filtermaterial aufgetragen und vor der Analyse für mindestens 10 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Quantifizierung der Analyten wurde zunächst das entsprechende Volumen der internen Standardlösung mittels Pipette auf dem Filtermaterial appliziert. Unmittelbar darauf erfolgte der Auftrag des Probenmaterials wie oben beschrieben. Nach mindestens 10stündiger Trocknungszeit erfolgte die Analyse.

3.5.3 Präparation der Kapillarpipetten mit internem Standard

Ein IS-Gemisch (10 ng/ml Ascomycin und 13c2d4RAD, 100 ng/ml CSD und d12CSA) wurde sowohl in MeOH als auch in 50/50 MeOH/H₂O [v/v] sowie in ACN aus den oben beschriebenen Stammlösungen hergestellt (s. 3.4.3.). Kapillarpipetten (end to end 10 µl, Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland) wurden vollständig mit dem IS-Gemisch befüllt und anschließend horizontal bis zur vollständigen Trocknung gelagert. Während des Trocknungsvorgangs wurde die Seite der Kapillare, auf der sich die Lösung konzentrierte, markiert.

3.5.4 Probenauftrag mittels Kapillarpipetten

Die mit dem internen Standard präparierten Kapillarpipetten wurden von der unmarkierten Seite her mit der Probe befüllt. Anschließend wurde mit einem Gummihütchen als Pipettierhilfe die Probe auf das Filtermaterial aufgetragen.

3.6 MS/MS-Analytik

3.6.1 Aufnahme von Q1-Spektren

Die Aufnahme von Q1-Spektren erfolgte mittels FIA über eine externe Spritzenpumpe. Eine 1 µg/ml Analytenlösung (in 50/50 MeOH/H₂O; 10 mM NH₄Oac; 0,1 % Hac) wurde mit einer konstanten Flussrate von 20 µl/min in das Massenspektrometer infundiert. Die Detektion erfolgte im positiven Ionisierungsmodus in einem für die jeweiligen Analyten relevanten Massenbereich (Anidulafungin 550 – 1250 amu, 13c2d4RAD 300 – 1100 amu, d12CSA 600 – 1320 amu). Es wurde eine Addition über 25 Scans vorgenommen. Die Quelleneinstellungen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: ausgewählte Quellenparameter und für die Q1-Scan-Analyse der Analyten Anidulafungin, 13c2d4RAD und d12CSA; DP: *Declustering Potential*; FP: *Focussing Potential*; EP: *Entrance Potential*; NEB: *Nebulizer Gas*; CUR: *Curtain Gas*; IS: *Ion Spray Voltage*; T: *Temperature*

DP [V]	60
FP [V]	300
EP [V]	20
NEB	6
CUR	8
IS [V]	5500
T [°C]	RT

3.6.2 Optimierung der Massenübergänge – SRM-Optimierung

Für die Ermittlung der analytspezifischen Massenübergänge wurden Analytlösungen mit einer Konzentration von 1 µg/ml (in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]; 10 mM NH₄Oac; 0,1 % Hac) verwendet. Diese wurde mittels einer Mikroliterspritze (1000 µl, 4,61 mm Durchmesser; Hamilton, Reno, Nevada, USA) und einer externen Spritzenpumpe (Havard Pump 22; Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) mit einer Flussrate von 10 µl/min in das Massenspektrometer infundiert. Die Optimierung der Massenübergänge erfolgte automatisch mittels der Analyst Software (Version 1.4.1).

SRM-Optimierungen wurden für die Analyten Anidulafungin sowie für d12CSA und 13c2d4RAD durchgeführt. Für die übrigen Analyten (TRL, RAD, CSA, Ascomycin und CSD) wurden die in der Arbeitsgruppe bereits optimierten Massenübergänge verwendet.

3.7 Untersuchung des Ionisierungs- und Fragmentierungsverhaltens der Analyten

3.7.1 *Fließinjektionsanalyse – FIA*

In der Fließinjektionsanalyse (FIA) werden die Analyten durch Direktinjektion, d.h. ohne vorherige chromatographische Trennung, in das Massenspektrometer infundiert und detektiert. Eine Injektion kann sowohl mittels einer externen Spritzenpumpe als auch über einen Probengeber in Kombination mit einer LC-Pumpe erfolgen. Während eine externe Spritzenpumpe bedingt durch das festgelegte Spritzenvolumen nur relativ geringe Flussraten erlaubt (theoretisch: 0,1 – 800 $\mu\text{l}/\text{min}$; sinnvoll bei 1 ml Spritzenvolumen: 1 – 200 $\mu\text{l}/\text{min}$), lassen sich mit einem Probengeber und einer LC-Pumpe Experimente mit wesentlich höheren Flussraten durchführen, welche durch das Leistungsvermögen der verwendeten LC-Pumpe sowie durch das der Ionenquelle des Massenspektrometers limitiert wird. Die in dieser Arbeit verwendete Pumpe (Perkin-Elmer Series 200 Micro Pump) erlaubt einen maximalen Fluss von 3000 $\mu\text{l}/\text{min}$, wobei die TurbolonSpray-Quelle des Massenspektrometers eine maximale Flussrate von 300 – 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ ohne gravierenden Intensitätsverlust zulässt.

Die Fließinjektionsanalyse erlaubt u.a. eine Abschätzung der Ionisierbarkeit der Analyten. Sie wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Ionisierung der Analyten unter unterschiedlichen Salz- und Säurekonzentrationen zu untersuchen sowie Q1-Spektren der Analyten aufzunehmen.

3.7.2 *Optimierung der Salz- und Säurekonzentration im HPLC-Eluenten*

Die Optimierung der Salz- und Säurekonzentrationen erfolgte mittels FIA über einen Probengeber und einer LC-Pumpe der Firma Perkin-Elmer. Die Eluentzusammensetzung wurde in Bezug auf Salz (NH_4Oac)- und Säurekonzentration (Hac) variiert. Die verschiedenen Bedingungen sind im Ergebnisteil zusammengefasst.

20 μl eines Analytenstandards (je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 97/3 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) wurden injiziert und im SRM-Modus detektiert. Die Flussrate betrug 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, die Messdauer 1 min. Für die Auswertung wurde ein Vergleich der Peakflächen herangezogen.

3.8 Methodenentwicklung

3.8.1 Quellen- und MS/MS-Parameter in der Methodenentwicklung

Die für die Methodenentwicklung gewählten Quelleneinstellungen am Massenspektrometer sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Quelleneinstellungen in der Methodenoptimierung; NEB: Nebulizer Gas, CUR: Curtain Gas; IS: Ion Spray Voltage, CAD: Collision Gas, T: Temperatur

NEB	12
CUR	10
IS [V]	5500
CAD	12
T [°C]	350
Gas 1	60
Gas 2	70
Q1 Resolution	low
Q3 Resolution	low

3.8.2 Auswahl des Filtermaterials

Von der Firma Spark Holland wurden zwei verschiedene Filtermaterialien (Material 1: R-25449 und Material 2: R-27784; Prototypen) zur Verfügung gestellt. Nach Angaben der Firma besteht Material 1 (R-25449) aus einem Polyethylen-Mantel, einem Polypropylen-Kern und einer hydrophilen, unlöslichen Beschichtung. Dagegen ist das Material 2 (R-27784) aus einem unbeschichteten Polyolefin aufgebaut.

Für die Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien wurde der in Abbildung 3-5 beschriebene Versuchsaufbau gewählt. Über die HPLC-Pumpe wurde der Eluent (50/50 MeOH/H₂O, 10 mM NH₄Oac; 0,1 % Hac) über das Filtermaterial und anschließend in das Massenspektrometer infundiert. Die Flussrate betrug 300 µl/min, die Detektion erfolgte im sowohl Q1-Modus als auch im SRM-Modus. Die verwendeten MS-Parameter sind in Tabelle 3-5 gezeigt. Als Vergleich diente eine leere Filterkartusche.

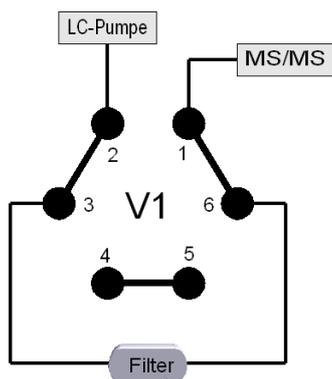


Abbildung 3-5: Versuchsaufbau zur Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien

3.8.3 Optimierung des Probentransfers von dem Filtermaterial auf die SPE-Kartusche

10 µl eines Standardgemisches (je 1 µg/ml Analyt in 50/50 MeOH/H₂O) wurden auf das Filtermaterial aufgetragen und für mindestens 10 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Messung erfolgte mit folgendem Versuchsaufbau (Abbildung 3-6):

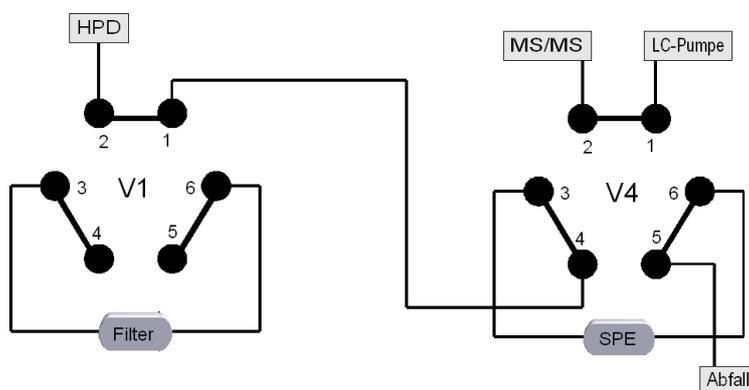


Abbildung 3-6: Versuchsaufbau zur Optimierung des Probentransfers von der Filter- auf die SPE-Kartusche sowie zur Minimierung von Verschleppungseffekten und zur Optimierung der Elution von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule; HPD: *High Pressure Dispenser*; MS/MS: Tandem-Massenspektrometer

Die Optimierung des Probentransfers erfolgte hinsichtlich des organischen Anteils im Transfereluenten, des Transfervolumens und der Flussrate bei Detektion im SRM-Modus. Um Mehrfachwerte zu erhalten, wurden die Messungen an drei verschiedenen Tagen wiederholt.

Tabelle 3-6 fasst die einzelnen Schritte der verwendeten Methode zusammen.

Material und Methoden

Tabelle 3-6: Methode zur Optimierung des Analyttransfers von der Filterkartusche auf die SPE-Kartusche. Die jeweiligen Variationen der Versuchsbedingungen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	V1	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	0 – 90% MeOH (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	1 – 2	0 – 90% MeOH (HPD)	100 – 1000 µl/min 100 – 750 µl
Elution	1 – 2	6 – 1	97/ 3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 1 min 15 sec.
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	1 – 2	0 – 90% MeOH (HPD)	3000 µl/min 1000 µl

3.8.4 Minimierung von Verschleppungseffekten

Oberer Versuchsaufbau (Abbildung 3-6) wurde verwendet, um Verschleppungseffekte (*carry over*) durch Spülen der Filter- und SPE-Kartusche nach dem Probentransfer zu minimieren.

In Tabelle 3-7 werden die einzelnen Schritte der Methode wiedergegeben.

Tabelle 3-7: Methode zur Minimierung von Verschleppungseffekten. Die jeweiligen Variationen der Versuchsbedingungen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	V1	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Elution	1 – 2	6 – 1	97/ 3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 1 min 15 sec.
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	1 – 2	Spüleluent / variabel (HPD)	300 – 3000 µl/min 500 – 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl

Eine Optimierung des Spülschritts erfolgte hinsichtlich des organischen Anteils im Spüleluenten, der Flussrate und des Spülvolumens. Als organische Lösungsmittel wurden MeOH, Isopropanol und ACN getestet.

Zur Ermittlung der Verschleppung wurde eine Standardprobe (1 µg/ml in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]) analysiert, auf die die Analyse einer leeren Filterkartusche (*blank*) folgte. Peakflächen der Standardprobe und des *blanks* wurden verglichen.

3.8.5 Optimierung des Analytentransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule

3.8.5.1 Elution von der analytischen Säule ohne Fokussierschritt

Mit dem in Abbildung 3-7 gezeigten Versuchsaufbau wurden Versuche zur Elution der Analyten von der analytischen Säule (Nucleodur C18 Gravity; 50 x 4,6 mm; 5 µ) durchgeführt. Der Ablauf der Messmethode ist in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

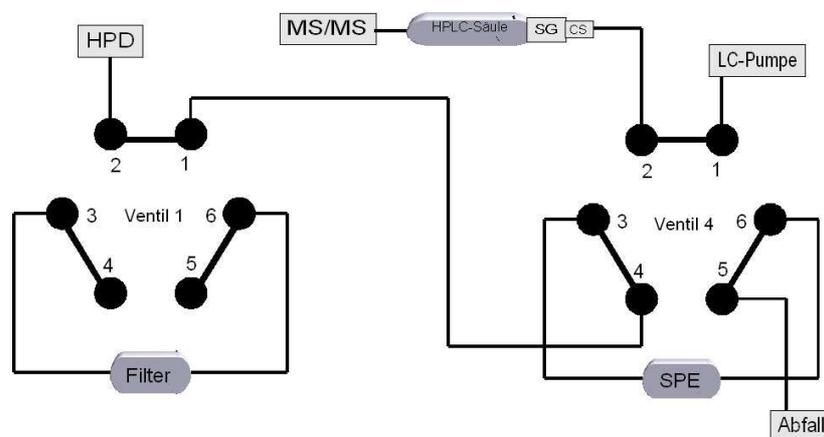


Abbildung 3-7: Versuchsaufbau zur Optimierung der Elution der Analyten von der analytischen Säule ohne einen zusätzlichen Fokussierungsschritt; SG: Security Guard; CS: Column Saver; MS/MS: Tandem-Massenspektrometer; HPD: High Pressure Dispenser

Material und Methoden

Tabelle 3-8: Methode zur Optimierung der Elution der Analyten von der analytischen Säule ohne einen zusätzlichen Fokussierungsschritt

	V1	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Elution	1 – 2	6 – 1	97/3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 5 min
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	1 – 2	97/3 MeOH/H ₂ O bzw. 80/20 ACN/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl bzw. 3000 µl/min 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µ

3.8.5.2 Optimierung der Elution von der analytischen Säule durch einen Fokussierschritt

Versuchsaufbau in Abbildung 3-6 wurde verwendet um den Eluenten für den Analytentransfer von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule durch einen Fokussierschritt zu optimieren. Diese Optimierung erfolgte hinsichtlich des organischen Anteils und der Flussrate (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Methode zur Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule. Die jeweiligen Variationen der Versuchsbedingungen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	V1	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Elution	1 – 2	6 – 1	80/20 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	200 – 600 µl/min 3 min
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	1 – 2	97/3 MeOH/H ₂ O bzw. 80/20 ACN/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl bzw. 3000 µl/min 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µ

3.8.6 Untersuchung von Matrixeffekten

3.8.6.1 Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung der chromatographischen Trennung

Zur Untersuchung von Matrixeffekten wurde ein Post-Column-Infusionsexperiment durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3-8, die HPLC-Methode in Tabelle 3-10 gezeigt. Der Infusionsmix (Analytenstandard in 1 µg/ml in 97/3 MeOH/H₂O; 1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac) wurde mit einer Flussrate von 10 µl/min in das Massenspektrometer infundiert.

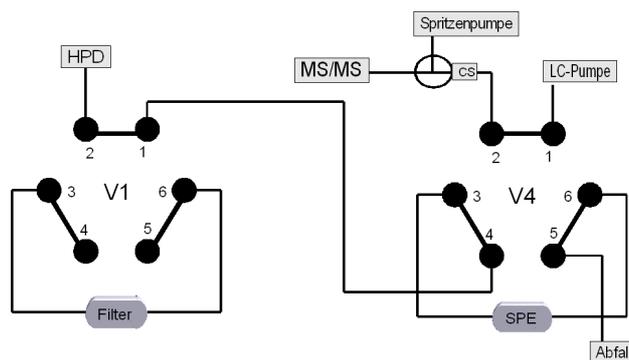


Abbildung 3-8: Versuchsaufbau eines *Post-Column-Infusionsexperiments* zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung der analytischen Säule – Die Infusion des Standard-Analytgemisches erfolgt über ein T-Stück in das Massenspektrometer (MS/MS); HPD: *High Pressure Dispenser*; CS: *Column Saver*

Tabelle 3-10: Methode zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung der analytischen Trennung. Die jeweiligen Variationen der Versuchsbedingungen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	V1	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Waschen der SPE	1 – 2	1 – 2	50 – 97 % MeOH	300 µl/min 500 µl
Reequilibrierung der SPE	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Elution	1 – 2	6 – 1	97/ 3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 1,25 min
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	1 – 2	97/3 MeOH/H ₂ O bzw. 80/20 ACN/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl bzw. 3000 µl/min 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl

3.8.6.2 Untersuchung von Matrixeffekten unter Berücksichtigung der chromatographischen Trennung

Um in der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode auftretende Matrixeffekte zu untersuchen, wurde ein *Post-Column-Infusionsexperiment* durchgeführt. Der Versuchsaufbau basiert auf dem der optimierten Methode und ist in Abbildung 3-9, die HPLC-Methode in Tabelle 3-11 beschrieben. Das Infusionsgemisch (Analytenstandard in

Material und Methoden

1 µg/ml in 97/3 MeOH/H₂O + 1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac) wurde mit einer Flussrate von 10 µl/min in das Massenspektrometer infundiert.

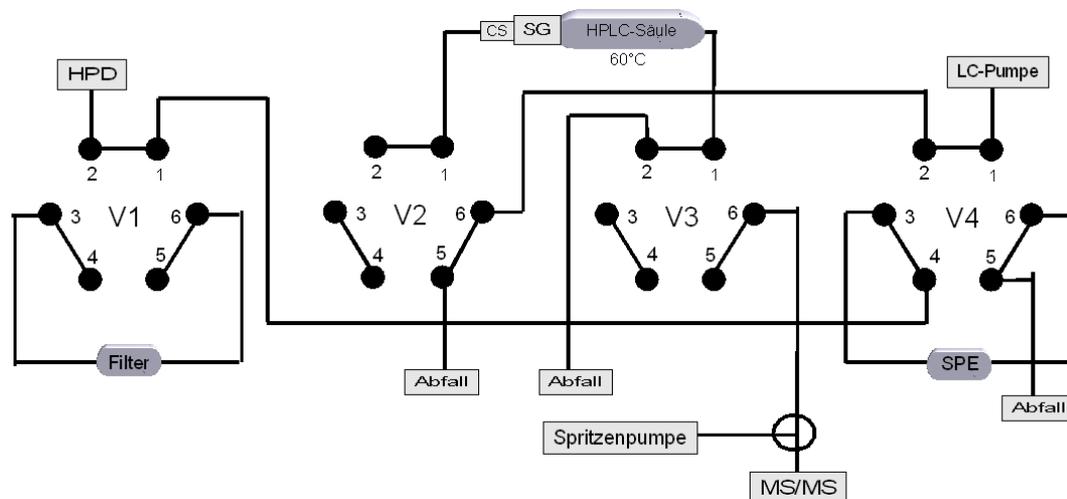


Abbildung 3-9: Schematischer Versuchsaufbau eines *Post-Column-Infusionsexperiments* zur Untersuchung von Matrixeffekten bei der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode – Die Infusion des Standard-Analytgemisches erfolgt über ein T-Stück in das Massenspektrometer (MS/MS); HPD: *High Pressure Dispenser*; CS: *Column Saver*; SG: *Security Guard*

Tabelle 3-11: Methode zur Untersuchung von Matrixeffekten unter Berücksichtigung der analytischen Trennung

	V1	V2	V3	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Waschen der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	1 – 2	60/40 MeOH/H ₂ O	500 µl/min 500 µl
Elution von der SPE-Kartusche auf die analytischen Säule	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	80/20 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	500 µl/min 0,75 min
Elution von der analytischen Säule in das MS	1 – 2	6 – 1	1 – 2 nach 1' 6 – 1	1 – 2	97/ 3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 4,25 min
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	97/3 MeOH/H ₂ O bzw. 80/20 ACN/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl bzw. 3000 µl/min 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl

3.9 Anwendung der optimierten Methode

3.9.1 Einfluss der Trocknungszeit auf die Signalintensitäten

Immunsuppressiva

Um den Einfluss der Trocknungszeit der Probe auf dem Filtermaterial zu untersuchen wurden 10 µl Probe (1 µg/ml Analytgemisch in 50/50 MeOH/H₂O [v/v] bzw. Blut) auf das Filtermaterial aufgetragen. Die Analyse erfolgte nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, und 120 h, wobei von den Proben 3-fach Werte der Peakflächen ermittelt wurden.

Anidulafungin

10 µl Probe (1 µg/ml Analytgemisch in 50/50 MeOH/H₂O [v/v] und Plasma) wurden auf das Filtermaterial aufgetragen. Die Analyse erfolgte nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, und 120 h, wobei von den Proben 3-fach Werte der Peakflächen ermittelt wurden.

3.9.2 Analyse von Patientenproben

Immunsuppressiva

Kapillarpipetten wurden verwendet, um die Probe auf das Filtermaterial aufzutragen. Hierfür wurde zunächst eine Lösung der internen Standards in den Kapillarpipetten getrocknet (s. 3.4.3.). Anschließend wurden die Kapillaren vollständig mit Patientenblut bzw. mit Eichreihe oder Kontrollproben gefüllt und die Probe auf das Filtermaterial übertragen. Die Messung erfolgte analog mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode.

Verglichen wurden die hier ermittelten Konzentrationen mit denen der Routinemethode.

Anidulafungin

Zur Quantifizierung von Anidulafungin in Patientenproben (Plasma) wurden 10 µl der Internen-Standard-Lösung (30 ng/ml Ascomycin in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]) auf das Filtermaterial aufgetragen. Anschließend erfolgte der Probenauftrag (5 µl) der Eichreihe bzw. der Kontrollproben und der Patientenproben mittels Pipette. Je eine Kontrollprobe wurde zu Beginn der Messung, nach der Hälfte der Proben sowie am Ende der Messung analysiert.

Die so ermittelten Konzentrationen wurden mit denen verglichen, die mit einer für Anidulafungin etablierten konventionellen LC-MS/MS-Methode ermittelt wurden.

3.10 Etablierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Immunsuppressiva und Anidulafungin

Die Quantifizierung der Immunsuppressiva und des Anidulafungins erfolgte in einer gleichartigen SPE-HPLC-MS/MS-Methode. Die Messung von Anidulafungin erforderte dabei 100 µl Plasma, die der Immunsuppressiva 100 µl EDTA-Vollblut.

3.10.1 Probenvorbereitung

Probe und Fällungsreagenz (80/20 MeOH/0,2 M ZnSO₄; 10 ng/ml Ascomycin / 13c2d4RAD, 100 ng/ml CSD / d12CSA) wurden im Verhältnis 1:2 gemischt. Das Probenvolumen betrug bei Patientenproben in der Routineanalytik 100 µl. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des internen Standards bei Probenauftrag mit einer Kapillarpipette betrug das Probenvolumen 10 µl. Die Proben wurden für mindestens 30 Sekunden gemischt und anschließend für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (140 00 rpm). Der Überstand wurde in Probengefäße mit Mikroinsert transferiert und anschließend analysiert.

3.10.2 Verwendete Gerätesysteme und MS/MS-Parameter

Das verwendete Gerätesystem bestand aus zwei unabhängigen Pumpen A und C (Perkin-Elmer Series 200 Micro Pump). Des Weiteren wurde ein *autosampler* mit einer 100 µl Probenschleife (Perkin-Elmer Series 200 *autosampler*) und einem Sechs-Wege-Ventil (Rheodyne Series 7125) verwendet.

Die *online* Anreicherung der Analyten auf eine SPE-Säule (Oasis[®] HLB, 20 x 2,1 mm; 25 µm) wurde mittels eines software-gesteuerten 10-Wege-Ventils (VICI Valco Instruments Co. Inc. Houston, Texas, USA) durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C18-RP-Säule (Nucleodur C18 Gravity; 50 x 4,6 mm; 5 µm) bei 60 °C (Säulenofen: Perkin-Elmer Series 200 Column Oven).

Die Analyten wurden im *single reaction monitoring* (SRM) an einem Tandem-Massenspektrometer (API 3000; Applied Biosystems/MDS Sciex Concord, Kanada), ausgestattet mit einer TurbolonSpray-Ionenquelle detektiert.

Abbildung 3-10 gibt den schematischen Versuchsaufbau dieser Methode wider. Zu Beginn ist die Position des 10-Wege-Ventils auf „Anreicherung“ (Ventilstellung A) gestellt. Über Pumpe A (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) werden so 25 µl des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstandes auf der SPE-Säule angereichert, während gleichzeitig Eluent C (97/3 MeOH/H₂O; 10 mM NH₄Oac; 0,1 % Hac) über die analytische Säule in das MS geleitet wird. Nach 1,1 min wird das Ventil auf „Elution“ (Ventilstellung B) geschaltet, so dass Pumpe C die Analyten innerhalb von 3,5 min in Gegenflussrichtung (*backflush*) von der SPE-Säule auf die

Material und Methoden

analytische Säule eluiert (Flussrate: 300 ml/min). Tabelle 3-12 fasst den zeitlichen Ablauf der Methode zusammen.

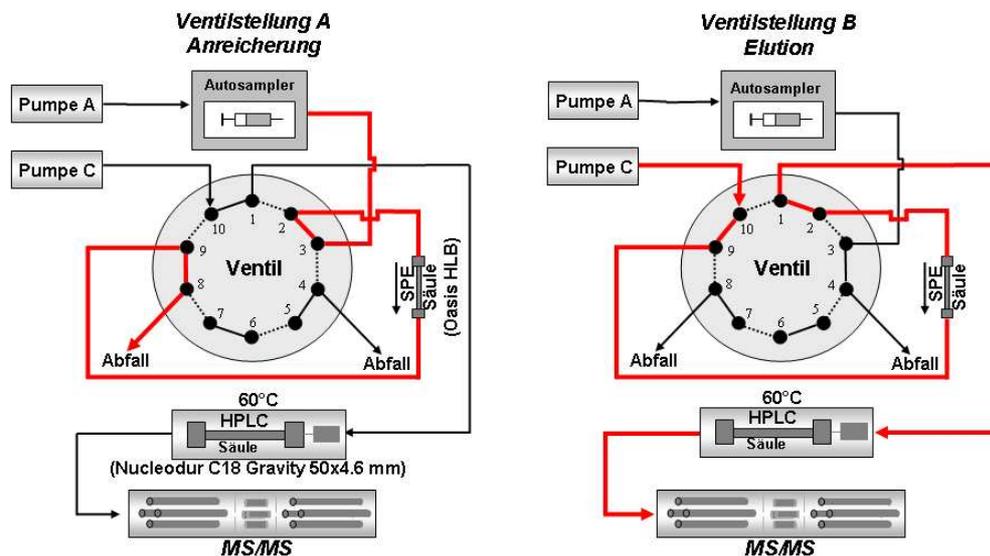


Abbildung 3-10: Schematischer Aufbau der in der Routineanalytik eingesetzten SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der Immunsuppressiva; gezeigt sind die beiden möglichen Ventilstellungen des 10-Wege-Ventils A und B; rot dargestellt ist der Fluss der mobilen Phase in der jeweiligen Ventilstellung; gleicher Versuchsaufbau wurde zur Quantifizierung von Anidulafungin verwendet.

Tabelle 3-12: Ablauf der konventionellen SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der Immunsuppressiva und des Anidulafungins (Eluent A: 50/50 MeOH/H₂O [v/v]; Eluent C: 97/3 MeOH/H₂O [v/v], 10 mM NH₄Oac, 0,1% Hac)

Schritt	Zeit (min)	Flussrate Eluent A (µl/min)	Flussrate Eluent B (µl/min)	Ventilstellung
0	0.0	900	300	
1	0.1	2700	300	Anreicherung
2	1.1	2700	300	Anreicherung
3	1.2	900	300	Elution
4	4.6	900	300	Elution

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Ionisierungs- und Fragmentierungsverhaltens

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die Massenübergänge von Tacrolimus (TRL), Sirolimus (SRL), Everolimus (RAD), Cyclosporin A (CSA), Ascomycin und Cyclosporin D (CSD) bereits im Rahmen der Routinediagnostik optimiert. Dabei zeigte sich, dass für alle Analyten im positiven Ionisierungsmodus deutlich höhere Intensitäten gemessen wurden als im negativen Ionisierungsmodus. Daher wurden die Massenübergänge von Anidulafungin, d12CSA und 13c2d4RAD ebenfalls ausschließlich im positiven Modus bestimmt.

4.1.1 Q1-Spektren der Analyten

Um die Vorläuferionen für die SRM-Optimierung zu bestimmen, wurden von den Analyten Anidulafungin, 13c2d4RAD und d12CSA mittels Fließinjektionsanalyse (Kapitel 3.6.1 und 3.7.1) Q1-Spektren im positiven Messmodus aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass das prominente Ion des Anidulafungins durch die protonierte Muttermasse ($[M+H]^+$) gebildet wurde, während bei 13c2d4RAD sowie d12CSA vorwiegend die Bildung von Ammoniumaddukten ($M+NH_4]^+$) beobachtet wurden. Das Spektrum des d12CSA zeigte neben dem genannten Ammoniumaddukt sowohl die einfach als auch zweifach protonierten Analytmassen ($[M+H]^+$ bzw. $[M+2H]^{2+}$). Diese wurden jedoch mit deutlich geringeren Intensitäten als das Ammoniumaddukt detektiert, so dass für die folgende SRM-Optimierung das Ammoniumaddukt des d12CSA herangezogen wurde (Abbildung 4-1)

4.1.2 Identifizierung der Analyten – SRM-Optimierung

Die Optimierung der Massenübergänge und analytspezifischen MS-Parameter, *Declustering Potential* (DP), *Focussing Potential* (FP), *Collision Energy* (CE), und *Collision exit energy* (CXP), wurde wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der Resultate aus den Q1-Scans erfolgte die Optimierung dabei auf die prominenten Vorläuferionen. Für Anidulafungin stellte diese die protonierte Muttermasse (m/z : 1140,8 amu), für 13c2d4RAD und d12CSA die Ammoniumaddukte (m/z : 981,75 amu bzw. m/z : 1232,02 amu) dar. Tabelle 4-1 zeigt jeweils die zwei intensivitätsstärksten Massenübergänge der untersuchten Analyten.

Ergebnisse

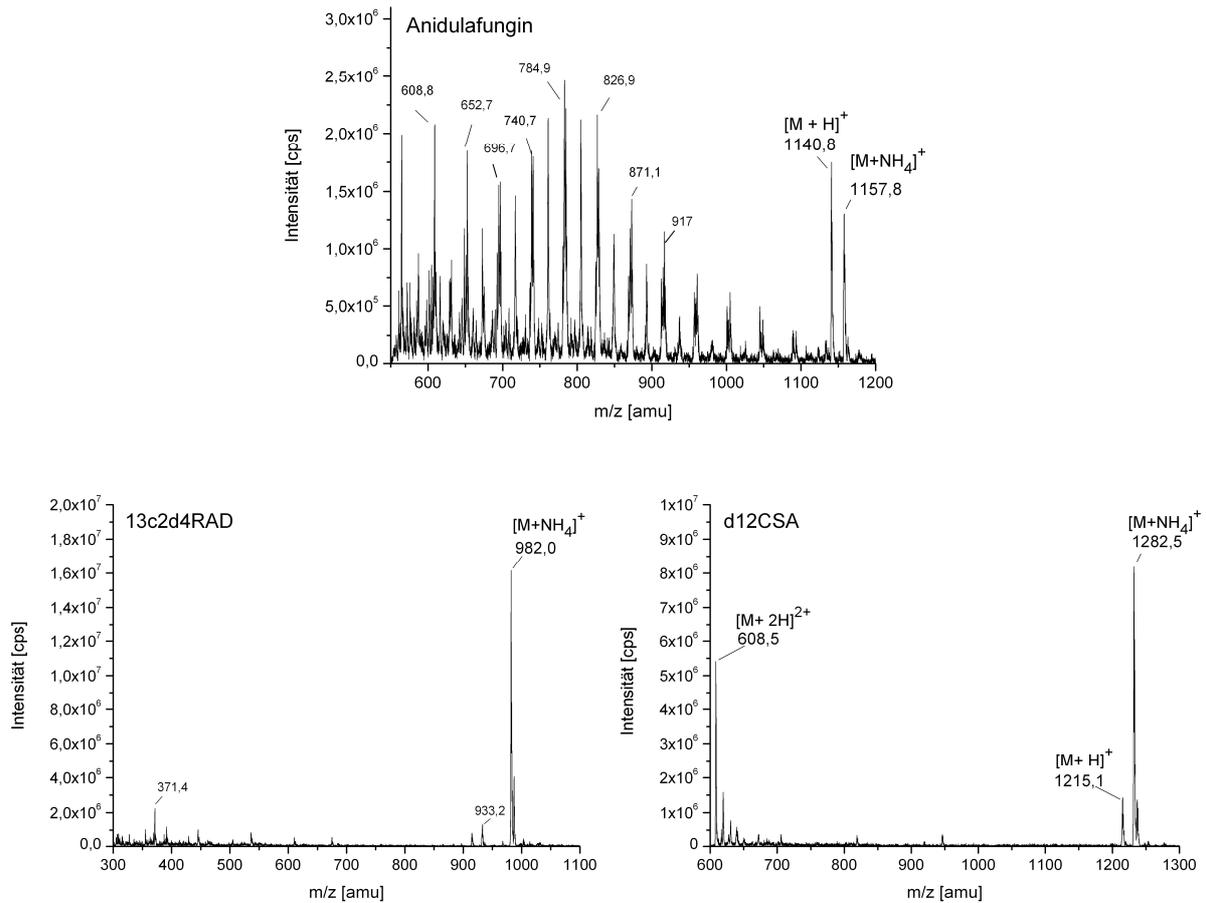


Abbildung 4-1: Q1-Spektren von Anidulafungin, 13c2d4RAD und d12CSA (DP: 60V, NEB: 6, CUR: 8, Ion Spray Voltage: 5500 V, Flussrate: 20 µl/min; Summation von 25 Scans)

Tabelle 4-1: Bei der SRM-Optimierung erhaltene zwei intensivste Massenübergänge; fett dargestellt sind die für die Methodenoptimierung verwendeten Massenübergänge

	amuVorläufer [m/z]	amuFragmention [m/z]	Intensität [cps]
Anidulafungin	1140,64	1122,59	2,0 x 10 ⁵
	1140,64	343,37	6,9 x 10⁴
13c2d4RAD	981,48	914,53	6,4 x 10⁴
	981,48	932,00	2,6 x 10 ⁴
d12CSA	1231,65	1215,05	3,9 x 10⁴
	1231,65	637,20	3,8 x 10 ³

In Tabelle 4-2 sind die optimierten Parameter aller Analyten zusammengefasst. Die Übergänge der Analyten Tacrolimus, Sirolimus, Cyclosporin A, Ascomycin und Cyclosporin D wurden dafür aus der bereits bestehenden Methode übernommen.

Ergebnisse

Tabelle 4-2: Am API 3000 optimierte Massenübergänge der Analyten; DP: *Declustering Potential*; FP: *Focussing Potential*; CE: *Collision Energy*; CXP: *Collision exit energy*

	amu _{Vorläuferion} [m/z]	amu _{Fragmention} [m/z]	DP [V]	FP [V]	CE [V]	CXP [V]
Tacrolimus	821,63	768,65	56	330	31	28
Sirolimus	931,64	864,75	57	350	23	32
Everolimus	975,71	908,75	51	320	25	32
Cyclosporin A	1219,95	1203,15	56	370	33	48
Anidulafungin	1140,64	343,37	76	360	99	34
Ascomycin	809,61	756,65	56	370	31	28
13c2d4RAD	981,75	914,53	51	260	25	40
d12CSA	1232,02	1215,04	41	320	33	44
Cyclosporin D	1233,94	1217,25	51	360	23	30

4.1.3 Untersuchung geeigneter Additive im HPLC-Eluenten

Salz- und Säurekonzentrationen im HPLC-Eluenten wurden wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben mittels Fließinjektionsanalyse optimiert. Zusammenfassend sind in Tabelle 4-3 die in den sieben Versuchsansätzen verwendeten Ammoniumacetat- und Essigsäurekonzentrationen aufgeführt.

Tabelle 4-3: Versuchsansätze 1 – 5 zur Untersuchung geeigneter Additive im HPLC-Eluenten

	1	2	3	4	5	6	7
NH₄Oac [mM]	-	1	5	1	1	1	10
Hac [%]	-	-	-	0,05	0,1	0,5	0,1

Die Detektion der Analyten erfolgte im SRM-Modus. Die Auswertung wurde über die Peakflächen der Analyten vorgenommen.

Abbildung 4-2 zeigt den Einfluss der Ammoniumacetatkonzentration auf die Peakfläche. Verglichen wurden die Peakflächen, die ohne Zusatz sowie nach Zusatz von 1 mM bzw. 5 mM Ammoniumacetat detektiert wurden (Bedingungen 1-3). Für den Vergleich wurde eine Normierung auf die unter Bedingung 1 ermittelten Peakflächen vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass die Zugabe von 1 mM Ammoniumacetat eine Intensitätssteigerung und damit verbundene Peakflächenvergrößerung bewirkte. Dieser Effekt war beim Anidulafungin besonders ausgeprägt. Hier bewirkte die Zugabe von 1 mM Ammoniumacetat eine Zunahme der Peakfläche auf das 126-fache. Die Immunsuppressiva zeigten eine Peakflächenvergrößerung auf das 8-fache (CSD) bis auf das 20-fache (SRL). Eine Erhöhung

Ergebnisse

der Ammoniumacetatkonzentration auf 5 mM zeigte zwar ebenfalls eine deutliche Intensitätssteigerung gegenüber Bedingung 1 auf das 5-fache (d12CSA) bis 84-fache (Anidulafungin). Im Vergleich zu 1 mM Ammoniumacetat resultierte eine Erhöhung auf 5 mM jedoch in einer im Mittel 55 %igen Abnahme der Peakflächen.

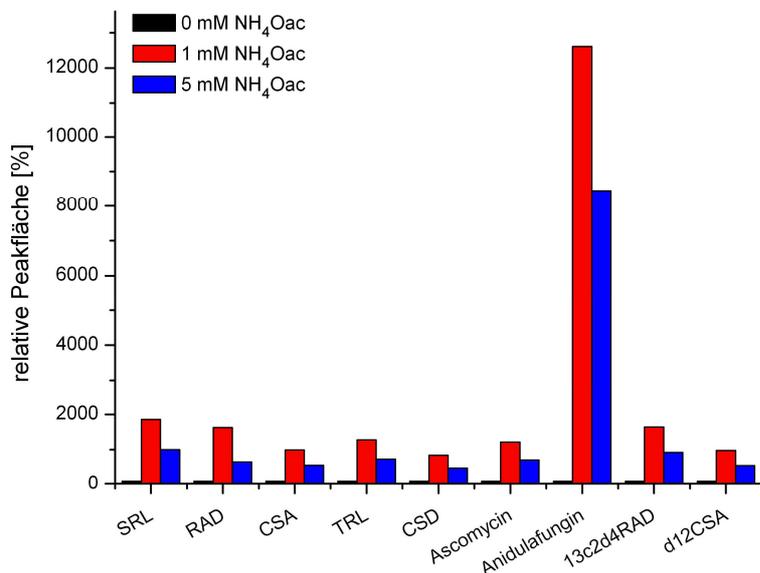


Abbildung 4-2: Abhängigkeit der Analytpeakflächen von der Ammoniumacetatkonzentration

Neben der Salzkonzentration wurde auch der Einfluss der Säurekonzentration auf die Ionisierung der Analyten untersucht. Die Messung erfolgte bei konstanter Salzkonzentration von 1 mM Ammoniumacetat. Die Essigsäurekonzentration wurde zwischen 0,05 % und 0,5 % (Bedingung 4 – 6) variiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-3 gezeigt.

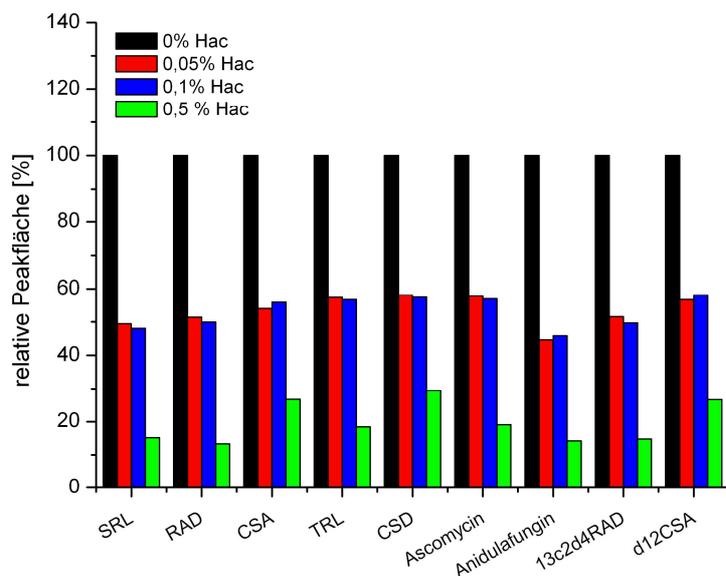


Abbildung 4-3: Abhängigkeit der Analytpeakflächen von der Essigsäurekonzentration im HPLC-Eluenten

Ergebnisse

Für alle Analyten zeigte sich nach einer Erhöhung der Salzkonzentration von 0 % auf 0,05 % eine signifikante Abnahme der Peakfläche auf im Mittel 53 %. Eine weitere Erhöhung auf 0,1 % Hac hatte auf die Peakfläche jedoch keinen Einfluss. Nach Zusatz von 0,5 % Hac wurde eine weitere Abnahme der Peakflächen auf 20 % des Ausgangswertes beobachtet. In einem weiteren Versuch wurde der in der Routineanalytik der Immunsuppressiva im Institut für Pharmakologie eingesetzte HPLC-Eluent (10 mM NH₄Oac, 0,1 % Hac; Bedingung 7) mit Bedingung 4 (1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac) verglichen (Abbildung 4-4). Die Peakflächen wurden auf Bedingung 7 normiert. Es stellte sich heraus, dass mit geringerer Salz und Säurekonzentration im Mittel etwa 50 % größere Peakflächen erzielt werden konnten.

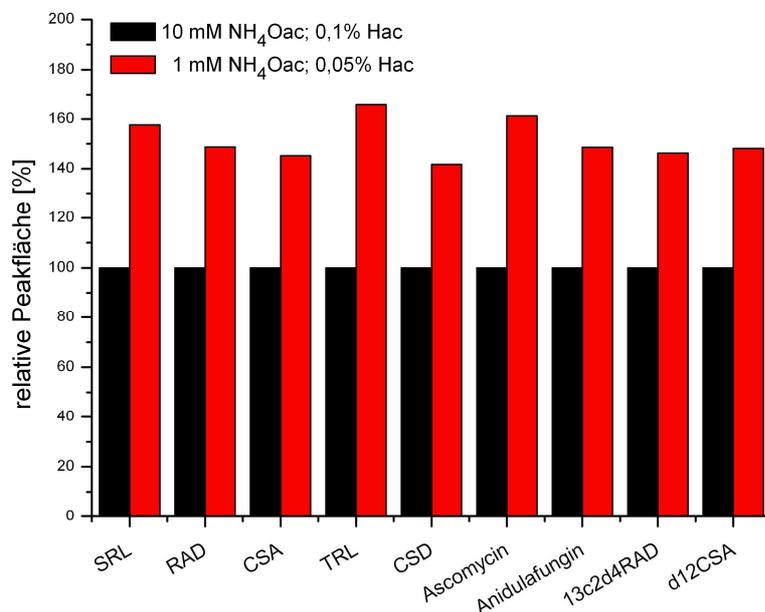


Abbildung 4-4: Vergleich des optimierten HPLC-Eluenten (roter Balken) mit dem in der Routinediagnostik der Immunsuppressiva (Institut für Pharmakologie – Medizinische Hochschule Hannover) eingesetzten (schwarzer Balken)

4.2 Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien

Von der Firma Spark Holland wurden zwei unterschiedliche Materialien (Material 1: R-25449, Material 2: R-27784) zur Verfügung gestellt, deren Reinheit in diesem Versuchsteil untersucht werden sollte. Nach dem in Kapitel 3.8.2. beschriebenen Versuchsaufbau wurden beide Filtermaterialien sowie eine filterfreie Referenzkartusche untersucht. Die Detektion erfolgte zunächst im Q1-Modus, in dem die Vorläuferionen der Analyten in einem festgelegten Massenbereich selektiv erfasst wurden. Abbildung 4-5 zeigt die erhaltenen Chromatogramme sowie die im Zeitraum von 0,3 – 1,4 min erhaltenen Spektren.

Während die filterfreie Kartusche zu keiner signifikanten Signalerhöhung führte ($I_{\max} = 1,2 \times 10^9$ cps), wurden mit beiden Filtermaterialien deutliche Signale nach ca. 0,4 –

Ergebnisse

0,5 min detektiert, wobei das durch Material 1 hervorgerufene Signal das 2,8-fache ($I_{\max} = 2,2 \times 10^{10}$ cps) des Material-2-Signals ($I_{\max} = 8,9 \times 10^9$ cps) betrug.

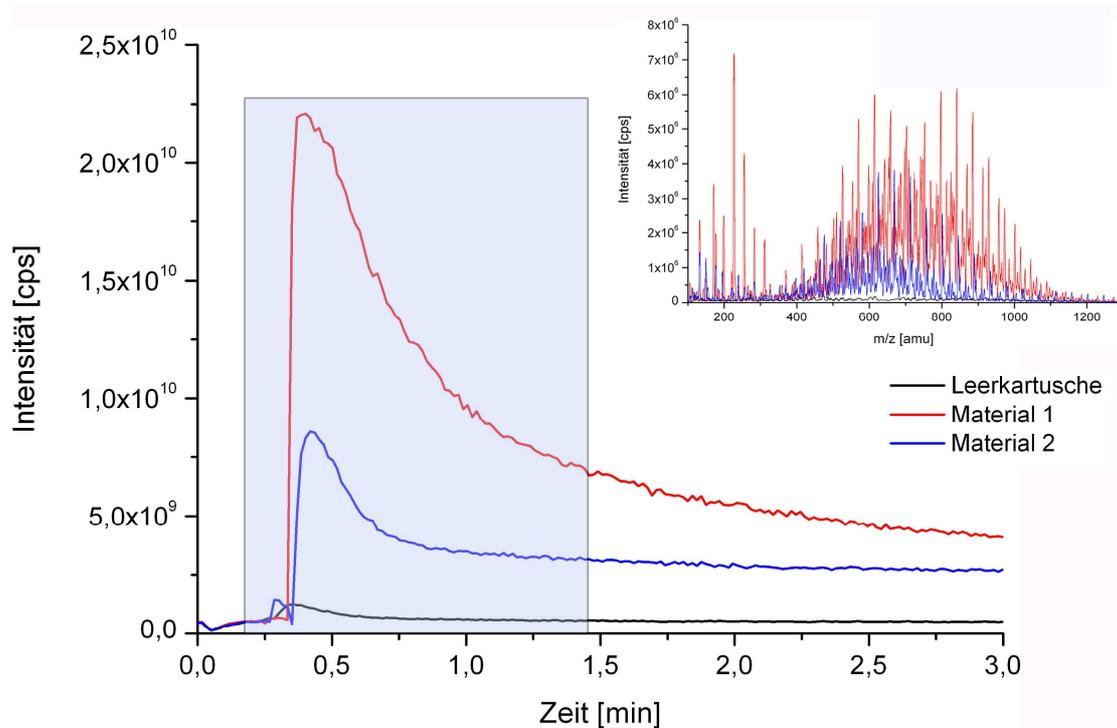


Abbildung 4-5: Q1- Chromatogramm zur Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien – großes Diagramm: Q1-Chromatogramm; kleines Diagramm: im Zeitfenster 0,3 – 1,4 min (blaues Fenster) aufgenommene Spektren

Die im Zeitfenster von 0,3 – 1,5 min aufgenommenen Spektren zeigen, dass sowohl die filterfreie Kartusche als auch beide Filtermaterialien ähnliche Signalverteilungsmuster aufwiesen, in denen der Bereich höchster Intensität zwischen 500 – 850 amu lag. Das von Material 1 aufgenommene Spektrum wies zudem hohe Intensitäten im unteren Massenbereich (100 – 300 amu) auf. Um zu untersuchen, ob die aus den Filtermaterialien detektierten Massen, die gleichen Übergänge aufwiesen wie die Analyten, wurde der obere Versuch im SRM-Modus wiederholt. Dabei ergab sich, dass von Material 1 solche Ionen detektiert wurden, deren Massenübergänge denen von CSA, CSD und d12CSA entsprachen. Dies war weder bei Filtermaterial 2 noch bei der leeren Kartusche der Fall (Abbildung 4-6), weshalb die weitere Methodenentwicklung mit Filtermaterial 2 durchgeführt wurde. Die SRM-Chromatogramme der übrigen Analyten sind im Anhang 1 zu finden.

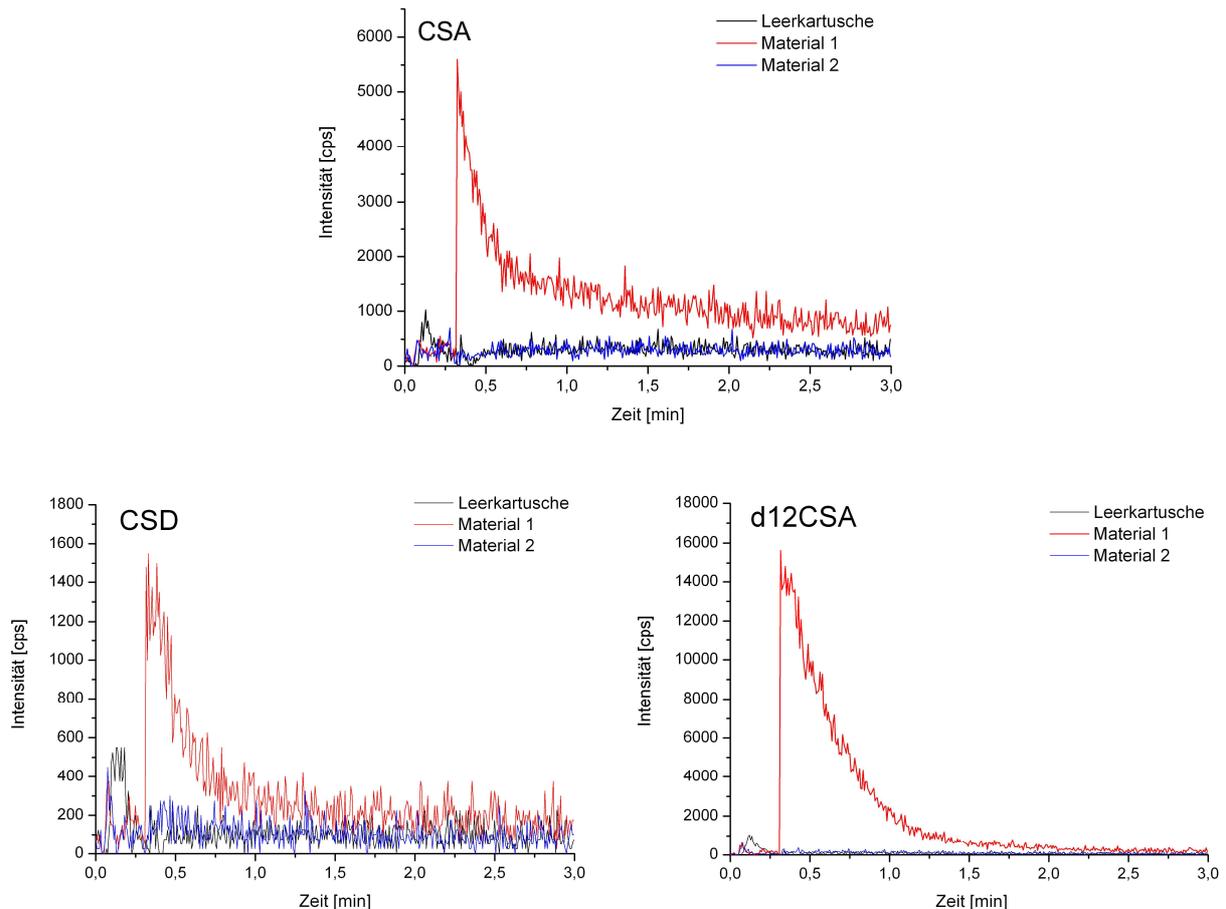


Abbildung 4-6: SRM-Chromatogramme von CSA, CSD und d12CSA zur Untersuchung der verschiedenen Filtermaterialien

4.3 Optimierung des Analyttransfers von dem Filtermaterial auf die SPE-Kartusche

4.3.1 Einfluss der Eluentzusammensetzung, des Transfervolumens und der Flussrate auf die Extraktionseffizienz

Die Optimierung des Analyttransfers wurde nach dem in Kapitel 3.8.3. beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt. Der Transfereluent wurde in Hinblick auf seinen organischen Anteil (MeOH) untersucht, wobei dieser von 0 – 90 % variiert wurde. Transfervolumina zwischen 100 und 750 μl wurden getestet. Der untersuchte Flussratenbereich lag zwischen 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Messung der Proben (Analytengemisch, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]) erfolgte an jeweils drei aufeinander folgenden Tagen, so dass für die Auswertung der Peakflächen Dreifachwerte zur Verfügung standen. In Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 sind exemplarisch die resultierenden Peakflächen für die Analyten TRL und Anidulafungin vergleichend gegenübergestellt. Die Diagramme der übrigen Analyten finden sich in Anhang 2.

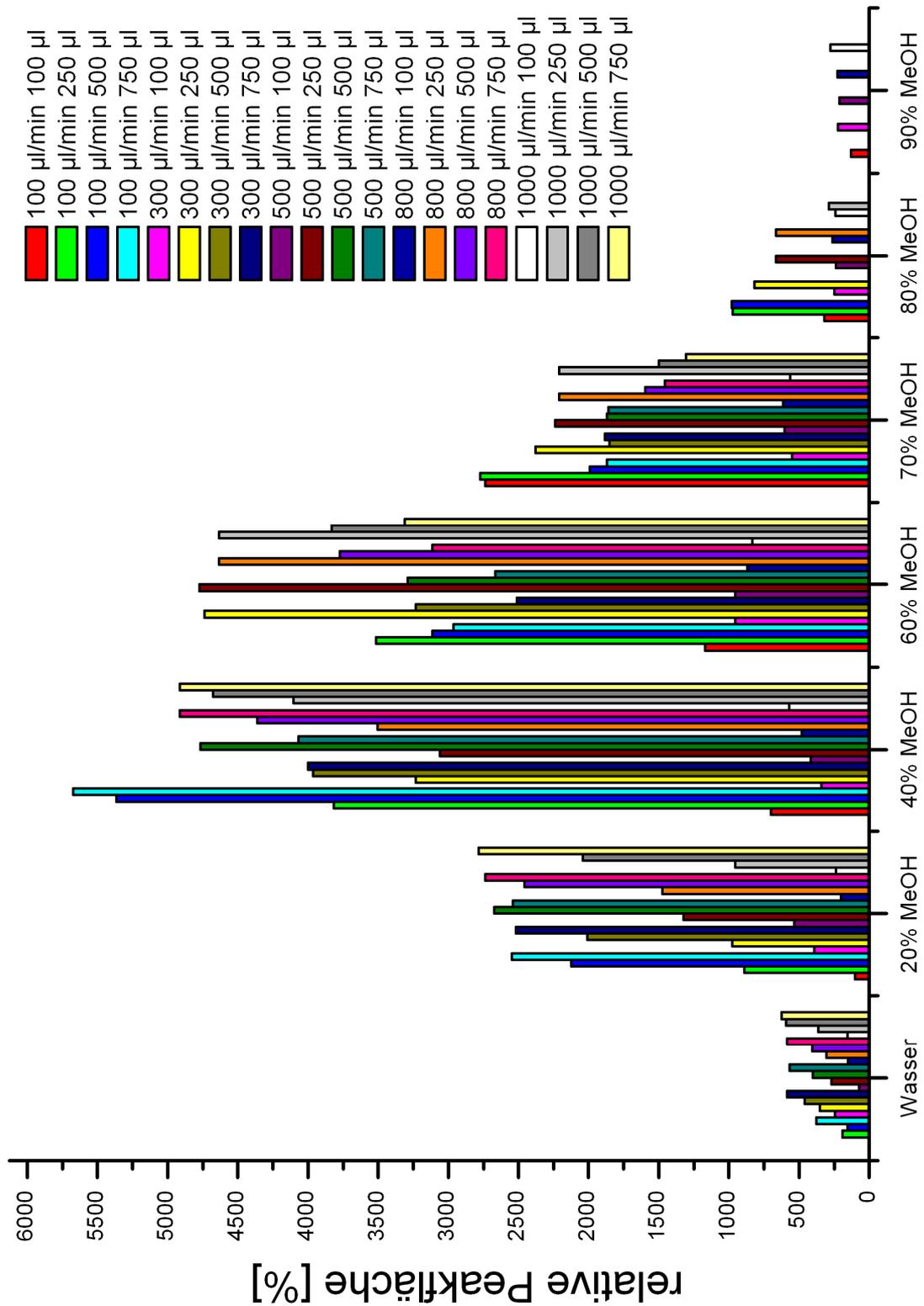


Abbildung 4-7: Übersicht der Optimierung des Probentransfers von der Filter- auf die SPE-Kartusche (Anidulafungin)

Ergebnisse

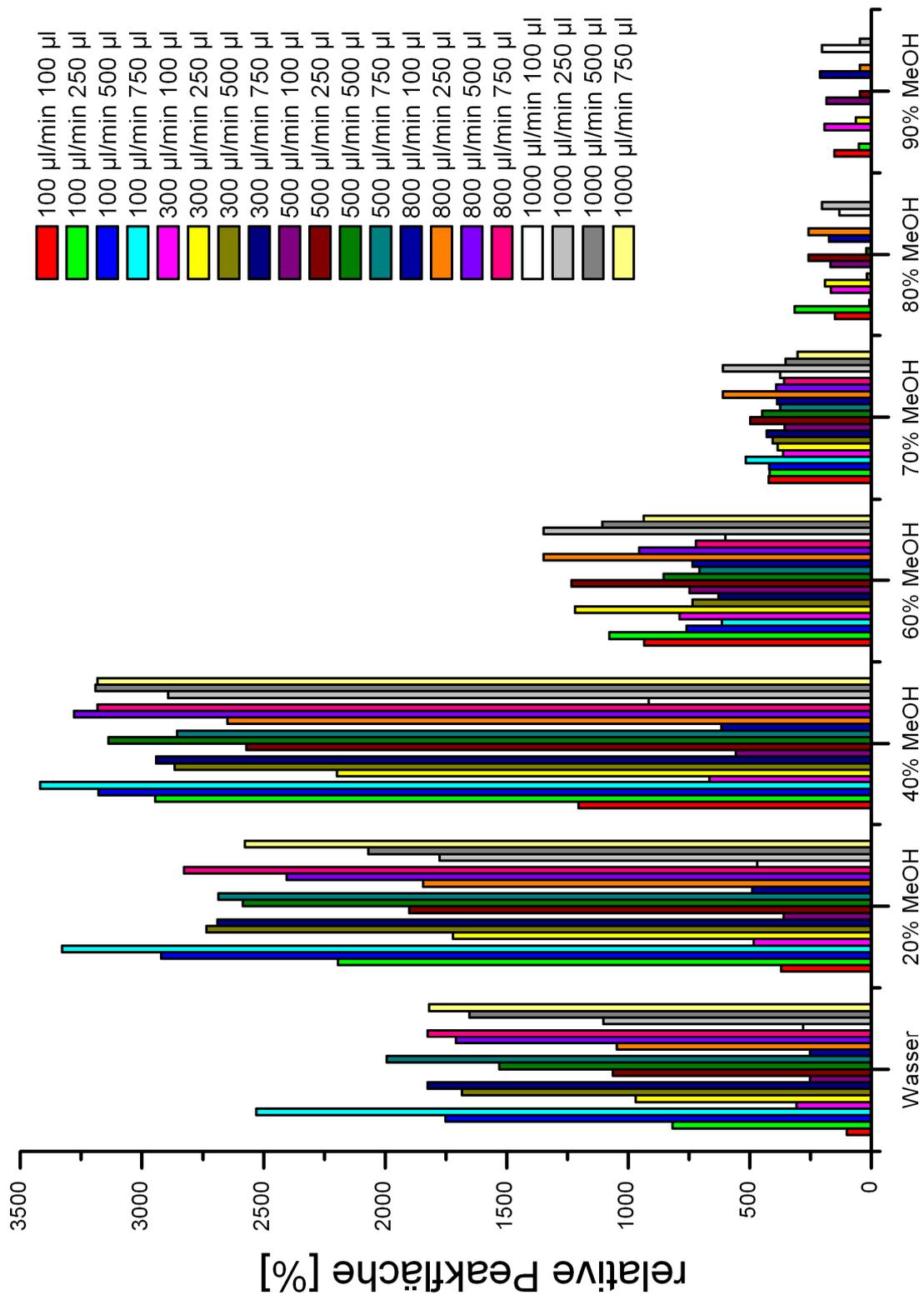


Abbildung 4-8: Übersicht der Optimierung des Probentransfers von der Filter- auf die SPE-Kartusche (Tacrolimus)

Ergebnisse

Die Diagramme geben die Abhängigkeit der Peakflächen vom MeOH-Anteil im Transfereluenten sowie von der Flussrate und dem Transfervolumen wieder. Zu erkennen war eine Zunahme der Peakflächen mit steigendem Methanolgehalt im Transfereluenten. Dieser Effekt war bei TRL deutlich weniger ausgeprägt als bei Anidulafungin, wo eine deutlichere Intensitätssteigerung durch eine Erhöhung des MeOH-Anteils erreicht wurde. Bei beiden Analyten konnten maximale Peakflächen bei einem MeOH-Anteil von 40 % detektiert werden. Ein noch höherer organischer Anteil führte zu einem sichtbaren Intensitätsverlust, und damit zu einer Verringerung der Peakflächen. Ab einem Methanolgehalt von 80 % und einem Transfervolumen von 500 µl wurden keine Analyten mehr detektiert.

Des Weiteren war zu erkennen, dass bei 100 µl Transfervolumen insgesamt die geringsten Peakflächen ermittelt wurden. Dieser Effekt wird auch in Abbildung 4-9 exemplarisch für Anidulafungin und Tacrolimus deutlich. Diese Abbildung zeigt den Einfluss des Transfervolumens abhängig von der Flussrate auf die Analytpeakflächen bei einem konstanten MeOH-Gehalt von 40 %.

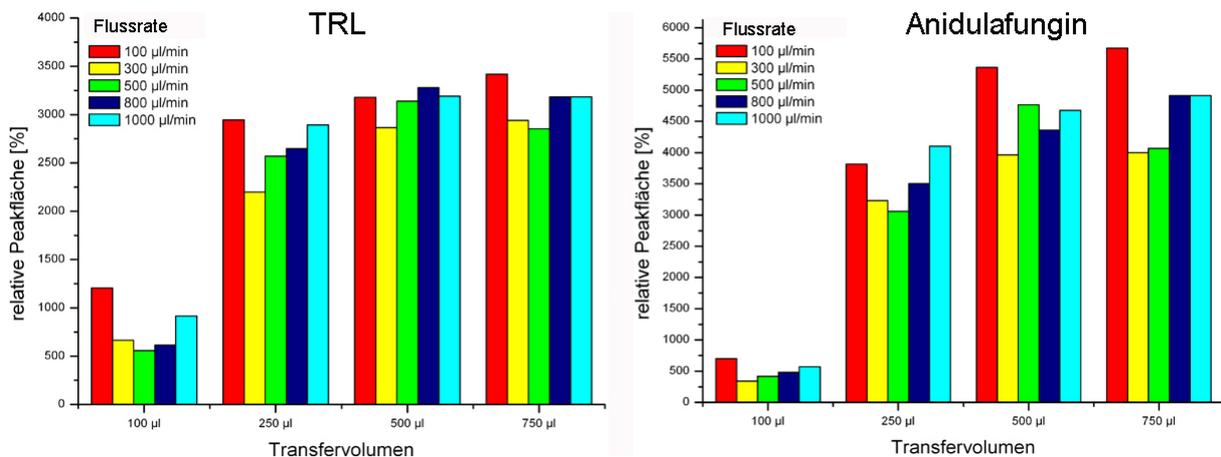


Abbildung 4-9: Optimierung des Probentransfers von der Filter- auf die SPE-Kartusche (exemplarisch für Tacrolimus und Anidulafungin gezeigt) – Transfereluent: 40% MeOH - Abhängigkeit der Analytpeakfläche von Flussrate und Volumen des Transfereluenten

Aus beiden Grafiken wurde ersichtlich, dass, unabhängig von der Flussrate, 100 µl Transfervolumen die geringsten Peakflächen lieferten. Eine Erhöhung des Volumens auf 250 µl hatte eine Erhöhung der Peakfläche um das im Mittel 2 - fache (Tacrolimus) bzw. das 6 – fache (Anidulafungin) zur Folge. Eine weitere Volumenerhöhung des Transfereluenten hatte jedoch nur noch einen geringen Effekt auf die Peakfläche. Außerdem wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass sich mit Flussraten von 100 µl/min die größten Peakflächen erzielen ließen (roter Balken in beiden Diagrammen).

4.3.2 Einfluss der Eluentzusammensetzung, des Transfervolumens und der Flussrate auf Matrixeffekte

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss der Transferbedingung auf Matrixeffekte mittels eines *Post-Column*-Infusionsexperiments untersucht. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abschnitt 3.8.6.1. beschrieben.

Zunächst sollte ein Vergleich zwischen Leerkartusche und Filtermaterial ohne Probe Aufschluss über mögliche Matrixeffekte, die durch das Filtermaterial hervorgerufen werden, geben. Beide Proben wurden unter gleichen Transferbedingungen analysiert. Der Transfer wurde mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und Volumen von 750 μl durchgeführt. Als Transfereluent wurde 40/60 MeOH/H₂O [v/v] verwendet. Die Auswertung erfolgte über das Totalionenchromatogramm (TIC), welches die Summe der Intensitäten aller Analyten aufgetragen gegen die Analysenzeit darstellt. Abbildung 4-10 zeigt das TI-Chromatogramm der Leerkartusche und der Filterkartusche, das unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen wurde.

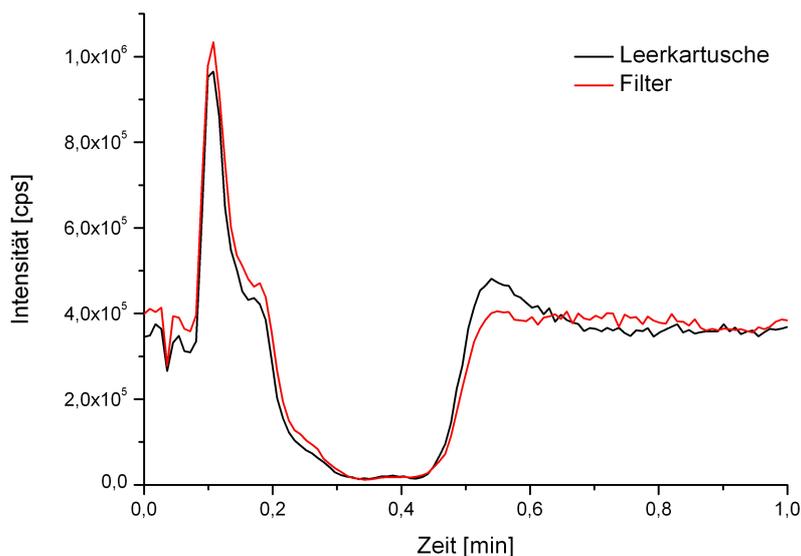


Abbildung 4-10: TI-Chromatogramm des *Post-Column*-Infusionsexperiments zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung einer chromatographischen Trennung: Vergleich Leerkartusche mit analytfreier Filterkartusche; Flussrate: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$; Transfervolumen: 750 μl

Sowohl die Leerkartusche als auch die Filterkartusche wiesen ein ähnliches Intensitätsprofil auf, in dem nach 0,35 min ein charakteristisches Intensitätsminimum zu erkennen ist. Nach 0,6 min erreichten die Intensitäten beider Proben wieder den Basiswert von ca. 4×10^5 cps.

Im Folgenden wurden nun *Post-Column*-Experimente unter fünf der vorherigen Transferbedingungen durchgeführt, bei denen für alle Analyten möglichst hohe Peakflächen erzielt werden konnten (Tabelle 4-4)

Ergebnisse

Tabelle 4-4: Versuchsansätze 1 – 5 zur Untersuchung von Matrixeffekten (ohne Berücksichtigung der analytischen Trennung)

	1	2	3	4	5
Anteil MeOH [%]	0	20	40	40	40
Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	100	100	100	300	800
Transfervolumen [μl]	750	750	750	500	250

Es wurden sowohl Kontrollplasma als auch Kontrollblut analysiert. Für die Auswertung wurden die resultierenden Totalionenchromatogramme miteinander verglichen (Abbildung 4-11). Unter jeder untersuchten Bedingung erreichten die Intensitätskurven zum Zeitpunkt $t = 0,3$ min ein Minimum. Ein Intensitätsanstieg erfolgte bei den Matrixkurven im Unterschied zur Intensitätskurve der Referenzkartusche deutlich später. Unter Verwendung eines rein wässrigen Transfereluenten (Bedingung 1) war ein Anstieg der Intensität erst nach 0,55 min (Plasma) bzw. nach 0,7 min (Blut) detektiert worden. Alle Kurven zeigten unter Verwendung von methanolischen Transfereluenten (Bedingung 2 – 5) bereits einen Intensitätsanstieg nach 0,4 – 0,5 min. Die Basisintensität von 4×10^5 cps wurde mit der Referenzkartusche nach ca. 0,6 min wieder erreicht, wohingegen die mit Blut- bzw. Plasmaprobe erreichten Intensitäten deutlich unter dieser lagen. Die erreichten Maximalintensitäten lagen dabei in Blut mit einem Mittelwert von 4×10^4 cps deutlich unter denen in Plasma ($1 - 2 \times 10^5$ cps). Dabei fiel auf, dass in Plasma die höchsten Intensitäten bei einem rein wässrigen Analyttransfer erreicht wurden.

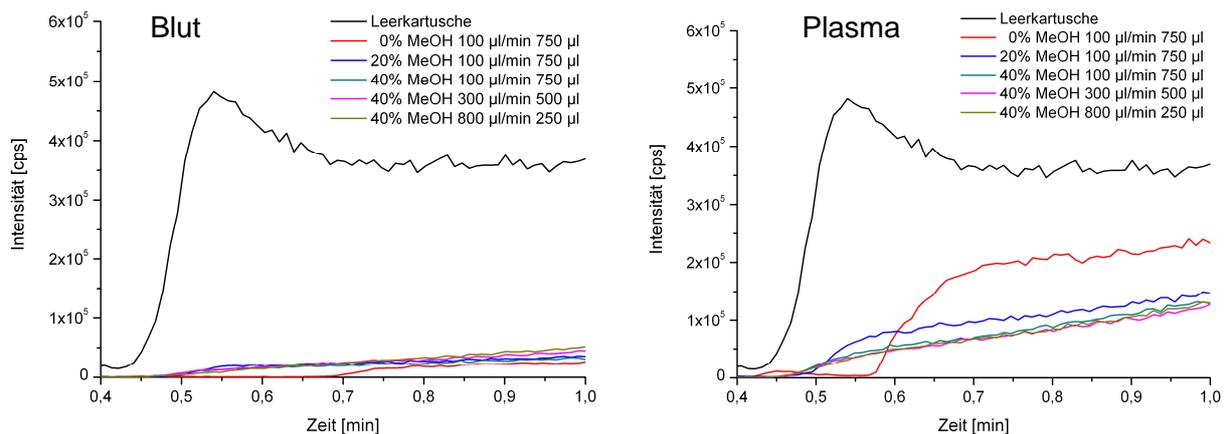


Abbildung 4-11: TI-Chromatogramm des *Post-Column*-Infusionsexperiments zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung einer chromatographischen Trennung: Einfluss von Transfervolumen und -flussrate auf Matrixeffekte in Blut und Plasma

4.3.3 Verringerung von Matrixeffekten – Waschen der SPE-Kartusche

Die vorangegangenen Experimente machten eine massive Intensitätsminderung durch Blut bzw. Plasma deutlich. Um diese Effekte zu verringern, sollte die SPE-Kartusche nach erfolgtem Analyttransfer gespült werden. Hierfür wurden verschiedene methanolische Waschlösungen getestet, die sich hinsichtlich ihres organischen Anteils (50 – 97 %) unterschieden. Der Spülschritt wurde mit einer Flussrate von 500 µl/min und einem Volumen von 500 µl durchgeführt.

In einem *Post-Column*-Experiment sollten die Waschlösungen zunächst auf ihre Eignung, Matrixbestandteile von der SPE-Kartusche zu entfernen, untersucht werden.

Abbildung 4-12 zeigt die unter den getesteten Bedingungen erhaltenen TI-Chromatogramme sowohl für Blut- als auch für Plasmamatrix.

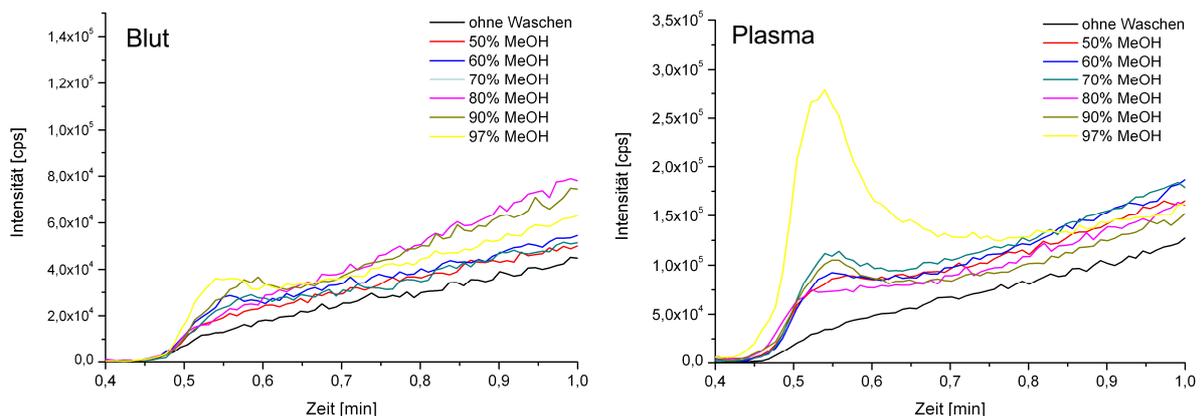


Abbildung 4-12: TI-Chromatogramm des *Post-Column*-Infusionsexperiments zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung einer chromatographischen Trennung: Einfluss des methanolischen Anteils in der Waschlösung auf die Matrixeffekte in Blut und Plasma

Waschen der SPE-Kartusche mit Methanol hatte sowohl bei Blut- als auch bei Plasmamatrix einen geringen Effekt auf die Analytintensitäten. In Blut wurde das beste Ergebnis mit einer 80 % methanolischen Waschlösung erreicht, in Plasma mit einer 60 %igen methanolischen Lösung.

Aus den Versuchen zur Optimierung der Transferbedingungen ließ sich bereits ersehen, dass ein Methanolgehalt von 70 % keine ausreichende Retention der Analyten auf der SPE-Kartusche ermöglichte, wobei 60 % Methanol sowohl die Retention gewährleistete als auch einen gering positiven Einfluss auf Matrixeffekte aufwies (vgl. Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8). Aus diesen Gründen wurde in weiteren Versuchen ein Waschschrift der SPE-Kartusche mit 60% MeOH in die Methode eingefügt.

4.4 Untersuchung von Verschleppungseffekten

Zur Untersuchung der Verschleppungseffekte (*carry over*) wurden eine Standardprobe (1 µg/ml in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]) und nachfolgend eine Leerkartusche (*blank*) analysiert. Die Verschleppung für jeden Analyten wurde als prozentualer Anteil der Peakfläche des *blank* von der der Standardprobe angegeben (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: prozentuale Verschleppung der Analyten ohne Spülschritt

	Verschleppung [%]
4.4.1.1.1 TRL	6,6 – 9,6
SRL	8,0 – 10,6
RAD	8,4 – 9,2
CSA	8,0 – 9,5
Anidulafungin	8,7 – 10,4
Ascomycin	7,2 – 9,6
13c2d4RAD	8,2 – 9,9
d12CSA	7,6 – 8,1
CSD	10,2 – 10,8

Da für keinen deutliche Verschleppungseffekte beobachtet wurden, sollte in diesem Versuchsteil durch Spülen von V1 mit eingesetzter Filterkartusche sowie von V4 mit eingesetzter SPE-Kartusche die Verschleppung minimiert werden. Verschiedene Eluenten wurden hierfür getestet, die sich zum einen in ihrer organischen Komponente (MeOH, Isopropanol oder ACN) sowie im Anteil der organischen Komponente (50 – 97 %) unterschieden. Flussrate (1000 µl/min) und Volumen (1000 µl) blieben zunächst unverändert. Analysiert wurden jeweils eine Standardprobe (1 µg/ml in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]) und nachfolgend eine Leerkartusche. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 4-6: prozentuale Verschleppung der Analyten nach Spülen der Ventile V1 und V2 mit variierten Spüleküenten; Spül-Volumen: 1000 µl; Spül-Flussrate: 1000 µl/min

	TRL	SRL	RAD	CSA	Anidulafungin	Ascomycin	d12CSA	13c2d4RAD	CSD
50/50 MeOH/H₂O	8,55	10,6	9,44	8,40	19,03	8,50	7,92	9,49	9,13
70/30 MeOH/H₂O	0,72	0,53	0,71	0,58	2,27	0,56	0,46	0,55	0,59
80/20 MeOH/H₂O	0,31	0,20	0,26	0,16	3,74	0,33	0,16	0,22	0,23
97/03 MeOH/H₂O	0,24	0,16	0,20	0,14	0,60	0,27	0,16	0,17	0,18
50/50 Isopr/ H₂O	0,99	2,61	2,76	3,33	7,93	1,11	3,05	2,67	3,99
70/30 Isopr/ H₂O	0,34	0,17	0,22	0,25	1,03	0,31	0,14	0,12	0,13
80/20 Isopr/ H₂O	0,28	0,20	0,23	0,20	1,70	0,32	0,15	0,18	0,12
97/03 Isopr/ H₂O	0,38	0,35	0,36	0,33	0,96	0,42	0,00	0,23	0,27
50/50 ACN/ H₂O	0,40	0,31	0,36	0,40	5,77	0,37	0,35	0,25	0,59
70/30 ACN/ H₂O	0,36	0,21	0,19	0,30	0,77	0,43	0,21	0,23	0,18
80/20 ACN/ H₂O	0,35	0,24	0,14	0,25	0,52	0,35	0,16	0,25	0,19
97/03 ACN/ H₂O	0,31	0,17	0,18	0,31	1,19	0,34	0,27	0,23	0,29

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass durch 50 % MeOH im Spül-Eluenten die Verschleppung nicht verringert werden konnte. Im Falle des Anidulafungin führte das Spülen mit diesem Eluenten sogar zu einer deutlichen Verstärkung der Verschleppung. Eine weitere Erhöhung des MeOH-Anteils äußerte sich jedoch bei allen Analyten in einer Reduktion der ermittelten Verschleppung.

Bei der Verwendung von Isopropanol und Acetonitril waren ähnliche Effekte zu beobachten. In beiden Fällen zeigte ein organischer Anteil von 50 % den geringsten Effekt auf die prozentuale Verschleppung, wobei bei diesem Anteil ACN die besseren Ergebnisse lieferte. Für Anidulafungin wurde beobachtet, dass eine Erhöhung des ACN-Anteils von 80% auf 97 % insgesamt zu vermehrter Verschleppung führte.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für Anidulafungin und die Immunsuppressiva die optimale Zusammensetzung des Spül-Eluenten ausgewählt. Für die Immunsuppressiva wurde die geringste Verschleppung bei einer Eluentzusammensetzung von 97/3 MeOH/H₂O [v/v], für Anidulafungin von 80/20 ACN/H₂O [v/v] ermittelt. In einem weiteren Versuch sollten nun die optimale Kombination aus Flussrate und Volumen bestimmt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse für Immunsuppressiva und Anidulafungin wurden beide Substanzgruppen für diesen Versuch getrennt untersucht. Wie in dem vorherigen Versuch wurden zunächst eine Standardprobe und anschließend eine leere Kartusche analysiert. Es ergaben sich die in Tabelle 4-7 und Tabelle 4-8 zusammengefassten Ergebnisse.

Ergebnisse

Tabelle 4-7: prozentuale Verschleppung der Immunsuppressiva und der internen Standards mit der optimierten Spüllufluent-Zusammensetzung

		TRL	SRL	RAD	CSA	Ascomycin	d12CSA	13c2d4 RAD	CSD
97/3 MeOH/H ₂ O	3000 µl/min 500 µl	0,37	0,23	0,30	0,25	0,37	0,39	0,29	0,21
	3000 µl/min 1000 µl	0,24	0,16	0,20	0,14	0,27	0,16	0,17	0,18
	3000 µl/min 2000 µl	0,65	0,39	0,36	0,49	0,62	0,89	0,41	0,48
	300 µl/min 2000 µl	0,27	0,25	0,15	0,17	0,29	0,15	0,17	0,13

Tabelle 4-8: prozentuale Verschleppung von Anidulafungin und Ascomycin mit der optimierten Spüllufluent-Zusammensetzung

		Anidulafungin	Ascomycin
80/20 ACN/H ₂ O	3000 µl/min 500 µl	1,04	0,50
	3000 µl/min 1000 µl	0,72	0,50
	3000 µl/min 2000 µl	0,18	0,33
	300 µl/min 2000 µl	0,35	0,44

Für die Immunsuppressiva (TRL, SRL, RAD, CSA) und ihre internen Standards (Ascomycin, d12CSA, 13c2d4RAD und CSD) ergab sich unter Verwendung von 97 % MeOH eine optimale Flussrate von 3000 µl/min und ein Volumen von 1000 µl. Unter diesen Bedingungen lag der Anteil der Verschleppungen zwischen 0,14 und 0,27 %. Anidulafungin wies unter 80 % ACN die geringste Verschleppung bei einer Flussrate von 3000 µl/min und einem Volumen von 2000 µl auf (0,18 %). Für Ascomycin, das als interner Standard sowohl für die Immunsuppressiva als auch für Anidulafungin verwendet werden sollte, wurde die Verschleppung unter beiden Bedingungen untersucht. Sie betrug unter methanolischen Bedingungen 0,27 %, unter ACN 0,33 %. Abbildung 4-13 stellt die *blanks* gegenüber, die ohne Spülschritt (linke Seite) sowie unter optimierten Bedingungen (rechte Seite) gemessen wurden. In dieser Abbildung wird, unter Beachtung der unterschiedlichen Intensitäten, deutlich, dass sich die für Anidulafungin berechnete Verschleppung von 0,18 % bereits durch die Integration des Grundrauschens ergab.

Ergebnisse

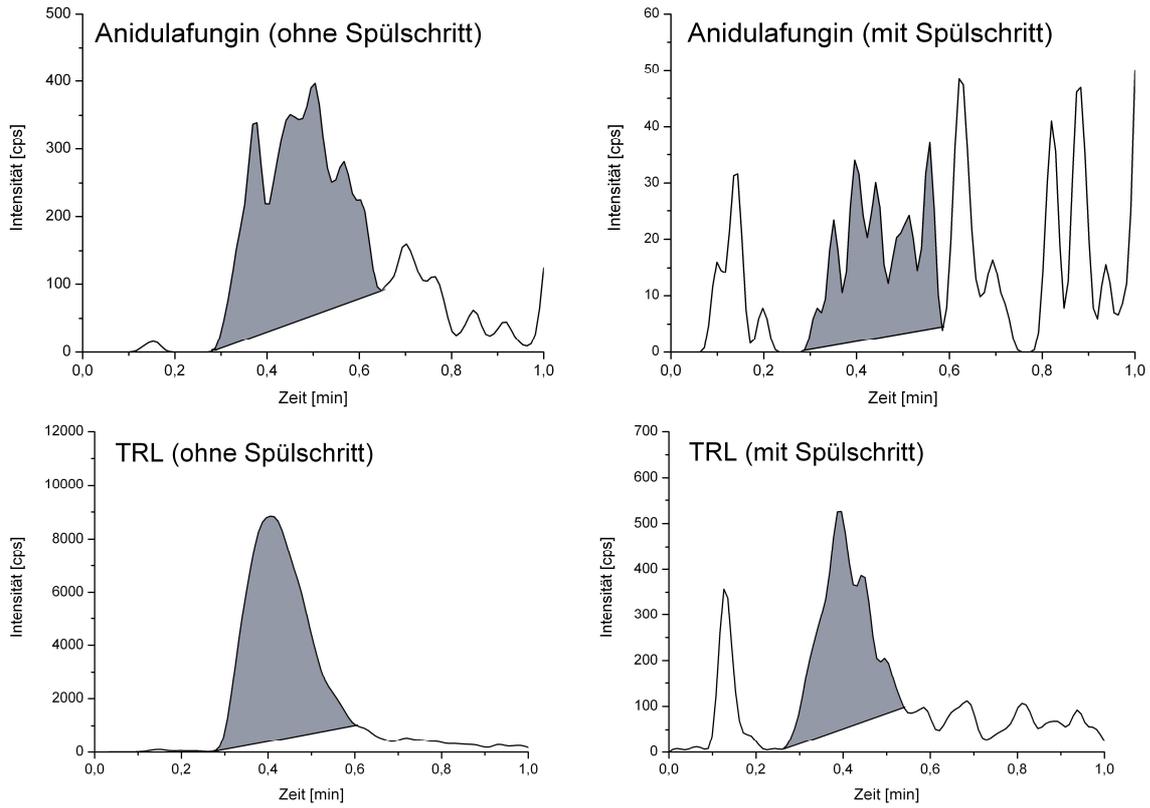


Abbildung 4-13: Minimierung der Verschleppungseffekte: Analytpeaks im *blank* mit und ohne Spülschritt (exemplarisch für Tacrolimus und Anidulafungin gezeigt); grau hinterlegt: zur Berechnung der Verschleppung herangezogene Peakfläche

4.5 Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule

Die Elution der Analyten von der SPE-Kartusche und darauffolgende Auftrennung auf der HPLC-Säule wurde analog zu der Routinemethode mit 97 % MeOH durchgeführt. Als Additive im HPLC-Eluenten wurden 1 mM NH_4Oac und 0,05 % Hac verwendet. Der Versuchsaufbau ist 3.8.3.1 dargestellt. Die so erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 4-14 gezeigt.

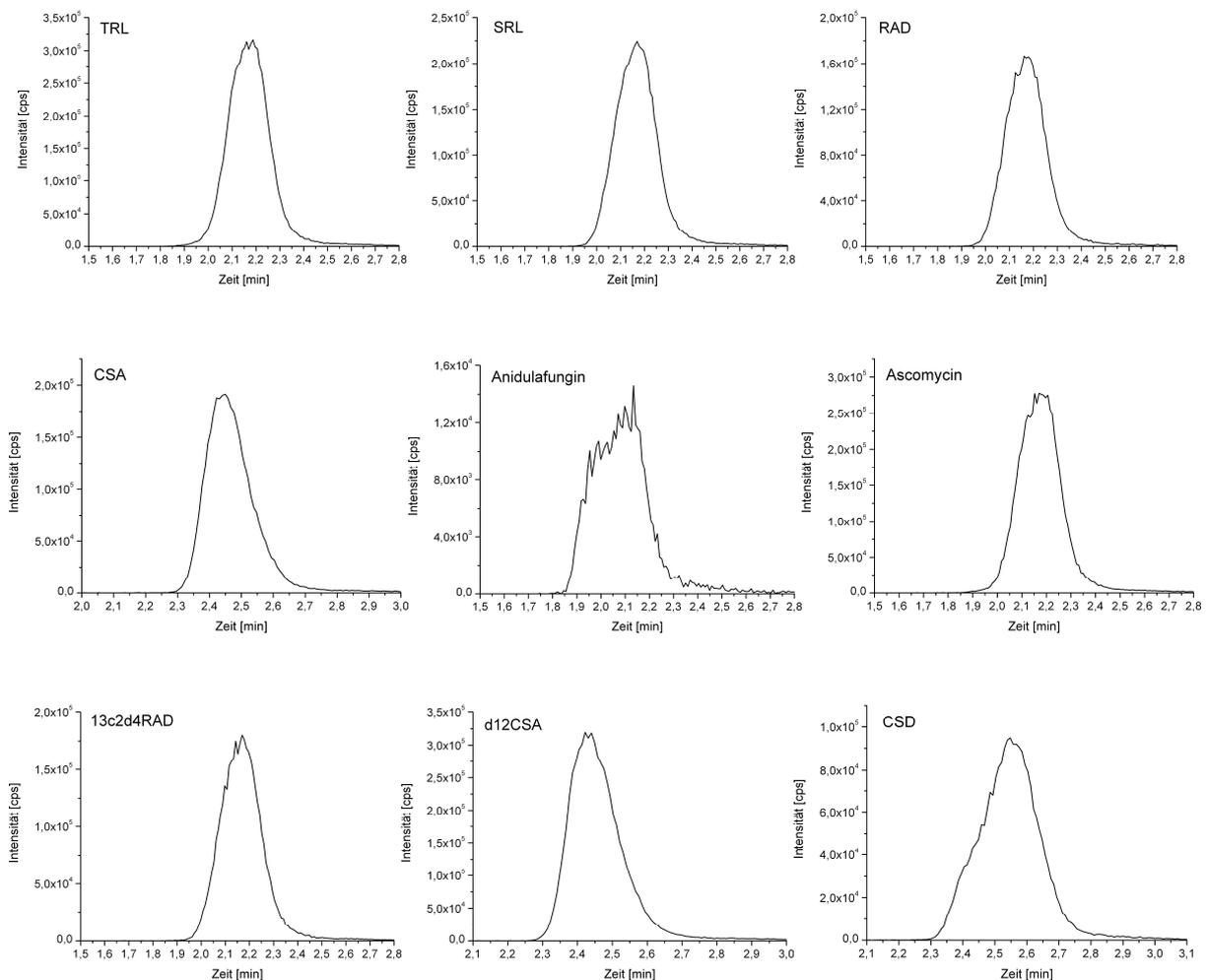


Abbildung 4-14: Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule - Chromatogramme aller Analyten; die Elution wurde durchgeführt mit 97% MeOH (1 mM NH_4Oac , 0,05% Hac) und einer Flussrate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$

Das Elutionsfenster der Analyten lag zwischen 1,8 und 2,6 min. Die Analytpeaks von CSA und d12CSA wiesen ein symmetrisches Profil mit Peakbreiten von 0,4 min auf. Die übrigen Analyten zeigten breitere (0,5 – 0,7 min) Peaks mit einer unsymmetrischen Form. Zur Verbesserung der Peakform sowie zur Verringerung der Peakbreite kann u.a. eine Fokussierung der Analyten auf der HPLC-Säule durchgeführt werden. Hierbei werden

Ergebnisse

Bedingungen gewählt, unter denen die Analyten auf der analytischen Säule retinieren. Durch geeignete Änderung der Bedingungen erfolgt dann die Elution.

Wie das Ergebnis der Optimierung des Analyttransfers von dem Filtermaterial (Kapitel 4.2) auf die SPE-Kartusche gezeigt hat, erfolgte unter 80 % Methanol keine Retention der Analyten auf der SPE-Kartusche. Unter dieser Bedingung können die Analyten demnach von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule transferiert werden. Auf dieser führte jedoch ein MeOH-Anteil von 80 % zu einer Retention der Analyten. Daher wurde diese Eluentzusammensetzung gewählt, um die Analyten von der SPE auf die HPLC-Säule zu transferieren und dort zu fokussieren. Zunächst sollte untersucht werden, welche Flussrate und Elutionsdauer für eine vollständige Elution der Analyten von der SPE-Kartusche notwendig war. Als Eluent wurde 80/20 MeOH/H₂O [v/v] mit den Zusätzen 1 mM NH₄Oac und 0,05% Hac verwendet. Flussraten von 300 bis 600 µl/min wurden getestet. Die Detektion erfolgte im SRM-Modus. Der verwendete Versuchsaufbau ist in Kapitel 3.8.5.2, die erhaltenen TICs in Abbildung 4-15 gezeigt.

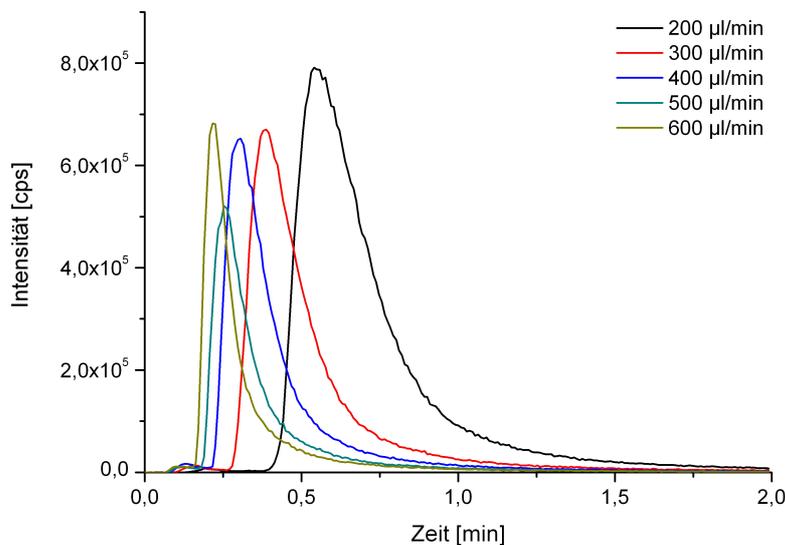


Abbildung 4-15: Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule – Elutionsprofil (dargestellt als TIC) in Abhängigkeit von der Flussrate; Eluent: 80% MeOH (1 mM NH₄Oac und 0,05% Hac)

Wie Abbildung 4-15 zeigt ließ sich abhängig von der Flussrate die Elutionsdauer verkürzen. So war eine vollständige Elution bei einer Flussrate von 200 µl/min nach ca. 1,5 min und bei einer Flussrate von 600 µl/min bereits nach 0,75 min erreicht. Um einen zu hohen Rückdruck zu vermeiden, wurde eine Flussrate von 500 µl/min gewählt, um die Analyten von der SPE auf die HPLC-Säule zu transferieren. Bei dieser Flussrate war eine Elution der Analyten nach ebenfalls 0,75 min erreicht.

Ergebnisse

In einem weiteren Schritt wurden die Analyten unter Verwendung von 80% MeOH von der SPE auf die HPLC-Säule transferiert. Die Transferzeit betrug 45 Sekunden. Eine Elution der Analyten von dieser Säule erfolgte dann mit dem höher organischen Eluenten 97/3 [v/v] MeOH 1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac und einer Flussrate von 300 µl/min. Unter diesen Bedingungen ergaben sich die folgenden Chromatogramme (Abbildung 4-16):

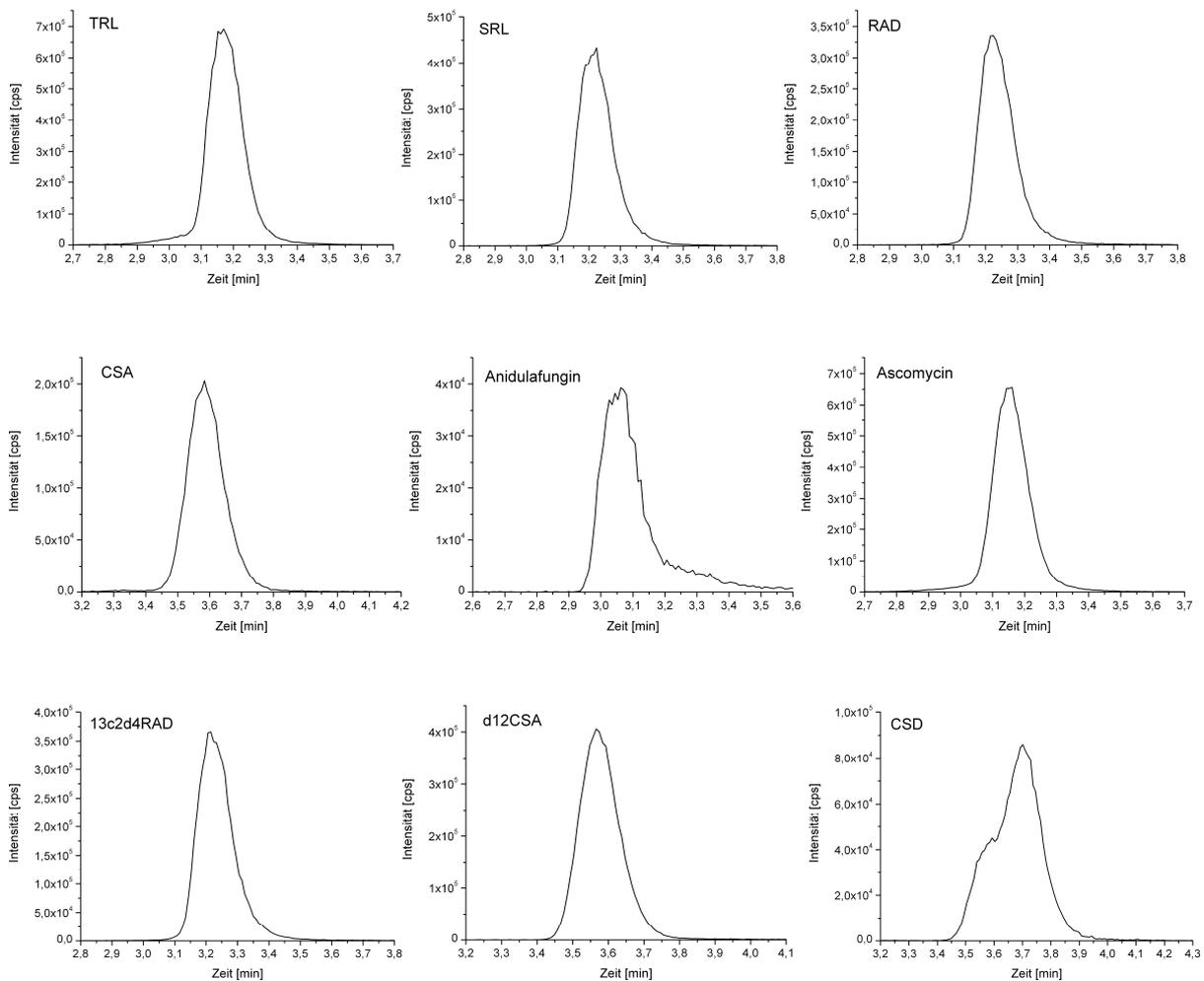


Abbildung 4-16: Optimierung des Analyttransfers von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule - Chromatogramme aller Analyten nach Fokussieren auf der analytischen Säule; die Fokussierung wurde durchgeführt mit 80 % MeOH (1 mM NH₄Oac, 0,05% Hac) und einer Flussrate von 500 µl/min, die Elution erfolgte mit 97 % MeOH (1 mM NH₄Oac, 0,05% Hac) und einer Flussrate von 300 µl/min

Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Peaks weisen in der Regel eine symmetrische Form auf. Eine Ausnahme sind CSD und Anidulafungin. Der CSD-Peak zeigt eine vorgelagerte Schulter (Retentionszeit 3,59 min), während der Peak von Anidulafungin eine weniger steile abfallende als ansteigende Signalfanke (*tailing*) aufweist. Die Retentionszeiten aller Analyten liegen zwischen 2,9 und 3,7 min. Im Vergleich zu dem vorherigen Versuch wiesen die Analyten schmalere Peaks mit Breiten von 0,3 bis 0,5 min auf.

4.6 Die optimierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorherigen Versuche wurde eine optimierte Methode zur Quantifizierung der zu untersuchenden Immunsuppressiva und Anidulafungin entwickelt. Um eine Verunreinigung des Massenspektrometers zu minimieren, wurde zunächst eine weitere Ventilschaltung in die bestehende Methode integriert. Hierbei wurde das Eluat der analytischen Säule nicht während des gesamten Elutionszeitraums in das Massenspektrometer geleitet, sondern ausschließlich in einem festgelegten Zeitfenster von 1,5 min, in dem die Analyten von der analytischen Säule eluieren. Der schematische Versuchsaufbau der so optimierten Methode ist in Abbildung 4-17 gezeigt. Tabelle 4-9 fasst die wesentlichen Schritte der Methode zusammen.

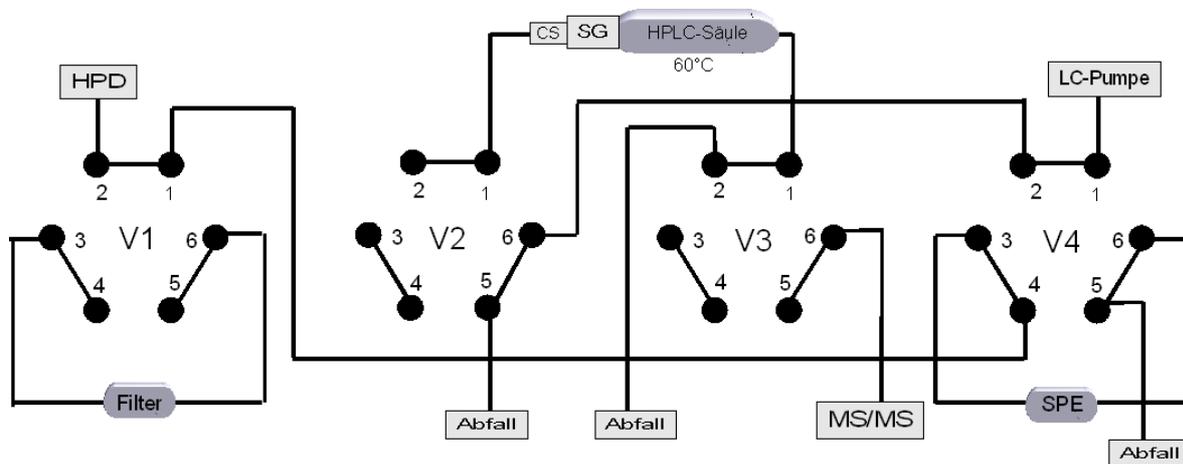


Abbildung 4-17: schematischer Versuchsaufbau der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode: HPD: *High Pressure Dispenser*, CS: *Column Saver*, SG: *Security Guard*

Ergebnisse

Tabelle 4-9: Optimierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Immunsuppressiva bzw. Anidulafungin

	V1	V2	V3	V4	Eluent	Flussrate / Volumen
Konditionierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	ACN (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Equilibrierung der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	5000 µl/min 1000 µl
Probentransfer	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	300 µl/min 500 µl
Waschen der SPE-Kartusche	1 – 2	6 – 1	1 – 2	1 – 2	60/40 MeOH/H ₂ O	500 µl/min 500 µl
Elution von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule	1 – 2	6 – 1	1 – 2	6 – 1	80/20 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	500 µl/min 0,75 min
Elution von der analytischen Säule in das MS	1 – 2	6 – 1	1 – 2 nach 1' 6 – 1	6 – 1	97/ 3 MeOH/H ₂ O 1 mM NH ₄ Oac 0,05% Hac (LC-Pumpe)	300 µl/min 4,25 min
Spülen der Filter- und SPE-Kartusche	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	80/20 ACN/H ₂ O bzw. 97/3 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl bzw. 3000 µl/min 2000 µl
Reequilibrierung der Kapillaren	6 – 1	6 – 1	1 – 2	1 – 2	40/60 MeOH/H ₂ O (HPD)	3000 µl/min 1000 µl

Die Methode beinhaltet als wesentliche Schritte den Analyttransfer von dem Filtermaterial auf die SPE-Kartusche (Oasis[®] HLB; 10 x 2 mm; 30 µm), das Fokussieren der Analyten auf der analytischen Säule (Nucleodur C18 Gravity, 4,6 x 50 mm; 5 µm) sowie die Elution der Analyten von der analytischen Säule. Um die Verschleppung zu minimieren, erfolgte am Ende der Analyse ein Waschschrift. Dieser unterscheidet sich für Anidulafungin und die Immunsuppressiva sowohl in der Eluentzusammensetzung (Immunsuppressiva: 97/3 MeOH/H₂O; Anidulafungin: 80/20 ACN/H₂O) als auch im Waschvolumen (Immunsuppressiva 1000 µl; Anidulafungin 2000 µl).

Abbildung 4-18 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm der Immunsuppressiva und ihrer internen Standards sowie von Anidulafungin mit Ascomycin als internem Standard. Die Retentionszeiten der Analyten (t_R) sowie die Peakbreiten (PW) wurden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Ergebnisse

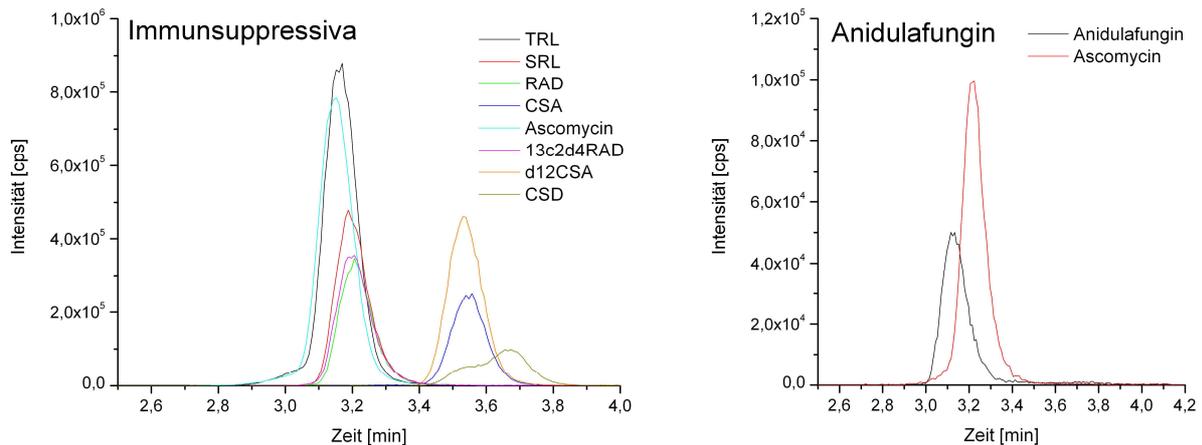


Abbildung 4-18: die optimierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode: Charakteristische Chromatogramme aller Analyten; Immunsuppressiva: 10 µl einer 1 µg/ml-Lösung (in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]); Anidulafungin: 10 µl einer 1 ng/ml (in 50/50 MeOH/H₂O [v/v]); die Ascomycin-Konzentration betrug für die Anidulafungin-Analyse 30 ng/ml (50/50 MeOH/H₂O [v/v])

Tabelle 4-10: charakteristische Retentionszeiten und Peakbreiten der Analyten

	Immunsuppressiva-Analyse		Anidulafungin-Analyse	
	Retentionszeit <i>t_R</i> [min]	Peakbreite auf halber Höhe; PW [min]	Retentionszeit <i>t_R</i> [min]	Peakbreite auf halber Höhe; PW [min]
TRL	3,16	0,45	-	-
SRL	3,2	0,414	-	-
RAD	3,21	0,369	-	-
CSA	3,55	0,414	-	-
Anidulafungin	-	-	3,13	0,405
Ascomycin	3,15	0,468	3,22	0,441
13c2d4RAD	3,2	0,468	-	-
d12CSA	3,54	0,293	-	-
CSD	3,67	0,495	-	-

Die Immunsuppressiva und die internen Standards ließen sich anhand ihrer Retentionszeiten in zwei Gruppen unterteilen. TRL, SRL, RAD, Ascomycin und 13c2d4RAD eluieren nach 3,2 min, wobei sowohl TRL als auch Ascomycin eine breitere Peakform als die übrigen Analyten dieser Gruppe aufweisen. Die Retentionszeit von CSA und d12CSA beträgt 3,6 min, während das CSD-Signal nach 3,7 min sein Maximum erreicht.

Anidulafungin eluierte nach 3,1 min von der analytischen Säule und damit 0,1 min früher als der interne Standard Ascomycin.

4.7 Einfluss der Trocknungszeit auf die MS-Signalintensitäten

Um den Einfluss der Trocknungszeit des Probenmaterials auf der Filterkartusche auf das Messergebnis zu bestimmen, wurde ein Analytengemisch zunächst in Standardlösung (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) auf die Filterkartuschen aufgetragen und nach unterschiedlichen Trocknungszeiten (0 – 120 h) mit der optimierten Methode analysiert. Die Analytpeakflächen wurden ermittelt und auf den t-0-Wert normiert. Abbildung 4-19 zeigt die relativen Peakflächen der Analyten in Abhängigkeit von der Trocknungszeit.

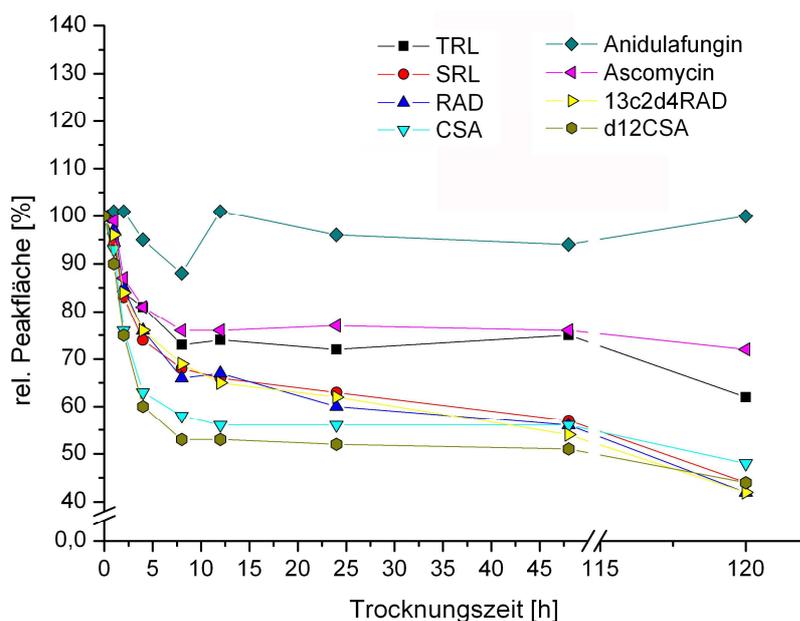


Abbildung 4-19: Einfluss der Trocknungszeit auf die Analytpeakflächen: prozentuale Analytpeakflächen extrahiert aus einem Standardgemisch (1 µg/ml in 50/05 MeOH/H₂O [v/v]) nach unterschiedlichen Probentrocknungszeiten (t = 0 – 120 Stunden), normiert auf den t-0-Wert.

In der ersten Trocknungsphase (0 – 8 h) nahm die Peakfläche zunächst stark ab, wobei das Ausmaß der Abnahme eine Analytabhängigkeit zeigte. Die stärkste Abnahme war bei CSA (58 %) und d12CSA (53 %) zu beobachten, während die Peakflächen bei SRL, RAD und 13c2d4RAD auf 68 %, 66 % bzw. 69 % abnahmen. Den geringsten Einfluss hatte die Trocknungszeit auf TRL (73 %), Ascomycin (76 %) und Anidulafungin (88 %). In der zweiten Trocknungsphase (8 – 48 h) wurden für alle Analyten gleichbleibende Intensitäten gemessen. Eine Ausnahme bildet das Anidulafungin, dessen Peakfläche nach 12 h wieder auf den Ausgangswert stieg. In der dritten Trocknungsphase (48 – 120 h) ist eine weitere Verringerung der Peakflächen auf bis zu 42 % (RAD, 13c2d4RAD) des Ausgangswertes zu erkennen.

Abbildung 4-20 stellt den Einfluss der Trocknungszeit auf das Verhältnis der Peakflächen von Analyt zu internem Standard dar. Soweit möglich wurden die isotonenmarkierten

Ergebnisse

Standards (13c2d4RAD, d12CSA) der Analyten verwendet. Ascomycin wurde sowohl als interner Standard für TRL und Anidulafungin verwendet als auch für SRL. Die Auswertung für SRL erfolgte zusätzlich mit 13c2d4RAD, da beide Substanzen ähnliche Retentionszeiten aufwiesen.

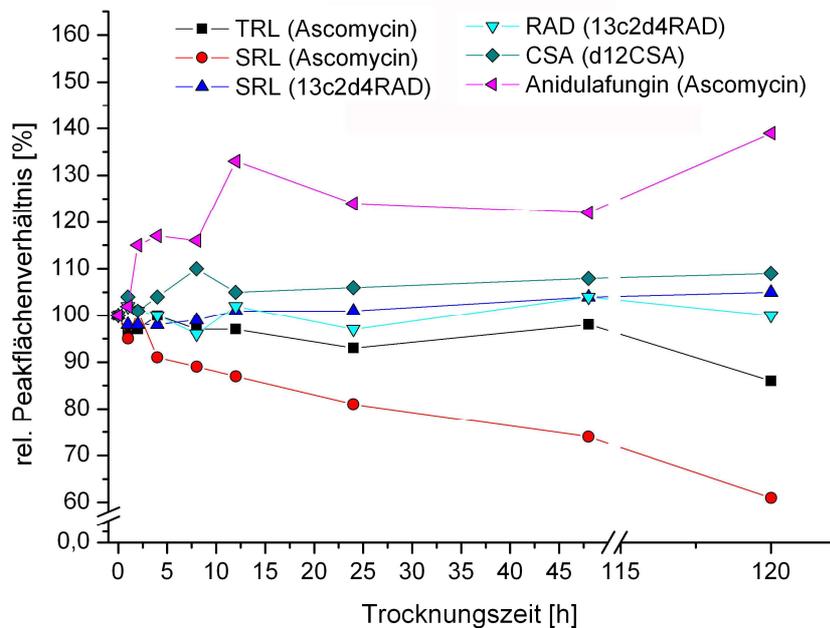


Abbildung 4-20: Einfluss der Trocknungszeit auf das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard (in runden Klammern angegeben): prozentuale Analytpeakflächen extrahiert aus einem Standardgemisch (1 µg/ml in 50/05 MeOH/H₂O [v/v]) nach unterschiedlichen Probentrocknungszeiten (t = 0 – 120 Stunden), normiert auf den t-0-Wert.

Das Diagramm zeigt ein annähernd konstantes Verhältnis von Analyt (TRL, RAD und CSA) zu internem Standard über den gesamten Trocknungszeitraum. Während das Verhältnis von SRL zu 13c2d4RAD ebenfalls konstant blieb, nahm es zu Ascomycin über die Zeit stetig bis auf 60 % ab. Das Peakflächenverhältnis von Anidulafungin zu Ascomycin zeigte im Verlauf des Trocknungsvorgangs einen Anstieg auf 139 %, wobei der Kurvenverlauf stark schwankte.

Analog zu oberen Versuchen wurde der Einfluss der Trocknungszeit auf die Peakflächen in Matrixproben (Blut bzw. Standard) untersucht. Hier ergaben sich folgende Ergebnisse (Abbildung 4-21):

Ergebnisse

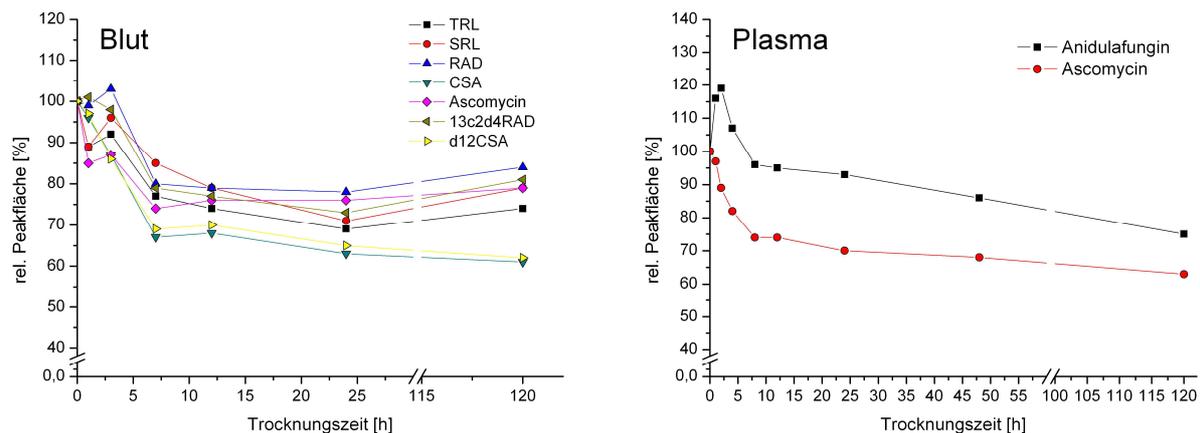


Abbildung 4-21: Einfluss der Trocknungszeit auf die Analytpeakflächen: prozentuale Analytpeakflächen extrahiert aus einem Analytgemisch (1 µg/ml in Blut bzw. in Plasma) nach unterschiedlichen Probentrocknungszeiten (t = 0 – 120 Stunden), normiert auf den t-0-Wert.

Beide Diagramme zeigen eine Abnahme der Peakflächen in den ersten zwölf Stunden nach Probenauftrag von im Mittel 25 %. Die Peakflächen der Immunsuppressiva und ihrer internen Standards in Blut blieben ab diesem Zeitpunkt annähernd konstant, während die Peakfläche von Ascomycin in Plasma auf 63 % weiter abnahm. Die Peakfläche von Anidulafungin stieg in den ersten zwei Stunden nach Probenauftrag zunächst auf 120 % des Ausgangswertes an, nahm im weiteren Versuchsverlauf jedoch auf 75 % ab, wobei der Kurvenverlauf dem des Ascomycins ähnelte.

Im Folgenden ist der Einfluss der Trocknungszeit auf den Quotienten aus Analytpeakfläche zu IS-Peakfläche gezeigt (Abbildung 4-22). Bei den Immunsuppressiva zeigte sich, dass dieser Quotient für alle Analyten über den gesamten Trocknungszeitraum annähernd konstant blieb. Wie jedoch an den Kurvenverläufen von SRL zu sehen ist, ergaben sich mit Ascomycin (rote Kurve) als internem Standard stärker schwankende Werte als mit 13c2d4RAD (blaue Kurve).

Der Quotient von Anidulafungin und Ascomycin zeigte ab einer Trocknungszeit von 12 h einen weitgehend stabilen Verlauf.

Ergebnisse

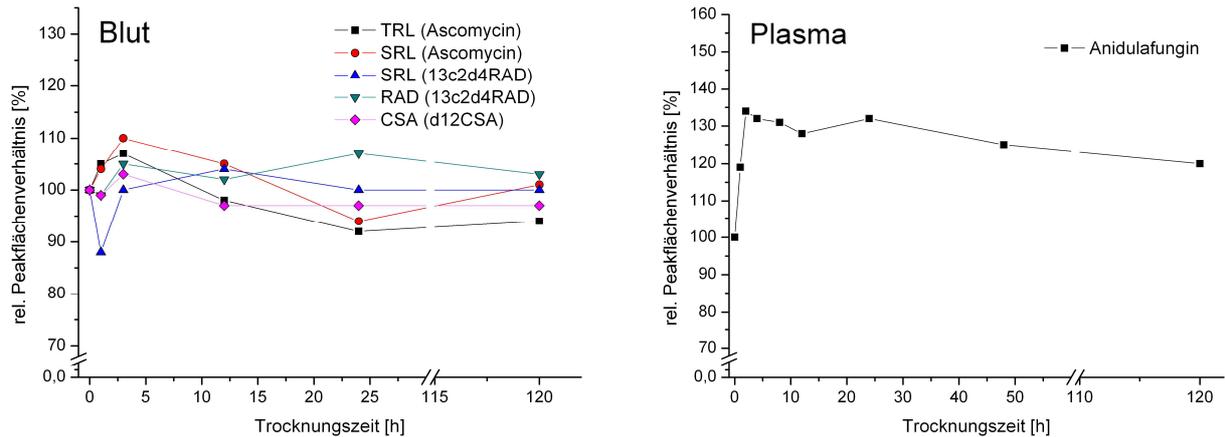


Abbildung 4-22: Einfluss der Trocknungszeit auf das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard: prozentuale Analytpeakflächen extrahiert aus einem Matrixgemisch (1 µg/ml in Blut bzw. Plasma) nach unterschiedlichen Probentrocknungszeiten (t = 0 – 120 Stunden), normiert auf den t-0-Wert.

4.8 Untersuchung von Matrixeffekten mittels *Post-Column*-Experimenten

Der in Abschnitt 3.8.6.2 beschriebene Versuchsaufbau wurde gewählt, um Matrixeffekte bei der optimierten Methode zu untersuchen. Ausgewertet wurden die Analytintensitäten, die mit der Leerkartusche, mit Blut- sowie mit Plasmamatrix gemessen wurden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 4-23 in Form von Totalionenchromatogrammen dargestellt. Zusätzlich sind die Retentionszeitfenster der Analyten gezeigt.

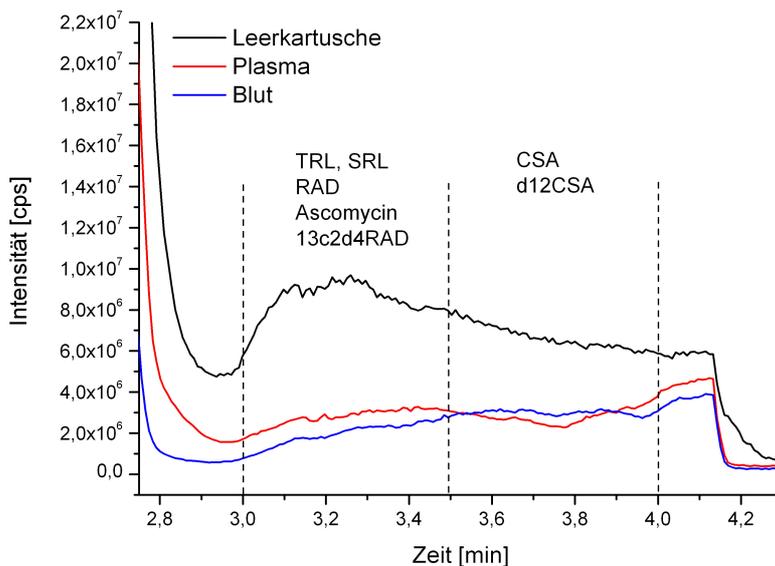


Abbildung 4-23: *Post-Column*-Infusionsexperiment zur Untersuchung von Matrixeffekten der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode; Vergleich zwischen einer Leerkartusche und Blut- bzw. Plasmamatrix; dargestellt sind weiterhin die Retentionszeitfenster der Analyten (gestrichelte Linien)

Sowohl mit Blut- als auch mit Plasmamatrix wurden deutlich niedrigere Intensitäten detektiert als mit der Leerkartusche. Die Intensitäten waren im ersten Retentionszeitraum (3 – 3,5 min) um den Faktor 3, im zweiten Retentionszeitraum (3,5 – 4 min) um den Faktor 2 im Vergleich zur Leerkartusche erniedrigt. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Blut und Plasma festgestellt.

4.9 Analyse von Eichreihen mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode

4.9.1 Analyse von Standardreihen

Um eine Aussage über die Anwendbarkeit der optimierten Methode machen zu können, wurden Eichreihen der Analyten in Blut (Immunsuppressiva) bzw. Plasma (Anidulafungin) aufgenommen. Die Auswertung der Eichreihen wurde über das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard vorgenommen. Für die Immunsuppressiva erfolgte dieses sowohl über die in der Routinediagnostik eingesetzten Standards Ascomycin und CSD als auch über die neu getesteten isotoopenmarkierten Standards $^{13}\text{C}_2\text{d}_4\text{RAD}$ und d_{12}CSA . Für Anidulafungin wurde Ascomycin als interner Standard verwendet. Es stellte sich heraus, dass die besten Ergebnisse mittels quadratischer Regression und einem Wichtungsfaktor von $1/x$ erzielt wurden. Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 zeigten die erhaltenen Eichreihen mit den dazugehörigen Geradengleichungen und Korrelationsfaktoren (R^2). Der Korrelationsfaktor gibt an, wie gut die Eichkurve durch die Ausgleichgrade beschrieben werden kann, und stellt damit ein Maß für die Genauigkeit dieser dar. Für die Eichreihen ergaben sich Korrelationsfaktoren von $R^2 = 0,994 - 0,9999$.

Der Vergleich der mit den mit verschiedenen internen Standards ausgewerteten Eichreihen zeigte für CSA, RAD und TRL keinen signifikanten Unterschied im Korrelationsfaktor, wohingegen die Korrelationsfaktoren der SRL-Eichreihen $R^2 = 0,994$ ($^{13}\text{C}_2\text{d}_4\text{RAD}$) bzw. $R^2 = 0,9999$ (Ascomycin) betrugen.

Des Weiteren wurden die errechneten Konzentrationen der einzelnen Eichpunkte mit den Nominalkonzentrationen verglichen. Der daraus resultierende Prozentwert wird als Richtigkeit (*accuracy*) bezeichnet und sollte $\pm 15\%$ des Nominalwertes (bzw. $\pm 20\%$ für den kleinsten Eichreihenpunkt) betragen. In diesem Versuch wurden *accuracies* von 86 – 110 % ermittelt.

Ergebnisse

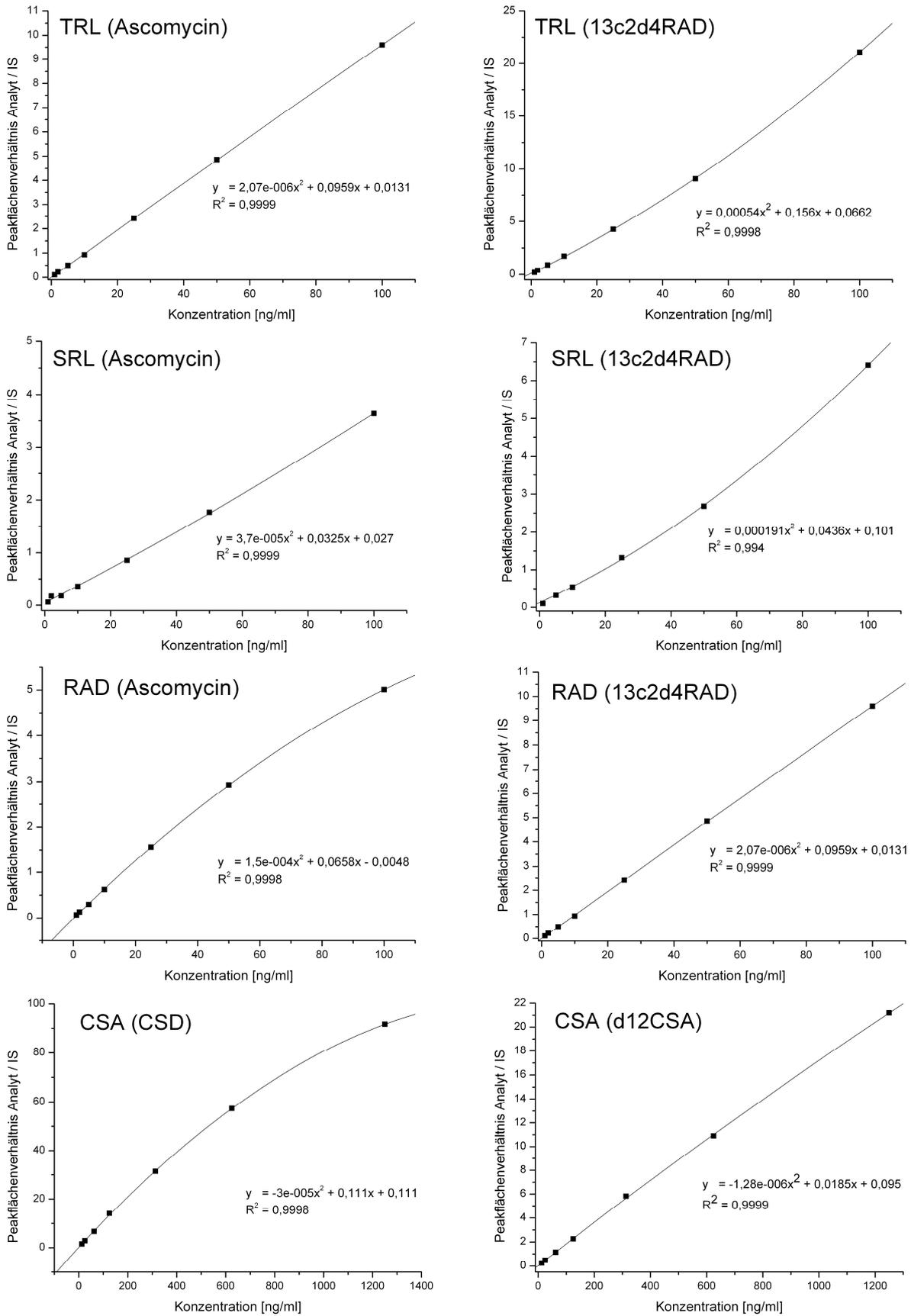


Abbildung 4-24: Standardeichreihen von TRL, SRL, RAD und CSA; der interne Standard wurde unmittelbar vor der Probe mittels Pipette auf die Filterkartusche aufgetragen.

Ergebnisse

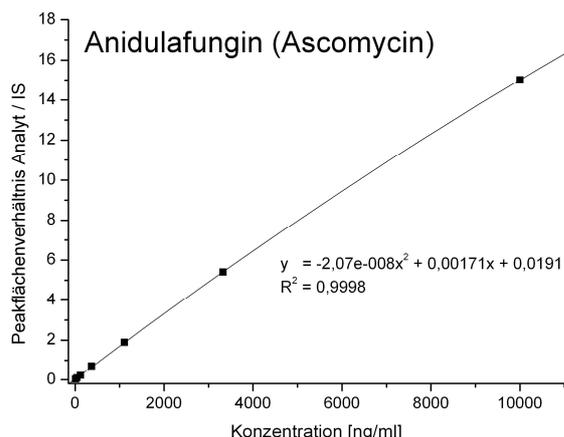


Abbildung 4-25: Standardreihe von Anidulafungin; der interne Standard wurde unmittelbar vor der Probe mittels Pipette auf die Filterkartusche aufgetragen.

In gleicher Weise wurden Eichreihen in Blut- bzw. Plasmamatrix analysiert. Die wichtigsten Parameter hierfür sind in Tabelle 4-11 gezeigt.

Tabelle 4-11: Parameter der Matrixeichreihen (Blut bzw. Plasma) von TRL, SRL, RAD, CSA und Anidulafungin

	<i>Interner Standard</i>	<i>Matrix</i>	<i>Geradengleichung</i>	<i>Korrelationsfaktor; R²</i>
TRL	Ascomycin	Blut	$Y = 2,99e-005x^2 + 0,106x + 0,0248$	0,9996
SRL	Ascomycin	Blut	$Y = 3,7e-005x^2 + 0,0325x + 0,027$	0,9999
SRL	13c2d4RAD	Blut	$Y = 1,8e-004x^2 + 0,0449x + 0,0576$	0,9998
RAD	13c2d4RAD	Blut	$Y = 2,07e-006x^2 + 0,0959x + 0,0131$	0,9999
CSA	d12CSA	Blut	$Y = -1,28e-006x^2 + 0,0185x + 0,0095$	0,9999
Anidulafungin	Ascomycin	Plasma	$Y = -2,07e-008x^2 + 0,00171x - 0,0191$	0,9998

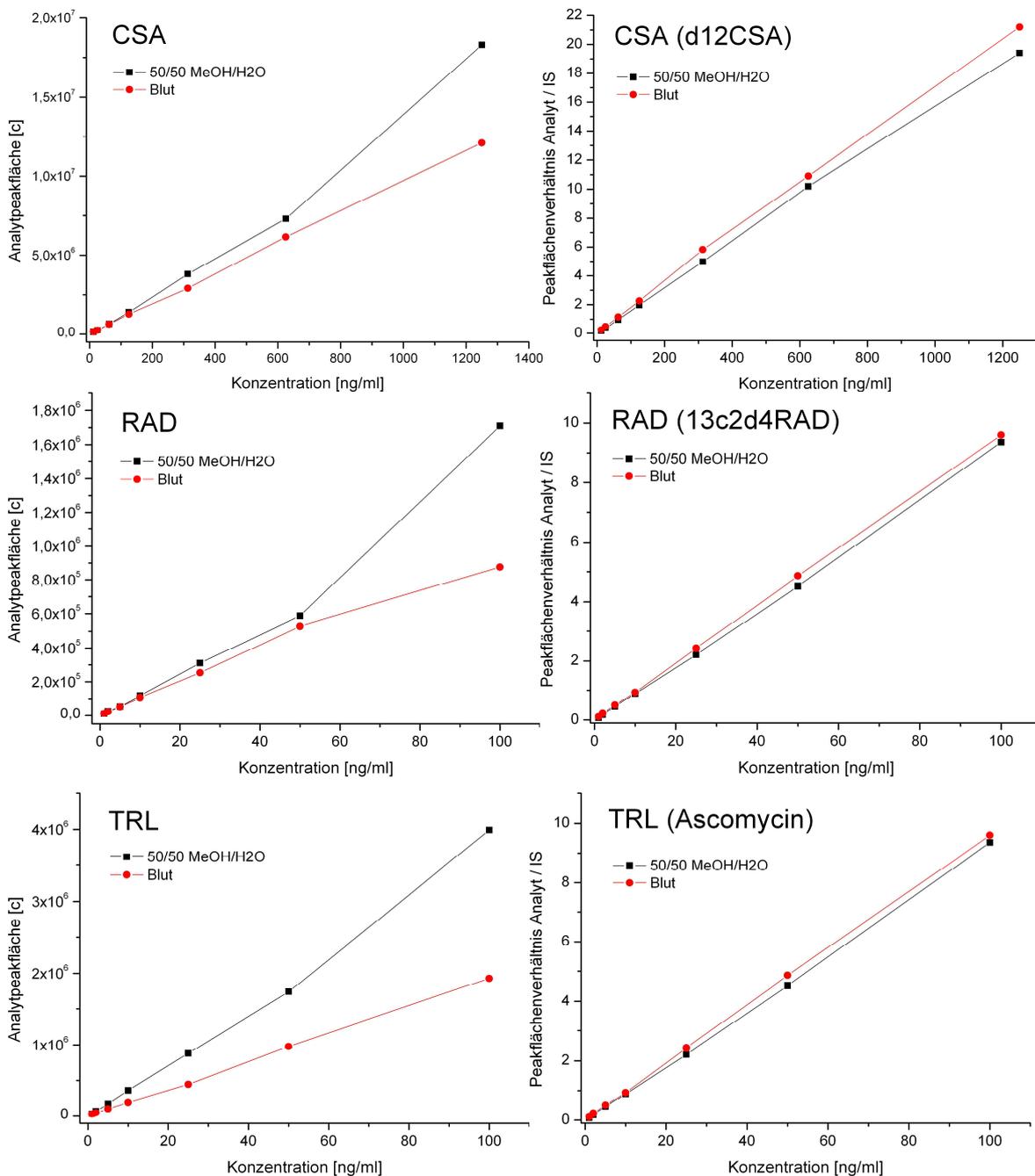
4.9.2 Vergleich von Standard- und Matrixeichreihen

Um die optimierte Methode auf Matrixeffekte zu untersuchen, wurden Standard- (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) und Matrixeichreihen (Blut bzw. Plasma) miteinander verglichen, welche zum einen über die Analytpeakfläche und zum anderen über das Verhältnis von Analytpeakfläche zu IS-Peakfläche erstellt wurden. Das Ergebnis für TRL, RAD, SRL und CSA ist in Abbildung 4-26, für Anidulafungin in Abbildung 4-27 gezeigt. Aufgrund der Resultate aus dem vorherigen Versuch wurde für TRL und Anidulafungin der interne Standard Ascomycin verwendet. Die Eichreihen von RAD und CSA wurden mit den entsprechenden isopenmarkierten Standards ausgewertet. Im Falle des SRL wurden sowohl 13c2d4RAD als auch Ascomycin für die Auswertung herangezogen. Die Auswertung

Ergebnisse

ergab, dass die Analytpeakflächen in der Matrixreihe deutlich unter denen der Standardreihe lagen, was sich in einer geringeren Steigung der Matrixreihe äußerte. Am stärksten war dieser Effekt bei SRL und RAD ausgeprägt. Im Vergleich zur Standardmatrix sind die Peakflächen in biologischer Matrix um den Faktor 1,7 (SRL) bzw. 1,9 (RAD) kleiner.

Im Gegensatz dazu zeigten die über das Peakflächenverhältnis ausgewerteten Eichreihen im Falle der Immunsuppressiva in beiden Matrices nahezu gleiche Steigungen. Für SRL ergab sich, dass Standard- und Matrixreihe eine größere Übereinstimmung aufwiesen, wenn sie mit Ascomycin statt mit 13c2d4RAD ausgewertet wurden.



Ergebnisse

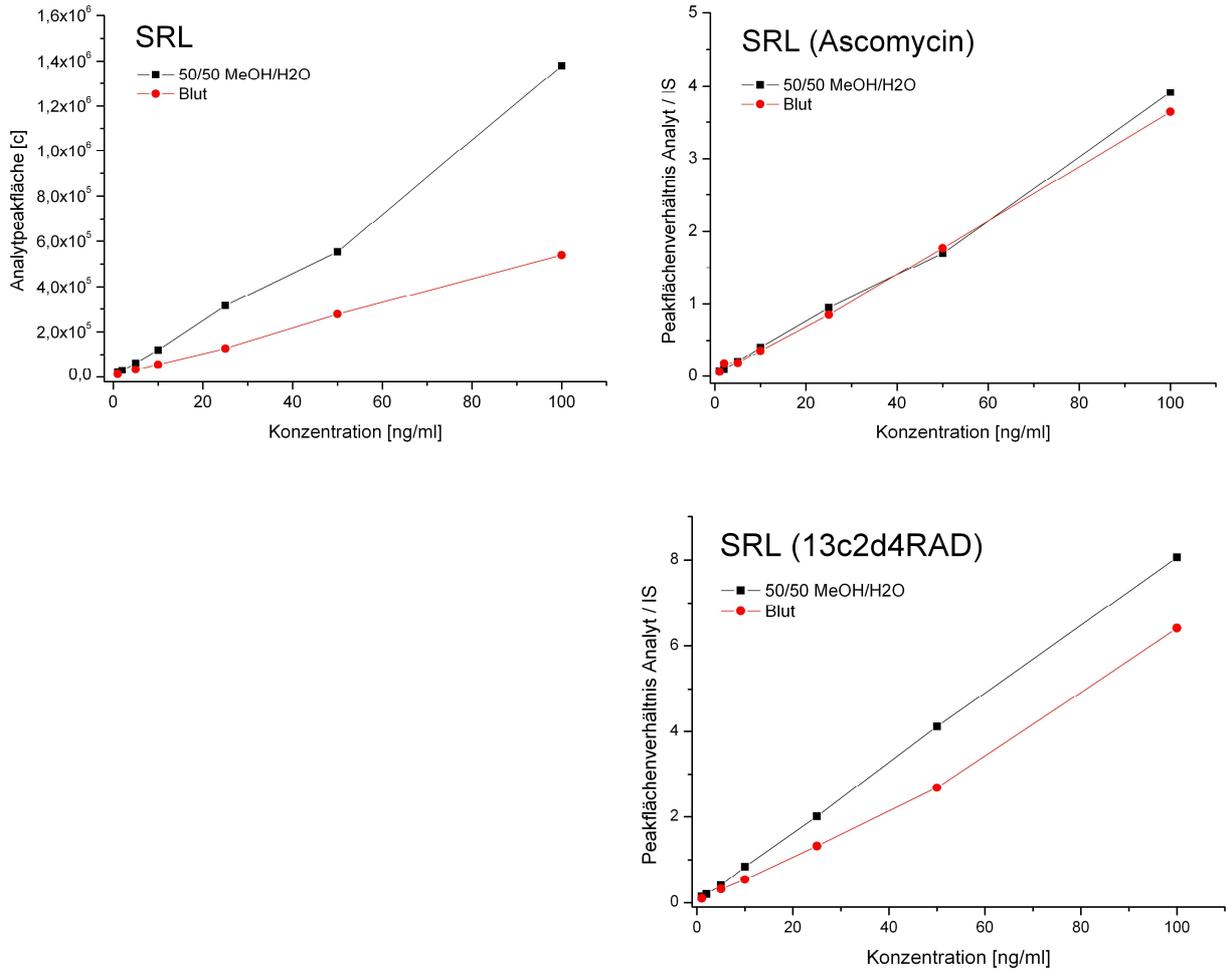


Abbildung 4-26: Vergleich von Standard- und Matriceichreihen der Immunsuppressiva (SRL, TRL, RAD, CSA) ausgewertet mit (rechts) und ohne internen Standard (links); der Auftrag des internen Standards erfolgte mittels Pipette unmittelbar vor dem Auftrag der Proben

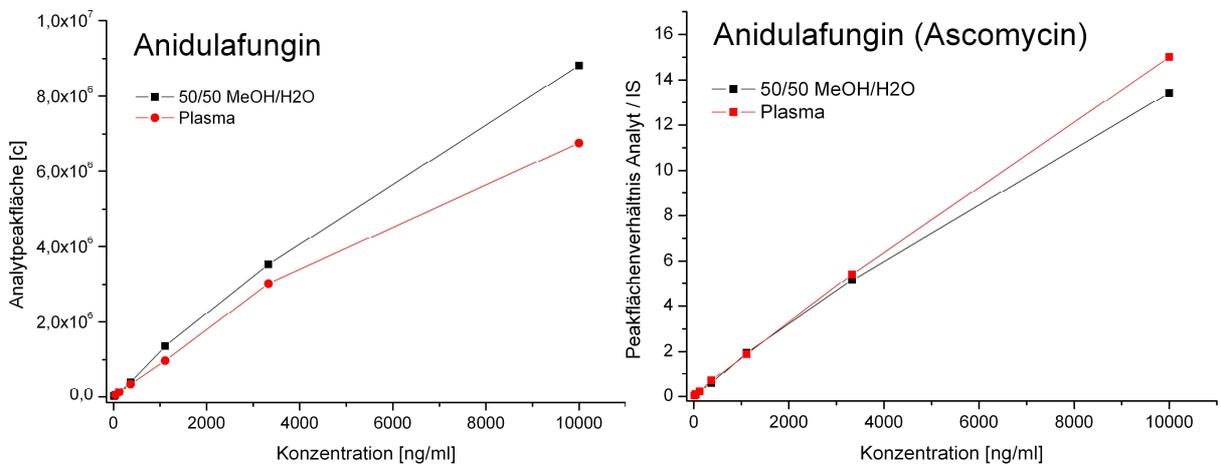


Abbildung 4-27: Vergleich von Standard- und Matriceichreihen von Anidulafungin, ausgewertet mit (rechts) und ohne internen Standard (links); der Auftrag des internen Standards erfolgte mittels Pipette unmittelbar vor dem Auftrag der Proben

4.10 Probenauftrag mittels Kapillarpipetten

Ziel der Arbeit war es, ein System zu entwickeln, mit der Transplantationspatienten in der Lage sind, regelmäßige Blutabnahmen selbstständig durchzuführen. Bestandteile dieses Systems sind zum einen die hier entwickelte SPE-HPLC-MS/MS-Methode, zum anderen ein geeignetes Probenahmesystem. Eine Möglichkeit, die Blutprobe auf das Filtermaterial aufzutragen, besteht in der Verwendung von Kapillarpipetten.

Daher sollte der Probenauftrag in diesem Versuchsteil mittels Kapillarpipette simuliert werden. Um die Kontrolle über die pipettierte Probenmenge zu gewährleisten, sollte der interne Standard auf die innere Oberfläche der Kapillare aufgebracht werden, so dass er beim Befüllen der Kapillare mit Blut in der Matrix wieder in Lösung geht und so zusammen mit dem Blut auf die Filterkartusche aufgetragen wird.

4.10.1 Untersuchungen zur Präparation der Kapillarpipetten

Zunächst sollte eine Methode entwickelt werden, den internen Standard auf die Kapillaroberfläche aufzubringen. Dazu wurden wie in 3.5.3. beschrieben IS-Lösungen (13c2d4RAD und d12CSA) in MeOH sowie ACN in den Kapillaren getrocknet, anschließend in Leerblut wieder gelöst, und mit der etablierten Routine-LC-MS/MS-Methode analysiert (s. 3.10). Für die Auswertung wurden die Peakflächen ermittelt. Auffällig war dabei, dass mit den mit ACN präparierten Kapillaren z.T. keine Analyten nachgewiesen werden konnten. Die mittlere Standardabweichung betrug daher 138 % (13c2d4RAD) bzw. 114 % (d12CSA).

Im Gegensatz dazu ließen sich in jeder der mit methanolischer Lösung präparierten Kapillaren die internen Standards nachweisen. Die mittlere Standardabweichung betrug für 13c2d4RAD 25 % für d12CSA 35 %. In Tabelle 4-12 sind diese Daten zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-12: relative Standardabweichung der internen Standards 13c2d4RAD und d12CSA nach Probenauftrag mittels Kapillarpipette

	13c2d4RAD		d12CSA	
	ACN	MeOH	ACN	MeOH
n	9	9	9	9
mittlere Peakfläche [c]	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	1×10^4	$1,3 \times 10^5$
R.S.D. [%]	138	114	25	35

Um zu untersuchen, ob sich die Analyten während des Trocknungsvorgangs gleichmäßig auf der Kapillarwand verteilen, wurden im folgenden Experiment die Kapillaren sowohl vollständig als auch unvollständig mit Blut befüllt und anschließend wie oben beschrieben analysiert. Dabei wurde eine mit Immunsuppressiva versetzte Blutprobe verwendet, so dass die Peakflächen der Immunsuppressiva als Referenz herangezogen werden konnten.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die internen Standards nur in den vollständig mit Blut befüllten Kapillaren zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 4-13 gezeigt.

Tabelle 4-13: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der internen Standards 13c2d4RAD und d12CSA nach Auftrag mittels Kapillarpipette; Probe: E5 der Matrixreihe der Immunsuppressiva; Auswertung über das Peakflächenverhältnis Analyt (RAD bzw. CSA) /IS; (n=3); n.d.: nicht detektiert

	Peakflächenverhältnis RAD/13c2d4RAD	Peakflächenverhältnis CSA/d12CSA
10 µl	8,78 ± 0,71	1,58 ± 3,87
ca. 8 µl*	6,70 ± 5,83	8,93 ± 8,01
ca. 5 µl	n.d.	n.d.
ca. 3 µl	n.d.	n.d.

*⁾ Detektion der internen Standards war nur in zwei der drei Versuchsansätze möglich

Da oben genannte Versuche auf eine inhomogene Verteilung der Standards auf der Kapillarwand schließen ließen, wurden die Kapillaren für die folgenden Versuche vollständig mit Probe befüllt. Um weitere Fehlerquellen auszuschließen, wurde die Kapillarseite markiert, von der aus die Trocknung der Standardlösung erfolgte. Die Probenaufnahme erfolgte dann von der unmarkierten Seite aus. Auf diese Weise wurden acht Proben analysiert. Es ergaben sich relative Standardabweichungen von 17 % (13c2d4RAD) bzw. 27 % (d12CSA)

4.10.2 Messung von mittels Kapillarpipetten aufgetragenen Eichreihen

Wie in Abschnitt 3.5.4. beschrieben wurden Eichreihen der Immunsuppressiva in Blut mittels Kapillarpipetten auf die Filterkartuschen aufgetragen und mit der optimierten Methode analysiert. Die Eichreihen wurden über das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard ausgewertet. Dabei ergaben sich Korrelationsfaktoren von $R^2 = 0,9978 - 0,999$ (Abbildung 4-28).

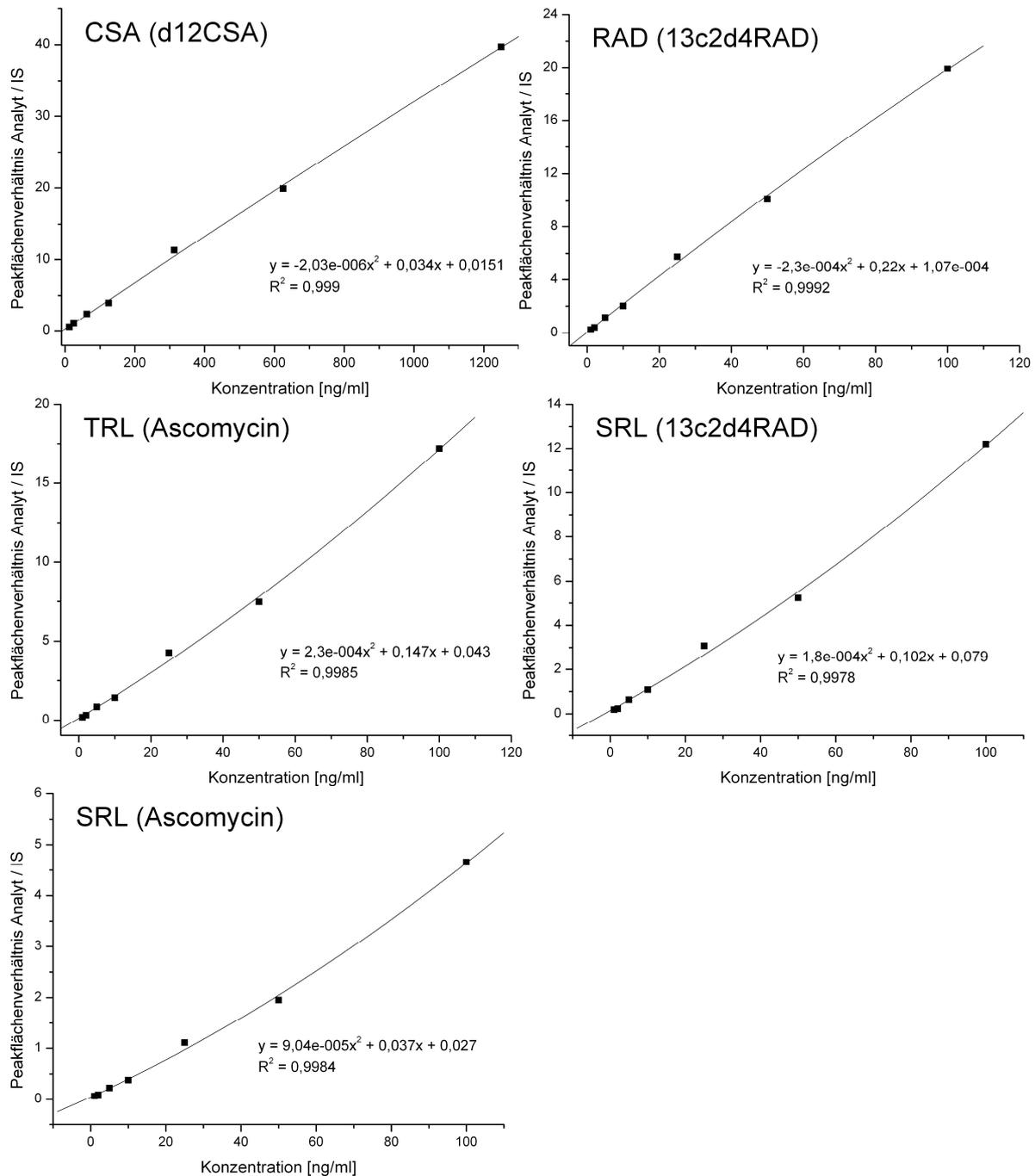


Abbildung 4-28: Matriceichreihen der Immunsuppressiva (SRL, TRL, RAD, CSA) ausgewertet mit internem Standard; der Auftrag des internen Standards erfolgte mittels Kapillarpipette

Ergebnisse

Tabelle 4-14 vergleicht die Korrelationsfaktoren von Blut- bzw. Standardreihen. Ferner werden die zwei verschiedenen Methoden des Probenauftrags aufgeführt.

Tabelle 4-14: Vergleich der Korrelationsfaktoren (R^2) der Eichreihen: Probenauftrag: Pipette bzw. Kapillare; Probenmatrix: Standard bzw. Blut

	<i>Korrelationsfaktor; R^2</i>				
	<i>TRL (Ascomycin)</i>	<i>SRL (Ascomycin)</i>	<i>SRL (13c2d4RAD)</i>	<i>RAD (13c2d4RAD)</i>	<i>CSA (d12CSA)</i>
<i>Standard; Pipette</i>	0,999	0,9999	0,994	0,9999	0,9999
<i>Blut; Pipette</i>	0,9996	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999
<i>Blut; Kapillare</i>	0,9985	0,9984	0,9978	0,9992	0,999

4.11 Analyse von Patientenproben

4.11.1 Anidulafungin

Mit der entwickelten Methode wurden zwei Kinetiken eines Patienten (insgesamt 12 Plasmaproben, s. Anhang 3) ermittelt, die zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Gabe von 200 mg bzw. 100 mg Ecalta[®] entnommen wurden. Zusätzlich wurden Kontrollproben (*low, medium, high*, s. 3.4.4.1.) analysiert. Abbildung 4-29 zeigt die ermittelten Konzentrationen aufgetragen gegen die mit Proteinfällung erhaltenen Konzentrationen. Angegeben sind die Funktionsgleichung der Ausgleichsgeraden ($y = 1,4171x + 13,06$) sowie der Korrelationskoeffizient der Datenpunkte ($R^2 = 0,8739$). Die Richtigkeit der Kontrollproben betrug 103 % (*low*), 105 % (*medium*) bzw. 91 % (*high*).

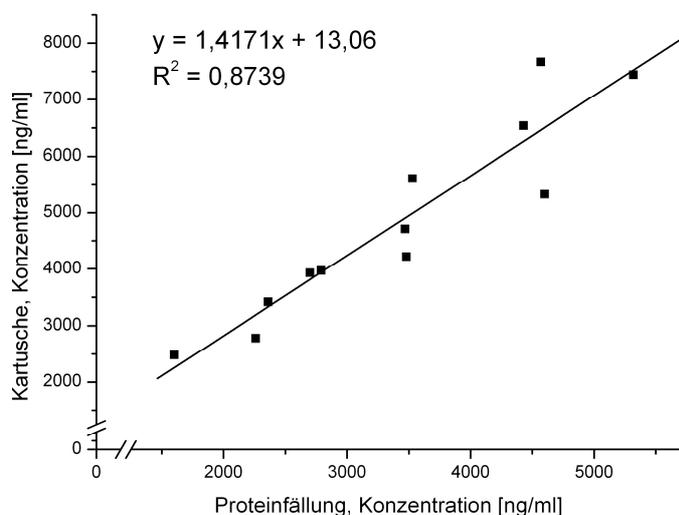


Abbildung 4-29: Korrelation zwischen Kartuschen-Methode und Routinemethode (Proteinfällung) bei Quantifizierung von Anidulafungin aus Patientenproben (Plasma)

Ergebnisse

Abbildung 4-30 stellt die Patientenkinetiken, die sowohl nach Proteinfällung als auch mit getrocknetem Plasma erhalten wurden, gegenüber. In beiden Kinetiken lagen die mit der entwickelten Methode erhaltenen Konzentrationen über denen nach Proteinfällung berechneten, wobei der relative Konzentrationsverlauf bei beiden Methoden jedoch vergleichbar war.

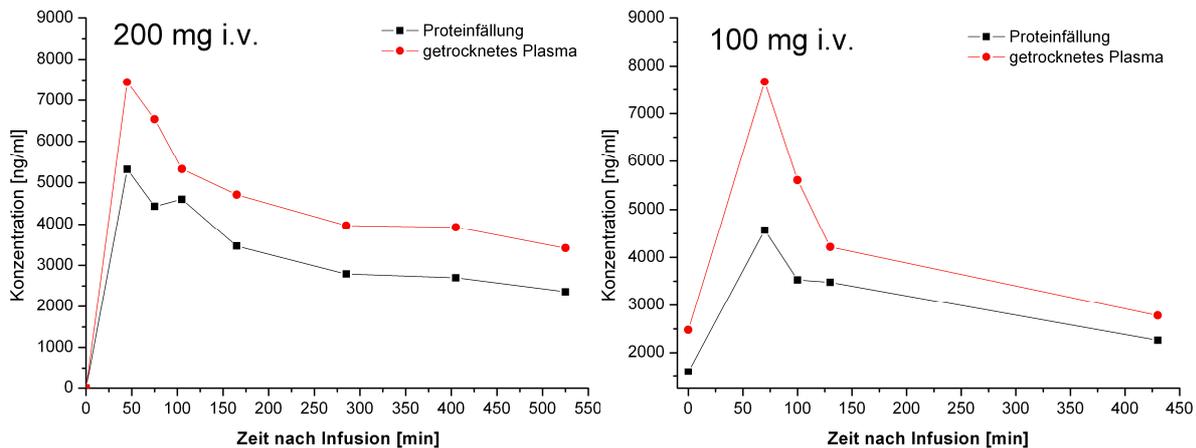


Abbildung 4-30: Patientenkinetiken nach Gabe von 200 bzw. 100 g Ecalta[®] (Anidulafungin); Vergleich zwischen Routine- und Kartuschen-Methode

4.11.2 Immunsuppressiva

Patientenproben sowie Eichreihe und Kontrollproben wurden wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben mittels Kapillarpipetten auf den Filterkartuschen vorbereitet und nach einer Trocknungszeit von mindestens 16 Stunden analysiert. Die Richtigkeit der Kontrollproben ist in Tabelle 4-15 gezeigt. Sie lag zwischen 81 und 109 %.

Die ermittelten Konzentrationen in den Patientenproben (s. Anhang 4) wurden gegen die in der Routinemethode gemessenen Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 4-31). Dabei wurden die SRL-Konzentrationen sowohl mit 13c2d4RAD (Graph A) als auch mit Ascomycin (Graph B) bestimmt. Die Auswertung der übrigen Analyten erfolgte mit Ascomycin (TRL), 13c2d4RAD (RAD) und d12CSA (CSA).

Der Korrelationsfaktor von Auswertung A betrug $R^2 = 0,9292$, der von Auswertung B $R^2 = 0,9311$. Die Steigung der Ausgleichsgeraden wurde zu 1,29 bzw. 1,24 bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 4-15: Richtigkeit der Kontrollproben [%] im Rahmen der Analyse von Patientenproben mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methoden; in Klammern angegeben sind die für die Auswertung verwendeten internen Standards

	<i>TRL</i> (<i>Ascomycin</i>)	<i>SRL</i> (<i>Ascomycin</i>)	<i>SRL</i> (<i>13c2d4RAD</i>)	<i>RAD</i> (<i>13c2d4RAD</i>)	<i>CSA</i> (<i>d12CSA</i>)
Kontrolle <i>low</i>	103	99	87	109	98
Kontrolle <i>medium</i>	108	95	81	92	89
Kontrolle <i>high</i>	101	108	99	99	92

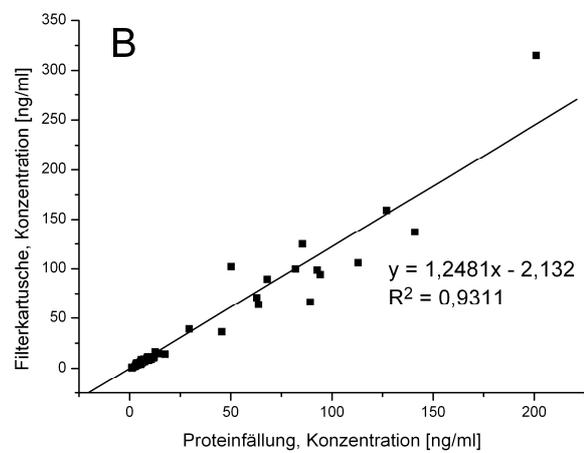
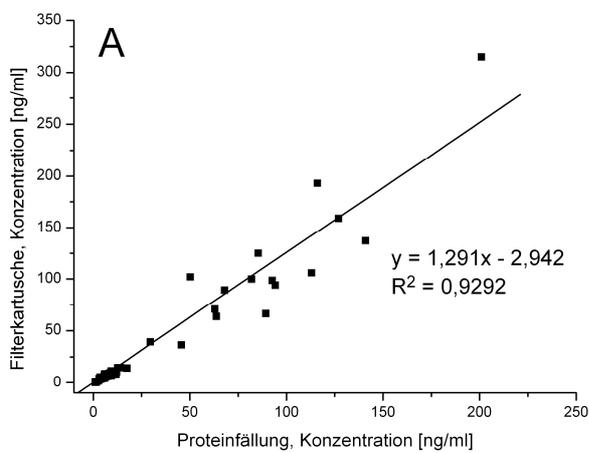


Abbildung 4-31: Korrelation zwischen Kartuschen-Methode und Routinemethode (Proteinfällung) bei Quantifizierung von Immunsuppressiva aus Patientenproben Blut); A: Auswertung von Sirolimus mit Ascomycin; B: Auswertung von Sirolimus mit 13c2d4RAD; Die Auswertung der übrigen Analyten erfolgte mit Ascomycin (TRL), 13c2d4RAD (RAD) und d12CSA (CSA)

Ergebnisse

Abbildung 4-32 stellt die hier ermittelten Konzentrationen der einzelnen Analyten denen aus der Routinemessung gegenüber.

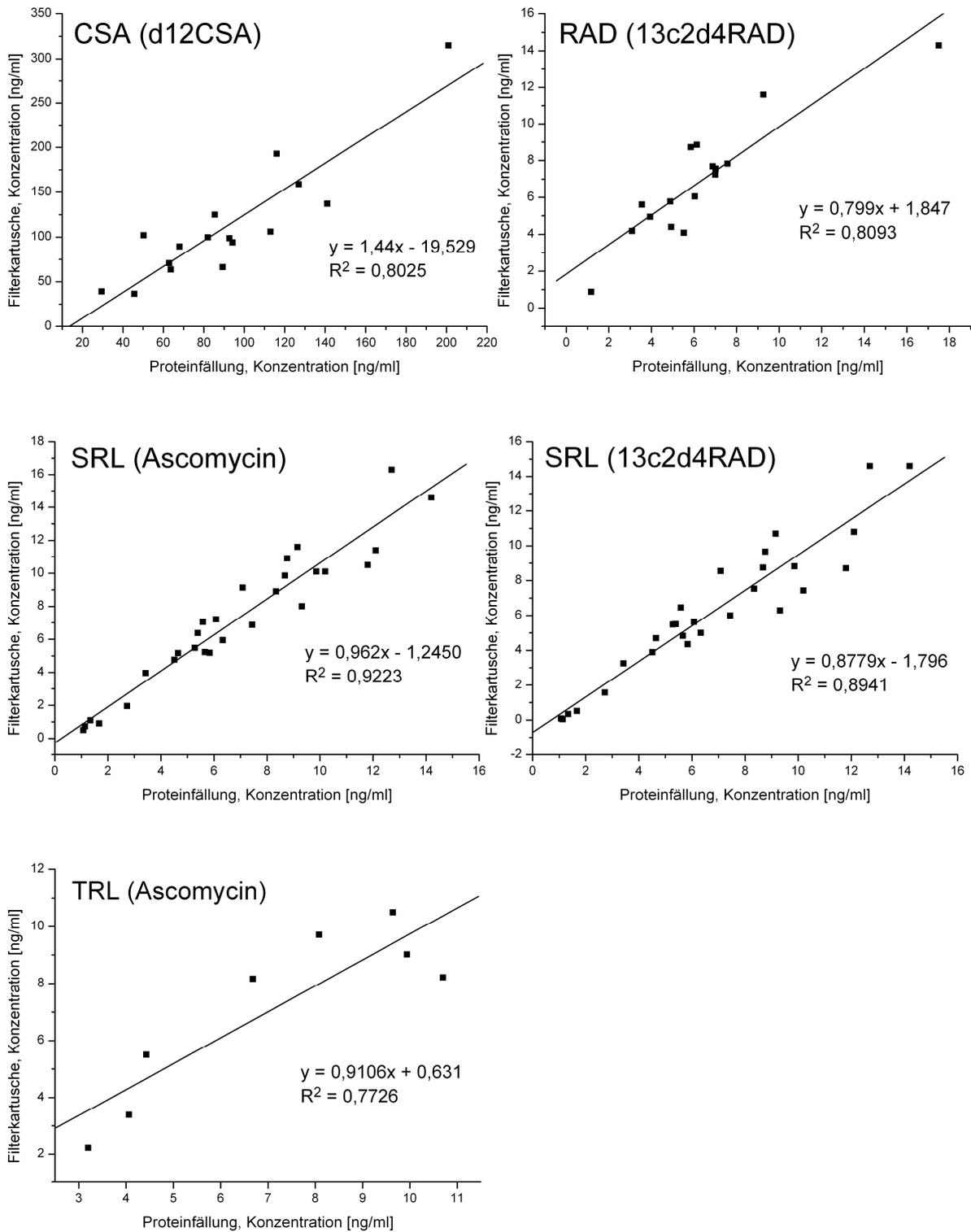


Abbildung 4-32: Vergleich der mit dem Filterkartuschensystem und der Routinemethode (Proteinfallung) ermittelten Konzentrationen von CSA, RAD, SRL und TRL; in Klammern angegeben ist der zur Auswertung herangezogene interne Standard

Ergebnisse

Tabelle 4-16: Vergleich Filterkartuschensystem mit Routinemethode anhand von Patientenproben (venöses Vollblut); in Klammern: die für die Auswertung verwendeten internen Standards

	TRL (Ascomycin)	SRL (Ascomycin)	SRL (13c2d4RAD)	RAD (13c2d4RAD)	CSA (d12CSA)
n	8	28	28	16	16
Steigung	0,9106	0,962	0,8779	0,799	1,44
R ²	0,7726	0,9223	0,8941	0,8093	0,8025

Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen der internen Standards (Ascomycin und CSD) beträgt für die Routinemessung 6,1 % bzw. 11,3 %, während sie in der hier optimierten Filterkartuschen-Methode für Ascomycin 20,1 %, für 13c2d4RAD 22,7 % und für d12CSA 24,8 % beträgt. Die Rohdaten zur Berechnung der relativen Standardabweichung sind in Anhang 5 zusammengefasst.

4.12 Weitere Optimierungsschritte

4.12.1 Waschen der SPE-Kartusche mit Isopropanol

Analog zu Abschnitt 4.3.3 sollte mit einem *Post-Column*-Experiment untersucht werden, ob durch Waschen der SPE-Kartusche mit Isopropanol anstelle von Methanol die Ionensuppression weiter verringert werden kann. Eluenten mit unterschiedlichem Isopropanolanteil (50 – 97%) wurden hierfür untersucht. Abbildung 33 zeigt die erhaltenen TICs in Blut sowie Plasma.

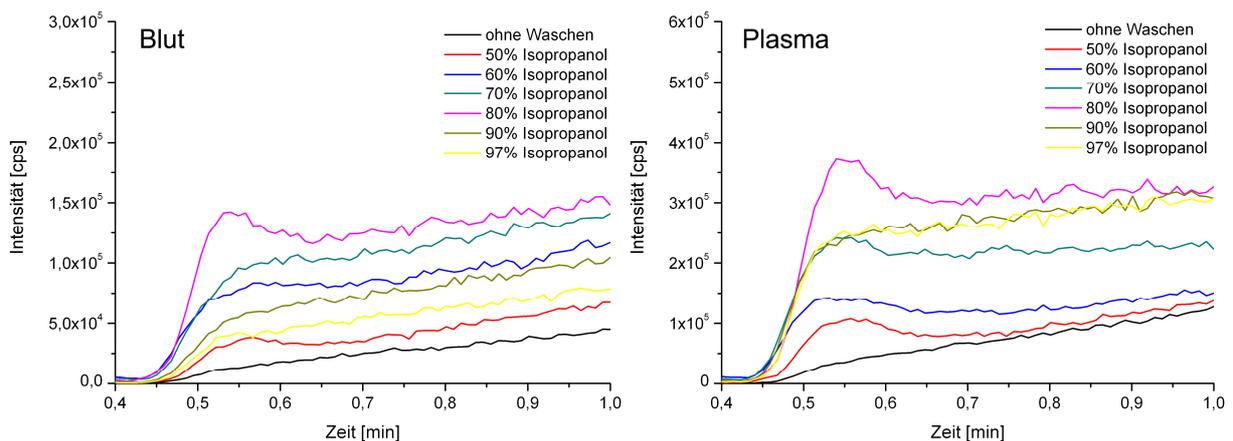


Abbildung 4-33: Einfluss des Isopropanol-Anteils in der Waschlösung auf die Matrixeffekte in Blut und Plasma; TI-Chromatogramm des *Post-column*-Infusionsexperiments zur Untersuchung von Matrixeffekten ohne Berücksichtigung einer chromatographischen Trennung:

Ergebnisse

Die Diagramme verdeutlichen, dass im Vergleich zur unbehandelten SPE-Kartusche, das Spülen mit Isopropanol eine deutliche Intensitätssteigerung sowohl in Blut als auch in Plasma bewirkte. Daher wurde im Folgenden für 70 % Isopropanol untersucht, ob eine Retention der Analyten auf der SPE-Kartusche weiterhin gewährleistet wurde. Hierfür wurde ein Analytstandard (50/50 MeOH/H₂O [v/v]) unter verschiedenen Spülbedingungen analysiert (Versuchsaufbau s. 3.8.3). Als Vergleich diente eine Messung, die keinen Waschschrift beinhaltet. Als Maß für die Retention der Analyten wurde deren Peakfläche herangezogen (Abbildung 4-34). Es zeigte sich, dass das Waschen mit 70 % Isopropanol eine Abnahme der Peakflächen um bis zu 95 % bewirkte.

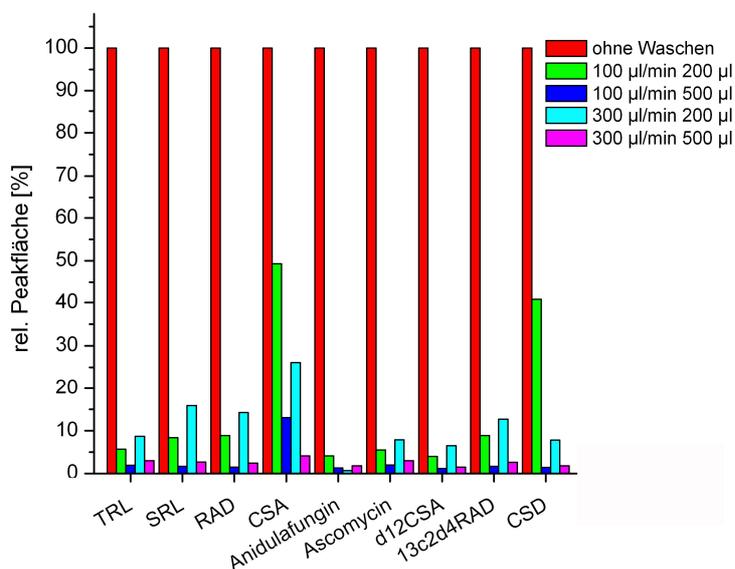


Abbildung 4-34: Einfluss des Waschschrifts mit 70% Isopropanol (nach erfolgtem Analyttransfer auf die SPE-Kartusche) auf die detektierten Analytpeakflächen [%]

4.12.2 Untersuchung verschiedener SPE-Phasen

In diesem Versuchsteil sollte der Einfluss unterschiedlicher SPE-Phasen auf Matrixeffekte untersucht werden. Dafür wurden *Post-Column*-Experimente unter Verwendung unterschiedlicher SPE-Phasen durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in 3.8.6.2. gezeigt. Bei den untersuchten SPE-Phasen handelte es sich um modifizierte Kieselgele, die sich hinsichtlich der Länge der Kohlenwasserstoffkette unterscheiden. Verwendet wurden die C2SE-, C8ECSE sowie die C18HD-Phase. Zum Vergleich wurden Messungen mit der bisher verwendeten Oasis[®] HLB-SPE-Kartusche durchgeführt.

Abbildung 4-35 zeigt die Ergebnisse der *Post-Column*-Experimente in Plasma- und Blutmatrix.

Ergebnisse

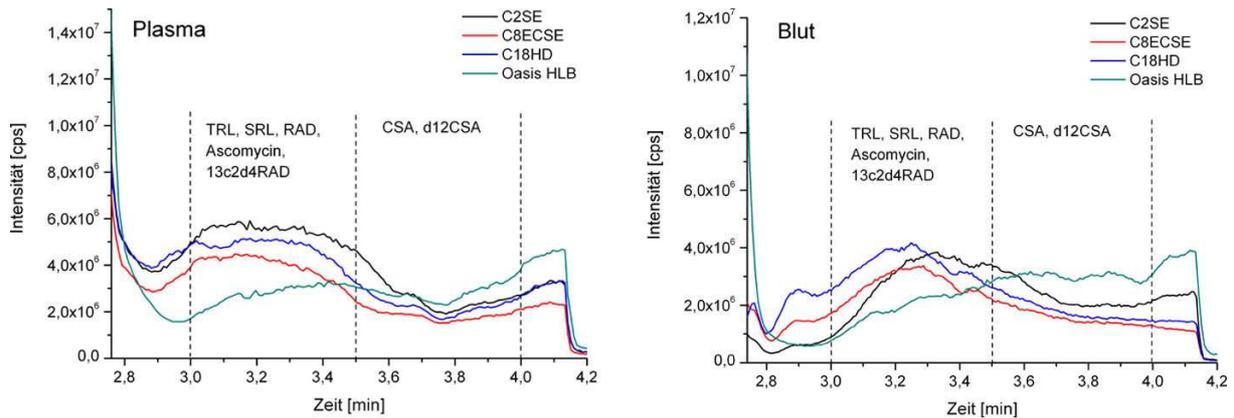


Abbildung 4-35: Vergleich verschiedener SPE-Phasen in einem *Post-Column*-Infusionsexperiments; durch gestrichelte Linien dargestellt sind die Retentionszeitfenster der Analyten

Die Intensitätsprofile der neu getesteten SPE-Phasen (C2SE, C8ECSE und C18HD) unterschieden sich sowohl in Plasma- als auch in Blutmatrix zu dem der Oasis[®] HLB-Phase vor allem in der ersten Phase der Elution (3 – 3,5 min). In diesem Zeitfenster wurden mit den RP-Phasen etwa doppelt so hohe Intensitäten detektiert als es unter Verwendung der Oasis[®] HLB-Phase der Fall war. In zweiten Zeitfenster (3,5 – 4 min) wurden hingegen mit allen SPE-Phasen vergleichbare Intensitäten gemessen.

Um den Einfluss der unterschiedlichen SPE-Phasen auf die Peakflächen der Analyten beurteilen zu können, wurde ein Analytstandardmix mit den verschiedenen SPE-Phasen mit der optimierten Methode analysiert. Die Auswertung erfolgte über die Analytpeakflächen. Abbildung 4-36 fasst die Ergebnisse zusammen, wobei eine Normierung auf die mit der C2SE-Kartusche erhaltenen Peakflächen vorgenommen wurde.

Ergebnisse

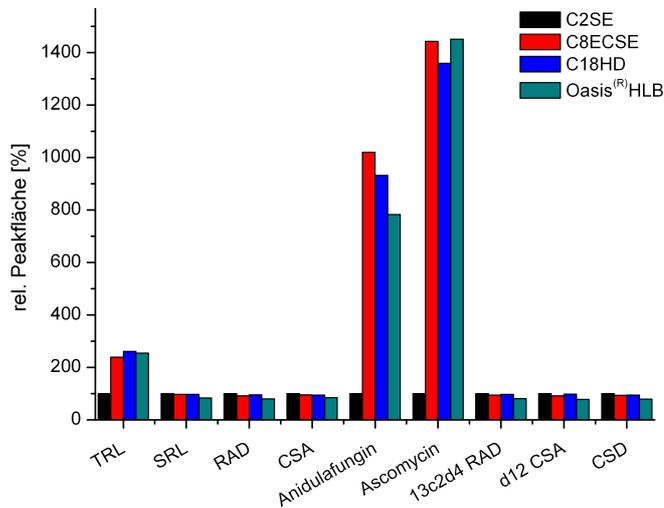


Abbildung 4-36: Vergleich der mit den verschiedenen SPE-Phasen in der optimierten SPE-SPLC-MS/MS-Methode erhaltenen Analytpeakflächen

Wie das Diagramm verdeutlicht, bewirkte der Wechsel der SPE-Phasen von der Oasis® HLB-Phase zu den C18HD- bzw. der C8ECSE-Phasen bei keinem Analyten einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Peakflächen. Die Verwendung der C2SE-Phase hingegen führte bei den Analyten TRL, Anidulafungin und Ascomycin zu einer deutlichen Intensitätsminderung um das bis zu 14-fache.

5 Diskussion

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist eine Quantifizierung von Pharmaka aus auf Filterkartuschen getrockneten Plasma- bzw. Vollblutproben möglich. Die entwickelten SPE-HPLC-MS/MS-Methoden erlauben einen vollautomatisierten Analyttransfer von der Filterkartusche auf eine SPE-Kartusche (Oasis[®] HLB; 10 x 2 mm, 30 µm), auf der die Anreicherung der Analyten stattfindet. Die chromatographische Trennung der Analyten wird auf einer C18-RP-Säule (Nucleodur C18 Gravity; 50 x 4,6 mm; 5 µm) realisiert. Die Detektion der Analyten erfolgt an einem Tandem-Massenspektrometer im SRM-Modus. Im Vergleich zu bisher publizierten Methoden zur Quantifizierung von Pharmaka aus getrockneter Matrix, zeichnet sich die hier entwickelte Methode durch ihre hohe Automatisierbarkeit aus. Die Probenvorbereitung aus auf Filterpapier getrockneten Proben beinhaltet zahlreiche manuell durchzuführende Aufarbeitungsschritte wie das Ausstanzen der Probe aus dem Filterpapier und die Extraktion der Analyten^[85,92]. Dagegen erlaubt die Verwendung von Filterkartuschen die direkte Aufreinigung mittels Festphasenextraktion ohne vorherige manuelle Aufarbeitung. Durch Aufbringen eines Barcodes auf der Kartusche könnte zudem zusätzlich die Erfassung von Patientendaten automatisiert erfolgen.

Die Optimierung der Methode erfolgte für die Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus und Cyclosporin A im Rahmen des TDM aus venösem Vollblut sowie für das Antimykotikum Anidulafungin als Modellsubstanz in Plasma. Aufgrund unterschiedlich langer Waschschritte unterscheiden sich die Methoden zur Bestimmung der Immunsuppressiva und von Anidulafungin geringfügig in ihrer Dauer. Die Analysedauer für die Immunsuppressiva beträgt 9 min, die des Anidulafungins 9,5 min. Damit ist die Methode der Immunsuppressiva deutlich länger als konventionelle Methoden, die ebenfalls die simultane Bestimmung der Immunsuppressiva ermöglichen. Die Analysezeiten betragen hier zwischen 2,5 min und 9,5 min^[74,79,81,84]. Für Hochdurchsatz-Methoden sind kurze Analysezeiten jedoch unbedingt erforderlich. Die Software „SparkLink“, die unter anderem den Kartuschenwechsel (ACE) ansteuert, erlaubt jedoch, zwei aufeinanderfolgende Messungen miteinander zu verschachteln. Dies ist möglich, indem in dem Moment, da die Elution von der analytischen Säule beginnt und die Waschschritte der Filter- und der SPE-Kartusche beendet sind, bereits die nächste Messung begonnen wird. Auf diese Weise könnten Analysezeiten um bis zu 3 Minuten auf 6 bzw. 6,5 Minuten verkürzt werden.

Im Folgenden soll die Methodenentwicklung sowie die Anwendung der optimierten Methoden diskutiert werden.

5.1 Methodenentwicklung

5.1.1 Untersuchungen zum Fragmentierungs- und Ionisierungsverhalten der Analyten

5.1.1.1 Q1-Spektren und SRM-Optimierung von 13c2d4RAD, d12CSA und Anidulafungin

Bei den Q1-Scans der Analyten zeigte sich, dass das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) der intensitätsstärksten Vorläuferionen sowohl für 13c2d4RAD als auch für d12CSA denen der Ammoniumaddukte ($m/z_{\text{Muttermasse}} + 17$ entspricht $[M+NH_4]^+$) beider Analyten entspricht. Damit zeigten sie erwartungsgemäß das gleiche Ionisierungsverhalten wie ihre nicht-isotopenmarkierten Analoga Everolimus bzw. CSA^[64,81]. Daneben zeigte das Q1-Spektrum des d12CSA zusätzliche Signale bei m/z 1215,1 und m/z 608,5. Diese Signale entsprechen denen des einfach- und des zweifach protonierten d12CSA-Moleküls ($[M+H]^+$ bzw. $[M+2H]^{2+}$).

Auch die bei der Optimierung der Massenübergänge beobachtete Fragmentierung in die Produktionen der isotopenmarkierten bzw. nicht-isotopenmarkierten Analyten ist direkt vergleichbar. Für 13c2d4RAD wird ein Masseverlust von $m/z = 67$ mit höchster Intensität detektiert, was dem Verlust von NH_3 , CH_3OH und Wasser entspricht. Diese Massendifferenz wird sowohl beim Everolimus als auch beim strukturähnlichen Sirolimus beobachtet^[133]. Aus dem Ammoniumaddukt des d12CSA-Moleküls entsteht in der Stoßzelle des Massenspektrometers lediglich das protonierte d12CSA-Molekül.

Das Q1-Spektrum des Anidulafungins unterscheidet sich deutlich von dem der Immunsuppressiva. Während die Spektren von 13c2d4RAD und d12CSA nur wenige Signale zeigen, erscheint im Anidulafungin-Spektrum neben dem Ammoniumaddukt (m/z 1157,8) und dem protonierten Molekül (m/z : 1140,8) eine erhöhte Signaldichte im Bereich von 550 – 1100 amu. Da im Q1-Modus keine Fragmentierung in der Stoßzelle des Massenspektrometers stattfindet, ist es wahrscheinlich, dass die hier detektierten Fragmente ihren Ursprung bereits in der Ionenquelle haben. Die Neigung des Anidulafungins während des Ionisierungsvorgangs zu fragmentieren erklärt die im Vergleich zum d12CSA und 13c2d4RAD geringe Intensität des Vorläuferions $[M + H]^+$. Diese liegt mit 2×10^6 cps um den Faktor 4 (d12CSA) bis 80 (13c2d4RAD) unter denen der anderen Analyten.

Bei der SRM-Optimierung stellte sich das Fragment m/z 1122,8 als das intensitätsstärkste heraus. Eine Massendifferenz von $m/z = 18$ deutet auf einen Wasserverlust hin. Da jedoch viele Substanzen bei der Fragmentierung zunächst ein Wassermolekül verlieren, ist dieser Massenübergang als unspezifisch zu betrachten^[57], so dass das intensitätsschwächere Fragment ($m/z = 343,37$) für die weiteren Analysen herangezogen wurde. Dieses Fragment

entsteht wahrscheinlich durch Abspaltung des Alcoxytriphenyl-Substituenten des Anidulafungin-Moleküls, und ist damit spezifisch für Anidulafungin.

5.1.1.2 Einfluss der Salz- und Säurekonzentrationen im HPLC-Eluenten auf die Ionisierung der Analyten

Es wurde deutlich, dass durch Ammoniumacetat-Zugabe eine Intensitätssteigerung der Analyten erreicht werden konnte. Dieses kann möglicherweise auf eine Verringerung des pH-Wertes (5,8 statt 7,5) zurückgeführt werden. Bei geringeren pH-Werten liegen die Analyten bereits in ionisierter Form in der Lösung vor, was schließlich zu höheren Signalintensitäten führt^[143]. Des Weiteren werden die Vorläuferionen des Großteils der hier verwendeten Analyten durch die Ammoniumionenaddukte gebildet, so dass sich der Zusatz eines Ammoniumsalzes positiv auf die Bildung dieser Addukte auswirken kann^[142]. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt beim Anidulafungin zu beobachten. Allerdings zeigte sich auch, dass eine zu hohe Salzkonzentration (hier 5 mM) einen negativen Effekt auf die Signalintensitäten hat. Dieses Phänomen kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Zum einen beschreiben Kostianinen et al.^[134], dass die Puffermoleküle während des Ionisierungsvorgangs in der ESI-Quelle mit den Analyten um einen Platz auf der Tröpfchenoberfläche konkurrieren. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit für ein Analyt in die Gasphase und damit in den Analysator einzutreten, was sich dann in geringeren Signalintensitäten äußert. Eine weitere Erklärung geben Constantopoulos et al.^[135]: Durch Erhöhung der Salzkonzentration erhöht sich auch die Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche, wodurch es zu einer vergrößerten Streuung der Tröpfchen, also einer „Verbreiterung“ des Sprays kommt. Dadurch befinden sich aber weniger Analytionen im Zentrum des Sprays, was im Resultat ebenfalls einen Abfall der Signalintensitäten zur Folge hat.

Neben der Salzkonzentration wurde auch die Auswirkung der Säurekonzentration auf die Ionisierung der Analyten untersucht. Hier zeigte sich nach Säure-Zugabe eine deutliche Abnahme der Analytpeakfläche, was auf die oben genannten Effekte zurückzuführen ist. Es zeigte sich, dass es bei dieser Versuchsreihe notwendig war, zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen das System – bestehend aus HPLC-Pumpen, Autosampler und Massenspektrometer sowie den Verbindungskapillaren – mit einem Eluenten, der frei von Additiven war, exzessiv zu spülen, um so Salz- und Säurereste von vorangegangenen Messungen aus dem System zu entfernen. Da zunächst der Einfluss der Salzkonzentration untersucht wurde, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass zu Beginn der Säure-Messreihe (0,05% Hac) im System befindliche Salzreste zu erniedrigten

Signalintensitäten beigetragen haben.

In der im Institut für Pharmakologie etablierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der Immunsuppressiva wird die Elution der Analyten von der analytischen Säule unter hoch organischen Bedingungen (97 % MeOH) und durch Zugabe von 10 mM NH₄Oac und 0,1% Hac erreicht. Die vorangegangenen Versuche haben jedoch verdeutlicht, dass die Konzentration der Additive so gering wie möglich gehalten werden sollte, um Suppressionseffekte während der Ionisierung zu minimieren. Dies bestätigte ein direkter Vergleich dieses Eluenten mit 97 % MeOH (1 mM NH₄Oac, 0,05 % Hac). Die Verringerung der Salzkonzentration hatte eine Vergrößerung der Analytpeakflächen um ca. 50 % zur Folge, was die beschriebenen Versuche bestätigt.

5.1.2 Extraktion - Analyttransfer von der Filterkartusche auf die SPE-Kartusche

Ein entscheidender Teil der Methodenentwicklung bestand in der Optimierung des Analyttransfers von der Filter- auf die SPE-Kartusche. Die Anforderung dabei war vor allem, eine Transferbedingung zu finden, unter der alle Analyten von der Filterkartusche extrahiert und auf der SPE-Kartusche angereichert werden. Variiert wurden dabei sowohl der methanolische Anteil im Transfereluenten als auch das Transfervolumen sowie die Flussrate. Dabei ergab sich für Tacrolimus, Everolimus, Sirolimus, Ascomycin und 13c2d4RAD auf der einen Seite und CSA, d12CSA, CSD und Anidulafungin auf der anderen Seite ein ähnliches Extraktionsverhalten. CSA, d12CSA, CSD und Anidulafungin zeigen unter Verwendung eines rein wässrigen Transfereluenten, unabhängig von Flussrate und Volumen, relativ kleine Peakflächen (ca. 10-30% von der Maximalpeakfläche bei 40 % MeOH), wobei dieser Effekt beim Anidulafungin am deutlichsten ausgeprägt ist. Die Analyten, die zu der Tacrolimus-Gruppe gehören, zeigen unter gleichen Bedingungen bereits 50 % der maximalen Peakfläche. Beiden Gruppen gemeinsam ist der deutliche Intensitätsverlust ab einem methanolischen Anteil von 70%. Für diese Beobachtungen kommen mehrere Gründe in Betracht: 1. die Wasserlöslichkeit der Analyten, 2. das Retentions- und Elutionsverhalten auf der SPE-Kartusche und 3. das Ionisierungsverhalten unter den gegebenen Bedingungen. Während des Analyttransfers wird der Transfereluent zunächst durch die Filterkartusche geleitet. Die Analyten werden extrahiert und zusammen mit dem Eluenten zur SPE-Kartusche transportiert. Voraussetzung dafür wäre die Löslichkeit der Analyten im Transfereluenten. Bei den Immunsuppressiva handelt es sich um hydrophobe Moleküle, die sich nur schlecht in Wasser lösen. CSA weist mit 23 - 40 µg/ml^[136] die beste Wasserlöslichkeit der vier Pharmaka auf. Für Tacrolimus und Sirolimus beträgt die Wasserlöslichkeit 1 - 12 µg/ml^[137,138] bzw. 2,6 µg/ml^[139]. Everolimus zeigt aufgrund des

Diskussion

polaren Hydroxyether-Substituenten mit ca. 20 µg/ml eine verbesserte Löslichkeit gegenüber Sirolimus^[140]. Für die internen Standards Ascomycin, CSD sowie d12CSA und 13c2d4RAD wird ein ähnliches Lösungsvermögen in Wasser angenommen wie für die Analyten. Anidulafungin ist in Wasser ebenfalls nur schlecht löslich^[141].

Die geringe Wasserlöslichkeit erklärt zwar die Beobachtung, dass mit wässrigem Transfereluenten insgesamt geringe Analytpeakflächen erreicht wurden, allerdings stehen die Wasserlöslichkeiten im Widerspruch zu dem Ergebnis, dass für z.B. CSA und d12CSA, die sich vergleichsweise gut in Wasser lösen, nur 30% der maximal detektierten Peakfläche erreicht wurde, während die schlechter wasserlöslichen Analyten der Tacrolimus-Gruppe bereits 70% der Maximal-Peakfläche zeigen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Analyten mit dem Filtermaterial nur geringe Wechselwirkungen eingehen und die Extraktion in diesem Fall eher als ein rein mechanischer Vorgang angesehen werden kann.

Ein Vergleich der Molekülstrukturen der Analyten zeigt jeweils eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Analyten der Tacrolimus-Gruppe und denen der CSA-Gruppe. Daher könnte ein weiterer Grund für das unterschiedliche Ansprechen auf den Transfereluenten in der Anreicherung bzw. Elution auf der SPE-Kartusche liegen. Auf dem hier verwendeten Oasis[®] HLB-Material sollten unter rein wässrigen Bedingungen alle Analyten gleichermaßen vollständig angereichert werden^[78]. Nach Umschalten auf die 97% MeOH des Elutionselementen stellt sich auf der SPE-Kartusche im Verlauf der Elution dieser höhere Methanolgehalt nur nach und nach ein. Da jedoch das Elutionsprofil für alle Analyten identisch ist – die Retentionszeiten betragen zwischen 0,42 und 0,46 min – , sollten die methanolischen Bedingungen während der Ionisierung für alle Analyten identisch sein und damit keinen Einfluss auf die Intensitäten haben.

Allerdings ist die Zusammensetzung des Lösungsmittels für die Ionisierung von entscheidender Bedeutung. Flüchtige Lösungsmittel wie Methanol tragen zu einer verbesserten Ionisierung bei, indem sie das Entstehen immer kleinerer Tröpfchen fördern, die schließlich die Ionen in die Gas-Phase entlassen^[134,150-152]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ionisierung von Analyten wie Tacrolimus oder Sirolimus in geringerem Maße von dem Methanolanteil während der Ionisierung abhängt als das z.B. bei CSA oder Anidulafungin der Fall zu sein scheint, womit sich die Unterschiede bezüglich der Peakflächen in beiden Gruppen erklären lassen.

Ebenfalls damit erklären lässt sich die Zunahme der Peakflächen mit steigendem Methanolanteil im Transfereluenten. Auf der SPE-Kartusche herrschen zu Beginn des Elutionsschritts, entsprechend der Zusammensetzung des Transfereluenten, weitgehend wässrige Bedingungen. Während der Elution stellt sich nach und nach ein höherer Methanolanteil auf der SPE-Kartusche ein, bis der Punkt erreicht ist, an dem die Analyten von der Säule eluieren. Das hat zur Folge, dass vor den Analyten eine wässrige

„Eluentenfront“ das Massenspektrometer erreicht und dort die Ionisierung der Analyten negativ beeinflusst.

Ist der Methanolanteil im Transfereluenten jedoch zu hoch (> 60 %) erfolgt offensichtlich nur noch eine unvollständige Retention auf der SPE-Säule, es kommt zu einem Durchbruch der Analyten auf der Säule, was sich in einer Abnahme der Peakflächen äußert. Dieser Effekt nimmt bei allen Analyten mit steigendem Methanolanteil zu.

5.1.3 Untersuchung von Verschleppungseffekten

Die Untersuchung der Verschleppungseffekte verdeutlichte die diesbezügliche Anfälligkeit von *online*-SPE-Methoden^[131]. Durch einen zusätzlich eingebauten Waschschrift ist es gelungen, die Verschleppung der Immunsuppressiva und des Anidulafungins von im Schnitt 8,7 % auf 0,2 % signifikant zu verringern.

5.1.4 Optimierung der Peakform

Aus einer früheren Veröffentlichung ist bekannt, dass die Immunsuppressiva unter hoch methanolischen Bedingungen von dem Oasis[®] HLB-Material eluiert werden und auf analytischen Säulen aufgetrennt werden können^[78]. Ersteres ließ sich auch aus den Ergebnissen des Analyttransfers ableiten. Analog zur Routinediagnostik wurde in dieser Arbeit eine C18-RP-Säule (Nucleodur C18 Gravity 50 x 4,6 mm; 5 µm) zur chromatographischen Trennung eingesetzt. Durch Fokussieren der Analyten mit einem weniger organischen Eluenten konnte eine deutliche Verbesserung der Peakform erreicht werden. Allerdings wurde durch diesen zusätzlichen Schritt die Analysenzeit um etwa 45 Sekunden verlängert.

5.1.5 Post-Column-Infusionsexperimente - Untersuchung von Matrixeffekten

Matrixbestandteile beeinflussen die entwickelte Methode auf zweierlei Weise. Zum einen führen sie dazu, dass die Lebensdauer des *Security Guards* deutlich verkürzt wird. Zu erkennen ist dies am sukzessive ansteigendem Rückdruck der analytischen Säule in der Elutionsphase der Methode, der daher rührt, dass Matrixbestandteile von dem *Security Guard* zurückgehalten werden und diesen so nach und nach zusetzen. Nach etwa 60 Blutproben (Probenvolumen 10 µl) wird daher ein Wechsel des *Security Guards* nötig.

Diskussion

Auf der anderen Seite führen Matrixbestandteile zu den „klassischen“ Matrixeffekten, indem sie die Ionisierung der Analyten beeinflussen. Dieser Einfluss wurde an zwei Stellen innerhalb der Methodenentwicklung untersucht: Zum einen zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine chromatographische Trennung der Analyten erfolgte, zum anderen nach der Optimierung der Gesamtmethode. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung von Blut und Plasma wurden diese Effekte für beide Matrices getrennt untersucht. Dabei stellte sich zunächst die Frage, inwiefern Transferolumen, Flussrate sowie der organische Anteil im Transfereluenten Einfluss auf Matrixeffekte haben. Dazu wurden *Post-Column*-Infusionsexperimente unter solchen Transferbedingungen durchgeführt, unter denen zuvor große Peakflächen detektiert werden konnten. Es zeigte sich, dass Matrixeffekte im Blut deutlich höher ausgeprägt sind als in Plasma, was auf den höheren Proteinanteil zurückzuführen ist. Des Weiteren ließ sich kein signifikanter Einfluss von Flussrate und Volumen auf die Matrixeffekte beobachten. Einzig der Methanolanteil im Transfereluenten führte zu einem deutlich veränderten Ionisierungsverhalten. In beiden Matrices wurden unter Verwendung eines rein wässrigen Eluenten während der ersten 0,7 min der Elution deutlich verminderte Intensitäten detektiert, was sich in erster Linie auf den erhöhten Wasseranteil zum Zeitpunkt der Ionisierung zurückführen lässt. Im Plasma wurde dann jedoch ein deutlicher Anstieg der Intensitäten beobachtet. Dies widerspricht den Erwartungen im Vorfeld des Versuches. Die Anreicherung wurde in rein wässriger Phase vorgenommen, was auf dem Oasis[®]-HLB-Material zunächst zu einer Anreicherung sowohl polarer als auch unpolarer Substanzen – Matrixbestandteile wie Analyten - führt, und so schließlich verstärkte Matrixeffekten zur Folge hat. Eine Erklärung für die hier gemachte Beobachtung wäre die Anreicherung von Substanzen, die keine Suppression der Ionisierung sondern eine Verstärkung derselben verursachen^[119,120,153]. Sind diese Substanzen vorrangig im Plasma vertreten, führen sie dort zu der beobachteten Signalverstärkung, während in Vollblut der supprimierende Effekt anderer Blutbestandteile überwiegt.

Die Tatsache, dass ein erhöhter Methanolanteil im Transfereluenten (bis auf 40 %) keinen deutlichen Einfluss auf die Ionensuppression zu haben scheint, lässt die Vermutung zu, dass die Matrixbestandteile mit ähnlicher Polarität wie die Analyten ursächlich für die beobachteten Matrixeffekte sind. Gestützt wird diese These dadurch, dass nur das Spülen der SPE-Kartusche (nach erfolgtem Analyttransfer) mit Waschlösungen mit deutlich höherem Methanolanteil (>80 %) zu einer signifikanten Verbesserung der Ionensuppression geführt hat. Auffällig ist dabei, dass selbst nach Spülen mit 97 % Methanol, was dem Methanolgehalt des HPLC-Eluenten entspricht, die Ionensuppression nicht vollständig unterbunden werden konnte. Das lässt darauf schließen, dass der apparente pH-Wert des Eluenten, im HPLC-Eluenten liegt dieser durch Zugabe von NH₄Oac und Hac bei ca. 6,6 einen Einfluss auf die Elution störender Matrixbestandteile hat. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass

Diskussion

verschiedene Matrixbestandteile erst zeitverzögert, z.T. erst in der darauffolgenden Messung, eine Ionensuppression verursachen. Ein Hinweis dafür ist, dass die Signalintensitäten im Laufe eines *Post-Column*-Experiments nur langsam wieder ansteigen, wobei die Intensitäten auch bei Beendigung der Messung nicht wieder den Ursprungswert erreichen. Dieser Effekt wird von Bonfiglio et al.^[154] beschrieben, die in einem *Post-Column*-Experiment gezeigt haben, dass die Verminderung der Signalintensitäten nicht nur direkt nach der Injektion auftritt, sondern auch noch 10 min nach der Injektion beobachtet wird. Sie führen das darauf zurück, dass einige für die Ionensuppression verantwortliche Matrixbestandteile erst 10 Minuten nach der Injektion von der Säule eluieren. Sind die Methoden deutlich kürzer als diese 10 Minuten, kann ein kumulativer Effekt der Ionensuppression auftreten, bei dem die Suppression durch Matrixbestandteile aus der vorherigen Messung hervorgerufen wird, was die Reproduzierbarkeit von Analysen deutlich beeinträchtigen kann. Bonfiglio et al.^[154] betrachten dabei einen Fall, in dem die Säule von Messung zu Messung wieder verwendet wird. Die SPE-Kartusche in der hier vorliegenden Arbeit wird jedoch nach jeder Messung gewechselt, so dass kumulative Effekte nicht durch Substanzen auf der SPE-Kartusche hervorgerufen werden können. Möglich ist jedoch, dass Matrixbestandteile im System, z.B. an Kapillarwänden oder Oberflächen der Schaltventile, adsorbieren und auf diese Weise zu „verspäteten“ Matrixeffekten führen. Um Matrixeffekte weiter zu vermindern wäre es daher sinnvoll, das System über eine längere Zeit zu spülen.

Ein anderer Ansatz zur Verringerung von Matrixeffekten ist die Wahl einer anderen organischen Komponente im Spüluventen. Dazu wurde in dieser Arbeit Isopropanol (in verschiedenen Anteilen) untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit 70 % Isopropanol im Spüluventen eine deutliche Verringerung der Matrixeffekte erzielt werden konnte. Problematisch erweist sich hier allerdings, dass unter diesen Bedingungen die Retention der Analyten auf der SPE-Kartusche aufgehoben wird. Etwas schlechtere Ergebnisse im Gegensatz zu 70 % Isopropanol wurden mit 60 % Isopropanol in Bezug auf Matrixeffekte erzielt. Da diese aber dennoch eine Verbesserung gegenüber dem Waschen mit 60% MeOH darstellen, wäre zu prüfen, ob das Waschen mit 60 % Isopropanol weiterhin die Retention der Analyten erlaubt.

Der dritte Ansatz liegt in der Verwendung eines anderen SPE-Materials. Dazu wurden verschiedene RP-SPE-Materialien, die sich im Wesentlichen in Hinblick auf die Länge ihrer Kohlenwasserstoffketten unterscheiden, untersucht. Dieses Experiment wurde mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode, d.h. mit chromatographischer Trennung der Analyten, durchgeführt. Diese Phasen zeigten im *Post-Column*-Experiment eine leicht verbesserte Intensitätskurve im Gegensatz zu dem bisher verwendeten Oasis[®] HLB-Material. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch bei einem Vergleich der mit den verschiedenen SPE-Kartuschen erhaltenen Analytpeakflächen nicht bestätigen, hier wurden im Allgemeinen

vergleichbare Peakflächen detektiert. Eine Ausnahme bildeten die Analyten Tacrolimus, Ascomycin und Anidulafungin, für die deutlich kleinere Peakflächen unter Verwendung der C2SE-Kartusche ermittelt wurden.

5.2 Stabilität der Analyten auf dem Filtermaterial

Das Konzept der Methode sieht vor, dass Patienten in der Lage sein sollen, routinemäßige Blutabnahmen zum TDM selbständig zu Hause durchführen können. Das auf die Filterkartuschen aufgetragene Probenmaterial wird dann auf dem Postweg in das zuständige Labor verschickt. In der Regel werden daher 1 bis 2 oder auch mehr Tage zwischen der Blutabnahme und der Analyse vergehen. Aus diesem Grund war es notwendig, die Stabilität der Analyten auf dem Filtermaterial bei Raumtemperatur zu untersuchen. Dabei ergab sich, dass vor allem in den ersten acht Stunden der Trocknungszeit ein deutlicher Intensitätsverlust aller Analyten zu verzeichnen war. In den darauffolgenden vier Tagen wurden weitestgehend konstante Peakflächen ermittelt, wobei für Anidulafungin ein weiterer Intensitätsverlust beobachtet wurde. Untersuchungen zur Stabilität der Immunsuppressiva wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. Für CSA wurden Stabilitäten bei Raumtemperatur von bis zu sieben Tagen in Serum^[144] und 74 Stunden in Blut^[83] nachgewiesen. Untersuchungen in getrockneten Blutproben ergaben für CSA eine Stabilität von 17 Tagen bei -20°C ^[94]. Für Tacrolimus wurden in Blut und bei Raumtemperatur Stabilitäten von bis zu 14 Tagen^[145,146,147] ermittelt. Sirolimus ist in Blut bis zu acht Tage stabil^[148], Everolimus bis zu 72 Stunden^[83] in ungetrockneter und bis zu 32 Tage in getrocknetem Blut (bei 4°C)^[93]. Für Anidulafungin wurden Stabilitätsbestimmungen im Rahmen der Validierung einer konventionellen SPE-HPLC-MS/MS-Methode durchgeführt. Danach ist Anidulafungin bei Raumtemperatur in Plasma für 24 Stunden stabil. Nach 96 Stunden wurden bereits deutliche Intensitätsverluste beobachtet^[unveröffentlichte Daten].

Diese Ergebnisse stehen zunächst im Widerspruch mit der hier gemachten Beobachtung des Intensitätsabfalls in den ersten acht Stunden. Zu erklären ist dies jedoch dadurch, dass oben genannte Stabilitätsbestimmungen in Matrix durchgeführt wurden, die in ihrer Beschaffenheit während des gesamten Messzeitraums unverändert blieb (ungetrocknet bzw. vollständig getrocknet). Dies ist in dieser Arbeit aufgrund des Trocknungsvorgangs nicht der Fall. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Intensitätsabfall eher auf eine schlechtere Extraktion aufgrund der fortschreitenden Trocknung als auf mangelnde Stabilität der Analyten zurückzuführen ist.

Da die Konzentrationsbestimmung über das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard erfolgt, ist für eine korrekte Konzentrationsbestimmung nicht nur die Stabilität der Analyten sondern auch die der internen Standards entscheidend. Unterschiedliches

Extraktionsverhalten während der Trocknungsphase oder eine unterschiedliche Stabilität könnten zu abweichenden Ergebnissen führen. Wie in Kapitel 4.7 gezeigt, ist dies jedoch nicht der Fall. Analyten wie interne Standards zeigen den gleichen Kurvenverlauf über den gesamten Trocknungszeitraum, was in Abbildung 4-20 und Abbildung 4.22 durch ein gleichbleibendes Peakflächenverhältnis nochmals deutlich wird.

Daher lässt sich der Schluss ziehen, dass die Konzentrationsbestimmung unabhängig von der Trocknungszeit der Proben auf der Filterkartusche ist, was vor allem in Hinblick auf die Vorbereitung der Eichreihe bedeutend ist.

5.3 Die optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methoden

5.3.1 Anidulafungin – Bestimmung von Patientenproben

Die optimierte SPE-HPLC-MS/MS-Methode wurde auf die Ermittlung pharmakokinetischer Daten bei Patienten angewandt. Die verwendete Eichreihe zeigte dabei eine zufriedenstellende Linearität in einem Konzentrationsbereich von 41 ng/ml – 10000 ng/ml von ($R^2 = 0,9998$).

Die Ergebnisse der Plasmaanalysen wurden mit denen aus einer etablierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode mit Proteinfällung verglichen. Die Werte weisen eine gute Korrelation mit einem Korrelationsfaktor von $R^2 = 0,8739$ auf. Auch die maximalen Abweichungen der Kontrollproben vom Nominalwert liegen in dem von der FDA geforderten Bereich von $\pm 20\%$ für Kontrolle *low* und $\pm 15\%$ für Kontrolle *medium* bzw. *high*. Allerdings liegen die mit der neu entwickelten Methode bestimmten Konzentrationen um den Faktor 1,4 über denen mit der konventionellen Methode bestimmten. Da für beide Messungen sowohl die gleiche Eichreihe als auch gleiche Kontroll- und Patientenproben verwendet wurden, die unter identischen Bedingungen gelagert wurden, lässt sich diese Abweichung nicht durch eine eventuelle Instabilität des Anidulafungins erklären. Auch bestehen keine signifikanten Abweichungen des internen Standards zwischen Eichreihe bzw. Kontrollproben und den Patientenproben, die in abweichenden Peakflächenquotienten resultieren würden. Möglich ist jedoch, dass sich die Extraktion des Anidulafungin aus den Patientenproben von der aus Eichreihe und Kontrollproben prozentual unterscheidet, wohingegen die des internen Standard Ascomycin gleich bleibt. Zur Abklärung dieser These wäre es somit wichtig, Kontrollplasma (d.h. „anidulafunginfrei“) verschiedener Probanden mit einer definierten Anidulafungin-Konzentration zu versetzen, diese Plasmaproben mit der vorliegenden Methode zu analysieren und die aus den einzelnen Proben erhaltenen Peakflächen miteinander zu vergleichen. Unterschiedliche Extraktionseffizienzen in den verschiedenen Proben sollten dann durch deutlich voneinander abweichende Peakflächen zu erkennen sein.

5.3.2 Immunsuppressiva

5.3.2.1 Wahl der internen Standards

Mit dem internen Standard können systematische und statistische Messfehler korrigiert werden, die während der Probenvorbereitung aber auch während der Analyse z.B. aufgrund von Matrixeffekten auftreten können. Es ist sinnvoll, interne Standards einzusetzen, die strukturell mit den Analyten verwandt sind, da diese dem Analyten sowohl in ihrem Retentions- als auch Ionisierungsverhaltens ähneln. Im Rahmen des TDM der Immunsuppressiva wurden in der Routineanalytik im Institut für Pharmakologie (Medizinische Hochschule Hannover) Ascomycin und CSD als interne Standards für TRL, SRL und RAD bzw. für CSA eingesetzt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die isotopenmarkierten Analoga d12CSA als interner Standard für CSA und 13c2d4RAD als interner Standard für RAD und möglicherweise für Tacrolimus und Sirolimus eignen.

- CSA: Mit beiden internen Standards CSD und d12CSA lassen sich zufriedenstellende Korrelationsfaktoren in den Standardreihen erreichen ($R^2_{\text{CSD}} = 0,9998$, $R^2_{\text{d12CSA}} = 0,9999$). Das mit der optimierten Methode erhaltene Chromatogramm zeigt identische Retentionszeiten für CSA und d12CSA während CSD – der ursprüngliche Standard für CSA – 0,15 min später von der analytischen Säule eluiert. Die CSD-Peakform unterscheidet sich von der des CSA. Während CSA und d12CSA in einem symmetrischen Peak von der analytischen Säule eluieren, zeigt der CSD-Peak in der aufsteigenden Flanke eine Schulter. Der Grund für diese Schulter ist wahrscheinlich der geringe Massenunterschied zwischen CSA und d12CSA: Die Vorläuferionen und Fragmentionen von CSD und d12CSA haben nur eine geringe Massendifferenz von 2 amu, was zusammen mit der geringen Auflösung des verwendeten Massenspektrometers (Einstellung *low* entspricht einer Massenauflösung $> 0,8$ amu) zu Überstrahlungen der Massenübergänge führen kann. Auf der Massenspur des einen Analyten (hier CSD) wird so ein anderer Analyt (hier d12CSA) falsch positiv detektiert. Wenn, wie im vorliegenden Fall, die Retentionszeiten beider Analyten dicht beieinander liegen, führt das zu der beobachteten Peak-Schulter.

Aufgrund der identischen Retentionszeit und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, auftretende Matrixeffekte bestmöglich zu korrigieren, wurde d12CSA als interner Standard für die Spiegelbestimmung von CSA ausgewählt.

- RAD: 13c2d4RAD ist das isotopenmarkierte Analogon von RAD. Die Retentionszeiten sowie Signalintensitäten beider Analyten sind daher nahezu identisch. Ascomycin hingegen eluiert ca. 0,1 min vor RAD. Dennoch sind sowohl Ascomycin als auch 13c2d4RAD für die Auswertung von RAD-Eichreihen geeignet. Die Korrelationsfaktoren sind mit $R^2 = 0,9998$ (Ascomycin) bzw. $R^2 = 0,9999$

(13c2d4RAD) vergleichbar. Wie bei CSA wurde auch für RAD der isotope markierte Standard für weitere Auswertungen ausgewählt, um auftretende Matrixeffekte bestmöglich zu korrigieren.

- TRL: Für Tacrolimus erweist sich Ascomycin aufgrund gleicher Retentionszeiten als geeigneter interner Standard, wobei auch hier die Korrelationsfaktoren der Eichreihen mit $R^2 = 0,9999$ (Ascomycin) und $R^2 = 0,9998$ (13c2d4RAD) nahezu identisch sind.
- SRL: Sirolimus eluiert zeitgleich mit 13c2d4RAD. Jedoch lässt Ascomycin eine bessere Auswertung der Eichreihe ($R^2_{\text{Ascomycin}} = 0,9999$ anstatt $R^2_{13c2d4RAD} = 0,9940$) zu.

5.3.2.2 Bestimmung von Patientenproben

Die Ergebnisse zeigen, dass die Spiegelbestimmung der Immunsuppressiva Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus und Cyclosporin A aus getrocknetem Vollblut möglich ist.

Die Spiegelbestimmung der Immunsuppressiva in Patientenproben erfolgte mit der optimierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode. In der Routinediagnostik wurden hierfür die internen Standards Ascomycin (für TRL, SRL und RAD) sowie CSD (für CSA) eingesetzt. Vergleiche zeigen jedoch, dass sich für RAD und CSA bessere Korrelationen unter Verwendung der entsprechenden isotope markierten Analoga (d12CSA und 13c2d4RAD) erzielen lassen. 13c2d4RAD zeigt sich auch für die Auswertung von Sirolimus als geeignet. Ascomycin ist sowohl für die Auswertung von Tacrolimus als auch von Sirolimus geeignet.

Die ermittelten Konzentrationen der Immunsuppressiva korrelieren gut mit denen, die mit der Routinemethode ermittelt wurden. Es ergeben sich Korrelationskoeffizienten zwischen $R^2 = 0,7726$ (Tacrolimus) und $R^2 = 0,9223$ (Sirolimus ausgewertet mit Ascomycin). 13c2d4RAD erweist sich hier für die Auswertung von Sirolimus als weniger geeignet, wie der etwas schwächere Korrelationskoeffizient von $R^2 = 0,8941$ belegt.

Während der Großteil der ermittelten Konzentrationen gut mit denen aus der Routinediagnostik übereinstimmen, zeigen andere Proben deutliche Abweichungen von diesen. Dieses ist in den meisten Fällen auf große Schwankungen der internen Standards zurückzuführen. Wie die Vorversuche zum Probenauftrag mit Kapillarpipette zeigen, werden hier stark schwankende Peakflächen der internen Standards gemessen (R.S.D. > 20%). Dies wurde ebenso in den Patientenproben beobachtet. Im Gegensatz dazu werden mit der Routinemethode konstante Peakflächen der internen Standards erzielt. Die relativen Standardabweichungen betragen hier 6,1 % (Ascomycin) bzw. 11 % (CSD). Es zeigte sich, dass die Peakflächen der internen Standards in solchen Proben, die eine nur schwache Korrelation zu den mit der Routinemethode analysierten aufweisen signifikant vom Mittelwert abweichen. Ursächlich dafür kann eine fehlerhaft präparierte Kapillarpipette sein. Möglich ist

Diskussion

jedoch auch, dass die internen Standards in Patientenproben nur schlecht reproduzierbar gelöst werden. Eine korrekte Konzentrationsbestimmung ist jedoch nur mit vergleichbaren Peakflächen der internen Standards möglich. Daher sind an dieser Stelle weitere Untersuchungen zur Peakflächen-Reproduzierbarkeit der internen Standards in verschiedenen Patientenproben nötig (*inter subject variability* der internen Standards).

In dieser Arbeit erfolgte die Spiegelbestimmung der Immunsuppressiva ausschließlich in venösem Vollblut. Es ist daher wichtig die Vergleichbarkeit der Spiegelbestimmung in Kapillarblut und venösem Blut zu untersuchen. In früheren Studien konnte für Cyclosporin A und Tacrolimus bereits eine gute Korrelation in beiden Matrices gezeigt werden^[96-102], weshalb diese Untersuchung vor allem für Sirolimus und Everolimus notwendig ist.

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Firma Spark Holland ein neuartiges Kartuschensystem konzipiert, das es ermöglicht, Pharmaka aus getrockneten Blut- bzw. Plasmaproben mittels Massenspektrometrie zu quantifizieren. Aufgrund des geringen Probenvolumens und der vollautomatisiert durchführbaren Probenvorbereitung lässt sich dieses System sowohl im Rahmen von pharmakokinetischen Untersuchungen an Kleintiermodellen als auch bei der therapeutischen Arzneimittelüberwachung (TDM) bei Patientenproben einsetzen. Die Anwendbarkeit der entwickelten SPE-HPLC-MS/MS-Methode auf Plasmaproben konnte am Beispiel des Antimykotikums Anidulafungin belegt werden. Die ermittelten Konzentrationen zeigten eine gute Korrelation zu einer konventionellen SPE-HPLC-MS/MS-Methode ($R^2 = 0,8739$).

Weiterhin wurde mit dieser Methode erstmals die simultane Spiegelbestimmung der Immunsuppressiva Sirolimus, Tacrolimus, Everolimus und Cyclosporin A im Rahmen des TDM aus getrocknetem Vollblut realisiert. Die Sensitivität der Methode ließ dabei eine Quantifizierung der Analyten in einem Konzentrationsbereich von 1-100 ng/ml (Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus) bzw. 12,5-1200 ng/ml (Cyclosporin A) zu. Damit entsprach die Sensitivität, bei gleichzeitig geringerem Probenvolumen, der einer etablierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode. Erste Vergleichsmessungen beider Methoden ergaben in Patientenproben eine zufriedenstellende Korrelation der jeweils erhaltenen Immunsuppressiva-Konzentrationen ($R^2 > 0,7726$). Die dabei festgestellte schwache Reproduzierbarkeit des internen Standards konnte auf die Präparation der verwendeten Kapillarpipetten zurückgeführt werden. Des Weiteren zeigte sich, dass aus der Probe extrahierte Matrixbestandteile zu einer deutlich verkürzten Lebensdauer der analytischen Säule führten sowie in der Quelle des Massenspektrometers eine ausgeprägte Ionensuppression bewirkten. Vorteile verspricht jedoch eine Modifikation des Spülvorgangs, durch die bereits in ersten Versuchen verbesserte Ergebnisse erzielt werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass die entwickelte Methode einen wichtigen Schritt zu einem anwendungsfreundlichen Probennahme- und Analyseverfahren zur Quantifizierung von Pharmaka aus getrockneten Matrixproben darstellt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] E Mutschler, G Geisslinger, HK Kroemer, M Schäfer-Korting; **Mutschler Arzneimittelwirkungen**; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Ausgabe, 2001, S. 54f.
- [2] WMA Niessen; **Liquid Chromatography-Mass spectrometry**; CRC Press Taylor & Francis Group, 3rd Edition, 2006; S. 332 ff.
- [3] Keine Autoren gelistet; **Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring**; Clin Chem. 1987, 33(7): 1269-1288
- [4] E Mutschler, G Geisslinger, HK Kroemer, M Schäfer-Korting; **Mutschler Arzneimittelwirkungen**; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Ausgabe, 2001, S. 931 ff.
- [5] S Matsuda, S Koyasu; **Mechanisms of action of cyclosporine**; Immunopharmacol. 2000, 47: 119-125, Review
- [6] R Venkataramanan, A Swaminathan, T Prasad, A Jain, S Zuckerman, V Warty, J McMichael, J Lever, G Burckart, T Strazl; **Clinical pharmacokinetics of tacrolimus**; Clin Pharmacokinet. 1995, 29(6): 404-430
- [7] HH Neumayer, K Paradis, A Korn, C Jean, L Fritsche, K Budde, M Winkler, V Kliem, P Pichlmayr, IA Hauser, K Burkhardt, AE Lison, I Brandt, S Appel-Dingemans; **Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal recipients**; Br J Clin Pharmacol. 1999, 48: 694-703
- [8] W Schuler, R Sedrani, S Cottens, B Häberlin, M Schulz, HJ Schuurman, G Zenke, HG Zerwes, MH Schreier; **SDZ Rad, A new rapamycin derivate: pharmacological properties in vitro and in vivo**; Transpl. 1997, 64(1): 36-42
- [9] VH Mabasa, MHH Ensom; **The role of therapeutic monitoring of everolimus in solid organ transplantation**; Ther Drug Monit. 2005, 27(5): 666-676, Review
- [10] I Yano; **Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors**; Drug Metab Pharmacokinet. 2008, 23(3): 150-157, Review
- [11] C Sommer, T Giese, S Meuer, M Zeier; **Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: Is there a clinical benefit?**; Nephrol Dial Transplant 2009, 24: 21-27, Review
- [12] G Levy, P Burra, A Cavalleri, C Duvoux, J Lake, AD Mayer, S Mies, SG Pollard, E Varo, F Villamil, A Johnston; **Improved clinical outcomes for liver transplant recipients using cyclosporine monitoring based on 2-hr post-dose levels (C2)**; Transpl. 2002, 73: 953-959
- [13] J Liu, JD Farmer Jr, WS Lane, J Friedman, I Weissman, SL Schreiber; **Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes**; Cell 1991, 66: 807-815
- [14] G Wiederrecht, E Lam, S Hung, M Martin, N Sigal, **The mechanism of action of FK-506 and ciclosporin A**; Ann N Y Acad Sci. 1993, 696: 9-19 Review
- [15] NA Clipstone, GR Crabtree; **Calcineurin is a key signalling enzyme in T Lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506**; Ann N Y Acad Sci. 1993, 696: 20-30
- [16] KM Rentsch; **Monitoring von Immunsuppressiva**; Therapeutische Umschau 2008, 545-550
- [17] K Aktories, U Förstermann, F Hoffmann, K Starke; **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie**; Urban & Fischer, 9. Auflage, 2005, S. 394
- [18] HL Gallant-Haidner, DJ Trepanier, DG Freitag, RW Yatscoff; **Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus**; Ther Drug Monit 2000, 22(1): 31-35
- [19] U Christians, T Strom, L Zhang, W Streudel, V Schmitz, S Trump, M Haschke; **Active drug transport of immunosuppressants: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics**; Ther Drug Monit. 2006, 28: 39-44
- [20] DJ Henderson, I Naya, RV Bundick, GM Smith, JA Schmidt; **Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production**; Immunology 1991, 73: 316-321

Literaturverzeichnis

- [21] N Terada, JJ Lucas, A Szepesi, RA Franklin, J Domenico, EW Gelfand; **Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic on the middle of late G₁ phase of the cycle**; J Cell Physiol. 1993, 154: 7-15
- [22] BE Bierer, PK Somers, TJ Wandless, SJ Burakoff, SL Schreiber; **Structure-function relationship of immunosuppressive drugs: A cautionary tale**; Hepatology 1991, 14(3): 570-572
- [23] SN Sehgal; **Immunosuppressive profile of rapamycin**; Ann N Y Acad Sci. 1993, 696: 1-8, Review
- [24] SN Sehgal; **Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of action immuosuppressive effect results from blockade of singnal transduction and inhibition of cell cycle progression**; Clin Biochem. 1998, 31: 335-340
- [25] BD Kahan, M Welsh, L Schoenberg, LP Rutzky, P Lynne, SM Katz, DL Urbauer, CT Van Buren; **Variable oral absorption of cyclosporine: A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection**; Transplant. 1996, 62(5): 599-606
- [26] DJ Trepanier, H Gallant, DF Legatt, RW Yatscoff; **Rapamycin: Distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigation: An update**; Clin Biochem. 1998 31(5): 345-351
- [27] BD Kahan, B Kaplan, MI Lorber, M Winkler, N Cambon, RS Boger; **RAD in de novo renal transplantation: Comparison of three doses on incidence and severity of acute rejection**; Transplant. 2001 71(10): 1400-1406
- [28] M Deters, V Kaefer, GI Kirchner; **Liquid chromatography/mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants**; Anal Chim Acta. 2003, 492: 133-145; Review
- [29] D Cattaneo, S Merlini, M Pellegrino, F Carrara, S Zenoni, S Murgia, S Baldelli, F Gaspari, G Remuzzi, N Perico; **Therapeutic drug monitoring of sirolimus: Effect of concomitant immunosuppressive therapy and optimization of drug dosing**; Am J Transplant. 2004, 4: 1345-1351
- [30] JM Kovarik, BD Kahan, B Kaplan, M Lorber, M Winkler, M Rouilly, C Gerbeau, N Cambon, R Boger, C Rordorf; **Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: Pharmacokinetics, exposure-response relationship, and influence on cyclosporine**; Clin Pharm Ther. 2001, 61(1):48-56
- [31] GI Kirchner, I Meier-Wiedenbach, MP Manns; **Clinical Pharmacokinetics of everolimus**; Clin Pharmacokin. 2004, 43(2):83-95
- [32] HJ Schuurman, S Cottens, S Fuchs, J Joergensen, T Meerloo, R Sedrani, M Tanner, G Zenke, W Schuler; **SDZ RAD, a new rapamycin derivative: Synergism with cyclosporine**; Transplant. 1997, 64(1): 32-35
- [33] W Manitsitkul, E McCann, S Lee, MR Weir; **Drug interactions in transplant patients: what everyone should know**; Curr Opin Nephrol Hypertens 2009, 18: 404-411; Review
- [34] A Sansone-Person, G Krishna, N Martino, B Kantesaria, S Gelone, TG Mant; **Effect of oral posaconazole on the pharmacokinetics of cyclosporin and tacrolimus**; Pharmacother. 2007, 27: 825-834
- [35] CL Osowski, SP Dix, LS Lin, RE Mullins, RB Geller, JR Wingard; **Evaluation of the drug interaction between intravenous high-dose fluconazole and ciclosporin or tacrolimus in bone marrow transplant patients**; Transplant. 1996, 61: 1268-1272
- [36] A Said, JJ Garnick, N Dieterle, E Peres, MH Abidi, RB Ibrahim; **Sirolimus-itraconazole interaction in a hematopoietic stem cell transplant recipients**; Pharmacother. 2006, 26: 289-295
- [37] EM Billaud, R Guillemain, F Tacco, P Chevalier; **Evidence for the pharmacokinetic interaction between itroconazole and tacrolimus in organ transplant patients**; Br J Pharmacol. 1998, 46: 271-272
- [38] V Furlan, F Parquin, JF Penaud, J Cerrina, FL Ladurie, P Dartevelle, AM Taburet; **Interaction between tacrolimus and itraconazole in a heart-lung transplant recipient**; Transplant Poc. 1998, 30: 187-188
- [39] H Leather, RM Boyette, L Tian, JR Wingard; **Pharmacokinetic evaluation of the drug interaction between intravenous itraconazole and intravenous tacrolimus or intravenous cyclosporin A in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients**; Biol Blood Marrow Transplant. 2006, 12: 325-334
- [40] AJ Romero, P le Pogamp, LG Nillson, N Wood; **Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant recipients**; Clin Pharmacol Ther. 2002, 71: 226-234

- [41] EM Billaud, C Antoine, M Berge, I Abboud, S Lefevre, M Benammar, D Glotz; **Management of metabolic cytochrome P450 3A4 drug-drug interaction between everolimus and azole antifungals in a renal transplant patient**; 2009 Clin Drug Investig. 29(7): 481-486
- [42] SM Turton-Weeks, GW Barone, BJ Gurley, BL Ketel, ML Lightfoot, SR Abul-Ezz; **St. John's wort: A hidden risk for transplant patients**; Progress in Transplant. 2001, 11: 116-120
- [43] I Mai, S Bauer, E Perloff, A Johne, B Uehleke, B Frank, K Budde, I Roots; **Hyperforin content determines the magnitude of the St. John's wort – cyclosporine drug interaction**; Clin Pharmacol Ther. 2004, 76: 330-340
- [44] SR Knight, PJ Morris; **The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring; a systematic review**; Transplant. 2007, 83: 1525-1535; Review
- [45] K Mahalati, P Belitsky, I Sketris, K West, R Romauld; **Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: Its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation**; Transplant. 1999, 68(1): 55-62
- [46] G Stallone, B Infante, G Grandaliano, L Gesualdo; **Management of side effects of sirolimus therapy**; Transplant. 2009, 87(8S): S23-S26
- [47] VW Armstrong, F Streit; **Drug monitoring of sirolimus and everolimus**; J Lab Med. 2003, 27(5/6): 222-227
- [48] E Nemati, B Einollahi, S Taheri, M Moghani-Lankarani, E Kalantar, N Simforoosh, M Nafar, AR Saadat; **Cyclosporine trough (C0) and 2-hour postdose (C2) levels: Which one is a predictor of graft loss?**; Transplant Proc. 2007, 39: 1223-1224
- [49] E Thervet, P Pfeffer, MP Scolari, L Toselli, LM Pallardó, S Chadban, H Pilmore, J Connolly, M Buchler, FP Schena, CA Carreo, R Dandavino, E Cole; **Clinical outcomes during the first three months posttransplant in renal allograft recipients managed by C₂ monitoring of cyclosporine microemulsion**; Transplant. 2003, 76(6): 903-908
- [50] F Villamil, S Pollard; **C₂ monitoring of cyclosporine in de novo liver transplant recipients: The clinician's perspective**; Liver Transplant. 2004, 10(5): 577-583; Review
- [51] JN Murthy, DL Davis, RW Yatscoff, SJ Soldin; **Tacrolimus metabolite cross-reactivity in different tacrolimus assays**; Clin Biochem. 1998, 31(8): 613-617
- [52] E Schütz, D Svinarov, M Shipkova, PD Niedmann, VW Armstrong, E Wieland, M Oellerich; **Cyclosporin whole blood immunoassay (AxSYM, CEDIA, and Emi): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC**; Clin Chem. 1998, 44(10): 2158-2164
- [53] AR Terell, TM Daly, KG Hock, DC Kilgore, TQ Wei, S Hernandez, D Weibe, L Fields, LM Shaw, MG Scott; **Evaluation of a no-pretreatment cyclosporin A assay on the Dade Behring RxL Clinical Chemistry Analyser**; Clin Chem. 2002, 48(7): 1059-1065
- [54] AW Butch, AM Fukuchi; **Analytical performance of the CEDIA[®] Cyclosporine PLUS whole blood immunoassay**; J Anal Tox. 2004, 28(3): 204-210
- [55] Ak Ghoshal; SJ Soldin; **IMx tacrolimus II assay: is it reliable at low blood concentrations? A comparison with tandem MS/MS**; Clin Biochem. 2002, 35: 389-392
- [56] RG Morris, P Salm, PJ Taylor, FA Wicks, A Theodossi; **Comparison of the reintroduced MEIA[®] assay with HPLC-MS/MS for the determination of whole-blood sirolimus from transplant recipients**; Ther Drug Monit. 2006, 28(2): 164-168
- [57] H Schneider, W Steimer; **Tandem-Massenspektrometrie in der therapeutischen Arzneimittelspiegel-Bestimmung: Praxis und Tücken der Anwendung**; J Lab Med. 2006, 30(6): 428-437
- [58] F Streit, U Christians, H-M Schiebel, KL Napoli, L Ernst, A Linck, BD Kahan, K-F Sewing; **Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry**; Clin Chem. 1996, 42(9): 1417-1425
- [59] PJ Taylor, A Jones, GA Balderson, SC Lynch, RLG Norris, SM Pond; **Sensitive, specific analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry**; Clin Chem. 1996, 42(2): 279-285

Literaturverzeichnis

- [60] PJ Taylor, NS Hogan, SV Lynch, AG Johnson, SM Pond; **Improved therapeutic monitoring of tacrolimus (FK506) by tandem mass spectrometry**; Clin Chem. 1997, 43(11): 2189-2190
- [61] PJ Taylor, CE Jones, PT Martin, SV Lynch, AG Johnson, SM Pond; **Microscale high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood**; J Chrom B. 1998, 705: 289-294
- [62] PJ Taylor, PI Pillans; **Analytical performance of microparticle enzyme immunoassay and HPLC-tandem mass-spectrometry in the determination of sirolimus**; Clin Chem. 1999, 45(12): 2278-2280
- [63] PJ Taylor, AG Johnson; **Quantitative analysis of sirolimus (rapamycin) in blood by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry**; J Chrom B. 1998, 718: 251-257
- [64] P Salm, PJ Taylor, SV Lynch, PI Pillans; **Quantification and stability of everolimus (SDZ RAD) in human blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry**; J Chrom B. 2002, 772: 283-290
- [65] DW Hold, T Lee, K Jones, A Johnston; **Validation of an assay for routine monitoring of sirolimus using HPLC with mass spectrometry detection**; Clin Chem. 2000, 46(8): 1179-1183
- [66] BG Keevil, DP Tierney, DP Cooper, MR Morris; **Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine analysis of cyclosporin A over an extended concentration range**; Clin Chem. 2002, 48(1): 69-76
- [67] I Segarra, TR Brazelton, N Guterman, B Hausen, W Jacobsen, RE Morris, LZ Benet, U Christians; **Development of a high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay for the specific and sensitive quantification of the novel immunosuppressive macrolide 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin**; J Chrom B. 1998, 720: 179-187
- [68] L Zhou, D Tan, J Theng, L Lim, Y-P Liu, K-W Lam; **Optimized analytical method for cyclosporin A high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry**; J Chrom B. 2001, 754: 201-207
- [69] GL Lensmeyer, MA Poquette; **Therapeutic drug monitoring of tacrolimus concentrations in blood: semi-automated extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry**; Ther Drug Monit. 2001, 23: 239-249
- [70] S Wang, A Mille; **A rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of whole blood sirolimus using turbulent flow technology for online extraction**; Clin Chem Lab. 2008, 46(11): 1631-1634
- [71] S O'Halloran, KF Ilett; **Evaluation of a deuterium-labeled internal standard for the measurement of sirolimus by high-throughput HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry**; Clin Chem. 2008, 54(8): 1386-1389
- [72] C Vidal, GI Kirchner, G Wünsch, K-F Sewing; **Automated simultaneous quantification of the immunosuppressants 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin and cyclosporine in blood with electrospray-mass spectrometric detection**; Clin Chem. 1998, 44(6): 1275-1282
- [73] GI Kirchner, C Vidal, W Jacobsen, A Franzke, K Hallensleben, U Christians, K-F Sewing; **Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry**; J Chrom B. 1999, 721: 285-294
- [74] U Christians, W Jacobsen, N Serkova, LZ Benet, C Vidal, K-F Sewing, MP Manns, GI Kirchner; **Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants**; J Chrom B 2000, 748: 41-53
- [75] A Volosov, KL Napoli, SJ Soldin; **Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry**; Clin Biochem. 2001, 34: 285-290
- [76] LM McMahon, S Luo, M Hayes, FLS Tse; **High-throughput analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a semi-automated 96-well solid-phase extraction system**; Rapid Commun Mass Spectrom. 2000, 14: 1965-1971
- [77] N Brignol, LM McMahon, S Luo, FLS Tse; **High throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood**; Rapid Commun Mass Spectrom. 2001, 15: 898-907

Literaturverzeichnis

- [78] M Deters, G Kirchner, K Resch, V Kaever; **Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)**; Clin Chem Lab. 2002, 40(3): 285-292
- [79] F Streit, VW Armstrong, M Oellerich; **Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood**; Clin Chem. 2002, 48(6): 955-958
- [80] M Oellerich, VW Armstrong, F Streit, L Weber, B Tönshoff; **Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients**; Clin Biochem. 2004, 97: 424-428
- [81] T Koal, M Deters, B Casetta, V Kaever; **Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**; J Chrom B. 2004, 805: 215-222
- [82] MA Poquette, GL Lensmeyer, TC Doran; **Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) in the routine clinical laboratory for monitoring sirolimus, tacrolimus and cyclosporin**; Ther Drug Monit. 2005, 27: 144-150
- [83] RA Koster, CF Dijkers, DRA Uges; **Robust, high-throughput LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus in whole blood**; Ther Drug Monit. 2009, 31(1): 116-125
- [84] C Seger, K Tentschert, W Stöggel, A Griesmacher, SL Ramsay; **A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples**; Nat Protoc. 2009, 4(4): 526-534
- [85] T Koal, H Burhenne, R Römling, M Svoboda, K Resch, V Kaever; **Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spots by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry** Rapid Commun Mass Spectrom. 2005, 19(21): 2995-3001
- [86] R ter Heine, H Rosing, EC van Gorp, JW Mulder, WA van der Steeg, JH Beijnen, AD Huitema; **Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry**; J Chrom B. Anal Technol Biomed Life Sci. 2008, 867(2): 205-212
- [87] R ter Heine, H Rosing, EC van Gorp, JW Mulder, JH Beijnen, AD Huitema; **Quantification of etravirine (TMC125) in plasma, in dried blood spots and peripheral blood mononuclear cell lysate by liquid chromatography mass spectrometry**; J Pharm Biomed Anal. 2009, 49(2): 393-400
- [88] R ter Heine, MJ Hillebrand, H Rosing, EC van Gorp, JW Mulder, JH Beijnen, AD Huitema; **Quantification of the HIV-integrase inhibitor raltegravir and detection of its main metabolite in human plasma, dried blood spots and peripheral blood mononuclear cell lysate by means of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry**; J Pharm Biomed Anal. 2009, 49(2): 451-458
- [89] G la Marca, S Malvagia, L Filippi, P Fiorini, M Innocenti, F Luceri, G Pieraccini, G Monti, S Francese, FR Dani, R Guerrini; **Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquid chromatography tandem-mass spectrometric method**; J Pharm Biomed Anal. 2008, 48(5): 1392-1396
- [90] AL Allanson, MM Cotton, JN Tettey, AC Boyter; **Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: a potential method for the therapeutic drug monitoring**; J Pharm Biomed Anal. 2007, 44(4): 963-969
- [91] K Woods, JD Douketis, T Schnurr, K Kinnon, P Powers, MA Crowther; **Patient preference for capillary vs. venous INR determination in an anticoagulation clinic: a randomized controlled trial**; Thromb Res. 2004, 114: 161-165
- [92] K Hoogtanders, J van der Heijden, M Christiaans, P Edelbroek, JP van Hooff, LML Stolk; **Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method**; J Pharm Biomed Anal. 2007, 44: 658-664
- [93] J van der Heijden, Y de Beer, K Hoogtanders, M Christiaans, GJ de Jong, C Neef, L Stolk; **Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry**; J Pharm Biomed Anal. 2009, 50(4): 664-670
- [94] AJ Wilhelm, JC den Burger, RM Vos, A Chahbouni, A Sinjewel; **Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry**; J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2009, 877(14-15): 1595-1598

Literaturverzeichnis

- [95] D Lampe, D Scholz, HJ Prümke, W Blank, H Hüller; **Capillary blood, dried on filter paper, as sample for monitoring cyclosporin A concentrations**; Clin Chem. 1987, 33(9): 1643-1644
- [96] G Merton, K Jones, M Lee, A Johnston, DW Holt; **Accuracy of cyclosporin measurements made in capillary blood samples obtained by skin puncture**; Ther Drug Monit. 2000, 22: 594-598
- [97] RJ Profumo, TM Foy, RE Kane; **Correlation between venous and capillary blood samples for cyclosporine monitoring in pediatric liver transplant patients**; Clin Transplant. 1995, 9(5): 424-426
- [98] BG Keevil, DP Tierney, DP Cooper, MR Morris, A Machaal, N Yonan; **Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring**; Ther Drug Monit. 2002: 24: 757-767
- [99] N Yonan, R Martyszczuk, A Machaal, A Baynes, BG Keevil; **Monitoring of cyclosporine levels in transplant recipients using self-administered fingerprick sampling**; Clin Transplant. 2006, 20: 221-225
- [100] NJA Webb, MG Coulthard, RS Trompeter, MM Fitzpatrick, S Stephens, J Dudley, H Maxwell, S Waller, GC Smith, AR Watson, DA Hughes, BG Keevil, JS Ellis; **Correlation between finger-prick and venous ciclosporin levels: association with gingival overgrowth and hypertrichosis**; Pediatr Nephrol. 2007, 22: 2111-2118
- [101] BG Keevil, J Fildes, A Baynes, N Yonan; **Liquid chromatography-mass spectrometry measurement of Tacrolimus in finger-prick samples compared with venous whole blood samples**; Ann Clin Biochem. 2009, 46(Pt 2): 144-145
- [102] NJA Webb, D Roberts, R Preziosi, BG Keevil; **Fingerprick blood samples can be used to accurately measure Tacrolimus levels by tandem mass spectrometry**; Pediatr Transplant. 2005, 9: 726-733
- [103] D Cooper, B Keevil, M Morris; **Cyclosporin A measurement in dried blood spot samples: a useful approach for self-monitoring?**; Application Brief AB 35, 2001; micromass
- [104] CY Cheung, J van der Heijden, K Hoogtanders, M Christiaans, YL Liu, YH Chan, KS Choi, A van de Plas, CC Shek, KF Chau, CS Li, J van Hooff, L Stolk; **Dried blood spot measurement: application in tacrolimus monitoring using limited sampling strategy and abbreviated AUC estimation**; Transpl Int. 2008, 21(2): 140-145
- [105] K Hoogtanders, J van der Heijden, M Christiaans, A van de Plas, J van Hooff, L Stolk; **Dried blood spot measurement of tacrolimus is promising for patient monitoring**; Tranplant. 2007, 83: 237-238
- [106] JA Vazques; **Anidulafungin: A new echinocandin with a novel profile**; Clin Ther. 2005, 27: 657-673
- [107] J Onishi, M Meinz, J Thompson, J Curotto, S Dreikorn, M Rosenbach, C Douglas, G Abruzzo, A Flattery, L Kong, A Cabello, F Vicente, F Pelaez, MT Diez, I Martin, G Billis, R Giacobe, A Dombrowski, R Schwartz, S Morris, G Harris, A Tsiouras, K Wilson, MB Kurtz; **Discovery of a novel antifungal (1,3)- β -D-Glucan synthase inhibitors**; Antimicrob Agents Chemother. 2000, 44(2): 368-377
- [108] DW Denning; **Echinocandins and pneumocandins – a new antifungal class with a novel mode of action**; J Antimicrob Chemother. 1997, 40: 611-614
- [109] RF Hector; **Compounds active against cell walls of medically important fungi**; Clin Microbiol Rev. 1993: 1-21
- [110] AH Groll, D Mickiene, R Petraitiene, V Petraitis, CA Lyman, JS Bacher, SC Piscitelli, TJ Walsh; **Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of anidulafungin (LY303366): Reappraisal of its efficacy in neutropenic animal models of opportunistic mycoses using optimal plasma sampling**; Antimicrob Agents Chemother. 2001, 45(10): 2845-2855
- [111] JA Dowell, W Knebel, T Ludden, M Stogniew, D Krause, T Henkel; **Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal**; J Clin Pharmacol. 2004, 44: 590-598
- [112] M Debono, WW Turner, L LaGrandeur, FJBurkhardt, JF Nissen, KK Nichols, MJ Rodriguez, MJ Zweifel, DJ Zeckner, RS Gordee, J Tang, TR Parr Jr.; **Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB**; J Med Chem. 1995, 38: 3271-3281

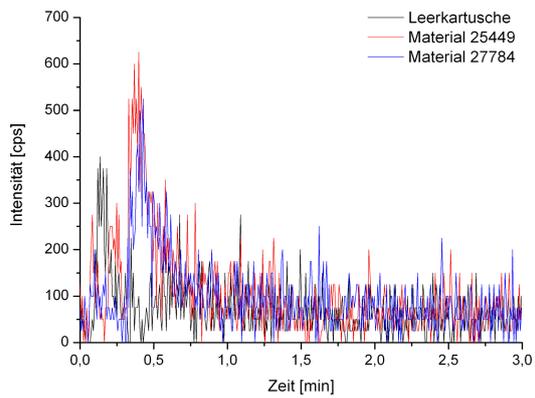
Literaturverzeichnis

- [113] LL Zornes, RE Stratfort; **Development of a plasma high-performance liquid chromatographic assay for LY303366, a lipopeptide antifungal agent, and its application in a dog pharmacokinetic study**; J Chrom B. 1997, 695: 381-387
- [114] JA Dowell, M Stogniew, D Krause, T Henkel, IE Weston; **Assessment on the safety on pharmacokinetics of anidulafungin when administered with cyclosporine**; J Clin Pharmacol. 2005, 45: 227-233
- [115] JV Iribarne, BA Thomson; **On the evaporation of small ions from charged droplets**; J Chem Phys. 1976: 64(6): 2287-2294
- [116] F Lottspeich, H Zorbas; **Bioanalytik**; Spektrum Akademischer Verlag; 1998; S.349 ff.
- [117] C Müller, P Schäfer, M Störzel, S Vogt, W Weinmann; **Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionization transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries**; J Chrom A. 2002, 773: 47-52
- [118] PJ Taylor; **Matrix effects: the achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry**; Clin Biochem. 2005, 38: 328-334
- [119] TM Annesley; **Ion suppression in mass spectrometry**; Clin Chem. 2003, 49(7): 1041-1044
- [120] R King, R Bongfiglio, C Fernandez-Metzler, C Miller-Stein, T Olah; **Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization**; J Am Soc Mass Spectrom. 2000, 11(11): 942-950
- [121] H Mei, Y Hsieh, C Nardo, X Xu, S Wang, K Ng, WA Korfmacher; **Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery**; Rapid Commun Mass Spectrom. 2003, 17: 97-103
- [122] MP Audrézet, B Costes, N Ghanem, P Fanen, C Verlingue, JP Morin, B Mercier, M Goossens, C Férec; **Screening for cystic fibrosis in dried blood spots of newborns**; Mol Cell Probes. 1993, 7(6): 497-502
- [123] JP Van Biervliet, N Vinaimont, H Caster, M Rosseneu, F Belpaire; **A screening procedure for dyslipoproteinemia in the newborn. Apoprotein quantitation on dried blood spots**; Clin Chim Acta. 1982, 120(2): 191-200
- [124] A Dajnoki, A Mühl, G Fekete, J Keutzer, J Orsini, V Dejesus, XK Zhang, OA Bodamer; **Newborn screening of Pompe disease by measuring acid alpha-glucosidase activity using tandem mass spectrometry**; Clin Chem. 2008, 54(10): 1624-1629
- [125] Fachinformation von "Novartis Pharma AG Basel, Switzerland", Stand: Mai 2009
- [126] Fachinformation von "Novartis Pharma AG Basel, Switzerland", Stand: Juli 2008
- [127] Fachinformation von "Astellas", Stand: April 2009
- [128] Fachinformation von "Wyeth", Stand: April 2009
- [129] Datenblatt von "Novartis Pharma AG Basel, Switzerland", Januar 2007
- [130] Datenblatt von "Novartis Pharma AG Basel, Switzerland", Juli 2007
- [131] RT Rossi, N Zhang; **Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects**; J Chrom A., 2000, 885: 97:113
- [132] Produktkatalog der Firma Waters "Chromatography columns and supplies catalog 2008-2009", S.15
- [133] WMA Niessen; **Liquid Chromatography-Mass spectrometry**; CRC Press Taylor & Francis Group, 3rd Edition, 2006; S. 334
- [134] R Kostianinen, AP Bruins; **Effect of multiple sprayers on dynamic range and flow rate limitations in electrospray and ionspray mass spectrometry**; Rapid Commun Mass Spectrom. 1994, 8: 549-558
- [135] TL Constantopolous, GS Jackson, CG Enke; **Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry**; J Am Soc Mass Spectrom. 1999, 10(7): 625-634

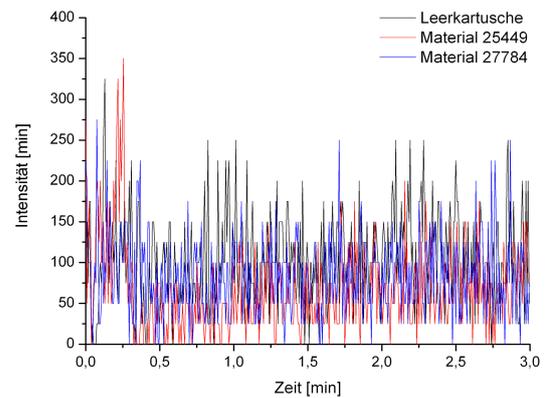
- [136] Y Ran, L Zhao, Q Xu, SH Yalkowsky; **Solubilization of cyclosporin A**; AAPS Pharm Sci Tech. 2001, 2(1) article 2
- [137] M Kawai, IWK Gunawardana, KW Mollison, GC Hsieh; **Studies on a immunosuppressive macrolactam, ascomycin: synthesis of a C-33 hydroxyl derivate**; Bioorg Med Chem Lett. 1998, 8(8): 935-938
- [138] S Tamura, A Ohike, R Ibuki, GL Amidon, S Yamashita; **Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: the effect of p-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats**; J Pharm Sci. 2002, 91(3): 719-729
- [139] P Simamora, JM Alvarez, SH Yalkowsky; **Solubilization of rapamycin**; Int J Pharm. 2001; 213(1-2): 25-29
- [140] Prüfzertifikat Novartis Pharma AG: "SDZ RAD: Use Guidelines" Basel, 1998
- [141] C Wagner, W Graninger, E Presterl, C Joukhadar; **The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications**; Pharmacol. 2006, 78: 161-177
- [142] R Kostianen, T Kauppila; **Effect of eluent of the ionization in liquid chromatography-mass spectrometry**; J Chrom A. 2009, 1216: 685-699; Review
- [143] S Gao, Z-P Zangh, HT Karnes; **Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives**; J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005, 825(2): 98-100
- [144] JM Smith, JM Hows, EG Gordon-Smith; **Stability of cyclosporin A in human serum**; J Clin Pathol. 1983, 36: 41-43
- [145] DJ Freeman, M Stawecki, B Howson; **Stability of FK 506 in whole blood samples**; Ther Drug Monit. 1995, 17: 266-267
- [146] TM Annesley, BC Hunter, DR Fidler, DA Giacherio; **Stability of tacrolimus (FK 506) and cyclosporin G in whole blood**; Ther Drug Monit. 1995, 17: 361-365
- [147] AM Alak, P Lizak; **Stability of tacrolimus in blood samples**; Ther Drug Monit. 1996. 18(2): 209-211
- [148] P Salm, MJ Tresillian, P Taylor; **Stability of sirolimus (rapamycin) in whole blood**; Ther Drug Monit. 2000, 22(4): 423-426
- [149] F Lottspeich, H Zorbas; **Bioanalytik**; Spektrum Akademischer Verlag; 1998; S.204 ff.
- [150] R Dams, T Benijts, W Günther, W Lambert, A De Leenheer; **Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray**; Rapid Commun Mass Spec. 2002, 16:1072-1077
- [151] SR Needham, PR Brown, K Duff, D Bell; **Optimized stationary phases for the high-performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometric analysis of basic pharmaceuticals**; J Chrom A. 2000, 869: 159-170
- [152] RF Straub, RD Voyksner; **Negative ion formation in electrospray mass spectrometry**; J Am Soc Mass Spectrom. 1993, 4(7): 578
- [153] H Kirchherr, WN Kühn-Velten; **Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi level, single sample approach**; J Chrom B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006, 843(1): 100-113
- [154] R Bonfiglio, RC King, TV Olah, K Merkle; **The effect of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds**; Rapid Commun Mass Spectrom. 1999, 13: 1175-1185

8. Anhang

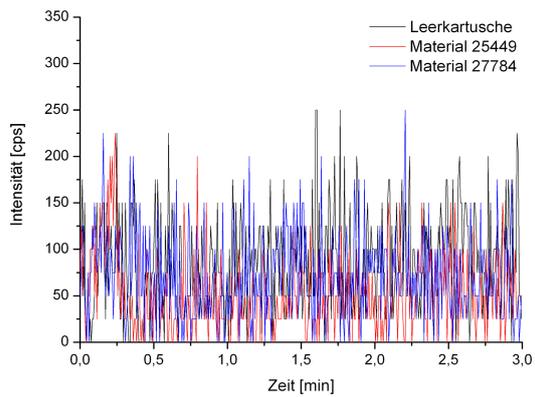
Anhang 1: SRM-Chromatogramme der Analyten zur Untersuchung eines geeigneten Filtermaterials



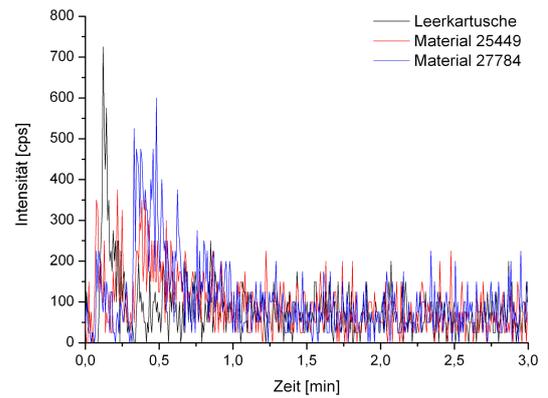
Tacrolimus



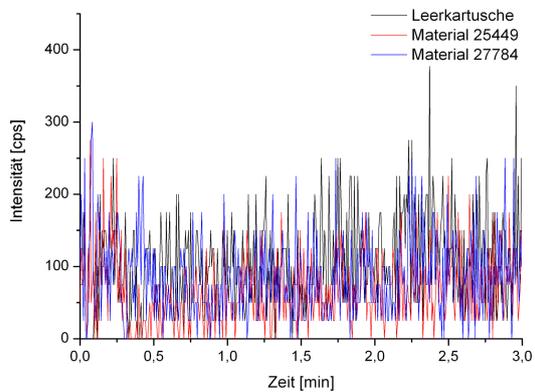
Sirolimus



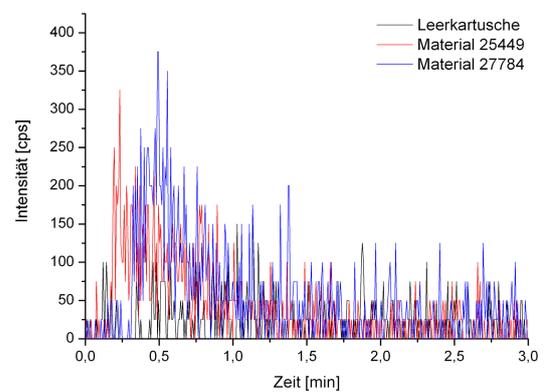
Everolimus



Ascomycin

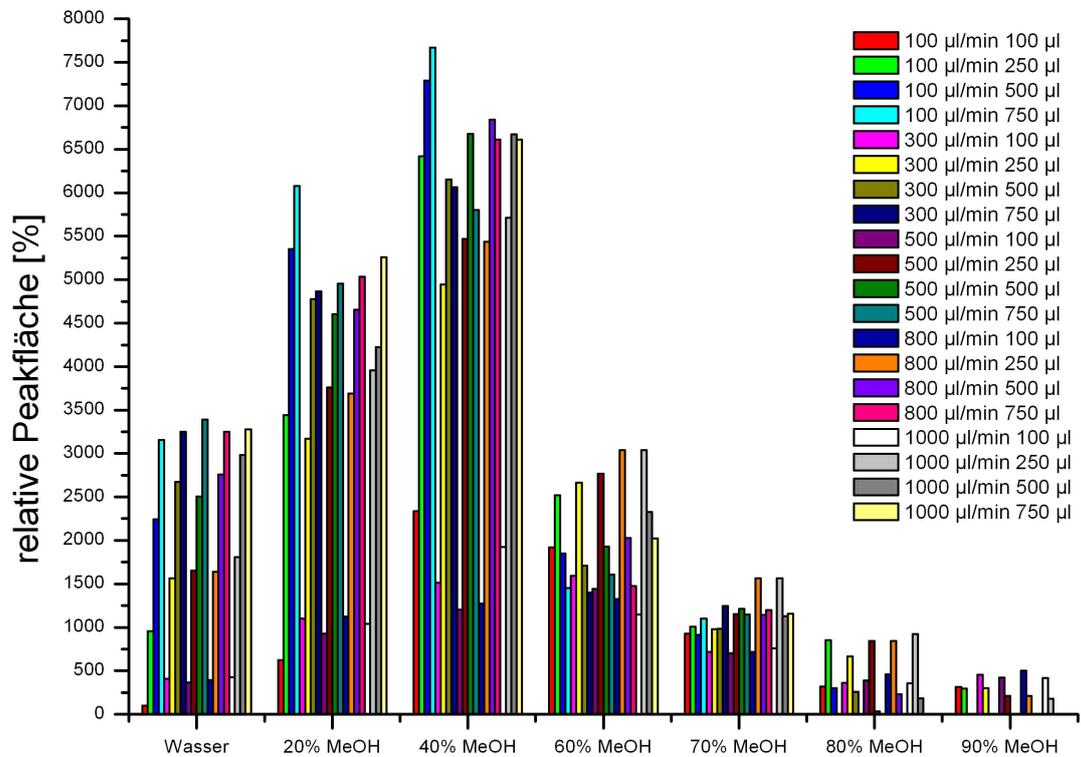


13c2d4RAD

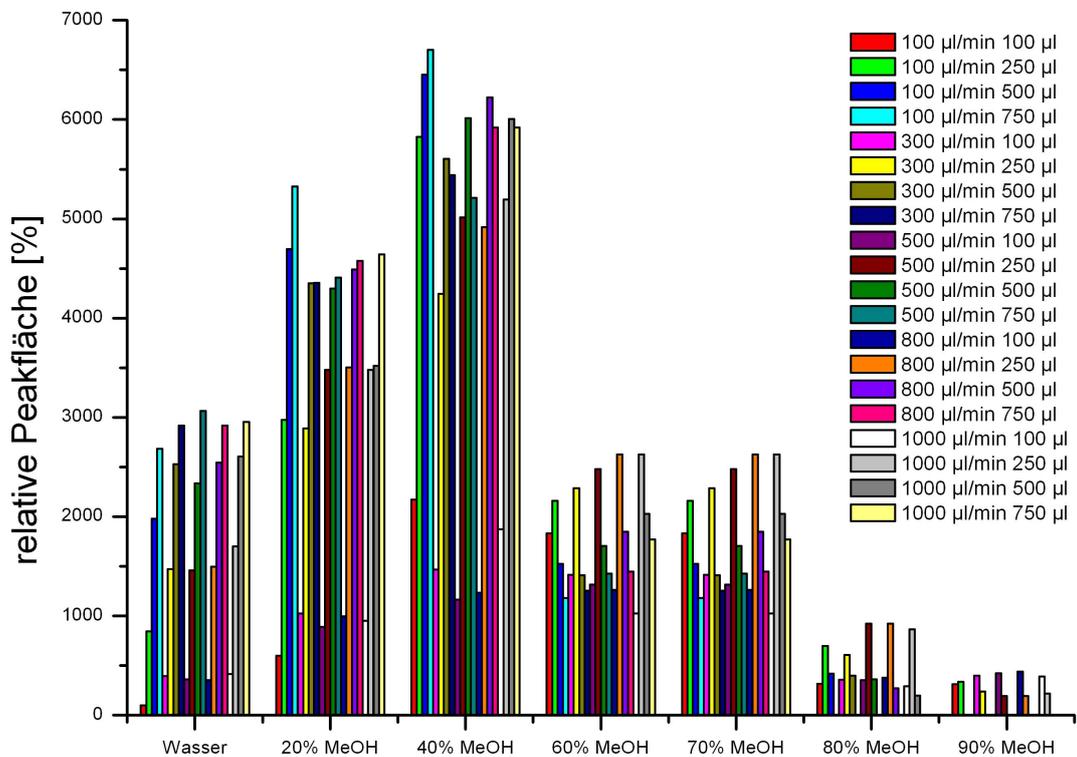


d12CSA

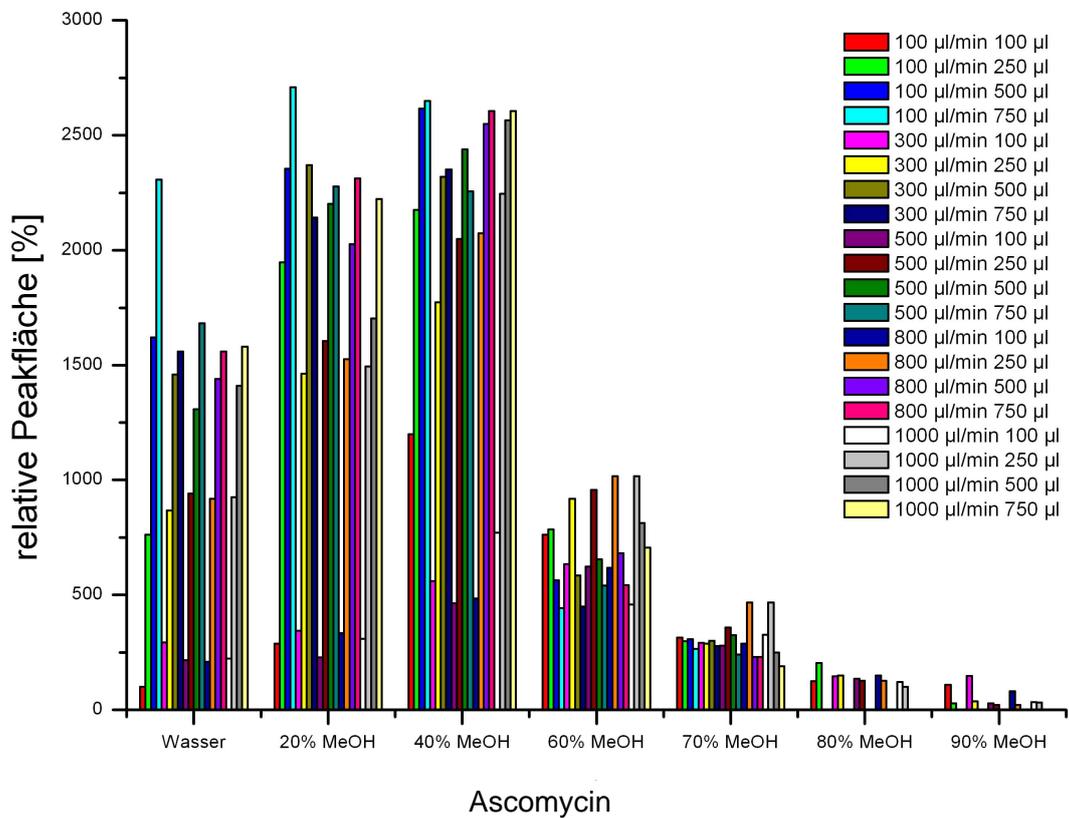
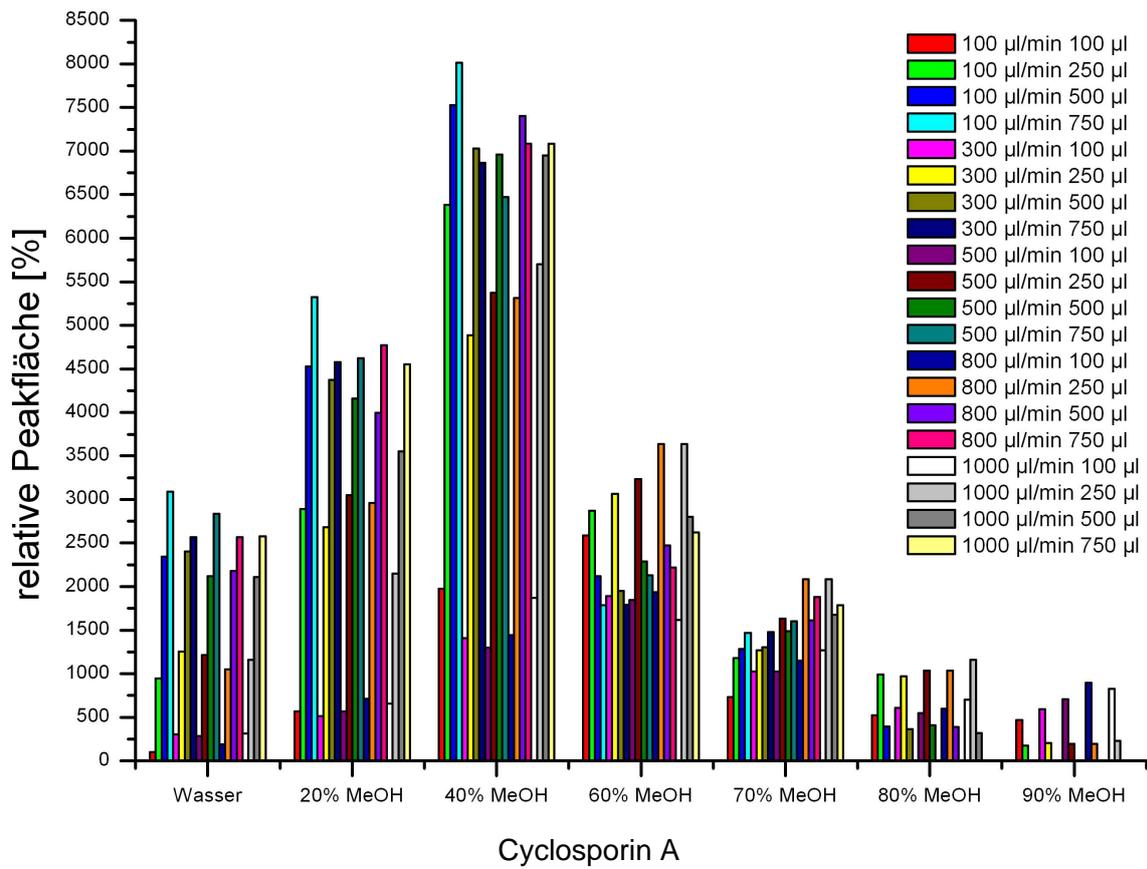
Anhang 2: Optimierung des Analyttransfers von dem Filtermaterial auf die SPE-Kartusche

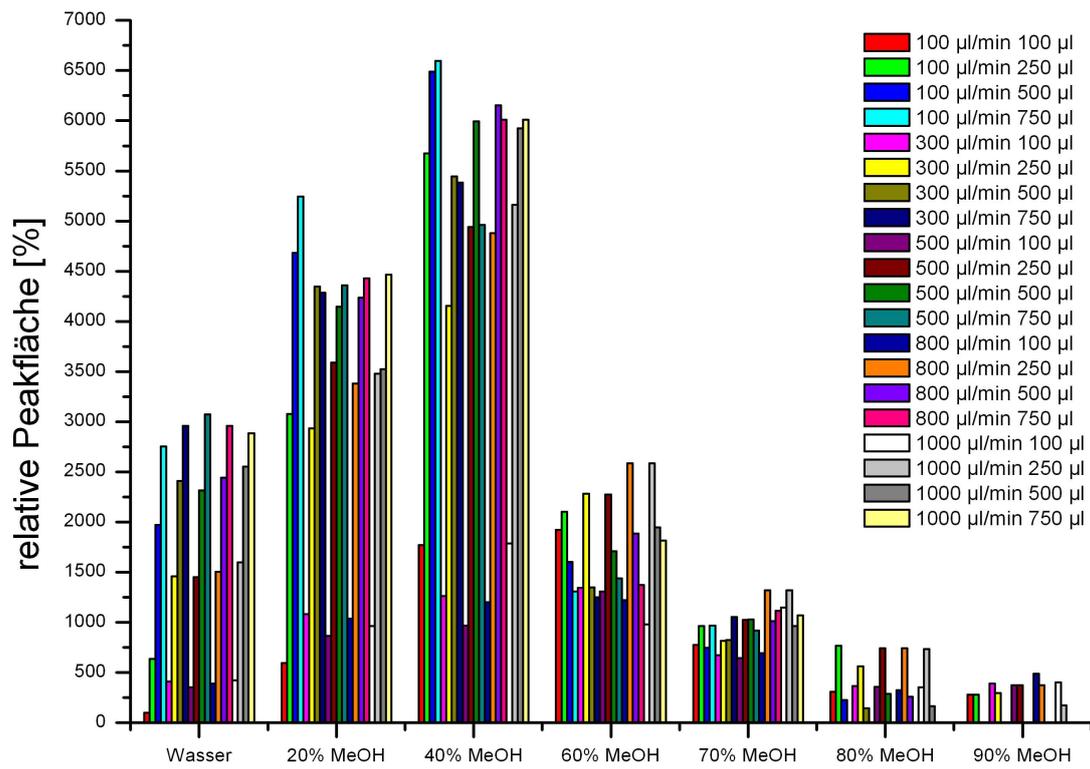


Sirolimus

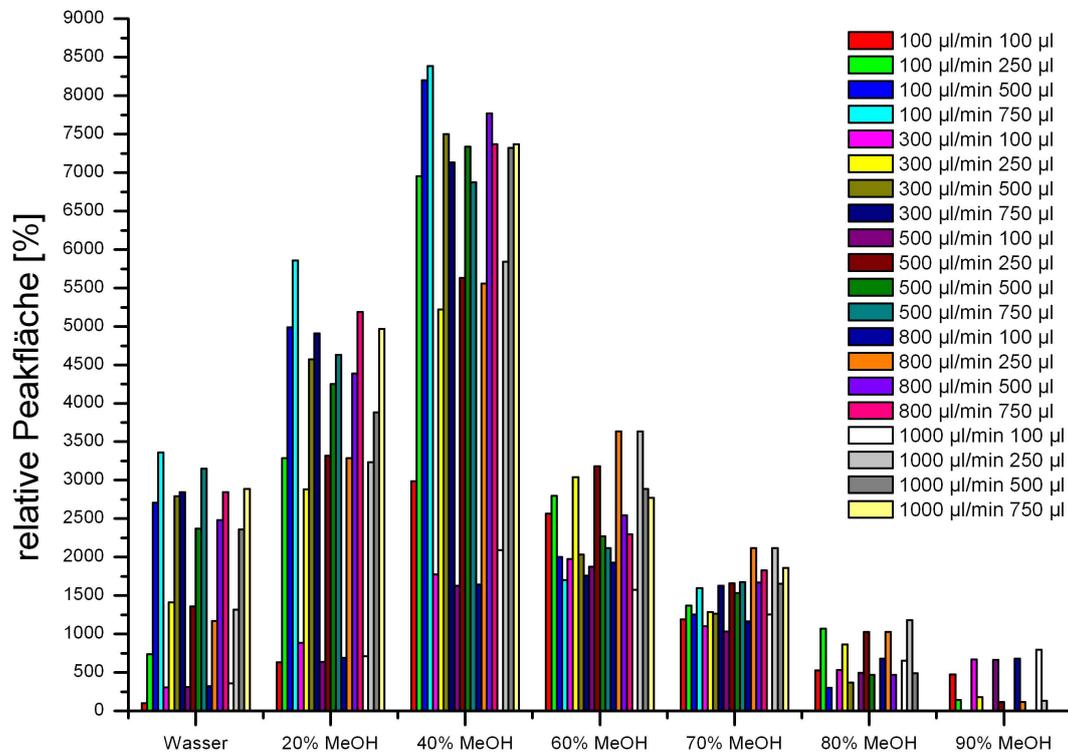


Everolimus

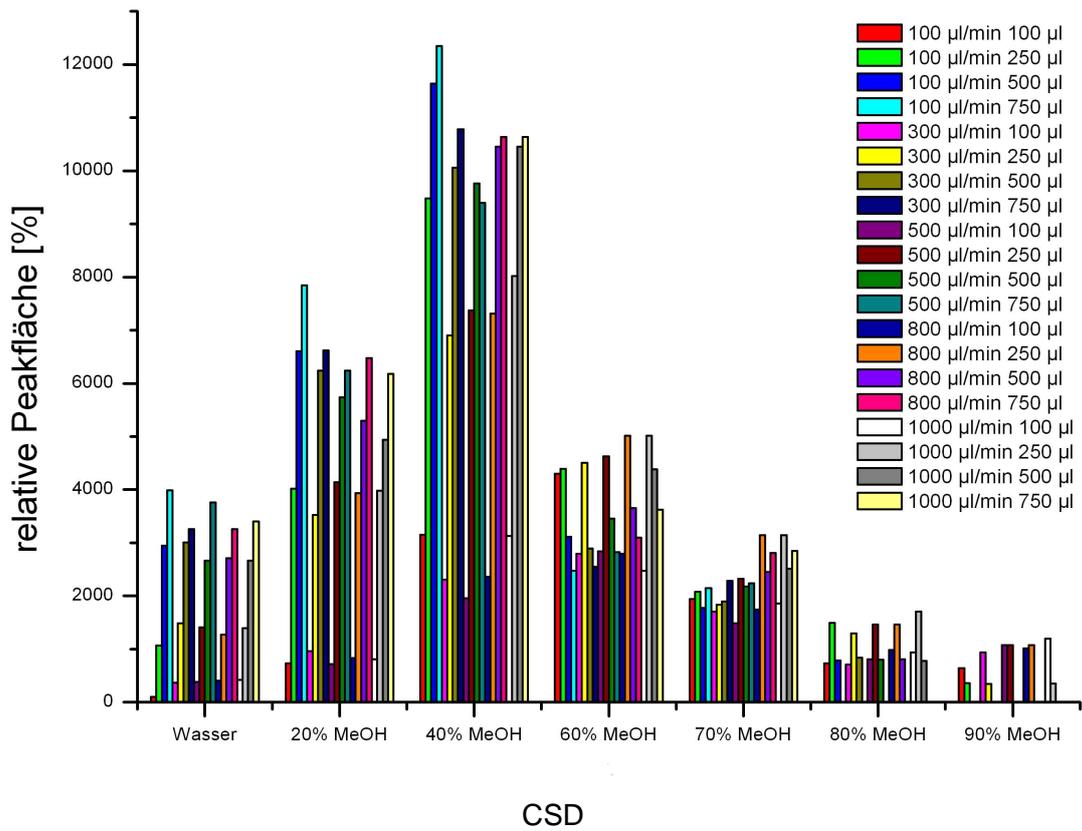




13c2d4RAD



d12CSA



Anhang: 3: Übersicht der ermittelten Anidulafunginkonzentrationen in Patientenproben

Proben-Nr.	Ermittelte Konzentration [ng/ml]	
	Routine-methode	Kartuschen-system
1	5320	7440
2	4430	6540
3	4600	5330
5	3470	4710
6	2790	3970
7	2700	3930
8	2360	3420
9	1600	2480
10	4570	7670
11	3530	5610
12	3480	4220
13	2260	2780

Anhang

Anhang 4: Übersicht der ermittelten Immunsuppressiva-Konzentrationen in Patientenproben

Pati- en- Nr.	Pharmaka	ermittelte Konzentration [ng/ml]	
		Routine- methode	Kartuschen- system
1	SRL	5,84	5,18
2	SRL	2,72	1,96
3	SRL	9,32	8,01
4	RAD CSA	3,09 85,4	3,28 109
5	SRL	5,66	5,23
6	CSA	113	106
7	RAD CSA	4,89 92,7	5,77 98,7
8	SRL	9,15	9,54
9	RAD CSA	5,85 68	5,94 69
10	RAD	3,94	3,2
11	SRL	5,39	6,38
12	RAD	1,17	0,914
13	TRL	9,94	9,35
14	SRL	8,34	8,9
15	SRL	6,33	5,95
16	RAD CSA	4,93 141	4,41 136
17	SRL	11,8	10,5
18	SRL	8,76	10,9
19	SRL	12,7	16,3
20	RAD CSA	6,88 127	7,69 159
21	RAD CSA	3,55 50,2	3,6 67,9
22	SRL TRL	5,28 6,68	5,48 7,65
23	SRL CSA	7,08 29,5	9,13 37,3
24	SRL RAD	1,13 6,13	0,736 8,83

Pati- en- Nr.	Pharmaka	Ermittelte Konzentration [ng/ml]	
		Routine- methode	Kartuschen- system
25	SRL CSA	4,51 63,7	4,77 63,6
26	SRL TRL	7,44 4,06	6,87 3,51
27	SRL RAD TRL	1,67 17,5 10,7	0,911 14,3 9,08
28	CSA	116	113
29	RAD	7,58	7,84
30	RAD CSA	7 94,2	7,24 94,1
31	CSA	89,3	86,1
32	CSA	62,9	68,7
33	SRL	14,2	14,6
34	SRL	12,1	11,4
35	RAD CSA	5,52 45,6	4,09 36,5
36	SRL	9,86	10,1
37	SRL TRL	10,2 3,2	10,1 2,89
38	RAD	6,04	6,05
39	SRL TRL	3,42 9,64	3,96 10,9
40	SRL CSA	8,68 82	9,86 97,9
41	SRL	4,65	5,16
42	RAD	7,02	7,45
43	SRL	6,08	7,21
44	CSA	201	224
45	SRL RAD	1,34 9,26	1,1 11,6
46	TRL	8,08	9,22
47	SRL	5,58	7,05
48	TRL	4,43	5,09

Anhang 5: Übersicht der Peakfläche (Einheit: counts) der internen Standards in den Patientenproben

	<i>Routinemethode</i>		<i>Kartuschensystem</i>		
	Ascomycin	CSD	Ascomycin	13c2d4RAD	d12CSA
1	2,87E+05	2,14E+06	1,09E+05	4,56E+04	2,27E+05
2	3,60E+05	2,06E+06	1,19E+05	4,82E+04	2,30E+05
3	3,66E+05	1,82E+06	1,13E+05	5,01E+04	1,86E+05
4	3,78E+05	1,95E+06	9,87E+04	3,28E+04	1,17E+05
5	4,04E+05	1,90E+06	1,11E+05	4,16E+04	1,87E+05
6	3,77E+05	1,81E+06	1,28E+05	4,67E+04	1,84E+05
7	4,07E+05	1,76E+06	9,03E+04	3,56E+04	1,30E+05
8	3,54E+05	1,76E+06	1,03E+05	4,32E+04	1,74E+05
9	3,75E+05	1,65E+06	8,37E+04	3,01E+04	1,07E+05
10	3,65E+05	1,77E+06	8,97E+04	3,02E+04	1,23E+05
11	3,97E+05	1,99E+06	1,16E+05	4,67E+04	1,96E+05
12	3,69E+05	2,32E+06	1,36E+05	5,29E+04	2,15E+05
13	4,00E+05	1,90E+06	1,46E+05	5,56E+04	2,11E+05
14	3,81E+05	1,94E+06	9,55E+04	3,96E+04	1,79E+05
15	3,94E+05	2,32E+06	1,07E+05	4,40E+04	1,64E+05
16	3,69E+05	2,05E+06	1,11E+05	4,50E+04	1,56E+05
17	3,91E+05	2,16E+06	1,27E+05	5,48E+04	2,64E+05
18	4,15E+05	2,25E+06	7,83E+04	2,91E+04	1,13E+05
19	4,17E+05	2,29E+06	8,76E+04	3,51E+04	1,42E+05
20	4,05E+05	2,28E+06	8,46E+04	3,53E+04	1,33E+05
21	3,91E+05	2,33E+06	7,80E+04	2,73E+04	1,05E+05
22	4,00E+05	2,20E+06	9,50E+04	3,34E+04	1,61E+05
23	3,83E+05	1,94E+06	8,91E+04	3,55E+04	1,38E+05
24	3,99E+05	2,28E+06	7,88E+04	3,19E+04	1,36E+05
25	3,94E+05	1,80E+06	9,22E+04	3,84E+04	1,35E+05
26	3,74E+05	1,88E+06	1,20E+05	4,78E+04	2,03E+05
27	3,94E+05	1,67E+06	8,56E+04	3,63E+04	2,02E+05
28	3,54E+05	1,78E+06	6,32E+04	1,95E+04	8,10E+04
29	3,60E+05	1,71E+06	1,29E+05	5,11E+04	1,57E+05
30	3,77E+05	1,79E+06	9,68E+04	3,66E+04	1,64E+05
31	3,66E+05	1,91E+06	1,03E+05	5,10E+04	2,06E+05
32	3,73E+05	1,78E+06	1,22E+05	4,86E+04	1,70E+05
33	3,61E+05	1,74E+06	9,36E+04	3,60E+04	1,49E+05
34	3,39E+05	1,98E+06	1,05E+05	3,92E+04	1,80E+05
35	3,47E+05	1,81E+06	1,48E+05	6,10E+04	2,19E+05
36	3,54E+05	1,70E+06	1,17E+05	4,72E+04	1,77E+05
37	3,43E+05	1,66E+06	9,88E+04	5,04E+04	2,20E+05
38	3,87E+05	2,01E+06	1,07E+05	4,67E+04	1,87E+05
39	3,66E+05	2,08E+06	7,76E+04	3,38E+04	1,44E+05
40	3,86E+05	2,39E+06	9,82E+04	4,29E+04	1,76E+05
41	3,56E+05	1,69E+06	8,23E+04	3,35E+04	1,28E+05
42	3,83E+05	1,83E+06	8,62E+04	3,60E+04	1,55E+05
43	3,52E+05	1,74E+06	6,86E+04	3,39E+04	1,61E+05
44	3,61E+05	1,68E+06	9,14E+04	2,73E+04	1,08E+05
45	3,78E+05	1,84E+06	7,76E+04	2,99E+04	1,34E+05
46	3,73E+05	1,71E+06	7,53E+04	3,04E+04	1,23E+05
47	3,65E+05	1,72E+06	8,56E+04	3,53E+04	1,23E+05
48	3,83E+05	1,83E+06	7,47E+04	2,85E+04	1,05E+05

Publikationen

O Burkhardt, S Ellis, **H Burhenne**, V Kaefer, J Hadem, JT Kielstein, T Welte; ***High caspofungin levels in alveolar cells of a lung transplant patient with suspected pulmonary aspergillosis***; Int J Antimicrob Agents. 2009, 34(5): 491-492

O Burkhardt, V Kaefer, **H Burhenne**, JT Kielstein; ***Extended daily dialysis does not affect the pharmacokinetics of Anidulafungin***; Int J Antimicrob Agents. 2009,34(3): 282-283

JT Kielstein, J Lorenzen, V Kaefer, **H Burhenne**, M Broll, C Hafer, O Burkhardt; ***Risk of underdosing of ampicillin/sulbactam in patients with acute kidney injury undergoing extended daily dialysis--a single case***; Nephrol Dial Transplant. 2009, 24(7): 2283-2285

T Koal, **H Burhenne**, R Römling, M Svoboda, K Resch, V Kaefer; ***Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry***; Rapid Commun Mass Spectrom. 2005,19(21): 2995-3001

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname	Burhenne, Heike
Geburtsdatum, -ort	17.05.1980, Hannover
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Krügerskamp 28 30539 Hannover

Ausbildung

1986 – 1990	Besuch der Grundschule am Sandberge in Bemerode
1990 – 1992	Besuch der Orientierungsstufe in der KGS Laatzen
1992 – 1997	Besuch des Gymnasiums im Gymnasium Laatzen
1997 – 1999	Besuch des Gymnasiums in der KGS Laatzen, Abitur
Oktober 1999 – Januar 2007	Studium der Biochemie (Diplom) an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie (Medizinische Hochschule Hannover) <i>Entwicklung einer online SPE-HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von NRTI und einer SPE-HPLC-MS-Methode zur Quantifizierung von NRTI-Triphosphaten</i>
Seit Dezember 2006	Promotion an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover am Institut für Pharmakologie (Medizinische Hochschule Hannover) <i>Entwicklung eines neuartigen Kartuschensystems zur automatisierten Probenvorbereitung bei der Quantifizierung von Pharmaka mittels Massenspektrometrie</i>

Beruflicher Werdegang

Seit Dezember 2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie an der Medizinischen Hochschule Hannover
--------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation „**Entwicklung eines neuartigen Kartuschensystems zur automatisierten Probenvorbereitung bei der Quantifizierung von Pharmaka mittels Massenspektrometrie**“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die gegebenenfalls zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben zu haben.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Unterschrift)

Name: Heike Burhenne