

**„Automatisierte Flüssigchromatographie mit  
Säulenschaltung und Ultraviolettspektroskopie oder  
Massenspektrometrie für Therapeutisches Drug Monitoring  
von Antipsychotika und Antidepressiva“**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Julia Sachse

geb. in Mainz

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2005

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1	Psychopharmakotherapie und TDM	2
1.2	Praktische Durchführung von TDM in der Psychiatrie	8
1.3	Aktueller Stellenwert des TDM in der Psychiatrie	9
1.4	Analytik von Antidepressiva und Antipsychotika für das TDM	10
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	<b>Material</b>	<b>16</b>
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Chromatographiesäulen	16
3.1.3	Chemikalien und Referenzsubstanzen	18
3.1.4	Stammlösungen, Arbeitsstandards, Kontrollen und Interne Standards	20
3.1.5	Fließmittel in der Chromatographie	21
3.1.6	Plasma und Serum	22
3.1.7	Computerprogramme	22
3.2	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.2.1	Detektion und Integration	23
3.2.2	Probenvorbereitung und Kalibriergeraden	23
3.2.3	Validierung	26
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1	<b>Optimierung der Vorsäule</b>	<b>27</b>
4.1.1	Charakterisierung der Bindungskapazität von Vorsäulenmaterial	27
4.1.2	Standzeit der Vorsäule	33
4.1.3	Selektivität der verwendeten Vorsäulen	35
4.2	<b>Entwicklung der HPLC-UV-Methode</b>	<b>38</b>
4.2.1	Entwicklung einer „Multi“-HPLC-UV-Methode zur Bestimmung verschiedener Antidepressiva und Neuroleptika	38
4.2.2	Entwicklung und Validierung einer HPLC-UV-Methode zur Bestimmung von Clozapin, Olanzapin, Perazin und Quetiapin	49
4.2.3	Erweiterung der HPLC-UV-Methode um Ziprasidon (Zeldox <sup>®</sup> )	60
4.3	<b>Entwicklung einer HPLC-MS-Methode</b>	<b>65</b>
4.3.1	Entwicklung einer HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von acht verschiedenen Neuroleptika	65
4.4	<b>Anwendung der Methoden</b>	<b>86</b>
4.4.1	Anwendung der HPLC-UV-Methode in der klinischen Routine	86
4.4.2	Bestimmung von Ziprasidon (Zeldox <sup>®</sup> ) in der klinischen Routine	89
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>Kurzzusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>112</b>
<b>11.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>12.</b>	<b>Summary</b>	<b>116</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Psychopharmakotherapie und TDM

»Ärzte schütten Medikamente,  
von denen sie wenig wissen,  
zur Heilung von Krankheiten,  
von denen sie weniger wissen,  
in Menschen,  
von denen sie nichts wissen.«

Voltaire (1694-1778)

In den letzten Jahrhunderten wurde das Wissen über Medikamente und Krankheiten zwar immer größer, aber grundlegend hat sich an der Aussage Voltaires wenig geändert. Noch immer birgt das Zusammentreffen von Mensch und Medikament eine Menge Überraschungen.

Die Markteinführung von Chlorpromazin, des ersten Antipsychotikums überhaupt, in den frühen 50er Jahren, war der Beginn der Psychopharmakotherapie. Es folgten weitere Wirkstoffe, die eine medikamentöse Therapie von depressiven und schizophrenen Patienten erstmalig ermöglichten. Heute sind mehr als 100 verschiedene Psychopharmaka verfügbar. Doch das bis heute Erreichte ist bei weitem noch nicht zufriedenstellend.

Selbst bei bester Diagnostik kann nicht sicher vorhergesagt werden, ob ein Patient auf ein gewähltes Medikament in der vorgesehenen Zieldosis ansprechen wird. Dosisänderungen, Medikamentenwechsel und Kombinationsbehandlungen gehören daher in der antidepressiven und antipsychotischen Pharmakotherapie zum klinischen Alltag. Unzureichendes Ansprechen kann pharmakokinetische und pharmakodynamische Ursachen haben.

Entscheidend für die Wirkung eines Arzneimittels ist die Konzentration, die am Wirkort erreicht wird. Um einen klinischen Effekt mit optimaler Wirkung und minimalem Risiko zu erzielen, wäre es deshalb wünschenswert, Arzneimittelkonzentrationen direkt dort, am Wirkort zu messen. Dies ist für Psychopharmaka in der klinischen Routine nicht durchführbar. Im klinischen Alltag stellt daher die tägliche Dosis die wesentliche Orientierungsgröße dar, um therapeutische Effekte zu erzielen. Die Dosis ist jedoch nur ein grobes Maß für die Einstellung einer wirksamen Konzentration. Variable Faktoren wie Compliance, Resorption, Transport, Metabolisierung und Ausscheidung führen zu interindividuell hoch variablen Wirkstoffkonzentrationen.

Für Antidepressiva und Antipsychotika gibt es Schätzungen, die besagen, dass die Compliance bei etwa 20 – 80 % unzureichend ist [1, 2].

Psychopharmaka werden deshalb, selbst mit Einhaltung von Dosierungsempfehlungen, bei 30 – 50 % der Patienten unter- oder überdosiert. Unterdosierung hat zur Folge, dass die Krankheitsdauer verlängert wird, bei Überdosierung ist mit vermehrten Nebenwirkungen zu rechnen. In beiden Situationen ist eine Dosiskorrektur erforderlich.

Ob eine besondere Pharmakokinetik oder mangelhafte Compliance bei einem individuellen Patienten Ursache des Therapieversagens sind, lässt sich durch therapeutisches Drug Monitoring (TDM), also durch Messung der Blutspiegel (entspricht der Konzentration der Medikamente im Blutplasma oder – serum), überprüfen. Konzentrationen von Psychopharmaka im Blut korrelieren mit den

Konzentrationen im Gehirn. TDM gehört bei einer Lithium-Behandlung zum Standard der Therapie und auch bei der Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva wird TDM relativ häufig angewandt [3]. Bei klassischen Antipsychotika wie Haloperidol soll TDM das Therapieansprechen verbessern und das Auftreten der sehr unangenehmen extrapyramidal-motorischen Störungen (EPS) vermeiden helfen [4].

Aufgrund des Nebenwirkungsprofils von Clozapin wurde das TDM gerade hier als Hilfe angenommen. Studien zeigten, dass das TDM das Ansprechen der Patienten auf die Therapie erhöhte, das Auftreten von Nebenwirkungen reduzierte [5-7] und bei langfristiger Einnahme, die Gefahr eines Rezidivs minimierte [8, 9].

Doch es gibt unterschiedliche Einschätzungen, ob und bei welchen Patienten TDM sinnvoll ist und was TDM bei der Behandlung mit Antidepressiva und Antipsychotika, insbesondere der neuen Medikamente, zur Optimierung der Pharmakotherapie leisten und nicht leisten kann [10]. In Behandlungsleitlinien zur Depression [11, 12] wird das TDM als Option erwähnt, ohne dass darauf eingegangen wird, wie TDM für die Therapieoptimierung einzusetzen ist. Die TDM-Gruppe der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP, <http://www.agnp.de>) hat publizierte Studien und die Literatur gesichtet und daraus Consensus-Empfehlungen erarbeitet [13, 14], um die Anwendung von TDM in der Psychiatrie zu verbessern [15].

#### Pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften von Antidepressiva und Antipsychotika

Antidepressiva und Antipsychotika sind chemisch sehr heterogene Gruppen. Gemeinsame Eigenschaften sind eine hohe Fettlöslichkeit und ein Molekulargewicht zwischen 200 und 500 d. Sowohl Antidepressiva als auch Antipsychotika tragen eine Aminofunktion. Sie werden in der Regel gut aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und in der Leber metabolisiert. Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit können interindividuell sehr unterschiedlich sein, im Wesentlichen aufgrund der individuell unterschiedlichen Ausstattung der Leber mit Arzneimittel abbauenden Enzymen. Entsprechend sind die Blutspiegel bei gleicher Dosis interindividuell sehr variabel. Tierexperimentell wurde für trizyklische Antidepressiva und die Antipsychotika Clozapin und Olanzapin [16] nachgewiesen, dass Blutspiegel sehr gut mit Konzentrationen im Gehirn korrelieren, meist deutlich besser als die Dosis. Mit Hilfe bildgebender Verfahren wurde für verschiedene Antipsychotika und für die neuen Antidepressiva Fluoxetin, Citalopram, Sertralin, Paroxetin und Venlafaxin am Menschen gezeigt, dass Blutspiegel sehr gut mit der Besetzung von Dopaminrezeptoren bzw. von Serotonintransportern im Gehirn korrelieren, den primären Wirkstrukturen dieser Psychopharmaka [17-19].

Die meisten Antidepressiva wirken durch Erhöhung der Konzentrationen von Serotonin und/oder Noradrenalin im synaptischen Spalt. Dies erfolgt bei den meisten Antidepressiva durch Hemmung der neuronalen Aufnahme (Reuptakeinhibitoren) oder des Abbaus (Monoaminoxidasehemmer) der Monoamine Serotonin und Noradrenalin. Bei trizyklischen Antidepressiva (TZA) mit tertiärer Aminogruppe sind außer der Muttersubstanz auch die N-demethylierten Metabolite pharmakologisch aktiv. Trizyklische Antidepressiva hemmen neben der neuronalen Aufnahme von Serotonin und/oder Noradrenalin im Gehirn zahlreiche Neurotransmitterrezeptoren, was ursächlich eine Reihe von Nebenwirkungen auslösen kann, z.B. Müdigkeit, Mundtrockenheit, Benommenheit oder Herzrhythmusstörungen. Lange Zeit waren TZA die Antidepressiva der ersten Wahl. Dies hat sich mit Einführung der neuen Antidepressiva geändert [20-22]. Die neuen Antidepressiva sind selektiver und

weniger toxisch als die alten. Auch ist die Pharmakokinetik einfacher, denn in der Regel werden keine aktiven Metabolite gebildet. Ausnahmen sind Fluoxetin (Norfluoxetin) und Venlafaxin (O-Desmethylvenlafaxin). Die Bioverfügbarkeit von Antidepressiva liegt zwischen 25 und 90%, die terminale Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) bei 20 Stunden. Eine wichtige Ausnahme ist Fluoxetin und sein aktiver Metabolit ( $t_{1/2} = 48$  bzw. 80 h) mit sehr langer Halbwertszeit, was bei einem Wechsel der Medikation und wegen des Interaktionsrisikos von Fluoxetin und seinem Metaboliten kritisch sein kann.

Antipsychotika entfalten nach derzeitigem Wissen ihre therapeutische Wirkung in erster Linie durch Antagonisierung von Dopamin-Rezeptoren vom Subtyp  $D_2$ . Bei übermäßiger  $D_2$ -Rezeptorblockierung ist mit den typischen unerwünschten Nebenwirkungen von Antipsychotika zu rechnen [17], den extrapyramidal-motorischen Störungen. Diese Nebenwirkungen treten vor allem bei Behandlung mit den traditionellen Antipsychotika wie Haloperidol auf. Unter Antipsychotika der zweiten Generation, mit Clozapin als Prototyp, fehlen motorische Nebenwirkungen oder sind selten. Außerdem bessert sich unter den neuen Antipsychotika auch die sogenannte Negativsymptomatik. Die Bioverfügbarkeit beträgt bei den Antipsychotika etwa 50%, die Eliminationshalbwertszeiten liegen zwischen 7 und 50 Stunden (Ausnahme Depotformen). Das heisst, auch bei den meisten Antipsychotika ist eine Woche nach stabiler Dosis das Steadystate eingestellt. Antipsychotika werden umfangreich metabolisiert, wobei Cytochrom P450-Enzyme eine besonders wichtige Rolle spielen. Nur Amisulprid und Sulpirid werden im Wesentlichen unverändert ausgeschieden. Metabolite sind für die therapeutische Wirkung von Antipsychotika so gut wie unbedeutend. Eine Ausnahme ist Risperidon, das primär über seinen Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon wirkt, welcher eine längere Halbwertszeit hat als die Muttersubstanz. Nur wenige Antipsychotika besitzen ein klinisch relevantes Hemmpotenzial auf Cytochrom P450-Enzyme. Chlorpromazin, Melperon und Levomepromazin sind Inhibitoren von CYP2D6. Eine Hemmung anderer Enzyme scheint klinisch keine Rolle zu spielen.

### Therapeutische Blutspiegel

TDM wurde ursprünglich für Nortriptylin eingeführt [23]. Die Autoren fanden, dass es einen therapeutisch optimalen Bereich gibt und sie beobachteten Nichtansprechen nicht nur bei niedrigen (unter 70 ng/ml) sondern auch bei hohen Blutspiegeln (über 170 ng/ml) von Nortriptylin. Nebenwirkungen von TZA (trizyklischen Antidepressiva) wie Unruhe oder Schlafstörung sind auch Symptome der Erkrankung, so dass es vorkommen kann, dass Nebenwirkungen als Verschlechterung der Erkrankung interpretiert werden. Das aus den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen abgeleitete Konstrukt des therapeutischen Fensters geht davon aus, dass es für therapeutische und toxische Wirkungen jeweils eine minimal effektive Konzentration gibt. Der Bereich zwischen beiden Konzentrationen wird als therapeutisches Fenster einer Substanz definiert. Dieses Konzept wurde für andere trizyklische Antidepressiva und auch für Antipsychotika der ersten Generation wie Chlorpromazin oder Haloperidol bestätigt [4, 24-26] und daraus wurden Zielspiegel für das TDM definiert. Für trizyklische Antidepressiva, einige typische Antipsychotika, Clozapin und Olanzapin sind Zielspiegel nach dem Konzept des therapeutischen Fensters gut belegt. Fraglich ist allerdings, ob dies auch für die neuen Antidepressiva und Antipsychotika in gleichem Maß zutreffend ist wie für die alten [27]. Bei neuen Antidepressiva und Antipsychotika gibt es keine gut belegten Referenzbereiche. Unterschiedliche Labors geben daher verschiedene Bereiche an [28].

Für Risperidon und Olanzapin konnte zum Beispiel eine Korrelation zwischen der Konzentration im Plasma und dem Therapieansprechen nachgewiesen werden. Das TDM verbesserte hier das Therapieergebnis deutlich [29-35]. Das therapeutische Fenster für Risperidon liegt zwischen 20 und 60 ng/ml, inklusive des aktiven Metaboliten 9-Hydroxy-Risperidon [29]. Optimal für Olanzapin ist eine Konzentration im Plasma von 20 bis 80 ng/ml [30, 32].

Die TDM-Gruppe der AGNP empfiehlt, für Antidepressiva und Antipsychotika ohne Angaben eines optimalen Zielbereiches Konzentrationen zu wählen, die im Mittel bei therapeutischen wirksamen Dosen eingestellt werden. Wenn es keinen durch Studien belegten Referenzbereich gibt und solche Daten auch in der Literatur fehlen, kann man zu erwartende Blutspiegel bei therapeutischen Dosen aus pharmakokinetischen Daten näherungsweise berechnen nach der Funktion:

$$C^{ss} = (F \cdot D) / \tau \cdot 1 / CL$$

$C^{ss}$  = Gleichgewichtskonzentration im Blut (ng/ml)

F = Bioverfügbarkeit

D = Dosis (mg)

$\tau$  = Dosierintervall (h)

CL = Clearance (ml/min)

In Tabelle 1 sind die nach Stand der aktuellen Literatur [14] für die Therapieoptimierung anzustrebenden Zielbereiche für Antidepressiva und Antipsychotika angegeben.

**Tabelle 1: Orientierende Blutspiegelbereiche von Antidepressiva und Antipsychotika, die bei der Therapieoptimierung mit Hilfe von Therapeutischem Drug Monitoring angestrebt werden sollten [14].**

Antidepressiva	Erhaltungsdosis (mg/Tag)	Blutspiegelbereich (ng/ml)	Antipsychotika	Erhaltungsdosis (mg/Tag)	Blutspiegelbereich (ng/ml)
Amitriptylin	150–300	80–200*	Amisulprid	400–800	100–400
Amitriptylinoxid	90–300	80–200*	Aripiprazol	15–30	unklar
Citalopram	20–60	50–130	Benperidol	3–20	2–10
Clomipramin	150–225	175–450*	Chlorpromazin	300–600	30–300
Desipramin	75–150	100–300	Clozapin	100–600	350–600
Doxepin	150–300	50–150*	Flupentixol	3–15	>2
Fluoxetin	20–60	120–300*	Fluphenazin	3–20	0,5–2
Fluvoxamin	100–300	80–300	Haloperidol	5–15	5–17
Imipramin	150–300	175–300*	Levomepromazin	200–600	15–60
Maprotilin	75–150	125–200	Melperon	100–600	50
Mianserin	15–70	15–70	Olanzapin	5–20	20–80
Mirtazapin	30–45	30–100	Perazin	75–800	100–230
Moclobemid	300–600	300–1000	Perphenazin	8–24	0,6–2,4
Nortriptylin	100–300	70–170	Pimozid	2–16	15–20
Paroxetin	20–60	70–120	Quetiapin	150–750	75–170
Reboxetin	4–12	20–100	Risperidon	4	20–60*
Sertralin	50–200	10–50	Sulpirid	300–1600	200–1000
Trazodon	200–600	650–1500	Ziprasidon	80–160	50–120
Trimipramin	150–400	150–300	Zotepin	200–400	12–120
Venlafaxin	75–375	200–400*	Zuclopentixol	20–80	4–50

\*Summe der Konzentrationen von Muttersubstanz plus aktivem Metabolit.

## Indikationen für TDM

Mit Hilfe des therapeutischen Drug Monitorings (TDM) lassen sich die verabreichten Dosen individuell für den jeweiligen Patienten optimieren. Mit TDM ist es möglich, die Effizienz der Psychopharmakotherapie zu erhöhen und das Auftreten von Nebenwirkungen oder Intoxikationen zu minimieren.

Für viele Antidepressiva und Antipsychotika wird das TDM bereits heute genutzt.

Wenn ein therapeutischer Bereich für ein Antidepressivum oder Antipsychotikum evaluiert ist, ist es sinnvoll, TDM immer als Bestandteil der Therapie zu nutzen. Dies ist allerdings derzeit noch keine gängige Praxis. Dies liegt unter anderem daran, dass es nur eine begrenzte Zahl qualifizierter Labors gibt, die in der Lage sind Blutspiegel von Psychopharmaka zu messen.

Noch wichtiger als die generelle Anwendung von TDM sind einzelfallbezogene Indikationen für die Anforderung von TDM:

- Verdacht auf Nichteinnahme der verordneten Medikamente
- kein oder ungenügendes Ansprechen trotz klinisch üblicher Dosis
- ausgeprägte Nebenwirkungen trotz klinisch üblicher Dosis
- Verdacht auf eine Arzneimittelinteraktion
- Kombinationsbehandlung mit einem Medikament mit bekanntem pharmakokinetischem Interaktionspotential
- Rezidiv unter Erhaltungsdosis
- bekannte pharmakogenetische Besonderheiten
- Kinder und Jugendliche
- Alterspatienten über 60 Jahre
- Komorbidität
- forensische Indikationen

## TDM zur Kontrolle von Arzneimittelwechselwirkungen

Eine besonders wichtige einzelfallbezogene Indikation für das TDM von Antidepressiva und Antipsychotika ist die Kontrolle von pharmakokinetischen Arzneimittelwechselwirkungen. Fluvoxamin, Paroxetin und Fluoxetin und sein Metabolit Norfluoxetin sind potente Inhibitoren von Enzymen der Cytochrom P450(CYP)-Familie. Paroxetin, Fluoxetin und Norfluoxetin hemmen CYP2D6, Fluvoxamin CYP1A2 und CYP2C19. Bei Kombination dieser Antidepressiva mit Antipsychotika oder anderen Medikamenten, die Substrate des entsprechenden CYP-Isoenzym sind, kann es unter therapeutischen Dosen zu Blutspiegelanstiegen und schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen. Mit TDM kann dies verhindert werden. Mit TDM können sogar Kombinationen eingesetzt werden, von denen ohne Blutspiegelkontrolle dringend abzuraten ist. TDM kann bei Antidepressiva- oder Antipsychotikabehandlung auch sinnvoll sein, wenn ein enzyminduzierendes Medikament wie Carbamazepin abgesetzt wird, oder wenn ein Patient im Verlauf der Behandlung seine Rauchgewohnheiten ändert. Rauchen hat einen Einfluss auf die Expression von CYP1A2. Bei Patienten, die beispielsweise mit Olanzapin oder Clozapin behandelt werden, kann es nach Einstellen des Rauchens, wegen verminderter Induktion von CYP1A2, zu einem Anstieg der Blutspiegel von Olanzapin bzw. Clozapin kommen und es können vermehrt Nebenwirkungen auftreten [36].

## Medizinischer und ökonomischer Nutzen von TDM

Es gibt vereinzelte Studien, die einen Nutzen von TDM für die antidepressive bzw. antipsychotische Pharmakotherapie belegen. Der erste Bericht eines ökonomischen Nutzens von TDM wurde 1985 von Simmons und Mitarbeitern publiziert [37]. Bei Patienten, die mit Nortriptylin bzw. Amitriptylin behandelt werden sollten, wurde durch eine pharmakokinetische Voruntersuchung die Enddosis berechnet. Es zeigte sich, dass Patienten, die auf diese Weise eindosiert worden waren, im Mittel sechs Tage weniger lang im Krankenhaus waren und ihre Arbeitsfähigkeit rascher wiedererlangten als die Kontrollgruppe, die ohne pharmakokinetische Voruntersuchung antidepressiv behandelt wurde. Für einige trizyklische Antidepressiva, Clozapin, Olanzapin und einige hochpotente Neuroleptika sind durch Blutspiegel-Wirkungs-Studien optimale Blutspiegel nachgewiesen worden. Bei Einstellung von Patienten auf optimale Spiegel, ist mit höherer Wahrscheinlichkeit mit Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen zu rechnen, als bei Einstellung auf Blutspiegel außerhalb der optimalen Bereiche. TDM ist demnach von medizinischem Nutzen [10]. Dies wurde in Untersuchungen an 108 Patienten, die mit trizyklischen Antidepressiva behandelt wurden, auch prospektiv nachgewiesen [38]. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass die Compliance der Therapeuten gegenüber TDM suboptimal war. Preskorn und Mitarbeiter [3, 39] haben bei Patienten, die mit trizyklischen Antidepressiva behandelt wurden, gezeigt, dass TDM durch Vermeidung von Intoxikationen die Kosten senkt. Bei neuen Antidepressiva vermindert TDM Arzneimittelkosten [40]. Ergebnisse aus prospektiven Untersuchungen innerhalb des BMBF-geförderten Kompetenznetzes "Depression/Suizidalität" zeigten, dass mit TDM Medikamentenwechsel und Therapieabbrüche um etwa 50% seltener waren als ohne TDM. Wenn die Patienten auf optimale Spiegel eingestellt waren, war die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus im Mittel drei bis sieben Tage kürzer als bei Patienten, deren Medikamentenspiegel unterhalb des Zielspiegels lag [13].

Insgesamt ist die Datenlage ergänzungsbedürftig, um evidenzbasiert die positiven Auswirkungen des therapeutischen Drug Monitorings auf die Psychopharmakotherapie darzustellen.

Daher sollte man das therapeutische Drug Monitoring primär indikationsbezogen einsetzen, wie zum Beispiel zur Kontrolle der Compliance oder beim Auftreten von Nebenwirkungen unter normalen therapeutischen Dosen.

## **1.2 Praktische Durchführung von TDM in der Psychiatrie**

### **1. Schritt: Anforderung und Blutentnahme**

Wenn die Messung der Konzentration eines Antidepressivums oder Antipsychotikums, mit oder ohne Erfassung von Metaboliten, für die Therapieoptimierung indiziert ist, dann sollte eine begründete Anforderung in Form eines Anforderungsscheines vorliegen. Darauf finden sich Angaben zur Medikation (Dosis, Dosierungszeitpunkte, Behandlungsdauer, Begleitmedikamente), zum Therapieeffekt und zu Nebenwirkungen. Diese Informationen sind für eine spätere Befundung sehr wichtig. Die dem Patienten verabreichte Tagesdosis sollte zum Zeitpunkt der Blutentnahme seit einer Woche stabil sein, damit die Messung unter steady-state-Bedingungen erfolgen kann. Die Entnahme von 5 bis 10 ml Vollblut erfolgt nach der längsten Einnahmepause, also vor der Morgendosis.

### **2. Schritt: Analyse im Labor**

Zur Analyse kommen entweder Serum oder Plasma, wobei es hier keine einheitliche Regelung gibt, was vorzuziehen ist. Es gibt bisher zu wenige experimentelle Daten, die der Frage nach dem Unterschied in der Verwendung von Serum oder Plasma auf den Grund gingen. Die meisten Validierungen werden entweder mit Serum oder mit Plasma durchgeführt und nur sehr selten mit beiden [41]. Vollblut wird in der Regel nicht zur Messung der Blutspiegel verwendet. Unüblich für das TDM sind Bestimmungen in Urin, Cerebrospinalflüssigkeit, Tränen, Haaren oder der Muttermilch. Die zu erwartenden Plasma- oder Serumkonzentrationen der Psychopharmaka sind in der Regel sehr niedrig. Zur quantitativen Messung bedarf es also sehr sensitiver und selektiver Methoden mit ausreichender Präzision.

Die Analyseergebnisse sollten durch interne und externe Qualitätskontrollen überprüft werden. Steht für die interne Qualitätskontrolle kein kommerziell erhältliches Referenzmaterial zur Verfügung, muss es selbst hergestellt werden. Dabei ist oft die Beschaffung von Metaboliten als Reinsubstanzen schwierig. Für externe Qualitätskontrollen sollte an Ringversuchen teilgenommen werden. Für Antidepressiva und Antipsychotika wird das umfangreichste Spektrum von einer Einrichtung in Cardiff (Wales, England) angeboten (<http://www.heathcontrol.com>).

### **3. Schritt: Befundmitteilung**

Innerhalb von ein bis zwei Tagen nach Eintreffen im Labor sollten die Proben analysiert und das Ergebnis dem behandelnden Arzt umgehend mitgeteilt werden. Der Befund sollte das Messergebnis des Labors, den Zielbereich und einen Kommentar enthalten. Eine externe Befundung ist möglich, wenn im Anforderungsschein die notwendigen Informationen enthalten sind.

### **4. Schritt: Therapieoptimierung**

Der behandelnde Arzt, der den Patienten und dessen Vorgeschichte am besten kennt, entscheidet, ob nach Eintreffen des Laborbefundes eine Änderung der Therapie vorgenommen wird. Dabei sind außer dem Blutspiegel auch die Dauer der Behandlung, das Therapieansprechen und das Auftreten von Nebenwirkungen zu beachten. Therapieansprechen kann einfach mit der Clinical Global Impressions (CGI)-Skala [42], Nebenwirkungen können mit der UKU-Skala [43] erfasst werden.

### **1.3 Aktueller Stellenwert des TDM in der Psychiatrie**

TDM ist ein Angebot zur Therapieverbesserung. Der Stellenwert von TDM ist jedoch abhängig vom eingesetzten Psychopharmakon und vom behandelnden Arzt sehr unterschiedlich. Für Lithium ist TDM obligater Bestandteil der Therapie, bei Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva oder Clozapin ist TDM relativ weit verbreitet, um in erster Linie die Sicherheit der Anwendung dieser Medikamente zu verbessern. Bei neuen Psychopharmaka, die sicherer sind als die alten, wird TDM im klinischen Alltag allerdings nur bedingt für die Therapieoptimierung genutzt [38, 44]. Die Behandlung psychiatrischer Patienten mit Unterstützung von TDM ist daher eher eine Ausnahme als die Regel.

Wie oben zum Teil bereits erläutert, gibt es verschiedene Gründe für die insgesamt seltene Anwendung von TDM.

- Der Kenntnisstand über den optimalen Einsatz von TDM ist unzureichend. Die kürzlich erschienenen Leitlinien der TDM-Gruppe [13] sollen diese Situation verbessern.
- Die Datenlage, die den Nutzen von TDM für die Psychopharmakotherapie als qualitätssteigernde Maßnahme belegt, ist unzureichend. Es sind Studien erforderlich.
- Die Befunde sind nicht ausreichend valide, weil unzureichende Methoden eingesetzt werden (siehe unten), wie gruppenselektive Immunoassays mit Angabe von unbrauchbaren Äquivalenzwerten.
- Es besteht eine Unterversorgung mit TDM für Antidepressiva und Antipsychotika, für welche TDM theoretisch sinnvoll ist, weil zu wenige Speziallabors existieren, die in der Lage sind, die Vielzahl der im Handel befindlichen Antidepressiva und Antipsychotika in ausreichender Qualität und Geschwindigkeit zu analysieren.
- Die Befundübermittlung nach erfolgter Blutentnahme dauert zu lange, in manchen Fällen eine Woche, weil die Analysen im Labor nicht für jedes Medikament an jedem Arbeitstag durchgeführt werden und weil in vielen Krankenhäusern die Blutprobe zur Analyse in ein Speziallabor geschickt werden muss.
- Es fehlt eine qualifizierte Beratung, die bei vielen speziellen Anforderungen erforderlich ist, um den Befund zu interpretieren und eine Änderung oder Beibehaltung der Pharmakotherapie valide zu begründen. Dazu sind allgemeine und spezielle Kenntnisse in Psychopharmakologie und Pharmakokinetik erforderlich. Es wird daher empfohlen, die Analysen in solchen Labors durchführen zu lassen, die über entsprechende Kenntnisse verfügen [13].
- Es gibt keine Abstimmung zwischen Labor und behandelnden Ärzten.

Für eine verbesserte Behandlung psychiatrische Patienten mit Antidepressiva und Antipsychotika durch Anwendung von TDM, ist die Verfügbarkeit qualifizierter und geeigneter Methoden eine erste Voraussetzung. Um die technischen Voraussetzungen für das TDM in der Psychiatrie zu verbessern, sind Weiterentwicklungen der bisher etablierten und verfügbaren Methoden erforderlich.

Die Verfügbarkeit von Labormethoden für das TDM von Antidepressiva und Antipsychotika zu verbessern, war das Ziel dieser Arbeit.

#### **1.4 Analytik von Antidepressiva und Antipsychotika für das TDM**

Wenn für ein Antidepressivum oder ein Antipsychotikum eine Labormethode entwickelt wird, orientiert man sich üblicherweise an Methoden, die initial für pharmakokinetische Untersuchungen vor der Zulassung des Medikamentes entwickelt wurden. Die Methoden sind in der Regel für das TDM geeignet. Wegen der Vielfalt der auf dem Markt befindlichen und in der Therapie zum Einsatz kommenden Wirkstoffe, gibt es daher zahlreiche verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung. Wenn man für jedes derzeit verfügbare Antidepressivum und Antipsychotikum eine spezielle Methode für die Serum- oder Plasmaanalyse benötigt und will man für alle diese Medikamente TDM anwenden, so müsste ein Labor mehr als 50 unterschiedliche Methoden vorhalten, um einen kompletten Service sicherzustellen. Dies ist allein aus ökonomischem Grund nicht einzurichten und aufrechtzuerhalten.

Für TDM-Labors sind daher Methoden attraktiv, die Bestimmung so vieler Substanzen wie möglich erlauben und schnell die geforderten Ergebnisse liefern. Die Methoden sollten möglichst auch auf neue Wirkstoffe erweiterbar sein.

Es gibt immunologische Tests für trizyklische Antidepressiva [45], die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen, und Radiorezeptorassays für Antipsychotika, bei denen die Verdrängung eines Radioliganden durch Antipsychotika an präparativ dargestellte Dopaminrezeptoren gemessen wird [46]. Bei diesen Tests ist eine Extraktion der zu messenden Substanz aus der Matrix meistens nicht erforderlich. Die Verfahren sind schnell und relativ einfach in der Durchführung. Limitierende Faktoren sind das Angebot an verwendbaren Antikörpern, Kreuzreaktivitäten mit Begleitmedikamenten, keine differentielle Erfassung von Muttersubstanz und Metaboliten, es werden nur Äquivalenzwerte geliefert, für die es keine evaluierten Bereiche gibt [45, 47, 48]. Daher haben sich solche Tests nicht durchsetzen können.

Von den meisten qualifizierten Labors, die die quantitative Bestimmung von Antidepressiva und Antipsychotika als TDM-Methode anbieten, werden chromatographische Verfahren angewandt, in erster Linie wird die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) vereinzelt auch die Gaschromatographie (GC) eingesetzt. Diese Methoden sind sehr flexibel. Für so gut wie alle Antipsychotika und Antidepressiva sind geeignete HPLC- oder GC-Methoden beschrieben. Vor der Chromatographie auf einer analytischen Säule müssen störende Matrixbestandteile aus der Probe durch Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktion entfernt werden. Die Detektion erfolgt bei der HPLC meist spektrophotometrisch mit Ultraviolett- (UV) oder Fluoreszenzdetektoren, bei der GC meist nach Flammenionisation. Die höchste Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit

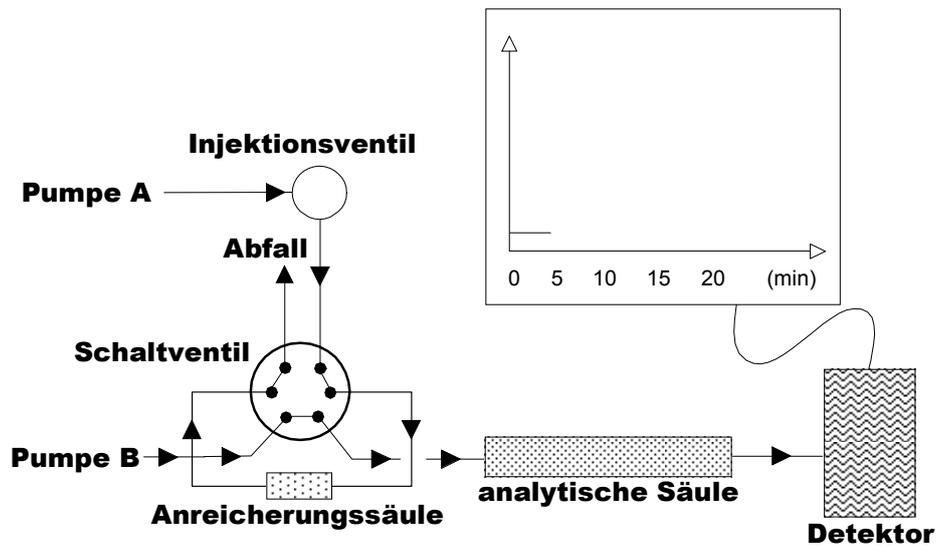
wird durch Kopplung chromatographischer Methoden mit einem Massenspektrometer (MS oder MS-MS) erreicht [49-52]. MS ermöglicht die Messung vieler Wirkstoffe mit identischer Probenvorbereitung und gleichen chromatographischen Bedingungen. Diese Verfahren sind teuer. Sie benötigen hoch qualifiziertes Laborpersonal und sind technisch aufwändiger als die einfache HPLC oder GC. Interessant sind auch die Möglichkeiten, die das Flüssigchromatographie (LC) in Kopplung mit MS-MS bietet. Ob sich der kostenintensive Einsatz eines Massenspektrometers für das TDM von Psychopharmaka lohnt, ist noch unklar. Auch fehlen bisher validierte Verfahren.

Ein gemeinsames Problem aller Methoden ist die Extraktion der gesuchten Substanz aus der biologischen Matrix. Gerade bei Blutproben ist dies sehr wichtig. Verschiedene Verfahren werden angewandt. Aufwendig und damit kostenintensiv sind flüssig-flüssig-Extraktionen [53] oder eine Festphasenextraktion mit Hilfe von Kartuschen [54, 55]. Oft sind mehrere Extraktionsschritte erforderlich. Ein großer Fortschritt ist die hier beschriebene automatisierte Säulenschaltung. Die Probe (Plasma oder Serum) wird nach Zentrifugation direkt in die HPLC-Anlage auf die Vorsäule injiziert. Proteine und sonstige störende Bestandteile der biologischen Matrix werden abgetrennt. Die Arzneistoffe verbleiben auf der Vorsäule und werden dann durch Umschalten des Ventils auf die analytische Säule gespült. Hier erfolgt dann die eigentliche qualitative und quantitative Bestimmung. Eine langwierige Probenvorbereitung entfällt.

#### HPLC mit Säulenschaltung

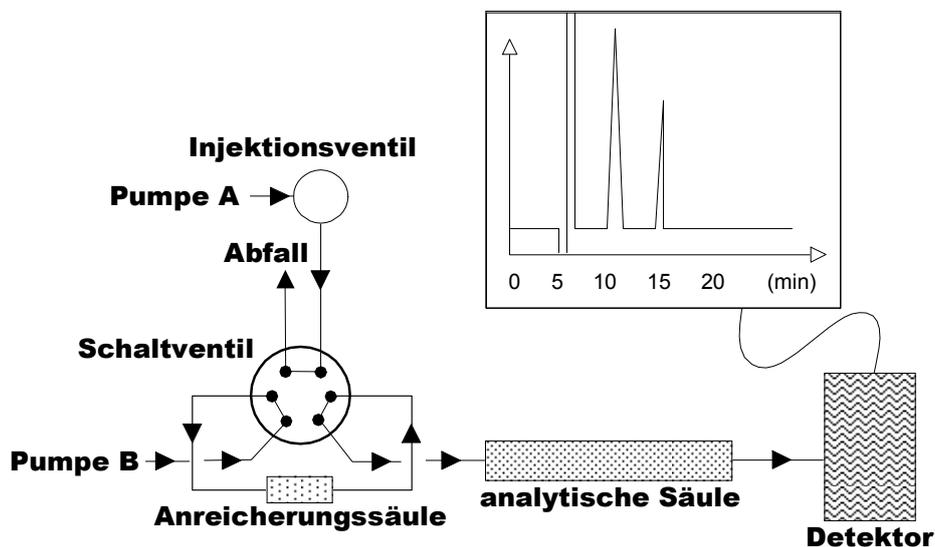
Ein HPLC-Verfahren mit guter Trennleistung und großer Flexibilität ist HPLC mit Säulenschaltung (Abb. 1). Mit Hilfe der Säulenschalttechnik kann die Probenvorbereitung über eine Festphase mit der Chromatographie gekoppelt werden. Dies erlaubt eine Automatisierung, was den Probendurchsatz beschleunigt und den Personalaufwand vermindert. HPLC mit Säulenschaltung ist für viele Antidepressiva und Antipsychotika etabliert [56-62, 63]. Die Technik der HPLC mit Säulenschaltung findet bereits seit 1981 Anwendung.

In der Psychiatrischen Klinik der Universität in Mainz wird HPLC mit Säulenschaltung für das TDM von Antidepressiva und Antipsychotika seit Jahren genutzt. Das Ergebnis wird innerhalb von 24 Stunden mitgeteilt. Der zusätzliche instrumentelle Aufwand im Vergleich zu einer konventionellen HPLC-Anlage ist gering. Neben den normalen Komponenten einer HPLC-Anlage benötigt man: eine Anreicherungssäule, eine zweite Pumpe und ein motorisiertes 6-Wege-Säulenschaltventil. Die gesamte Konfigurierung der HPLC-Anlage ist in Abbildung 1 und 2 dargestellt. Nach dem Eintreffen im Labor, wird das Serum oder Plasma zentrifugiert. Damit ist die Probenvorbereitung abgeschlossen und die Messung kann beginnen. Die Injektion in das System erfolgt bei Start der Messung zum Zeitpunkt null. Das Fließmittel aus Pumpe A (der sogenannte Anreicherungs-eluent) spült die Probe auf die Anreicherungssäule. Die gesuchte Substanz wird hier reteniert und von der Matrix gereinigt.



**Abbildung 1: Probenaufgabe bei der HPLC mit Säulenschaltung**

Nach etwa 5 Minuten verändert das Schaltventil seine Position. Der analytische Eluent aus Pumpe B durchströmt nun die Anreicherungssäule. Er transportiert die gesuchten Substanzen „back flush“ auf die analytische Säule, auf der die eigentliche chromatographische Trennung erfolgt.



**Abbildung 2: Probenelution bei der HPLC mit Säulenschaltung**

Die Schaltzeiten sind abhängig von der Methode und können daher variieren. Das Integrationssystem wandelt die elektrischen Impulse des Detektors graphisch in ein Chromatogramm um. Damit wird es möglich, den Prozess der Festphasenextraktion zur Reinigung der Probe von Matrixbestandteilen zu automatisieren und an die

chromatographische Trennung zu koppeln. Es können mehr Proben mit weniger Personalaufwand in kürzerer Zeit gemessen werden. Die Säulenschaltung erleichtert die Arbeit im Laboralltag bei der täglichen Blutspiegelbestimmung also erheblich. Personalintensive Vorbereitungen der Proben, wie z.B. flüssig-flüssig Extraktionen entfallen.

Ein Problem bleibt allerdings bestehen: Es existiert bisher keine HPLC-Methode, mit der sich alle auf dem Markt und für das TDM relevanten Psychopharmaka messen lassen.

Wenn HPLC-Methoden mit UV oder Fluoreszenz-Detektion mit oder ohne Säulenschaltung zum Einsatz kommen, wie sie in der Literatur beschrieben sind, dann muss ein Labor über mehrere HPLC-Anlagen verfügen, um viele Analyte in der klinisch-chemischen Routine messen zu können. Es kann auch zwischen den einzelnen Bestimmungen umgebaut werden. Doch der Wechsel von Säulen und Fließmitteln, ausgiebiges Durchspülen aller Kapillaren und Konditionieren der Säulen ist zeitaufwändig.

Wie viele verschiedene Antidepressiva und Antipsychotika einschließlich deren aktiven Metaboliten mit einer einzigen HPLC-Methode mit Säulenschaltung und UV-Detektion sicher quantitativ nachweisbar sind und ob ein solches System für den therapiebegleitenden Routineeinsatz von TDM für Antidepressiva und Antipsychotika geeignet ist, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Dies zu prüfen, war eine Aufgabe dieser Arbeit. In der forensischen Chemie befindet sich ein HPLC-System mit Säulenschaltung und UV-Spektroskopie für den Nachweis von Drogen im Urin im Einsatz [64]. Dieses kann eingeschränkt auch für TDM-Applikationen verwendet werden [65], allerdings nicht für Psychopharmaka.

Ein anderer Ausweg, die Zahl der messbaren Analyte mit einer einzigen HPLC-Methode zu messen, besteht in der Verwendung eines massenselektiven Detektors. Kratzsch et al. publizierten 2003 eine Methode mit Massenspektrometrie, mit der sich 15 verschiedene Neuroleptika messen lassen [52] und 2004 eine andere Methode zur Bestimmung von 23 Benzodiazepinen, Flumazenil, Zaleplon, Zolpidem und Zopiclon (allerdings mit vorangehender flüssig-flüssig Extraktion) [66]. Kollroser et al. gelang es 2002, sieben trizyklische Antidepressiva mit einer einzigen Applikation an einem HPLC-APCI-MS-MS-System zu bestimmen [67].

Ob und unter welchen Bedingungen der Einsatz eines kosten- und personalintensiven MS oder MS-MS zur Detektion unbedingt erforderlich ist, ist derzeit eine offene Frage.

## 2. Zielsetzung

Mit Hilfe des therapeutischen Drug Monitorings (TDM) lassen sich die verabreichten Dosen eines Medikamentes individuell für den jeweiligen Patienten optimieren. Bei der Behandlung psychiatrischer Patienten ist für eine Reihe von Antidepressiva und Antipsychotika nachgewiesen worden, dass durch TDM die Effizienz der Psychopharmakotherapie erhöht und das Auftreten von Nebenwirkungen oder Intoxikationen minimiert werden können. Trotz nachgewiesener therapieverbessernder Effekte von TDM werden Antidepressiva und Antipsychotika bei den meisten Patienten ohne begleitendes TDM verabreicht, selbst wenn eine eindeutige Indikation besteht, wie Nebenwirkungen oder Nichtansprechen bei therapeutisch üblichen Dosen. Ein Grund für den zurückhaltenden Einsatz von TDM ist die unzureichende Verfügbarkeit von Labormethoden. Dies liegt zu einem Teil daran, dass kaum ein Labor in der Lage ist, für jedes der mehr als 50 verschiedenen im Einsatz befindlichen Antidepressiva und Antipsychotika ein validiertes Verfahren zum quantitativen Nachweis vorzuhalten. Gruppenspezifische Bestimmungen, wie Radiorezeptorassays für Antipsychotika und Immunassays für Antidepressiva haben sich als wenig tauglich erwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine flüssigkeitschromatographische Methode mit Säulenschaltung zu entwickeln, mit der sich möglichst viele verschiedene Psychopharmaka in Blutserum oder –plasma quantitativ nachweisen lassen. Um den instrumentellen und personellen Aufwand gering zu halten, sollte bei der Methode die Probenvorbereitung vor der chromatographischen Trennung zur Entfernung von störenden Matrixbestandteilen weitgehend automatisiert ablaufen.

Als Verfahren sollte die Flüssigchromatographie mit Säulenschaltung benutzt werden, welches große Vorteile gegenüber anderen Analyseverfahren bietet, und von Einzelapplikationen ausgegangen werden, die für viele Antidepressiva und Antipsychotika bereits beschrieben sind. Doch es war vor Beginn der Arbeit unklar, wieviele Substanzen man mit einer Methode sicher analysieren kann.

Zunächst sollte eine HPLC-Methode mit isokratischer Trennung und UV-Detektion entwickelt werden. Sie ist technisch kaum aufwändiger als die basale HPLC bestehend aus Pumpe, Progengeber, Trennsäule und UV-Detektor wird nur eine zusätzliche HPLC-Pumpe, eine Vorreinigungssäule und ein Säulenschaltventil benötigt. Mit UV-Spektroskopie können prinzipiell alle Antidepressiva und Antipsychotika nachgewiesen werden. Doch es war unsicher, ob ein Verfahren mit UV-Detektion ausreichend sensitiv und selektiv ist.

Da die Probenvorreinigung bei der HPLC mit Säulenschaltung ein kritischer Schritt ist, sollte durch systematische Testung verschiedener Vorsäulen herausgefunden werden, welches Material für die Probenvorbereitung am besten geeignet ist.

Die chromatographischen Bedingungen sollten so gewählt werden, dass die Trennung und der Nachweis innerhalb von einer halben Stunde abgeschlossen ist.

Um die Methode zu charakterisieren sollten die folgenden Leistungsmerkmale erfasst werden:

- Präzision
- Richtigkeit
- untere Nachweisgrenze
- untere Quantifizierungsgrenze
- absolute und analytische Wiederfindung
- Interferenzen mit Matrixbestandteilen
- Interferenzen mit anderen Psychopharmaka

Um zu prüfen, ob die Methode für die tägliche Routine tauglich ist, sollte sie in der Patientenversorgung eingesetzt werden.

Da absehbar war, dass mit einer HPLC-Methode mit Säulenschaltung und UV-Detektion nur eine begrenzte Anzahl von Analyten erfasst werden kann, sollte in einem zweiten Ansatz die Säulenschaltung mit massenspektrometrischer Detektion gekoppelt werden, um für Weiterentwicklungen zu prüfen, welche Möglichkeiten ein an die HPLC gekoppeltes Massenspektrometer eröffnet.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

###### HPLC-UV-Methode

Das verwendete HPLC-System von Agilent (HP, Waldbronn) aus der 1100 Serie, bestand aus einer binären Pumpe, einem automatischen Probengeber, einem temperierten Säulenofen (in den ein elektrisches Sechs-Wege-Schaltventil eingebaut worden war) und einem variablen Wellenlängendetektor.

Die Chromatogramme wurden aufgenommen und integriert mit Hilfe der HP ChemStation (Version A.06.01).

Alle Komponenten wurden von der Firma Bio-Rad (München) zur Verfügung gestellt.

###### HPLC-MS-Methode

Das HPLC-System, welches für die Entwicklung der HPLC-MS-Methode benutzt wurde, bestand ebenfalls aus Komponenten der Agilent 1100 Serie (HP, Waldbronn). Verwendet wurden zwei quarternäre Pumpen, zwei Degaser, ein automatischer Probengeber, ein temperierter Säulenofen (in den ein elektrisches Sechs-Wege-Schaltventil eingebaut worden war) und ein Massenspektrometer.

Die Chromatogramme wurden aufgenommen und integriert mit Hilfe der HP ChemStation (Version A.09.03).

##### 3.1.2 Chromatographiesäulen

###### HPLC-UV-Methode

Bei den verwendeten Säulen zur Chromatographie handelt es sich um kommerziell erhältliche Edelstahlsäulen, gefüllt mit unterschiedlichem Material, verschiedener Länge und variierendem Durchmesser.

In Tabelle 2 und 3 sind alle getesteten Säulen aufgeführt:

**Tabelle 2 : Überblick über alle für die Optimierung des Säulenmaterials getesteten Säulen**

<b>Vorsäule</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Materialgröße (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
BioSil C8	BioRad	15-25	10 x 4.6
BioSil CN	BioRad	40-63	10 x 4.6
BioSil CN	BioRad	10-25	10 x 4.6
C8	MZ-Analysentechnik	20	10 x 4.0
CN	MZ-Analysentechnik	20	10 x 4.0
Hypersil-CN	ict-Homburg	10	10 x 4.0

<b>analytische Säule</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Partikelgröße (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
BioSil CN	BioRad	5	250 x 4.6
BioSil CN	BioRad	3	150 x 4.0
BioSil CN B104	BioRad	3	90 x 3.2
Hypersil ODS	MZ-Analysentechnik	5	150 x 3.0
LiChropsher CN	MZ-Analysentechnik	5	250 x 4.6
LiChrospher CN	MZ-Analysentechnik	5	150 x 4.0
LiChrospher CN	MZ-Analysentechnik	5	100 x 2.1

**Tabelle 3 : Überblick über alle bei der Entwicklung der HPLC-UV-Methode getesteten Säulen**

<b>Vorsäule</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Partikelgröße (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
Hypersil-CN	ict-Homburg	10	10 x 4.0
C8	MZ-Analysentechnik	20	10 x 4.0

<b>analytische Säule</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Partikelgröße (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
Hypersil ODS	MZ-Analysentechnik	5	150 x 3.0
Hypersil ODS	MZ Analysentechnik	5	250 x 4.6

#### HPLC-MS-Methode

Bei den verwendeten Säulen zur Chromatographie handelt es sich um kommerziell erhältliche Edelstahlsäulen, gefüllt mit unterschiedlichem Material, verschiedener Länge und variierendem Durchmesser.

In Tabelle 4 sind alle getesteten Säulen aufgeführt:

**Tabelle 4 : Überblick über alle für die Entwicklung einer Applikation zur Bestimmung von Neuroleptika und Antidepressiva (mit HPLC-MS-Detektion) getesteten Säulen**

<b>Vorsäule</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Partikelgröße (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
Agilent Eclipse XDB C8	Agilent	5	4.6 x 12.5
C8	MZ-Analysentechnik	20	10 x 4.0

<b>analytische Säulen</b>			
<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Partikelgröße (µm)</b>	<b>Maße (mm I.D.)</b>
Hypersil ODS C18	MZ-Analysentechnik	5	150 x 3.0
Synergi MAX-RP C12	Phenomenex	4	250 x 3.0
Synergi MAX-RP C12	Phenomenex	4	150 x 4.6
Synergi MAX-RP C12	Phenomenex	4	150 x 3.0
Synergi MAX-RP C12	Phenomenex	4	150 x 2.0
Synergi MAX-RP C12	Phenomenex	4	75 x 3.0
Zorbax Eclipse XDB-C8	Phenomenex	5	150 x 4.6

### 3.1.3 Chemikalien und Referenzsubstanzen

Chemikalien

HPLC-UV-Methode

**Tabelle 5 : tabellarische Übersicht über alle verwendeten Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Essigsäure (98%)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphorsäure (85%)	Merck (Darmstadt)

Das Wasser wurde durch eine Mill-Q-Wasser Aufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) für die HPLC verwendbar gemacht.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität verwendet, die anderen Chemikalien wiesen p.a. Qualität auf.

HPLC-MS-Methode

**Tabelle 6 : tabellarische Übersicht über alle verwendeten Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Ameisensäure	Sigma (Taufkirchen)
Ammonium Acetat	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Wasser	Merck (Darmstadt)
Zincksulfat	Sigma (Taufkirchen)

Das für das Massenspektrometer verwendete Wasser wurde in Flaschen von Merck (Darmstadt) gekauft.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität verwendet, die anderen Chemikalien wiesen p.a. Qualität auf.

## Referenzsubstanzen

Die Referenzsubstanzen wurden uns von folgenden Firmen zu Forschungszwecken überlassen oder käuflich erworben:

**Tabelle 7 : Verwendeten Referenzsubstanzen und Bezugsquellen**

Substanz	Hersteller
9-Hydroxyrisperidon	Janssen-Cilag (Neuss, Deutschland)
Amisulprid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Amitriptylin	Merck, Sharpe und Dohm (Rahway, NY, USA)
Carbamazepin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Carbamazepin-10,11-epoxid	Ciba Geigy (Wehr, Deutschland)
Citalopram	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Clomipramin	Ciba Geigy (Wehr, Deutschland)
Clozapin	Sandoz (Nürnberg, Deutschland)
Clozapin-N-Oxid	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Desipramin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Diazepam	Hoffmann-La Roche (Grenzach Whylen, Deutschland)
Dipiperon	Janssen-Cilag (Neuss, Deutschland)
Domperidon	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Donepezil	Esai (Frankfurt am Main, Deutschland)
Doxepin	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
Fluoxetin	Lilly (Bad Homburg, Deutschland)
Fluperlapin	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Fluvoxamin	Solvay Arzneimittel (Hannover, Deutschland)
Haloperidol	Janssen Cilag (Neuss, Deutschland)
Hydroxy-Clozapin	Novartis (Basel, Schweiz)
Imipramin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Lorazepam	Hoffmann-La Roche (Grenzach Whylen, Deutschland)
Maprotilin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Melperon	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Mirtazapin	Organon (Oberschleißheim, Deutschland)
N-Desmethylcitalopram	Lundbeck (Hamburg, Deutschland)
N-Desmethylclomipramin	Ciba Geigy (Wehr, Deutschland)
N-Desmethylozapin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
N-Desmethyldoxepin	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
N-Desmethylfluoxetin	Eli Lilly (Bad Homburg/Ts.)
N-Desmethylmaprotilin	Ciba Geigy (Basel, Schweiz)
N-Desmethylmirtazapin	Organon (Oberschleißheim, Deutschland)
N-Desmethylperazin	Promonta (Hamburg, Deutschland)
N-Desmethylsertralin	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
N-Desmethyltrimipramin	Aventis Pharma (Bad Soden, Deutschland)
N-Desmethylvenlafaxin	Weyeth Pharma (Münster, Deutschland)
Nordiazepam	Hoffmann-La Roche (Grenzach Whylen, Deutschland)
Nortriptylin	Merck, Sharpe und Dohm (Rahway, NY, USA)
O-Desmethylvenlafaxin	Weyeth Pharma (Münster, Deutschland)
Olanzapin	Lilly (Bad Homburg, Deutschland)
Oxazepam	Hoffmann-La Roche (Grenzach Whylen, Deutschland)
Pantoprazol	Altana Pharma (Konstanz, Deutschland)
Paroxetin	Smith Kline Beecham (München, Deutschland)
Perazin	Promonta (Hamburg, Deutschland)
Perphenazin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Pimozid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Pipamperon	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Protriptylin	Ciba Geigy (Wehr, Deutschland)
Quetiapin	Astra Zeneca (Wedel, Deutschland)
Reboxetin	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
Risperidon	Janssen Cilag (Neuss, Deutschland)
Sertindol	Lundbeck (Hamburg, Deutschland)
Sertralin	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
Sipiperon	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Sulpirid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Tacrin	Gödecke/Parke Davis (Freiburg, Deutschland)
Temazepam	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Tianeptin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trimipramin	Rhône-Poulenc (Köln, Deutschland)
Venlafaxin	Weyeth Pharma (Münster, Deutschland)
Ziprasidon	Pfizer Pharma (Karlsruhe, Deutschland)
Zotepin	Aventis Pharma (Bad Soden, Deutschland)

### 3.1.4 Stammlösungen, Arbeitsstandards, Kontrollen und Interne Standards

#### Stammlösungen und Arbeitsstandards

Zur Herstellung der Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurden 10 mg der Referenzsubstanz in 10 ml Methanol aufgelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Auch nach einem Jahr Lagerung zeigten sich keine messbaren Veränderungen. Die methanolischen Stammlösungen wurden dann bei Bedarf weiter mit Wasser auf 10 µg/ml verdünnt. Diese wässrigen Arbeitsstandards wurden auch bei -20 °C gelagert, aber alle drei Monate frisch zubereitet.

#### Kontrollplasma

Kontrollen dienen dazu, die Methode nach der Validierung, auf ihre Präzision zu überprüfen und bei Abweichungen darauf zu reagieren. Mit Plasma aus der Blutbank, welches medikamentenfrei sein sollte und den wässrigen Arbeitsstandards wurden entsprechende Kontrollproben mit bekannter Wirkstoffkonzentration hergestellt. Die jeweiligen Konzentrationen wurden anhand der entsprechenden therapeutisch zu erwartenden Blutspiegel festgesetzt.

Neben diesen internen Kontrollen bieten extern hergestellte Ringversuchskontrollen (z.B. von Cardiff Bioanalytical Services, Cardiff, Wales), unbekannter Konzentration, eine weitere Möglichkeit der Selbstüberprüfung.

#### Interne Standards

Für die verwendeten internen Standards wurden zuerst methanolische Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt, die dann entsprechend weiter auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurden.

#### HPLC-UV-Methode

Für die Multi-HPLC-UV-Methode wurden Domperidon, Protriptylin und Sertindol als interne Standards verwendet. Aus einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml wurden jeweils 5 µl der Domperidon- bzw. Protriptylin-Verdünnung oder 10 µl der Sertindol-Verdünnung in die Probe pipettiert.

Der interne Standard der HPLC-UV-Methode war Fluperlapin. Für die Stammlösung wurden 26.4 mg Fluperlapin in 10.0 ml Methanol gelöst. Anschließend wurde mit Wasser auf eine Endkonzentration von 40 µg/ml verdünnt. Der Autosampler mischte dann 99 µl der Probe mit 1 µl dieser Lösung.

#### HPLC-MS-Methode

Für die am Massenspektrometer entwickelte Methode wurden Fluperlapin, Sertindol und Protriptylin als interne Standards verwendet. Mit einer Konzentration von 25 ng/ml diente Fluperlapin als interner Standard für Clozapin-N-oxid, Haloperidol, Olanzapin, Quetiapin, Risperidon, 9-Hydroxy-Risperidon und Ziprasidon. Sertindol wurde mit 250 ng/ml als interner Standard für Amisulprid, Clozapin, N-Desmethylclozapin, Perazin und N-Desmethylperazin eingesetzt. Die Substanzen wurden direkt in das Fällungsreagenz gegeben und dann bei der Fällung mit der Probe vermischt.

Protriptylin wurde als interner Standard für die Erweiterung der Methode um Substanzen aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva (TZA's) und selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI's) vorgesehen.

### 3.1.5 Fließmittel in der Chromatographie

Anreicherungsfließmittel bzw. Anreicherungseluent

HPLC-UV-Methode

Sowohl bei der Multi-HPLC-UV-Methode als auch bei der HPLC-UV-Methode wurden die Plasmaproben mit einem Fließmittel aus Wasser und 8 % (V/V) Acetonitril auf der Anreicherungssäule gereinigt. Nach der Herstellung wurde der Eluent im Ultraschallbad entgast. Von der Verwendung eines 1%igen Acetatpuffers wurde schnell Abstand genommen, da die Gefahr einer Verkeimung doch erheblich ist und dieser Eluent täglich frisch angesetzt werden muss.

HPLC-MS-Methode

Für die HPLC-MS-Methode kam ein Ammonium-Acetat-Puffer als Anreicherungseluent zum Einsatz. 2 ml einer 2 molaren Ammonium-Acetat-Lösung (77.08 g Ammonium Acetat in 500 ml Wasser) wurden mit 1700 ml Wasser gemischt und mit Ameisensäure auf einen pH von 6.4 eingestellt. Abschließend wurden noch 300 ml Methanol dazu gegeben.

Analytisches Fließmittel bzw. analytischer Eluent

Für jede der drei hier beschriebenen Methoden wurde ein anderer analytischer Eluent verwendet.

Multi-HPLC-UV-Methode

Bei der Methode zur Bestimmung verschiedener Antidepressiva und Neuroleptika mit UV-Detektion bestand der analytische Eluent aus 50 % (V/V) Acetonitril und 50 % (V/V) Phosphatpuffer. Zur Herstellung des Phosphatpuffers wurden 3.65 g Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat in 2000 ml Wasser gelöst und mit 85%iger Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ ) tropfenweise auf pH 6.4 eingestellt und anschließend im Ultraschallbad entgast.

HPLC-UV-Methode

Der analytische Eluent der HPLC-UV-Methode hatte einen Anteil von 37.5 % (V/V) Acetonitril, 0.4 % (V/V) TEMED und 62.1 % (V/V) Wasser. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure tropfenweise auf einen pH von 6.5 eingestellt und anschließend im Ultraschallbad entgast.

HPLC-MS-Methode

Bei der HPLC-MS-Methode wurde der analytische Eluent als Gradient gefahren, d.h. die Konzentration der organischen Phase, in diesem Fall Methanol, veränderte sich

während der Messung. Zwei Flaschen wurden an die Pumpe angeschlossen. In einer befand sich reines Methanol und in der anderen Wasser, welches mit 0.01 % Ameisensäure versetzt worden war. Aus diesen beiden Flaschen wurde der analytische Eluent in der Pumpe je nach programmierter Methode gemischt.

### **3.1.6 Plasma und Serum**

Aus der Cubitalvene wurde sowohl gesunden als auch psychiatrisch erkrankten Patienten Blut entnommen und entweder in heparinbeschichteten Röhrchen zur Gewinnung von Plasma oder in unbeschichteten Polypropylenröhrchen zur Gewinnung von Serum aufgefangen. Bei 4000 g wurde für 10 min sowohl das heparinisierte wie auch das unbehandelte Blut in einer Becherzentrifuge Rotana/RP (Hettich, Tuttlingen) bei 10 °C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand (Plasma aus Heparinblut, Serum aus unbehandeltem Blut) wurde dekantiert und entweder sofort verwendet oder bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Eingefrorenes Serum oder Plasma wurde nach dem Auftauen für die weitere Aufarbeitung noch einmal für 5 min in einer Biofuge A (Heraeus/Hanau) bei 1500 g zentrifugiert.

#### HPLC-UV-Methode

Die Transfusionszentrale in Mainz lieferte gepooltes, medikamentenfreies Plasma, das u. a. zur Herstellung von Kontrollen und Eichkurven diente.

#### HPLC-MS-Methode

Für die HPLC-MS-Methode wurde ebenfalls sogenanntes „Leerplasma“ aus der Transfusionszentrale des University of Colorado Health Sciences Centers bezogen.

### **3.1.7 Computerprogramme**

Die HP ChemStation-Software wurde zur Integration und Auswertung der erhaltenen Chromatogramme benutzt. Die HPLC-UV-Anlage in Mainz arbeitete mit der HP ChemStation (Version A.06.01). Für die HPLC-MS-Methode wurde die Version A.09.03 der HP ChemStation benutzt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Detektion und Integration**

#### HPLC-UV-Methode

Alle Bestimmungen erfolgten UV-spektrometrisch. Wenn nicht anders beschrieben, wurde zur Quantifizierung die Höhe der jeweiligen Peaks verwendet.

#### HPLC-MS-Methode

Mit einem Massenspektrometer wurden die  $[M+H]^+$  Ions der jeweiligen Substanzen erfasst. Zur Auswertung wurde hier die Fläche herangezogen.

### **3.2.2 Probenvorbereitung und Kalibriergeraden**

#### Probenvorbereitung HPLC-UV-Methode

Die Blutentnahme erfolgte nüchtern und mindestens 12 Stunden nach der letzten Medikamenteneinnahme. Die Dosis der Medikation sollte seit 7 Tagen stabil sein, da 5 Halbwertszeiten für das Erreichen des „steady state“ als erforderlich gelten. Verwendet wurde entweder eine Serummonovette ohne Zusätze oder aber das durch Zugabe von EDTA oder Heparin gewonnene Plasma.

Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4000 g und 10 °C wurde das Serum bzw. Plasma entweder direkt analysiert oder bei -20 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Proben noch einmal bei 1500 g für 5 Minuten zentrifugiert und dann in den Autosampler gestellt.

#### Probenvorbereitung HPLC-MS-Methode

Das Serum oder Plasma wurde im Verhältnis 1:4 mit einem Fällungsreagenz versetzt. Das Fällungsreagenz bestand aus 17.25 g Zinksulfat, das in einer Mischung von 700 ml Methanol (HPLC-grade) mit 300 ml Wasser (HPLC-grade) gelöst wurde. Der interne Standard für die quantitative Bestimmung wurde ebenfalls zugesetzt. Für die hier entwickelte Methode wurden als interne Standards auf einen Liter Fällungsreagenz 25 µl Fluperlapin (einer 1 mg/ml Stammlösung) und 250 µl Sertindol (ebenfalls aus einer 1 mg/ml Stammlösung) gegeben.

Zu 400 µl Probe wurden 560 µl Fällungsreagenz pipettiert und nach kurzem Durchmischen (ca. 20 Sekunden) mittels eines Vortexers, für 10 min mit 3200 g bei 4 °C zentrifugiert. Arbeitete man mit „HPLC-vials“ weiter, wurde der resultierende Überstand vorsichtig dekantiert.

Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten wurden die Proben (bis zu 96) in der Mikrotiterplatte mit dem Fällungsreagenz versetzt, zentrifugiert und gemessen.

## Erstellen von Kalibriergeraden

Die Erstellung einer Kalibriergeraden ist Grundlage jeglicher Quantifizierung. Die Anzahl der Kalibratoren kann zwischen einem und vielen schwanken.

## HPLC-UV-Methode

Bei der Validierung der HPLC-UV-Methode wurde nur ein einziger Kalibrator verwendet. Allerdings wurden diesem Kalibrator zwei Kontrollen zugeordnet, um mögliche Fehler bei der Quantifizierung zu erkennen. Ausgehend von den methanolischen Stammlösungen wurden die jeweiligen Standards durch Verdünnung der methanolischen Stammlösungen zunächst in Wasser und dann in Plasma hergestellt. Basis für diese Verdünnungen war von der Blutbank bezogenes medikamentenfreies Plasma. Die hergestellten Konzentrationen orientierten sich an den in Patientenplasma zu erwartenden Konzentrationen.

Bei allen Methoden kam ein interner Standard zum Einsatz. Der Quotient aus der Peakhöhe der gesuchten Substanz zu der Peakhöhe der internen Standards ist die relative Peakhöhe des Analyten. Sie dient als Grundlage für die Berechnung der gefundenen Konzentration der Probe.

## Berechnung unbekannter Konzentrationen von Neuroleptika und Antidepressiva in Patientenplasma

Zum Zeitpunkt der Blutabnahme befanden sich die Plasmaspiegel der Patienten im Fließgleichgewicht (= steady state). Zur Quantifizierung wurde die Geradengleichung  $y = a x + b$  herangezogen bzw. nach  $x$  aufgelöst  $x = (y - b) / a$ .  $y$  stellt die relative Höhe dar und  $x$  die gesuchte Konzentration. Der Wert  $b$  ist der Schnittpunkt der ermittelten Geraden mit der Ordinate und  $a$  deren Steigung.

In den Patientenproben lagen die gesuchten Substanzen als freie Basen vor und nicht wie viele Reinsubstanzen als Salze. Daher wurde direkt bei der Herstellung der methanolischen Stammlösungen mit einem Faktor die Konzentration der Salze in die der freien Basen umgerechnet (siehe Tabelle 8). Der Faktor ergibt sich durch Division des Molekulargewichts der Base durch das Molekulargewicht des Salzes.

**Tabelle 8 : Korrekturfaktoren zur Umrechnung der als Salze vorliegenden Reinsubstanzen in die freie Basen**

Parameter	MG	Salz	MG-Salz	Faktor = <u>Base</u> Salz
Amisulprid	369.49	Base	/	/
Amitriptylin	277.41	HCl	312.86	0.89
Nortriptylin	263.41	HCl	298.86	0.88
Citalopram	324.40	HBr	405.30	0.80
N-Desmethylcitalopram	310.40	HBr	391.30	0.79
Clomipramin	314.86	HCl	351.31	0.90
N-Desmethylclomipramin	300.86	HCl	337.31	0.89
Clozapin	326.83	Base	/	/
N-Desmethylclozapin	312.83	Base	/	/
Clozapin-N-Oxid	344	Base	/	/
Domperidon	425.92	Base	/	/
Doxepin	279.38	HCl	315.83	0.88
N-Desmethyldoxepin	265.38	HCl	301.81	0.88
Fluoxetin	309.33	HCl	345.78	0.89
N-Desmethylfluoxetin	295.33	HCl	331.78	0.89
Fluvoxamin	318.34	Maleat	434.34	0.73
Fluperlapin	309.40	Base	/	/
Haloperidol	375.90	Base	/	/
Imipramin	280.41	HCl	316.86	0.88
Desipramin	266.41	HCl	302.86	0.88
Maprotilin	277.41	HCl	313.86	0.88
N-Desmethylmaprotilin	263.41	HCl	299.86	0.88
Mirtazapin	265.36	HCl	300.81	0.88
N-Desmethylmirtazapin	251.36	HCl	286.81	0.88
Olanzapin	312.44	Base	/	/
Paroxetin	329.37	HCl-Hemihydrat	374.32	0.88
Perazin	339.50	Dimaleat	571.50	0.59
N-Desmethylperazin	325.50	HCl	361.50	0.90
Protriptylin	263.38	HCl	299.80	0.88
Quetiapin	441.55	Base	/	/
Reboxetin	313.28	Methansulfonat	409.51	0.77
Risperidon	410.49	Base	/	/
9-Hydroxyrisperidon	427.49	Base	/	/
Sertindol	440.90	Base	/	/
Sertralin	305	HCl	342.70	0.89
N-Desmethylsertralin	291	Maleat	407	0.71
Trimipramin	294.44	Maleat	410.44	0.72
N-Desmethyltrimipramin	280.44	Maleat	396.49	0.72
Venlafaxin	277.41	HCl	313.86	0.88
N-Desmethylvenlafaxin	263.41	Base	/	/
O-Desmethylvenlafaxin	263.41	Base	/	/
Ziprasidon	412	HCl	467.4	0.88

### **3.2.3 Validierung**

#### HPLC-UV-Methode

Die Validierung erfolgte gemäß der NCCLS (= National Committee for Clinical Laboratory Standards)-Richtlinien [68]. Ermittelt wurden die Präzision, die Linearität, die absolute und analytische Wiederfindung, die untere Nachweisgrenze, sowie Interferenzen verursacht durch Triglyceride, Hämoglobin, Bilirubin oder andere Arzneimittel.

#### HPLC-MS-Methode

Die Validierung der HPLC-MS-Methode erfolgte nach Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration). Ermittelt wurden die Präzision, die Linearität, die absolute und analytische Wiederfindung, die untere Nachweisgrenze, die Ion suppression sowie die Stabilität.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Optimierung der Vorsäule

#### 4.1.1 Charakterisierung der Bindungskapazität von Vorsäulenmaterial

Ein sehr wichtiger Bestandteil der „on-line“-Extraktion mit Säulenschaltung ist die Anreicherungssäule. Auf ihr trennt sich die zu detektierende Substanz von den übrigen Plasmabestandteilen ab. Bei der Auswahl aus den zahlreichen zur Verfügung stehenden Materialien kann man einen sogenannten „breakthrough“- bzw. Durchbruchversuch zur Hilfe nehmen. Die Versuchsanordnung erfolgte nach Ooms und Mitarbeitern [69]. Dabei wurde dem verwendeten Eluent ein Arzneistoff in definierter Konzentration zugesetzt und direkt in den Detektor geleitet (siehe Abbildung 3).

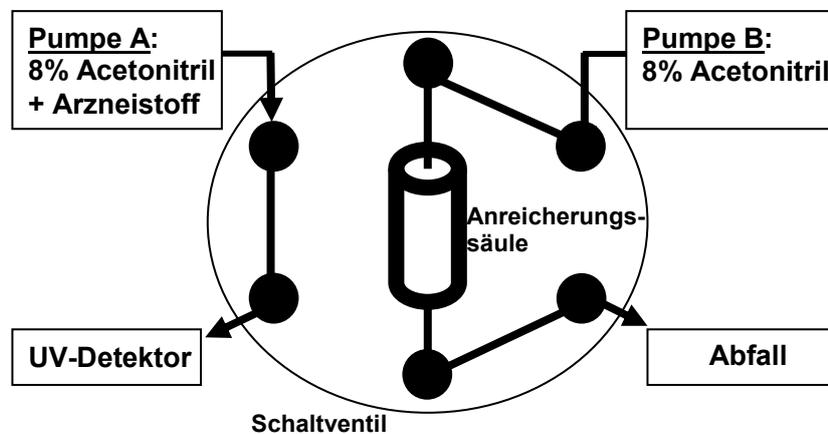


Abbildung 3 : Anordnung von Säulenschaltung und Eluenten für den „breakthrough“-Versuch

Man erhält ein deutliches UV-Signal in Form einer konstanten Linie (= 100 %). Wird nun durch Betätigung des Schaltventils (siehe Abbildung 4) eine Anreicherungssäule dazwischen geschaltet, fällt das UV-Signal sofort ab (= 0 %). Die Anreicherungssäule hält den zugesetzten Arzneistoff zurück. Ist ihre Kapazität erschöpft, beginnt Arzneistoff „durchzubrechen“ und man sieht, wie das Signal im UV-Detektor ansteigt.

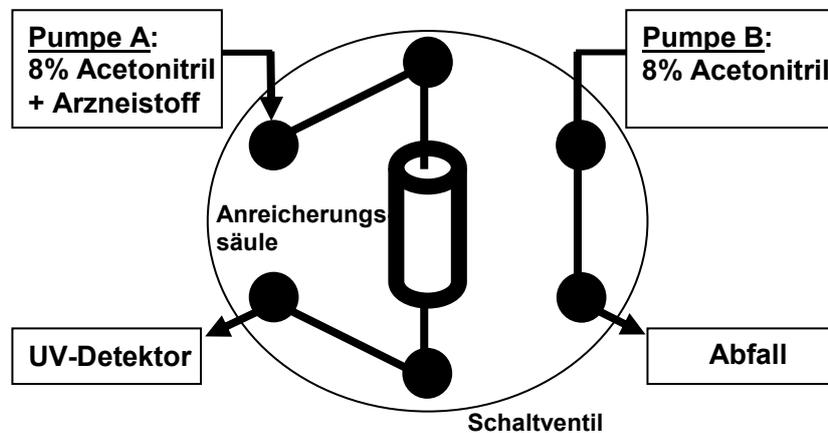


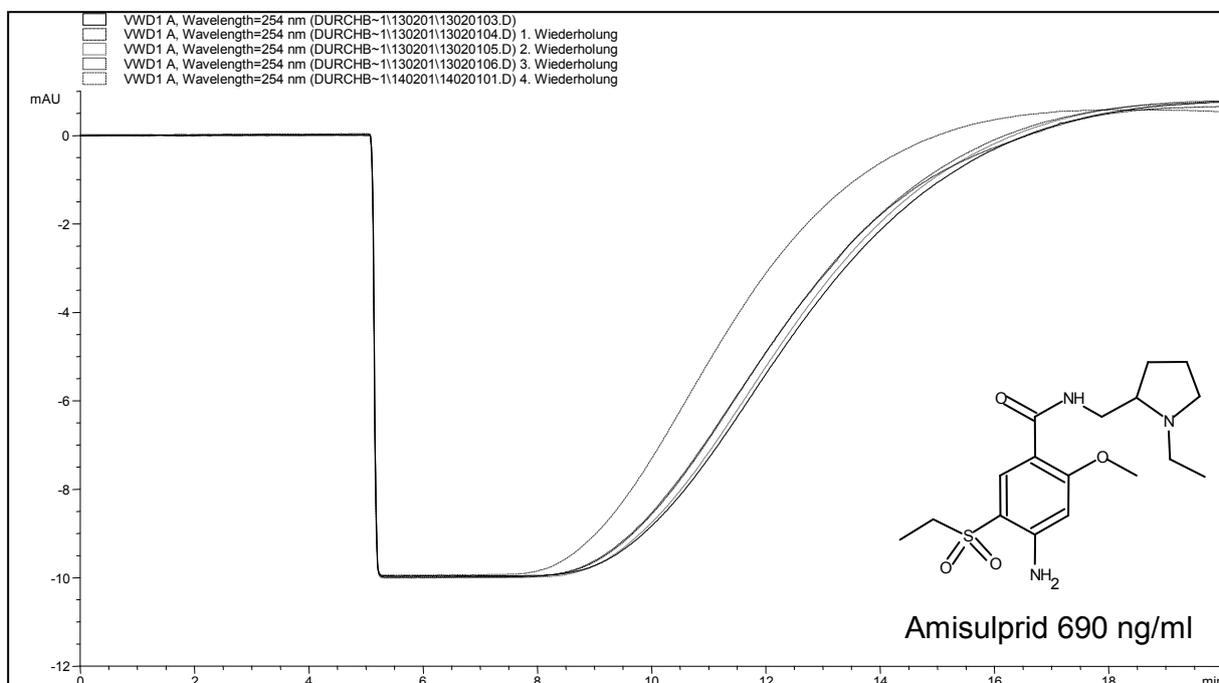
Abbildung 4 : Beladen der Säule mit Arzneistoff nach Betätigung des Schaltventils

Als Testsubstanzen wurden Amisulprid und Clomipramin aufgrund ihres unterschiedlichen Elutionsverhaltens ausgewählt. Amisulprid wurde sehr früh eluiert, wohingegen Clomipramin wesentlich länger retiniert wurde. Um die „Durchbruchzeit“ und das „Durchbruchvolumen“ zu bestimmen, setzte man als Anfangspunkt den Moment, in dem das UV-Signal unter 10 % fällt und als Endpunkt, den Moment, in dem das UV-Signal wieder auf über 10 % ansteigt. Getestet wurden Vorsäulen verschiedener Hersteller, gefüllt mit unterschiedlichen Materialien (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9 : Alle getesteten Vorsäulen im Überblick**

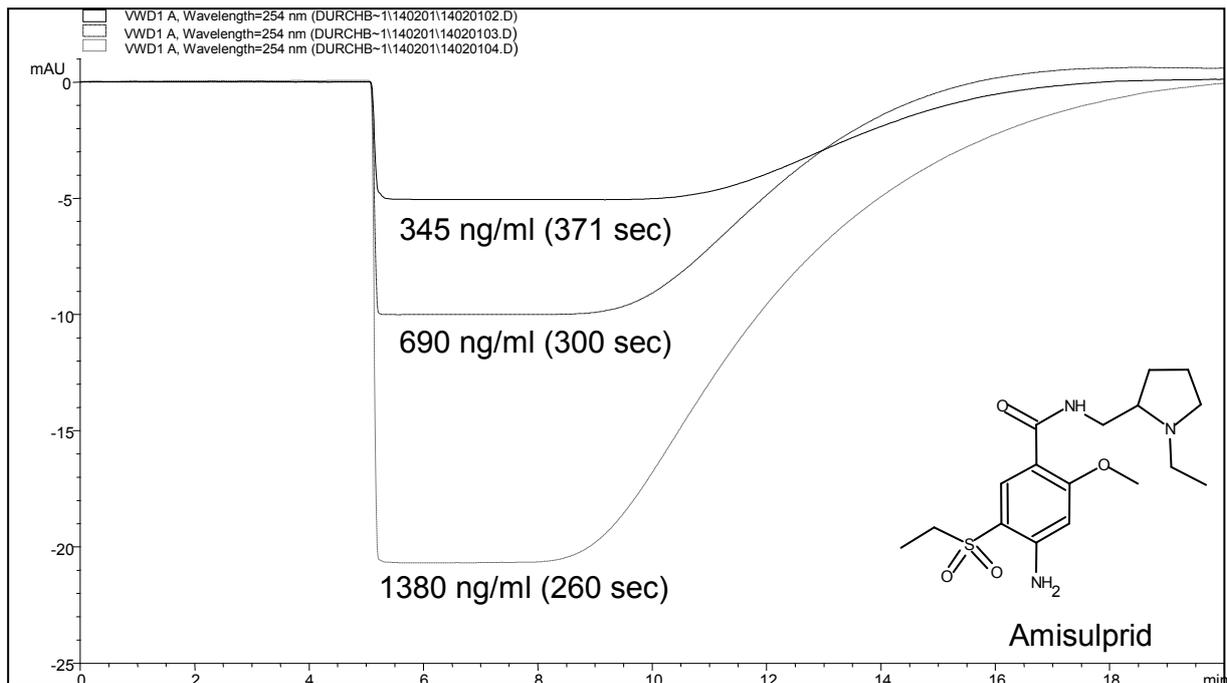
Material	Materialgröße (µm)	Maße (mm)
CN (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
C8 (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
BioSil CN (BioRad)	40-63	10x4.6
BioSil CN (BioRad)	10-25	10x4.6
BioSil C8 (BioRad)	15-25	10x4.6
Hypersil-CN (ict-Homburg)	10	10x4.0

Da das Vorsäulenmaterial bei der HPLC mit Säulenschaltung mehrfach verwendet wird, war es notwendig, die Regenerierbarkeit des Materials zu testen. Durch Auswaschen des Arzneistoffes mit 80 % Acetonitril ließ sich der Versuch, abhängig von der Qualität der Säule, wiederholen (siehe Abbildung 5). Dies war mit der CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule und mit der C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule problemlos möglich, nicht jedoch mit den anderen getesteten Materialien.



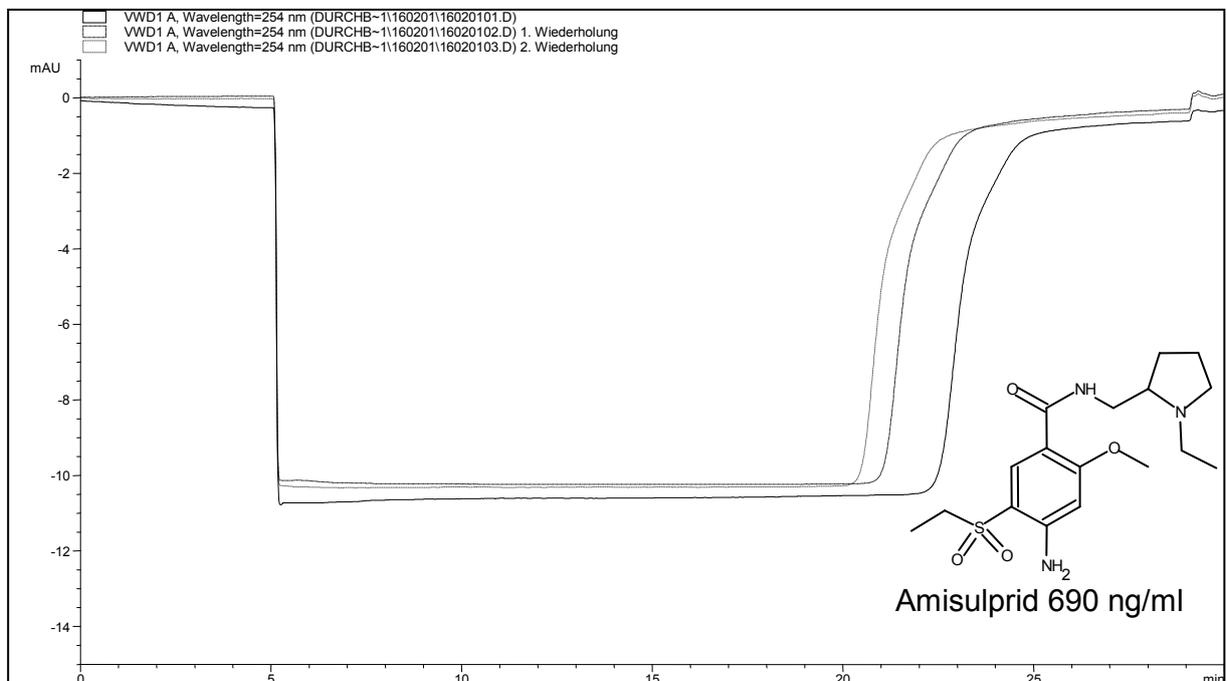
**Abbildung 5: Durchbruchverhalten einer CN (20 µm 10 x 4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule zeigt die Wiederholbarkeit des Versuches nach Auswaschen des Arzneistoffs mit 80 % Acetonitril**

Durch die Wiederholbarkeit lässt sich auch die Abhängigkeit der Durchbruchzeit von der Konzentration zeigen (siehe Abbildung 6).



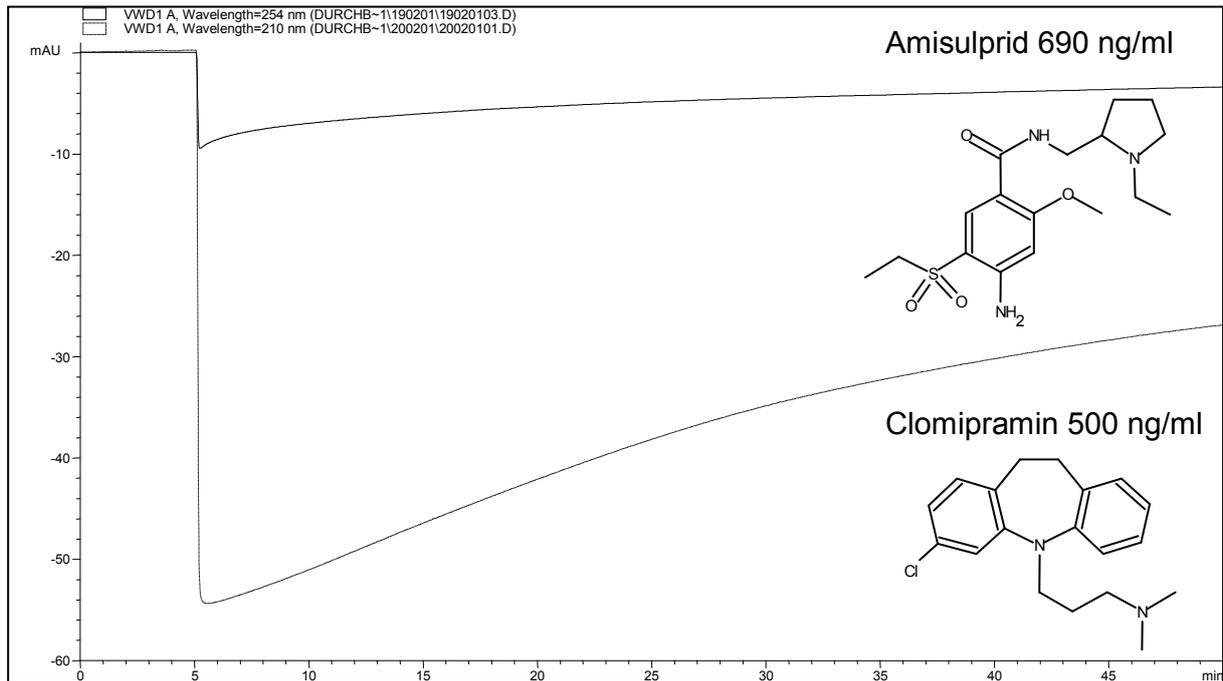
**Abbildung 6: Durchbruchverhalten einer CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule in Abhängigkeit von der Konzentration**

Für die Beurteilung des Vorsäulenmaterials ist außerdem der Kurvenverlauf sehr wichtig. Die Kurve sollte nach dem Durchbruch möglichst steil ansteigen. Sowohl die C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) als auch die Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule zeigen dieses „breakthrough“-Verhalten (siehe Abbildung 7 und 11).



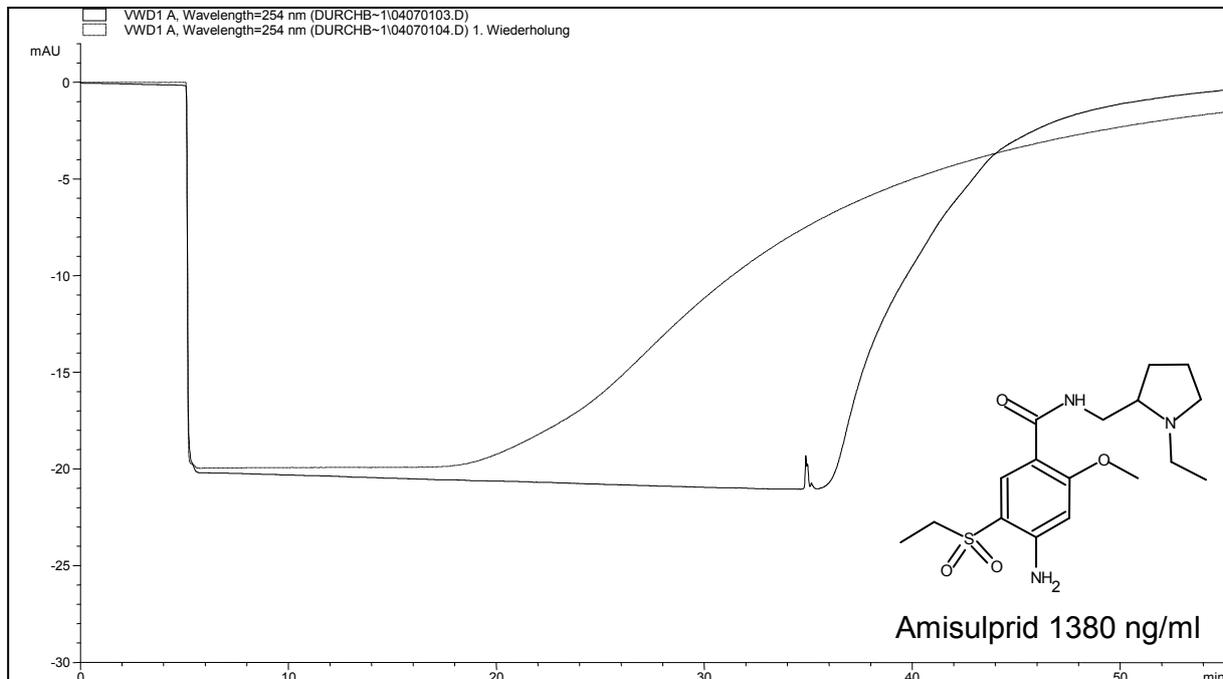
**Abbildung 7: Durchbruchverhalten einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule**

Ein negatives Beispiel lieferte BioSil CN (40-63  $\mu\text{m}$  10x4.0 mm I.D. BioRad) Material (siehe Abbildung 8), da der Arzneistoff vom ersten Moment an eluiert wurde.



**Abbildung 8: Durchbruchverhalten einer BioSil CN (40-63  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) Vorsäule**

Auch die beiden getesteten Vorsäulen BioSil CN (10-25  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) und die BioSil C8 (15-25  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) genügten den Ansprüchen nicht (siehe Abbildung 9 und 10). Sie zeigen eine schlechte Wiederholbarkeit.



**Abbildung 9: Durchbruchverhalten einer BioSil CN (10-25  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) Vorsäule**

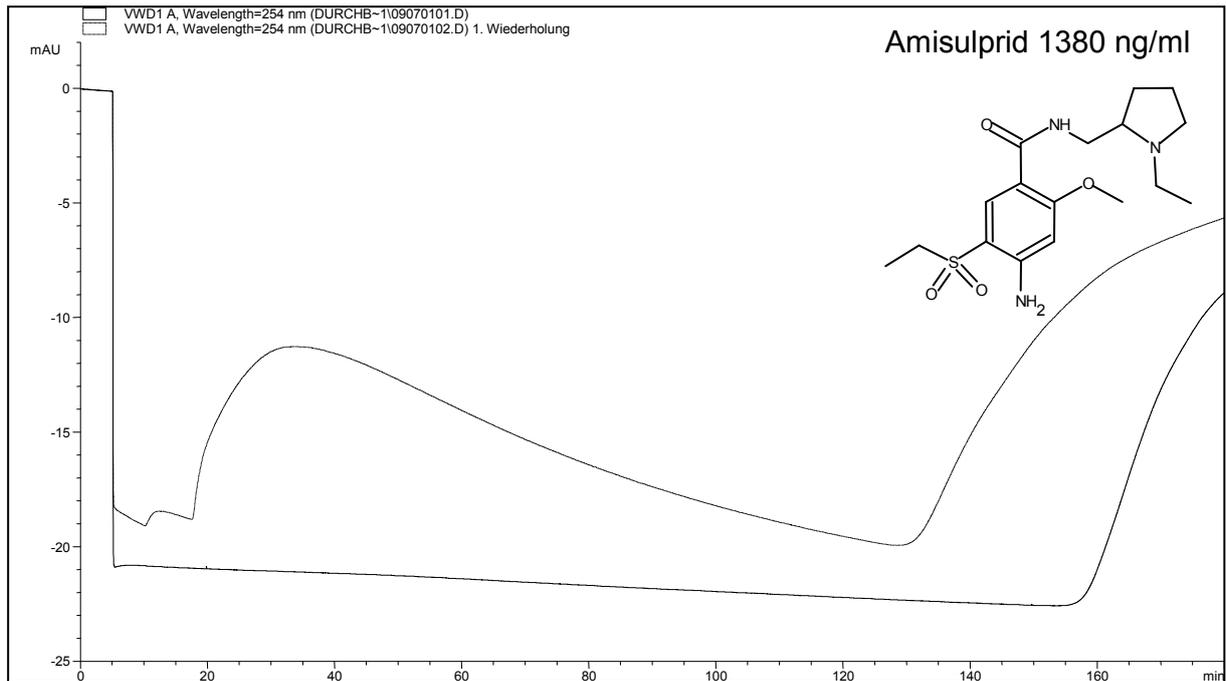


Abbildung 10: Durchbruchverhalten einer BioSil C8 (15-25 µm 10x4.6 mm I.D. BioRad) Vorsäule

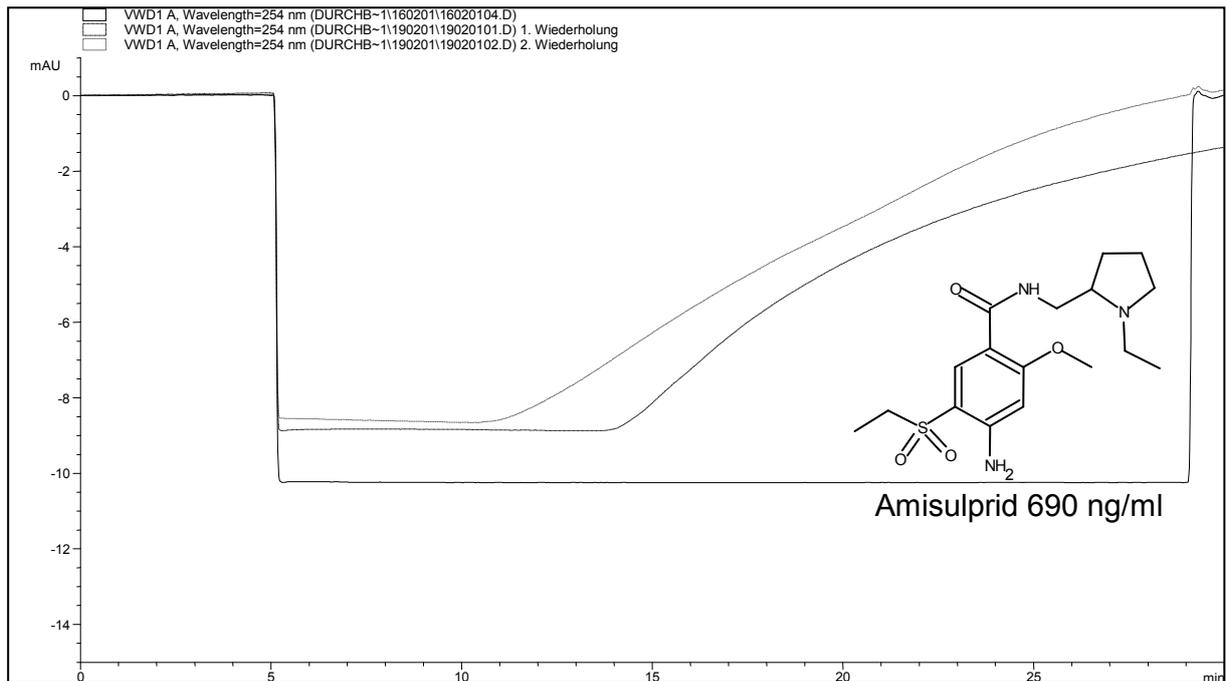
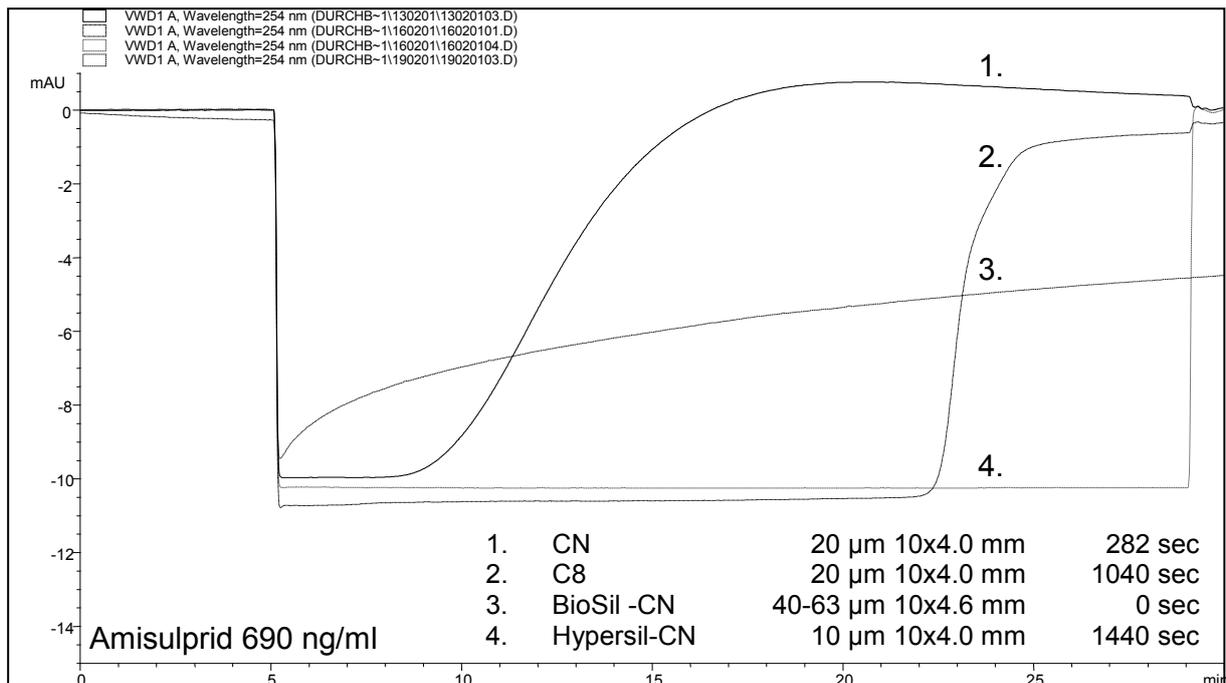


Abbildung 11: Durchbruchverhalten einer Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule

Optimal waren also ein schlagartiges Durchbrechen von Substanz nach einem längeren Zeitintervall und eine gute Wiederholbarkeit des Versuches. Abbildung 12 zeigt noch einmal das „breakthrough“-Verhalten der wichtigsten Vorsäulen im Überblick.



**Abbildung 12: Durchbruchverhalten der wichtigsten Säulen in der Übersicht**

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse (siehe Tabelle 10) spielten Material und Teilchengröße eine wichtige Rolle. C8 und Hypersil-CN erzielten bessere Ergebnisse, das Durchbruchvolumen betreffend, als vergleichbares CN Material. Eine Verkleinerung der Teilchengröße von 40 auf 20 bzw. 10 µm vergrößerte das Durchbruchvolumen. Allerdings verschlechterte sich die Wiederholbarkeit des Versuches bei einer Partikelgröße von 10 µm.

**Tabelle 10: „breakthrough“- Zeit und Volumen (bei einem Fluss von 1.5 ml/min) im Überblick**

Säule	Wdh	Amisulprid (ng/ml)	Zeit (sec)	Volumen (ml)
CN 20 µm 10x4.0 mm	neu	690	282	7.05
CN 20 µm 10x4.0 mm	1x	690	274	6.85
CN 20 µm 10x4.0 mm	2x	690	280	7.00
CN 20 µm 10x4.0 mm	3x	690	274	6.85
CN 20 µm 10x4.0 mm	4x	690	234	5.85
CN 20 µm 10x4.0 mm	neu	345	371	9.28
CN 20 µm 10x4.0 mm	1x	690	300	7.50
CN 20 µm 10x4.0 mm	2x	1380	260	6.50
C8 20 µm 10x4.0 mm	neu	690	1040	26.00
C8 20 µm 10x4.0 mm	1x	690	965	24.13
C8 20 µm 10x4.0 mm	2x	690	930	23.25
BioSil CN 40-63 µm 10x4.6 mm	neu	690	0	0
BioSil CN 10-25 µm 10x4.6 mm	neu	1380	1890	47.25
BioSil CN 10-25 µm 10x4.6 mm	1x	1380	1040	26.00
BioSil C8 15-25 µm 10x4.6 mm	neu	1380	9480	237.00
BioSil C8 15-25 µm 10x4.6 mm	1x	1380	780	19.50

Hypersil-CN 10 µm 10x4.0 mm	neu	690	1440	28.50
Hypersil-CN 10 µm 10x4.0 mm	1x	690	590	14.75
Hypersil-CN 10 µm 10x4.0 mm	2x	690	477	11.93

Material, das sich auch in den nächsten Versuchen durchsetzen sollte, war die C8-Säule (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik). Sie hatte wie die Hypersil-CN Säule (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) eine sehr lange „Durchbruch“-Zeit, zeigte allerdings eine wesentlich bessere Regenerierbarkeit und damit Belastbarkeit des Materials.

#### 4.1.2 Standzeit der Vorsäule

Durch die Direktinjektion von Plasma oder Serum wird die Vorsäule stark belastet. Nach einer Weile steigt der Druck an und die Wiederfindung wird schlechter. Eine gute Vorsäule sollte selektiv sein und mindestens 100 Injektionen von Plasma oder Serum aushalten. Um diese „Standzeit“ der Vorsäule auszutesten, wurden alle bereits mit dem „breakthrough“-Versuch getesteten Materialien 90 (CN und C8), 60 (BioSil CN) oder 30 (Hypersil-CN) Plasmainjektionen ausgesetzt. 100 µl einer Mischung aus Amisulprid (1385 ng/ml), Nortriptylin (1074 ng/ml) und Clomipramin (1000 ng/ml) in Plasma wurden injiziert. Die Wahl fiel auf diese drei Substanzen, da Amisulprid sehr früh und Clomipramin sehr spät eluiert wird. Nortriptylin liegt mit seiner Retentionszeit im Mittelfeld.

Die getesteten Vorsäulen zeigt Tabelle 11:

**Tabelle 11: Alle getesteten Vorsäulen im Überblick**

Material	Partikelgröße (µm)	Maße (mm)
CN (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
C8 (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
BioSil CN (BioRad)	40-63	10x4.6
Hypersil-CN (ict-Bad Homburg)	10	10x4.0

Für dieses Experiment wurde eine bereits im Labor etablierte Methode als Grundlage verwendet. Die Parameter sind in Tabelle 12 zusammengefasst:

**Tabelle 12: Methodenparameter im Überblick**

<b>Vorsäule</b>	CN, C8, BioSil CN oder Hypersil-CN
<b>analytische Säule</b>	LiChropsher 5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analysentechnik
<b>Anreicherungs-eluent</b>	8 % Acetonitril in Wasser
<b>analytischer Eluent</b>	1000 ml Acetonitril + 1000 ml Puffer (3,65 g di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat in 2000 ml H <sub>2</sub> O mit 85%iger H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6,4 eingestellt)
<b>Analysenzeit (min)</b>	30
<b>Fluss (ml/min)</b>	1.3
<b>Temperatur (°C)</b>	25
<b>Wellenlänge (nm)</b>	254 und 210

Ausgewertet wurden die Höhe und Fläche der erhaltenen Peaks, die Retentionszeit und die daraus resultierende Konzentration. Die Konzentration wurde einmal über die Fläche und einmal über die Höhe berechnet (siehe Tabelle 13 und 14).

**Tabelle 13: Standardabweichung (SD) in Prozent (%) für Höhe, Fläche, Retentionszeit (RT) und Konzentration (ermittelt sowohl über die Höhe als auch über die Fläche)**

<b>Amisulprid</b>					
<b>SD (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	0.30	1.52	0.13	83.92	32.79
<b>2. C8</b>	0.18	4.64	0.09	52.12	102.16
<b>3. BioSil CN</b>	0.52	3.67	0.13	196.96	84.93
<b>4. Hypersil-CN</b>	0.04	0.91	0.05	9.17	19.63
<b>Nortriptylin</b>					
<b>SD (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	0.62	5.17	0.22	37.23	12.78
<b>2. C8</b>	0.85	34.54	0.25	55.05	87.62
<b>3. BioSil CN</b>	1.84	8.96	0.25	135.96	21.61
<b>4. Hypersil-CN</b>	0.46	7.86	0.12	22.81	18.00
<b>Clomipramin</b>					
<b>SD (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	0.45	6.98	0.30	38.99	18.44
<b>2. C8</b>	0.79	28.51	0.38	75.04	82.63
<b>3. BioSil CN</b>	0.95	11.80	0.30	115.09	33.01
<b>4. Hypersil-CN</b>	0.10	4.23	0.17	7.34	11.26

**Tabelle 14: Variationskoeffizient (VK) in Prozent (%) für Höhe, Fläche, Retentionszeit (RT) und Konzentration (ermittelt sowohl über die Höhe als auch über die Fläche)**

<b>Amisulprid</b>					
<b>VK (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	6.65	2.40	0.92	6.54	2.40
<b>2. C8</b>	3.72	6.32	0.63	3.72	6.32
<b>3. BioSil CN</b>	16.82	6.10	0.95	16.82	6.10
<b>4. Hypersil-CN</b>	0.67	1.45	0.41	0.67	1.45
<b>Nortriptylin</b>					
<b>VK (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	3.59	1.17	0.98	3.63	1.17
<b>2. C8</b>	5.37	7.15	1.02	5.37	7.27
<b>3. BioSil CN</b>	15.13	2.02	1.10	15.13	2.02
<b>4. Hypersil-CN</b>	2.17	1.71	0.58	2.17	1.71
<b>Clomipramin</b>					
<b>VK (%)</b>	<b>Höhe</b>	<b>Fläche</b>	<b>RT</b>	<b>Konzentration (Höhe)</b>	<b>Konzentration (Fläche)</b>
<b>1. CN-Säule</b>	4.10	1.88	1.10	4.09	1.88
<b>2. C8</b>	8.23	6.61	1.28	8.23	6.66
<b>3. BioSil CN</b>	13.81	3.30	1.08	13.81	3.30
<b>4. Hypersil-CN</b>	0.74	1.11	0.65	0.74	1.11

Die Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule schnitt bei allen Parametern wie z.B. Stabilität der Höhe der Peaks, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten sehr gut ab. Allerdings stieg nach 30 Plasmajektionen der Druck so stark an (auf über 350 bar), daß keine weitere Messung mehr möglich war.

Die BioSil CN (40-63  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) Vorsäule zeigte sich als nicht stabil in der Höhe der Peaks. Man konnte dies durch eine Berechnung über die Fläche bzw. unter Einbeziehung eines internen Standards ausgleichen. Wählte man zum Beispiel Nortriptylin als internen Standard, sank die Standardabweichung für die Konzentration, bei einer Berechnung über die Höhe, für Amisulprid von 136 % auf 34 % und für Clomipramin von 115 % auf 21 %. Der Variationskoeffizient reduzierte sich für Amisulprid von 17 % auf 2 % und für Clomipramin von 14 % auf 2 %. Um Fehler bei der Integration zu vermeiden, sollte der Bestimmung der Konzentration über die Höhe der Vorzug gegeben werden. Die BioSil CN (40-63  $\mu\text{m}$  10x4.6 mm I.D. BioRad) Vorsäule war dafür allerdings nicht geeignet. Was sich auch im Hinblick auf die analytische Wiederfindung zeigte.

**Tabelle 15: Analytische Wiederfindung (%) der einzelnen Vorsäulen im Vergleich**

Vorsäulenmaterial	Amisulprid	Nortriptylin	Clomipramin
<b>CN</b> (20 $\mu\text{m}$ 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik)	93	96	95
<b>C8</b> (20 $\mu\text{m}$ 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik)	101	95	91
<b>BioSil CN</b> (40-63 $\mu\text{m}$ 10x4.6 mm I.D. BioRad)	85	84	83
<b>Hypersil-CN</b> (10 $\mu\text{m}$ 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg)	99	98	99

Die BioSil CN-Vorsäule zeigte die schlechteste Wiederfindung (siehe Tabelle 15). Berechnete man die Werte mit Nortriptylin als internem Standard, verbesserte sich die analytische Wiederfindung für Amisulprid von 85 % auf 101 % und die von Clomipramin von 83 % auf 100 %. Ein weiteres Beispiel für den positiven Einfluss eines internen Standards.

Die Wahl mußte nun zwischen der CN (20  $\mu\text{m}$  10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) und der C8 Säule (20  $\mu\text{m}$  10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) getroffen werden.

### 4.1.3 Selektivität der verwendeten Vorsäulen

Für die Therapie psychiatrisch erkrankter Patienten steht dem behandelnden Arzt ein weites Spektrum an Wirkstoffen zur Verfügung. Eine für das TDM breit anwendbare Methode sollte in der Lage sein, so viele verschiedene Substanzen wie möglich zu erfassen. Jeder Umbau an der HPLC von Säulen oder anderen Eluenten kostet Zeit. Nach der Testung des „Durchbruchverhaltens“ und der „Standzeit“ wurden nun folgende Vorsäulen auf ihre Selektivität hin untersucht (siehe Tabelle 16):

**Tabelle 16: Alle getesteten Vorsäulen im Überblick**

Material	Materialgröße ( $\mu\text{m}$ )	Maße (mm)
CN (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
C8 (MZ-Analysentechnik)	20	10x4.0
Hypersil-CN (ict-Bad Homburg)	10	10x4.0

Mit Selektivität ist gemeint, wie viele verschiedene Arzneistoffe mit dem Säulenmaterial angereichert und somit später detektiert werden können.

Die für diesen Versuch gewählte Ausgangsmethode wurde ursprünglich für Amitriptylin (+Nortriptylin), Trimipramin (+Desmethyltrimipramin), Clomipramin

(+Desmethylclomipramin), Fluvoxamin und Paroxetin entwickelt und basiert auf den Veröffentlichungen von Härtter und Weigmann [56, 57, 59, 60, 70, 71].

Durch geringfügige Modifikationen konnte sie um einige Komponenten erweitert werden:

Citalopram	+	N-Desmethylcitalopram
Doxepin	+	N-Desmethyldoxepin
Fluoxetin	+	N-Desmethylfluoxetin
Imipramin	+	N-Desmethylimipramin
Maprotilin	+	N-Desmethylmaprotilin
Perazin	+	N-Desmethylperazin
Sertralin		

Die wichtigsten Parameter der Ausgangsmethode sind in der unteren Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 17):

**Tabelle 17 : Methodenparameter im Überblick**

<b>Vorsäule</b>	CN 20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik
<b>analytische Säule</b>	LiChropsher 5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analysentechnik
<b>Anreicherungsmedium</b>	8 % Acetonitril in Wasser
<b>analytischer Eluent</b>	1000 ml Acetonitril + 1000 ml Puffer (3.65 g di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat in 2000 ml H <sub>2</sub> O mit 85%iger H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6.4 eingestellt)
<b>Analysenzeit (min)</b>	30
<b>Fluss (ml/min)</b>	1.3
<b>Temperatur (°C)</b>	25
<b>Wellenlänge (nm)</b>	210, 254 (für Fluvoxamin)

Die nachfolgende Tabelle 18 zeigt, welche Antidepressiva und Neuroleptika bereits von der Methode erfasst wurden. Fettgedruckt sind die Substanzen, die zusätzlich mit der zu entwickelnden Methode erfasst werden sollten, inklusive der jeweiligen Metabolite:

**Tabelle 18: Liste der zu detektierenden Neuroleptika und Antidepressiva und deren optimale Messwellenlängen**

210 nm	226 nm	254 nm	295 nm
Amitriptylin	<b>Reboxetin</b>	<b>Amisulprid</b>	Clomipramin
Nortriptylin	<b>Venlafaxin</b>	<b>Clozapin</b>	N-Desmethylclomipramin
Citalopram	<b>N-Desmethyl-venlafaxin</b>	<b>N-Desmethylclozapin</b>	Doxepin
N-Desmethylcitalopram		Fluvoxamin	N-Desmethyldoxepin
Fluoxetin		<b>Olanzapin</b>	Trimipramin
N-Desmethylfluoxetin		Perazin	N-Desmethyltrimipramin
Imipramin		N-Desmethylperazin	<b>Quetiapin</b>
Desipramin			
Maprotilin			
N-Desmethylmaprotilin			
Paroxetin			
Sertralin			
N-Desmethylsertralin			

Aus den oben aufgezählten Wirkstoffen wurden 18 verschiedene Plasmaproben hergestellt, so dass jeweils Muttersubstanz und Metabolit in einer Probe gemeinsam enthalten waren. Die gewählte Konzentration orientierte sich am therapeutischen

Bereich der jeweiligen Substanz. Die 18 Mischungen wurden mit jeder Vorsäule in vier Durchgängen gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 19 in der Übersicht. Um besser vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Höhen auf mAU pro 100 ng Substanz umgerechnet.

**Tabelle 19: Signalstärken aller getesteten Säulen umgerechnet auf mAU/100 ng**

<b>Wellenlänge 210 nm</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>C8 Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>Hypersil-CN Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>CN Höhe (mAU/100 ng)</b>
Amitriptylin	180	0.57	1.03	-
Nortioptylin	135	0.85	0.95	0.95
Citalopram	130	1.43	1.49	0.65
N-Desmethylcitalopram	155	0.52	0.64	0.66
Fluoxetin	200	0.40	0.43	0.58
N-Desmethylfluoxetin	205	0.94	1.10	0.78
Imipramin	310	1.15	1.27	1.53
Desipramin	110	12.00	13.75	10.00
Maprotilin	155	0.48	0.47	0.33
N-Desmethylmaprotilin	150	0.70	0.78	0.72
Paroxetin	100	0.72	0.94	0.20
Sertralin	40	0.55	0.65	0.64
N-Desmethylsertralin	30	4.52	4.82	-
<b>Wellenlänge 226 nm</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>C8 Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>Hypersil-CN Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>CN Höhe (mAU/100 ng)</b>
Reboxetin	100	0.63	-	-
Venlafaxin	350	0.60	0.67	0.80
N-Desmethylvenlafaxin	310	0.52	0.63	0.74
<b>Wellenlänge 254 nm</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>C8 Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>Hypersil-CN Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>CN Höhe (mAU/100 ng)</b>
Amisulprid	280	0.43	0.43	0.47
Clozapin	500	0.98	1.02	0.84
N-Desmethylclozapin	500	0.74	0.88	0.34
Fluvoxamin	100	4.52	4.62	3.71
Olanzapin	155	1.43	1.43	0.78
Perazin	150	0.52	0.60	0.64
N-Desmethylperazin	105	0.53	0.61	0.66
<b>Wellenlänge 295 nm</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>C8 Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>Hypersil-CN Höhe (mAU/100 ng)</b>	<b>CN Höhe (mAU/100 ng)</b>
Clomipramin	400	1.42	1.79	2.01
N-Desmethylclomipramin	400	5.99	6.77	7.67
Doxepin	140	0.92	1.11	1.30
N-Desmethyldoxepin	125	1.28	1.44	1.72
Quetiapin	210	0.84	-	-
N-Desmethyltrimipramin	270	0.86	0.94	1.09
Trimipramin	300	1.07	1.13	1.07

Die Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule wies für die Mehrheit der getesteten Arzneistoffe, die höchste Sensitivität auf, gefolgt von der CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule. Im Vergleich zeigte sich allerdings, dass nur mit der C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule alle Arzneistoffe erfasst wurden. Sie war also die einzige, die alle Substanzen retinierte. Quetiapin, Reboxetin und D-Sertralin ließen sich weder mit der CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) noch mit der Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule nachweisen. Das Hypersil-CN Material schied aufgrund des schnellen Druckanstiegs auf über 350 bar nach Aufgabe von nur 30 Proben von vorneherein für eine weitere Verwendung aus.

## 4.2 Entwicklung der HPLC-UV-Methode

### 4.2.1 Entwicklung einer „Multi“-HPLC-UV-Methode zur Bestimmung verschiedener Antidepressiva und Neuroleptika

Ein weiterer entscheidender Baustein für eine HPLC-Methode ist die analytische Säule. Auf ihr werden die gesuchten Komponenten chromatographisch getrennt und danach detektiert. Auf den bisherigen Ergebnissen aufbauend, erfolgte nun die Entwicklung einer Methode, die die Bestimmung möglichst vieler verschiedener Antidepressiva und Neuroleptika nebeneinander ermöglichte. In Tabelle 20 sind alle getesteten analytischen Säulen aufgelistet:

Tabelle 20: Alle getesteten analytischen Säulen im Überblick

Material	Partikelgröße (µm)	Maße (mm)
LiChrospher CN (MZ-Analysentechnik)	5	250x4.6
LiChrospher CN (MZ-Analysentechnik)	5	150x4.0
LiChrospher CN (MZ-Analysentechnik)	5	100x2.1
BioSil CN (BioRad)	5	250x4.6
BioSil CN (BioRad)	3	150x4.0
BioSil CN B104 (BioRad)	3	90x3.2
Hypersil ODS (MZ-Analysentechnik)	5	150x3.0

Es wurden für diesen Versuch die gleichen Probenmischungen verwendet wie für die Testung der Vorsäulen auf ihre Selektivität. Auch die dort verwendete HPLC-Methode wurde übernommen (siehe Tabelle 17). Für die 250 mm langen Säulen konnte der Fluss von 1.3 ml/min beibehalten werden. Für die 150 mm langen Säulen wurde er auf 1.0 ml/min reduziert und für die 100 bzw. 90 mm langen Säulen sogar auf 0.6 ml/min gedrosselt, da sonst der Druck zu stark angestiegen wäre. Mit der Hypersil ODS (5 µm 150x3.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) war unter Verwendung der oben beschriebenen Methode keine Detektion der gesuchten Komponenten möglich. Der folgende Abschnitt zeigt anhand von Clozapin exemplarisch die Unterschiede zwischen den einzelnen analytischen Säulen (siehe Abbildung 13–18).

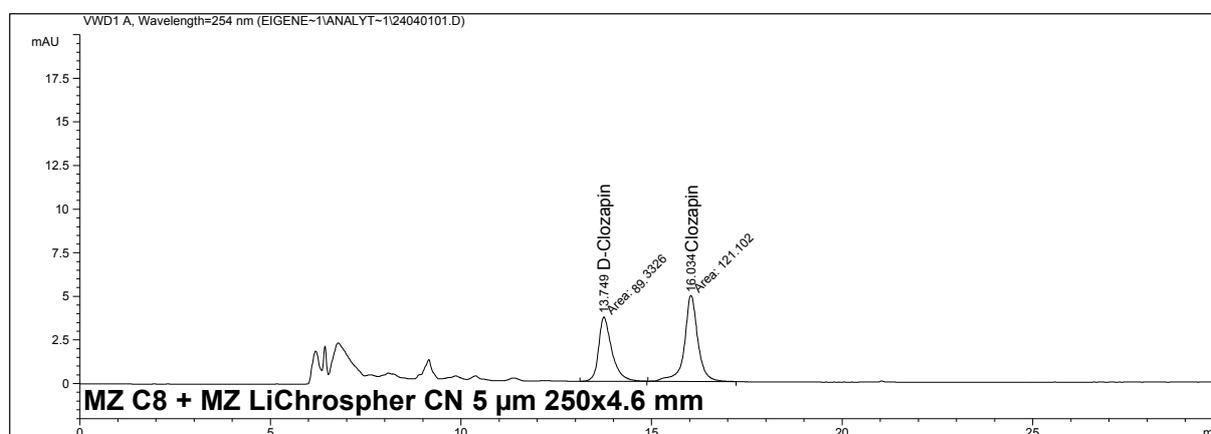
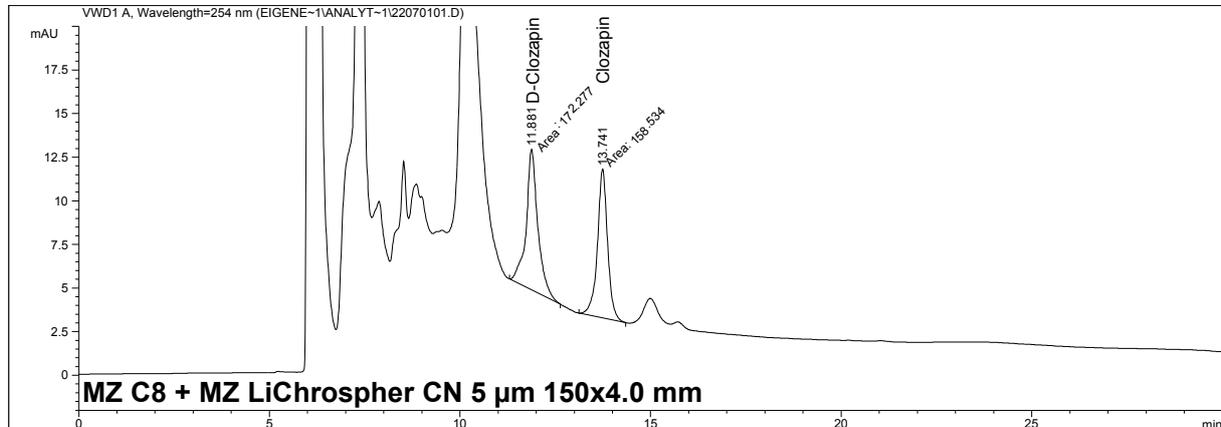


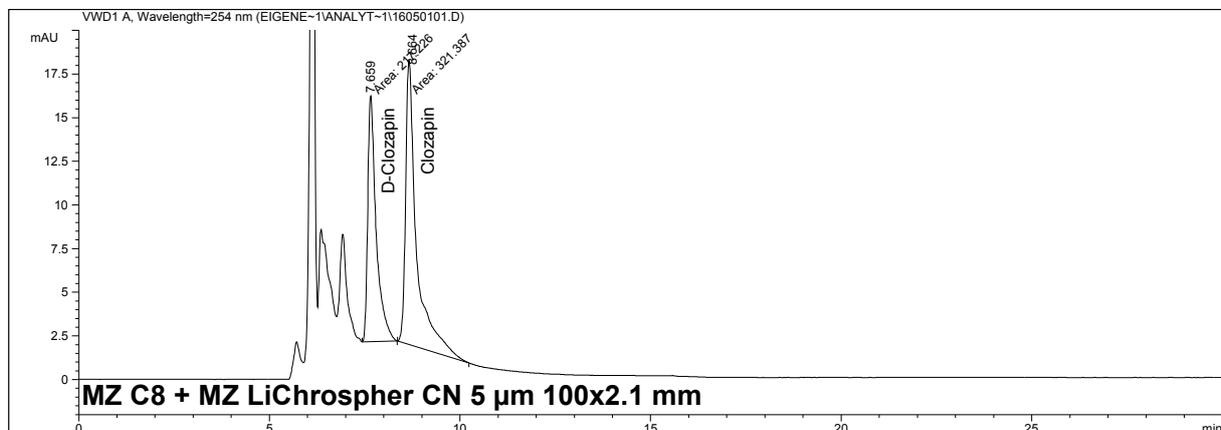
Abbildung 13: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer LiChrospher CN (5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analysentechnik) als analytischer Säule

Die LiChrospher CN (5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analyentechnik) trennte Muttersubstanzen und Desmethylmetaboliten gut auf. Die Plasmainterferenzen waren akzeptabel, allerdings ließ die Sensitivität zu wünschen übrig (siehe Abbildung 13 und Tabelle 21).



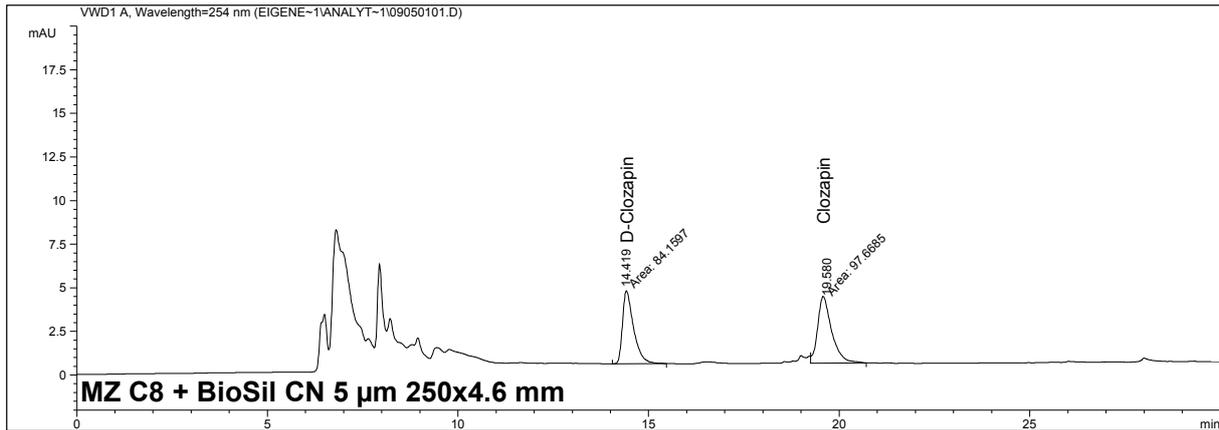
**Abbildung 14: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer LiChrospher CN (5 µm 150x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) als analytischer Säule**

Durch die Verkürzung der LiChrospher CN (5 µm) auf 150x4.0 mm stieg die Sensitivität und die Analysezeiten verringerten sich (siehe Abbildung 14 und Tabelle 21). Allerdings interferierte das Plasma stark, vor allem bei Substanzen die vor Clozapin eluiert wurden.



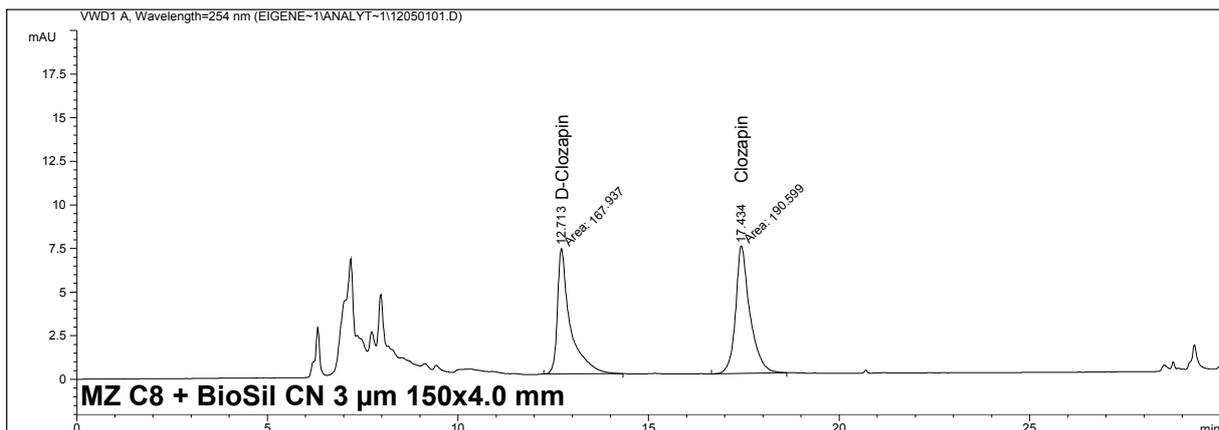
**Abbildung 15: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer LiChrospher CN (5 µm 100x2.1 mm I.D. MZ-Analysentechnik) als analytischer Säule**

Eine Verkleinerung des Durchmessers und eine weitere Verkürzung der Länge der LiChrospher CN (5 µm) auf 100x2.1 mm erhöhte die Sensitivität nochmals (siehe Abbildung 15 und Tabelle 21). Die Retentionszeit sank weiter, allerdings verschlechterte sich dadurch auch die chromatographische Trennung. Die Desmethyl-Metabolite waren teilweise nicht mehr klar von der Muttersubstanz zu trennen. Der Injektionspeak interferierte mit schneller eluierenden Substanzen.



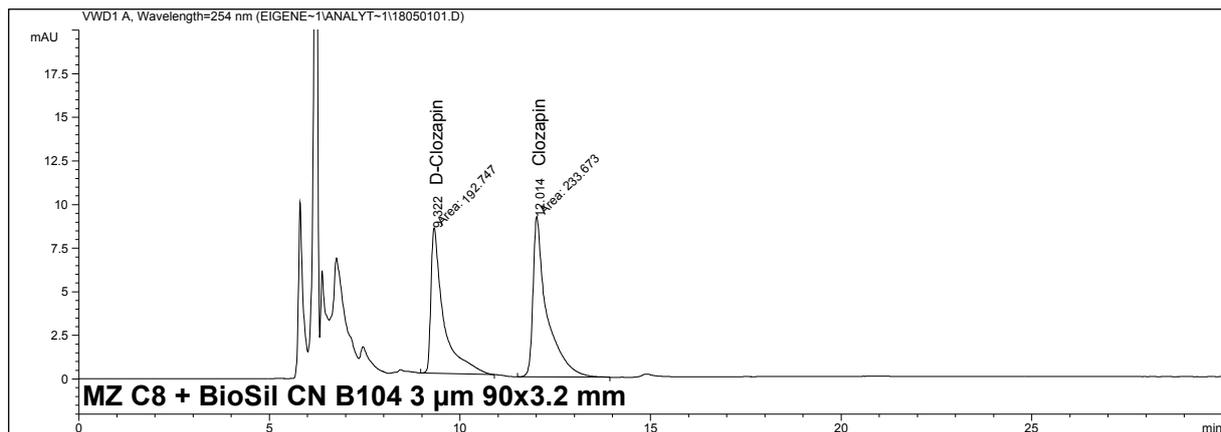
**Abbildung 16: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer BioSil CN (5 µm 250x4.6 mm I.D. BioRad) als analytischer Säule**

Die BioSil CN (5 µm 250x4.6 mm I.D. BioRad) retenierte die Substanzen länger als das CN-Material von MZ-Analysentechnik und die Sensivität war vergleichbar. Muttersubstanzen und Metabolite wurden klar getrennt. Der Injektionspeak interferierte nicht.



**Abbildung 17: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer BioSil CN (3 µm 150x4.0 mm I.D. BioRad) als analytischer Säule**

Die BioSil CN (3 µm 150x4.0 mm I.D. BioRad) lieferte die besten Ergebnisse (siehe Abbildung 17 und Tabelle 21). Die chromatographische Trennung war sehr gut. Die Retentionszeiten waren für alle Komponenten unter 30 Minuten und die Sensivität ausreichend. Die Verkürzung der Länge, die Verkleinerung des Durchmessers und die reduzierte Teilchengröße von 3 µm wirkten sich positiv aus.



**Abbildung 18: 500 ng/ml Clozapin und N-Desmethylclozapin aufgetrennt mit einer C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule kombiniert mit einer BioSil CN B104 (3 µm 90x3.2 mm I.D. BioRad) als analytischer Säule**

Die Sensitivität ließ sich durch eine weitere Verkürzung der BioSil CN-Säule auf 90x3.2 mm noch weiter erhöhen (siehe Abbildung 18 und Tabelle 21), allerdings verschlechterte sich dadurch wieder die Chromatographie, d.h. ungenügende Trennung der Metabolite von der Muttersubstanz und der Injektionspeak interferierte mit früh eluierenden Substanzen.

**Tabelle 21: Die mit den getesteten analytischen Säulen erzielten Höhen (mAU) und Retentionszeiten (RT) von Clozapin (500 ng/ml) und N-Desmethylclozapin (500 ng/ml) im Vergleich**

Säule	Partikelgröße (µm)	Maße (mm)	Höhe Clozapin (mAU)	Höhe N-Desmethylclozapin (mAU)	RT Clozapin (min)	RT N-Desmethylclozapin (min)
LiChrospher CN	5	250x4.6	4.80	3.60	16.03	13.75
LiChrospher CN	5	150x4.0	8.50	8.00	13.74	11.88
LiChrospher CN	5	100x2.1	14.10	16.30	7.66	8.66
BioSil CN	5	250x4.6	3.80	4.20	19.58	14.42
BioSil CN	3	150x4.0	7.30	7.20	17.43	12.71
BioSil CN B104	3	90x3.2	9.20	8.30	12.01	9.32

Um die Analysenzeit zu verkürzen und die Sensitivität zu erhöhen, scheinen folgende Veränderungen sinnvoll: eine Verkürzung der Säule, eine Verkleinerung des Durchmessers sowie die Reduzierung der Teilchengröße.

Bei den getesteten Säulen mit einer Länge von 100 mm und weniger, wurde die chromatographische Trennung zu schlecht, auch wenn kurze Retentionszeiten und gesteigerte Sensitivität verlockend waren. Bei einer Länge über 150 mm stieg die Analysenzeit auf z.T über 45 Minuten für z.B. Clomipramin und der Verlust an Sensitivität war für einige Komponenten wie z.B. Olanzapin, Reboxetin oder Paroxetin zu groß.

Die BioSil CN (3 µm 150x4.0 mm I.D. BioRad) war ein guter Kompromiß für alle Komponenten.

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Ausgangsmethode betreffend des Säulenmaterials schrittweise verändert. Tabelle 22 zeigt noch einmal die Methodenparameter, die nun optimiert wurden.

Tabelle 22: Parameter der Ausgangsmethode im Überblick

<b>Vorsäule</b>	CN 20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik
<b>analytische Säule</b>	LiChropsher 5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analysentechnik
<b>Anreicherungs-eluent</b>	8 % Acetonitril in Wasser
<b>analytischer Eluent</b>	1000 ml Acetonitril + 1000 ml Puffer (3.65 g di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat in 2000 ml H <sub>2</sub> O mit 85%iger H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6.4 eingestellt)
<b>Analysenzeit (min)</b>	35
<b>Fluss (ml/min)</b>	1.3
<b>Temperatur (°C)</b>	25
<b>Wellenlänge (nm)</b>	210

Die CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule wurde durch eine C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) Vorsäule ersetzt. Anstatt der LiChropsher CN (5 µm 250x4.6 mm I.D. MZ-Analysentechnik) kam nun eine BioSil CN (3 µm 150x4.0 mm I.D. BioRad) zum Einsatz.

Nach dem Säulenmaterial standen nun Methodenparameter wie Injektionsvolumen, Temperatur, Wellenlänge etc. auf dem Prüfstand. Auch ein passender interner Standard (ISTD) musste noch gefunden werden.

### Injektionsvolumen

Durch die Wahl des Säulenmaterials war schon ein Maximum an Sensitivität erreicht. Die Peakhöhe ließ sich noch steigern durch die Vergrößerung des Injektionsvolumen von 100 auf 200 µl bzw. Mehrfachinjektion von zweimal 200 µl. Substanzen für die das Injektionsvolumen auf 200 µl erhöht werden musste sind Paroxetin, Perazin (+ Desmethylperazin), Olanzapin, Reboxetin und Sertralin (+ Desmethylsertralin. Für alle anderen Substanzen war eine Injektion von 100 µl ausreichend. Abbildung 19 zeigt die lineare Abhängigkeit der Höhe vom Injektionsvolumen am Beispiel von Paroxetin.

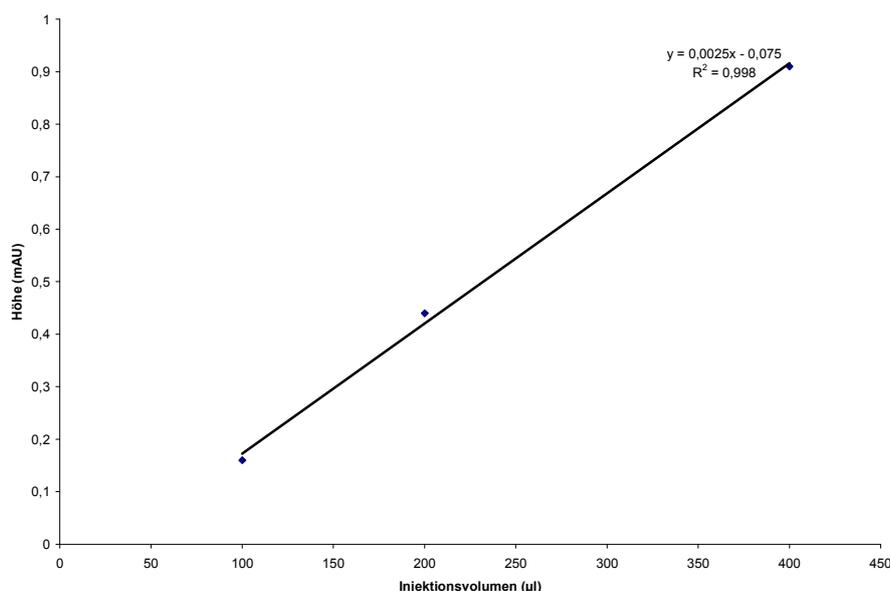
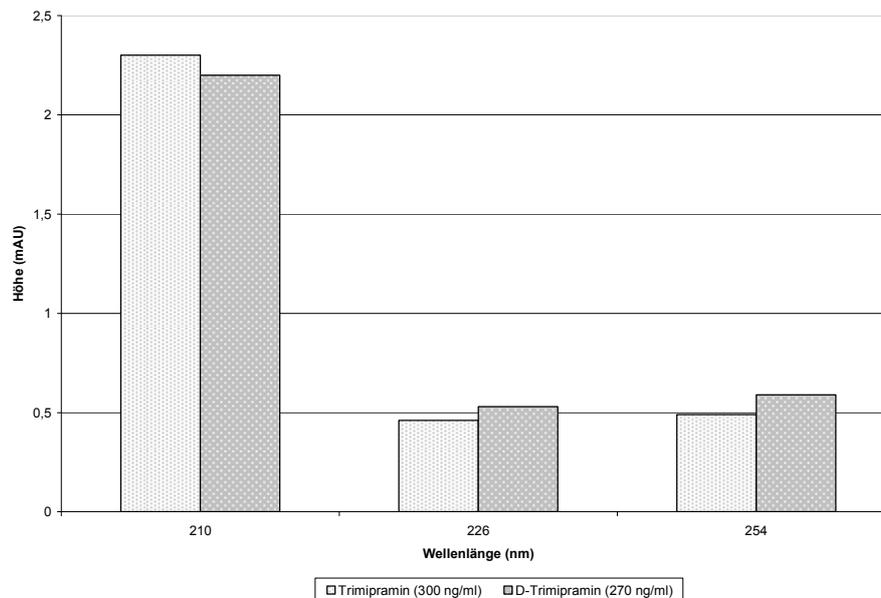


Abbildung 19: Injektion von 100, 200 und 400 µl Paroxetin (100 ng/ml) in Plasma

Die Höhe des UV-Signals (in mAU) steigt von 0.16 auf 0.44 bis 0.91, wenn 100, 200 bzw. 400 µl Probe injiziert werden.

## Wellenlänge

Bei der UV-Detektion ist die Wellenlänge, bei der die Probe gemessen wird ein entscheidender Faktor. Der Detektor, der hier zum Einsatz kam, war ein „variable wavelength detector“ mit dem im Lauf jeweils nur eine Wellenlänge pro Probe erfasst werden konnte. Die jeweils beste Messwellenlänge (210, 226 oder 254 nm) wurde bei allen Substanzen noch einmal überprüft. Abbildung 20 zeigt den Einfluss der Wellenlänge auf die resultierende Höhe am Beispiel von Trimipramin und Desmethyltrimipramin:



**Abbildung 20: Trimipramin (300 ng/ml) und Desmethyltrimipramin (270 ng/ml) in Plasma gemessen bei verschiedenen Wellenlängen (210, 226 und 254 nm)**

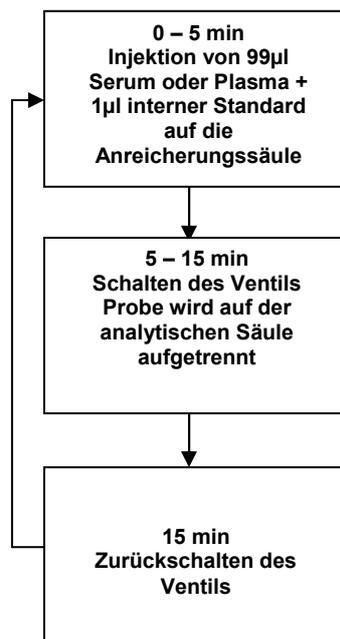
Bei einem Wechsel der Wellenlänge von 226 nm auf 210 nm stieg das Signal von Trimipramin von 0.46 mAU auf 2.3 mAU und für Desmethyltrimipramin von 0.53 mAU auf 2.2 mAU an. Nach Überprüfung aller Substanzen, ergeben sich folgende, in Tabelle 23 dargestellte Gruppen:

**Tabelle 23: Einteilung der getesteten Substanzen nach ihrer optimalen Messwellenlänge**

210 nm	226 nm	254 nm
<b>Amitriptylin</b>	<b>Reboxetin</b>	<b>Amisulprid</b>
Nortriptylin	<b>Venlafaxin</b>	<b>Clozapin</b>
<b>Citalopram</b>	O-Desmethyl-	N-Desmethylclozapin
N-Desmethylcitalopram	venlafaxin	<b>Fluvoxamin</b>
<b>Clomipramin</b>		<b>Perazin</b>
N-Desmethylclomipramin		N-Desmethylperazin
<b>Doxepin</b>		<b>Quetiapin</b>
N-Desmethyldoxepin		
<b>Fluoxetin</b>		
N-Desmethylfluoxetin		
<b>Imipramin</b>		
<b>Desipramin</b>		
<b>Maprotilin</b>		
N-Desmethylmaprotilin		
<b>Olanzapin</b>		
<b>Paroxetin</b>		
<b>Sertralin</b>		
N-Desmethylsertralin		
<b>Trimipramin</b>		
N-Desmethyltrimipramin		

## „time table“ für das Schaltventil

Das Schaltventil im Säulenofen wird nach einem festen Zeitschema geschaltet. Dieses Schema reguliert wie lange die aufzugebene Probe auf der Vorsäule angereichert wird und wann auf „back-flash“ umgeschaltet wird, d.h. ab wann die Probe mit dem analytischen Eluenten auf die analytische Säule aufgespült wird. Anreicherungszeiten von 10, 5 und 2.5 Minuten wurden untersucht und es konnte kein wesentlicher Unterschied in der Ausbeute festgestellt werden. Ebenso wurde der Fluss variiert, mit dem die Probe auf die Vorsäule aufgespült wurde. Es gab keine nennenswerten Unterschiede zwischen einem Fluss von 0.5 oder 1.0 ml/min. Folgendes Schaltschema wurde für die Methode festgelegt:



**Abbildung 21: Schaltschema**

## Temperatur

Der integrierte Säulenofen der Agilent Series 1100 ermöglicht Messungen bei verschiedenen Temperaturen von 10 Grad unter Raumtemperatur bis 80° Celsius, mit einer Stabilität von  $\pm 0,15$  ° Celsius.

Um die Chromatographie zu beschleunigen wurde der Säulenofen für beide Seiten auf 40° Celsius geheizt. Die Retentionszeiten verkürzten sich so im Schnitt um 2 Minuten. Von Temperaturen über 40° Celsius wurde abgesehen, da sie das Risiko von Plasmapräzipitation der Probe mit sich bringen könnten. Durch diese Temperaturerhöhung sank auch der Druck ab, der durch die Kürzung der Säule auf 150 mm und der Verkleinerung der Teichengröße auf 3 µm angestiegen war.

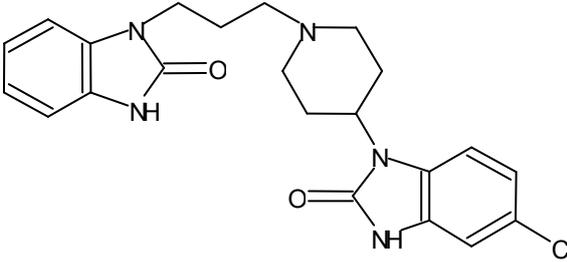
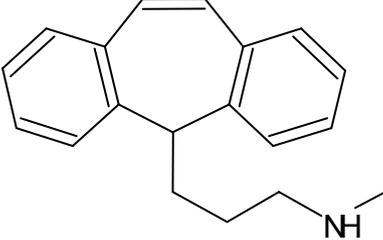
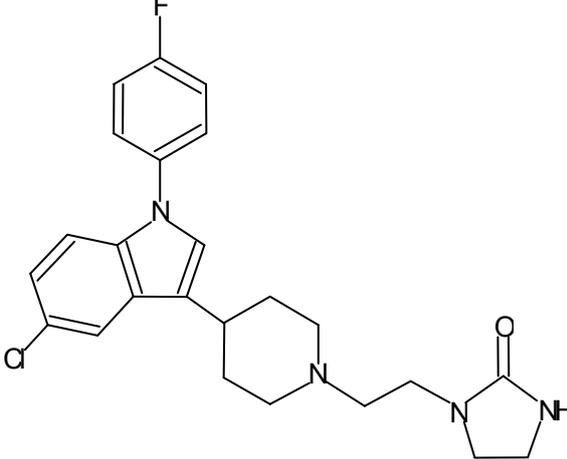
## Fluss

Ein Fluss von 0.9 ml/min war ein guter Kompromiss für die meisten Arzneistoffe. Bei Trimipramin (+ D-Trimipramin) und Perazin (+ D-Perazin) ließen sich Muttersubstanz und Metabolit nur bei einem Fluss von 0.7 ml/min sauber trennen. Für die Bestimmung von Quetiapin mußte der Fluss auf 0.5 ml/min gedrosselt werden, da es sonst zu einer Interferenz mit dem internen Standard gekommen wäre.

## Interner Standard

Ein interner Standard (ISTD) sollte mehrere Bedingungen erfüllen u.a. eine ähnliche Strukturformel haben und damit ein vergleichbares chromatographisches Verhalten zeigen und am besten keine Verwendung als Arzneistoff finden, damit das Risiko einer Interferenz nicht gegeben ist. Eine Reihe günstig erscheinender Substanzen wurde auf ihre Tauglichkeit als interner Standard getestet. Mit der entwickelten Methode am besten zu detektieren, waren Domperidon, Protriptylin und Sertindol (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24: Die als interne Standards (ISTD) verwendeten Substanzen im Überblick**

Name	Formel
Domperidon	
Protriptylin	
Sertindol	

Domperidon (Motilium<sup>®</sup>), ein Dopamin-Antagonist, ist zwar als Antiemetikum zugelassen, findet aber keine breite Anwendung. Das UV-Signal von Domperidon war bei 210 nm am intensivsten. Eine Bestimmung bei 226 und 254 nm war bei Erhöhung der Konzentration ebenfalls möglich (siehe Tabelle 25). Für Sertindol (Serdolact<sup>®</sup>) ruht derzeit die Zulassung wegen schwerer kardiovaskulärer Nebenwirkungen (AMK-Meldung PZ 9/2000 Seite 9). Für Protriptylin ist kein Fertigprodukt in der Roten Liste aufgeführt.

**Tabelle 25: Messwellenlänge, Retentionszeit und Peakhöhe der als interner Standard (ISTD) verwendeten Substanzen**

Substanz	Wellenlänge (nm)	Retentionszeit (min)	Höhe (mAU/100 ng)
Domperidon	210	12.2	3.12
	226		0.58
	254		0.08
Protriptylin	210	23.7	0.83
Sertindol	210	22.5	0.34

### Methodenüberblick und Fazit

Einen Überblick über die für die Messung der jeweiligen Substanz zu wählenden Parameter gibt Tabelle 26.

**Tabelle 26: Alle wichtigen Parameter in einer Tabelle zusammengefasst**

Parameter	RT (min)	empfohlener therapeutischer Bereich (ng/ml)	Wellenlänge (nm)	Fluss (ml/min)	ISTD	Injektionsvolumen (µl)	Höhe (mAU/100ng)
Quetiapin	8.7	20-170	254	0.5	D <sup>3</sup>	100	1,00
<b>Domperidon</b>	<b>12.2</b>	<b>ISTD<sup>2</sup></b>	<b>210 226 254</b>				
N-Desmethyloclazapin	13.1	350-600	254	0.9	D <sup>3</sup>	100	1,22
Reboxetin	14.0	10-100	226	0.9	D <sup>3</sup>	100	0,56
N-Desmethylvenlafaxin <sup>1</sup>	14.3	195-400	226	0.9	D <sup>3</sup>	100	0,61
Venlafaxin	15.3	195-400	226	0.9	D <sup>3</sup>	100	0,37
Fluvoxamin	16.6	20-200	254	0.9	D <sup>3</sup>	100	3,00
Olanzapin	16.7	20-80	210	0.9	P <sup>4</sup>	200	2,60
Clozapin	17.9	350-600	254	0.9	D <sup>3</sup>	100	0,76
Amisulprid	17.9	100-400	254	0.9	D <sup>3</sup>	100	1,24
N-Desmethyloclazapin	19.1	-	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,54
N-Desmethylfluoxetin <sup>1</sup>	19.3	120-300	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,54
N-Desmethylsertralin	20.3	-	210	0.9	S <sup>5</sup>	200	0,43
N-Desmethylmaprotilin	20.9	-	210	0.9	D <sup>3</sup>	100	0,45
Citalopram	20.9	30-130	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,43
Paroxetin	21.0	70-120	210	0.9	P <sup>4</sup>	200	0,89
N-Desmethyldoxepin <sup>1</sup>	22.0	50-150	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,72
Fluoxetin <sup>1</sup>	22.3	120-300	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,33
<b>Sertindol</b>	<b>22.5</b>	<b>ISTD<sup>2</sup></b>	<b>210</b>				
<b>Protriptylin</b>	<b>23.7</b>	<b>ISTD<sup>2</sup></b>	<b>210</b>				
N-Desmethylperazin	23.7	-	254	0.7	D <sup>3</sup>	200	0,63
Desipramin <sup>1</sup>	23.8	175-300	210	0.9	S <sup>5</sup>	100	0,85
Nortriptylin <sup>1</sup>	24.1	80-200	210	0.9	S <sup>5</sup>	100	0,58
Doxepin <sup>1</sup>	24.1	50-150	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,71
Maprotilin <sup>1</sup>	24.3	125-200	210	0.9	D <sup>3</sup>	100	1,42
N-Desmethyltrimipramin	24.6	-	210	0.7	S <sup>5</sup>	100	0,15
Perazin	24.6	100-230	254	0.7	D <sup>3</sup>	200	0,38
Sertralin	25.0	10-50	210	0.9	S <sup>5</sup>	200	0,70
Trimipramin	25.7	150-350	210	0.7	S <sup>5</sup>	100	0,15
N-Desmethylclomipramin <sup>1</sup>	26.0	175-450	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,30
Amitriptylin <sup>1</sup>	26.6	80-200	210	0.9	S <sup>5</sup>	100	0,49
Imipramin <sup>1</sup>	27.0	175-300	210	0.9	S <sup>5</sup>	100	0,61
Clomipramin <sup>1</sup>	28.9	175-400	210	0.9	P <sup>4</sup>	100	0,45

- <sup>1</sup>der empfohlener therapeutische Bereich setzt sich aus der Konzentration der Muttersubstanz und des Metaboliten zusammen
- <sup>2</sup>ISTD = Interner Standard
- <sup>3</sup>Domperidon
- <sup>4</sup>Protriptylin
- <sup>5</sup>Sertindol

Die nachfolgenden Chromatogramme (siehe Abbildung 22 bis 26) zeigen mit der oben beschriebenen Methode analysierte Patientenproben.

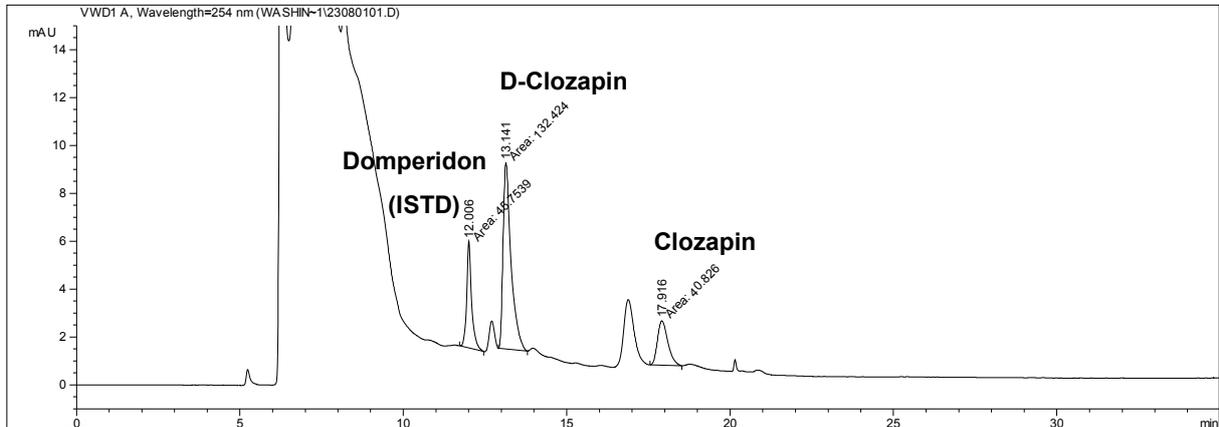


Abbildung 22: Chromatogramm eines Patientenserums mit 237 ng/ml N-Desmethylclozapin und 497 ng/ml Clozapin. Der Patient wurde mit 300 mg Clozapin pro Tag behandelt.

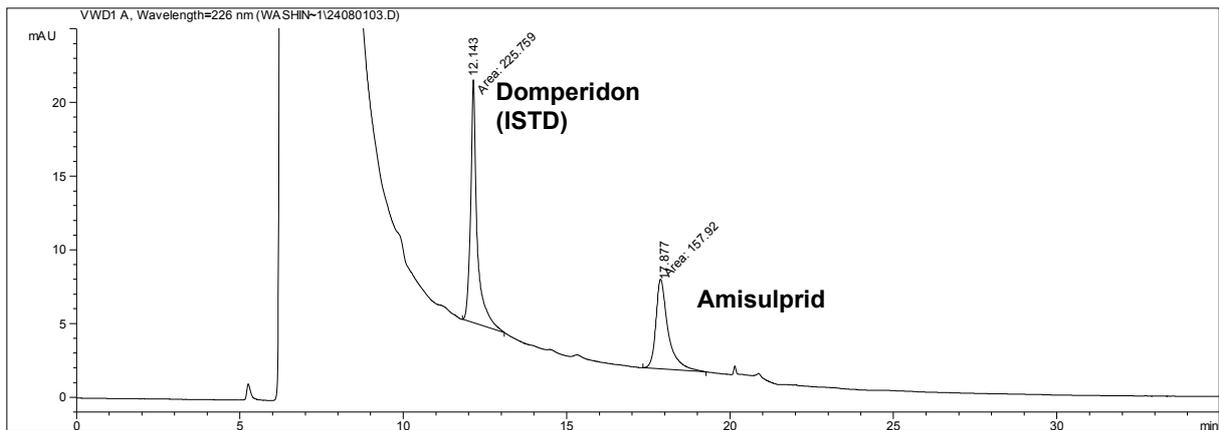


Abbildung 23: Chromatogramm eines Patientenserums mit 320 ng/ml Amisulprid. Der Patient wurde mit 600 mg Amisulprid pro Tag behandelt.

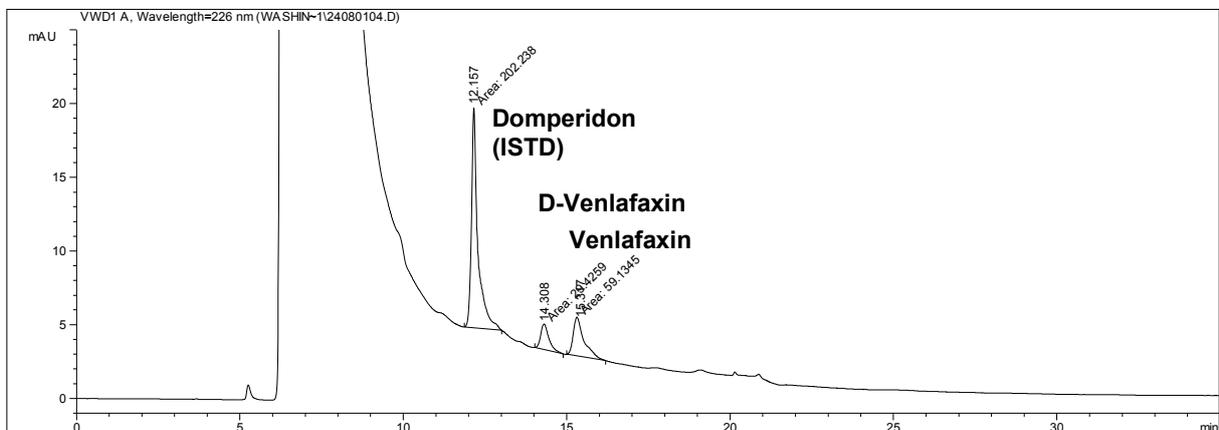
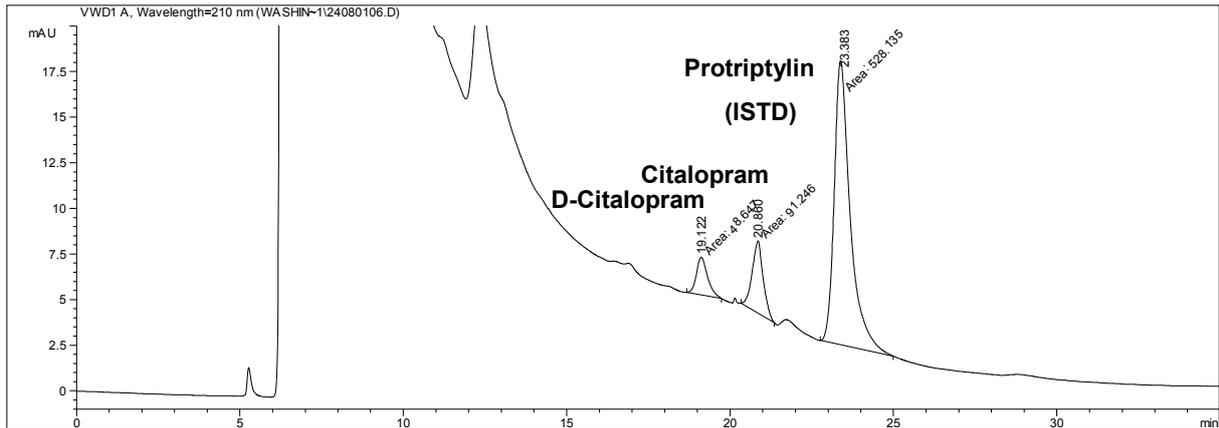
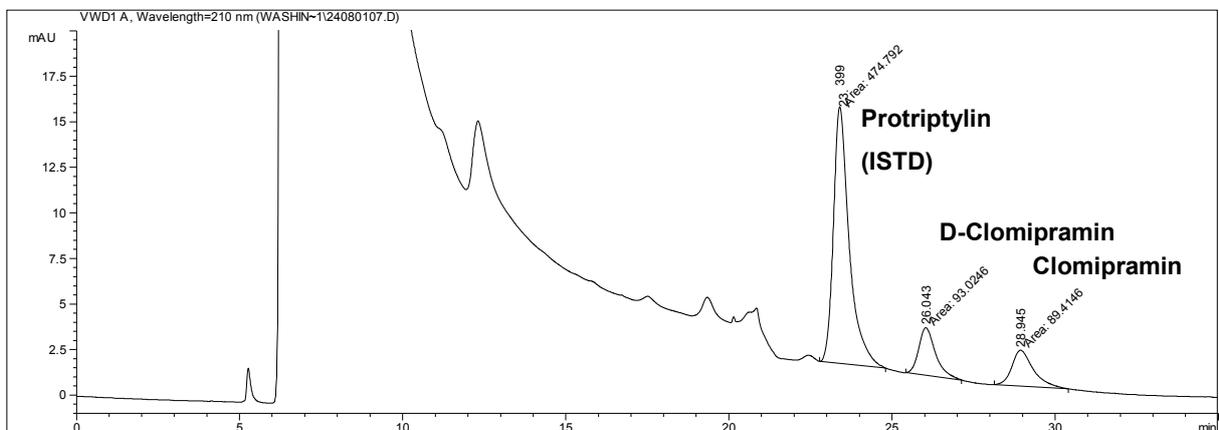


Abbildung 24: Chromatogramm eines Patientenserums mit 165 ng/ml N-Desmethylvenlafaxin und 230 ng/ml Venlafaxin. Der Patient wurde mit 300 mg Venlafaxin pro Tag behandelt.



**Abbildung 25: Chromatogramm eines Patientenserums mit 115 g/ml N-Desmethylcitalopram und 256 ng/ml Citalopram. Der Patient wurde mit 40 mg Citalopram pro Tag behandelt.**



**Abbildung 26: Chromatogramm eines Patientenserums mit 333 g/ml N-Desmethylclomipramin und 295 ng/ml Clomipramin. Der Patient wurde mit 150 mg Clomipramin pro Tag behandelt.**

Mit der hier beschriebenen Methode konnten 20 verschiedene Psychopharmaka einschließlich ihrer Metabolite quantitativ erfasst werden. Die Analysenzeit betrug maximal 30 Minuten. Die Vorsäule wurde nach 150 Injektionen (entspricht einem Volumen von 15 ml Plasma) ausgewechselt. Die analytische Säule konnte mit mehr als 300 Plasmainjektionen belastet werden, bevor sie ausgetauscht werden musste. Um eine ausreichende Sensivität und Selektivität zu erzielen, mussten die 20 Substanzen und ihre Metabolite in verschiedenen Gruppen, je nach verwendeter Wellenlänge und internem Standard eingeteilt werden. Mit dieser hohen Anzahl an unterschiedlichen Substanzen war die Grenze der Leistungsfähigkeit eines variablen Wellenlängendetektors erreicht.

Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht validiert.

#### 4.2.2 Entwicklung und Validierung einer HPLC-UV-Methode zur Bestimmung von Clozapin, Olanzapin, Perazin und Quetiapin

Das zweite Verfahren, das potenziell als „Multi“-HPLC-UV-Methode für Antipsychotika und Antidepressiva geeignet erschien, war die von Weigmann et al. [72] entwickelte HPLC mit Säulenschaltung.

Tabelle 27: Methodenparameter nach Weigmann et al. [72] im Überblick

<b>Vorsäule</b>	Hypersil CN 10 µm 10x4.0 mm ict-Homburg
<b>analytische Säule</b>	Hypersil ODS 5 µm 250 x 4.6 mm MZ Analysentechnik
<b>Anreicherungs-eluent</b>	1 % Acetat-Puffer (täglich frisch zubereiten)
<b>analytischer Eluent</b>	37.5 % (V:V) Acetonitril 0.4 % TEMED mit Essigsäure auf pH 6.5 eingestellt
<b>interner Standard</b>	Fluperlapin
<b>Analysenzeit (min)</b>	25
<b>Fluss (ml/min)</b>	1.5
<b>Temperatur (°C)</b>	25
<b>Wellenlänge (nm)</b>	254

Beschrieben ist für die Methode von Weigmann und Mitarbeitern [72] der Nachweis von Clozapin, D-Clozapin und Olanzapin.

Eigene Messungen deckten einige Schwachpunkte auf bezüglich Stabilität der Methode und Anwendbarkeit auf weitere Psychopharmaka:

Der Anreicherungs-eluent muss, aufgrund der fehlenden Konservierung, täglich frisch zubereitet werden.

Der Druck auf der Anreicherungs-säule stieg nach Injektion von nur 20 Plasmaproben auf über 350 bar an, was einen Austausch der Säule erforderlich machte. Anschließend war die Equilibrierung einer neuen Säule notwendig, bevor das System wieder messbereit war.

Das Antipsychotikum Quetiapin war mit dieser Methode nicht nachweisbar.

Nach einigen Testläufen konnten diese Probleme wie folgt, gelöst werden:

Der Anreicherungs-eluent wurde auf 8 % Acetonitril in Wasser umgestellt. Acetonitril unterdrückt das Wachstum von Mikroorganismen, und der Eluent musste daher nicht mehr täglich frisch angesetzt werden.

Aufbauen auf den Vorversuchen hatten sich bereits die positiven Eigenschaften der C8-Anreicherungs-säule (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) gezeigt. Der Druck blieb auch nach Injektion von mehr als 150 Plasmaproben stabil.

Bezüglich der potenziellen Anwendbarkeit der Methode auf möglichst viele Psychopharmaka wurden 53 verschiedene Substanzen analysiert. Wie Tabelle 28 zeigt, konnten mit dieser Methode nicht nur etwa 40 Antidepressiva und Antipsychotika, sondern auch noch andere Psychopharmaka, wie Benzodiazepine oder Antidementiva, nachgewiesen werden.

**Tabelle 28: Retentionszeiten und Signalstärken von Psychopharmaka, die mit der modifizierten Methode von Weigmann und Mitarbeitern [72] durch HPLC mit Säulenschaltung und UV-Detektion analysiert wurden.**

Substanz	Retentionszeit (min)	Peakhöhe (mAU)	Konzentration (ng/ml)	relative Höhe ( $\mu$ AU/ ng)
N-Desmethylperazin	n.d.	n.d.	1000	n.d.
O-Desmethylvenlafaxin	n.d.	n.d.	1160	n.d.
N-Desmethylsertralin	n.d.	n.d.	1074	n.d.
Pimozid	n.d.	n.d.	1050	n.d.
Sertindol	n.d.	n.d.	1070	n.d.
Sulpirid	n.d.	n.d.	1120	n.d.
Tianeptin	n.d.	n.d.	1010	n.d.
Amisulprid	7.36	5.6	500	11.20
Tacrin	7.76	10.3	1000	10.30
9-Hydroxyrisperidon	8.01	11.6	1250	9.28
Pantoprazol	8.16	2.6	4000	0.65
N-Desmethylvenlafaxin	8.24	0.7	1000	0.70
Venlafaxin	8.64	1.0	1030	0.97
Risperidon	8.74	8.9	1160	7.67
Carbamazeine-10,11-epoxid	8.84	3.4	5000	0.68
<b>Olanzapin</b>	<b>9.16</b>	<b>0.9</b>	<b>40</b>	<b>22.25</b>
Dipiperon	9.25	3.3	250	13.20
Melperon	9.37	9.5	1000	9.50
Donepezil	10.33	4.0	1020	3.92
N-Desmethylcitalopram	10.38	1.3	200	6.50
<b>N-Desmethylclozapin</b>	<b>10.40</b>	<b>3.5</b>	<b>250</b>	<b>14.00</b>
Oxazepam	10.59	85.2	1110	76.76
Pipamperon	10.71	0.7	400	1.83
reduziertes Haloperidol	10.81	0.4	5200	0.08
Carbamazepin	10.9	112.9	5000	22.6
Citalopram	10.99	1.3	200	6.50
Reboxetin	11.15	1.1	1086	1.01
Spiperon	11.42	7.5	1120	6.70
N-Desmethyldoxepin	11.61	7.1	1048	6.77
Lorazepam	12.94	8.5	500	17.00
Doxepin	12.36	7.7	1020	7.55
<b>Clozapin</b>	<b>13.15</b>	<b>7.6</b>	<b>570</b>	<b>13.33</b>
Sertralin	13.34	0.3	1145	0.28
Haloperidol	13.44	37.6	5250	7.16
Temazepam	13.78	25.4	1000	25.40
<b>Quetiapin</b>	<b>13.86</b>	<b>0.9</b>	<b>80</b>	<b>11.25</b>
Paroxetin	14.24	0.5	1020	0.56
<b>Fluperlapin (ISTD)</b>	<b>15.57</b>			
Desipramin	15.65	0.8	200	4.05
Domperidon	16.13	3.8	1000	3.80
N-Desmethyldiazepam	16.30	29.4	1250	23.52
Protriptylin	16.40	1.5	1150	1.30
Imipramin	16.75	1.4	200	7.00
Fluvoxamin	17.09	1.0	300	3.33
N-Desmethylmaprotilin	17.27	0.1	1420	0.08
N-Desmethylfluoxetin	17.83	0.2	1030	0.26
Nortriptylin	18.18	2.6	905	2.87
Maprotilin	18.45	0.3	1600	0.24
N-Desmethyltrimipramin	18.48	0.5	200	2.90
<b>Perazin</b>	<b>19.57</b>	<b>0.8</b>	<b>160</b>	<b>5.19</b>
Amitriptylin	19.75	4.4	900	4.89
Ziprasidon	19.87	0.7	200	3.65
Fluoxetin	20.09	0.3	1000	0.37
Trimipramin	21.09	0.9	200	4.75
N-Desmethylclomipramin	23.26	2.8	1000	2.80
Perphenazin	23.30	3.0	1230	2.44
Diazepam	23.06	16.3	1000	16.32
Clomipramin	26.15	3.3	1040	3.17
Zotepin	33.01	0.2	1050	0.25

*n.d. = zwischen 0 und 25 Minuten nicht detektierbar. Interferenzen sind grau schattiert.*

Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Methode wurden mit den vier Antipsychotika Clozapin (plus seinem Metaboliten N-Desmethyclozapin), Quetiapin und Perazin durchgeführt. Fluperlapin wurde als interner Standard verwendet.

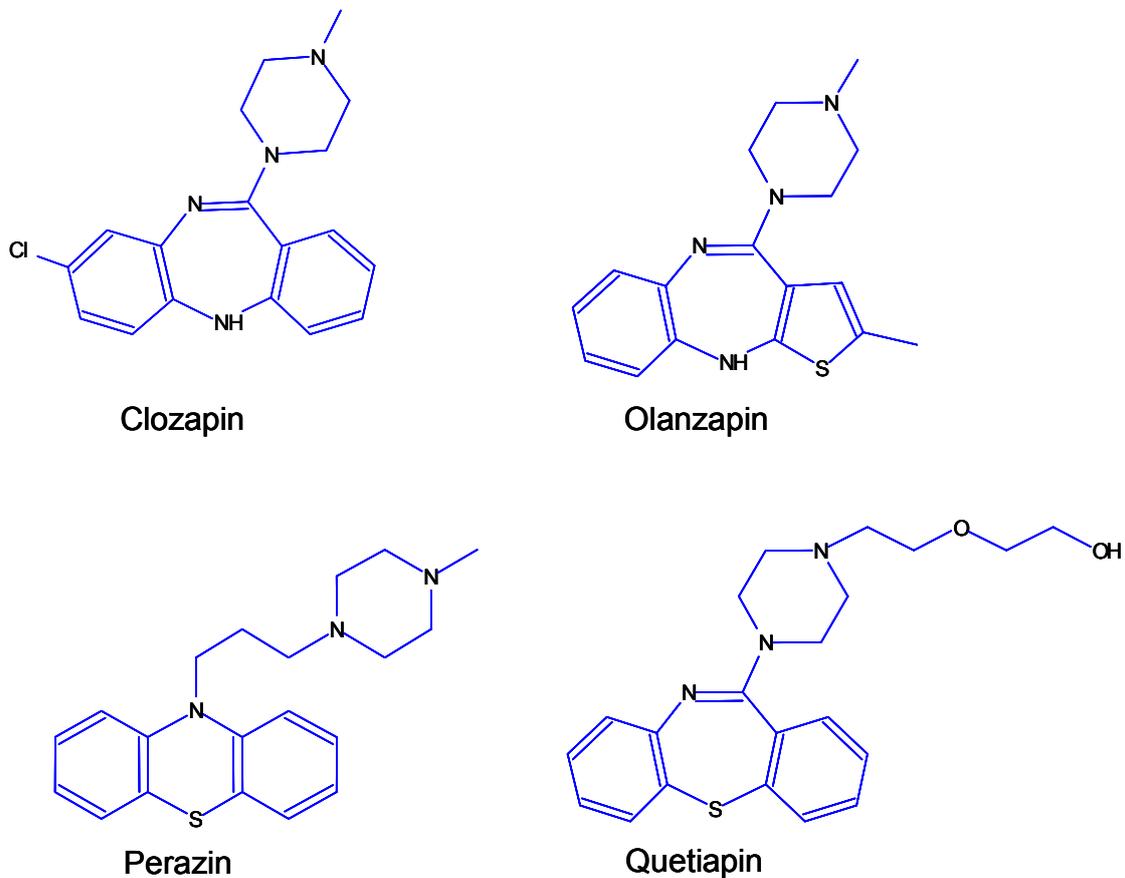


Abbildung 27: Formeln von Clozapin, Olanzapin, Perazin und Quetiapin

#### Probenvorbereitung und Probenstabilität

Um die Alltagstauglichkeit der entwickelten Methode zu beweisen, wurden bereits während der Validierung und auch danach, Proben von Patienten gemessen, die mit dem jeweiligen Arzneistoff behandelt worden waren.

Die Blutentnahme erfolgte nüchtern und mindestens 12 Stunden nach der letzten Medikamenteneinnahme. Die Dosis der Medikation sollte seit 7 Tagen stabil sein, da 5 Halbwertszeiten für das Erreichen des „steady state“ als erforderlich gelten. Verwendet wurde entweder eine Serummonovette ohne Zusätze oder aber das durch Zugabe von EDTA oder Heparin gewonnene Plasma.

Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4000 g und 10 °C wurde das Serum bzw. Plasma entweder direkt analysiert oder bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben bei 1500 g für 5 Minuten zentrifugiert und dann in den Autosampler gestellt.

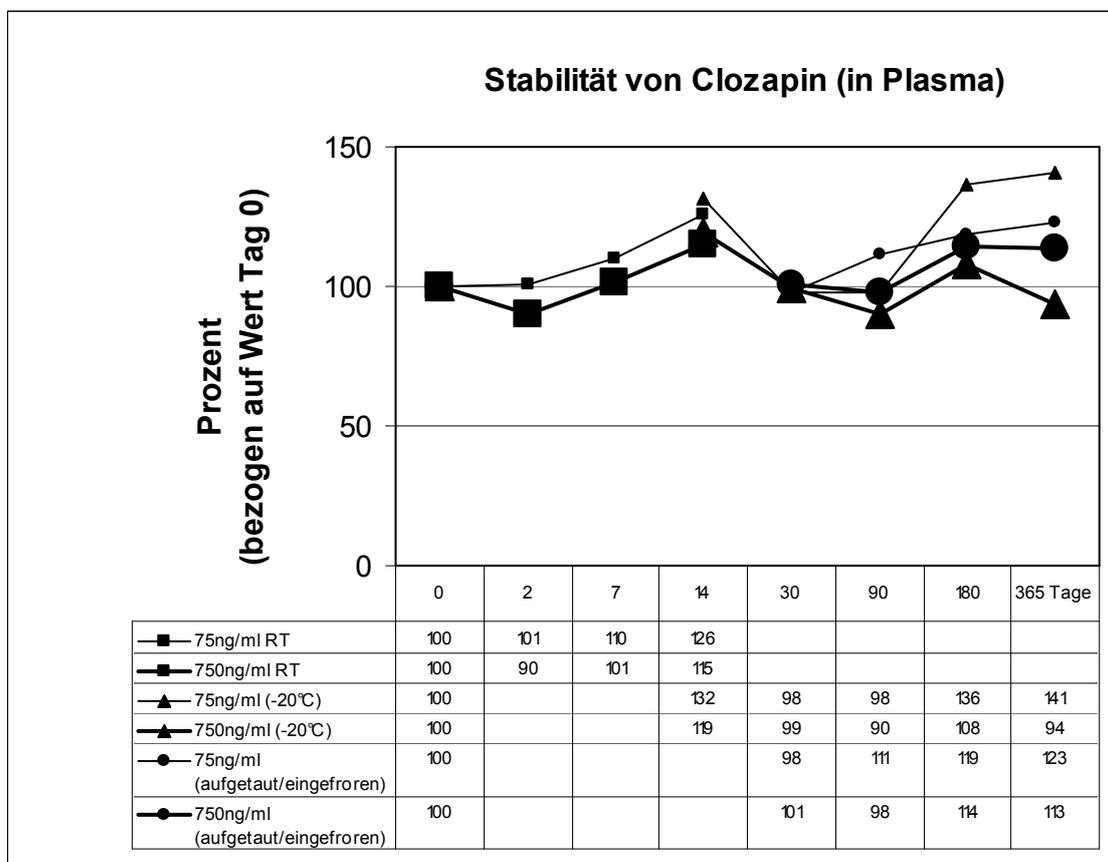
Proben konnten so über mehrere Monate, ohne nennenswerte Veränderungen in der Konzentration des zu untersuchenden Parameters, gelagert werden.

Um dies zu beweisen, wurden Proben von Amisulprid, Clozapin, Reboxetin, Sertralin, Quetiapin und Venlafaxin unter verschiedenen Bedingungen gelagert und in unterschiedlichen Zeitintervallen gemessen. Gewählt wurden jeweils eine niedrige und eine hohe Konzentration der jeweiligen Substanz.

Ein Teil der Proben wurde bei Raumtemperatur gelagert. Die Messung erfolgte zu Beginn des Versuches am Tag 0, nach 2 Tagen, nach einer und nach zwei Wochen. Der andere Teil der Proben wurde bei -20 °C eingefroren. Von diesen Proben wurde die Hälfte wiederholt aufgetaut und eingefroren, während die andere Hälfte nur einmal eingefroren und nur einmal aufgetaut wurde.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte wie in Abbildung 28 zu sehen ist, nach zwei Wochen sowie nach 1, 3, 6 und 12 Monaten.

Für Olanzapin zeigte sich, dass es bei einer Lagerung bei Raumtemperatur innerhalb von 7 Tagen zu einer deutlichen Veränderung in der messbaren Konzentration kam. Die gefundenen Werte waren um 54 % abgesunken. Lagerte man Olanzapin dagegen für drei Monate bei -20 °C, veränderte sich der gefundene Wert nur um -2 %. Für Clozapin fand sich nach drei Monaten Lagerung bei -20 °C ebenfalls nur eine Differenz von 2 % für die niedrigere und 10 % für die höhere Konzentration [73].



**Abbildung 28: Stabilität von Clozapin**

Mit diesem Versuch konnte bewiesen werden, dass die Lagerung einer Probe über einen längeren Zeitraum bei -20 °C bis zur Messung ohne Veränderung in der Konzentration möglich ist. Auf eine Aufbewahrung bei Raumtemperatur sollte verzichtet werden.

## Validierung

### Präzision (EP 5T2)

Für die Bestimmung der Präzision wurden anhand der therapeutischen Bereiche der zu validierenden Arzneistoffe, drei verschiedene Konzentrationen festgelegt (siehe Tabelle 29):

**Tabelle 28: Für die Bestimmung der Präzision festgelegte Konzentrationen**

<b>Arzneistoff</b>	<b>therapeutischer Bereich (ng/ml)</b>	<b>niedrig (ng/ml)</b>	<b>mittel (ng/ml)</b>	<b>hoch (ng/ml)</b>
Clozapin	350-600	200	400	600
N-Desmethylozapin		125	250	375
Olanzapin	20-80	20	40	80
Quetiapin	40-170	20	80	170
Perazin	100-230	80	160	230

Nach einem festen Schema wurden die Proben abgemessen. Das Schema sah wie folgt aus:

1. Leerplasma
2. mittel (= Kalibrator)
3. niedrig (= Kontrolle)
4. hoch (= Kontrolle)
5. niedrig
6. mittel
7. hoch
8. hoch
9. mittel
10. niedrig
11. Patientenprobe
12. Patientenprobe

Pause von 60 Minuten

13. Leerplasma
14. mittel (= Kalibrator)
15. niedrig (= Kontrolle)
16. hoch (= Kontrolle)
17. niedrig
18. mittel
19. hoch
20. hoch
21. mittel
22. niedrig
23. Patientenprobe
24. Patientenprobe

Nach der 24. Probe folgte wieder eine Pause von 60 Minuten. Danach wurden erneut 24 Proben nach diesem Schema abgearbeitet. So wurden an 20 Tagen 960 Proben gemessen. Daraus ließ sich die Präzision über den Variationskoeffizienten (VK %) von Tag zu Tag, aber auch innerhalb eines Tages ermitteln.

In Tabelle 30 wurden alle Ergebnisse aus der über 20 Tage dauernden Bestimmung der Präzision zusammengefasst.

**Tabelle 30: Variationskoeffizienten (VK %) für die Bestimmung der Präzision von Clozapin, N-Desmethylozapin, Olanzapin, Quetiapin und Perazin**

Clozapin	Variationskoeffizient (%)		
	200 ng/ml	400 ng/ml	600 ng/ml
Intraassay	2.46	3.04	3.13
Interassay	2.77	1.33	1.98
Präzision von Tag zu Tag	1.95	2.66	2.59
Gesamtpräzision	4.19	4.25	4.52

N-Desmethylozapin	Variationskoeffizient (%)		
	125 ng/ml	250 ng/ml	375 ng/ml
Intraassay	2.33	3.17	3.18
Interassay	2.71	1.97	2.26
Präzision von Tag zu Tag	1.17	2.1	1.68
Gesamtpräzision	3.76	4.28	4.24

Olanzapin	Variationskoeffizient (%)		
	20 ng/ml	40 ng/ml	80 ng/ml
Intraassay	2.87	3.16	3.14
Interassay	3.04	3.18	4.23
Präzision von Tag zu Tag	5.6	2.06	5.52
Gesamtpräzision	6.98	4.94	7.64

Quetiapin	Variationskoeffizient (%)		
	20 ng/ml	80 ng/ml	170 ng/ml
Intraassay	3.55	2.46	4.67
Interassay	2.72	2.1	3.28
Präzision von Tag zu Tag	3.52	1.19	1.07
Gesamtpräzision	5.69	3.45	5.61

Perazin	Variationskoeffizient (%)		
	80 ng/ml	160 ng/ml	230 ng/ml
Intraassay	3.85	2.6	4.62
Interassay	2.02	1.99	3.3
Präzision von Tag zu Tag	2.73	2.08	0.77
Gesamtpräzision	5.14	3.89	5.73

Die Variationskoeffizienten schwankten zwischen 0.77 und 7.64 %. Sie lagen jedoch alle unter 10 %. Damit war die Präzision der Methode ausreichend für die Anwendung am Patienten [74].

#### Linearität

Für die Bestimmung der Linearität wurde von jedem zu validierenden Neuroleptikum eine niedrige (A) und eine hohe (B) Konzentration hergestellt (siehe Tabelle 31).

**Tabelle 29: Konzentration A und B zur Bestimmung der Linearität**

Substanz	niedrig = A (ng/ml)	hoch = B (ng/ml)
Clozapin	105	1260
N-Desmethylozapin	100	1210
Olanzapin	10	170
Quetiapin	20	370
Perazin	50	460

Die beiden Konzentrationen A und B wurden wie folgt, vermischt (siehe Tabelle 32):

**Tabelle 30: Mischungsverhältnis der Konzentrationen A und B**

Konzentration	% von A (= niedrig)	% von B (= hoch)
1	0	100
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0

Diese 5 Mischungen wurden 4x hintereinander bestimmt. Inklusive Leerplasma und Kalibrator wurden so 110 Proben gemessen. Der Korrelationskoeffizient diente als Maß für die Linearität und damit auch für die Qualität des analytischen Verfahrens. Die Summe der Quadrate der vertikalen Abweichungen der empirischen y-Werte von der geschätzten Gerade sollte minimal sein [75]. Als weitere Kenngröße der Linearität wurde der Ordinaten Schnittpunkt der Geraden bestimmt, der sich möglichst nahe am Ursprung befinden sollte. Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die vorliegende Methode über den gesamten Messbereich und darüber hinaus linear war. Die „Equality of Variance“ (Cochrans-Test,  $p=0.01$ ) sowie die Anpassung an das lineare Modell (f-Test,  $p=0.01$ ) wurden erfüllt. Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) lagen zwischen 0.9765 und 0.9816 (siehe Tabelle 33). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (= b) befand sich in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes (-0.0248 bis -0.3847).

**Tabelle 31: Korrelationskoeffizienten  $R^2$  für die Bestimmung der Linearität von Clozapin, N-Desmethylozapin, Olanzapin, Quetiapin und Perazin**

	$R^2$	( $y = a \cdot x + b$ )
Clozapin	$\geq 0.978$	$y = 0.4314 x - 0.3847$
N-Desmethylozapin	$\geq 0.9793$	$y = 0.4655 x - 0.4899$
Olanzapin	$\geq 0.9807$	$y = 0.1153 x - 0.1745$
Quetiapin	$\geq 0.9816$	$y = 0.0949 x - 0.1014$
Perazin	$\geq 0.9765$	$y = 0.0337 x - 0.0248$

#### Absolute und analytische Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden von jeder Substanz vier Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 34), die dann jeweils viermal hintereinander gemessen wurden.

**Tabelle 32: Übersicht der für die Bestimmung der absoluten und analytischen Wiederfindung hergestellten Konzentrationen**

Substanz	Konzentration A (ng/ml)	Konzentration B (ng/ml)	Konzentration C (ng/ml)	Konzentration D (ng/ml)
Clozapin	105	370	630	1260
N-Desmethylozapin	100	350	605	1210
Olanzapin	10	20	85	170
Quetiapin	20	45	185	370
Perazin	50	100	230	460

Die Proben zur Bestimmung der absoluten Wiederfindung wurden nicht in Plasma, sondern mit analytischem Eluent hergestellt und konnten so direkt unter Umgehung der Anreicherungssäule auf die analytische Säule injiziert werden. Die aus dieser Messung resultierenden Höhen wurden als 100 % bewertet. Die Plasmaproben wurden ganz normal mit Säulenschaltung gemessen. Der Quotient aus der Höhe der mit Säulenschaltung gemessenen Peaks durch die Höhe der mit Direktinjektion gemessenen Peaks, mit 100 multipliziert, ergab die Wiederfindungsrate in Prozent. Die analytische Wiederfindung ergab sich durch Vergleich der theoretisch in der Probe vorhandenen Konzentration mit der in der Probe gemessenen. Der Quotient aus der Höhe der mit Direktinjektion gemessenen Peaks durch die Höhe der mit Säulenschaltung gemessenen Peaks, mit 100 multipliziert ergab die absolute Wiederfindungsrate in Prozent.

Die analytische Wiederfindung in Prozent ergab sich aus dem Quotienten der in der Probe gemessenen Konzentration mit der theoretisch in der Probe vorhandenen multipliziert mit 100. Tabelle 35 zeigt alle Ergebnisse in der Übersicht.

**Tabelle 33: Ergebnisse der absoluten und analytischen Wiederfindung**

<b>Substanz</b>	<b>absolute Wiederfindung</b>	<b>analytische Wiederfindung</b>
<b>Clozapin</b>	85-122 % (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 103±16%)	95-105% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 98±3%)
<b>N-Desmethylclozapin</b>	95-126% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 111±13%)	93-105% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 99±5%)
<b>Olanzapin</b>	83-138% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 103±17%)	91-111% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 103±6%)
<b>Quetiapin</b>	90-138% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 118±17%)	87-138% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 110±14%)
<b>Perazin</b>	76-133% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 104±18%)	103-123% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 112±6%)

<sup>1</sup>MW = Mittelwert

<sup>2</sup>SD = Standardabweichung

#### Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde nicht analytisch bestimmt, sondern festgelegt (siehe Tabelle 36) und zwar wurden 50% der Konzentration veranschlagt, die als niedrigster Blutspiegel bei der jeweiligen Substanz erwartet werden kann.

**Tabelle 34: Konzentrationen zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>
Clozapin	50
N-Desmethylclozapin	50
Olanzapin	5
Quetiapin	10
Perazin	25

Der Variationskoeffizient (VK %) durfte bei wiederholter (n= 10) Messung nicht größer als 10 % sein.

Die Variationskoeffizienten (VK%) lagen für alle Substanzen unter 5% (siehe Tabelle 37), d.h. mit diesen Konzentrationen ist die eigentliche untere Nachweisgrenze noch lange nicht erreicht. Für das TDM in der klinischen Routine sind solch niedrigen Konzentrationen allerdings uninteressant. Entweder ist der Patient nicht compliant, oder er hat einen zu schnellen Metabolismus, um ausreichende Plasmaspiegel aufzubauen.

**Tabelle 35: Bestimmung der unteren Nachweisgrenze**

Substanz	Konzentration (ng/ml)	Variationskoeffizient (VK%)
Clozapin	50	2.0
N-Desmethylozapin	50	2.4
Olanzapin	5	3.5
Quetiapin	10	1.4
Perazin	25	3.9

Interferenzen

Triglyceride

Um den möglicherweise bestehenden Einfluss von lipämischen Proben auf die Methode zu dokumentieren, wurden von jeder Substanz drei Konzentrationen aus Leerplasma hergestellt, die jeweils mit fünf unterschiedlichen Mengen an Triglyceriden versetzt wurden. Die lipämischen Plasmen wurden in Anlehnung an die in „Interferences Testing in Clinical Chemistry, Anhang B (NCCLS Document EP7-P)“ hergestellt. Hierzu wurde Plasma durch Ultrafiltration auf 70% seines Volumens eingengt und anschließend mit einer kommerziell erhältlichen 20%igen Triglyceridemulsion zur Infusion wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Dies entspricht dann einem Plasma mit 6000 mg/dl Triglyceriden. Dies wurde dann mit Normalplasma (Octoplas) zu weiteren Lipidgehalten verdünnt.

**Tabelle 38: Konzentration der zu validierenden Substanzen bei dem Versuch zur Bestimmung einer möglichen Interferenz durch Triglyceride**

Substanz	Konzentration A (ng/ml)	Konzentration B (ng/ml)	Konzentration C (ng/ml)
Clozapin	100	600	1200
N-Desmethylozapin	100	600	1200
Olanzapin	20	80	160
Quetiapin	20	170	230
Perazin	50	230	460

Die Konzentrationsreihe der Triglyceride begann mit der nativ im Plasma vorliegenden Menge (70 mg/dl) und steigerte sich dann durch Zusatz von Intralipid Lösung von 370 auf 670 über 1570 bis 4570 mg/dl. Die Messung wurde zweimal durchgeführt. Der Triglyceridgehalt hatte nur einen geringen Einfluss auf die Analyse. Ab einer Triglycerid-Konzentration von  $\geq 1570$  mg/dl reduzierten sich die gefundenen Konzentrationen von Clozapin ( $70 \pm 10\%$ ), N-Desmethylozapin ( $85 \pm 8\%$ ) und Perazin ( $61 \pm 11\%$ ). Der Effekt war bei Quetiapin ( $87 \pm 7\%$ ) und Olanzapin ( $99 \pm 9\%$ ) nicht so stark. Ein Grund für die niedrigeren Clozapin- und Perazin-Werte könnte die Abtrennung der mit Triglyceriden durchsetzten fettigen Phase vom Plasma bzw. Serum durch Zentrifugation vor der Aufgabe auf das HPLC-System sein. Nach der Zentrifugation wurde der fettige Überstand dekantiert und mit ihm eventuell darin gelöste Substanzen. Ein Verzicht auf das Abtrennen der fettigen Phase zum Schutz der Säule könnte dieses Problem beheben. Bei physiologischen Triglyceridkonzentrationen besteht dieses Problem nicht, erst bei pathologischen Werten (Grenze 528 mg/dl).

**Tabelle 36: physiologisch unbedenkliche Triglyceridkonzentrationen**

<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Konzentration (mg/dl)</b>
Frauen	30-60	44-185
Männer	30-60	40-250

### Hämoglobin

Um die Frage zu klären, ob die Methode auch in der Lage ist, hämolytisches Plasma ohne Fehler zu messen, wurde in die Proben Hämoglobin in einer Konzentration von 1 und 5% gegeben. Die Messung wurde zweimal durchgeführt.

Weder bei einer Konzentration von 1% noch von 5% Hämoglobin konnte ein Unterschied zu einem nicht-hämolytischem Plasma gefunden werden. Bei einer Konzentration von 1 % Hämoglobin lagen die gefundenen Werte bei 97-100% eines normalen Leerplasmas. Bei einem Anteil von 5% Hämoglobin schwankten die gefundenen Werte von 84-102% um die im normalen Leerplasma.

### Bilirubin

Eine erhöhte Konzentration an Bilirubin im Blut könnte ebenfalls die ermittelten Werte verfälschen. Um dies zu untersuchen, wurden zu einer niedrigen und einer hohen Konzentration der zu validierenden Substanzen (Clozapin 105 und 1260 ng/ml, N-Desmethylozapin 100 und 1210 ng/ml, Olanzapin 10 und 170 ng/ml, Quetiapin 20 und 370 ng/ml, Perazin 50 und 460 ng/ml), fünf verschiedene Konzentrationen an Bilirubin gegeben (0/5/10/15/20 mg/dl Bilirubin). Die Messung wurde zweimal durchgeführt.

Es konnte kein Unterschied ausgemacht werden, zwischen Proben mit einem Zusatz an Bilirubin und Proben ohne Zusatz an Bilirubin. Die Tabelle 40 zeigt die Schwankungen der mit Bilirubin versetzten Proben im Vergleich zu Proben ohne Bilirubinzusatz.

**Tabelle 37: Schwankungen der mit Bilirubin versetzten Proben**

<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	<b>Vergleich (MW±SD)</b>
5	101±3%
10	102±5%
15	101±4%
20	100±3%

Als physiologisch gilt eine Bilirubinkonzentration von bis zu 1.1 mg/dl. Als Alarmgrenze gelten Konzentrationen von <0.3 mg/dl bzw. >11.42 mg/dl.

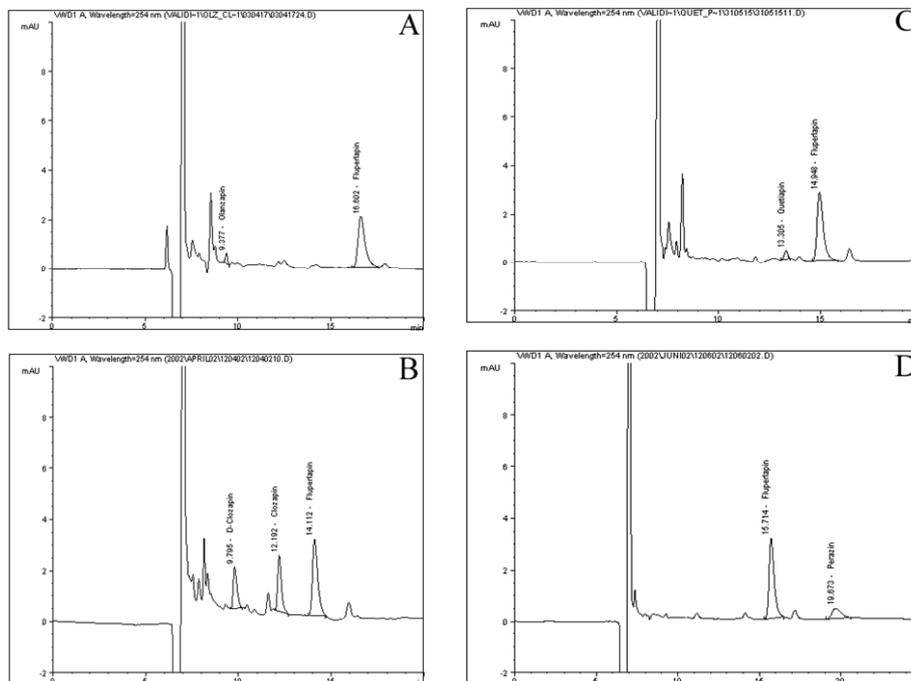
### Interferenzen durch andere Arzneimittel

Mögliche Interferenzen durch andere Arzneistoffe zeigt Tabelle 28. Für den Nachweis der 4 Neuroleptika wurde eine Interferenz von Oxazepam (RT 10.6 min) und N-Desmethylozapin (RT 10.3) mit N-Desmethylozapin (RT 10.4 min) und eine Interferenz von Temazepam (RT 13.8 min) mit Quetiapin (RT 13.9 min). Daran sollte bei einer möglichen Kombination beider Arzneistoffe gedacht werden.

## Anwendung der Methode

Die Methode eignet sich für die Analyse von Serum von Patienten.

Die in Abbildung 29 gezeigten Chromatogramme stammen von schizophrenen Patienten, die mit Olanzapin, Clozapin, Quetiapin oder Perazin behandelt wurden.



**Abbildung 29:** Chromatogramme von Patienten, die mit einer täglichen Dosis von (A) 20 mg Olanzapin, (B) 250 mg Clozapin, (C) 175 mg Quetiapin und (D) 200 mg Perazin behandelt wurden. Die gemessenen Konzentrationen waren 21 ng/ml für Olanzapin, 126 ng/ml für Clozapin, 132 ng/ml für N-Desmethylolanzapin, 42 ng/ml für Quetiapin und 59 ng/ml für Perazin.

Mit der hier vorgestellten HPLC-UV-Methode war es möglich Clozapin, Olanzapin, Quetiapin und Perazin innerhalb von 25 Minuten zu bestimmen.

### 4.2.3 Erweiterung der HPLC-UV-Methode um Ziprasidon (Zeldox<sup>®</sup>)

Im Mai 2002 wurde Ziprasidon (siehe Abbildung 30) in Deutschland zugelassen.

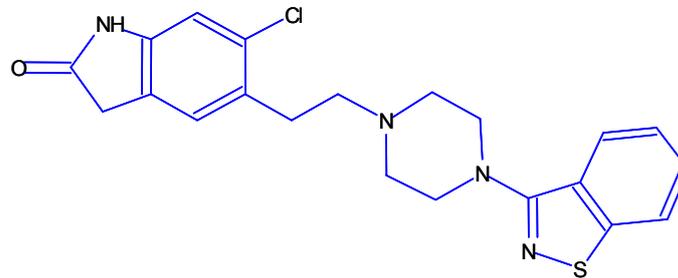


Abbildung 30: Formel von Ziprasidon (Zeldox<sup>®</sup>)

Bereits kurz danach kamen die ersten Anfragen, ob eine Blutspiegelbestimmung möglich sei. Zwei Methoden wurden bisher veröffentlicht, um diesen Wirkstoff in Serum oder Plasma zu messen. Die erste aus dem Jahr 1995 arbeitet mit einer offline-Extraktion als Probenvorbereitung, was sich in der Routine als zu aufwendig darstellt [76]. Bei der später veröffentlichten Methode findet ein Massenspektrometer als Detektor Einsatz, was allerdings aufgrund der hohen Anschaffungskosten nicht in jedem Labor zur Verfügung steht [77].

Durch eine geringfügige Variation der HPLC-UV-Methode war es möglich, Ziprasidon (Zeldox<sup>®</sup>) zu erfassen. Der einzige Parameter der verändert wurde, war der Acetonitrilgehalt des analytischen Eluenten. Er wurde von 37.5% auf 50% erhöht. Die Analysenzeit verkürzte sich auf 20 Minuten.

Die Validierung von Ziprasidon erfolgte auch nach den NCCLS (= National Committee for Clinical Laboratory Standards)-Richtlinien [68]. Ermittelt wurden die Präzision, die Linearität, die absolute und analytische Wiederfindung, die untere Nachweisgrenze, sowie Interferenzen, verursacht durch andere Arzneimittel. Da zum Zeitpunkt der Validierung noch keine Erfahrungen über die im Patienten aufgebauten Blutspiegel vorlagen, mussten erste Informationen aus im Labor gemessenen Proben als Orientierung dienen.

Validierung

Präzision, Linearität und analytische Wiederfindung

Präzision

Die Bestimmung der Präzision erfolgte im Falle des Ziprasidons nicht über 20 Tage, sondern nur über 5. Der Ablauf war aber ansonsten ähnlich.

Es wurden für die Kalibriergerade 5 Kalibratoren eingesetzt mit einer Konzentration von: 20, 50, 150, 300 und 600 ng/ml.

Die Kontrollen hatten folgende Konzentrationen: 25 (niedrig), 75 (mittel) und 200 (hoch) ng/ml.

Das Schema sah wie folgt aus:

1. Leerplasma
2. Kalibrator 1
3. Kalibrator 2
4. hoch
5. niedrig
6. mittel
7. mittel
8. niedrig
9. niedrig
10. hoch
11. hoch
12. mittel
13. Kalibrator 3
14. Kalibrator 4
15. Kalibrator 5

Zweimal am Tag wurden Proben in dieser Reihenfolge gemessen. Dazwischen lag eine Pause von 60 Minuten. Damit ließen sich die Präzision, die Linearität und die analytische Wiederfindung ermitteln.

In Tabelle 41 wurden alle Ergebnisse der 5 Tage dauernden Messung der Präzision zusammengefasst.

**Tabelle 38: Variationskoeffizienten (VK %) für die Bestimmung der Präzision von Ziprasidon**

<b>Ziprasidon (VK's %)</b>	<b>niedrig (25 ng/ml)</b>	<b>mittel (75 ng/ml)</b>	<b>hoch (200 ng/ml)</b>
Intraassay	4.40	3.50	2.93
Interassay	0.24	0.62	1.68
Präzision von Tag zu Tag	5.78	3.40	3.65
Gesamtpräzision	6.06	3.37	3.73

Die Variationskoeffizienten schwankten zwischen 0.24 und 6.06 %. Damit war eine ausreichende Präzision der Methode bewiesen [74].

#### Linearität

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die vorliegende Methode über den gesamten Messbereich (20-600 ng/ml) und darüber hinaus linear war. Der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) lag bei 0.999. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (= b) befand sich in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes (-0.023).

$$R^2 \geq 0.999 \quad y = a \cdot x + b$$

$$y = 0.004 x - 0.023$$

## Analytische Wiederfindung

Die analytische Wiederfindung wurde berechnet durch Vergleich der gemessenen Konzentration mit der theoretisch enthaltenen Menge (25, 75 und 200 ng/ml) an Ziprasidon.  $MW \pm SD$  für die analytische Wiederfindung ergab: niedrig (25 ng/ml) =  $98 \pm 5\%$ , mittel (75 ng/ml) =  $99 \pm 2\%$  und hoch (200 ng/ml) =  $101 \pm 3\%$ .

## Absolute Wiederfindung

Die drei Konzentrationen niedrig (25 ng/ml), mittel (75 ng/ml) und hoch (200 ng/ml), die bereits bei der Ermittlung der Präzision zum Einsatz kamen, wurden einmal mit Wasser und dann mit Plasma verdünnt. Die wässrigen Proben konnten direkt auf die analytische Säule injiziert werden. Die aus dieser Messung resultierenden Höhen wurden als 100% bewertet. Die Plasmaproben wurden mit Säulenschaltung gemessen. Der Quotient aus der Höhe der mit Säulenschaltung gemessenen Peaks durch die Höhe der mit Direktinjektion gemessenen Peaks, mit 100 multipliziert, ergab die absolute Wiederfindung in Prozent.

Der Quotient aus der Höhe der mit Direktinjektion gemessenen Peaks durch die Höhe der mit Säulenschaltung gemessenen Peaks, mit 100 multipliziert, ergab die absolute Wiederfindungsrate in Prozent. Es ergaben sich folgende Werte:

niedrig (25 ng/ml) = 100%, mittel (75 ng/ml) = 99% und hoch (200 ng/ml) = 96%.

## Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde mit 10 ng/ml angenommen. Der Variationskoeffizient (VK %) durfte bei wiederholter (n= 10) Messung nicht größer als 10 % sein.

Der Variationskoeffizient (VK%) lag für Ziprasidon bei 3%, d.h. mit 10 ng/ml war die eigentliche untere Nachweisgrenze noch nicht erreicht.

## Interferenzen durch andere Arzneimittel

Gerade bei der Verwendung eines UV-Detektors kann es zu Interferenzen mit gleichzeitig verabreichten Arzneimitteln kommen, wenn sie zur gleichen Zeit eluiert werden und bei der gleichen Wellenlänge absorbieren. 42 verschiedene Substanzen wurden auf ein mögliches Interferenzpotential überprüft.

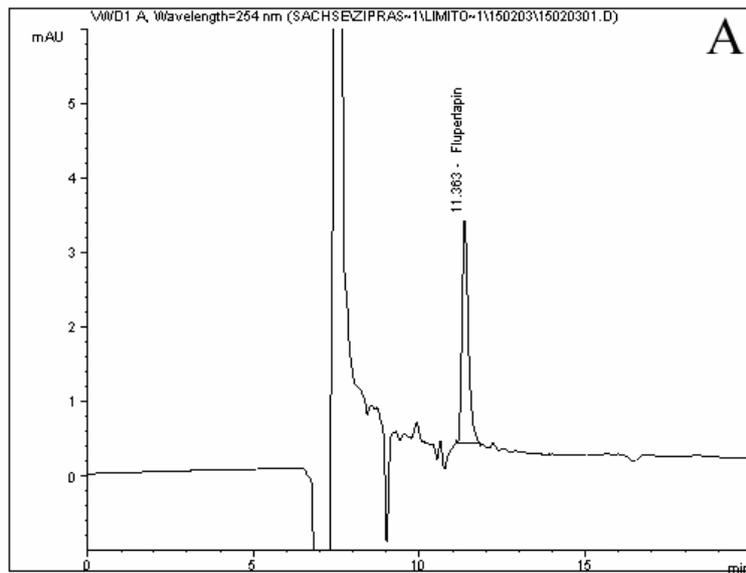
Die Ergebnisse zeigt Tabelle 42 im Überblick. Gefunden wurde eine Interferenz von Trimipramin (RT 11.8 min) und Clomipramin (RT 12.8). Auch werden Fluoxetin und N-Desmethyltrimipramin sehr dicht vor dem internen Standard Fluperlapin eluiert. Daran sollte bei einer möglichen Kombination dieser Arzneistoffe gedacht werden.

**Tabelle 39: Mögliche Interferenzen durch andere Arzneistoffe**

Substanz	Retentionszeit (min)	Peakhöhe (mAU)	Konzentration (ng/ml)	relative Höhe (mAU/100ng)
Perazin	n. d.	n.d.	1000	n.d.
O-Desmethylvenlafaxin	n. d.	n.d.	1160	n.d.
N-Desmethylsertralin	n.d.	n.d.	1074	n.d.
Sulpirid	n.d.	n.d.	1210	n.d.
Tianeptin	n.d.	n.d.	1010	n.d.
Amisulprid	n.d.	n.d.	500	n.d.
N-Desmethylvenlafaxin	n.d.	n.d.	1000	n.d.
9-Hydroxyrisperidon	7.63	29.8	1250	2.38
Risperidon	8.02	9.2	160	0.79
Venlafaxin	8.05	0.9	1030	0.09
Pipamperon	8.07	5.7	400	1.43
Olanzapin	8.29	4.2	100	4.20
N-Desmethylcitalopram	8.44	1.4	200	0.70
Melperon	8.45	10.2	1000	1.02
N-Desmethylozapin	8.49	3.6	100	3.60
Citalopram	8.69	1.5	250	0.60
Reboxetin	8.73	1.6	1086	0.15
N-Desmethyldoxepin	8.91	12.4	1048	1.18
Oxazepam	8.92	557.0	1110	50.18
Desipramin	9.93	2.7	200	1.35
Paroxetin	9.28	1.3	1020	0.13
Doxepin	9.31	12.3	1020	1.21
reduziertes Haloperidol	9.57	13.0	1000	1.30
Fluvoxamin	9.70	59.5	1000	5.95
N-Desmethylmaprotilin	9.76	0.6	1420	0.04
Quetiapin	9.80	1.8	100	1.80
Sertralin	9.84	0.5	1145	0.04
Clozapin	9.94	2.4	100	2.40
N-Desmethylfluoxetin	9.95	0.8	1030	0.07
Maprotilin	10.28	1.2	1600	0.08
Temazepam	10.29	33.1	1000	3.31
N-Desmethyldiazepam	10.30	297.2	1250	23.78
Imipramin	10.52	1.9	200	0.95
Nortriptylin	10.45	6.4	905	0.71
Fluoxetin	10.60	0.7	1000	0.07
N-Desmethyltrimipramin	10.64	0.7	200	0.36
<b>Fluperlapin (ISTD)</b>	<b>10.83</b>			
Amitriptylin	11.18	9.5	900	1.06
Perazin	11.25	2.4	100	2.40
N-Desmethylclomipramin	11.75	5.5	1000	0.55
Trimipramin	11.75	1.2	200	0.60
<b>Ziprasidon</b>	<b>11.98</b>	<b>1.0</b>	<b>150</b>	<b>0.66</b>
Clomipramin	12.83	6.9	1040	0.66
Zotepin	14.93	0.8	1050	0.07

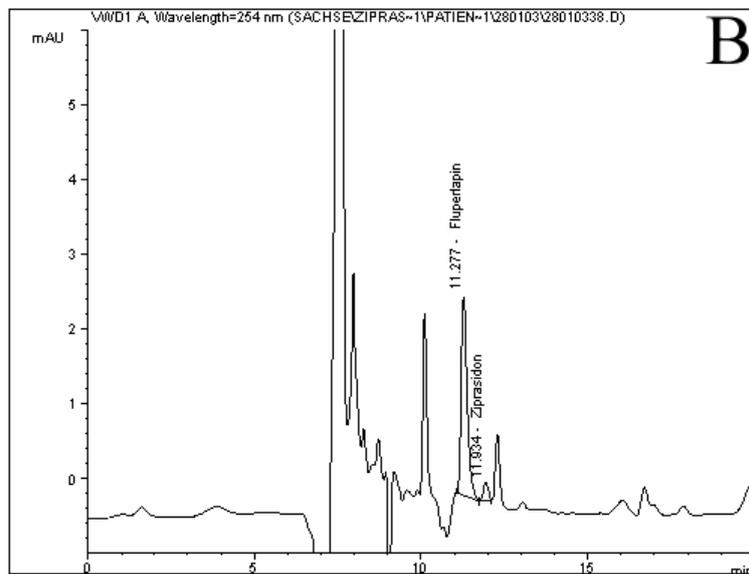
*n. d = zwischen 0 und 20 Minuten nicht detektierbar. Interferenzen sind grau schattiert.*

Abbildung 31 zeigt das Chromatogramm einer Leerplasmaprobe.



**Abbildung 31: Leerplasma**

Abbildung 32 zeigt dies eines Patienten, der mit Ziprasidon behandelt wurde. Dort wurde eine Konzentration von 22 ng/ml Ziprasidon gemessen. Der Patient hatte eine Tagesdosis von 80 mg Ziprasidon erhalten.



**Abbildung 32: Chromatogramm eines Patienten mit einer Tagesdosis von 80 mg Ziprasidon. Die gemessene Konzentration in der Probe war 22 ng/ml.**

### 4.3 Entwicklung einer HPLC-MS-Methode

#### 4.3.1 Entwicklung einer HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von acht verschiedenen Neuroleptika

Mit dieser Methode ließen sich acht verschiedene Neuroleptika nebeneinander detektieren und quantitativ messen: Amisulprid, Clozapin (+ N-Desmethylclozapin + Clozapin-N-Oxid), Haloperidol, Risperidon (+ 9-Hydroxyrisperidon), Olanzapin, Perazin (+ N-Desmethylperazin), Quetiapin und Ziprasidon.

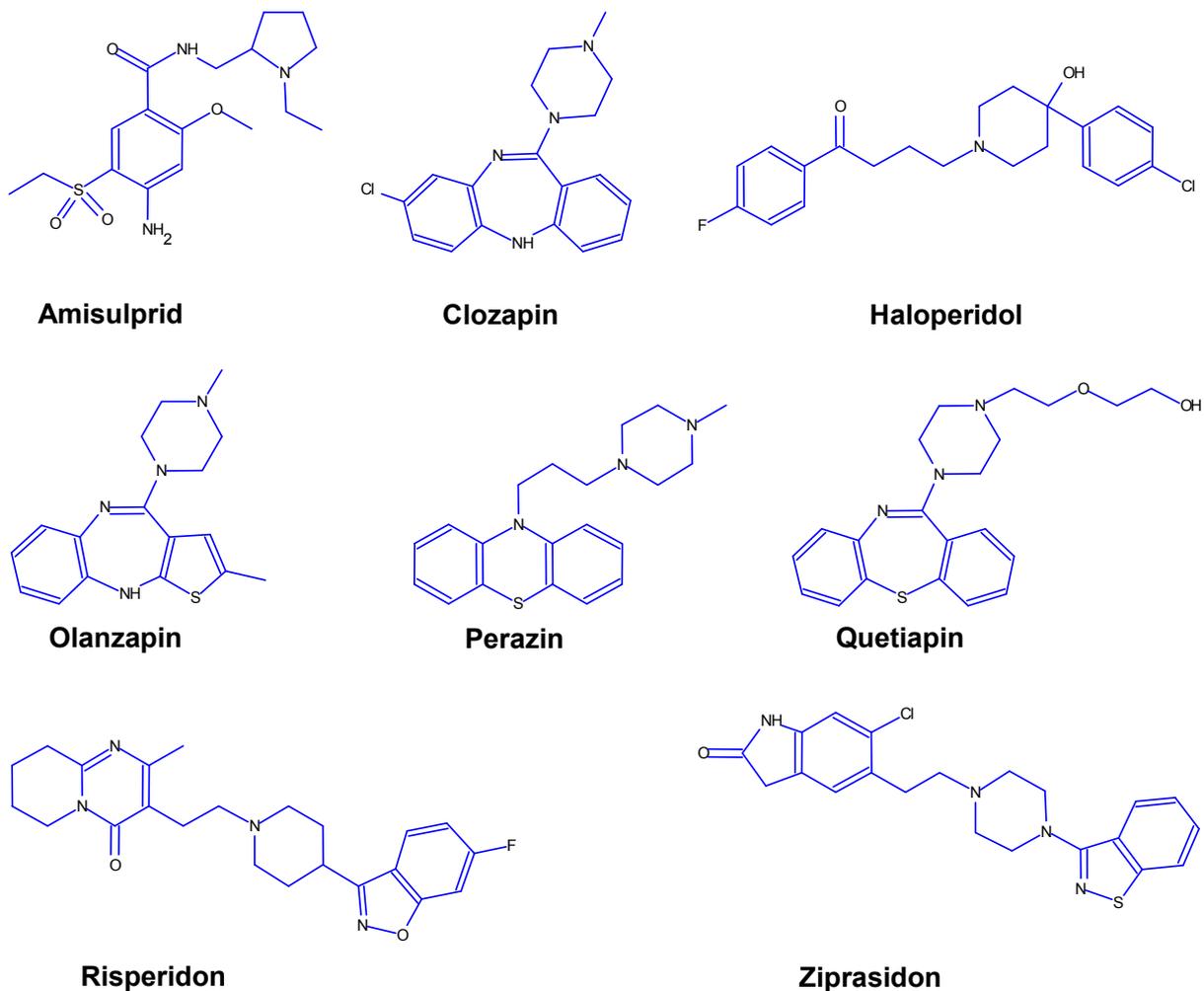


Abbildung 33: Formeln der Neuroleptika

Ausgehend von einer Veröffentlichung von Kratzsch et al. (2003) [52] wurde die hier beschriebene Methode entwickelt. Die verwendeten Säulen, Eluenten und jeder weitere wichtige Parameter wurden in zahlreichen Experimenten bis zum endgültigen Optimum aufeinander abgestimmt. Im folgenden Abschnitt wird die Methode im Einzelnen vorgestellt. Die bereits bei der Entwicklung der HPLC-UV-Methode erfolgreich eingesetzte C8-Vorsäule zeigte sich auch hier allen anderen Materialien als überlegen. Tabelle 43 listet die verwendeten Säulen, Eluenten etc. auf.

Tabelle 40: Methodenparameter im Überblick

<b>Vorsäule</b>	C8 20 µm 10x4.0 mm MZ-Analysentechnik
<b>analytische Säule</b>	Synergi MAX-RP C12 4 µm 150 x 4.6 mm Phenomenex
<b>Anreicherungs-eluent</b>	2 mMol Ammoniumacetat pH 6.4 (Gradient)
<b>analytischer Eluent</b>	0.01% Ameisensäure / Methanol (Gradient)
<b>interner Standard</b>	Fluperlapin, Sertindol
<b>Analysenzeit</b>	6 min 30 sec
<b>Fluss</b>	0.5 ml/min
<b>Temperatur</b>	65 °C

Am aufwendigsten war die Entwicklung des Gradienten. Bereits geringfügige Änderungen verschlechterten das Ergebnis erheblich.

Tabelle 41: Gradient Pumpe 1 ( = Anreicherungs-eluent )

Organische Phase : Methanol

Wässrige Phase : 2 mMol Ammoniumacetat pH 6.4

Zeit [min]	0.00	1.00	1.06	3.00	3.06	5.00	5.06	6.30
Methanol [%]	15	15	100	100	90	90	15	15
Fluss [ml/min]	5.00	5.00	0.6	0.6	4.0	4.0	5.0	5.0

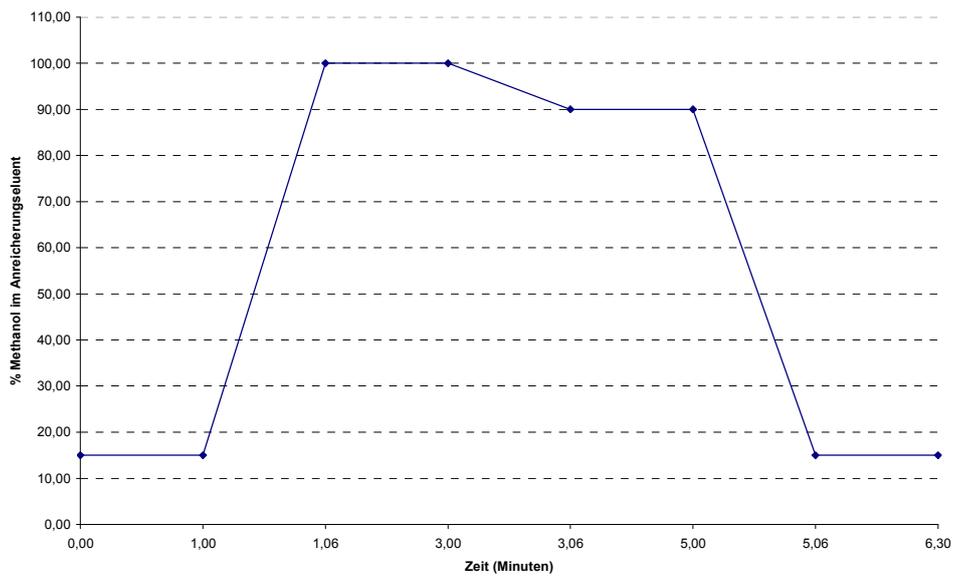
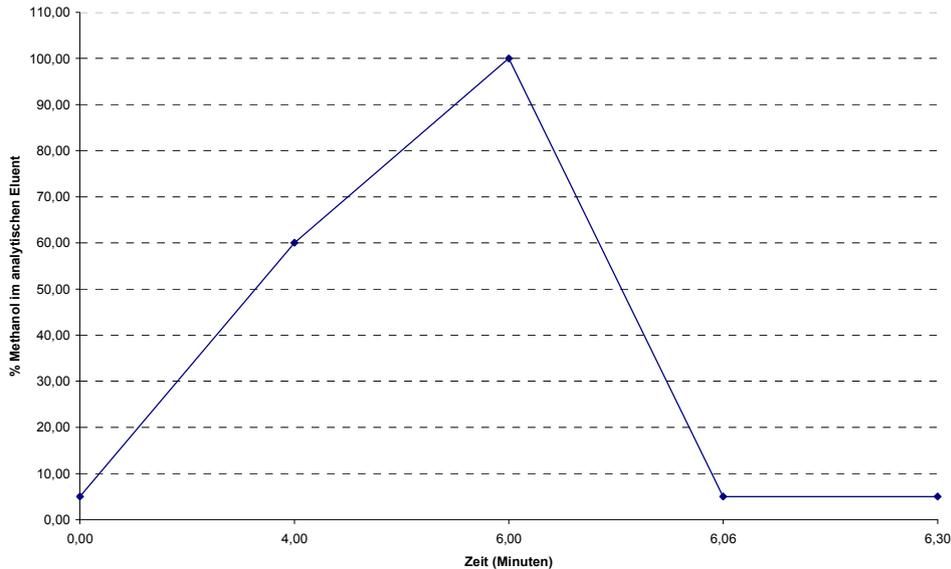


Abbildung 34: Gehalt an Methanol im Anreicherungs-eluent während der Messung (0 bis 6 Minuten 30 Sekunden)

**Tabelle 425: Gradient Pumpe 2 ( = analytischer Eluent )**

**Organische Phase : Methanol**  
**Wässrige Phase : 0.01 % Ameisensäure**

Zeit	[min]	0.00	4.00	6.00	6.06	6.30
Methanol	[%]	5	60	100	5	5
Fluss	[ml/min]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5



**Abbildung 35: Gehalt an Methanol im analytischen Eluent während der Messung (0 bis 6 Minuten 30 Sekunden)**

Die Elektrospray-Ionisation zeigte sich in den durchgeführten Versuchen der chemischen Ionisation als überlegen. Nach dem Erstellen eines eigenen „tune-files“ für diese Methode ergaben sich folgende Parameter (siehe Tabelle 46):

**Tabelle 436: MS-Parameter**

MS-Parameter	
Ionisierungsmodus	API-ES
Gastemperatur	300 °C
Gasfluß	6.0 l/min
Verneblerdruck	30 psig
Capillary Voltage (Vcap)	5500 V
Fragmentorspannung	100
Verstärker	1.5

Im „single ion mode“ (= SIM) wurden die in Tabelle 47 aufgeführten Substanzen als  $[M+H]^+$ -Ionen detektiert.

**Tabelle 447: Molekulargewicht und detektierte Ions**

Substanz	MG	RT (min)		Detektion im SIM <sup>1</sup>
Amisulprid	369	2.69	m/z = 370	Amisulprid [M+H] <sup>+</sup>
Clozapin	326	3.92	m/z = 327	Clozapin [M+H] <sup>+</sup>
N-Desmethylclozapin	312	3.85	m/z = 313	N-Desmethylclozapin [M+H] <sup>+</sup>
Clozapin-N-oxid	342	4.46	m/z = 343	Clozapin-N-oxid
Haloperidol	375	3.94	m/z = 376	Haloperidol [M+H] <sup>+</sup>
Olanzapin	312	2.96	m/z = 313	Olanzapin [M+H] <sup>+</sup>
Perazin	339	4.31	m/z = 340	Perazin [M+H] <sup>+</sup>
N-Desmethylperazin	325	4.28	m/z = 326	N-Desmethylperazin [M+H] <sup>+</sup>
Quetiapin	383	4.09	m/z = 384	Quetiapin [M+H] <sup>+</sup>
Risperidon	410	3.57	m/z = 411	Risperidon [M+H] <sup>+</sup>
9-Hydroxyrisperidon	426	3.39	m/z = 427	9-Hydroxyrisperidon [M+H] <sup>+</sup>
Ziprasidon	412	4.26	m/z = 413	Ziprasidon [M+H] <sup>+</sup>

ISTD	MG	RT (min)		Detektion im SIM mode <sup>1</sup>
Fluperlapin	309	3.93	m/z = 310	Fluperlapin [M+H] <sup>+</sup>
Sertindol	440	4.55	m/z = 441	Sertindol [M+H] <sup>+</sup>

<sup>1</sup>SIM = single ion mode

Der interne Standard Fluperlapin wurde für Clozapin-N-Oxid, Haloperidol, Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon, Olanzapin, Quetiapin und Ziprasidon eingesetzt. Der zweite interne Standard Sertindol fand Verwendung für Amisulprid, Clozapin, Desmethylclozapin, Perazin und Desmethylperazin.

#### Probenvorbereitung

Im Unterschied zur Probenvorbereitung für die HPLC-UV-Methode, wurde hier noch eine Proteinpräzipitation vor der Messung durchgeführt. Das Serum oder Plasma wurde im Verhältnis 1:4 mit einem Fällungsreagenz versetzt. Das Fällungsreagenz bestand aus 17.25 g Zinksulfat, das in einer Mischung von 700 ml Methanol (HPLC-grade) mit 300 ml Wasser (HPLC-grade) gelöst wurde. Der interne Standard für die quantitative Bestimmung wurde ebenfalls zugesetzt. Für die hier entwickelte Methode wurden als interne Standards auf einen Liter Fällungsreagenz 25 µl Fluperlapin (einer 1 mg/ml Stammlösung) und 250 µl Sertindol (ebenfalls aus einer 1 mg/ml Stammlösung) gegeben.

Zu 400 µl Probe wurden 560 µl Fällungsreagenz pipettiert und nach kurzem Durchmischen (ca. 20 Sekunden) mittels eines Vortexers, für 10 min mit 3200 g bei 4 °C zentrifugiert.

Arbeitete man mit „HPLC-vials“, wurde danach der resultierende Überstand vorsichtig aus dem „Eppendorf cup“ in ein solches „vial“ dekantiert.

Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten ließ sich ab einer Probenanzahl von 15 nicht nur Zeit, sondern auch Geld sparen. Die Probe wurde in der Mikrotiterplatte mit dem Fällungsreagenz versetzt, zentrifugiert und gemessen. Bis zu 96 Proben fanden auf einer Mikrotiterplatte Platz.

Es wurden also 400 µl Probe mit 560 µl Fällungsreagenz (welches bereits die internen Standards enthielt) in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 20 Sekunden durchmischen mit Hilfe eines Vortexers, wurde die Mikrotiterplatte für 10 Minuten bei 5 °C und 1300 rpm (rounds per minute) zentrifugiert.

Damit war die Probenvorbereitung beendet und die Messung konnte beginnen.

## Validierung

Die Verwendung des Massenspektrometers erlaubte es, alle für die Validierung relevanten Substanzen in eine Probe zu geben. Amisulprid, Clozapin, N-Desmethylclozapin, Clozapin-N-Oxid, Haloperidol, Olanzapin, Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon, Quetiapin und Ziprasidon konnten so nebeneinander bestimmt werden.

Bestimmung von Präzision („intra“- und „interday“), „accuracy“, untere und obere Nachweisgrenze, Linearität

Vor Beginn der Validierung wurde eine Standardkurve mit elf verschiedenen Konzentrationen (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml) in zehn 96er-Mikrotiterplatten pipettiert. Von diesen 10 wurden vier für spätere Messungen an den Validierungstagen 1 bis 3 eingefroren, eine davon als Reserve. Die restlichen sechs wurden noch am gleichen Tag, am sogenannten **Tag 0** gemessen. Aus diesen Daten ließ sich die Accuracy, die „intraday“-Präzision, die untere und die obere Nachweisgrenze, sowie die Linearität ermitteln. Zwischen jeder Standardkurve waren vier Proben dazwischengeschaltet, wovon zwei nur Methanol 70% enthielten. Die 3. Probe war Leerplasma und die 4. Leerplasma mit den internen Standards. Der interne Standard Fluperlapin wurde in einer Konzentration von 25 ng/ml in das Fällungsreagenz (MeOH/ZnSO<sub>4</sub>) gegeben. Der zweite interne Standard Sertindol wurde in einer Konzentration von 250 ng/ml dem Fällungsreagenz zugesetzt. Am **Tag 1** wurden 6 Mikrotiterplatten vorbereitet, die 3 Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch, siehe Tabelle 48) in einer bestimmten Reihenfolge enthielten, so dass alle Konzentrationen insgesamt fünfmal gemessen wurden. Die Reihenfolge lautete: hoch-niedrig-mittel-mittel-niedrig-niedrig-hoch-hoch-mittel-niedrig-mittel-hoch-niedrig-mittel-hoch. Eine Mikrotiterplatte diente als Reserve und wurde direkt eingefroren.

**Tabelle 45: gewählte Konzentrationen für die an Tag 1-3 gemessenen Proben**

	therapeutischer Bereich		niedrig	mittel	hoch
<b>Gruppe 1 (niedrig)</b>	untere Grenze	obere Grenze	ng/ml	ng/ml	ng/ml
Clozapin-N-Oxid	5	100	5	15	70
Haloperidol	5	17	5	15	70
Risperidon	2	40	5	15	70
9-Hydroxyrisperidon	10	60	5	15	70
<b>Gruppe 2 (mittel)</b>					
Olanzapin	20	80	15	50	150
Ziprasidon	50	120	15	50	150
Quetiapin	70	170	15	50	150
<b>Gruppe 3 (hoch)</b>					
Perazin	100	230	75	350	700
N-Desmethylperazin	50	230	75	350	700
Amisulprid	100	400	75	350	700
Clozapin	350	600	75	350	700
N-Desmethylclozapin	350	600	75	350	700

Die in Tabelle 48 angegebenen therapeutischen Bereiche orientieren sich an den „Consensus Guidelines“ der AGNP-TDM-Expertengruppe [14]. Die Substanzen

wurden in drei Gruppen aufgeteilt, abhängig vom Bereich ihrer therapeutischen Breite, in eine niedrige, mittlere und hohe Gruppe.

Von den 6 wurde die 1. Mikrotiterplatte sofort extrahiert und gemessen. Sie lieferte erste Daten zur „1. interday“-Präzision. Danach blieb sie für 24 Stunden im Autosampler stehen. Die 2. Mikrotiterplatte wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die anderen 4 Mikrotiterplatten wurden eingefroren.

Am **Tag 2** wurde die für 24 Stunden im Autosampler belassene 1. Mikrotiterplatte zum 2. Mal gemessen, um eine Aussage über die „Autosampler“-Stabilität zu bekommen. Die 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagerte 2. Mikrotiterplatte wurde extrahiert und gemessen. Aus diesen Daten lässt sich eine Aussage über die „in-process“-Stabilität machen. Die 3., 4. und 5. Mikrotiterplatte wurden aufgetaut. Die 3. Mikrotiterplatte wurde ebenfalls extrahiert und im Anschluß gemessen. Die daraus resultierenden Daten geben Auskunft über die „2. interday“-Präzision und den 1. Einfrier-Auftau-Cyclus. Die 4. und 5. Mikrotiterplatte wurden wieder eingefroren.

Am **Tag 3** wurden die 4., 6. und 5. Mikrotiterplatte aufgetaut, wobei die 5. Mikrotiterplatte direkt nach dem Auftauen wieder eingefroren wurde. Die 4. und 6. Mikrotiterplatte wurden direkt extrahiert und gemessen. Die 4. Mikrotiterplatte lieferte Daten zum 2. Einfrier-Auftau-Cyclus und die 6. Mikrotiterplatte Ergebnisse die „3. interday“-Präzision betreffend. Die 5. Mikrotiterplatte wurde erneut aufgetaut und dann nach der Extraktion gemessen. Damit wurden Daten über den 3. Einfrier-Auftau-Cyclus gewonnen. An jedem der drei Tage wurde zusätzlich noch eine Standardkurve zur Quantifizierung gemessen.

#### Linearität

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die vorliegende Methode über den gesamten Messbereich linear war. Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) lagen zwischen 0.9974 und 0.9999 (siehe Tabelle 49). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate befand sich in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes.

**Tabelle 46: Ergebnisse der Regressionsanalyse**

Substanz	Regressionsanalyse ( $R^2$ )
Amisulprid	0.9974
Clozapin	0.9984
N-Desmethylozapin	0.9992
Clozapine-N-oxid	0.9996
Haloperidol	0.9999
Olanzapin	0.9998
Perazin	0.9996
N-Desmethylperazin	0.9996
Risperidon	0.9998
9-Hydroxyrisperidon	0.9998
Quetiapin	0.9997
Ziprasidon	0.9992

#### Präzision Intraassay

In den Tabellen 50-52 sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Präzision am Tag 0 aufgeführt, also der Präzision innerhalb eines Tages (= Intraassay).

**Tabelle 50: Präzision (Intraassay) der Gruppe 1**

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)
Clozapin-N-Oxid	5-100	2.5	9.78	-3.10
		5	8.81	-5.90
		10	6.71	-5.10
		25	5.85	-1.80
		50	7.21	-2.50
		100	1.78	-0.50
		250	5.95	6.70
Haloperidol	5-17	1	7.39	5.40
		2.5	3.97	-5.70
		5	4.66	-6.20
		10	3.72	-0.30
		25	5.24	-4.70
		50	1.86	-4.70
Risperidon	2-40	1	6.43	6.10
		2.5	6.29	5.70
		5	6.79	3.70
		10	3.65	4.90
		25	6.98	1.20
		50	4.05	0.80
		100	4.85	0.30
9-Hydroxyrisperidon	10-60	2.5	4.10	4.80
		5	7.90	2.50
		10	3.34	3.10
		25	7.25	-4.10
		50	2.53	-4.50
		100	6.02	0.90
		250	5.78	5.20

**Tabelle 471: Präzision (Intraassay) der Gruppe 2**

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)
Olanzapin	20-80	2.5	6.40	-8.00
		5	4.91	-7.30
		10	8.82	-1.90
		25	8.61	4.60
		50	5.53	7.10
		100	6.39	6.60
		250	5.42	1.70
Quetiapin	20-170	10	4.91	-6.10
		25	8.01	-0.90
		50	4.95	-1.80
		100	4.77	3.90
		250	2.20	1.60
		500	4.68	2.90
Ziprasidon	25-120	10	2.40	-6.20
		25	8.06	-6.00
		50	9.33	0.40
		100	4.73	0.20
		250	5.00	-2.80
		500	6.32	-8.90
		1000	4.46	-6.40

**Tabelle 48: Präzision (Intraassay) der Gruppe 3**

<b>Substanz</b>	<b>therapeutischer Bereich (ng/ml)</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>
<b>Amisulprid</b>	100-400	50	6.36	-0.50
		100	6.08	4.80
		250	7.72	8.00
		500	6.42	2.30
		1000	6.95	9.70
<b>Clozapin</b>	350-600	50	7.82	5.50
		100	5.53	2.30
		250	3.53	1.60
		500	5.64	-2.60
		1000	4.78	-1.20
<b>Desmethylclozapin</b>	350-600	25	6.08	-2.30
		50	6.28	-1.50
		100	4.50	6.70
		250	4.47	4.20
		500	4.33	5.20
		1000	7.24	8.10
<b>Perazin</b>	100-230	10	6.30	-9.30
		25	6.95	-6.30
		50	3.61	-1.20
		100	5.41	2.80
		250	4.46	1.80
		500	3.33	-1.50
		1000	4.29	-3.30
<b>Desmethylperazin</b>	50-230	10	6.82	-6.50
		25	5.84	-5.50
		50	5.90	-1.30
		100	3.95	2.50
		250	3.96	-0.20
		500	4.01	-0.60
		1000	4.42	-0.70

Der Variationskoeffizient (VK %) und die accuracy (%) lagen für alle Parameter immer unter 10%.

#### Präzision von Tag zu Tag

In Tabelle 53 sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag aufgeführt. Die Proben wurden an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen.

Tabelle 49: Ergebnisse der Interday-Präzision an den Tagen 1-3

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
			VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Clozapin-N-Oxid	5-100	2.5	3.97	7.94	3.43	7.11	2.21	18.81
		12.5	1.65	4.37	3.44	-1.86	5.52	15.25
		70	2.93	-6.40	7.95	-2.26	3.86	16.43
Haloperidol	5-17	2.5	2.97	-6.86	3.14	-6.30	1.41	-13.00
		12.5	3.60	-6.96	2.39	-10.92	4.29	-7.61
		70	1.52	3.13	4.40	-6.24	2.14	2.25
Risperidon	2-40	2.5	4.07	4.16	2.91	0.40	7.40	-6.29
		12.5	2.89	3.51	2.73	-5.33	4.12	-2.79
		70	3.15	10.91	1.45	-2.92	1.66	7.54
9-Hydroxy-risperidon	10-60	2.5	5.41	-0.44	2.22	14.26	7.56	2.09
		12.5	4.39	1.82	2.03	15.39	3.95	6.60
		70	3.39	11.31	4.32	13.19	4.88	15.68
Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Olanzapin	20-80	15	3.22	-4.74	6.28	3.31	5.44	-11.92
		50	1.71	-0.94	0.84	1.40	5.55	-2.68
		150	3.11	-2.34	2.34	0.08	2.32	2.54
Quetiapin	20-170	15	6.20	-3.79	3.21	-0.61	6.57	-10.63
		50	3.27	1.68	2.71	4.43	4.15	2.38
		150	2.11	6.29	2.79	8.98	1.30	10.47
Ziprasidon	25-120	15	5.35	-1.18	8.53	-1.47	5.90	-3.36
		50	2.68	-13.50	3.88	2.07	3.18	5.80
		150	2.61	-17.09	1.53	-0.82	2.24	-1.03
Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Amisulprid	100-400	75	6.25	6.57	7.10	14.06	3.86	8.25
		350	6.40	-3.70	5.08	13.43	2.71	6.98
		700	6.11	1.81	4.03	8.16	6.30	12.41
Clozapin	350-600	75	5.39	10.52	4.38	17.62	3.17	15.22
		350	3.14	2.77	3.95	17.09	5.12	16.45
		700	3.36	7.97	4.62	14.71	7.03	12.95
Desmethyl-clozapin	350-600	75	6.85	8.67	3.48	15.10	2.12	5.51
		350	7.60	-4.94	2.92	1.98	3.86	1.54
		700	4.13	-1.42	1.89	-0.39	9.40	6.67
Perazin	100-230	75	2.60	4.83	3.15	3.85	2.74	7.99
		350	2.86	0.38	0.91	1.02	1.26	3.66
		700	1.40	1.73	3.33	-2.75	2.32	7.32
Desmethyl-perazin	50-230	75	1.93	0.62	4.24	13.05	2.86	2.08
		350	1.66	-2.90	1.44	-1.34	3.08	-4.68
		700	3.91	-3.17	2.13	-0.96	4.32	0.41

Der Variationskoeffizient (VK %) lag für alle Parameter unter 10 % und die accuracy (%) war kleiner als 20%.

## Untere und obere Nachweisgrenze

In Tabelle 54 sind die Ergebnisse zur unteren Nachweisgrenze zusammengefasst. Als untere Nachweisgrenze wurde die Konzentration gewählt, bei der die „accuracy“ von allen sechs Messungen am Tag 0 immer kleiner als  $\pm 20\%$  war. Eine obere Nachweisgrenze konnte (nach diesen Kriterien) bei allen Substanzen bis zu einer Konzentration 1000 ng/ml nicht festgestellt werden.

**Tabelle 50: Untere Nachweisgrenze**

Substanz	(ng/ml)
Amisulprid	50
Clozapin	50
N-Desmethylclozapin	25
Clozapine-N-oxid	2.5
Haloperidol	1
Olanzapin	2.5
Perazin	10
N-Desmethylperazin	10
Risperidon	1
9-Hydroxyrisperidon	2.5
Quetiapin	10
Ziprasidon	10

## Stabilität

### „in-Process“-Stabilität

Es wurde die sogenannte „in-Process“-Stabilität bestimmt, d.h. ein Teil der Proben wurde nach der Herstellung für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann erst extrahiert und gemessen. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch die Stabilität im Autosampler kontrolliert. Nach der Messung blieben die Proben für 24 Stunden im temperierten Autosampler und wurden dann am nächsten Tag noch einmal bestimmt.

**Tabelle 51: Ergebnisse der „in-Process“-Stabilität**

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	24h Raumtemperatur		24h Autosampler	
			VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Clozapin-N-Oxid	5-100	2.5	8.15	8.53	6.08	1.39
		12.5	5.44	0.33	3.99	-1.81
		70	7.79	1.16	6.22	-4.60
Haloperidol	5-17	2.5	3.94	-0.48	4.02	-5.82
		12.5	2.53	-8.47	2.53	-12.44
		70	3.79	-4.34	3.49	-10.72
Risperidon	2-40	2.5	2.29	0.87	4.57	0.65
		12.5	1.46	-4.20	2.47	-8.03
		70	4.01	-0.53	0.80	-3.29
9-Hydroxyrisperidon	10-60	2.5	5.82	8.08	4.59	11.20
		12.5	1.49	7.79	2.45	11.76
		70	1.64	9.99	3.67	12.76

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Olanzapin	20-80	2.5	4.34	4.34	2.70	2.70
		12.5	2.20	-2.52	5.78	-0.70
		70	1.87	-1.94	4.31	-1.42
Quetiapin	20-170	5	4.58	-3.46	1.79	-0.57
		25	2.86	2.12	2.11	3.11
		140	2.83	6.44	1.82	9.59
Ziprasidon	25-120	5	7.23	8.19	2.70	-6.12
		25	3.52	3.28	2.85	-5.58
		140	2.88	0.46	1.82	-5.84

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Amisulprid	100-400	75	7.28	6.73	4.87	21.97
		350	2.36	4.09	7.68	18.73
		700	5.61	6.96	5.74	19.71
Clozapin	350-600	75	4.43	4.08	5.94	22.97
		350	2.82	5.99	5.34	22.96
		700	5.79	13.54	9.68	21.76
Desmethyl-clozapin	350-600	75	3.46	3.83	6.46	19.28
		350	2.06	-3.81	4.89	3.13
		700	2.09	-1.66	7.30	2.75
Perazin	100-230	75	2.25	1.52	2.55	7.10
		350	2.69	-3.23	3.63	0.18
		700	3.46	-2.01	4.14	-3.89
Desmethyl-perazin	50-230	75	2.15	3.50	3.59	11.61
		350	2.33	-0.09	2.55	-0.77
		700	3.83	-4.52	3.87	-3.59

Für Amisulprid und Clozapin verschlechtert sich die accuracy, wenn die präzipitierte Probe 24 Stunden im Autosampler stand. Eine Messung sollte besser direkt im Anschluß an die Proteinpräzipitation erfolgen.

#### Einfrier-Auftau-Cyclus

Während der drei Tage dauernden Validierung wurden die Proben mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren.

Tabelle 52: Ergebnisse der Einfrier-Auftau-Cyclen

Substanz	therapeutischer Bereich (ng/ml)	Konzentration (ng/ml)	1. Mal aufgetaut		2. Mal aufgetaut		3. Mal aufgetaut	
			VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)	VK (%)	accuracy (%)
Clozapin-N-Oxid	5-100	2.5	3.43	7.11	7.53	16.96	1.18	18.81
		12.5	3.44	-1.86	1.80	20.70	1.33	20.97
		70	7.95	-2.26	1.62	18.54	2.49	15.19
Haloperidol	5-17	2.5	3.14	-6.30	3.92	-11.84	3.22	-13.99
		12.5	2.39	-10.92	4.70	-2.54	2.54	-3.31
		70	4.40	-6.24	2.55	5.17	1.16	0.24

<b>Risperidon</b>	<b>2-40</b>	2.5	2.91	0.40	3.79	-3.74	2.31	-9.80
		12.5	2.73	-5.33	5.88	5.15	4.11	-0.55
		70	1.45	-2.92	2.29	10.70	3.76	5.97
<b>9-Hydroxy-risperidon</b>	<b>10-60</b>	2.5	2.22	14.26	4.97	4.32	5.37	2.96
		12.5	2.03	15.39	5.77	9.72	6.67	6.84
		70	4.32	13.19	5.69	17.97	2.67	14.11

<b>Substanz</b>	<b>therapeutischer Bereich (ng/ml)</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>
<b>Olanzapin</b>	<b>20-80</b>	2.5	6.28	3.31	4.36	-9.63	7.18	-4.55
		12.5	0.84	1.40	4.73	-1.64	7.30	0.02
		70	2.34	0.08	3.52	4.21	3.42	-0.27
<b>Quetiapin</b>	<b>20-170</b>	5	3.21	-0.61	2.77	-7.03	4.84	-12.72
		25	2.71	4.43	4.64	4.33	3.52	3.74
		140	2.79	8.98	2.17	8.96	4.00	7.28
<b>Ziprasidon</b>	<b>25-120</b>	5	8.53	-1.47	4.92	-4.68	6.46	-4.01
		25	3.88	2.07	3.06	13.74	3.60	8.44
		140	1.53	-0.82	3.78	-1.60	4.34	-3.03

<b>Substanz</b>	<b>therapeutischer Bereich (ng/ml)</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>	<b>VK (%)</b>	<b>accuracy (%)</b>
<b>Amisulprid</b>	<b>100-400</b>	75	7.10	14.06	2.92	6.67	9.23	8.61
		350	5.08	13.43	6.84	-0.96	4.69	0.96
		700	4.03	8.16	5.87	16.40	4.39	5.79
<b>Clozapin</b>	<b>350-600</b>	75	4.38	17.62	3.85	18.31	4.72	15.29
		350	3.95	17.09	5.25	12.78	2.97	11.93
		700	4.62	14.71	6.70	19.39	2.64	18.86
<b>Desmethyl-clozapin</b>	<b>350-600</b>	75	3.48	15.10	4.21	6.99	4.96	1.52
		350	2.92	1.98	6.28	-1.67	2.98	-0.62
		700	1.89	-0.39	8.77	10.30	3.72	4.74
<b>Perazin</b>	<b>100-230</b>	75	3.15	3.85	3.32	15.43	4.72	11.37
		350	0.91	1.02	1.46	3.82	2.84	5.65
		700	3.33	-2.75	5.74	5.25	3.90	4.04
<b>Desmethyl-perazin</b>	<b>50-230</b>	75	4.24	13.05	5.02	3.68	3.62	2.75
		350	1.44	-1.34	5.36	-1.50	3.30	-3.11
		700	2.13	-0.96	6.23	4.09	4.83	0.02

## Ion Suppression

Am Tag 4 wurde untersucht, ob das Plasma zu einer Ion Suppression führt. Unter Ion Suppression versteht man eine Unterdrückung der Ionisierung durch koeluiierende Komponenten, wie z.B. Matrixbestandteile, Salze, Arzneistoffe und ihre Metabolite. Die unterdrückte Ionisierung führt zu falsch niedrigen Ergebnissen bei der quantitativen Bestimmung einer Substanz.

Dafür wurden zwei verschiedene Arten von Proben hergestellt, die einen in Wasser (A) die anderen in Plasma (B) (siehe Tabelle 57).

**Tabelle 53: Verdünnungsschema Ion Suppression**

wässrige Proben (A)		Plasmaproben (B)	
290 µl	Wasser	400 µl	Plasma
560 µl	Methanol/Wasser (70:30 V/V)	560 µl	Fällungsreagenz
für 20 Proben			
5800 µl	Wasser	8000 µl	Plasma
11200 µl	Methanol/Wasser (70:30 V/V)	11200 µl	Fällungsreagenz

Nach Zugabe des Fällungsreagenz wurden die Plasmaproben (B), wie oben bereits unter „Probenvorbereitung“ beschrieben, mit einem Vortexer gemischt und anschließend zentrifugiert. Da bei B alleine 2000 µl als Präzipitat ausfielen d.h. es blieben nur 70 % als Überstand verfügbar, reduzierte sich die zugegebene Wassermenge bei A von 400 µl auf nur 290 µl, also 70%.

Erst jetzt wurden die Arzneistoffe zu den einzelnen Lösungen dazu gegeben. Es wurden 3 verschiedene Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch) hergestellt (siehe Tabelle 58) in einer für 5 Messungen ausreichenden Menge.

**Tabelle 54: Arzneistoffkonzentrationen zur Überprüfung der Ion Suppression**

	niedrig (ng/ml)	mittel (ng/ml)	hoch (ng/ml)
<b>Gruppe 1</b>			
Clozapin-N-Oxid	5	10	70
Haloperidol			
Risperidon			
9-Hydroxyrisperidon			
<b>Gruppe 2</b>			
Olanzapin	15	50	150
Quetiapin			
Ziprasidon			
<b>Gruppe 3</b>			
Amisulprid	70	350	700
Clozapin			
N-Desmethylozapin			
Perazin			
N-Desmethylperazin			
<b>Interne Standards</b>			
Fluperlapin	10	20	50
Sertindol	150	250	400

Es wurden dann abwechselnd erst die 5 niedrigen, wässrigen Proben (A) und dann die 5 niedrigen Plasmaproben (B) usw. gemessen. Vor diesen für die Ion Suppression wichtigen Proben, wurden 10 Leerplasmaproben abgearbeitet.

Tabelle 59 zeigt die Ergebnisse:

**Tabelle 559: Ergebnis Ion Suppression**

<b>Arzneistoffe</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Methanol/Wasser</b>	<b>Plasma</b>
Amisulprid	niedrig	100 ± 6.4	99.7± 6.0
	mittel	100 ±14.7	100.7±10.8
	hoch	100 ± 3.8	102.2± 4.9
Olanzapin	niedrig	100 ± 8.3	87.1± 8.4
	mittel	100 ±15.1	94.0±10.9
	hoch	100 ± 4.8	98.9± 5.8
9-OH-Risperidon	niedrig	100 ± 6.7	101.9± 9.6
	mittel	100 ±15.3	101.9±17.1
	hoch	100 ± 6.3	101.8± 7.9
Risperidon	niedrig	100 ± 7.6	92.7± 9.4
	mittel	100 ±16.3	95.8±13.9
	hoch	100 ± 6.4	99.2± 6.3
Desmethylclozapin	niedrig	100 ± 6.6	99.9±12.0
	mittel	100 ±18.1	102.4±15.3
	hoch	100 ± 8.3	105.7± 3.9
Clozapin	niedrig	100 ± 6.3	101.4± 9.7
	mittel	100 ±17.8	101.9±13.2
	hoch	100 ± 6.4	101.8± 4.8
Haloperidol	niedrig	100 ± 8.7	89.6±11.0
	mittel	100 ±17.9	94.5±13.1
	hoch	100 ± 6.0	97.7± 4.7
Quetiapin	niedrig	100 ± 6.9	96.1± 9.7
	mittel	100 ±18.9	103.7±13.3
	hoch	100 ± 7.1	103.0± 5.6
Ziprasidon	niedrig	100 ± 5.8	85.8± 7.8
	mittel	100 ±17.2	99.0±15.0
	hoch	100 ± 6.6	95.9± 6.4
Desmethylperazin	niedrig	100 ± 8.0	89.9±10.1
	mittel	100 ±18.0	98.6±15.0
	hoch	100 ± 7.0	96.8± 6.3
Perazin	niedrig	100 ± 8.8	94.7±10.0
	mittel	100 ±15.9	99.8±14.7
	hoch	100 ± 5.4	98.8± 5.5
Clozapin-N-oxid	niedrig	100 ± 6.6	99.9± 8.5
	mittel	100 ±17.2	107.0±15.4
	hoch	100 ± 6.4	102.5± 3.4
Sertralin	niedrig	100 ± 7.6	86.2± 9.6
	mittel	100 ±14.3	84.1±14.7
	hoch	100 ± 7.0	85.7± 2.3
Fluperlapin	niedrig	100 ± 7.4	98.6± 8.8
	mittel	100 ±18.1	102.3±12.8
	hoch	100 ± 7.9	103.3± 4.6

## Absolute und analytische Wiederfindung

Im Anschluss an Tag 4 wurde die absolute und die analytische Wiederfindung bestimmt. Die absolute Wiederfindung wurde mit und ohne Proteinpräzipitation überprüft. Dabei wurden von jeder Substanz drei verschiedene Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch) fünfmal hintereinander gemessen. Die Proben zur Bestimmung der absoluten Wiederfindung wurden nicht in Plasma, sondern wie die Proben für die Ion Suppression hergestellt und konnten so direkt ohne Proteinpräzipitation injiziert werden. Die Plasmaproben wurden ganz normal mit Proteinpräzipitation analysiert. Der Quotient aus der Fläche der ohne Proteinpräzipitation gemessenen Peaks durch die Fläche der mit Plasma gemessenen Peaks, mit 100 multipliziert, ergab die Wiederfindungsrate in Prozent. Die analytische Wiederfindung in Prozent ergab sich aus dem Quotienten der in der Probe gemessenen Konzentration mit der theoretisch in der Probe vorhandenen multipliziert mit 100. Tabelle 60 zeigt alle Ergebnisse in der Übersicht.

**Tabelle 60: Absolute und analytische Wiederfindung**

<b>Substanz</b>	<b>absolute Wiederfindung (%)</b>	<b>analytische Wiederfindung (%)</b>
Amisulprid	92-113% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 101±6)	87-117% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 102± 7)
Clozapin	91-117% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 102±9)	98-121% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 107± 5)
N-Desmethylozapin	90-120% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 103±9)	85-121% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 101± 8)
Clozapin-N-oxid	93-117% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 103±9)	80-116% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 102± 9)
Haloperidol	81-109% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 94±8)	88-105% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 96± 5)
Olanzapin	80-107% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 93±9)	90-102% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 97± 3)
Perazin	87-111% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 98±8)	96-109% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 102± 3)
N-Desmethylperazin	83-109% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 95±9)	94-103% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 98± 3)
Risperidon	79-112% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 96±9)	98-117% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 106± 5)
9-Hydroxyrisperidon	85-118% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 102±10)	91-115% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 104± 7)
Quetiapin	87-115% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 101± 9)	86-110% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 101± 6)
Ziprasidon	82-107% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 94±9)	80-104% (MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> 89± 8)

<sup>1</sup>MW = Mittelwert

<sup>2</sup>SD = Standardabweichung

## Vergleichsmessungen

Am Ende der Validierung wurden Patientenproben, die in Mainz mit der HPLC-UV-Methode gemessen worden waren, auf Trockeneis lagernd nach Denver geschickt und dort mit der LC-MS-Methode noch einmal quantitativ bestimmt.

Beispiel: Olanzapin

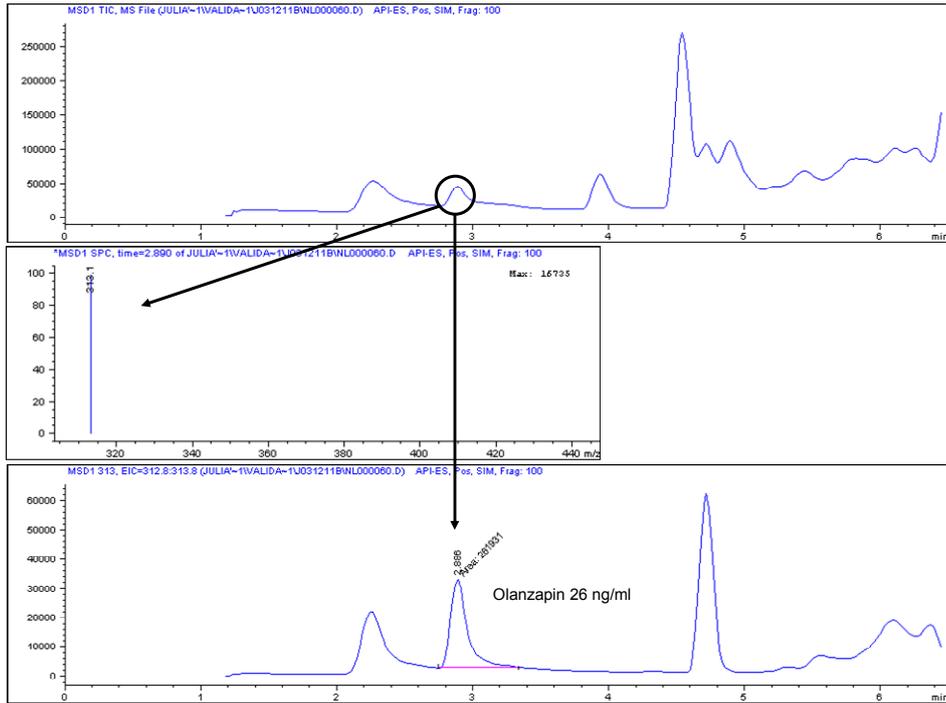
Die Werte für Olanzapin stimmten gut überein (siehe Tabelle 61).

**Tabelle 56: Ergebnisse der Vergleichsmessung**

<b>Olanzapin</b> (Konzentration in ng/ml)			
Patientenprobe Nr.	LC-MS- Methode	HPLC-UV- Methode	Differenz (ng)
<b>1</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>107</b>	<b>116</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>43</b>	<b>49</b>	<b>6</b>
7	1	19	18
<b>8</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>-1</b>
<b>9</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

Bei Probe 7 wurde mit der HPLC-UV-Methode eine Konzentration von 19 ng/ml Olanzapin bestimmt, während sich kein Olanzapin mit der LC-MS-Methode nachweisen ließ. Eine mögliche Erklärung wäre eine Interferenz, die mit einem UV-Detektor nicht auszuschließen ist.

Abbildung 36 zeigt die Probe eines Patienten, der mit Olanzapin behandelt wurde.



**Abbildung 36: Chromatogramm eines Patienten, der mit Olanzapin behandelt wurde**

Sowohl mit der HPLC-UV- als auch mit der LC-MS-Methode wurde hier eine Konzentration von 26 ng/ml gemessen.

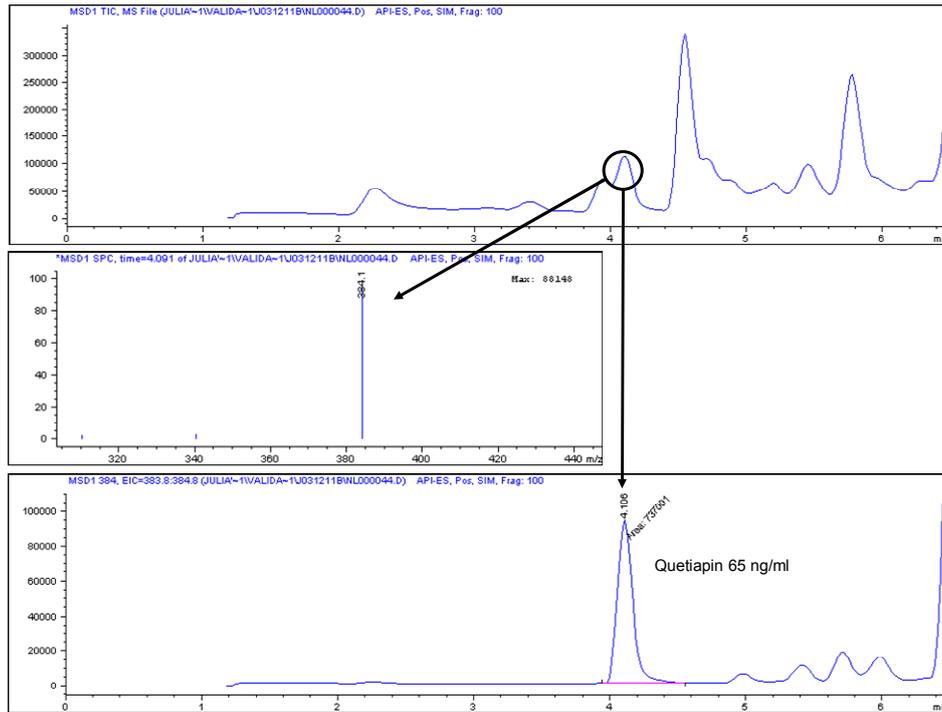
Beispiel: Quetiapin

Die Werte für Quetiapin stimmen teilweise nicht ganz überein (siehe Tabelle 62).

**Tabelle 57: Ergebnisse der Vergleichsmessung**

Patientenprobe Nr.	Quetiapin (Konzentration in ng/ml)	
	LC-MS-Methode	HPLC-UV-Methode
1	0	0
2	355	599
3	65	73
4	0	0
5	115	120
6	0	14
7	204	253
8	90	121
9	27	20
10	45	28

Tendenziell lagen die mit der HPLC-UV-Methode gefundenen Werte höher. Hier herrscht noch Klärungsbedarf. Man darf natürlich auch nicht den Transport vergessen. Die Proben waren von Mainz (Deutschland) nach Denver, Colorado (USA) ein paar Tage unterwegs. Das Trockeneis reichte nicht für eine Kühlung aus und die Proben kamen in aufgetautem Zustand an.



**Abbildung 37: Chromatogramm eines Patienten, der mit Quetiapin behandelt wurde**

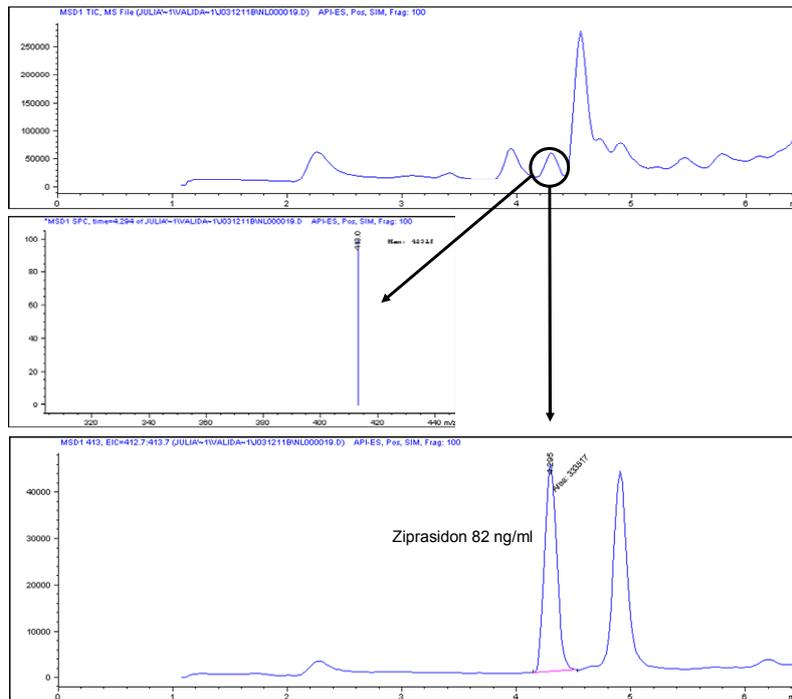
Mit der HPLC-UV-Methode wurden 73 ng/ml gemessen und mit der LC-MS-Methode 65 ng/ml. Beide Werte stimmen gut miteinander überein.

Beispiel: Ziprasidon

Auch hier weichen drei Proben erheblich voneinander ab (siehe Tabelle 63).

**Tabelle 583: Ergebnisse der Vergleichsmessung**

<b>Ziprasidon</b> (Konzentration in ng/ml)		
Patientenprobe Nr.	LC-MS-Methode	HPLC-UV-Methode
1	46	90
2	0	31
<b>3</b>	<b>66</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>82</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>152</b>	<b>163</b>
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>7</b>	<b>112</b>	<b>129</b>
8	63	149
<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>47</b>	<b>31</b>



**Abbildung 38: Chromatogramm eines Patienten, der mit Ziprasidon behandelt wurde**

Mit der HPLC-UV-Methode wurden 79 ng/ml gemessen und mit der LC-MS-Methode 82 ng/ml. Beide Werte stimmen gut miteinander überein.

Für weitere Aussagen müsste eine höhere Anzahl an Proben verglichen werden. Es war nur ein erster Versuch, um die Methode zu testen.

Kann diese Methode noch erweitert werden?

Bei der Entwicklung der HPLC-MS-Methode lag der Schwerpunkt auf der Messung von Neuroleptika. Es stellte sich die Frage, ob es nicht auch möglich sei, diverse Antidepressiva ebenfalls mit dieser Methode zu erfassen und damit dem Ziel, eine Methode zur Messung so vieler Psychopharmaka wie möglich, wieder ein Stück näher zu kommen.

Es war tatsächlich möglich. Tabelle 64 zeigt welche Antidepressiva noch erfasst werden können:

**Tabelle 59: Die HPLC-MS-Methode ist um folgende Antidepressiva erweiterbar**

<b>Substanz</b>	<b>MG</b>	<b>RT (min)</b>		<b>Detektion im SIM mode<sup>1</sup></b>
Amitriptylin	277	4.32	m/z = 278	Amitriptylin [M+H] <sup>+</sup>
Nortriptylin	263	4.34	m/z = 264	Nortriptylin [M+H] <sup>+</sup>
Citalopram	324	3.86	m/z = 325	Citalopram [M+H] <sup>+</sup>
Desmethylcitalopram	310	3.85	m/z = 311	Desmethylcitalopram [M+H] <sup>+</sup>
Clomipramin	314	4.51	m/z = 315	Clomipramin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethylclomipramin	300	4.53	m/z = 301	Desmethylclomipramin [M+H] <sup>+</sup>
Doxepin	279	3.91	m/z = 280	Doxepin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethyldoxepin	265	3.94	m/z = 266	Desmethyldoxepin [M+H] <sup>+</sup>
Fluoxetin	309	4.44	m/z = 310	Fluoxetin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethylfluoxetin	295	4.44	m/z = 296	Desmethylfluoxetin [M+H] <sup>+</sup>
Fluvoxamin	318	4.40	m/z = 319	Fluvoxamin [M+H] <sup>+</sup>
Imipramin	280	4.18	m/z = 281	Imipramin [M+H] <sup>+</sup>
Desipramin	266	4.22	m/z = 267	Desipramin [M+H] <sup>+</sup>
Maprotilin	277	4.25	m/z = 278	Maprotilin [M+H] <sup>+</sup>
Mirtazapin	265	3.44	m/z = 266	Mirtazapin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethylmirtazapin	251	3.40	m/z = 252	Desmethylmirtazapin [M+H] <sup>+</sup>
Paroxetin	329	4.17	m/z = 330	Paroxetin [M+H] <sup>+</sup>
Reboxetin	313	4.08	m/z = 314	Reboxetin [M+H] <sup>+</sup>
Sertralin	305	4.47	m/z = 306	Sertralin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethylsertralin	291	4.51	m/z = 292	Desmethylsertralin [M+H] <sup>+</sup>
Trimipramin	294	4.32	m/z = 295	Trimipramin [M+H] <sup>+</sup>
Desmethyltrimipramin	280	4.34	m/z = 281	Desmethyltrimipramin [M+H] <sup>+</sup>
Venlafaxin	277	3.69	m/z = 278	Venlafaxin [M+H] <sup>+</sup>
N-Desmethylvenlafaxin	263	3.70	m/z = 264	N-Desmethylvenlafaxin [M+H] <sup>+</sup>
O-Desmethylvenlafaxin	263	3.19	m/z = 264	O-Desmethylvenlafaxin [M+H] <sup>+</sup>

<b>ISTD</b>	<b>MG</b>	<b>RT (min)</b>		<b>Detektion im SIM mode<sup>1</sup></b>
Fluperlapin	309	3.93	m/z = 310	Fluperlapin [M+H] <sup>+</sup>
Sertindol	440	4.55	m/z = 441	Sertindol [M+H] <sup>+</sup>

<sup>1</sup>SIM = single ion mode

### Linearität

Die Linearität wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen (10, 100 und 1000 ng/ml) bestimmt.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die vorliegende Methode über einen Messbereich von 10 über 100 bis 1000 ng/ml linear war. Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) lagen zwischen 0.9981 und 1 (siehe Tabelle 65). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate befand sich in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes.

**Tabelle 65: Ergebnisse der Regressionsanalyse**

<b>Substanz</b>	<b>Regressionsanalyse (R<sup>2</sup>)</b>
Amitriptylin	0.9987
Nortriptylin	0.9996
Citalopram	0.9984
Desmethylcitalopram	0.9996
Clomipramin	0.9991
Desmethylclomipramin	0.9995
Doxepin	0.9995
Desmethyldoxepin	0.9993
Fluoxetin	0.9990
Desmethylfluoxetin	0.9998
Fluvoxamin	0.9991
Imipramin	0.9996
Desipramin	0.9991
Maprotilin	0.9981
Mirtazapin	0.9984
Desmethylmirtazapin	0.9999
Paroxetin	1
Reboxetin	0.9994
Sertralin	0.9999
Desmethylsertralin	0.9999
Trimipramin	0.9989
Desmethyltrimipramin	0.9997
Venlafaxin	0.9982
N-Desmethylvenlafaxin	0.9991
O-Desmethylvenlafaxin	1

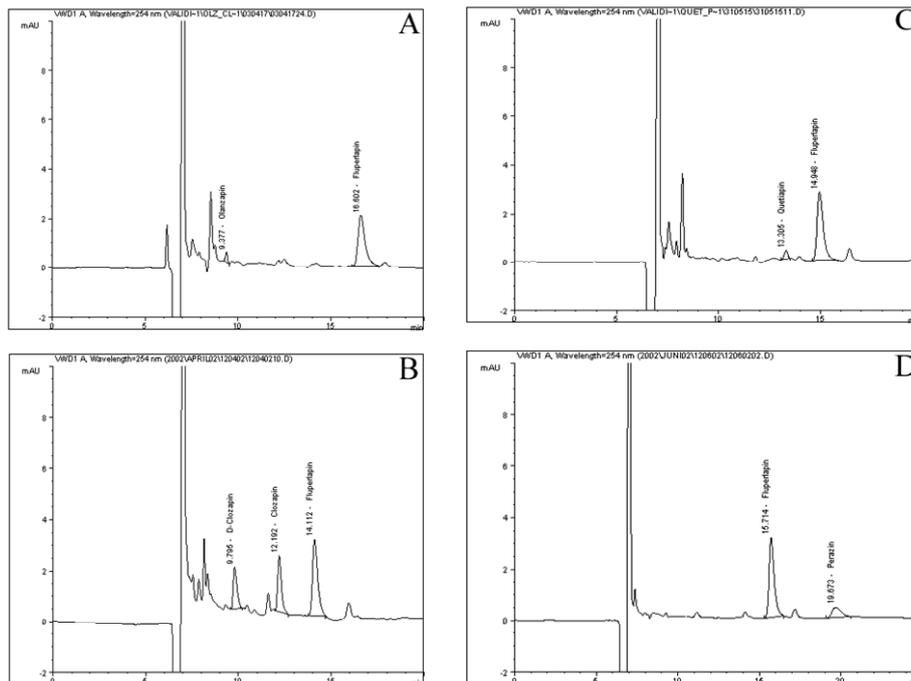
Es wäre ein sehr interessantes Projekt, diese Methode vollständig zu validieren und an weiteren Patientenproben auszuprobieren.

## 4.4 Anwendung der Methoden

### 4.4.1 Anwendung der HPLC-UV-Methode in der klinischen Routine

Die Methode eignet sich für die Analyse von Serum von Patienten, die mit Clozapin, Olanzapin, Perazin oder Quetiapin behandelt werden.

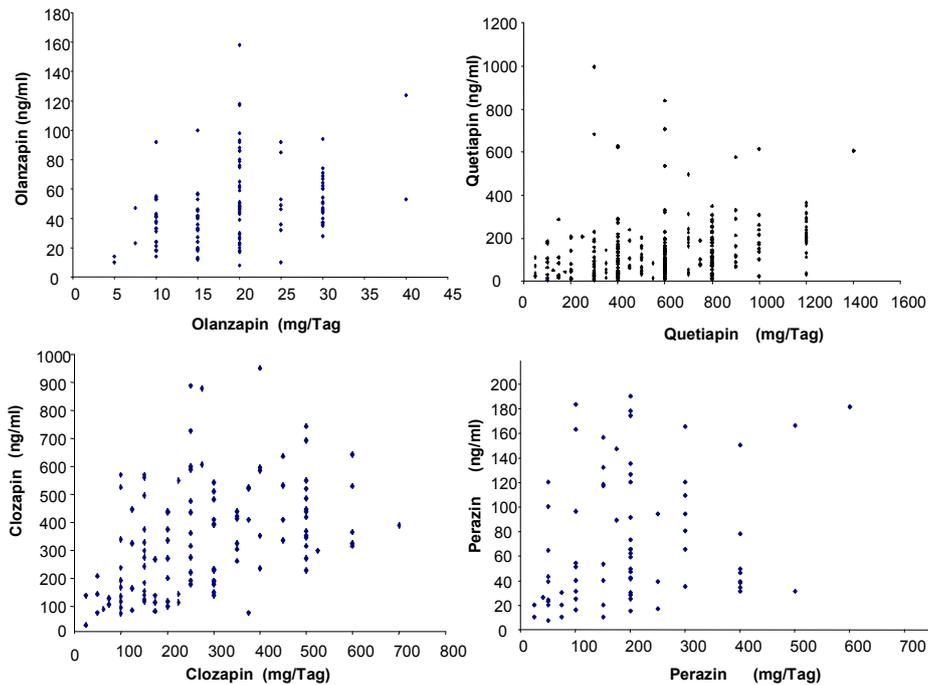
Die in Abbildung 39 gezeigten Chromatogramme stammen von schizophrenen Patienten, die mit Olanzapin, Clozapin, Quetiapin oder Perazin behandelt wurden.



**Abbildung 39: Chromatogramme von Patienten, die mit einer täglichen Dosis von (A) 20 mg Olanzapin, (B) 250 mg Clozapin, (C) 175 mg Quetiapin und (D) 200 mg Perazin behandelt wurden. Die mit gemessenen Konzentrationen waren 21 ng/ml für Olanzapin, 126 ng/ml für Clozapin, 132 ng/ml für N-Desmethylclozapin, 42 ng/ml für Quetiapin und 59 ng/ml für Perazin.**

Mit der hier vorgestellten HPLC-UV-Methode war es möglich Clozapin, Olanzapin, Quetiapin und Perazin innerhalb von 25 Minuten zu bestimmen.

Einer der Gründe für ein therapeutisches Drug Monitoring ist, dass von der verabreichten Dosis keine Rückschlüsse auf den im Patienten aufgebauten Blutspiegel gezogen werden können. Dies zeigte sich auch für die in Abbildung 40 aufgetragene Dosis der Neuroleptika Olanzapin, Quetiapin, Clozapin und Perazin gegen den, mit der hier vorgestellten Methode, gemessenen Blutspiegel. Alle Patienten wurden seit mindestens 7 Tagen mit dem jeweiligen Neuroleptikum behandelt. Die Dosis wurde in diesem Zeitraum nicht verändert.



**Abbildung 40: Dosis (mg/Tag) aufgetragen gegen die gemessenen Blutspiegel (ng/ml) von Olanzapin (n= 120), Quetiapin (n= 295), Clozapin (n= 120) und Perazin (n= 75)**

Es herrschte eine hohe Variabilität zwischen der Dosis und den Blutspiegeln. In Tabelle 66 finden sich noch mehr Ergebnisse aus den statistischen Berechnungen der ausgewerteten TDM-Bögen und dem gemessenen Blutspiegel.

**Tabelle 60: Tagesdosis (mg/Tag) der verabreichten Antipsychotika und die daraus resultierenden Blutspiegel (ng/ml)**

	Clozapin	N-Desmethyloclapin	Olanzapin	Quetiapin	Perazin
Anzahl der Patienten	120	120	120	295	75
<b>Tagesdosis</b>					
MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> (mg/Tag)	278±156		20±8	595±306	196±127
Median	250		20	600	200
25. – 75. Percentile	150 - 375		15 - 25	400 - 800	100 - 250
Bereich	25 - 700		5 - 40	50 - 1400	25 - 600
<b>Plasmakonzentration</b>					
MW <sup>1</sup> ±SD <sup>2</sup> (ng/ml)	328±195	219±126	48±27	139±136	71±52
Median	315	204	45	102	50
25. – 75. Percentile	169 - 438	119 - 285	30 - 59	49 - 187	30 - 111
Bereich	25 - 945	27 - 581	8 - 158	3 - 996	7 - 190

<sup>1</sup>MW = Mittelwert

<sup>2</sup>SD = Standardabweichung

Zum Zeitpunkt der Entwicklung der hier vorgestellten Methode war über wirksame Blutspiegel und den Einsatz von Therapeutischem Drug Monitoring für Quetiapin noch wenig bekannt und so richtete sich der Fokus vor allem auf diesen Arzneistoff. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst und veröffentlicht [78]. Untersucht wurden 295 Blutproben von 131 Patienten (im Alter von 16 bis 86 Jahren, 51% Frauen), die 50 bis 1400 mg Quetiapin pro Tag (median 600 mg/Tag) eingenommen hatten. Die gemessenen Blutspiegel reichten von nicht detektierbar (< 5 ng/ml) bis 996 ng/ml. Im

Median waren die Blutspiegel 102 ng/ml, die 25. und 75. Perzentile betragen 49 ng/ml und 187 ng/ml. Der 25- bis 75-Prozent-Bereich stimmte gut überein mit dem, der in einer Placebo-kontrollierten Studie zur Wirksamkeit von Quetiapin gefunden wurde [79]. In dieser Studie wurde als Ergebnis eine Spanne von 22 bis 169 ng/ml als therapeutisch wirksam beschrieben. 40 bis 170 ng/ml können daher als orientierender Zielbereich für die Eindosierung von Patienten auf Quetiapin unter TDM-Kontrolle angesehen werden. Zwischen der Quetiapin-Dosis und den gemessenen Blutspiegeln konnte keine signifikante Korrelation ( $r=0.313$ ;  $P>0.05$ ) ermittelt werden. Bei Blutspiegeln über 500 ng/ml waren Nebenwirkungen häufig. TDM von Quetiapin scheint sinnvoll, da wegen der hohen interindividuellen Variabilität der Pharmakokinetik von Quetiapin aus der verordneten Dosis, die resultierenden Blutspiegel nicht vorhersagbar sind. Bei welchen Blutspiegeln von Quetiapin, die Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens am größten ist, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

#### 4.4.2 Bestimmung von Ziprasidon (Zeldox®) in der klinischen Routine

In Abbildung 41 wurde die Dosis gegen den, mit der hier vorgestellten Methode, gemessenen Blutspiegel (n=53) aufgetragen. Alle Patienten wurden seit mindestens 7 Tagen mit Ziprasidon (Zeldox®) behandelt. Die Dosis (40-280 mg/Tag) wurde in diesem Zeitraum nicht verändert.

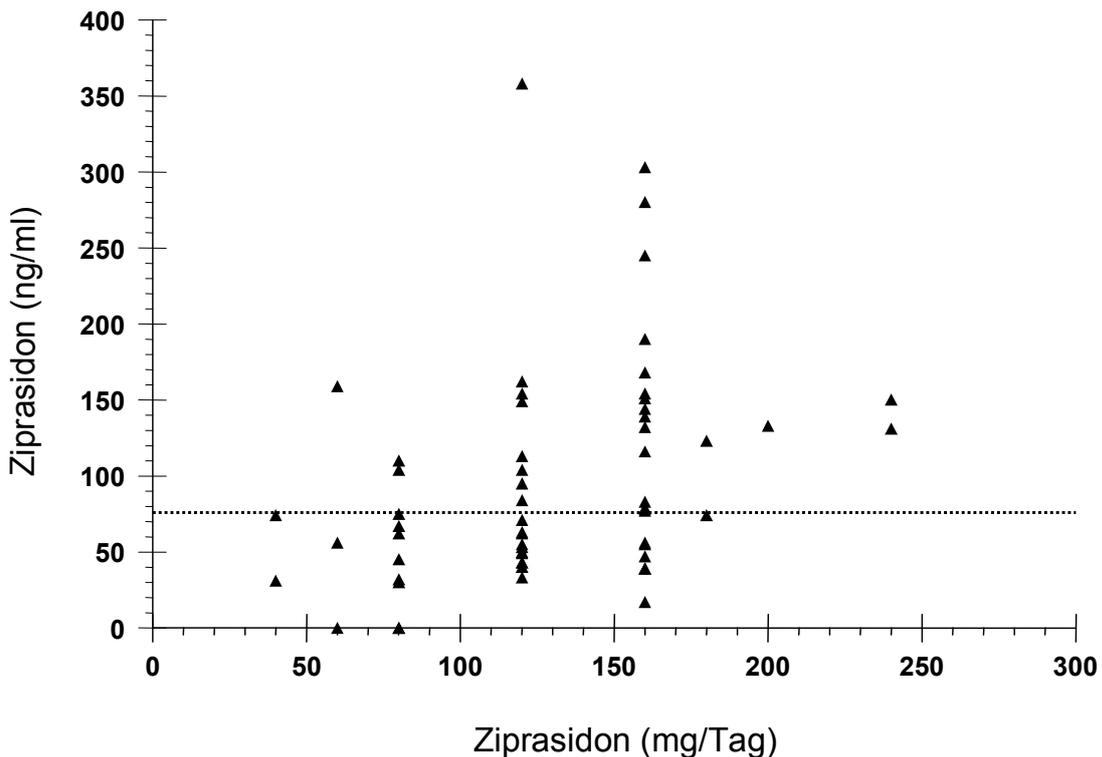


Abbildung 41: Dosis (mg/Tag) aufgetragen gegen die gemessenen Blutspiegel (ng/ml) von mit Ziprasidon behandelten Patienten (n= 53). Die gestrichelte Linie zeigt die mediane Konzentration von 76 ng/ml.

Deutlich erkennt man, wie wenig vorhersehbar auch in diesem Fall der resultierende Blutspiegel im Patienten ist.

Untersucht wurden Blutproben von 67 schizophrenen Patienten (23 Männer und 44 Frauen im Alter von 19 bis 63 Jahren), die mit Ziprasidon behandelt wurden. Alle Patienten nahmen über mindestens 7 Tage eine stabile Tagesdosis ein. Das Blut wurde den Anforderungen des TDM entsprechend morgens vor der ersten Dosis abgenommen. Eine erste statistische Auswertung, ergibt folgendes:

**Tabelle 61: Statistische Auswertung der Ergebnisse aus 67 Patientenproben**

Tagesdosis (mg/Tag):

MW	SD	SEM	median	25. Percentile	75. Percentile	Minimum	Maximum	Anzahl
131	43	6	120	120	160	40	240	58

Plasmaspiegel schizophrener Patienten im "steady state" (ng/ml):

MW	SD	SEM	median	25. Percentile	75. Percentile	Minimum	Maximum	Anzahl
94	71	9	76	43	131	0	358	67

Man kann also einen vorläufigen therapeutischen Bereich von 40 bis 130 ng/ml formulieren. Natürlich ist diese Auswertung nur ein Anfang und weitere umfangreichere Studien müssen folgen.

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine HPLC-Methode zu entwickeln, mit der sich möglichst viele unterschiedliche Antidepressiva und Antipsychotika mit ausreichender Präzision, Sensitivität und Selektivität innerhalb einer halben Stunde bestimmen lassen und die für das therapeutische Drug Monitoring geeignet ist. Es wurden drei unterschiedliche HPLC-Methoden mit Säulenschaltung aufgebaut und optimiert, zwei Applikationen mit Säulenschaltung und UV-Detektion und eine mit massenspektrometrischer Detektion. Eine der HPLC-UV-Methoden und die LC-MS-Methode wurden für Antipsychotika validiert. Die Methoden erfüllten beide die für einen Einsatz in der klinisch-chemischen Routine geforderten Qualitätskriterien. Für eine der HPLC-UV-Methoden wurde gezeigt, dass sie für das TDM bei der Behandlung von psychiatrischen Patienten geeignet ist.

### Selektion des Vorsäulenmaterials

Bei einer HPLC mit Säulenschaltung bestimmen das Vorsäulenmaterial und die dafür benutzten mobilen Phasen wesentlich die Qualität der anschließenden Trennung auf der analytischen Säule. Die Vorsäule soll möglichst 100% des Arzneistoffs abfangen. Daher war es ein erstes Ziel der Entwicklungsarbeiten, ein Material zu finden, das alle interessierenden Medikamente und – wenn vorhanden – auch die aktiven Metaboliten aus einer Serum- oder Plasmaprobe reteniert, während störende Matrixbestandteile, wie Plasmaproteine oder Lipide nicht festgehalten werden. Desweiteren sollen die zu messenden Substanzen durch den analytischen Eluenten vollständig eluiert werden. Mit Blick auf die Säulenschaltung ist es darüber hinaus sehr wichtig, dass das Festphasenmaterial der Vorsäule eine gute Regenerationsfähigkeit besitzt, d.h. der Auftrags- und Elutionszyklus soll möglichst oft wiederholbar sein.

Um die Materialeigenschaften der Vorsäule zu prüfen, wurden so genannte „breakthrough“-Versuche durchgeführt. Diese „Durchbruchversuche“ basierten auf einem Artikel von Ooms und Mitarbeitern [69]. Wenn die Vorsäule in den Fluß eines Eluenten geschaltet wurde, der die zu retenierende Substanz enthielt, musste die Extinktion innerhalb kurzer Zeit auf das Niveau des Puffers abfallen. War die Kapazität erschöpft, sollte die Extinktion möglichst ebenso rasch wieder ansteigen wie sie zuvor bei der Beladung der Vorsäule abfiel und so den „Durchbruch“ der Säule anzeigen. Die Extinktionskurve sollte also steil abfallen und ansteigen. Die Güte des Materials wird dabei insbesondere durch den Wiederanstieg der Extinktion beschrieben. Erwünscht ist ein scharfer Anstieg der Kurve nach dem Durchbruch. Nach diesem Prinzip wurden 5 unterschiedliche Säulenmaterialien getestet.

Sowohl die C8 (20 µm 10x4.0 mm I.D., MZ-Analysentechnik) als auch die Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule zeigten den optimalen Kurvenverlauf und waren demnach für die geplanten Untersuchungen geeignet.

Wiederholte Durchbruchversuche wurden an einer Säule durchgeführt, um die Regenerierbarkeit des Materials zu prüfen. Diese Eigenschaft zu untersuchen ist wichtig, wenn das Material wie bei der Säulenschaltung wiederholt benutzt wird. Für diese Untersuchung wurde die Vorsäule nach einem ersten Durchbruchversuche mit 80% Acetonitril gewaschen und dann wieder beladen und ein erneutes

Durchbruchexperiment durchgeführt. Nur mit dem Hypersil-CN- (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) und dem C8-Vorsäulematerial (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) konnte das Elutionsprofil des ersten Durchbruchversuch reproduziert werden.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Vorsäule ist auch die Lebenserwartung oder Standzeit, d.h. wie viele Messungen ohne Wechsel durchgeführt werden können. Eine gute Vorsäule sollte mindestens 100 Injektionen mit Plasma bzw. Serum ohne nennenswerte Verschlechterung aushalten. Hypersil-CN-Material, das zuvor bei den Durchbruchversuchen gut abgeschnitten hatte, überstand nur 30 Injektionen. Danach stieg der Druck auf über 350 bar an und der Versuch musste abgebrochen werden. Nach diesen Versuchen waren nur das CN- und C8-Material der Firma MZ-Analysentechnik geeignet.

Um die Vorsäule hinsichtlich Selektivität zu testen, wurden 18 verschiedene Arzneistoffe auf dem Säulenmaterial angereichert und eluiert. Auch bei diesem Test verhielten sich die Vorsäulen unterschiedlich. Nur das C8-Vorsäulenmaterial retenierte alle Arzneistoffe. Quetiapin, Reboxetin und D-Sertralin ließen sich weder mit der CN (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) noch mit der Hypersil-CN (10 µm 10x4.0 mm I.D. ict-Bad Homburg) Vorsäule extrahieren.

Somit fiel nach den umfangreichen Testungen die Entscheidung auf das C8-Material für die Probenvorreinigung. Warum die Eigenschaften der verschiedenen Materialien so unterschiedlich waren, ist unklar. Die fehlende Retention von Einzelsubstanzen auf CN-Material könnte man ursächlich auf unterschiedliche physikochemische Eigenschaften von C8 und CN-Trägermaterial zurückführen, die auch aus der Benutzung von CN- und C8-Material zur Substanztrennung auf der analytischen Säule bekannt ist. Die Ergebnisse der Durchbruchversuche zeigen in jedem Fall, dass die Durchführung solcher Materialprüfungen ein fester Bestandteil bei der Entwicklung von neuen HPLC-Methoden mit Säulenschaltung sein sollte.

Ähnliche systematische Untersuchungen zur Testung von Vorsäulenmaterial für die Analytik von Psychopharmaka sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Daher können die eigenen Ergebnisse dieses Versuchsabschnittes nicht mit den Befunden anderer Untersucher verglichen werden. Der erfolgreiche anschließende Einsatz des Materials innerhalb der Säulenschaltung, sowohl für die HPLC-UV- als auch für die LC-MS-Methode, zeigte, dass sich durch Durchbruchversuche die Verwendbarkeit des Materials sehr gut vorhersagen lässt.

## HPLC-UV-Methoden

Für die Entwicklung einer „Multi“-HPLC-UV-Methode, die möglichst viele verschiedene Antidepressiva und Antipsychotika erfassen sollte, wurden die Methodenparameter für die Trennung optimiert. Ausgangsmethoden waren solche, die im Neurochemischen Labor der Mainzer Psychiatrischen Klinik für trizyklische Antidepressiva [41, 47, 57] und neue Antidepressiva vom Typ Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) entwickelt worden sind [56, 59, 71]. Dabei besteht bei einer Methode, die viele Analyte erfassen soll, das grundsätzliche Problem, dass Bedingungen, die für eine Substanz optimal sind für eine andere suboptimal sein können. Für den Optimierungsprozess wurden im ersten Schritt in der Regel Modellsubstanzen verwendet und dann die Anwendbarkeit des Verfahrens für andere Substanzen überprüft.

Für die erste entwickelte Multi-HPLC-UV-Methode wurden 7 verschiedene analytischen Säulen getestet. Es wurden Injektionsvolumen, Detektionswellenlänge, Zeitschema für das Schaltventil, Temperatur und Fluss optimiert. Mit der optimierten Methode konnten 20 verschiedene Psychopharmaka einschließlich ihrer Metabolite, insgesamt 30 verschiedene Substanzen quantitativ erfasst werden. Die Analysenzeit betrug maximal 30 Minuten. Die Vorsäule wurde nach 150 Injektionen (entspricht einem Volumen von 15 ml Plasma) ausgewechselt. Die analytische Säule konnte mit mehr als 300 Plasmainjektionen belastet werden, bevor sie ausgetauscht werden musste.

Die Analyse von Patientenproben zeigte, dass die Methode für das TDM in der Routine möglich ist und ebenso funktionstüchtig ist wie etablierte Methoden für Einzelsubstanzen [41, 47, 56-59, 69, 71]. Für einen Einsatz steht allerdings noch eine Validierung aus. Eine Validierung, die nicht durchgeführt wurde, müsste für diese Applikation in Gruppen erfolgen. Denn alle Substanzen sind in einer Probe nicht analysierbar, weil einige Substanzen zu gleichen oder sehr ähnlichen Retentionszeiten eluieren. Dies ist für Patientenproben nicht relevant, da die interferierenden Substanzen nicht am gleichen Patienten gegeben werden, z.B. zwei SSRI. Bei einem Einsatz für TDM müssten je nach Analyt unterschiedliche Injektionsvolumina, Meßwellenlängen (210, 226 und 254 nm) und interne Standards verwendet werden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Damit zeigen sich die Grenzen der Auflösung einer HPLC-UV-Methode. Mit dieser Applikation und auch mit der zweiten sind in einem Lauf realistisch fünf bis sechs Substanzen in einer Probe messbar.

Durch Veränderung einer im Labor bereits etablierten Methode von Weigmann und Mitarbeitern [72] wurde es möglich, Clozapin (+ Desmethylclozapin), Olanzapin, Perazin und Quetiapin mit ein und derselben Methode zu bestimmen. Mit kleinen Modifikationen war die Methode auf Ziprasidon erweiterbar.

Die Ausgangsmethode, die für Olanzapin und Clozapin entwickelt wurde [72], wies einige Schwachpunkte auf:

- Der Anreicherungs-eluent (Puffer) musste, aufgrund der fehlenden Konservierung, täglich frisch zubereitet werden.
- Der Druck auf der Anreicherungssäule stieg nach Injektion von nur 20 Plasmaproben auf über 350 bar an, was einen Austausch der Säule erforderlich machte. Wegen der anschließend notwendigen Equilibrierung einer neuen Säule vergehen ein bis zwei Stunden, bevor das System wieder einsatzbereit ist.
- Quetiapin war mit dieser Methode nicht nachweisbar.

Die Probleme wurden durch folgende Modifikationen gelöst:

Der Anreicherungs-eluent wurde auf 8% Acetonitril in Wasser umgestellt. Acetonitril unterdrückt das Wachstum von Mikroorganismen, so dass der Eluent über Wochen haltbar ist und nicht täglich angesetzt werden muss.

Nach den Durchbruchversuchen war C8-modifiziertes Kieselgel in der Anreicherungssäule (20 µm 10x4.0 mm I.D. MZ-Analysentechnik) am besten geeignet. Dieses wurde auch in der zweiten Applikation eingesetzt. Der Druck blieb

nach Injektion von mehr als 150 Plasmaproben stabil. Von den untersuchten 53 Substanzen zeigten mit Ausnahme von 7 alle ein UV-Signal. Die Signalstärke war allerdings zu schwach, um Substanzen wie Reboxetin, Haloperidol oder Risperidon in therapeutischen Konzentrationen zu erfassen. Als TDM-Methode scheint diese Applikation für etwa 15 verschiedene Psychopharmaka einsetzbar zu sein.

Eine Validierung, die umfassend nach den NCCLS-Richtlinien erfolgte, wurde für Clozapin, Desmethylclozapin, Perazin, Quetiapin und Olanzapin durchgeführt. Fluperlapin blieb als interner Standard verwendbar.

Für den Einsatz im therapeutischen Drug Monitoring muss eine Methode hinsichtlich folgender Parameter überprüft werden: Spezifität, Sensitivität, Linearität, Genauigkeit, Präzision, untere und obere Nachweisgrenze, Wiederfindung, Stabilität und Interferenzen [80, 54]. Die Methode sollte auch mit realen Patientenproben geprüft werden. Der bei der Präzision erhaltene Wert des Variationskoeffizienten liegt idealerweise unter 10%. Die Werte für die Wiederfindung sollten so dicht wie möglich an die 100% kommen.

Im Zuge dieser Validierung wurde auch eine umfangreiche Prüfung der Stabilität der verschiedenen Substanzen bei Transport und Lagerung durchgeführt [73]. Ohne nennenswerte Veränderungen in der Konzentration ließen sich Proben bei -20 °C über drei Monate lang lagern. Olanzapin sollte man bei Raumtemperatur nicht länger als 7 Tage aufbewahren, denn dann verändert sich die messbare Konzentration merklich.

Die Methode erfüllte alle von einer Validierung geforderten Gütekriterien [80]. Bei der Bestimmung der Präzision lag der Variationskoeffizient (VK%) zwischen 0.77 und 7.64 %. Ein Variationskoeffizient von 10% wird beim TDM als ausreichend angesehen [80]. Ein kleinerer Variationskoeffizient ist aus medizinischer Sicht nicht erforderlich. Linearität bewiesen Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) zwischen 0.9765 und 0.9816. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate lag in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes (-0.0248 bis -0.3847). Die absolute und analytische Wiederfindung lag zwischen 98 und 118 %. Die für das TDM erforderlichen unteren Nachweisgrenzen wurden erreicht. Sie hätte bei allen Substanzen noch weiter herabgesetzt werden können, da der Variationskoeffizient (VK%) bei den gewählten niedrigsten Konzentrationen immer unter 5 % lag. Eine Messung der Arzneistoffe im Picogramm-Bereich kann zwar forensisch von Interesse sein, aber nicht für das TDM. Für TDM möchte man wissen, ob der Patient den therapeutischen Bereich erreicht oder nicht d.h. eine untere Nachweisgrenze von beispielsweise 5 ng/ml ist für Olanzapin vollkommen genügend [14, 81].

Erhöhte Konzentrationen an Hämoglobin und Bilirubin interferierten nicht mit der Analyse. Der Triglyceridgehalt hatte einen geringen Einfluss. Ab einer Triglycerid-Konzentration von  $\geq 1570$  mg/dl war die absolute Wiederfindung reduziert, von Clozapin ( $70\pm 10\%$ ), N-Desmethylclozapin ( $85\pm 8\%$ ) und Perazin ( $61\pm 11\%$ ). Der Effekt war bei Quetiapin ( $87\pm 7\%$ ) und Olanzapin ( $99\pm 9\%$ ) nicht so stark. Ein Grund für die niedrigeren Clozapin- und Perazin-Werte könnte die Abtrennung der mit Triglyceriden durchsetzten fettigen Phase vom Plasma bzw. Serum durch Zentrifugation vor der Aufgabe auf das HPLC-System sein. Nach der Zentrifugation wurde der fettige Überstand dekantiert und mit ihm wahrscheinlich darin gelöste Substanzen. Ein Verzicht auf das Abtrennen der fettigen Phase könnte dieses Problem beheben.

Doch dabei ist damit zu rechnen, dass die Vorsäule oder die analytische Säule Schaden nimmt. Bei physiologischen Triglyceridkonzentrationen besteht das Problem nicht, erst bei pathologischen Werten (Grenze 528 mg/dl).

Bei der Verwendung eines UV-Detektors kann es zu Interferenzen mit gleichzeitig verabreichten Arzneimitteln kommen, wenn sie zu ähnlichen Zeiten eluiert werden und bei der gleichen Wellenlänge absorbieren. Eine Interferenz bestand mit Oxazepam (RT 10.6 min) und N-Desmethylcitalopram (RT 10.3) mit N-Desmethylclozapin (RT 10.4 min) und eine von Temazepam (RT 13.8 min) mit Quetiapin (RT 13.9 min). Daran sollte bei einer möglichen Kombination beider Arzneistoffe gedacht werden.

Die Methode hat sich bei der Anwendung in der Routine bewährt. Sie war stabil und lieferte zuverlässige Werte, die durch die Teilnahme an externen Ringversuchen bestätigt wurden. Die Applikation wurde inzwischen auch von anderen Labors für das TDM übernommen.

Am Beispiel von Ziprasidon konnte gezeigt werden, dass die Methode leicht erweiterbar ist, um neue Substanzen zu integrieren. Nach der Markteinführung von Zeldox<sup>®</sup> (Ziprasidon) kamen erste Anfragen, ob eine Blutspiegelmessung bereits möglich sei. Durch eine geringfügige Variation der HPLC-UV-Methode, war es möglich Ziprasidon zu erfassen. Der einzige Parameter, der verändert wurde, war der Acetonitrilgehalt des analytischen Eluenten. Er wurde von 37.5% auf 50% erhöht. Die Analysenzeit verkürzte sich auf 20 Minuten.

Die Messmethode für Ziprasidon wurde ebenfalls nach den NCCLS –Richtlinien validiert und erwies sich demnach für geeignet. Bei der Bestimmung der Präzision lag der Variationskoeffizient (VK%) zwischen 0.24 und 6.06 %. Linearität bewies ein Korrelationskoeffiziente ( $R^2$ ) von 0.999. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate lag in der Nähe des Nullpunktes (-0.023). Die absolute und analytische Wiederfindung lag zwischen 96 und 101 %. Die untere Nachweisgrenze wurde mit 10 ng/ml festgesetzt. Da der Variationskoeffizient (VK%) hier mit 3% sehr niedrig war, hätte man die untere Nachweisgrenze auch noch wesentlich tiefer anlegen können. 43 verschiedene Substanzen wurden auf ein mögliches Interferenzpotential überprüft. Gefunden wurde eine Interferenz von Trimipramin (RT 11.8 min) und Clomipramin (RT 12.8). Auch werden Fluoxetin und N-Desmethyltrimipramin sehr dicht vor dem internen Standard Fluperlapin eluiert. Daran sollte bei einer möglichen Kombination dieser Arzneistoffe gedacht werden.

#### LC-MS-Methode

Mit der simultanen Analyse von 5 Substanzen wurde ein wesentliches Ziel der Arbeit erreicht, nämlich so viele verschiedene Arzneistoffe wie möglich mit einer Methode zu messen. Doch aus den bereits oben aufgeführten Gründen scheint die Kapazität einer HPLC-UV-Methode mit einer Anzahl von etwa 5 Analyten ausgeschöpft zu sein.

Um die durch die Technik der HPLC mit UV-Detektion vorgegebene Grenze zu überwinden, kam ein Massenspektrometer zum Einsatz. Eine neue Welt mit ungeahnten Möglichkeiten eröffnete sich. Nach Optimierung von Säulen, Eluenten und anderer Parameter gelang es, 8 Neuroleptika und ihre Metabolite in einer Probe mit ausreichender Präzision und Sensitivität innerhalb weniger Minuten zu

analysieren: Amisulprid, Clozapin (+ N-Desmethylozapin + Clozapin-N-Oxid), Haloperidol, Risperidon (+ 9-Hydroxyrisperidon), Olanzapin, Perazin (+ N-Desmethylperazin), Quetiapin und Ziprasidon. Ausgangspunkt war eine Veröffentlichung von Kratzsch et al. (2003) [52].

Die bereits bei der Entwicklung der HPLC-UV-Methode erfolgreich eingesetzte C8 (20 µm 10x4.0 mm MZ-Analysentechnik) Vorsäule zeigte sich auch hier allen anderen Materialien als überlegen.

Als analytische Säule wurde eine Synergi MAX-RP C12 (4 µm 150 x 4.6 mm Phenomenex) verwendet.

Im Unterschied zur Probenvorbereitung für die HPLC-UV-Methode, mussten die Proteine vor der Messung präzipitiert werden. Dabei war im Fällungsreagenz der interne Standard enthalten und eine spätere Zugabe durch den Autosampler nicht notwendig.

Die Verwendung von Mikrotiterplatten verkürzte die Probenvorbereitung erheblich. Die Probe wurde in der Mikrotiterplatte mit dem Fällungsreagenz versetzt, zentrifugiert und gemessen. Bis zu 96 Proben fanden auf einer Mikrotiterplatte Platz. Die Validierung der HPLC-MS-Methode erfolgte nach Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration). Die Verwendung des Massenspektrometers erlaubte es, alle für die Validierung relevanten Substanzen in eine Probe zu geben und in einem Lauf zu bestimmen. Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die vorliegende Methode über den gesamten Messbereich linear war. Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) lagen zwischen 0.9974 und 0.9999. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate befand sich in allen Fällen in der Nähe des Nullpunktes. Bei der Bestimmung der Präzision lag der Variationskoeffizient (VK %) zwischen 0.84 und 9.78 %. Als untere Nachweisgrenze wurde die Konzentration gewählt, bei der die „accuracy“ von allen sechs Messungen am Tag 0 immer kleiner als  $\pm 20\%$  war. Damit ergaben sich folgende untere Nachweisgrenzen: Amisulprid 50 ng/ml, Clozapin 50 ng/ml, N-Desmethylozapin 25 ng/ml, Clozapin-N-oxid 2.5 ng/ml, Haloperidol 1 ng/ml, Olanzapin 2.5 ng/ml, Perazin 10 ng/ml, N-Desmethylperazin 10 ng/ml, Risperidon 1 ng/ml, 9-Hydroxyrisperidon 2.5 ng/ml, Quetiapin 10 ng/ml und Ziprasidon 10 ng/ml.

Die eigene Methode war bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren überlegen. Eine 2003 veröffentlichte HPLC-MS-Methode mit vorangehender Flüssig-flüssig-Extraktion von Goeringer et al. [53] gibt als untere Nachweisgrenze Werte von 10 ng/ml für Risperidon und 50 ng/ml für 9-Hydroxyrisperidon an. Dies ist nicht ausreichend. Denn der therapeutische Bereich ist für Risperidon 2-40 ng/ml und für 9-Hydroxyrisperidon 10-60 ng/ml. Die Hälfte der unteren Konzentration des therapeutischen Bereichs sollte man mit einer Methode noch erfassen können. Die eigene entwickelte HPLC-MS-Methode hatte für Risperidon eine untere Nachweisgrenze von 1 ng/ml ergeben. Für den Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon die Grenze bei 2.5 ng/ml. Eine obere Nachweisgrenze konnte (nach diesen Kriterien) bei allen Substanzen bis zu einer Konzentration 1000 ng/ml nicht festgestellt werden. Getestet wurde auch die „in-Process“-Stabilität. Proben wurden dafür nach der Herstellung für 24h bei Raumtemperatur gelagert und dann erst gemessen. Sowie nach der Extraktion und Messung für 24h im Autosampler belassen und anschließend ein 2. Mal analysiert. Die Werte für den Variationskoeffizienten (VK%) lagen bei der 24stündigen Lagerung bei Raumtemperatur zwischen 1.46 und 7.79% und bei der 24stündigen Aufbewahrung im Autosampler zwischen 0.8 und 7.68%. Für Amisulprid und Clozapin verschlechtert sich die accuracy, wenn die präzipitierte Probe 24 Stunden im Autosampler stand. Eine Messung sollte besser direkt im Anschluß an die Proteinpräzipitation erfolgen.

Es wurde ebenfalls kontrolliert, ob ein mehrfaches Auftauen und wieder Einfrieren Auswirkungen auf das Ergebnis hat. Die Methode erwies sich als stabil. Der Variationskoeffizient (VK%) lag zwischen 0.84 und 9.23%.

Überprüft wurde auch das mögliche Auftreten einer Ion Suppression. Es ergaben sich keine Hinweise darauf. Die absolute und analytische Wiederfindung lag zwischen 89 und 107 %. Am Ende der erfolgreichen Validierung wurden Patientenproben, die in Mainz mit der HPLC-UV-Methode gemessen worden waren, auf Trockeneis lagernd nach Denver geschickt und dort mit der LC-MS-Methode noch einmal quantitativ bestimmt. Die Anzahl der Proben war für eine statistische Auswertung zwar nicht groß genug, lieferte aber erste Vergleichswerte. Für Olanzapin fand sich eine hohe Übereinstimmung aller Werte, bis auf einen möglicherweise falsch positiven Olanzapinwert bei der UV-Detektion. Tendenziell lagen die mit der HPLC-UV-Methode gefundenen Werte höher. Kritisch betrachtet, könnte dies durch Ion Suppression verursacht sein. Durch eine unterdrückte Ionisierung werden zu niedrige Werte gemessen. Vor der Anwendung an Patienten sollte diese Methode noch einmal ausführlicher in dieser Richtung überprüft werden.

Sehr vielversprechend erscheint eine Erweiterung der Methode. Es wurden 15 verschiedene Antidepressiva inklusive ihrer Metabolite testweise mit der Methode gemessen. Alle 37 Substanzen wurden mit ihren jeweiligen  $[M+H]^+$ -Ions erfasst. Ein erster Linearitätsversuch verlief positiv. Der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) lag zwischen 0.9981 und 1. Der Schnittpunkt der Ordinate lag in der Nähe des Nullpunkts. Diesen Ergebnissen sollte in einer weiteren Arbeit unbedingt nachgegangen werden. Die Methode könnte so auf mindestens 37 Substanzen erweitert werden.

In den letzten vierzig Jahren wurden zahlreiche Methoden veröffentlicht mit deren Hilfe sich Arzneistoffe qualitativ und quantitativ in Blut, Serum, Plasma, Urin, Schweiß oder anderen biologischen Matrices bestimmen lassen [82, 83]. Bei forensischen Untersuchungen oder akuten Vergiftungsfällen in der Toxikologie sollte die Methode ein breites Spektrum an Substanzen innerhalb kürzester Zeit detektieren können [55, 84]. Bei den für das therapeutische Drug Monitoring verwendeten Methoden steht vor allem die Quantifizierung im Vordergrund.

Anstelle des bei den Untersuchungen verwendeten variablen UV-Detektors kann auch ein Diodenarraydetektor verwendet werden. Hierbei eröffnen sich weitere Möglichkeiten. Anhand der Kombination von Retention und UV-Spektrum lassen sich 300 und mehr Substanzen mit einer Methode qualitativ nachweisen [55]. Allerdings verlangt die im Vergleich zum Massenspektrometer geringe Sensitivität eine aufwendige Probenvorbereitung oder aber die Beschränkung der Messung auf Urinproben.

Bei Einsatz eines Massenspektrometers als Detektor an die HPLC-Anlage steigen allerdings die Anforderungen an Budget und Personal. Doch wie gezeigt, ist die Detektion mit einem MS der mit einem UV-Detektor deutlich überlegen. Das MS ist wesentlich sensitiver und kann ohne die Gefahr von Interferenzen viele Arzneistoffe auf einmal erfassen. Erste Methoden wurden für den Nachweis von Psychopharmaka bereits publiziert [53, 84, 85], allerdings mit aufwändiger Probenvorbereitung. In der hier vorgestellten LC-MS-Methode erfolgte nur eine Proteinpräzipitation mit anschließender Zentrifugation. Dann wird die Messung sofort gestartet.

Bei Verwendung eines Massenspektrometers mit chemischer Ionisation unter Atmosphärendruck oder aber besonders bei der Elektronensprayionisierung sollte unbedingt eine mögliche Ion Suppression ausgeschlossen werden [86].

Bei der Ion Suppression kann die Ionisierung des Analyten durch koeluiierende Substanzen erniedrigt werden. Die gemessenen Konzentrationen sind dann niedriger als sie tatsächlich sind. Durch Veränderung der Probenvorbereitung können solche Matrixeffekte vermindert werden. Bei einer Validierung einer MS-Methode muss daher ausser Spezifität, Sensitivität, Linearität, Genauigkeit, Präzision, untere und obere Nachweisgrenze, Wiederfindung, Stabilität und Interferenzen auch eine möglicherweise vorhandene Ion Suppression untersucht werden [84]. In vielen Veröffentlichungen sind die Angaben zu den Validierungsergebnissen lückenhaft und erschweren eine Beurteilung der dort beschriebenen Methode.

### Praxistauglichkeit der HPLC-UV-Methode

Um die Praxistauglichkeit zu beweisen, wurde die validierte HPLC-UV-Methode an Patienten eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Entwicklung der HPLC-UV-Methode war über wirksame Blutspiegel und den Einsatz von therapeutischem Drug Monitoring für Quetiapin und Ziprasidon noch wenig bekannt und so richtete sich der Fokus vor allem auf diese Arzneistoffe. Zwischen der Quetiapin-Dosis und den gemessenen Blutspiegeln konnte keine signifikante Korrelation ( $r=0.313$ ;  $P>0.05$ ) ermittelt werden. Bei Blutspiegeln über 500 ng/ml waren Nebenwirkungen häufig. Im Median waren die Blutspiegel 102 ng/ml, die 25. und 75. Perzentile betragen 49 ng/ml und 187 ng/ml. Der 25- bis 75-Prozent-Bereich stimmte gut überein mit dem, der in einer Placebo-kontrollierten Studie zur Wirksamkeit von Quetiapin gefunden wurde [79]. In dieser Studie wurde als Ergebnis eine Spanne von 22 bis 169 ng/ml als therapeutisch wirksam beschrieben. 40 bis 170 ng/ml können daher als orientierender Zielbereich für die Eindosierung von Patienten auf Quetiapin unter TDM-Kontrolle angesehen werden [78]. Es bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, um diesen Wert zu untermauern.

Ziprasidon ist nach Clozapin, Risperidon, Olanzapin und Quetiapin das fünfte atypische Antipsychotikum. Es wurde im Mai 2002 in Deutschland zugelassen. Ziprasidon bindet stark an Serotonin-5HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren und Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren und wirkt dort antagonistisch [87, 88]. Man nimmt an, dass dadurch zum Teil die antipsychotische Wirkung entsteht. Ebenso bindet Ziprasidon an die Serotonin-Rezeptorsubtypen 2C, 1D und 1A und hemmt die neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin [87].

Als Antipsychotikum zeigt es Wirkung bei Positiv- und Negativsymptomatik, aber auch bei depressiven Symptomen im Rahmen einer akuten Exazerbation einer Schizophrenie oder schizoaffektiven Störung [89, 90]. Nebenwirkungen sind selten [91, 92]. Klinisch wirksam zeigte sich ein Dosisbereich von 80 bis 160 mg pro Tag. Ziprasidon wird extensiv metabolisiert und hat eine Halbwertszeit von 7 Stunden [93]. Die Metaboliten tragen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht zu der antipsychotischen Wirkung bei [93]. Der extensive Metabolismus und die interindividuell so unterschiedliche Ausstattung jedes Menschen an metabolisierenden Enzymen lassen bereits vermuten, dass eine Vorhersage der Blutspiegel allein aus der verabreichten Dosis nur schwer möglich sein wird. Da das Therapeutische Drug Monitoring bereits seinen Nutzen bei einigen Antipsychotika bewiesen hat [18, 94, 81,95], erschien die Anwendung auch in diesem Fall sinnvoll. Nachdem die Bestimmung von Ziprasidon mit der hier entwickelten und beschriebenen Methode

möglich wurde, begann das Sammeln und Messen von Patientenproben. Untersucht wurden Blutproben von 67 schizophrenen Patienten.

Besonders die Bindung an D<sub>2</sub>-Rezeptoren und damit deren Blockade wird für die antipsychotische Wirkung verantwortlich gemacht [96-98]. Optimal ist dafür eine Blockade von 60 bis 80 %. Werden mehr Rezeptoren blockiert, kann es zu extrapyramidalmotorischen Nebenwirkungen kommen [99]. Eine Positronenemissionstomographie-Studie (PET-Studie) von Mamo et al. [100] zeigte, dass eine 60 bis 80 %ige D<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade bei Plasmakonzentrationen von 50 bis 130 ng/ml erreicht wird [100]. Dieser Bereich stimmt sehr gut mit der 25. und 75. Perzentile unserer Auswertung überein, nämlich 43-131 ng/ml.

Man kann also einen vorläufigen therapeutischen Bereich von 40 bis 130 ng/ml formulieren. Natürlich ist diese Auswertung nur ein Anfang und weitere umfangreichere Studien müssen folgen.

## 6. Zusammenfassung

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM), bei dem Konzentrationen von Medikamenten im Blut gemessen werden und mit dem klinischen Status des Patienten assoziiert werden, wird zur individuellen Dosiseinstellung genutzt, um die Effizienz der Medikamentenwirkung zu steigern und das Auftreten von Nebenwirkungen zu senken. Dies gilt auch für die Behandlung von Patienten Psychopharmaka. Bei TDM von Antipsychotika und Antidepressiva besteht allerdings das Problem, dass es mehr als 50 Medikamente gibt. Ein TDM-Labor für Psychopharmaka muss dementsprechend über 50 verschiedene Wirkstoffe im Blut messen können. Zum Teil müssen noch aktive Metaboliten miterfasst werden. Am besten geeignet sind dafür flüssigchromatographische Methoden (HPLC bzw. LC) mit Ultraviolettespektroskopie (UV) oder Massenspektrometrie (MS). Bei Einsatz von Säulenschaltung ist eine automatisierte Analyse von Blutplasma- oder -serum möglich. Auf einer Vorsäule können störende Matrixbestandteile mit oder ohne vorherige Proteinfällung abgetrennt werden. Nach Wechsel des Eluenten werden die zu messenden Substanzen auf der analytischen Säule getrennt und durch UV oder MS quantifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die die Messung möglichst vieler Antipsychotika und Antidepressiva erlaubt und für die TDM-Routine geeignet ist.

Eine mit C8-modifiziertem Kieselgel gefüllte Säule (20  $\mu\text{m}$  10x4.0 mm I.D.) erwies sich als optimal geeignet bezüglich Extraktionsverhalten, Regenerierbarkeit und Stabilität. Die C8-Phase extrahierte alle interessierenden Substanzen. Die Substanzen konnten nahezu vollständig mit 80% Acetonitril eluiert werden. Mit einer ersten HPLC-UV-Methode mit Säulenschaltung konnten 20 verschiedene Psychopharmaka einschließlich ihrer Metabolite quantitativ erfasst werden, insgesamt 30 verschiedene Substanzen. Die Analysenzeit betrug maximal 30 Minuten. Auf einer Vorsäule konnten 150 Plasmaproben vorgereinigt werden. Die analytische Säule konnte mit mehr als 300 Plasmainjektionen belastet werden, bevor sie ausgetauscht werden musste. Abhängig vom Analyten, musste allerdings das aufgegebenen Probenvolumen, die Flussrate oder die Detektionswellenlänge jeweils verändert werden. Daher war die Methode für eine Routineanwendung nur bedingt geeignet. Mit einer zweiten HPLC-UV-Methode konnten 43 verschiedene Antipsychotika und Antidepressiva inklusive Metaboliten nachgewiesen werden. Nach Vorreinigung über C8-Material (10  $\mu\text{m}$ , 10x4 mm I.D.) erfolgte die Trennung auf Hypersil ODS (5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße) in der analytischen Säule (250x4.6 mm I.D.) mit 37.5% Acetonitril im analytischen Eluenten. Die optimale Flussrate war 1.5 ml/min und die Detektionswellenlänge 254 nm. In einer Einzelprobe, konnten mit der Methode maximal 7 bis 8 unterschiedliche Substanzen gemessen werden. Für die Antipsychotika Clozapin, Olanzapin, Perazin und Quetiapin wurde die Methode validiert. Die Impräzision lag zwischen 0.2 und 6.1%. Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) zeigten Werte zwischen 0.9765 und 0.9816. Im erforderlichen Messbereich war die Methode damit linear. Die absolute und analytische Wiederfindung lagen zwischen 98 und 118 %. Die für das TDM erforderlichen unteren Nachweisgrenzen wurden erreicht. Für Olanzapin betrug sie 5 ng/ml. Nach geringfügiger Variation der HPLC-UV-Methode konnte auch Ziprasidon erfasst werden. Die validierte HPLC-UV-Methode erwies sich für die TDM-Routine als geeignet. Nach retrospektiver

Auswertung von TDM-Daten konnte erstmalig ein therapeutischer Bereich für Quetiapin (40-170 ng/ml) und Ziprasidon (40-130 ng/ml) formuliert werden.

Mit einem Massenspektrometer als Detektor gelang es, acht Neuroleptika und Metabolite, insgesamt 12 Substanzen, in einem Lauf zu bestimmen: Amisulprid, Clozapin, N-Desmethylozapin, Clozapin-N-oxid, Haloperidol, Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon, Olanzapin, Perazin, N-Desmethylperazin, Quetiapin und Ziprasidon. Die Vorreinigung erfolgte mit einer mit C8-Material gefüllten Säule (20 µm 10x4.0 mm MZ-Analysentechnik), und als analytische Säule wurde eine Synergi MAX-RP C12 (4 µm 150 x 4.6 mm Phenomenex) verwendet. Die Validierung der HPLC-MS-Methode erfolgte nach Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration). Die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) mit Werten zwischen 0.9974 und 0.9999 belegten einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal. Die Präzision lag mit Variationskoeffizienten (VK%) von 0.84 bis 9.78% im tolerablen Bereich. Die für das TDM erforderlichen unteren Nachweisgrenzen wurden erreicht. Es gab keine Hinweise auf das Auftreten von Ion Suppression durch Matrixbestandteile. Die absolute und analytische Wiederfindung lag zwischen 89 und 107 %. Es zeigte sich, dass die HPLC-MS-Methode ohne Modifikation erweitert werden kann und anscheinend mehr als 30 verschiedene Psychopharmaka erfasst werden können.

Mit der Entwicklung der flüssigchromatographischen Methoden stehen neue Verfahren für das TDM von Antipsychotika und Antidepressiva zur Verfügung, die es erlauben, mit einer Methode verschiedene Psychopharmaka und ihre aktiven Metabolite zu messen. Damit kann die Behandlung psychiatrischer Patienten insbesondere mit Antipsychotika verbessert werden.

## 7. Kurzzusammenfassung

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) wird zur individuellen Dosiseinstellung genutzt, um die Effizienz der Medikamentenwirkung zu steigern und das Auftreten von Nebenwirkungen zu senken. Für das TDM von Antipsychotika und Antidepressiva besteht allerdings das Problem, dass es mehr als 50 Medikamente gibt. Ein TDM-Labor muss dementsprechend über 50 verschiedene Wirkstoffe und zusätzlich aktive Metaboliten messen. Mit der Flüssigchromatographie (LC oder HPLC) ist die Analyse vieler unterschiedlicher Medikamente möglich. LC mit Säulenschaltung erlaubt eine Automatisierung. Dabei wird Blutserum oder -plasma mit oder ohne vorherige Proteinfällung auf eine Vorsäule aufgetragen. Nach Auswaschen von störenden Matrixbestandteilen werden die Medikamente auf einer nachgeschalteten analytischen Säule getrennt und über Ultravioletspektroskopie (UV) oder Massenspektrometrie (MS) detektiert. Ziel dieser Arbeit war es, LC-Methoden zu entwickeln, die die Messung möglichst vieler Antipsychotika und Antidepressiva erlaubt und die für die TDM-Routine geeignet ist. Eine mit C8-modifiziertem Kieselgel gefüllte Säule (20 µm 10x4.0 mm I.D.) erwies sich in Vorexperimenten als optimal geeignet bezüglich Extraktionsverhalten, Regenerierbarkeit und Stabilität. Mit einer ersten HPLC-UV-Methode mit Säulenschaltung konnten 20 verschiedene Psychopharmaka einschließlich ihrer Metabolite, also insgesamt 30 verschiedene Substanzen quantitativ erfasst werden. Die Analysenzeit betrug 30 Minuten. Die Vorsäule erlaubte 150 Injektionen, die analytische Säule konnte mit mehr als 300 Plasmainjektionen belastet werden. Abhängig vom Analyten, musste allerdings das Injektionsvolumen, die Flussrate oder die Detektionswellenlänge verändert werden. Die Methode war daher für eine Routineanwendung nur eingeschränkt geeignet. Mit einer zweiten HPLC-UV-Methode konnten 43 verschiedene Antipsychotika und Antidepressiva inklusive Metaboliten nachgewiesen werden. Nach Vorreinigung über C8-Material (10 µm, 10x4 mm I.D.) erfolgte die Trennung auf Hypersil ODS (5 µm Partikelgröße) in der analytischen Säule (250x4.6 mm I.D.) mit 37.5% Acetonitril im analytischen Eluenten. Die optimale Flussrate war 1.5 ml/min und die Detektionswellenlänge 254 nm. In einer Einzelprobe, konnten mit dieser Methode 7 bis 8 unterschiedliche Substanzen gemessen werden. Für die Antipsychotika Clozapin, Olanzapin, Perazin, Quetiapin und Ziprasidon wurde die Methode validiert. Der Variationskoeffizient (VK%) für die Impräzision lag zwischen 0.2 und 6.1%. Im erforderlichen Messbereich war die Methode linear (Korrelationskoeffizienten,  $R^2$  zwischen 0.9765 und 0.9816). Die absolute und analytische Wiederfindung lagen zwischen 98 und 118 %. Die für das TDM erforderlichen unteren Nachweisgrenzen wurden erreicht. Für Olanzapin betrug sie 5 ng/ml. Die Methode wurde an Patienten für das TDM getestet. Sie erwies sich für das TDM als sehr gut geeignet. Nach retrospektiver Auswertung von Patientendaten konnte erstmalig ein möglicher therapeutischer Bereich für Quetiapin (40-170 ng/ml) und Ziprasidon (40-130 ng/ml) formuliert werden. Mit einem Massenspektrometer als Detektor war die Messung von acht Neuroleptika und ihren Metaboliten möglich. 12 Substanzen konnten in einem Lauf bestimmt werden: Amisulprid, Clozapin, N-Desmethylclozapin, Clozapin-N-oxid, Haloperidol, Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon, Olanzapin, Perazin, N-Desmethylperazin, Quetiapin und Ziprasidon. Nach Vorreinigung mit C8-Material (20 µm 10x4.0 mm I.D.) erfolgte die Trennung auf Synergi MAX-RP C12 (4 µm 150 x 4.6 mm). Die Validierung der HPLC-MS-Methode belegte einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal ( $R^2=0,9974$  bis  $0.9999$ ). Die Impräzision lag zwischen 0.84 bis 9.78%. Die für das TDM erforderlichen unteren Nachweisgrenzen wurden erreicht. Es gab keine Hinweise auf das Auftreten von Ion Suppression durch Matrixbestandteile. Die absolute und analytische Wiederfindung lag zwischen 89 und 107 %. Es zeigte sich, dass die HPLC-MS-Methode ohne Modifikation erweitert werden kann und anscheinend mehr als 30 verschiedene Psychopharmaka erfasst werden können. Mit den entwickelten flüssigchromatographischen Methoden stehen neue Verfahren für das TDM von Antipsychotika und Antidepressiva zur Verfügung, die es erlauben, mit einer Methode verschiedene Psychopharmaka und ihre aktiven Metabolite zu messen. Damit kann die Behandlung psychiatrischer Patienten insbesondere mit Antipsychotika verbessert werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Rettenbacher MA, Burns T, Kemmler G, Fleischhacker WW. Schizophrenia: attitudes of patients and professional carers towards the illness and antipsychotic medication. *Pharmacopsychiatry* 2004; 37: 103-109
- [2] Lingam R, Scott J. Treatment non-adherence in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand* 2002; 105: 164-172
- [3] Preskorn SH, Fast GA. Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety and cost effectiveness. *J Clin Psychiat* 1991; 52: 23-33
- [4] Baldessarini RJ, Cohen BM, Teicher MH. Significance of neuroleptic dose and plasma level in the pharmacological treatment of psychoses. *Arch Gen Psychiat* 1988; 45: 79-91
- [5] Freeman DJ, Oyewumi LK. Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy? *Clin Pharmacokinet* 1997; 32: 93-100
- [6] Liu HC, Chang WH, Wei FC, Lin SK, Lin SK, Jann MW. Monitoring of plasma clozapine levels and its metabolites in refractory schizophrenic patients. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 200-207
- [7] Uges DR, Boom K, Wientjes GD, Versteeg J. Therapeutic drug monitoring of clozapine: an unexpected outcome. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 323-324
- [8] Gaertner I, Gaertner HJ, Vonthein R, Dietz K. Therapeutic drug monitoring of clozapine in relapse prevention: a five-year prospective study. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 305-310
- [9] Ulrich S, Baumann B, Wolf R, Lehmann D, Peters B, Bogerts B, Meyer FP. Therapeutic drug monitoring of clozapine and relapse – a retrospective study of routine clinical data. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 3-13
- [10] Hiemke C, Weigmann H, Härtter S, Mann K. Therapeutisches Drug Monitoring von Psychopharmaka unter EBM-Gesichtspunkten. *Neurotransmitter* 2000; 11: 52-55
- [11] Bauer M, Whybrow PC, Angst J, Versiani M, Möller HJ. World federation of societies of biological psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, Part 1: acute and continuation treatment of major depressive disorder. *World Journal of Biological Psychiatry* 2002; 3: 5-43
- [12] American Psychiatric Association: Practice Guideline for the Treatment of Patients With Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1997; 54: 4, Supplement
- [13] Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, Kuss H-J, Laux G, Müller-Oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G. Therapeutic Monitoring of psychotropic drugs. An outline of the AGNP-TDM expert group consensus guideline: *Ther Drug Monit* 2004; 26: 167-170

- [14] Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Gaertner I, Rao ML, Eckermann G, Gerlach M, Kuss H-J, Laux G, Müller-Oerlinghausen B, Riederer P, Zernig G. The AGNP-TDM expert group consensus guideline: Therapeutic drug monitoring. *Pharmacopsychiatry* 2004; 26: 167-170
- [15] Hiemke C. Drug Monitoring von Antidepressiva und Antipsychotika. *J Lab Med* 2004; 28: 326-333
- [16] Aravagiri M, Teper Y, Marder SR. Pharmacokinetics and tissue distribution of olanzapine in rats. *Biopharm Drug Dispos* 1999 Nov; 20: 369-377
- [17] Farde L, Nordsrom AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedwall G. Positron emission tomography analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. *Arch Gen Psychiat* 1992; 49: 538-544
- [18] Hiemke C, Dragicevic A, Gründer G, Härtter S, Sachse J, Vernaleken I, Müller MJ. Therapeutic drug monitoring of new antipsychotic drugs. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 156-160
- [19] Meyer JM, Wilson AA, Sagrati S, Hussey D, Carella A, Potter WZ, Ginovart N, Spencer EP, Cheek A, Houle S. Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: An [<sup>11</sup>C]DASB positron emission tomography study. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 826-835
- [20] Baumann P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31: 444-469
- [21] Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 11-28
- [22] Kent JM. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet* 2000; 355: 911-918
- [23] Åsberg M, Cronholm B, Sjoqvist F, Tuck D. Relationship between plasma level and therapeutic effect of nortriptyline. *Br Med J* 1971; 3: 331-334
- [24] Glassmann AH, Schildkraut JJ, Orsulak PJ et al. Tricyclic antidepressants, blood level measurements and clinical outcome: an APA task force report. *Am J Psychiat* 1985; 142: 155-162
- [25] Ulrich S, Läuter J. Comprehensive survey of the relationship between serum concentration and therapeutic effect of amitriptyline in depression. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 853-876
- [26] Ulrich S, Schrödter I, Partscht G, Baumann P. Therapeutisches Drug-Monitoring von Psychopharmaka: Eine allgemeine Einführung. *Psychopharmakotherapie* 2000; 7: 2-14
- [27] Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. TDM "nouveau". *Ther Drug Monit* 2004; 26: 145-151

- [28] Wilson JF. Survey of reference ranges in clinical measurements for psychoactive drugs in serum. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 243-247
- [29] Balant-Gorgia AE, Gex-Fabry M, Genet C, Balant LP. Therapeutic drug monitoring of risperidone using a new, rapid HPLC method: reappraisal of interindividual variability factors. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 105-115
- [30] Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP. Therapeutic drug monitoring of olanzapine: the combined effect of age, gender, smoking, and comedication. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 46-53
- [31] Olesen OV, Licht RW, Thomsen E, Bruun T, Viftrup JE, Linnet K. Serum concentrations and side effects in psychiatric patients during risperidone therapy. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 380-384
- [32] Olesen OV, Linnet K. Olanzapine serum concentrations in psychiatric patients given standard doses: the influence of comedication. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 87-90
- [33] Perry PJ, Lund BC, Sanger T, Beasley C. Olanzapine plasma concentrations and clinical response: acute phase results of the North American Olanzapine Trial. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 14-20
- [34] Rao ML, Hiemke C, Grasmader K, Baumann P. TDM Arbeitsgruppe der AGNP: [Olanzapine: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring] *Fortschr Neurol Psychiatr* 2001; 69: 510-517
- [35] Skogh E, Reis M, Dahl ML, Lundmark J, Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring data on olanzapine and its N-demethyl metabolite in the naturalistic clinical setting. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 518-526
- [36] Zullino DF, Delessert D, Eap CB, Preisig M, Baumann P. Tobacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine or olanzapine. *Int Clin Psychopharmacol* 2002; 17: 141-143
- [37] Simmons SA, Perry PJ, Rickert ED, Browne JL. Cost-benefit analysis of prospective pharmacokinetic dosing of nortriptyline in depressed inpatients. *J Affect Disord* 1985; 8: 47-53
- [38] Müller MJ, Dragicevic A, Fric M, Gärtner I, Grasmäder K, Härtter S, Hermann E, Kuss HJ, Laux G, Oehl W, Rao ML, Rollmann N, Weigmann H, Weber-Labonte M, Hiemke C. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants: How does it work under clinical conditions. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 98-104
- [39] Burke MJ, Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants: cost implications and relevance to clinical practice. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 147-65
- [40] Correll CU, Malhotra AK, Kaushik S, McMeniman M, Kane JM. Early prediction of antipsychotic response in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 2063-2065

- [41] Härtter S, Hermes B, Hiemke C. Automated determination of trimipramine and N-desmethyl-trimipramine in human plasma or serum by HPLC with on-line solid phase extraction. *J Liq Chromatogr* 1995; 18: 3495-3505
- [42] Collegium Internationale Psychiatriae Salarum (CIPS). Internationale Skalen für Psychiatrie. Weinheim, Beltz Verlag 1998
- [43] Lingjaerde O, Ahlfors UG, Bech P, Dencker SJ, Elgen K. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. *Acta Psychiatr Scand* 1987; Suppl 334: 1-100
- [44] Vuille F, Amey M, Baumann P. Use of plasma level monitoring of antidepressants in clinical practice. Towards an analysis of clinical utility. *Pharmacopsychiatry* 1991; 24: 190-195
- [45] Hackett LP, Dusci LJ, Ilett KF. A comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay for therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 30-34
- [46] Rao ML. Modification of radioreceptor assay technique for the estimation of serum neuroleptic drug levels leads to improved precision and sensitivity. *Psychopharmacol* 1986; 90: 548-553
- [47] Banger M, Hermes B, Härtter S, Hiemke C. Monitoring serum concentrations of clomipramine and metabolites: fluorescence polarization immunoassay versus high performance liquid chromatography. *Pharmacopsychiatry* 1987; 30: 128-132
- [48] Rao ML, Staberock U, Baumann P, Hiemke C, Deister A, Cuendet C, Amey M, Härtter S, Kraemer M. Monitoring tricyclic antidepressant concentrations in serum by fluorescence polarization immunoassay compared with gas chromatography and HPLC. *Clin Chem* 1994; 40: 929-933
- [49] Eap CB, Bouchoux G, Amey M, Cochard N, Savary L, Baumann P. Simultaneous determination of human plasma levels of citalopram, paroxetine, sertraline and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 1998; 36: 365-372
- [50] Kollroser M, Schober C. Direct-injection high-performance liquid chromatography ion trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16:1266-1272
- [51] Kollroser M, Schober C. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with an ion trap detector. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 537-544
- [52] Kratzsch C, Peters FT, Kraemer T, Weber AA, Maurer HH. Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 283-295

- [53] Goeringer KE, McIntyre M, Drummer OH. LC-MS analysis of serotonergic drugs. *J Anal Toxicol* 2003; 27: 30-35
- [54] Frahnert C, Rao ML, Grasmader K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 794: 35-47
- [55] Lai CK, Lee T, Au KM, Chan AY. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin Chem* 1997; 43: 312-325
- [56] Härtter S, Hermes B, Szegedi A, Hiemke C. Automated determination of paroxetine and its main metabolite by column switching and on-line high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monitoring* 1994; 16: 400-406
- [57] Härtter S, Hiemke C. Column switching and high-performance liquid chromatography in the analysis of amitriptyline, nortriptyline and hydroxylated metabolites in human plasma or serum. *J Chromatogr B* 1992; 578: 273-282
- [58] Härtter S, Weigmann H, Hiemke C. Automated determination of reboxetine by high-performance liquid chromatography with column-switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2000; 740: 135-140
- [59] Härtter, S., Wetzel, H., Hiemke, C. Automated determination of fluvoxamine in plasma by column-switching high performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1992; 38: 2082-2086
- [60] Sachse J, Härtter S, Weigmann H, Hiemke C. Automated determination of amisulpride by liquid chromatography with column switching and spectrophotometric-detection. *J of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784: 405-410
- [61] Yasui-Furukori N, Furukori H, Saito M, Inoue Y, Kaneko S, Tateishi T. Poor reliability of therapeutic drug monitoring data for haloperidol and bromperidol using enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 709-714
- [62] Yasui-Furukori N, Inoue Y, Chiba M, Tateishi T. Simultaneous determination of haloperidol and bromperidol and their reduced metabolites by liquid-liquid extraction and automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 805: 175-180
- [63] Chiba R, Ogasawara A, Kubo T, Yamazaki H, Umino M, Ishizuka Y. Direct determination of benzamides in serum by column-switching high-performance liquid chromatography. *Anal Sci* 2003; 19: 785-789
- [64] Binder SR. Analysis of drugs of abuse in biological fluids by liquid chromatography. *Adv Chromatogr* 1996; 36: 201-271

- [65] Ohtsuji M, Lai JS, Binder SR, Kondo T, Takayasu T, Ohshima T. Use of REMEDI HS in emergency toxicology for a rapid estimate of drug concentrations in urine, serum and gastric samples. *J Forensic Sci* 1996; 41: 881-886
- [66] Kratzsch C, Tenberken O, Peters FT, Weber AA, Kraemer T, Maurer HH. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom* 2004; 39: 856-872
- [67] Kollroser M, Schober C. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with an ion trap detector. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 537-544
- [68] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. NCCLS Document EP5-T2. 1992
- [69] Ooms BJA, van Gils MGJ, Duinkerken AR, Halmnigh O. Development and validation of protocols for solid-phase extraction coupled to LC and LC-MS. *International Laboratory* 2000; 8: 18-23
- [70] Weigmann H, Härtter S, Hiemke C. Automated determination of clomipramine and its major metabolites in human and rat serum by high-performance liquid chromatography with on-line column-switching. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 710: 227-233
- [71] Härtter S, Hermes B, Szegedi A, Hiemke C. Automated determination of paroxetine and its main metabolite by column switching and on-line high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1994; 16: 400-406
- [72] Weigmann H, Bierbrauer J, Härtter S, Hiemke C. Automated determination of clozapine and major metabolites in serum and urine. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 480-488
- [73] Heller S, Hiemke C, Stroba G, Rieger-Gies A, Daum-Kreysch E, Sachse J, Härtter S. Assessment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a nationwide TDM service. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 459-461
- [74] Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B* 1997; 689: 175-180
- [75] Sachs L. *Angewandte Statistik*, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1978
- [76] Janiszewski JS, Fouda HG, Cole RO. Development and validation of a high-sensitivity assay for an antipsychotic agent, CP-88,059, with solid-phase extraction and narrow-bore high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 668: 133-139

- [77] Janiszewski J, Schneider P, Hoffmaster K, Swyden M, Wells D, Fouda H. Automated sample preparation using membrane microtiter extraction for bioanalytical mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1997; 11: 1033-1037
- [78] Sachse J, Härtter S, Müller JM, Dragicevic A, Hiemke C. Therapeutisches Drug-Monitoring von Quetiapin. *Psychopharmakotherapie* 2003; 10: 19-23
- [79] Small JG, Hirsch SR, Arvantis LA, Miller BG, et al. Quetiapine in patients with schizophrenia. A high and a low-dose double blind comparison with placebo. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 253-273
- [80] Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 689: 175-180
- [81] Perry PJ. Therapeutic drug monitoring of antipsychotics. *Psychopharmacol Bull* 2001; 35: 19-29
- [82] Scoggins BA, Maguire KP, Norman TR, Burrows GD. Measurement of Tricyclic Antidepressants. Part I. A Review of Methodology. *Clin Chem* 1980; 26: 5-17
- [83] Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 713: 91-109
- [84] Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 2005; 38: 310-318
- [85] Maurer HH. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381: 110-118
- [86] Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 773: 47-52
- [87] Buckley PF. Ziprasidone: pharmacology, clinical progress and therapeutic promise. *Drugs Today* 2000; 36: 583-589
- [88] Schmidt AW, Lebel LA, Howard HR Jr, Zorn SH. Ziprasidone: a novel antipsychotic agent with a unique human receptor binding profile. *Eur J Pharmacol* 2001; 425: 197-201
- [89] Daniel DG, Zimbroff DL, Potkin SG, Reeves KR, Harrigan EP, Lakshminarayanan M. Ziprasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: a 6-week placebo-controlled trial. Ziprasidone Study Group. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20: 491-505

- [90] Schooler NR. Maintaining symptom control: review of ziprasidone long-term efficacy data. *J Clin Psychiatry* 2003; 64 Suppl 19: 26-32
- [91] Daniel DG. Tolerability of ziprasidone: an expanding perspective. *J Clin Psychiatry* 2003; 64 Suppl 19: 40-49
- [92] Daniel DG, Zimbroff DL, Swift RH, Harrigan EP. The tolerability of intramuscular ziprasidone and haloperidol treatment and the transition to oral therapy. *Int Clin Psychopharmacol* 2004; 19: 9-15
- [93] Prakash C, Kamel A, Gummerus J, Wilner K. Metabolism and excretion of a new antipsychotic drug, ziprasidone, in humans. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 863-872
- [94] Ulrich S, Neuhof S, Braun V, Meyer FP. Therapeutic window of serum haloperidol concentration in acute schizophrenia and schizoaffective disorder. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31: 163-169
- [95] Raggi MA. Therapeutic drug monitoring: chemical-clinical correlations of atypical antipsychotic drugs. *Curr Med Chem* 2002; 9: 1397-1349
- [96] Kapur S, Remington G. Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 873-883
- [97] Seeman P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can J Psychiatry* 2002; 47: 27-38
- [98] Grunder G, Carlsson A, Wong DF. Mechanism of new antipsychotic medications: occupancy is not just antagonism. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 974-977
- [99] Farde L, Nordsrom AL, Wiesel FAI. Positron emission tomography analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. *Arch Gen Psychiat* 1992; 49: 538-544
- [100] Mamo D, Kapur S, Shammi CM, Papatheodorou G, Mann S, Therrien F, Remington G. A PET study of dopamine D2 and serotonin 5-HT2 receptor occupancy in patients with schizophrenia treated with therapeutic doses of ziprasidone. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 818-825



## **10. Lebenslauf**

### ***10.1 Kongreßteilnahmen mit eigenen Beiträgen:***

AGNP (International Meeting)

Pharmacovigilance in Psychiatry Therapeutic Drug Monitoring and  
Pharmacogenetics of Psychotropic Drugs  
Lausanne (Schweiz) 1. - 3. September 2004

ICTDMCT

8th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology  
Basel (Schweiz) 7. - 11. September 2003

5<sup>th</sup> Workshop of AGNP

Magdeburg (Deutschland) 4. - 5. Juli 2002

22nd Symposium of AGNP

Nürnberg (Deutschland) 26. - 29. September 2001

ICTDMCT

7th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology  
Washington DC (USA) 1. - 6. September 2001

## 10.2 Veröffentlichungen

### Pub Med

1. **Sachse J**, Köller J, Härtter S, Hiemke C. Automated analysis of quetiapine and other antipsychotic drugs in human blood by high performance-liquid chromatography with column-switching and spectrophotometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Nov; in press
2. **Sachse J**, Härtter S, Hiemke C. Automated determination of ziprasidone by HPLC with column switching and spectrophotometric detection. *Ther Drug Monit.* 2005 Apr;27(2):158-162
3. Härtter S, Connemann B, Schonfeldt-Lecuona C, **Sachse J**, Hiemke C. Elevated quetiapine serum concentrations in a patient treated concomitantly with doxepin, lorazepam, and pantoprazole. *J Clin Psychopharmacol.* 2004 Oct; 24(5): 568-571
4. Heller S, Hiemke C, Stroba G, Rieger-Gies A, Daum-Kreysch E, **Sachse J**, Härtter S. Assessment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a nationwide TDM service. *Ther Drug Monit.* 2004 Aug; 26(4): 459-461
5. Hiemke C, Dragicevic A, Grunder G, Hatter S, **Sachse J**, Vernaleken I, Müller MJ. Therapeutic monitoring of new antipsychotic drugs. *Ther Drug Monit.* 2004 Apr; 26(2): 156-160
6. **Sachse J**, Härtter S, Weigmann H, Hiemke C. Automated determination of amisulpride by liquid chromatography with column switching and spectrophotometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Feb 5; 784(2): 405-410

### Sonstige

7. Hiemke CH, **Sachse J**, Köller J, Weigmann H, Härtter S. HPLC with column-switching for therapeutic monitoring of psychoactive drugs. *Clinical Laboratory International* 2003 Sept; 27 Nr. 5: 26-27
8. **Sachse J**, Härtter S, Müller MJ, Dragicevic A, Hiemke C. Therapeutisches Drug Monitoring von Quetiapin. *Psychopharmakotherapie* 10. Jahrgang 2003; 1:19-22
9. Müller MJ, **Sachse J**, Vernaleken I, Gründer G, Härtter S, Hiemke C. Therapeutisches Drug Monitoring von Amisulprid in der klinischen Routine. *Psychopharmakotherapie* 10. Jahrgang 2003; 1 :23-27

## Abstracts

### AGNP (International Meeting)

Pharmacovigilance in Psychiatry Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacogenetics of Psychotropic Drugs  
Lausanne (Schweiz) 1. - 3. September 2004

1. Dragicevic A, **Sachse J**, Härtter S, Hiemke C, Müller MJ. Serum Concentrations of Quetiapine and Clinical Effects. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 47-48
2. Hiemke C, Kuss HJ, Müller MJ, Rao ML, Dragicevic A, Fric M, Geiger E, Grasmäder K, Härtter S, Laux G, Röschke J, **Sachse J**, Schanz B, Scherer A. The German Network on Depression: TDM of new and old Antidepressant Drugs. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 52-53
3. Rieger-Gies A, Heller S, Stroba G, Daum-Kreysch E, **Sachse J**, Härtter S, Hiemke C. Storage and Transport Stability of new Antidepressant and Antipsychotic drugs. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 61
4. **Sachse J**, Christians U, Hiemke C. Automated Analysis of Antipsychotic Drugs Using Liquid Chromatography with Column Switching. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 62

### 5th Workshop of AGNP

Therapeutic Drug Monitoring of Psychotropic Drugs  
Magdeburg, Germany, July 4-5, 2002

1. **Sachse J**, Härtter S, Müller MJ, Weigmann H, Hiemke C. Therapeutic Drug Monitoring of Quetiapine. *Pharmacopsychiatry* 2002; 35; VII
2. Müller MJ, **Sachse J**, Vernaleken I, Gründer G, Härtter S, Hiemke C. Therapeutic Drug Monitoring of Amisulpride : Clinical Implications. *Pharmacopsychiatry* 2002; 35; VI
3. **Sachse J**, Köller J, Härtter S, Weigmann H, Schanz F, Hiemke C. Column Switching and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Rapid Determination of Atypical Antipsychotics. *Pharmacopsychiatry* 2002; 35; X

### 22<sup>nd</sup> Symposium of AGNP

Nuremberg, Germany, September 26-29, 2001

1. **Sachse J**, Härtter S, Weigmann H, Köller J, Schanz F, Hiemke C. Automated chromatographic analysis of multiple psychoactive drugs in blood serum or plasma. *Pharmacopsychiatry* 2001; 34; 197

### 7<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology

Washington (DC) USA, September 1-6, 2001

1. **Sachse J**, Köller J, Härtter S, Weigmann H, Schanz F, Hiemke C. Automated HPLC with on-line column switching for multiple psychoactive drugs. *Ther Drug Monit* 2001; 23(4): 483

## 11. Abkürzungsverzeichnis

µm	=	Mikrometer
AGNP	=	Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
AMK	=	Arzneimittelkommission
API-ES	=	Atmospheric-Pressure-Ionisation (Elektrospray-Modus)
BMBF	=	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bzw.	=	Beziehungsweise
CYP	=	Cytochrom
D	=	Desmethyl-
EPS	=	extrapyramidal-motorischen Störungen
FDA	=	Food and Drug Administration
GC	=	Gaschromatographie
h	=	Stunde
HPLC	=	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I.D.	=	Innendurchmesser
ISTD	=	interner Standard
LC	=	liquid chromatography (= Flüssigkeitschromatographie)
MeOH	=	Methanol
mg	=	Milligramm
MG	=	Molekulargewicht
ml	=	Milliliter
MS	=	Massenspektrometer
n.d.	=	nicht detektierbar
NCCLS	=	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	=	Nanogramm
nm	=	Nanometer
PZ	=	Pharmazeutische Zeitung
RT	=	Retentionszeit
SD	=	Standardabweichung
sec	=	Sekunde
SIM	=	single ion mode
SSRI	=	selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer
t <sub>1/2</sub>	=	Halbwertszeit
TDM	=	therapeutisches Drug Monitoring
TZA	=	trizyklischen Antidepressiva
UV	=	ultraviolett
VK	=	Variationskoeffizient
Wdh	=	Wiederholung
z.B.	=	zum Beispiel
ZnSO <sub>4</sub>	=	Zinksulfat

## 12. Summary

Therapeutic Drug Monitoring (TDM) that analyses drug concentrations in blood serum or plasma in association with clinical status of the patient is used for individual dose adjustment. It may increase the efficiency of a given medication and decrease the occurrence of side effects. The availability of TDM for antipsychotic or antidepressant drugs requires multiple assays for the more than 50 different compounds. Liquid chromatographic (LC) methods enable the determination on many drugs, using column switching it is even possible to analyse serum or plasma samples automatically. Samples are injected on a clean-up column. After wash out of interfering matrix constituents, drugs are separated on an analytical column and detected by ultraviolet spectroscopy (UV) or mass spectrometry (MS).

The aim of the present investigation was to develop LC-UV and LC-MS methods with column switching that enable the determination as many antipsychotic and antidepressant drugs as possible and that are suitable for routine TDM.

C8 modified silica gel (20  $\mu\text{m}$  10x4.0 mm I.D.) was found to be optimal for sample clean-up. All drugs of interest were extracted. C8 material was also optimal in regard to regeneration and stability. A first HPLC-UV method enabled the determination of 20 different psychoactive drugs including metabolites. Analysis was completed within 30 minutes. Pre-columns allowed clean-up of about 150 samples, the analytical column more than 300 injections. To analyse the 20 different psychoactive compounds, however, sample volume, flow rate or detection wave length had to be varied depending on the compound to be analysed. The method was insufficient for routine use. A second HPLC-UV-method enabled determination of 43 different antipsychotic and antidepressant drugs and metabolites. After sample clean-up on C8-material (10  $\mu\text{m}$ , 10x4 mm I.D.) by 8% acetonitrile, drugs were separated on Hypersil ODS (5  $\mu\text{m}$  particle size 250x4.6 mm I.D.) by 37.5% acetonitrile. The optimal flow rate was 1.5 ml/min and the detection wavelength 254 nm. The method was well suitable for routine TDM. It enabled quantification of 7 to 8 different compounds in a single run. The assay was validated for clozapine, olanzapine, perazine, quetiapine and ziprasidone. Coefficients of variance ranged between 0.24 and 6.06% for imprecision. Correlation coefficients ( $R^2$ ) of drug concentration versus detector signal ranged between 0.9765 and 0.9816, the absolute and analytical recoveries between 98 and 118%. The lowest limit of quantification was 5 ng/ml (olanzapine). LC coupled to a mass spectrometric detector enabled the quantification of at least 12 different antipsychotic drugs plus metabolites in a single run or sample as shown for amisulpride, clozapine, N-desmethylozapine, clozapine N-oxide, haloperidol, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, olanzapine, perazine, N-desmethylperazine, quetiapine and ziprasidone. Deproteinized serum or plasma samples were cleaned up on C8 material and separated on Synergi MAX-RP C12 material (4  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm Phenomenex). Validation of the LC-MS-method revealed linearity ( $R^2 = 0.9974$  to  $0.9999$ ). Imprecision ranged between 0,84 and 9,78%. The lower limits of detection were sufficient for routine TDM. The occurrence of ion suppression by matrix constituents was not observed. The absolute and analytical recoveries ranged between 98 and 118%. Further analyses revealed that the LC-MS-method could be extended without modification to more than other 30 different psychoactive drugs. When applying the validated HPLC-UV method to patients retrospective analyses of TDM data revealed therapeutic ranges could be derived for the new atypical antipsychotic drugs quetiapine (40-170 ng/ml) and ziprasidone (40-130 ng/ml).

The established and validated liquid chromatographic methods with UV or MS detection were found to be suitable for analyses of antipsychotic and antidepressant drugs in plasma or serum. Using these methods for TDM they are helpful to improve psychopharmacotherapy.