

Kapillarelektrophoretische Analytik von Metaboliten
saurer und basischer Arzneistoffe im Speichel

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fachbereich Chemie

vorgelegt von
Katrin Bennesch

Hamburg 2006

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
Prof. Dr. Detlef Geffken

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2002 bis Februar 2006 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein,

dem ich für die Überlassung des Themas, die stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken

möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken.

Frau Dr. Andrea Junker-Buchheit und Frau Dr. Ute Beyer der Firma Varian[®] Deutschland GmbH und Herrn Dr. Matthias Kullnik von Phenomenex[®] danke ich für den Ideenaustausch und die Hilfsbereitschaft bei der Entwicklung der Festphasenextraktionsmethoden.

Frau Christine Bostedt möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Vorbereitung der Experimente danken.

Ganz herzlich Danke ich Frau Dr. Andrea Nicola Lübbe für die zahlreichen Diskussionen, der ständigen Hilfsbereitschaft und der sehr netten, freundschaftlichen Zeit im Labor.

Bei Herrn Dr. Ulrich Riederer möchte ich mich für die fachliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ebenfalls Danke sagen möchte ich Frau Katharina Wehner, Frau Dr. Judith Möllenbeck und Frau Dr. Katrin Schlüter für ihre fachliche und experimentelle Unterstützung bei den Synthesen und allen anderen Mitgliedern des Instituts für Pharmazie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön an alle Korrekturleser für ihre kritische Durchsicht.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre ständige Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

Amfe	Amfepramon
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	Area Under the Curve
AUC _{last}	Fläche unter der Speichelkonzentrations-Zeitkurve nach dem letzten Messpunkt einer Messreihe
ber.	berechnet
bidest.	bidestilliert
c	Konzentration
c _{last}	Konzentration des letzten Messpunktes
CBA	Carboxylic Acid
CE	Kapillarelektrophorese
COX	Cyclooxygenase
DAD	Dioden-Array-Detektor
DHBS	Dihydroxybenzoesäure
DIN	Deutsche Industrie Norm
EOF	Elektroosmotischer Fluss
Eph	Ephedrin
ESI	Elektrospray Ionisation
evtl.	eventuell
FDA	Food and Drug Administration
Fl.	Fläche
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
GSH	Glutathion
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
H-NMR	H-Nuclear Magnetic Resonance
Ibu	Ibuprofen
ICH	International Conference of Harmonisation
ID	innerer Durchmesser
IR	Infrarot-Strahlung
k	Geschwindigkeitskonstante
Konz.	Konzentration
LC	Liquid Chromatographie

mAU	milli Absorption Unit
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
Nico	Nicotin
n.q.	nicht quantifizierbar
n.n.	nicht nachweisbar
o-HHS	ortho-Hydroxyhippursäure
Parac	Paracetamol
Phep	Phenylephrin
p.o.	per oral
Pseu	Pseudoephedrin
PW	Peakbreite
RP	Reverse Phase
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPE	Solid Phase Extraktion
Stabw	Standardabweichung
t	Zeitpunkt nach Arzneimittelapplikation
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett-Strahlung
VB	Vertrauensbereich
Vk	Variationskoeffizient
Wiederf.	Wiederfindung

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Die Untersuchungsmatrix Speichel	3
2.1.1	Speicheldrüsen und Speichelarten	3
2.1.2	Speichelzusammensetzung	4
2.1.3	Permeation von Arzneistoffen und deren Metaboliten in den Speichel ...	6
2.2	Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese	8
2.2.1	Einführung	8
2.2.2	Grundlagen der Methodenentwicklung	10
3.	Validierungsparameter	13
4.	Probenentnahme und Probenvorbereitung	17
4.1	Probanden	17
4.2	Probenentnahme	17
4.3	Probenvorbereitung	18
5.	Untersuchungen saurer Arzneistoffe	23
5.1	Acetylsalicylsäure	24
5.1.1	Einleitung	24
5.1.2	Methodenentwicklung	26
5.1.3	Probenvorbereitung	28
5.1.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	29
5.1.5	Ergebnisse der Urinuntersuchungen	32
5.1.6	Analytische Daten	33
5.1.7	Diskussion	36
5.2	Ibuprofen	38
5.2.1	Einleitung	38
5.2.2	Methodenentwicklung	39
5.2.3	Probenvorbereitung	40

5.2.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	40
5.2.5	Diskussion	41
6.	Untersuchungen eines schwach sauren Arzneistoffes.....	43
6.1	Paracetamol	44
6.1.1	Einleitung.....	44
6.1.2	Methodenentwicklung	46
6.1.3	Probenvorbereitung.....	48
6.1.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	49
6.1.5	Ergebnisse der Untersuchungen eines Kombinationspräparates	52
6.1.6	Ergebnisse der Urinuntersuchungen	54
6.1.7	Analytische Daten	56
6.1.8	Diskussion	58
6.1.9	Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie.....	59
6.1.9.1	Einführung.....	59
6.1.9.2	Methodenentwicklung.....	60
6.1.9.3	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen.....	60
6.1.9.4	Analytische Daten.....	62
6.1.9.5	Diskussion	64
7.	Untersuchungen basischer Arzneistoffe.....	65
7.1	Ambroxol.....	69
7.1.1	Einleitung.....	69
7.1.2	Methodenentwicklung	70
7.1.3	Probenvorbereitung.....	70
7.1.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	70
7.1.5	Diskussion	72
7.2	Phenylephrin und Carbinoxamin	73
7.2.1	Einleitung.....	73
7.2.2	Methodenentwicklung	75
7.2.3	Probenvorbereitung.....	75
7.2.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	76

7.2.5	Diskussion	77
7.3	Diphenhydramin.....	78
7.3.1	Einleitung.....	78
7.3.2	Methodenentwicklung	79
7.3.3	Probenvorbereitung.....	79
7.3.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	81
7.3.5	Diskussion	83
7.4	Doxylamin	84
7.4.1	Einleitung.....	84
7.4.2	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	84
7.4.3	Diskussion	85
7.5	Ephedrin.....	85
7.5.1	Einleitung.....	85
7.5.2	Methodenentwicklung	86
7.5.3	Probenvorbereitung.....	88
7.5.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	90
7.5.5	Analytische Daten	93
7.5.6	Diskussion	97
7.6	Dextromethorphan	98
7.6.1	Einleitung.....	98
7.6.2	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	99
7.6.3	Diskussion.....	99
7.7	Pseudoephedrin und Cetirizin.....	101
7.7.1	Einleitung.....	101
7.7.2	Methodenentwicklung	103
7.7.3	Probenvorbereitung.....	103
7.7.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen	104
7.7.5	Ergebnisse der Urinuntersuchungen	106
7.7.6	Analytische Daten der Speicheluntersuchungen.....	107
7.7.7	Analytische Daten der Urinuntersuchungen.....	110
7.7.8	Diskussion	112

7.8	Nicotin.....	113
7.8.1	Einleitung.....	113
7.8.2	Methodenentwicklung.....	114
7.8.3	Probenvorbereitung.....	116
7.8.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen.....	119
7.8.5	Diskussion.....	120
7.9	Amfepramon.....	121
7.9.1	Einleitung.....	121
7.9.2	Methodenentwicklung.....	122
7.9.3	Probenvorbereitung.....	124
7.9.4	Ergebnisse der Speicheluntersuchungen.....	124
7.9.5	Analytische Daten.....	128
7.9.6	Diskussion.....	135
7.9.7	Racemattrennung mit Cyclodextrinen.....	136
7.9.7.1	Einführung.....	136
7.9.7.2	Methodenentwicklung und Ergebnisse.....	137
7.9.7.3	Diskussion.....	140
8.	Synthese der Amfepramon Metaboliten.....	141
8.1	Darstellung von Ethyl- und Diethylnorephedrin.....	141
8.2	Überprüfung der Reinheit.....	141
9.	Diskussion.....	143
9.1	Speicheluntersuchungen.....	143
9.2	Probenvorbereitung.....	143
9.3	Kapillarelektrophorese.....	146
9.4	Validierung.....	148
9.5	Bewertung der Ergebnisse und Ausblick.....	148
10.	Zusammenfassung.....	151
11.	Summary.....	154

12.	Experimenteller Teil.....	157
12.1	Verzeichnis der Geräte	157
12.2	Pufferlösungen	159
12.3	Festphasenextraktionsvorschrift für saure Substanzen	161
12.4	Festphasenextraktionsvorschrift für schwach saure Substanzen.....	161
12.5	Festphasenextraktionsvorschriften für basische Substanzen	162
12.5.1	Allgemeine Extraktionsvorschriften	162
12.5.2	Ambroxol	163
12.5.3	Phenylephrin	163
12.5.4	Diphenhydramin	163
12.5.5	Ephedrin	164
12.5.6	Dextromethorphan	165
12.5.7	Pseudoephedrin.....	166
12.5.8	Nicotin	166
12.5.9	Amfepramon	168
12.6	Kapillarelektrophoretische Methoden für saure Substanzen	169
12.6.1	Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode.....	169
12.6.2	Acetylsalicylsäure	169
12.6.3	Ibuprofen	170
12.7	Kapillarelektrophoretische Methoden für schwach saure Substanzen	170
12.7.1	Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode.....	170
12.7.2	Paracetamol.....	171
12.8	Kapillarelektrophoretische Methoden für basische Substanzen	172
12.8.1	Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode.....	172
12.8.2	Ambroxol	172
12.8.3	Phenylephrin	172
12.8.4	Diphenhydramin	173
12.8.5	Dextromethorphan, Ephedrin und Pseudoephedrin.....	173
12.8.6	Ephedrin	173
12.8.7	Pseudoephedrin und dessen Metaboliten im Urin.....	173

12.8.8	Nicotin	174
12.8.9	Amfepramon	175
12.9	HPLC-Methoden	177
12.9.1	Acetylsalicylsäure	177
12.9.2	Ibuprofen	177
12.10	Validierung der Methode ASS1.M für Salicylsäure	178
12.11	Validierung der Methode ASS2.M für Salicylsäure	184
12.12	Kalibrierung für Paracetamol.....	190
12.13	Validierung der Methode Parac2.M für Paracetamol.....	192
12.14	Validierung der MEKC-Methode Parac3.M für Paracetamol.....	200
12.15	Kalibrierung für Diphenhydramin.....	206
12.16	Kalibrierung für Ephedrin.....	207
12.17	Validierung der Methoden Pseu1.M und Eph.M für Norephedrin	209
12.18	Validierung der Methode Pseu1.M für Norpseudoephedrin	221
12.19	Validierung der Methode PseuU.M für Pseudoephedrin.....	228
12.20	Validierung der Methode Amfe2.M für Amfepramon-Metaboliten ...	234
12.21	Synthesevorschriften für Ethyl- und Diethylnorephedrin	268
12.21.1	HPLC-Methode zur Reinheitsüberprüfung	268
12.21.2	Charakterisierung der synthetisierten Substanzen	269
13.	Anhang.....	271
13.1	Gefahrstoffe	271
	Literatur	273
	Lebenslauf	281

1. Einleitung und Zielsetzung

Zimmermann et al.¹ entwickelten Methoden zum Nachweis von Amphetaminderivaten im Speichel mit immunchromatographischen Teststreifen und enantioselektiver Kapillarelektrophorese. Die Metabolite der Amphetaminderivate waren nach Arzneistoffgabe im Speichel nachzuweisen. Ausgehend von dieser Erkenntnis, wurden für die vorliegende Arbeit Analysen mit sauren und basischen Arzneistoffen durchgeführt. In die Untersuchungen waren Arzneistoffe mit unterschiedlichen Säure-Base-Eigenschaften einbezogen um zu überprüfen, ob ein pK_a -Wert bestimmbar ist, ab dem Arzneistoffe und deren Metaboliten in den Speichel permeieren und dort nachzuweisen sind.

Eine zentrale Aufgabe war die Entwicklung von Methoden zur einfachen Probenvorbereitung und zur zuverlässigen kapillarelektrophoretischen Identifizierung und Quantifizierung von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Speichel. Es sollte herausgefunden werden, ob allgemein gültige Methoden existieren, die in der Praxis zuverlässig für Metabolismusuntersuchungen von sauren und basischen Arzneistoffen im Speichel eingesetzt werden können. Die entwickelten Methoden waren für die Kapillarelektrophorese zu validieren, um nachzuweisen, dass die Methoden zuverlässige, aussagekräftige und verwertbare Ergebnisse liefern.

Die Matrix 'Speichel' war für die vorliegende Arbeit von Interesse, da diese verschiedene Vorteile bietet^{2,3}. Speichel wird im Organismus nicht gespeichert, so dass Speichelproben immer die momentanen Wirkstoffkonzentrationen zum Sammelzeitpunkt enthalten. Vorteilhaft ist außerdem, dass die Gewinnung von Speichel keinen invasiven Eingriff darstellt und somit leicht durchführbar ist. Studien der Pharmakokinetik erfordern mehrere invasive Eingriffe, um die erforderlichen Blutproben zu erhalten. Diese Prozedur ist mit einer großen Anzahl von Punktionen für den Patienten äußerst unangenehm. Urinuntersuchungen bieten in diesem Fall auch keinen Vorteil, weil diese nicht die Konzentrationen im Blut zum Sammelzeitpunkt wieder spiegeln. Die Urinkonzentrationen hängen vom Hydratationsstatus ab.

Speichelbestimmungen erleichtern die Kontrolle der Pharmakokinetik von Arzneistoffen im menschlichen Organismus sowie die Kontrolle der Compliance und der Therapie.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit der Kapillarelektrophorese (CE) durchgeführt, da diese Vorteile gegenüber anderen analytischen Systemen aufweist. Die Kapillarelektrophorese ermöglicht ein automatisiertes Arbeiten mit kleinsten Probenmengen bei einem hohen Probendurchsatz mit kurzen Analysenzeiten, geringstem Lösungsmittelverbrauch und hoher Auflösung sowie kleiner theoretischer Trennstufenhöhe. Ein großer Vorteil der Kapillarelektrophorese liegt in der Direktbestimmung von Analyten in komplexen Matrices. Arzneistoffe aus Körperflüssigkeiten können ohne Probenvorbereitung direkt injiziert werden, so

dass Zeit und Kosten vermindert werden⁴. Die steigende Anzahl der Publikationen zu kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zeigt die Zunahme der Bedeutung der Kapillarelektrophorese. Es erschienen Veröffentlichungen, die sich mit der kapillarelektrophoretischen Analytik von Arzneistoffen (z.B. Antihistaminika⁵) und Körperflüssigkeiten (z.B. Blut⁶) beschäftigten. Die Publikation von Thormann et al.⁷ gibt einen Überblick über die klinischen und forensischen Kapillarelektrophoreseuntersuchungen. Die kapillarelektrophoretischen Methoden entwickelten sich zu leistungsfähigen analytischen Trenntechniken zur Quantifizierung von Substanzen beim therapeutischen Drug Monitoring* und bei pharmakokinetischen Studien.

Nur sehr wenige Publikationen beschäftigten sich mit kapillarelektrophoretischen Untersuchungen von Arzneistoffen im Speichel^{8,9}. Diese legten ihren Schwerpunkt auf die Optimierung der Methode zur Untersuchung eines Arzneistoffes oder Arzneistoffgemisches im Speichel. Die veröffentlichten Berichte über Metabolismusuntersuchungen mit der Kapillarelektrophorese bezogen sich vorwiegend auf die Körperflüssigkeiten Urin, Serum oder Plasma^{10,11}.

Es zeigte sich, dass die kapillarelektrophoretischen Methoden, bezogen auf ihre Trennleistung und Reproduzierbarkeit, mittlerweile denen der HPLC überlegen sind und weniger systematische Fehler aufweisen¹². Es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren die HPLC-Methoden durch kapillarelektrophoretische Methoden ersetzt werden. Aufgrund dieser Tatsachen wird die Bedeutung ersichtlich, Methoden für die Kapillarelektrophorese zu entwickeln und zu etablieren.

* Drug Monitoring ist eine wiederholte Messung der Arzneistoffkonzentration zur individuellen Dosisfindung und zur Therapiekontrolle.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Die Untersuchungsmatrix Speichel

2.1.1 Speicheldrüsen und Speichelarten

Der Mundspeichel wird vorwiegend von den drei großen Speicheldrüsen produziert, der

- Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis)
- Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis)
- Unterzungenspeicheldrüse (Glandula sublingualis)¹³.

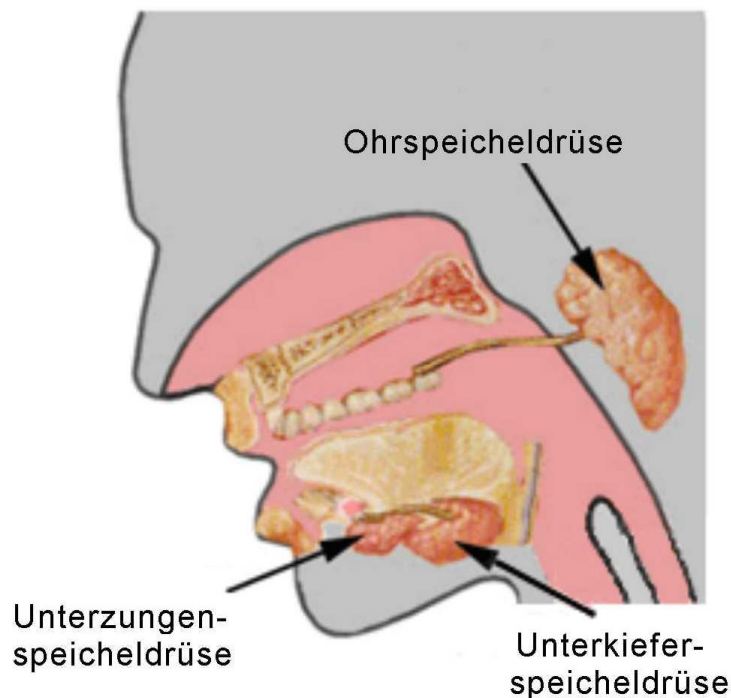


Bild 2.1: Speicheldrüsen

Ein Erwachsener produziert täglich zwischen 600 und 1700 ml Speichel. Die normale Fließgeschwindigkeit des Speichels liegt bei 0,3-0,5 ml/min. Durch Stimulation des Speichelflusses kann die Geschwindigkeit auf 2-3 ml/min gesteigert werden. Nach Schmidt¹⁴ besteht der Gesamtruhespeichel aus 72 % serös-mukösem Submandibularisspeichel, 24 % serösem Parotisspeichel und 4 % mukösem Speichel der Glandula sublingualis. Seröser Speichel zeichnet sich durch eine dünnflüssige Konsistenz ohne schleimigen Zusatz aus und ist reich an Proteinen und Enzymen. Muköser Speichel ist dickflüssig und reich an Mucinen, den Glykoproteinen, die dem Speichel die typische Viskosität geben. Die Menge und Zusammensetzung des Speichels unterliegt individuellen Schwankungen, so dass Abweichungen von den aufgeführten Angaben auftreten können.

2.1.2 Speichelzusammensetzung

Die Speicheldrüsen bestehen aus Zellaggregaten mit Ausführgängen, an deren hinteren Enden sich Acinuszellen befinden.

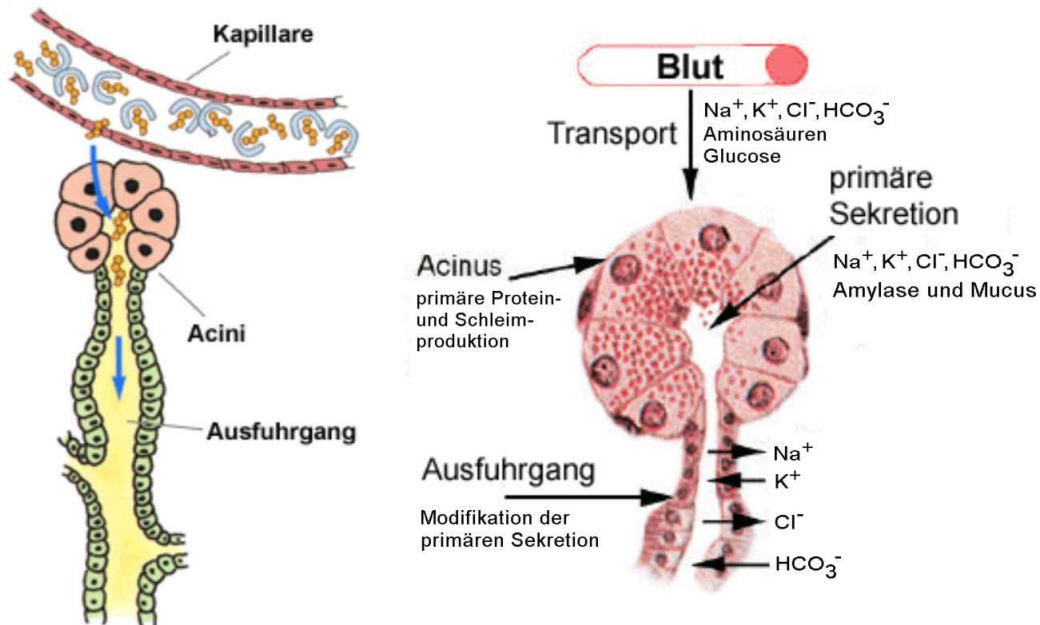


Bild 2.2: Vorgänge in den Acini und dem Ausführgang

Die Acini der Speicheldrüsen sezernieren den isotonen Primärspeichel, der noch nicht das Ausführungsgangsystem der Drüse passiert hat. In den Acini der Speicheldrüsen werden Chloridionen durch einen $\text{Na}^+ / 2 \text{Cl}^- / \text{K}^+$ -Cotransporter in die Zelle aufgenommen, wofür die Na^+ / K^+ -ATPase den Antrieb liefert und von dort über einen Cl^- -Kanal in den oberen Teil der Ausführungsgänge sezerniert. Na^+ und Wasser folgen passiv auf parazellulärem Weg. In den Ausführungsgängen werden Na^+ - und Cl^- -Ionen aus dem Lumen resorbiert und kleinere Mengen an K^+ - und HCO_3^- -Ionen sezerniert.

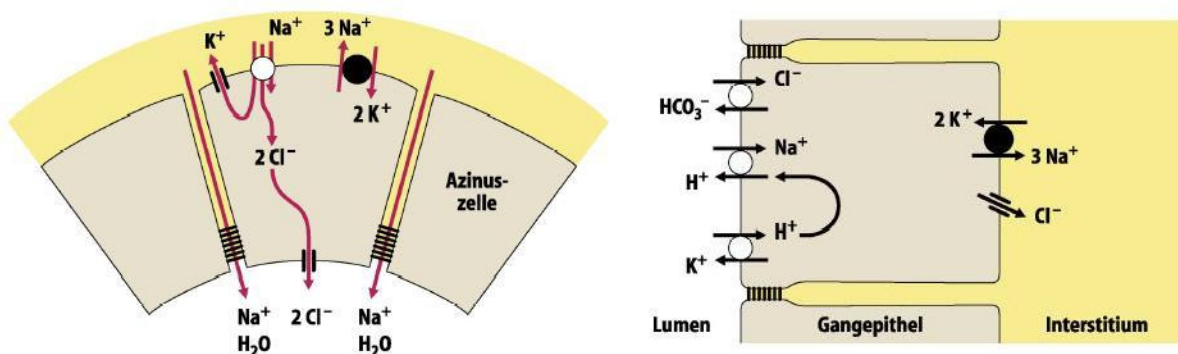


Bild 2.3: Sekretionsmechanismen

Eine Flüssigkeitsrückresorption ist durch die fehlende Permeabilität der lumenseitigen Zellen für Wasser ausgeschlossen, wodurch der Mundspeichel hypoton wird. Die Hypotonizität des Speichels hat gegenüber der Isotonizität den Vorteil, dass die Löslichkeit von Proteinen und die Salzempfindlichkeit der Geschmacksrezeptoren erhöht sind (geringere Adaptation). Die Osmolarität des Speichels unterliegt Schwankungen, da diese davon abhängt, wie lange der Speichel mit dem Epithel der Ausführungsgänge der Drüsen in Kontakt ist. Bei starkem Speichelfluss sind die Transportmechanismen der Ausführungsgänge ausgelastet, so dass die Konzentrationen der Kalium-, Phosphat- und Magnesiumionen abfallen und die der Natrium-, Chlorid- und Hydrogencarbonationen sowie der Proteine ansteigen¹³. Der pH-Wert des Ruhespeichels liegt zwischen 5,5 und 7,0 und kann bei Stimulation bis auf 7,8 ansteigen.

Die letztendliche Zusammensetzung des Speichels ist abhängig von der Häufigkeit, Dauer und Intensität der Reize auf die Speicheldrüsen sowie der Durchblutung und den zirkadianen Schwankungen. Des Weiteren hat das vegetative Nervensystem Einfluss auf die Zusammensetzung des Speichels. Eine Aktivierung des Parasympathikus bewirkt in allen Drüsen eine erhebliche Steigerung der serösen Sekretion, d.h. eines dünnflüssigen, glykoproteinarmen Speichels. Die mukösen Zellen verfügen über keine cholinergen Rezeptoren, so dass es zu keiner erhöhten Produktion von mukösem Speichel kommt. Eine Erregung des Sympathikus liefert durch Stimulation der serösen- und mukösen Zellen der Unterkieferspeicheldrüse geringe Mengen eines viskosen, glykoprotein-, kalium- und hydrogencarbonationenreichen Speichels, da beide Zelltypen über adrenerge Rezeptoren verfügen¹³.

Prinzipiell besteht der Speichel zu 99,4 % aus Wasser und zu 0,6 % aus den in Tabelle 2.1 aufgeführten Bestandteilen¹⁵. In Tabelle 2.1 sind die durchschnittlichen Konzentrationen der gelösten Bestandteile des menschlichen Gesamtruhespeichels im Vergleich zu ihren normalen Blutplasmakonzentrationen dargestellt. Zusätzlich sind im Speichel die gleichen Elektrolyte wie im Plasma enthalten, jedoch in einem anderen Verhältnis. Die aufgeführten Bestandteile des Speichels haben verschiedene wichtige Funktionen. Sie befeuchten den Mund, machen die Nahrung gleitfähig, haben einen reinigenden Effekt, leiten die Verdauung ein und verhindern eine Diffusion schädlicher oder toxischer Stoffe durch die Schleimhaut.

Bestandteile	Konzentration im menschlichen Gesamtspeichel	Normalwerte der Blutplasmakonzentration
Organisch	mmol/l	mmol/l
Harnstoff	2-6	5
Harnsäure	0,2	3
Aminosäuren	1-2	2
Glucose	0,05	5
Lactat	0,1	1

Makromoleküle	mg/l	mg/l
Proteine	1400-2000	70.000
Glykoproteine	110-300	1400
Amylase	380	-
Lysozym	109	-
Lactoperoxidase	3	-
Fettsäuren	10	3000
IgA	194	1300
IgG	14	13.000
IgM	2	1000
Lipide	20-30	5500
Lactoferrin	keine Angaben	keine Angaben

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Gesamtspeichels und des Blutplasmas¹⁶

2.1.3 Permeation von Arzneistoffen und deren Metaboliten in den Speichel

Im Zuge der Sekretion eines Wirkstoffmoleküls in die Speicheldrüsen muss dieser durch die Lipidmembran zwischen den Speicheldrüsengängen und dem übrigen Gewebe permeieren. Dies erfolgt durch aktiven Transport, passive Diffusion oder (Ultra-) Filtration durch die Membranporen. Am häufigsten gelangen Arzneistoffe durch einfache Diffusionsprozesse in den Speichel. Entscheidend für den Diffusionsprozess sind die Lipophilie, der pK_a -Wert, die Molekülgröße, das Molekulargewicht, die Konzentration, die sterische Konfiguration der Substanz und der pH-Wert des Speichels. Wenig ionisierte und lipophile Stoffe können leichter die Lipidmembran zwischen Plasma und Speichel überwinden. Diese Stoffe werden im Vergleich zur Plasmakonzentration angereichert, wenn sie im Speichel ionisiert vorliegen. Für die Permeation eines Stoffes in den Speichel ist die Differenz des pH-Wertes zwischen Plasma und Speichel entscheidend. Martin, Wan und Karam¹⁷ stellten folgende Beziehungen auf, welche den Zusammenhang verdeutlichen:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pH_s - pK_a)}}{1 + 10^{(pH_p - pK_a)}} \cdot \frac{F_P}{F_S} \text{ gilt für Säuren} \quad (2.1)$$

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_s)}}{1 + 10^{(pK_a - pH_p)}} \cdot \frac{F_P}{F_S} \text{ gilt für Basen} \quad (2.2)$$

S steht für die Konzentration im Speichel, P für die Konzentration im Plasma, pH_s für den pH-Wert des Speichels, pH_p für den pH-Wert des Plasmas, pK_a für den pK_a -Wert der entsprechenden Substanz, F_P für die freie Konzentration im Plasma und F_S für die freie Konzentration im Speichel.

Da der physiologische pH-Wert des Blutes bei 7,4 und der pH-Wert des Speichels zwischen 5,5 und 7,8 liegt, wird die Anreicherung einer sauren Substanz durch höhere pH-Werte bzw. einer basischen Substanz durch niedrigere pH-Werte des Speichels begünstigt.

Schwankungen der Speichelkonzentrationen können u.a. durch variierende pH-Werte des Speichels auftreten^{2,3}. Durch einen zunehmenden Speichelfluss steigt die Hydrogencarbonat-Ionenkonzentration im Speichel an. Dies führt zu einem erhöhten Speichel-pH-Wert und somit zu veränderten Speichelkonzentrationen. Des Weiteren können Pharmaka im Gewebe gebunden und gespeichert werden, z.B. durch Bindung an Phospholipide der Zellmembran oder durch Speicherung von lipophilen Substanzen im Fettgewebe. Dies führt ebenfalls zu veränderten Speichelkonzentrationen. Der Speichel selbst enthält nur einen sehr geringen Anteil an Proteinen (ca. 0,3 %), so dass der Wirkstoffgehalt bei neutralen Stoffen der ungebundenen Substanz im Plasma entspricht. Saure Pharmaka gehen im Plasma Bindungen mit Plasmaproteinen (z.B. Albumin) ein und lipophile basische Pharmaka mit α 1-Glykoproteinen¹⁸.

2.2 Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

2.2.1 Einführung

Instrumentierung

Das in dieser Arbeit verwendete kapillarelektrophoretische System (Agilent® 3D CE) besteht aus einem Probengeber, einem Injektionssystem, einer Kieselglaskapillare (fused silica, amorphes SiO₂), die in eine Kassette eingespannt wird, einer Hochspannungsversorgung, zwei Elektroden, zwei Puffergefäßen, einer Thermostatisierungseinheit, einem Autosampler und einem Dioden-Array-Detektor¹⁹.

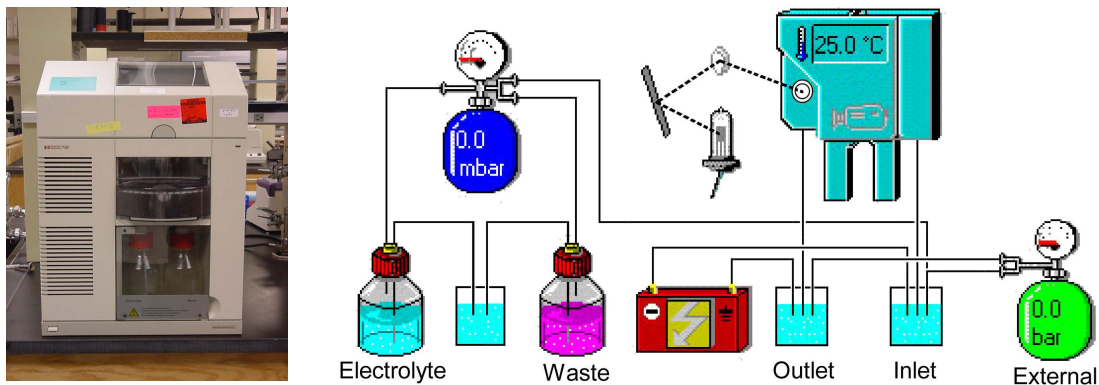


Bild 2.4: Aufbau einer Kapillarelektrophorese

Alle elektrophoretischen Trennungen erfolgten in unbeschichteten Kieselglaskapillaren, die einen Innendurchmesser von 50 µm aufwiesen und mit einer ca. 10 µm starken Polyimidschicht geschützt waren. Zur Messung der Lichtabsorption wurde die Polyimidschicht der Kapillare im Detektionsbereich entfernt. Die Länge bis zum Detektor wird als effektive und die Gesamtlänge als totale Kapillarlänge bezeichnet, so dass in dieser Arbeit immer zwei Längen (z.B. 40/47 cm) angegeben werden.

Zur Injektion der Probe standen beim verwendeten Gerät zwei Injektionsvarianten zur Verfügung, die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion. Die hydrodynamische Injektion erfolgte durch Anlegen eines Druckes auf der Einlassseite (Inlet). Bei der elektrokinetischen Injektion wurde kurzzeitig eine Hochspannung zwischen den Kapillarenden angelegt, wodurch die Probenkomponenten in die Kapillare wanderten. Die Diskriminierung der Analytionen erfolgte bei der elektrokinetischen Injektion entsprechend ihrer Mobilität, d.h. die injizierte Probenmenge nimmt mit der Mobilität der Analytionen zu.

Als Trennmedien wurden wässrige Puffersysteme verwendet, um den Stromtransport und den pH-Wert in der Kapillare konstant zu halten.

Um die Reproduzierbarkeit einer Methode zu erhöhen, wurde der Puffer vor jeder Analyse über das „Replenishment“ ausgetauscht. Das „Replenishmentssystem“ ist im Bild 2.4 mit einer Vorrats- und Abfallflasche abgebildet.

Während der elektrophoretischen Trennung entwickelte sich durch den elektrischen Stromfluss durch die Kapillare Joulesche Wärme, wodurch die Pufferlösung und Kapillare aufgeheizt wurden. Durch Kühlung der Kapillare konnte die störende Konvektion infolge Joulescher Wärmeentwicklung weitgehend verhindert werden.

Trennprinzip

Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld und hängt von der Ladung, dem Radius, der Feldstärke und der Viskosität des Elektrolyten ab²⁰. Für das elektrophoretische Ergebnis spielen außerdem die Zusammensetzung und Konzentration der Elektrolytlösung, die Ionenstärke und der pH-Wert des Elektrolyten, die Temperatur der Kapillare und die Viskosität der Probe eine Rolle. Zusätzlich zur beschriebenen elektrophoretischen Geschwindigkeit der Ionen muss der elektroosmotische Fluss (EOF) berücksichtigt werden²¹. Die Gesamtgeschwindigkeit der Analytionen setzt sich aus der elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeit zusammen.

Der elektroosmotische Fluss

Die Innenwände der Quarzkapillaren sind mit Silanolgruppen bedeckt, die oberhalb des pH-Wertes von 2 negativ geladen sind²². An der negativ geladenen Kapillarinnenwand reichern sich Kationen an, so dass eine Doppelschicht entsteht. Wird eine Spannung angelegt, wandern die Kationen zur Kathode und ziehen durch ihre Solvathülle die gesamte Pufferlösung mit^{20, 21}. Diese Bewegung der Pufferlösung wird als elektroosmotischer Fluss bezeichnet. Der EOF bewirkt, dass Neutralteilchen, die eigentlich durch ein elektrisches Feld nicht angezogen werden, bei kapillarelektrophoretischen Bestimmungen den Detektor erreichen und registriert werden. Ist der EOF genügend hoch werden auch Anionen zur Kathode transportiert.

Eine einzigartige Eigenschaft des elektroosmotischen Flusses ist, dass die Geschwindigkeit über den gesamten Querschnitt der Kapillare konstant bleibt. Auf Grund des sehr flachen Strömungsprofils des EOFs ergeben sich schmalere Peaks als bei der HPLC (parabolisches Strömungsprofil), woraus eine bessere Trennleistung der Kapillarelektrophorese gegenüber der HPLC resultiert.

Zusätzlich sind in einer ungepackten Kapillare die theoretischen Trennstufenhöhen verkleinert und die Auflösung verbessert, weil der Term in der van-Deemter Gleichung, der die unterschiedlichen Weglängen in einer gepackten Säule berücksichtigt, wegfällt. Eine weitere Abnahme der Trennstufenhöhen erfolgt in der Kapillarelektrophorese bei ungepackten Kapillaren durch den Wegfall des Massetransfer-Terms, der sich aus der endlichen Zeit ergibt, die ein Analyt zur Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase benötigt. Die einzige wesentliche Ursache für die Peakverbreiterung bei der Kapillarelektrophorese ist die longitudinale Diffusion²¹.

2.2.2 Grundlagen der Methodenentwicklung

Zur Beeinflussung der Selektivität bzw. zur Optimierung der Trennungen wird häufig zuerst der pH-Wert des Puffers variiert. Da sich die effektive Mobilität eines Analyten durch Protonierungs- bzw. Deprotonierungsvorgänge mit dem Dissoziationsgrad stark ändert, ist die größte Mobilitätsänderung bei variierendem pH-Wert zu beobachten.

Die Trennleistung einer Methode wird außerdem durch die Spannung beeinflusst. Bei steigender Spannung steigt die Zahl der theoretischen Stufen und damit auch die Trennleistung. Bei der Auswahl einer geeigneten Spannung sollte auf die Höhe der Spannung und der daraus resultierenden Stromstärke geachtet werden, damit eine effektive Abführung der entstehenden Jouleschen Wärme sichergestellt ist und eine Peakverbreiterung durch folgende Konvektion vermieden wird²¹. Laut Herstellerangaben (Agilent®) liegt die optimale Stromstärke einer Methode bei maximal 50 μA . Dies wurde mit Ausnahme der Salicylsäure für alle Methoden erreicht. Bei der Salicylsäure-Methode betrug die Stromstärke etwa 60 μA . Dies wird laut Herstellerangabe als „gut“ eingestuft²³.

Das Auftreten von verschiedenen Peakbreiten wird durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der Proben am Detektor bedingt. Die Probenbestandteile, die nach wenigen Minuten am Detektor vorbeiwandern, besitzen eine hohe Geschwindigkeit und sind schmaler, während deutlich später detektierte Peaks breiter aufgenommen werden. Bedingt durch die unterschiedliche Verweilzeit der Komponenten im Detektor werden in Abhängigkeit von der Migrationszeit unterschiedliche Flächenwerte für die gleiche Probe bestimmt. Es werden jedoch konstante Werte erhalten, wenn die Peakfläche durch die Migrationszeit der Probe dividiert wird. Durch diese Normalisierung werden bei schwankenden Migrationszeiten quantitative Ergebnisse erhalten, die besser reproduzierbar sind²⁴.

Weitere Ursachen für eine Peakverbreiterung sind Adsorptionen der Analyten an der Kapillareninnenwand, zu hohe Injektionsvolumen und die Elektrodispersion auf Grund von größeren

Mobilitätsunterschieden zwischen Analyt und Puffer. Um die Peakverbreiterung durch Adsorptionen der Analyten an der Kapillarenwand zu minimieren, war die Entwicklung von effektiven Konditionierungsschritten zwischen den einzelnen Läufen sowie Maßnahmen zur Reduzierung der Salz- bzw. Fremdionenkonzentration wichtig. Dies wurde durch eine Festphasenextraktion der Probe erzielt. Zusätzlich konnte durch die Extraktion eine Sensitivitätserhöhung erreicht werden. Gausepohl und Blaschke²⁵ berichteten von einer Steigerung der Sensitivität bei der Vermessung von biologischen Proben, indem eine Extraktion mit anschließender elektrokinetischer Injektion angewendet wurde. Siluvera und Stewart²⁶ verwendeten diese Technik zur Untersuchung von Serum, wobei die Injektion aus einer Probe niedriger Leitfähigkeit in eine gefüllte Kapillare mit hoher Ionenstärke erfolgte. Nach Anlegen der Spannung an die Kapillare tritt eine größere elektrische Feldstärke über der Probe auf, so dass die Ionen schneller wandern. Sobald sie auf den Trennpuffer stoßen, werden diese Ionen abgebremst und in einer schmalen Zone komprimiert^{27, 28}.

Dieses sog. „Sample Stacking“, welches zu einer Aufkonzentrierung der Analyten führt, verbessert die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Es ermöglicht eine genauere Peakintegration, da die Peaks einen steileren Anstieg aufweisen und sich somit deutlicher von der Matrix abheben. Die Peakbreite an der Basis ist minimiert, so dass schmalere Peaks erhalten werden. Zhang und Thormann²⁹ wiesen eine erhebliche Sensitivitätserhöhung durch die Verwendung einer Wasserzone beim „Sample Stacking“ nach. Sie erzielten eine Sensitivitätserhöhung um das Tausendfache.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den überwiegenden Methoden das „Sample Stacking“ eingesetzt, da die Konzentrationsempfindlichkeit bei der CE, durch den verkürzten Strahlengang, ungünstiger ist als bei der HPLC. Die geringe Schichtdicke der Kapillare bedingt eine sehr geringe optische Weglänge, wodurch die Empfindlichkeit der Absorptionsdetektion eingeschränkt wird. Ein weiterer Lösungsansatz zur Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist die Vergrößerung der Schichtdicke. Dies erfolgt durch blasenförmige Aufweitungen der Kapillaren (bubble-cell Kapillaren), Z-förmige oder rechteckige Kapillaren. Diese Kapillaren sind jedoch wegen zu erwartenden Auflösungsverlusten und technischen Schwierigkeiten nur bedingt einsetzbar.

3. Validierungsparameter

Allgemeines

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Speichel. Um zu prüfen, ob die entwickelten Methoden zuverlässige und verwertbare Ergebnisse lieferten, wurde eine Validierung der Methoden durchgeführt. Die ISO-Norm 8402 definiert die Validierung wie folgt: „Die Validierung ist die Bestätigung durch eine Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden.“

In der vorliegenden Arbeit wurden die wesentlichen Arbeitsschritte systematisch überprüft und der Nachweis der Zuverlässigkeit der analytischen Methoden erbracht. Da die entwickelten Methoden bioanalytische Analysenverfahren darstellen, erfolgte die Ermittlung der entsprechenden Validierungsparameter überwiegend in Anlehnung an die Richtlinie für bioanalytische Analysenverfahren der Food and Drug Administration (FDA)³⁰. In dieser Richtlinie ist festgelegt, welche Kriterien mit welchen Fehlergrenzen eine analytische Methode erfüllen muss. In den folgenden Abschnitten werden die Validierungsparameter und die Vorgehensweise ihrer Ermittlung kurz erläutert.*

Selektivität-Spezifität

Es wird in der Validierung zwischen der Selektivität und Spezifität unterschieden. Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne Störung zu erfassen. Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit einer Methode eine interessierende Komponente ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen. Die Ermittlung der Selektivität bzw. Spezifität erfolgte nach der Vorgabe der FDA, indem sechs verschiedene negative Proben (analytfreie Probe mit Matrix) vermessen wurden. Bevor die Analysen der Proben durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen keine Störungen im Bereich der nachzuweisenden Substanzen zu beobachten waren.

* Die statistischen Grundlagen zur Berechnung der einzelnen Parameter wurden aus dem „Handbuch: Validierung in der Analytik“ von Stavros Kromidas³¹ entnommen.

Linearität

Die Linearität beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen dem Messwert (Signal) und der Konzentration. Besteht eine Abhängigkeit zwischen diesen Größen ist das Analysensystem für die entsprechende Bestimmung im kalibrierten Bereich zulässig. Zur Kalibration wurden mindestens sechs Konzentrationsniveaus eingesetzt, die den zu erwartenden Konzentrationsbereich abdeckten. Die negativen Proben mit verschiedenen Konzentrationen eines Standards oder einer Standardmischung sind ohne oder nach einer Probenaufbereitung dreimal vermessen worden. Zur Regressionsanalyse wurde das Programm Dintest^{®32}, beruhend auf DIN 32645, herangezogen. Weiterhin wurden die Reststandardabweichungen, die Verfahrensstandardabweichungen und die relativen Verfahrensstandardabweichungen berechnet. Die Reststandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Residuen und die Verfahrensstandardabweichung gibt die Leistungsfähigkeit einer Methode an. Die relative Verfahrensstandardabweichung ermöglicht es, verschiedene Verfahren leichter zu vergleichen und zu interpretieren.

Mit Hilfe des Mandel-Tests (DIN 38402) konnte für die ermittelten Regressionen der untersuchten Substanzen gezeigt werden, dass der Unterschied zwischen den linearen und quadratischen Regressionen nur zufällig war. Die Berechnungen in dieser Arbeit erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Die Präzision beschreibt das Maß der Übereinstimmung unabhängiger Analyseergebnisse untereinander. Als Präzisionsmaß wird die Standardabweichung (Stabw) und der Variationskoeffizient (Vk) verwendet. Die Streuung der Ergebnisse kann entweder von dem Analysengerät selbst oder von der Methode stammen. Nachstehend sind die Präzisionsarten, die in dieser Arbeit Relevanz haben, aufgeführt.

Messpräzision

Die Messpräzision beschreibt die Schwankungen, die das Analysengerät selbst verursacht. Zur Ermittlung wurde der entsprechende Standard in drei verschiedenen Konzentrationen zu den negativen Proben dotiert und jeweils sechsfach aus demselben Gefäß vermessen. Der Variationskoeffizient wurde bestimmt.

Methodenpräzision

Die Methodenpräzision bezieht Schwankungen der einzelnen Methodenschritte mit ein (Probennahme, Wägung, Pipettierung, Probenvorbereitung, Messung, Auswertung). Jeweils sechs separat hergestellte Lösungen von drei festgelegten Konzentrationen des Standards wurden zu den negativen Proben dotiert, mit der entsprechenden Vorschrift aufgearbeitet und aus unterschiedlichen Gefäßen analysiert. Es wurden die Variationskoeffizienten ermittelt.

„Interday“ Präzision

Die Mess- bzw. Methodenpräzision wurde auch als eine „Interday“ Präzision bestimmt. Dies ist eine Wiederholpräzision, die an drei verschiedenen Tagen ermittelt wurde.

Für jede Präzisionsbestimmung war die FDA-Richtlinie die Grundlage, die vorschreibt, dass eine niedrige, mittlere und hohe Konzentration des Messbereichs einer Probelösung jeweils mindestens fünfmal zu bestimmen ist. Der ermittelte Variationskoeffizient durfte für keine der vermessenen Konzentrationen größer als 15 % sein. Im Bereich der unteren Bestimmungsgrenze konnte der Variationskoeffizient bis zu 20 % erreichen.

Prüfung auf Normalverteilung

Die Voraussetzung der statistischen Betrachtung ist, dass die Analysenwerte normal verteilt sind. Da in der vorliegenden Arbeit mit Stichproben $N < 10$ gearbeitet wurde, konnte der Schnelltest nach David ($n = 6$, 99 %; $g_u = 2,15$ $g_o = 3,16$) durchgeführt werden.

F-Test und t-Test

Die Beurteilung mehrerer Datenreihen erfolgte mit dem Fishers' F-Test und dem Student t-Test (bei der „Interday“ Präzision) anhand der Standardabweichungen bzw. Mittelwerte. Es wurde überprüft, ob die Resultate keine signifikanten Abweichungen aufwiesen. Unterschiede können zufallsbedingt sein oder auf eine Veränderung der Methode beruhen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit 5 % gewählt.

Wiederfindung

Die Anwendbarkeit der Analysenmethoden auf natürliche, mit Matrix belastete Proben ist ein wesentliches Gütekriterium der Methoden. In der Praxis der Speichelanalytik traten in der Probenvorbereitung Substanzverluste auf.

Dies bedeutet aber nicht von vornherein eine Beeinträchtigung der Methode. Es muss gezeigt werden, wie zuverlässig eine entwickelte Probenvorbereitung ist, d.h. welche Schwankungen

in der Wiederfindung auftreten. Gemäß der Richtlinie der FDA für bioanalytische Analyseverfahren wird die Wiederfindung für drei verschiedene Konzentrationen, eine niedrige, mittlere und hohe ermittelt. Zu den negativen Proben wurden diese drei Standardlösungen dotiert, nach der entsprechenden Vorschrift aufgearbeitet und kapillarelektrophoretisch vermessen. Die mit diesen Proben ermittelten Peakflächen (A) wurden verglichen mit den Peakflächen (B), die entstanden, wenn die Standards erst nach der Extraktion der negativen Proben hinzugefügt wurden. Der Quotient A/B, ausgedrückt in Prozent, ergab die Wiederfindung. Zur Bestimmung der Wiederfindung der Methoden, die keine Festphasenextraktion zur Probenaufbereitung beinhalteten, wurde das Standardadditionsverfahren³¹ verwendet. Die Wiederfindung gibt die gemessene Konzentration des zudosierten Analyten (errechnet mit Hilfe der entsprechenden Regressionsgleichung) bezogen auf die wahre Konzentration (bekannt durch die Zusetzung zur Probe) in Prozent an. In der Richtlinie der FDA sind keine Angaben zu tolerablen Schwankungen und keine absoluten Grenzen für die Wiederfindung festgelegt.

Richtigkeit

Die Bestimmung der Richtigkeit erfolgte nach der Vorgabe der FDA, indem drei verschiedene Konzentrationen jeweils mindestens fünfmal vermessen wurden. Die ermittelten Mittelwerte dieser Konzentrationen wurden mit den Sollwerten verglichen. Die Richtigkeit gibt die relative Abweichung des errechneten Wertes vom wahren Wert in Prozent an. Bei einem positiven Zahlenwert der Richtigkeit ist der errechnete Wert kleiner als der wahre Wert, bei einem negativen Zahlenwert ist der errechnete Wert größer. Es werden maximale Abweichungen von 15 % toleriert. Im Bereich der Bestimmungsgrenze darf der Wert 20 % nicht überschreiten.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist weder ein internationaler verbindlicher Standard noch eine Richtlinie vorhanden. Mit Hilfe des Dintests[®], der auf der DIN 32645 beruht, wurden in der vorliegenden Arbeit die Nachweisgrenzen (limit of detection) und die Bestimmungsgrenzen (limit of quantitation) bei einer vorgegebenen Sicherheit von 99 % ermittelt.

4. Probenentnahme und Probenvorbereitung

4.1 Probanden

Die Speichel- und Urinuntersuchungen wurden an Probanden mit ausschließlich apothekenpflichtigen Medikamenten durchgeführt. Insgesamt waren 30 Frauen und Männer im Alter von 25 bis 55 Jahren in die Speichel- bzw. Urinuntersuchungen einbezogen. Vor der Gabe des Medikamentes wurde überprüft, ob eine Kontraindikation für dieses Arzneimittel beim Probanden vorlag und die Einnahme anderer Medikamente eine Woche zurücklag. Arzneimittel, die täglich eingenommen wurden, sind vermerkt worden. Der Proband wurde über eventuelle Nebenwirkungen aufgeklärt und hat sein Einverständnis gegeben. Für jede Untersuchung wurden Angaben zur Person, die Dosierung des Arzneimittels und die Nahrungsaufnahme notiert.

4.2 Probenentnahme

Die Probanden nahmen mit einer genau festgelegten Menge Wasser (200 ml) die Tabletten ein bzw. dosierten die Flüssigkeiten nach den Angaben des Beipackzettels. Es wurden bestimmte Zeiten für die Entnahme des Speichels bzw. Urins nach der Einnahme des Arzneimittels festgelegt. Im Zeitraum der Probenentnahme sollte wenig Nahrung zu sich genommen werden. Als Flüssigkeitszufuhr war Wasser erlaubt. Vor jeder erneuten Speichelentnahme wurde der Mund mit Wasser ausgespült. Es durfte keine Zahnpasta verwendet werden, weil Inhaltsstoffe der Zahnpasta Bestandteile des Speichels beeinflussen könnten. Die Entnahme des Speichels erfolgte mit der Watterolle einer Salivette[®].



Bild 4.1: Schematische Darstellung einer Salivette[®]

Salivetten[®] bestehen aus zwei ineinander gesteckten Plastikgefäßen mit einer Watterolle im Locheinsatz. Die Watterolle wurde aus der Salivette[®] entnommen und für eine Minute im Mund behalten. Die voll gesogene Watterolle wurde dann in den Locheinsatz gegeben und in der Salivette[®] zentrifugiert, so dass der Speichel aus dem Locheinsatz in das äußere Gefäß floss. Bei der Verwendung der Salivetten[®] wurde nach der Zentrifugation ein wasserklarer Speichel gewonnen. Der bei anderen Gewinnungsmethoden oft notwendige Schritt des Ein-

frierens von frischem Speichel zur Erniedrigung der Viskosität vor der weiteren Bearbeitung konnte entfallen. Der Speichel wurde lediglich bei -30 °C in dem äußeren Plastikgefäß gelagert, um Enzymprozesse zu unterbinden. Auf eine Stimulation mit Zitronensäure konnte verzichtet werden, weil die Entnahme mit der Watterolle 0,5 bis 1 ml Speichel lieferte. Dies war eine ausreichende Menge für die weitere Bearbeitung.

4.3 Probenvorbereitung

Proteinfällung

Proteine sind amphoter. Ihr Ampholytcharakter wird durch freie saure und basische Gruppen im Molekül bedingt. Da die Proteine meist hydrophil sind, d.h. mit einem Wassermantel umgeben, schützen sie sich vor dem Ausflocken. Der Zusatz geringer nichtpolarer Lösungsmittel (Methanol, Acetonitril) führt zum Verlust des Wassermantels und einer geringeren Löslichkeit der Proteine, so dass eine Ausflockung auftritt.

Die Vorteile der Proteinfällung sind der geringe Zeitaufwand und die niedrigen Kosten. Zusätzlich werden Substanzverluste verhindert, die bei der Festphasenextraktion auftreten. Die Proteinfällung wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Speicheluntersuchungen der Arzneistoffe Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Paracetamol und Ambroxol mit Methanol oder Acetonitril durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Proteinfällung meist nicht effektiv genug war, um die Speichelmatrix ausreichend zu minimieren, so dass mit der kapillarelektrophoretischen Methode eine Trennung der Matrix von den gewünschten Substanzen erreicht wurde. Zur effektiven Minimierung der Matrix wurde die Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung angewendet.

Filtration

Zur Filtration der Speichelproben, nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure, wurde ein Membran-Tiefenfilter Captiva[®] der Firma Varian aus Polyvinylidendifluorid (PVDF; speziell geeignet für biologische Flüssigkeiten) mit der Porenweite 0,45 µm eingesetzt. Der Vorteil der Filtration mit Captiva[®] Filtern liegt in der schnellen Reinigung partikelbeladener Proben ohne Verstopfen der Membran. Der Captiva[®] Filter ermöglichte es, die Proteinfällung und Filtration in diesem Filter direkt durchzuführen.

Als weitere Membranfilter wurden Multoclear[®] Filter 0,45 µm (Polyamid) bei den Speicheluntersuchen des Ibuprofens eingesetzt.

Die Filtrationen mit verschiedenen Filtern zeigten keine effektiven Abtrennungen der Speichelmatrix, so dass bei den weiteren Arzneistoffen auf den Einsatz einer Filtration zur Probenvorbereitung verzichtet wurde.

Bei den Urinuntersuchungen, nach Einnahme von Paracetamol, konnten 0,45 µm Membranfilter (enthalten Cellulosemischester aus Nitrocellulose) erfolgreich zur Minimierung der Matrix verwendet werden.

Festphasenextraktion*

In den letzten Jahren hat sich die Festphasenextraktion (SPE) als leistungsstarke Probenvorbereitung etabliert. Vorteile der Festphasenextraktion gegenüber der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion sind der geringere Lösungsmittelverbrauch, bessere Wiederfindungen, klarere Extrakte, keine Emulsionsbildung, die Zeitersparnis und die Möglichkeit zur Automatisierung. Durch die Vielfalt an Sorbentien bei der Festphasenextraktion besteht die Möglichkeit polare, unpolare und ionische Wechselwirkungen auszunutzen, wobei man bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion nur auf Verteilungsgleichgewichte in flüssiger Phase zurückgreifen kann. Um ein geeignetes SPE-Sorbens (grau in der Tabelle 4.1) auszuwählen, wurden die Analyten und die Polarität der Probenmatrix betrachtet.

* Die Angaben und verwendeten Abkürzungen stammen aus Herstellerinformationen.

		Polarität des Analyten		
		unpolar	polar	ionisch
Eigenschaften der Probenmatrix	wässrig	unpolar	unpolar	unpolar Ionenaustausch
	unpolar ionisch	polar	polar	unpolar Ionenaustausch

Tabelle 4.1: Kriterien für die Auswahl eines geeigneten Sorbens

Komponenten mit einer unpolaren Struktur können über van-der-Waals-Kräfte an unpolare Sorbentien adsorbiert werden. Typische unpolare Sorbentien sind C18- und C8-modifizierte Kieselgele. Polare Wechselwirkungen zwischen den Sorbentien und funktionellen Gruppen des Analyten entstehen über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen. Polare Sorbentien sind unmodifizierte oder modifizierte Kieselgele mit CN-, NH₂- oder OH-Gruppen. Als Anionenaustauscher werden meist primäre, sekundäre oder tertiäre Amine sowie quartäre Ammoniumsalze eingesetzt, als Kationenaustauscher anionische Gruppen, wie Carboxyl- oder Sulfonylgruppen. Bei diesen elektrostatischen Anziehungskräften tritt die höchste Bindungsenergie auf. Dies bedeutet, dass bei der Elution ein entsprechendes starkes Elutionsmittel eingesetzt werden muss, um die Wechselwirkungen wieder aufzuheben.

Ziele der Festphasenextraktion waren die Entfernung störender Matrixbestandteile und die selektive Anreicherung und Isolierung der Analyten. Dies erfolgte in mehreren Arbeitsschritten, die sich aus der Probenvorbehandlung, der Konditionierung, der Probenapplikation, eventuelles Waschen des Sorbens, dem Trocknen und einer selektiven Elution des Analyten zusammensetzten. Zur Festphasenextraktion wurden die Kartuschen auf einer Vakuumkammer fixiert.

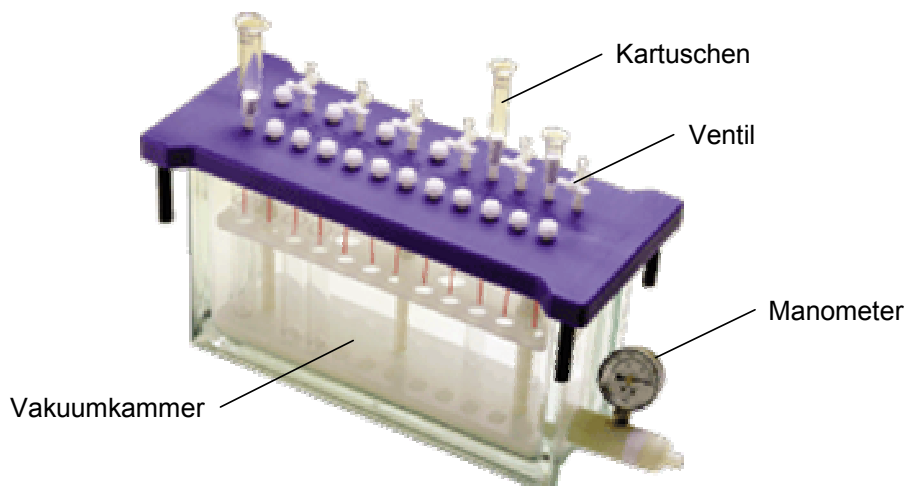


Bild 4.2: Vakuumkammer für die Festphasenextraktion

Die meisten Extraktionen erfolgten mit Mischbettphasen. Es wurden die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen der Firma Varian für die basischen Substanzen Ambroxol, Phenylephrin, Diphenhydramin, Dextromethorphan, Ephedrin, Pseudoephedrin, Nicotin, Amfepramon und die „Bond Elut Certify[®] II“ Kartuschen für die saure Substanz Ibuprofen eingesetzt. Die Auswahl fiel auf die Mischbettphasen, da diese Extraktionen mit zwei verschiedenen Retentionen des Analyten ermöglichen. Die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen weisen ein gemischtes Sorbentbett aus C-8 Ketten und Benzensulfonsäure (SCX) auf, so dass die Retention des Analyten auf unpolaren Kräften und einem starken Kationenaustausch beruht. Das „Bond Elut Certify[®] II“ Sorbentbett besitzt als gebundene funktionelle Gruppen C-8 Ketten und quartäre Ammoniumsalze (SAX). Die Retention des Analyten beruht auf unpolaren Kräften (van-der-Waals Kräfte) und starkem Anionenaustausch (elektrostatische Anziehung). Da es sich bei diesen Kartuschen um kieselgelgebundene Materialien handelt, gilt als Arbeitsbereich ein pH-Wert von 2 bis 8.

Zur selektiven Anreicherung der Analyten Norephedrin und Nicotin wurden zusätzlich Kartuschen der Firma Varian mit einem unpolaren Sorbens C-18 bzw. einem schwach sauren Kationenaustauscher (CBA = Carboxylic Acid) verwendet.

Die unpolaren Wechselwirkungen eines C-18 Sorbens sind am stärksten, wenn die Analyten ungeladen vorliegen, so dass eine genaue pH-Wert Einstellung der Probe entscheidend ist. Als Faustregel gilt bei sauren Analyten ein pH-Wert von $\leq \text{pK}_a - 2$ und für basische Analyten ein pH-Wert von $\geq \text{pK}_a + 2$.

Die Ionenaustausch-SPE führt zu selektiven Extraktionen, ist aber komplizierter, weil die Ionenstärke, die Ionenselektivität und der pK_a -Wert der Analyten berücksichtigt werden müssen. Bei der Probenvorbereitung entstehen geladene Analyten. Dies bedeutet bei der Verwendung eines Anionenaustauschers, dass ein pH-Wert der Probe mindestens zwei pH-Einheiten oberhalb des pK_a -Wertes des Analyten bzw. für einen Kationenaustauscher mindestens zwei pH-Einheiten unterhalb des pK_a -Wertes des Analyten gewählt werden muss. Die Ionenstärke sollte zwischen 20-50 mM bei der Konditionierung liegen, da sonst die ioni-schen Wechselwirkungen mit dem Sorbens unterdrückt werden. Bei der Auswahl der Ionen zur Konditionierung muss die Ionenselektivität bedacht werden, die anhand von starken Austauschern bestimmt wurde. Protonen werden weniger stark als Natriumionen, Kaliumionen stärker als Natriumionen gebunden. Je stärker das Kation des Puffers bei der Konditionierung gebunden wird, umso niedriger ist die Chance für das organische Kation bei der Probenapplikation ausgetauscht zu werden. Bei der Konditionierung der Ionenaustausch-SPE ist außerdem die Ladung des Sorbens zu beachten. Bei einem Anionenaustauschersorbens

wird ein pH-Wert von $\leq \text{pK}_a - 2$ für die Pufferlösung gewählt und für einen Kationenaustauscher ein pH-Wert von $\geq \text{pK}_a + 2$. Dies bedeutet für die „CBA[®]“-Kartuschen mit Carboxypropyl-funktionalisiertem Kieselgel, die einen pK_a -Wert von 4,8 aufweisen, dass ein pH-Wert größer als 6,8 ausgewählt werden muss. Dann liegen die funktionellen Gruppen negativ geladen vor. Nach der Probenapplikation wird ein langsamer Durchfluss eingestellt, da die elektrostatischen Wechselwirkungen langsam stattfinden. Zur Elution des Analyten können verschiedene Methoden angewendet werden. Beim Einsatz eines schwachen Ionenaustauschers wird das Sorbens durch eine Base bzw. Säure neutralisiert oder die Analyten durch ein Gegenion aus einer Salzlösung (z.B. Natriumchlorid) verdrängt.

Als weitere Festphasenextraktionsvarianten wurden „Strata X-C[®]“ Kartuschen der Firma Phenomenex[®] für die Analyten Paracetamol, Diphenhydramin, Ephedrin und Nicotin verwendet. Es ist ein polymerbasiertes starkes Kationenaustauschermaterial. Neben dem Ionenaustausch sind aromatische und polare Wechselwirkungen für die Retention verantwortlich. Der Retentionsmechanismus erlaubt eine fraktionierte Trennung von Säuren, neutralen Analyten und Basen aus komplexen Mischungen. Die spezielle Oberflächenmodifizierung des Polymersorbens bewirkt, dass es auch konditioniert bleibt, wenn es während der Extraktion trocken läuft.

Das Sorbens besitzt eine Partikelgröße von 33 μm und einen pH-Stabilitätsbereich von 1-14.

5. Untersuchungen saurer Arzneistoffe

Ziel der Untersuchungen war es, einen pK_a -Wert zu bestimmen, ab dem Arzneistoffe und deren Metaboliten in den Speichel permeieren und mit kapillarelektrophoretischen Methoden nachweisbar sind. Für die Untersuchungen saurer Arzneistoffe wurden Acetylsalicylsäure und Ibuprofen ausgewählt, da sie über unterschiedliche pK_a -Werte verfügen. Nachfolgend sind die pK_a -Werte von Acetylsalicylsäure mit dessen Metaboliten Salicylsäure und Gentisinsäure sowie von Ibuprofen aufgelistet:

Gentisinsäure	$pK_a = 2,9$
Salicylsäure	$pK_a = 3,0$
Acetylsalicylsäure	$pK_a = 3,7$
Ibuprofen	$pK_a = 4,4$

Die Probenvorbereitung bei der Acetylsalicylsäure und Ibuprofen erfolgte mit einer Proteinfällung und einer Filtration. Eine Festphasenextraktion war nur bei dem Arzneistoff Ibuprofen notwendig (S. 40).

Die kapillarelektrophoretische Methodenentwicklung für saure Arzneistoffe wurde anhand von Acetylsalicylsäure und dessen Metaboliten durchgeführt. Ziel war es, eine kapillarelektrophoretische Methode mit einer reproduzierbaren Identifizierung und Quantifizierung saurer Arzneistoffe und deren Metaboliten, mit einer guten Trennleistung und niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie einer kurzen Analysenzeit, zu entwickeln. Die Ausgangsüberlegungen der Methodenentwicklung basierten auf einer Publikation von Zaugg et al.³³. Abweichend zu der in dieser Publikation beschriebenen Methode wurde eine kürzere Kapillare (23/30 cm) zur Reduzierung der Analysenzeit mit einer angepassten Spannung von 12 kV verwendet sowie ein 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 als Hintergrundelektrolyt. Zur hydrodynamischen Injektion wurde ein Druck mit 25 mbar für 5 s eingesetzt.

Es wurde folgende Methode ASS1.M* für saure Arzneistoffe entwickelt:

Methode:	ASS1.M
----------	--------

* Der Methodenname ist eine Abkürzung für Acetylsalicylsäure. In der vorliegenden Arbeit wurden die entwickelten Methoden durch Abkürzungen der untersuchten Arzneistoffe benannt. Einige Methoden werden auf mehrere Arzneistoffe angewendet, so dass der Name der Methode in diesen Fällen nicht im Zusammenhang mit dem Namen des untersuchten Arzneistoffes steht.

Kassettentemperatur:	20,0 °C
Puffer:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Replenishment:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Präkonditionierung:	1. 0,5 min I: 0,1 N NaOH 2. 0,5 min I: Wasser 3. 2,0 min I: 50 mM Boratpuffer pH 9,3
Elektrik:	Polarität Positiv
Hydrodynamische Injektion:	25,0 mbar für 5,0 s Probe
Laufzeit:	20,0 min
Spannung:	12,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

Diese Ausgangsmethode wurde für die einzelnen sauren Arzneistoffe durch wenige Variationen weiter optimiert.

5.1 Acetylsalicylsäure

5.1.1 Einleitung

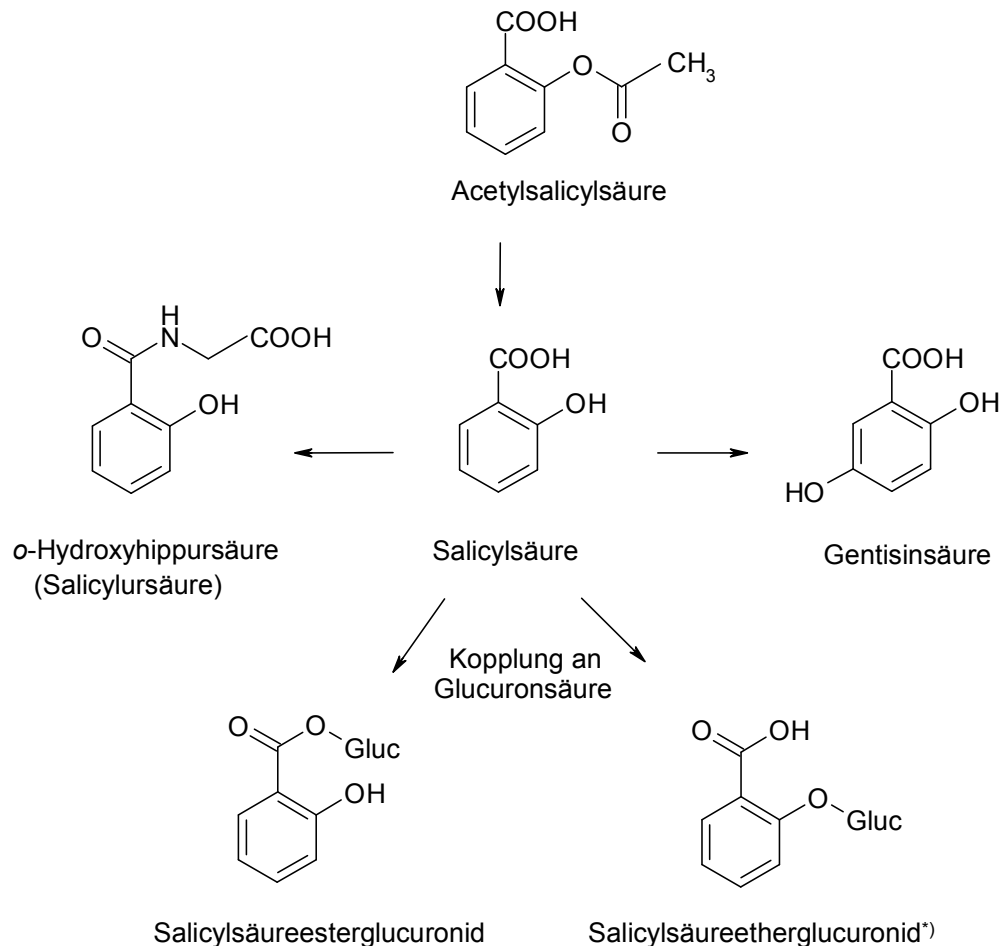
Die Acetylsalicylsäure* (ASS) wird nach oraler Aufnahme im Magen und Dünndarm resorbiert und mit einer Halbwertszeit von 15 Minuten zum Teil in der Mucosa des Gastrointestinaltraktes bzw. in der Leber durch Leber- und Blutesterasen zu Salicylsäure† desacetyliert (First-Pass-Metabolismus). Nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure kommt es zur Acetylierung der Aminosäure Serin in der Cyclooxygenase I (COX I) und der Cyclooxygenase II (COX II). Infolge der Acetylierung sind beide Isoenzyme irreversibel blockiert. Der maximale Plasmaspiegel der Acetylsalicylsäure wird nach 10 bis 20 Minuten erreicht und liegt bei einmaliger oraler Gabe von 1000 mg bei maximal 20 µg/ml. Bei Dosierungen von 1000 mg Acetylsalicylsäure wurden Salicylsäureplasmakonzentrationen von 40-50 µg/ml gefunden^{34, 35}. Rumble et al.³⁶ verabreichten acht Probanden Acetylsalicylsäure zur Therapie von rheumatoiden Arthritis mit einer Dosierung von 3,9 g/Tag. Nach acht Tagen fanden sie maximale Plasmaspiegel zwischen 105 und 227 µg/ml. Im Speichel konnten maximale Konzentrationen zwischen 4,5 und 8 µg/ml nachgewiesen werden.

* Nach IUPAC: 2-(Acetyloxy)-benzoesäure

† Nach IUPAC: 2-Hydroxybenzoesäure

Kaneo et al.³⁷ und Graham et al.³⁸ wiesen 60 bis 90 Minuten nach einer Dosierung von 650 mg eine maximale Salicylsäurekonzentration von 1,5 µg/ml im Speichel nach.

Bei Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure beträgt die Plasmahalbwertszeit von Salicylsäure 2 bis 3 Stunden³⁹. Die Salicylsäure liegt zu über 80 % an Plasmaproteine gebunden vor, wobei der Anteil zunimmt, je geringer die Salicylsäurekonzentration im Plasma ist³⁷. Lange et al.⁴⁰ und Pohto⁴¹ analysierten die Bindung von Salicylsäure an Proteinen im Speichel. Es zeigte sich, dass 35 bis 50 % der Salicylsäure gebunden an Speichelproteinen vorlagen. Als Hauptmetabolite der Acetylsalicylsäure werden im Plasma neben der Salicylsäure Konjugate der Salicylsäure mit Glucuronsäure oder Glycin gefunden. Die Kopplung mit Glycin führt zur ortho-Hydroxyhippursäure. Außerdem wird Salicylsäure zur Gentisinsäure oxidiert^{39, 42}.



Schema 5.1: Biotransformation von Acetylsalicylsäure; *) Salicylsäureetherglucuronid wurde aus der Literatur als üblich verwendete Bezeichnung übernommen. Chemisch ist es kein Ether, sondern ein Acetal.

5.1.2 Methodenentwicklung

Mit der beschriebenen kapillarelektrophoretischen Methode ASS1.M für saure Arzneistoffe ließen sich die Metabolite der Acetylsalicylsäure sowie mögliche Hydroxylierungsprodukte der Phase I Biotransformation, mit ausreichender Auflösung trennen.

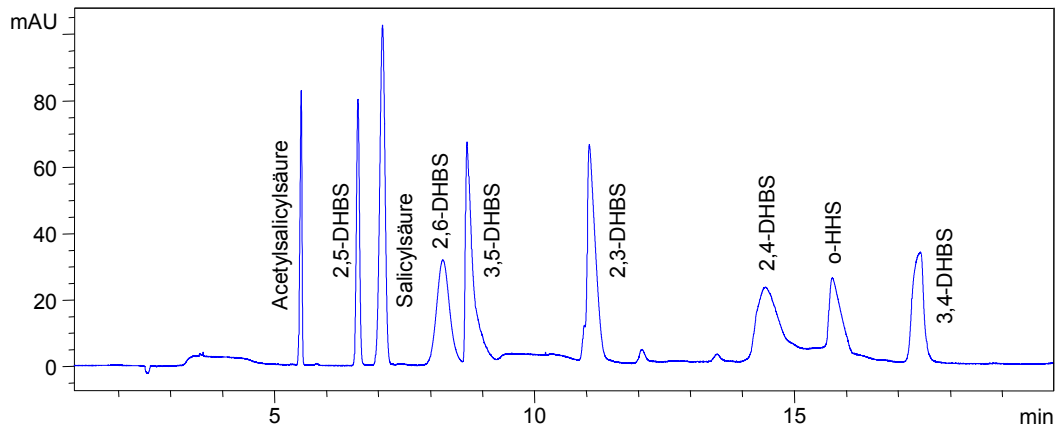


Bild 5.1: Auftrennung der Substanzen Acetylsalicylsäure, Salicylsäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure (= DHBS), 2,4-DHBS, 2,5-DHBS, 2,6-DHBS, 3,4-DHBS, 3,5-DHBS und o-Hydroxyhippur-säure (o-HHS) mit der Methode ASS1.M

Um die Analysenzeit weiter zu verkürzen, wurde die Polung der Elektroden umgekehrt. Dies ist möglich, da die Polaritäten der Elektroden bei der Kapillarelektrophorese wählbar sind, d.h. die Detektion kann kathoden- bzw. anodenseitig erfolgen. Es wurde die Methode ASSshort.M (S. 169) mit negativer Polarität am Inlet und der hydrodynamischen Injektion am Outlet getestet. Die Analyten wanderten vom Outlet zum Inlet und legten somit einen sehr viel kürzeren Weg zum Detektorfenster zurück (s. Bild 2.4, S. 8). Dies hatte zur Folge, dass die Auflösungen zwischen den Substanzen verringert wurden. Es war keine Auftrennung des Gemisches, wie im Bild 5.1, unter diesen Bedingungen möglich. Nur Acetylsalicylsäure und Salicylsäure in bidestilliertem Wasser ließen sich auf diese Weise mit einer wesentlich kürzeren Migrationszeit trennen (Bild 5.2).

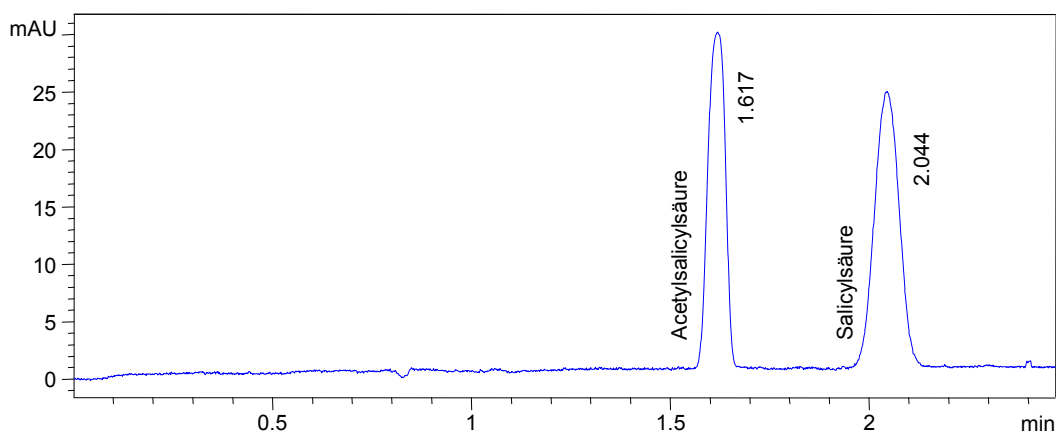


Bild 5.2: Trennung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure (0,1 mg/ml) in bidest. Wasser nach der Injektion vom Outlet; Methode: ASSshort.M

Die Analysen der negativen Speichelproben mit zudotierter Acetylsalicylsäure und Salicylsäure zeigten, dass die Peaks dieser Substanzen in der Speichelmatrix lagen. Die Methode ASSshort.M wies somit eine zu niedrige Trennleistung auf. Deshalb wurde für die weitere Methodenentwicklung eine Injektion vom Inlet angewendet. Die Injektion wurde derart abgewandelt, dass Wasser nach der Probeninjektion injiziert wurde. Das auftretende „Sample Stacking“ (S. 11) führte zu schärferen Peaks, wodurch eine genauere Integration ermöglicht wurde. Zusätzlich wurden ein Probenverlust aufgrund der thermischen Ausdehnung, während des Anlegens der Trennungsspannung, und eine Kontamination des Einlasspuffers verhindert. Die Parameter dieser Methode ASS2.M sind auf Seite 169 aufgeführt.

Die Injektionszeit der Methode ASS2.M (Bild 5.3) wurde weiter variiert. Im oberen Elektropherogramm wurde die Injektionszeit der wässrigen Probe von 10 auf 5 Sekunden und die des Wassers von 5 auf 2,5 Sekunden halbiert, im mittleren Elektropherogramm ist das Ergebnis der Methode ASS2.M abgebildet und im unteren Elektropherogramm wurde die Injektion auf 15 Sekunden verlängert sowie die Injektionsdauer von Wasser auf 10 Sekunden verdoppelt.

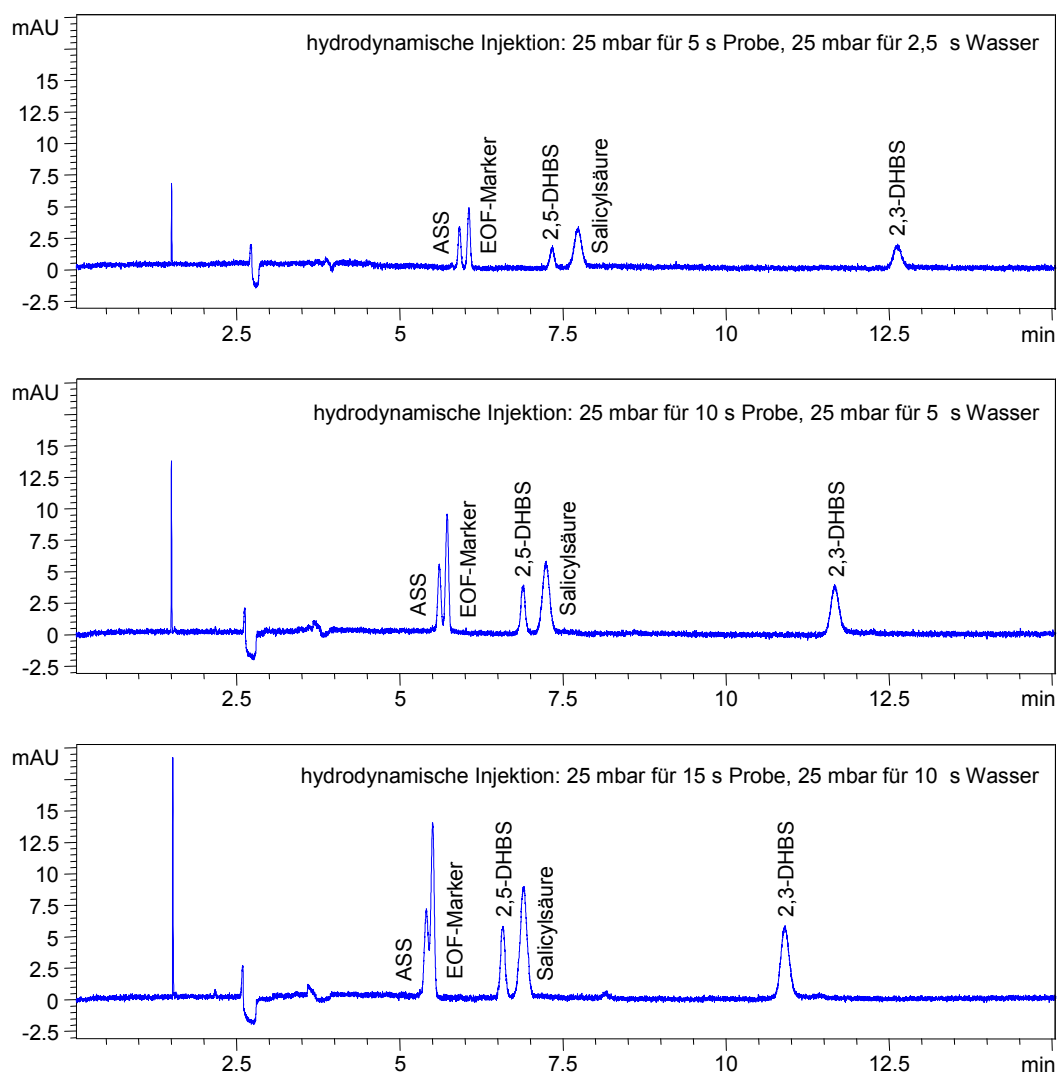


Bild 5.3: Darstellung der Probenanreicherung bei verschiedenen Injektionszeiten

Die Verlängerung der Injektionszeit (Bild 5.3) führte zu einer Zunahme der Peakhöhe, die Erniedrigung zu ihrer Abnahme. Die Probenanreicherung war somit bei der längeren Injektionszeit höher.

Die Anwendung der verlängerten Injektionszeit zur Analyse der Speichelproben zeigte eine deutliche Peakverbreiterung und erschwerte Integration, so dass die Methode ASS2.M mit einer hydrodynamischen Injektion von 25 mbar für 10 Sekunden mit anschließender Wasserinjektion (25 mbar für 5 Sekunden) für die weiteren Analysen des im Speichel nachweisbaren Metaboliten Salicylsäure verwendet wurde. Im Folgenden ist ein Elektropherogramm (Bild 5.4) einer Speichelprobe nach einer Proteinfällung mit anschließender direkter Vermessung abgebildet.

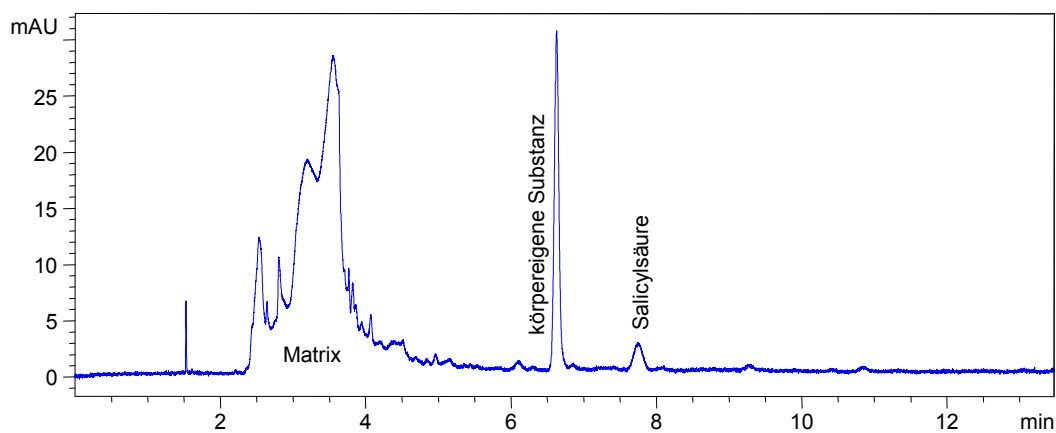


Bild 5.4: 240 min Speichelprobe nach der Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure; Methode ASS2.M

5.1.3 Probenvorbereitung

Proteinfällung und Filtration

Zur Probenvorbereitung wurde eine Proteinfällung mit den Speichelproben durchgeführt. Für die Proteinfällung war herauszufinden, welches Fällungsmittel (Methanol oder Acetonitril) zur effektivsten Fällung führt. Es war die Menge des Fällungsmittels zu bestimmen, die eine maximale Minimierung der Speichelmatrix erreicht, ohne einen zu hohen Verdünnungseffekt zu bewirken. Damit sollten die höchst möglichen Messwerte für den Analyten erreicht werden. Um dies herauszufinden, wurden zu 500 μ l Speichel unterschiedliche Volumenanteile Methanol bzw. Acetonitril zur Proteinfällung hinzugefügt. Nach dem Zusatz von unterschiedlichen Mengen Methanol (300-700 μ l) zu 500 μ l Speichel trat die Ausprägung der Matrix gleich bleibend auf. Die Verwendung von Acetonitril als Fällungsmittel erbrachte vergleichbare Ergebnisse wie mit Methanol. Um den eingesetzten Speichel nicht zu stark zu verdünnen, wurden für die weiteren Proteinfällungen 500 μ l Speichel mit 300 μ l Fällungs-

mittel verwendet. Die Probenvorbereitung mit Captiva® Filtern brachte keine effektivere Abtrennung der Speichelmatrix im Vergleich zur Proteinfällung (Bild 5.5).

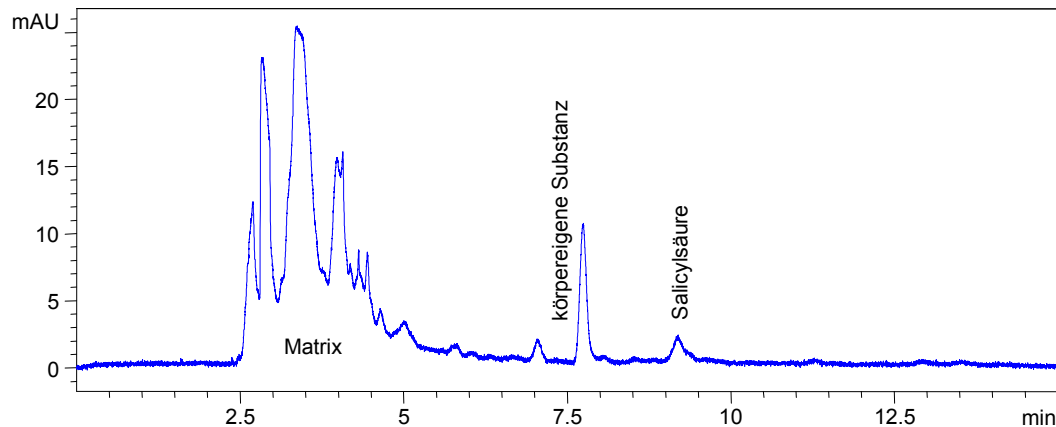


Bild 5.5: 300 min Speichelprobe nach der Filtration mit einem Captiva® Filter; Methode ASS2.M

5.1.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

Nachfolgend werden die Ergebnisse nach der Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure aufgeführt. Die Probanden haben nach definierten Zeitpunkten die Speichelproben mit Salivetten® entnommen. Nach einer Proteinfällung wurden die Speichelproben direkt vermessen. In den entnommenen Speichelproben der männlichen und weiblichen Probanden war der Metabolit Salicylsäure nachweisbar. Nach Überprüfung der Spezifität wurden die Salicylsäurekonzentrationen im Speichel nach der Analyse mit den Methoden ASS1.M und ASS2.M ermittelt. Zur Auswertung wurden die Flächen nicht durch die Migrationszeit dividiert, da mit zunehmender Migrationzeit keine Vergrößerung der Fläche festzustellen war. Im folgenden Bild 5.6 soll dies für die Methode ASS1.M anhand von zwei Konzentrationen verdeutlicht werden.

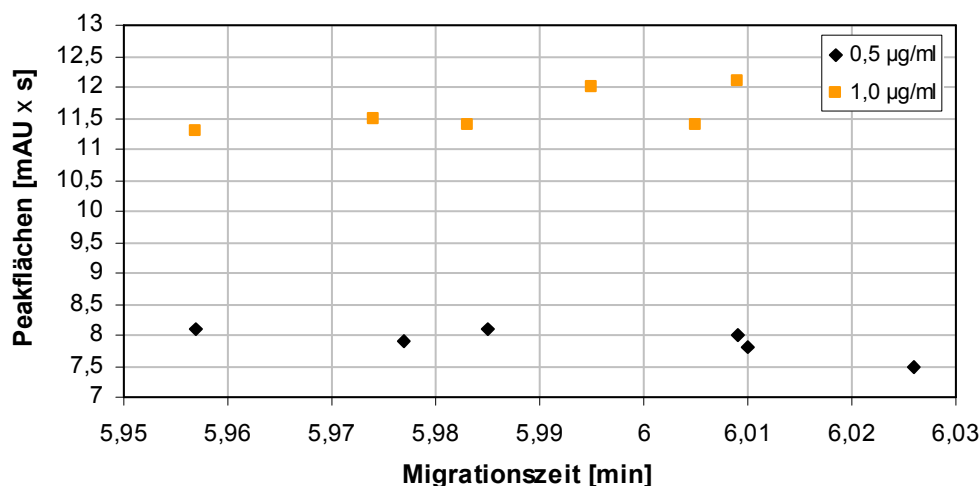


Bild 5.6: Darstellung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Migrationszeit

Es zeigte sich eine nach Gauß normal verteilte Streuung der Migrationszeiten um einen Mittelwert (0,5 µg/ml: Stabw = 0,03; Vk = 0,23; 1,0 µg/ml: Stabw = 0,02; Vk = 0,33).

In Tabelle 5.1 sind die mittleren Salicylsäurekonzentrationen (n = 3) der Probanden nach Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure aufgeführt, die mit der Methode ASS2.M analysiert wurden.

Zeit der Probenentnahme [min]	Proband A (weiblich) 1. Einnahme Konzentration [µg/ml]	Proband B (weiblich) Konzentration [µg/ml]	Proband C (weiblich) Konzentration [µg/ml]
15	n.n.	n.n.	n.n.
30	n.q.	n.q.	n.q.
45	3,14	-	-
60	4,87	-	4,78
90	5,73	3,23	5,38
120	4,19	3,83	5,22
150	-	-	4,56
180	-	3,62	-
210	-	2,90	-
240	3,94	2,87	2,75
300	3,90	2,44	2,44
360	-	2,37	-

Tabelle 5.1: Ermittelte Salicylsäurekonzentration im Speichel (n = 3); (- = keine Probe entnommen) (n.n. = nicht nachweisbar; n.q. = nicht quantifizierbar)

In dem Bild 5.7 ist der zeitliche Verlauf der Salicylsäurekonzentration im Speichel nach oraler Gabe von 1000 mg Acetylsalicylsäure veranschaulicht.

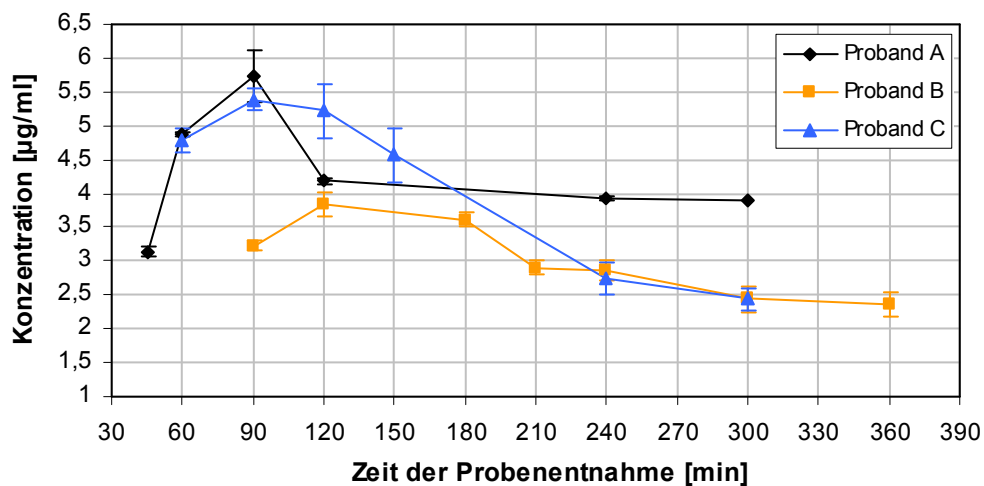


Bild 5.7: Zeitlicher Verlauf der Salicylsäurekonzentration im Speichel

In Tabelle 5.2 sind die mittleren Salicylsäurekonzentrationen ($n = 3$) der Probanden nach Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure aufgeführt, die mit der Methode ASS1.M analysiert wurden.

Zeit der Probenentnahme [min]	Proband D (männlich) Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Proband A (weiblich) 2. Einnahme Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
15	n.q.	n.q.
30	2,20	-
45	-	1,25
60	2,88	3,59
90	2,49	5,47
120	1,52	3,73
150	-	-
180	-	-
210	-	-
240	-	1,51

Tabelle 5.2: Ermittelte Salicylsäurekonzentration im Speichel ($n = 3$); (- = keine Probe entnommen; n.q. = nicht quantifizierbar)

Beim Vergleich der Konzentrationen der Probanden (Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2) ist zu erkennen, dass die Speichelproben der weiblichen Probanden ein Konzentrationsmaximum zwischen 90 und 120 Minuten erreichten. Der männliche Proband hingegen wies eine maximale Salicylsäurekonzentration im Speichel nach 60 Minuten auf.

Nach Einnahme von Reactine[®] duo (s. S. 106) konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Probandin ein Konzentrationsmaximum zu einem späteren Zeitpunkt aufwies als der männliche Proband. Dieser Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden kann durch den langsameren Magen-Darm-Transport bei Frauen als bei Männern erklärt werden⁴³.

Die niedrigeren Salicylsäurekonzentrationen im Speichel des Probanden B sind vermutlich auf eine niedrigere Resorption der Acetylsalicylsäure zurück zu führen. Der Proband B nahm im Gegensatz zu den Probanden A und C die Tablette nach einer Nahrungsaufnahme ein. Dies führte zu einem Anstieg des Magen pH-Wertes von 2 (nüchtern) auf 3 (nach einer Mahlzeit). Dieser Anstieg bedingte, dass ca. 17 % der Acetylsalicylsäure im Magen ionisiert vorlagen, wodurch die Resorption erschwert wurde.

Beim Vergleich der gefundenen Salicylsäurekonzentrationen im Speichel mit den Plasmakonzentrationen $40\text{-}50\ \mu\text{g/ml}^{34,35}$ wurde deutlich, dass die Salicylsäure im Speichel eine wesentlich geringere maximale Konzentration erreichte als im Plasma.

Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen

Zur Analyse eines Gemisches aus Acetylsalicylsäure, Salicylsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure und ortho-Hydroxyhippursäure wurde die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Parameter s. S. 177) verwendet. Das Gemisch wurde mit einer Konzentration von $0,2\ \mu\text{g/ml}$ vermessen. Salicylsäure war nach einer Retentionszeit von $10,7\ \text{min}$ zu identifizieren. In den entnommenen Speichelproben der Probanden A und B war nach einer Proteinfällung nur die Salicylsäure als Metabolit der Acetylsalicylsäure nachzuweisen. Für weitere Analysen wurde die Massenspektrometrie herangezogen.

Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese wurden bei einigen Arzneistoffen massenspektrometrische Analysen durchgeführt. In diesem Fall erfolgte die negative Ionisierung an der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) mittels Direkteinlass der Probe. Acetylsalicylsäure, Salicylsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure und o-Hydroxyhippursäure waren mit einer Konzentration von $0,2\ \mu\text{g/ml}$ nachweisbar. Durch diese Messungen wurde bestätigt, dass nach der Proteinfällung bzw. Filtration mit dem Captiva Filter Salicylsäure im Speichel zu identifizieren war. Mit den massenspektrometrischen Messungen konnten keine weiteren Metabolite im Speichel nachgewiesen werden. Die Messungen bestätigten die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese und der HPLC.

5.1.5 Ergebnisse der Urinuntersuchungen

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, in welchem Ausmaß Salicylsäure durch die Lipidmembran in die Speicheldrüsen permeierte, wurden zum Vergleich Elektropherogramme von Urinproben nach der Einnahme von $1000\ \text{mg}$ Acetylsalicylsäure aufgenommen. Ein männlicher Proband von 27 Jahren sammelte Urinproben nach $5\ \frac{3}{4}$, $8\ \frac{1}{2}$, 13 und 24 Stunden. Der Urin wurde durch Captiva[®] Filter filtriert und direkt mit der Methode ASS2.M vermessen. Beim Vergleich der Elektropherogramme (Bild 5.4: S. 28 und Bild 5.8: S. 33) wurde der Unterschied der Anreicherung sehr deutlich.

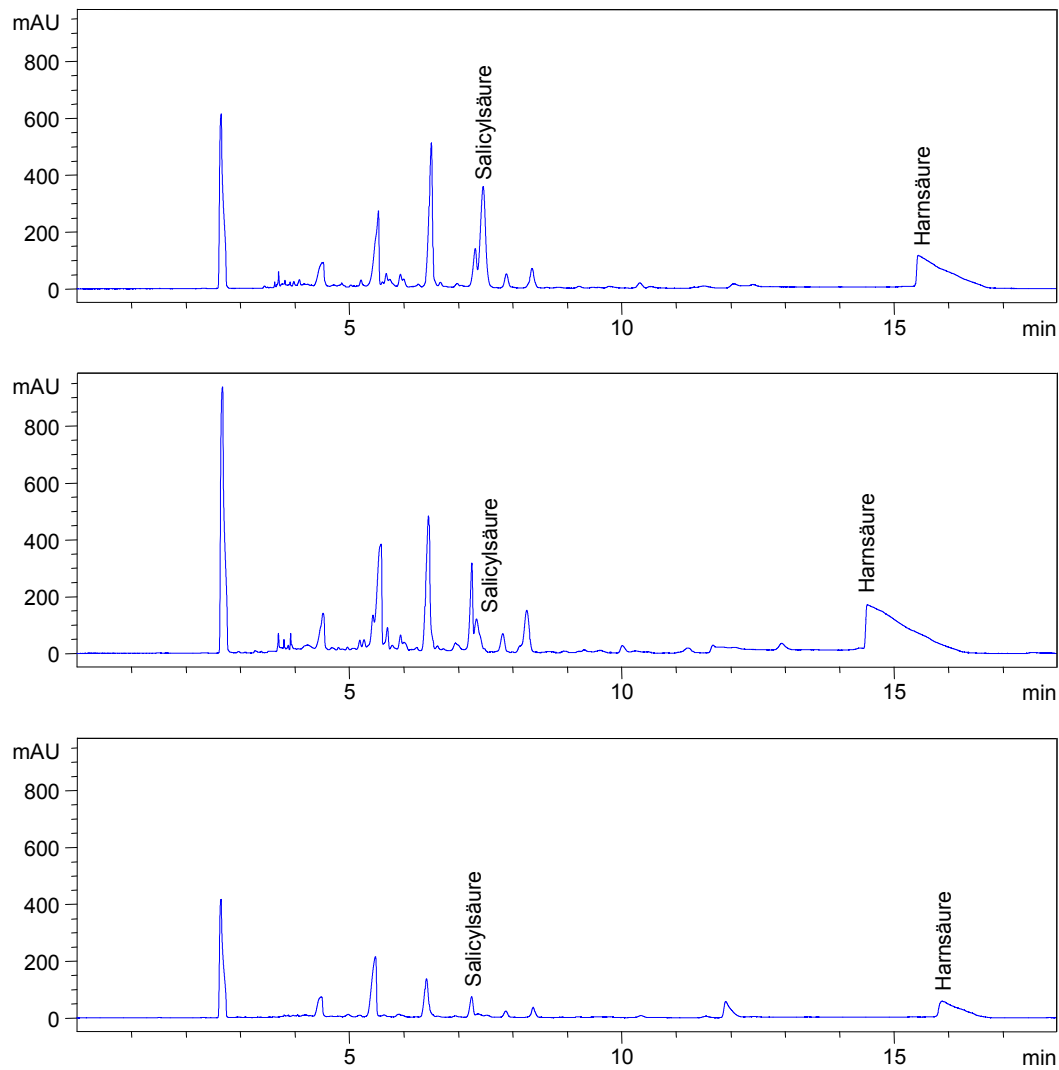


Bild 5.8: Urinproben nach 5 $\frac{3}{4}$, 8 $\frac{1}{2}$ und 13 Stunden nach oraler Gabe von 1000 mg Acetylsalicylsäure; Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Matrix zuzuordnen.

Nach 24 $\frac{1}{2}$ Stunden war keine Salicylsäure mehr im Urin nachweisbar. Die Salicylsäure reichte sich im Speichel zu einem deutlich geringeren Anteil an als im Urin. Es wurden im Urin bei vergleichbaren Zeiten der Probenentnahme die hundertfachen Salicylsäureflächen als im Speichel gemessen.

5.1.6 Analytische Daten

Für die Methoden ASS1.M und ASS2.M wurde eine Validierung durchgeführt, um den Nachweis der Zuverlässigkeit dieser analytischen Methoden zu erbringen. Im experimentellen Teil sind alle Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen für die Methode ASS1.M (S. 178) und ASS2.M (S. 184) aufgelistet.

Die Überprüfung der Spezifität zeigte für beide Methoden im Bereich der nachzuweisenden Substanz Salicylsäure keine Störungen durch Signale der Speichelmatrix.

Beleg hierfür ist das in Bild 5.9 aufgeführte Elektropherogramm einer undotierten negativen Speichelprobe im Vergleich zu einer mit Salicylsäure (2 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe.

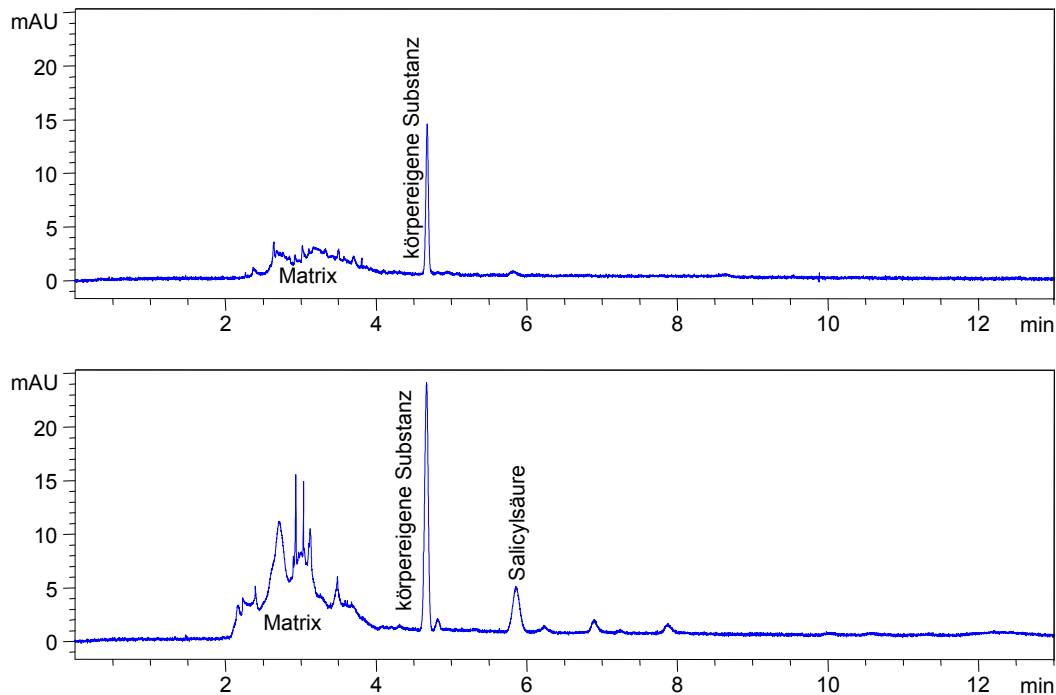


Bild 5.9: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Salicylsäure (2 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode: ASS2.M

Die Bestimmungen der Linearität zeigten eine gute Korrelation der Messgrößen [Korrelationskoeffizienten: 0,9969 (ASS1.M) und 0,9959 (ASS2.M)]. Die Reststandardabweichungen von 0,40 und 0,96 ergaben nur geringe Streuungen der Messwerte um die Regressionsgerade. Die Methode ASS2.M zeigte eine höher Empfindlichkeit (Steigung: $10,04 \pm 0,46$) als die Methode ASS1.M (Steigung: $4,84 \pm 0,19$). Die relative Verfahrensstandardabweichung war für die Methode ASS1.M (4,57 %) geringer als für die Methode ASS2.M (5,71 %).

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung eine Normalverteilung. Der F- und t-Test zeigten, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festzustellen waren.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmung nach der Proteinfällung zeigte Streuungen der Flächenwerte unter 4,6 %. Für die Migrationszeiten lagen die Abweichungen für die Methode ASS1.M zwischen 1 % und 3 % und für die Methode ASS2.M zwischen 2 % und 7 %. Die ermittelten relativen Standardabweichungen lagen unter 15 %, die als Akzeptanzkriterium in der Richtlinie der FDA für bioanalytische Analysenverfahren angegeben werden.

Die Schwankungen der Migrationszeiten sind auf den Einfluss der Speichelmatrix zurückzuführen. Durch Adsorptionen der Matrix an der Kapillarenwand werden die für den elektroosmotischen Fluss verantwortlichen Silanolgruppen blockiert. Dadurch wird der elektroosmotische Fluss langsamer und die Ionen wandern ebenfalls langsamer zum Detektor. Da die Messwerte der Präzisionen keine migrationszeitabhängigen Veränderungen der Flächen zeigten, wurde auf eine Division der Flächen durch die Migrationszeit verzichtet.

Der Einfluss der Speichelmatrix wurde ebenfalls bei der Bestimmung der Wiederfindung sichtbar. Es ist anzunehmen, dass die Wechselwirkungen mit der Speichelmatrix Ursache der Wiederfindung von über 100 % war. Die Schwankungen der Wiederfindungen waren für beide Methoden gering:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,5	92,61	3,68	3,98
1,0	109,20	2,30	2,10
2,0	105,19	2,05	1,95

Tabelle 5.3: Wiederfindung für Salicylsäure (Methode ASS1.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,5	107,49	6,11	5,68
1,0	94,45	3,24	3,43
2,0	94,04	2,85	3,03

Tabelle 5.4: Wiederfindung für Salicylsäure (Methode ASS2.M)

Die Bestimmung der Richtigkeit zeigte, dass die von der FDA-Richtlinie vorgegebene maximal erlaubte Abweichung von 15 % für beide Methoden unterschritten wurde:

Konz. [µg/ml]	Mittelwert der Richtigkeit [%] ASS1.M	Mittelwert der Richtigkeit [%] ASS2.M
0,5	7,39	-7,49
1,0	-9,2	5,55
2,0	-5,19	5,96

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Richtigkeit für die Methode ASS1.M und ASS2.M

Die Methoden ASS1.M und ASS2.M zeigten geringe Unterschiede bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze:

ASS1.M

Nachweisgrenze:	0,34 µg/ml
Bestimmungsgrenze:	0,92 µg/ml

ASS2.M:

Nachweisgrenze:	0,39 µg/ml
Bestimmungsgrenze:	1,03 µg/ml

Die Anwendung des „Sample Stackings“ bei der Methode ASS2.M führte zwar zu einer verbesserten Peakintegration, aber die Fokussierung des Analyten war nicht so ausgeprägt, dass eine Erniedrigung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erreicht wurde. Es ist anzunehmen, dass der EOF die Analytanreicherung störte. Bei der Injektion der Probe bildet sich eine Zone, die eine geringe Leitfähigkeit besitzt. Durch einen hohen EOF wird diese Zone schnell ausgebildet und verringert so die Möglichkeit zum „Sample Stacking“. Bei diesen Methoden wäre eine Steigerung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze durch die Vergrößerung der Schichtdicke erreichbar.

5.1.7 Diskussion

Nach der Einnahme von 1000 mg Acetylsalicylsäure konnte nur der Metabolit Salicylsäure im Speichel nachgewiesen werden. Die Salicylsäure (pK_a 2,98) liegt im stark sauren Milieu des Magens als Säure vor und ist damit lipophil. Im Darm wird die Salicylsäure bei einem pH-Wert von 6 bis 8 zu einem hydrophilen Molekül deprotoniert. Da der pH-Wert des Speichels zwischen 5,5 und 7,0 und im Gewebe zwischen 6,8 und 7,0 liegt, ist folglich die Salicylsäure im Gewebe ein hydrophiles Molekül und permeiert nur geringfügig durch die Lipidmembran in die Speicheldrüsen. Ein Beleg dafür ist, dass die Salicylsäure im Speichel (maximal gefundene Konzentration: 5,7 µg/ml) nicht die Konzentrationen erreichte, die im Plasma nachzuweisen waren (40-50 µg/ml^{34, 35}). Die Plasmaproteinbindung der Salicylsäure von über 80 % trägt zu der niedrigen Konzentration im Speichel bei.

Die weiteren Metabolite der Acetylsalicylsäure (Gentisinsäure, ortho-Hydroxyhippursäure und die Konjugate) sind polarer als die Salicylsäure, weil die Substanzen eine höhere Anzahl an Hydroxylgruppen oder zusätzlich eine Amid-Struktur aufweisen.

Dies führte dazu, dass diese zu einem sehr geringen Anteil durch die Lipidmembran permeierten, der deutlich unter der Nachweisgrenze lag. Zusätzlich weist die Gentisinsäure im Plasma eine sehr geringe Konzentration auf. Nach oraler Gabe von 325 mg Acetylsalicylsäure konnten O`Kruk et al.⁴⁴ im Plasma eine maximale Gentisinsäurekonzentration von 0,4 µg/ml und 0,5 µg/ml nach 0,5 und 4 Stunden nachweisen. Zu den anderen Sammelzeiten lagen die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze von 0,3 µg/ml der Methode. Einige weitere Publikationen berichteten ebenfalls, dass bei den Untersuchungen von Acetylsalicylsäure und dessen Metaboliten die Gentisinsäurekonzentrationen im Plasma unter der Nachweisgrenze lagen^{42, 45}, so dass mit Sicherheit anzunehmen ist, dass die Konzentrationen im Speichel deutlich unter der Nachweisgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode lagen.

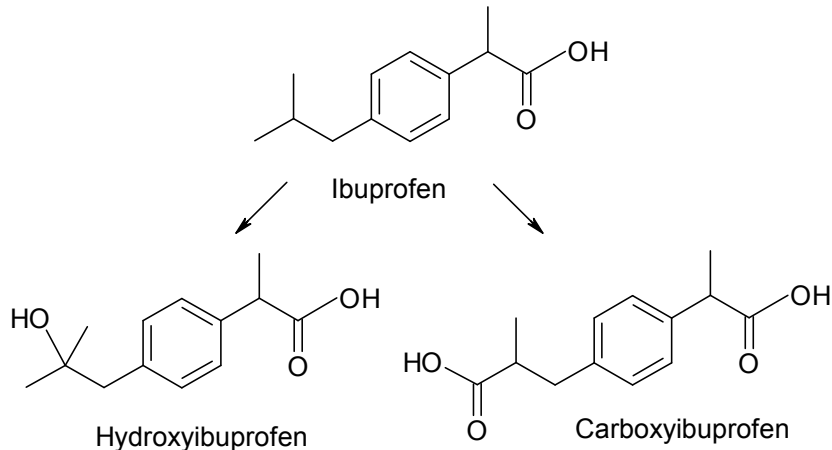
Ziele der Methodenentwicklung für die Identifizierung und Quantifizierung des Metaboliten Salicylsäure im Speichel waren geringer Zeitaufwand und niedrige Kosten, so dass eine direkte Vermessung der Speichelproben nach der Proteinfällung durchgeführt werden konnte. Die entwickelten Methoden zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die von Goto et al.⁴² beschriebene kapillarelektrophoretische Methode für Salicylsäureuntersuchungen im Urin. Die Methoden ASS1.M und ASS2.M wiesen bei der Reproduzierbarkeit, Wiederfindung und Korrelation der Messwerte bessere Ergebnisse auf als die von Liu et al.⁴⁶ beschriebene HPLC-Methode (Wiederfindung 85 %; Interday Präzision: V_k 7,2 %; $r = 0,995$) zur Analyse der Acetylsalicylsäure-Metaboliten im Plasma oder Urin. Ebenfalls ergaben die Methoden ASS1.M und ASS2.M bessere Resultate für die Reproduzierbarkeit und Korrelation der Messwerte als die von Krivosikova et al.⁴⁷ (V_k bis 5,88 %; $r = 0,988$) entwickelte HPLC-Methode zur Bestimmung von Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und ortho-Hydroxyhippursäure im Plasma und Urin.

5.2 Ibuprofen

5.2.1 Einleitung

Ibuprofen* wird zur Behandlung akuter und chronischer entzündlicher Schmerzen in Einmaldosen von 200 bis 800 mg eingesetzt. Je nach Ibuprofen-Dosierung (200 mg bzw. 400 mg) wurden maximale Plasmakonzentrationen nach 30 bis 45 Minuten gefunden, die 15 µg/ml bzw. 25 µg/ml betragen. Die therapeutisch wirksame Plasmakonzentration von 10 µg/ml wurde nach 10 bis 12 Minuten nachgewiesen. Die Eliminationshalbwertszeit von Ibuprofen beträgt etwa zwei Stunden. Ibuprofen zeigt eine hohe Proteinbindung (99 %).

Bei Dosen über 600 mg stieg der Anteil des ungebundenen Ibuprofens an⁴⁸. Die beiden Hauptmetabolite des Ibuprofens sind Carboxyibuprofen und Hydroxyibuprofen (Schema 5.2). Mills et al.⁴⁹ führten Metabolismusuntersuchungen im Plasma und Urin an verschiedenen Spezies durch. Es wurde nach der Einnahme von dreimal täglich 200 mg Ibuprofen nach einem Tag eine Plasmakonzentration von 0,2 µg/ml Hydroxyibuprofen und 0,4 µg/ml Carboxyibuprofen nachgewiesen. Die Metabolite sind pharmakodynamisch inaktiv. Wie Ibuprofen kumulieren die Metabolite nicht nach Mehrfachgabe. Carboxyibuprofen (zu 35 %) und Hydroxyibuprofen (zu 26 %) werden rasch als Glucuronide über die Nieren ausgeschieden.



Schema 5.2: Biotransformation von Ibuprofen

Die Publikationen zu dem Arzneistoff Ibuprofen beschäftigten sich mit kapillarelektrophoretischen Untersuchungen im Serum und Urin. Shihabie und Hinsdale⁵⁰ entwickelten eine kapillarelektrophoretische Methode zur Kontrolle von Ibuprofenkonzentrationen im Serum und

* Nach IUPAC: 2-(4-Isobutyl-phenyl)-propionsäure

Bjoernsdottir et al.⁵¹ beschäftigten sich mit der Trennung der Enantiomere des Ibuprofens und dessen Metaboliten im Urin.

5.2.2 Methodenentwicklung

Kapillarelektrophorese

Als Grundlage für die Entwicklung einer angepassten Methode zum Nachweis und zur Trennung von Ibuprofen und dessen Metaboliten wurde die allgemeine Methode ASS1.M für saure Arzneistoffe verwendet. Es zeigte sich, dass der Peak des Ibuprofens bei einer direkten Vermessung mit der Methode ASS1.M von der Speichelmatrix überlagert wurde. Die Veränderungen von Spannung, Temperatur, Injektionsart und Kapillarlänge erbrachten nicht den erwünschten Erfolg einer vollständigen Trennung von Speichelmatrix und Ibuprofen.

Deshalb erfolgten die Auswertungen bei dem zweiten Absorptionsmaximum des Ibuprofens bei einer Wellenlänge von 235 nm, da bei dieser Wellenlänge die Speichelmatrix nicht detektiert wird. Für die weiteren Untersuchungen wurde anstatt einer 30/37 cm Kapillare eine 40/47 cm Kapillare eingesetzt, da diese stabilere Messbedingungen bei einer Stromstärke unter 50 μA erbrachte. Neben der angepassten Spannung an die Kapillarlänge wurde der Druck zur Injektion erhöht und eine Wasserzone injiziert, um die Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu erniedrigen. Die Methode Ibu1.M. (S. 170) erreichte eine Bestimmungsgrenze von 1 $\mu\text{g/ml}$.

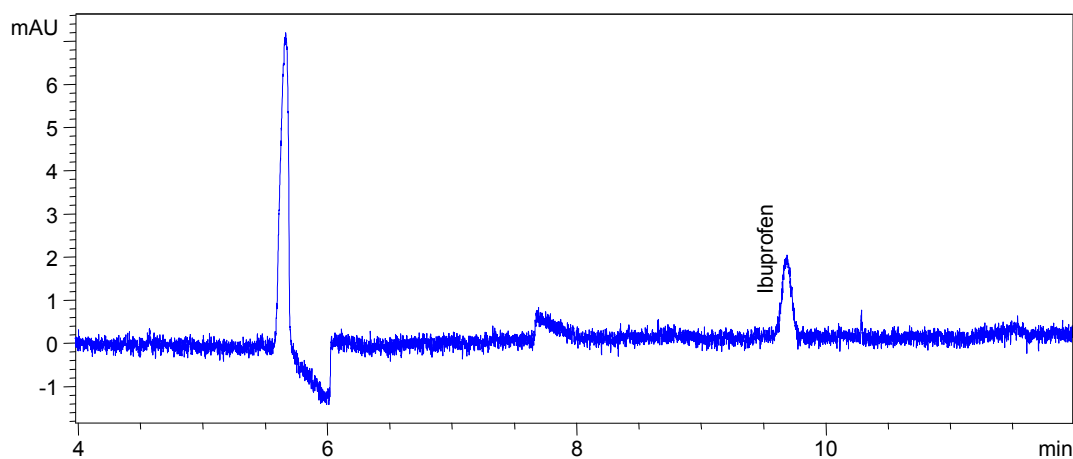


Bild 5.10: Ibuprofen 2 $\mu\text{g/ml}$ in bidest. Wasser mit der Methode Ibu1.M vermessen

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Zusätzlich wurde eine HPLC-Methode mit einer RP-18 Säule (Parameter: S. 177) zum Nachweis von Ibuprofen im Speichel entwickelt. Zunächst wurde als mobile Phase eine Mischung aus Methanol und Wasser pH 2,5 (eingestellt mit 5 % Perchlorsäure) im Verhältnis 85:15 verwendet. Ibuprofen wurde aufgrund der zu hohen Elutionskraft des Fließmittels nicht detektiert. Eine Mischung aus Acetonitril und 75 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 im Verhältnis 50:50 erwies sich als geeignetes Fließmittel. Ibuprofen war in einer Konzentration von 0,1 µg/ml mit dieser Methode nachweisbar. Der Peak erschien nach 7,6 Minuten im Chromatogramm.

5.2.3 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurde eine Proteinfällung mit Methanol oder Acetonitril und eine anschließende Filtration mit dem Multoclear[®] Filter 0,45 µm (Polyamid) durchgeführt. Da es mit der kapillarelektrophoretischen Methode nicht möglich war die Speichelmatrix und Ibuprofen zu trennen, wurde eine Festphasenextraktion zur besseren Abtrennung der Matrix entwickelt. Zur Festphasenextraktion wurden „Bond Elut Certify[®] II“ Kartuschen (C-8/SAX) verwendet. Die Retention beruht auf unpolaren Kräften und einem Anionenaustausch, so dass zur Konditionierung und zum Verdünnen der Speichelprobe eine Natriumacetatlösung mit einem pH-Wert von 9 verwendet wurde. Als Elutionsmittel wurde eine Mischung aus Phosphorsäure/Acetonitril (1:1) eingesetzt, um die Analyten zu neutralisieren und die Wechselwirkungen zwischen Sorbent und Analyten aufzuheben (Extraktionsvorschrift für saure Substanzen S. 161). Mit der Festphasenextraktion konnte eine effektive Abtrennung der Speichelmatrix erreicht werden. Die Wiederfindungen lagen im Mittel bei 78 %.

5.2.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Die Probandin A nahm an zwei aufeinander folgenden Tagen dreimal 400 mg und am dritten Tag einmal 400 mg Ibuprofen ein. Die Probandin B bekam lediglich eine einmalig Einnahme von 400 mg Ibuprofen. Die Proben wurden nach 1, 1 ½, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden der letzten Einnahme des Ibuprofens mit Salivetten[®] entnommen. Ibuprofen und dessen Metaboliten waren im Speichel der Probanden mit der Kapillarelektrophorese und der HPLC nicht nachweisbar.

5.2.5 Diskussion

Ibuprofen und dessen Metaboliten waren im Speichel nicht nachweisbar, da Ibuprofen zwar einen höheren pK_a -Wert (4,4) als Salicylsäure (3,0) besitzt, dieser jedoch noch deutlich unter dem pH-Wert des Blutes (7,4) liegt. Bei einem pK_a -Wert von 4,4 ist somit der Anteil der nicht ionisierten Form mit 0,1 % im Blut immer noch so gering, dass die Permeation in den Speichel erschwert war. Zusätzlich waren vermutlich die niedrigen Plasmakonzentrationen des Ibuprofens, dessen Phase I Metaboliten und die hohe Plasmaproteinbindung des Ibuprofens (99 %) dafür verantwortlich, dass diese im Speichel in Konzentrationen unter der Nachweisgrenze der Methoden vorlagen. Des Weiteren werden die Metabolite schnell und vollständig als Glucuronide über die Nieren ausgeschieden. Da die Glucuronide polare Verbindungen sind, permeierten diese erschwert durch die Lipidmembran in den Speichel. Mit der entwickelten kapillarelektrophoretischen Methode für Ibuprofen wurde eine Bestimmungsgrenze von 1 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Diese Bestimmungsgrenze lag damit deutlich unter der Grenze (Bestimmungsgrenze: 8 $\mu\text{g/ml}$) der von Shihabie und Hinsdale⁵⁰ entwickelten kapillarelektrophoretischen Methode zur Kontrolle von Ibuprofenkonzentrationen im Serum.

6. Untersuchungen eines schwach sauren Arzneistoffes

Für die Untersuchungen eines schwach sauren Arzneistoffes wurde Paracetamol mit einem pK_a -Wert von 9,5 ausgewählt.

Zunächst erfolgte die Probenvorbereitung durch eine Proteinfällung, um die auftretenden Verluste bei einer Festphasenextraktion zu minimieren. Die Proteinfällung wurde für die Untersuchungen von Paracetamol und dessen Metaboliten im Speichel wie bei den Arzneistoffen Salicylsäure und Ibuprofen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Festphasenextraktion mit den „Strata X-C[®]“ Kartuschen entwickelt, um die Speichelmatrix effektiver zu minimieren.

Zur Identifizierung und Quantifizierung von schwach sauren Substanzen wurde eine kapillarelektrophoretische Methode anhand des Arzneistoffes Paracetamol mit einem 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 erstellt.

Die Methode Ibu1.M des Ibuprofens wurde für diese Methodenentwicklung bezüglich der Spannung verändert (auf 15 kV erhöht), um kürzere Analysenzeiten zu erreichen. Die Präkonditionierung wurde verlängert, um insbesondere bei den Urinuntersuchungen die Adsorptionen der Matrix an der Kapillarinnenwand zu minimieren. Folgende Methode Parac1.M wurde für schwach saure Substanzen entwickelt:

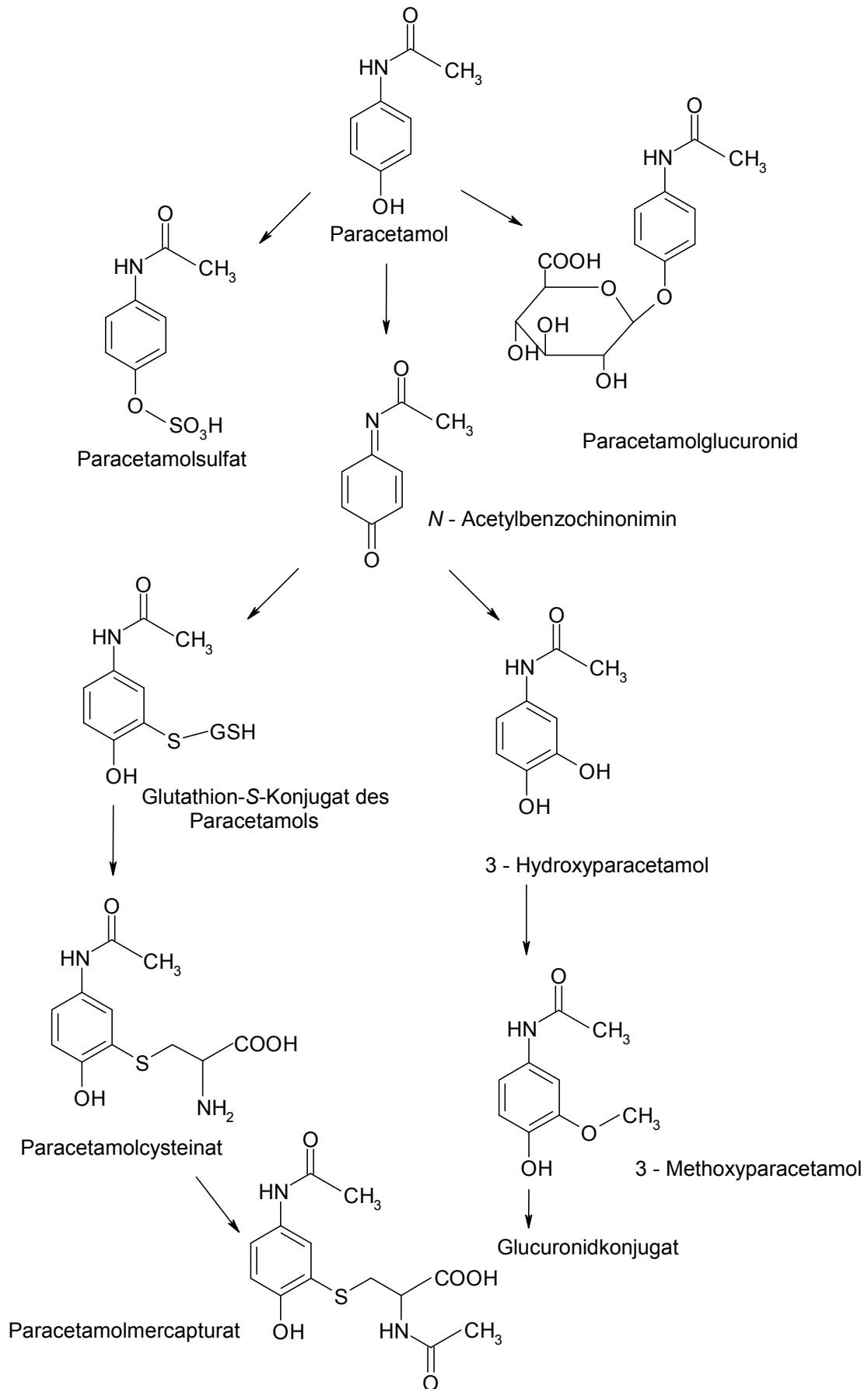
Methode:	Parac1.M
Kassettentemperatur	20,0 °C
Puffer:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Replenishment:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Präkonditionierung:	1. 1,0 min I: 0,1 N NaOH 2. 2,0 min I: Wasser 3. 2,0 min I: 50 mM Boratpuffer pH 9,3
Elektrik:	Polarität Positiv
Hydrodynamische Injektion:	1. 34,0 mbar für 5,0 s Wasser 2. 34,0 mbar für 10,0 s Probe
Laufzeit:	15,0 min
Spannung:	15,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

6.1 Paracetamol

6.1.1 Einleitung

Als weiteres therapeutisch eingesetztes Analgetikum wurde die schwach saure Substanz Paracetamol* untersucht. Das Anilin-Derivat wirkt analgetisch und antipyretisch. Nach oraler Gabe zeigt Paracetamol eine Bioverfügbarkeit von bis zu 90 %. Die maximale Plasmakonzentration wird 30 bis 60 Minuten nach oraler Einnahme erreicht. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei 2 bis 3 Stunden⁵². Paracetamol wird im Wesentlichen durch Konjugation mit Schwefelsäure und Glucuronsäure inaktiviert. Ein geringer Anteil wird zum *N*-Acetylbenzochinonimin metabolisiert, welches zum 3-Hydroxyparacetamol oxidiert bzw. mit Glutathion (GSH = γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) konjugiert wird. Das Glutathion-S-Konjugat wird als Paracetamolcysteinat bzw. Mercapturat ausgeschieden (Schema 6.1, S. 45). Der Metabolit 3-Methoxyparacetamol kommt in Spuren im Urin vor⁵³. Therapeutische Dosen von 1000 mg Paracetamol führten bei gesunden Erwachsenen zu Höchstkonzentrationen im Serum von 16 $\mu\text{g/ml}$ bis 38 $\mu\text{g/ml}$ ⁵⁴. Die Plasmaproteinbindung kann bis zu 10 % betragen.

* Nach IUPAC: *N*-(4-Hydroxyphenyl)-acetamid



Schema 6.1: Biotransformation von Paracetamol

6.1.2 Methodenentwicklung

Die Zeit der hydrodynamischen Injektion der Methode Parac1.M wurde für Wasser von 5 auf 8 Sekunden erhöht, um den Effekt des „Sample Stackings“ zu verbessern (Methode Parac2.M: s. S. 171). Die Analysen wiesen eine Überlagerung von Paracetamol und Speichelmatrix auf. Zur Verbesserung der Trennung wurde die Spannung variiert, wobei ein Herabsetzen zu einer Verschlechterung des Ergebnisses führte. Im Bild 6.1 wird der Einfluss einer Spannungsvariation dargestellt.

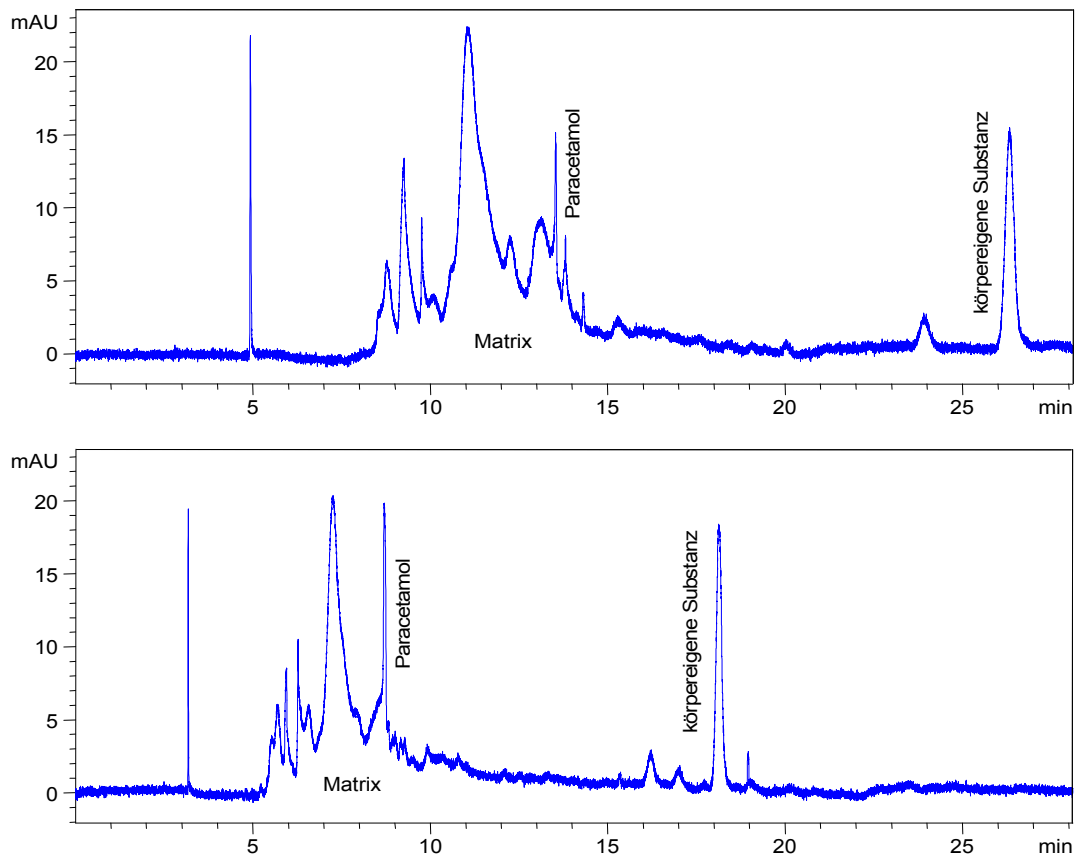


Bild 6.1: 30 Minuten Speichelprobe vermessen mit 10 kV (oben) und 15 kV (unten)

Zur Minimierung der Matrix kann die elektrokinetische Injektion verwendet werden, da bei dieser Injektionsart die Diskriminierung der Probenkomponenten entsprechend der Mobilität erfolgt (Bild 6.2, S. 47).

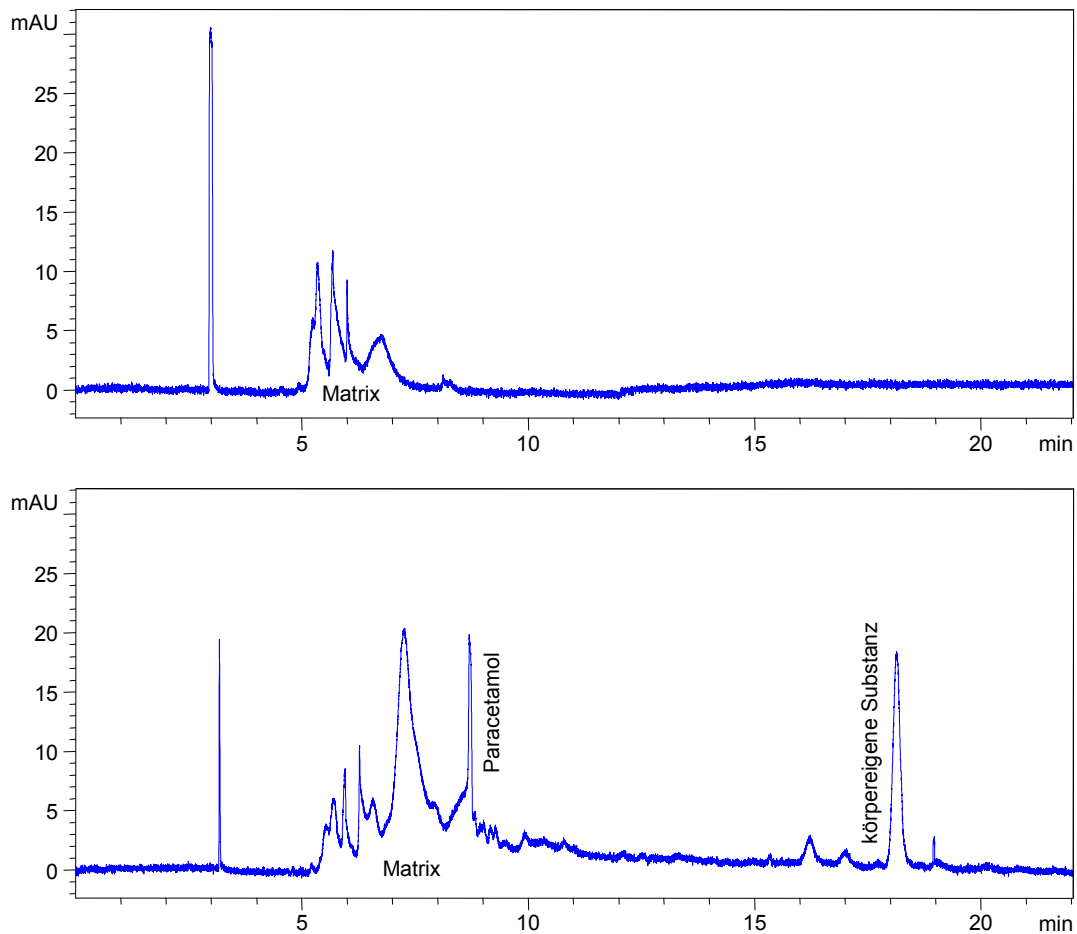


Bild 6.2: Vergleich der Elektropherogramme nach einer elektrokinetischen (oben) und hydrodynamischen (unten) Injektion

Die elektrokinetische Injektion führte zur Minimierung der Matrix und des Paracetamols. Durch die erhöhte Leitfähigkeit der Probe waren andere Ionen am Ladungstransport beteiligt, so dass bei der gewählten Injektionszeit keine Paracetamolionen injiziert wurden.

Als weitere Modifikation wurde die optimale Pufferkapazität ($\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$) für Paracetamol ausgewählt (pK_a -Wert 9,5). Durch die Veränderung des pH-Wertes des 50 mM Natriumtetraboratpuffers wurde ebenfalls kein verbesserter Trenneffekt erreicht. Da keine Veränderungen der Methode zu einem wesentlich verbesserten Ergebnis führten, erfolgten die Messungen und Auswertungen beim zweiten Absorptionsmaximum des Paracetamols bei der Wellenlänge 245 nm. Bei dieser Wellenlänge wurde die Matrix nicht detektiert. Des Weiteren wurde eine Festphasenextraktion entwickelt, mit der die störende Matrix abtrennbar war.

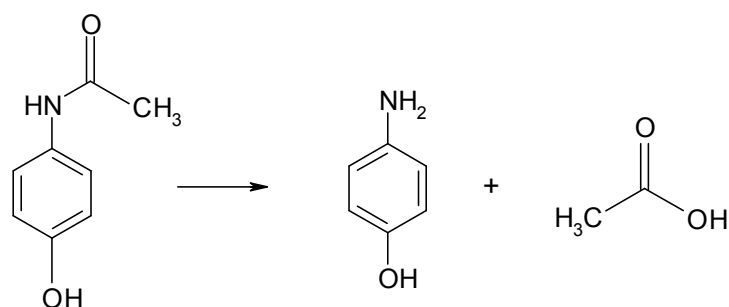
6.1.3 Probenvorbereitung

Proteinfällung

Für die Untersuchungen von Paracetamol und dessen Metaboliten im Speichel wurde die direkte Bestimmung nach einer Proteinfällung, wie bei den Analysen von Salicylsäure bzw. Ibuprofen, eingesetzt. Der Peak des Paracetamols wurde nach einer Proteinfällung mit Acetonitril von der Speichelmatrix überlagert. Um die Effektivität der Proteinfällung zu steigern, wurden 25 % Trichloressigsäure dem Speichel in gleichen Anteilen zugesetzt, da Kamali et al.⁵⁵ diese Säure erfolgreich vor den Speicheluntersuchungen von Paracetamol mit der HPLC einsetzten. Es trat eine deutliche Trübung auf, die stärker war als bei der Zugabe von Methanol bzw. Acetonitril. Die Analysen zeigten aber, dass die Matrix nicht ausreichend minimiert war um mit der kapillarelektrophoretischen Methode eine Trennung der Matrix von den gewünschten Analyten zu erreichen.

Festphasenextraktion

Zur Festphasenextraktion der Speichelproben wurde eine allgemeine Extraktion über „Strata X-C[®]“ Kartuschen für schwach saure Arzneistoffe entwickelt. Die Probe wurde nicht angesäuert, da Paracetamol als *N*-Arylamid hydrolyseempfindlich ist. Bei einer sauren Hydrolyse entstehen *p*-Aminophenol und Essigsäure (Schema 6.2).



Schema 6.2: Hydrolyse des *N*-Arylamids des Paracetamols im wässrig sauren Milieu

Auf den Zusatz von Ammoniak im Elutionsmittel wurde verzichtet, da die Retention des Paracetamols auf unpolaren Kräften beruhte und somit nur Methanol zur Elution notwendig war. Um das Eluat nach dem Einengen aufzunehmen, wurde eine 0,1 mM, 1 mM bzw. 100 mM NaOH verwendet. Die 0,1 mM und 1 mM NaOH wiesen für den Analyten Paracetamol vergleichbare Ergebnisse auf. Die Aufnahme in 100 mM NaOH führte zu längeren Migrationszeiten des Analyten. Für die Analysen wurde das eingeeengte Eluat in 0,1 mM NaOH aufgenommen. Die Vorschrift für die Extraktion von Paracetamol über „Strata X-C[®]“

Kartuschen ist auf Seite 161 aufgeführt. Mit dieser Extraktion war die Speichelmatrix minimiert und Paracetamol mit einer guten Wiederfindung von über 90 % nachweisbar.

6.1.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Es war zu erwarten, dass nur Paracetamol im Speichel zu identifizieren ist, weil die Metabolite instabile polare Produkte sind, welche die Lipidmembran nur erschwert überwinden. Diese Annahme konnte durch die Speicheluntersuchungen bestätigt werden.

Ergebnisse der Proteinfällung

Nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol wurden die Speichelproben einer Probandin nach 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten mit Salivetten[®] entnommen. Diese Proben wurden nach einer Proteinfällung (300 µl Speichel mit 200 µl Acetonitril) direkt mit der Methode Parac2.M kapillarelektrophoretisch vermessen. Die Auswertungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 245 nm auf zwei verschiedene Arten. Zur Berechnung der Konzentrationen wurde die unkorrigierte Fläche bzw. die durch die Migrationszeit dividierte Fläche (s. S. 10) in die entsprechende Regressionsgleichung (s. S. 190) übernommen. Die Auswertungen wurden verglichen.

Die mittleren Paracetamolkonzentrationen (n = 3) sind nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol in der Tabelle 6.1 aufgeführt.

Zeit der Probenentnahme [min]	15	30	45	60	90	120
Konz. [µg/ml] Paracetamol unkorrig. Fl.	8,90	13,02	12,67	10,58	10,85	5,59
Konz. [µg/ml] Paracetamol korrig. Fl.	8,80	12,57	12,01	9,79	10,72	4,24

Tabelle 6.1: Ermittelte Paracetamolkonzentrationen im Speichel (n = 3)

Die berechneten mittleren Paracetamolkonzentrationen der unkorrigierten Flächen und der korrigierten Flächen sind im Bild 6.3 dargestellt.

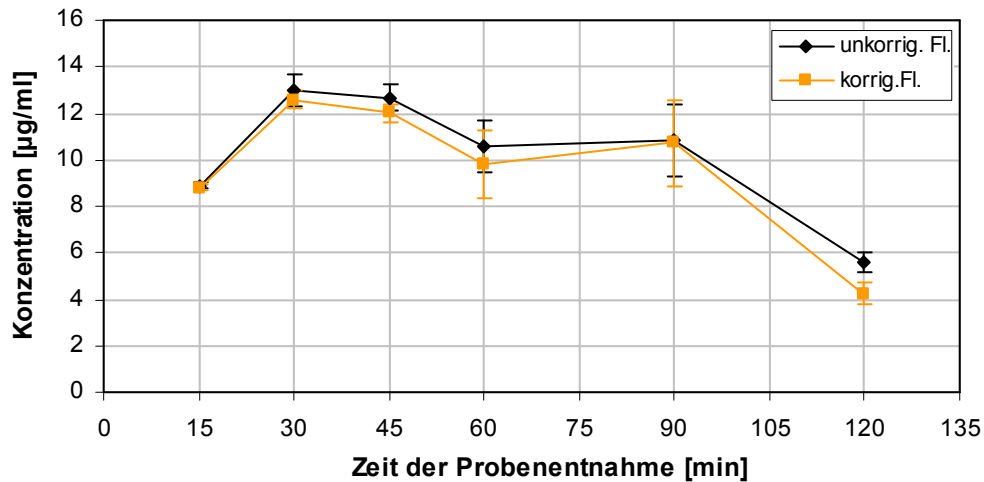


Bild 6.3: Zeitlicher Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Speichel

Es waren geringe Abweichungen der Konzentrationen nach der Berechnung mit den unkorrigierten und korrigierten Flächen festzustellen. Es trat also nur ein geringer Einfluss auf die Flächenwerte durch zunehmende Migrationszeiten auf. Dies war ebenfalls bei der Bestimmung der Präzision (S. 195) festzustellen. Für die weiteren Auswertungen der Paracetamolkonzentrationen wurden die unkorrigierten Flächen verwendet.

Ergebnisse der Festphasenextraktion

Bei einer zweiten Speicheluntersuchung derselben Probandin wurden Speichelproben 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Minuten nach oraler Gabe von 1000 mg Paracetamol mit Salivetten[®] entnommen. Zwischen dieser und der vorherigen Einnahme des Arzneistoffes lag eine ausreichende Zeit, so dass davon auszugehen ist, dass der Wirkstoff vollständig eliminiert war. Die entnommenen Proben wurden nach der Extraktionsvorschrift für schwach saure Substanzen über die „Strata X-C[®]“ Kartuschen (S. 161) aufgearbeitet.

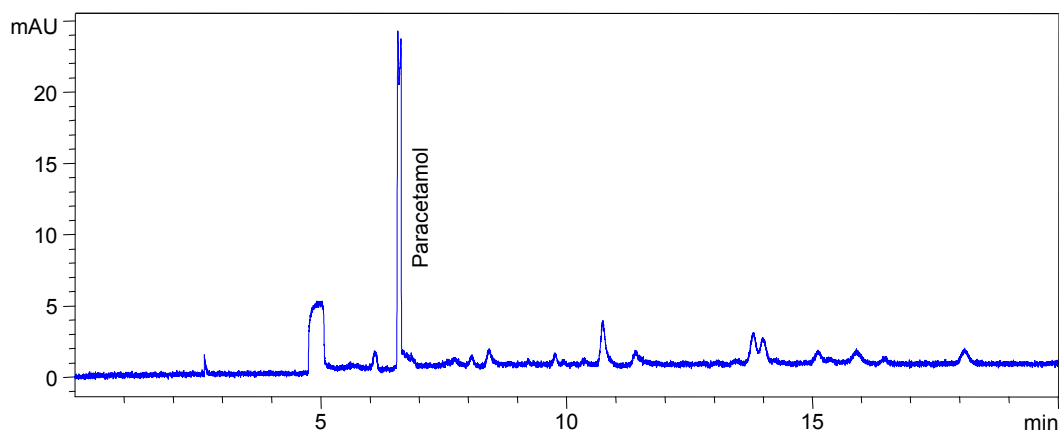


Bild 6.4: 30 Minuten Speichelprobe nach oraler Gabe von 1000 mg Paracetamol; Aufgearbeitet mit der Extraktion über die „Strata X-C[®]“ Kartuschen; Methode: Parac2.M; Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Matrix zuzuordnen.

Die Konzentrationen wurden zum Vergleich bei der Wellenlänge 200 nm und 245 nm berechnet. In der Tabelle 6.2 sind die mittleren Paracetamolkonzentrationen ($n = 3$) nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol erfasst.

Zeit der Probenentnahme [min]	15	30	45	60	90	120	180	240	360
Konz. [$\mu\text{g/ml}$] Paracetamol 200 nm	10,31	10,93	9,95	6,06	3,96	3,37	2,11	1,74	1,43
Konz. [$\mu\text{g/ml}$] Paracetamol 245 nm	10,28	10,46	9,31	5,72	4,79	3,65	2,51	1,81	1,49

Tabelle 6.2: Ermittelte Paracetamolkonzentrationen im Speichel ($n = 3$); Extraktion mit den „Strata X-C[®]“ Kartuschen; Methode: Parac2.M

Das Bild 6.5 zeigt die berechneten mittleren Paracetamolkonzentrationen im Speichel ausgewertet bei 200 nm und 245 nm.

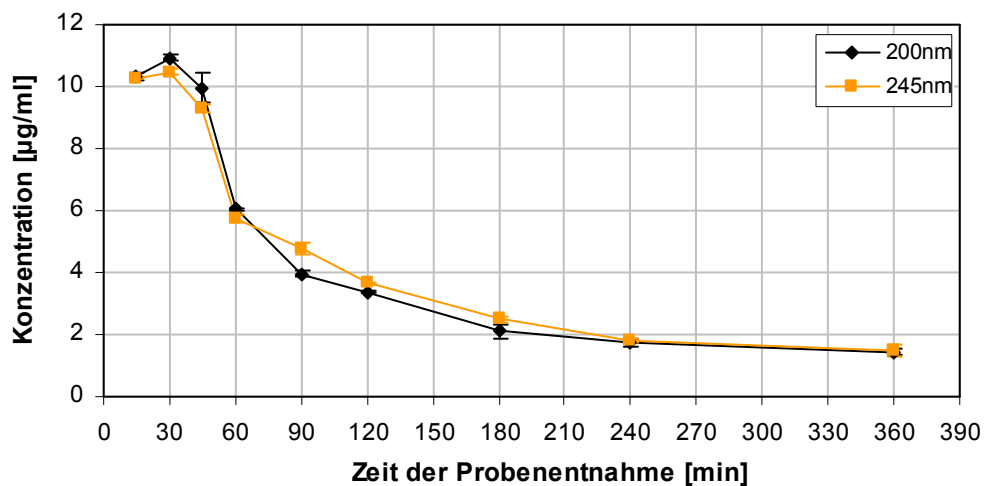


Bild 6.5: Zeitlicher Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Speichel ($n = 3$) nach oraler Gabe von 1000 mg; Extraktion mit den „Strata X-C[®]“ Kartuschen; Methode: Parac2.M

Die Auswertungen bei den Wellenlängen 200 nm und 245 nm wiesen nur sehr geringe Unterschiede der berechneten Konzentrationen auf (Bild 6.5), so dass Lösungsmittel-Eigenabsorptionen keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse der Analysen zeigten. Für die weiteren Messungen wurde die Wellenlänge 200 nm verwendet, da das Absorptionsspektrum des Paracetamols bei der Wellenlänge 200 nm eine größere Absorption zeigte als bei der

Wellenlänge 245 nm. Daraus resultierten höhere Peaks bei derselben Konzentration, die eine genauere Peakintegration ermöglichten.

Die Probandin zeigte bei der ersten (Tabelle 6.1) und der zweiten Einnahme (Tabelle 6.2) jeweils nach 30 Minuten die maximalen Paracetamolkonzentrationen von 13,02 µg/ml bzw. 10,93 µg/ml im Speichel. Adithan et al.⁵⁴ wiesen nach 45 Minuten ein Maximum von 14 µg/ml Paracetamol im Speichel nach.

Der Vergleich der Fläche unter der Speichelkonzentrations-Zeitkurve (AUC in µg·ml⁻¹·h) in Bild 6.5 (S. 51) (Wellenlänge 200 nm: AUC = 32,31 µg·ml⁻¹·h, Wellenlänge 245 nm: AUC = 30,72 µg·ml⁻¹·h) zeigte Übereinstimmung mit der von Adithan et al.⁵⁴ berechneten Fläche von 28,9 µg·ml⁻¹·h.

Die AUC wurde nach Gibaldi und Perrier⁵⁶ mit der Trapezregel berechnet, wobei die Fläche unter der Kurve als Summe ihrer Trapezsegmente dargestellt wird. Für die Fläche, die sich nach dem letzten Messpunkt ergeben würde (AUC_{last}), wird die Annahme einer Kinetik 1. Ordnung getroffen, d.h. es wird angenommen, dass die Änderungsgeschwindigkeit der Konzentration proportional zur jeweils vorliegenden Konzentration ist (exponentielle Abnahme $c = a \cdot e^{-kt}$). Hierbei ist die Geschwindigkeitskonstante k konstant, die aus den letzten 3 Messpunkten interpoliert wird. Die Fläche nach dem letzten Messpunkt berechnet sich mit der Formel $AUC_{last} = c_{last}/k$, wobei c_{last} die Konzentration des letzten Messpunktes darstellt.

Die Abweichungen zwischen den Werten von Adithan et al.⁵⁴ und den Berechnungen aus Bild 6.5 ist dadurch zu erklären, dass Adithan et al.⁵⁴ die Fläche unter der Speichelkonzentrations-Zeitkurve lediglich bis zum letzten Messpunkt bestimmten, wohingegen die vorliegenden Werte für Bild 6.5 die Extrapolation der Fläche AUC_{last} beinhalten.

Adithan et al.⁵⁴ führten eine Vergleichsstudie von Paracetamol im Speichel und Serum mit spektroskopischen Methoden durch. Die ermittelten Kurvenverläufe der Serumkonzentrationen und Speichelkonzentrationen waren vergleichbar. Die Vergleichbarkeit von Speichel- und Serumkonzentrationen stellten Smith et al.⁵⁷ nach Einnahme von 1,5 mg Paracetamol ebenfalls fest.

6.1.5 Ergebnisse der Untersuchungen eines Kombinationspräparates

Die bisherigen Untersuchungen beschäftigten sich mit der Analyse des Speichels nach der Tabletteneinnahme von 1000 mg Paracetamol. Es sollte nun überprüft werden, ob die entwickelte Methode auf ein Kombinationspräparat mit 600 mg Paracetamol anwendbar ist. Ein männlicher Proband nahm 30 ml des apothekenpflichtigen Erkältungssafts Wick MediNait[®] ein und sammelte die Speichelproben zu festgelegten Zeiten in Salivetten[®].

Nach Überprüfung der Spezifität wurden die mittleren Paracetamolkonzentrationen ($n = 3$) (Tabelle 6.3) ermittelt.

Zeit der Probenentnahme [min]	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	180	210	240
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	6,16	6,52	4,63	4,72	4,52	4,43	4,32	3,68	3,27	3,36	2,71	2,90	2,00

Tabelle 6.3: Ermittelte Paracetamolkonzentrationen im Speichel ($n = 3$) nach oraler Gabe von 600 mg; Extraktion für schwach saure Substanzen mit den „Strata X-C[®]“ Kartuschen; Methode: Parac2.M

In Bild 6.6 ist der zeitliche Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Speichel des Probanden dargestellt.

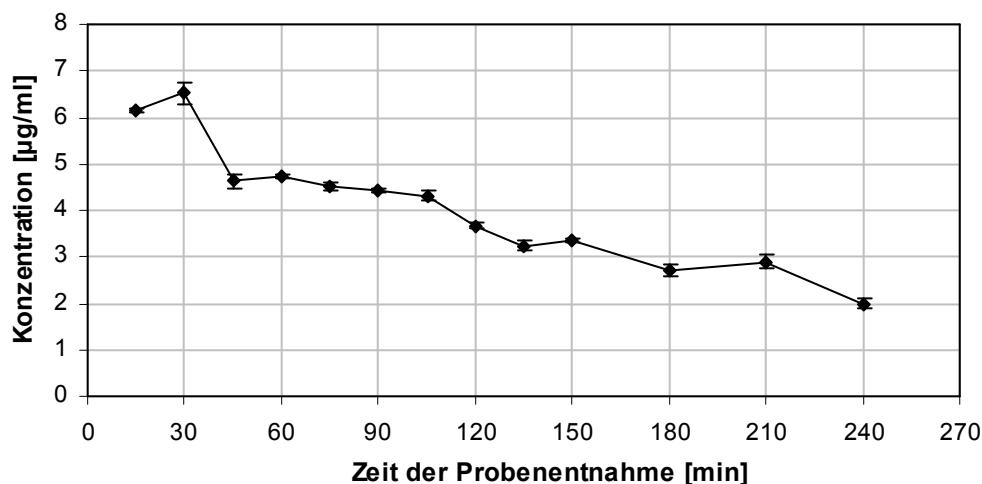


Bild 6.6: Zeitlicher Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Speichel ($n = 3$) nach oraler Gabe von 600 mg; Extraktion mit den „Strata X-C[®]“ Kartuschen; Methode: Parac2.M

Bild 6.7 (S. 54) zeigt den direkten Vergleich der Speichelkonzentrationen von Paracetamol des männlichen und weiblichen Probanden. Der männliche Proband hatte eine Gesamtmenge von 600 mg Paracetamol eingenommen, der weibliche Proband 1000 mg. Beide Probanden erreichten ihre maximalen Paracetamolkonzentrationen nach 30 Minuten. Das Verhältnis der eingenommenen Mengen ($600 \text{ mg} / 1000 \text{ mg} = 0,6$) wird durch das Verhältnis der Flächen unter den Kurven ($21,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h} / 32,31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h} = 0,67$) wiedergegeben, da die Fläche unter der Kurve (AUC) ein Maß für die aufgenommene Arzneistoffmenge ist.

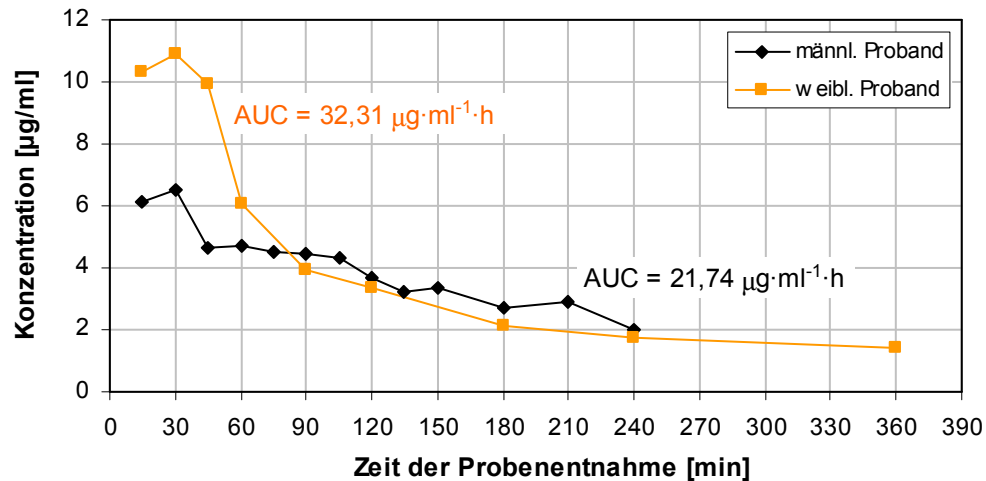


Bild 6.7: Vergleich der Speichelkonzentrationen von Paracetamol des männlichen und weiblichen Probanden

Diese Untersuchungen des Kombinationspräparates Wick MediNait® zeigten, dass mit der kapillarelektrophoretischen Methode für Paracetamol dieses ohne eine Störung durch weitere Komponenten des Kombinationspräparates spezifisch zu analysieren war.

6.1.6 Ergebnisse der Urinuntersuchungen

Zum Vergleich der Speichel- und Urinuntersuchungen sollte das Paracetamol im Speichel und Urin quantifiziert werden. Die Zuordnung der Substanzen im Urin erfolgte mit Hilfe eines Spektren- und Elektropherogrammvergleichs aus den Arbeiten von Heitmeier und Blaschke⁵³. Für die Untersuchungen hatte die Probandin nach oraler Gabe von 1000 mg Paracetamol Urinproben nach 50, 85 Minuten und nach 3, 6, 14 Stunden gesammelt. Der gesammelte Urin wurde durch einen 0,45 µm Filter (enthält Cellulosemischester aus Nitrocellulose) filtriert. Das Filtrat wurde mit der kapillarelektrophoretischen Methode Paracl.M vermessen. Im Urin wurden Paracetamol, Paracetamolglucuronid und Paracetamolsulfat gefunden. Das Paracetamolcysteinat konnten in der 85 Minuten, 3 und 6 Stunden Urinprobe nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten Hippursäure und Harnsäure in allen Proben detektiert werden. Das Paracetamolmercapturat war mit dieser Methode nicht im Urin zu identifizieren.

Im Bild 6.8 wird das Elektropherogramm der 3 Stunden Urinprobe der Probandin abgebildet.

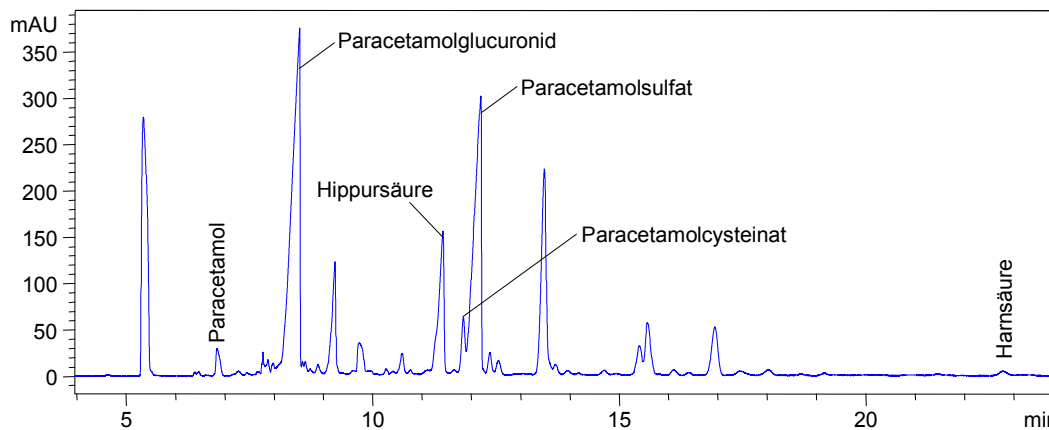


Bild 6.8: 3 Stunden Urinprobe nach der Filtration; Methode Parac1.M; Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Matrix zuzuordnen.

Nach Überprüfung der Selektivität der Urinuntersuchungen der Probandin konnten die Paracetamolkonzentrationen mit der Methode Parac1.M ermittelt werden. Zur Auswertung wurden die Flächen durch die Migrationszeit dividiert, um die Zunahme der Fläche bei höheren Migrationszeiten zu korrigieren. In Tabelle 6.4 sind die mittleren Paracetamolkonzentrationen (n = 3) nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol aufgeführt.

Zeit der Probenentnahme [min]	50	85	180	360	840
Konz. Paracetamol [µg/ml]	39,42	34,89	34,29	9,82	2,02

Tabelle 6.4: Ermittelte Paracetamolkonzentrationen im Urin (n = 3)

Das Bild 6.9 zeigt die mittleren Paracetamolkonzentrationen im Urin.

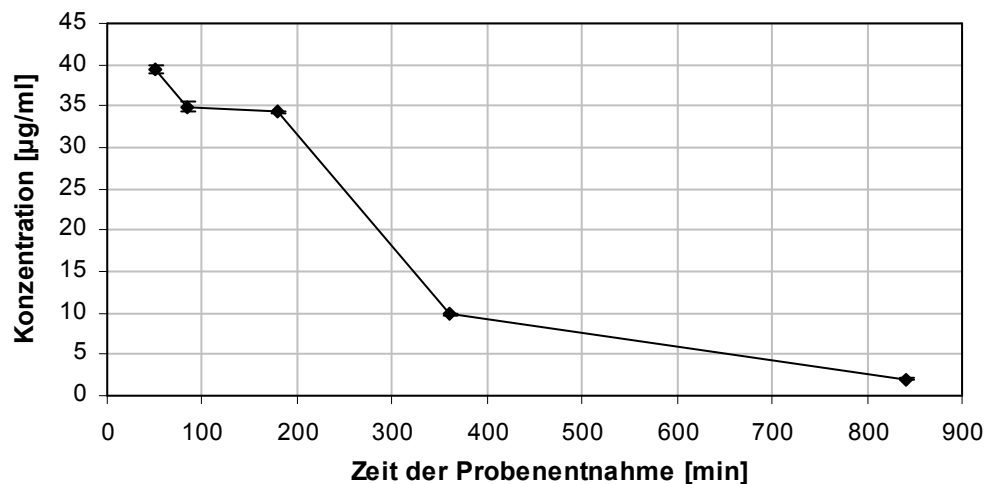


Bild 6.9: Zeitlicher Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Urin nach oraler Gabe von 1000 mg

Es wurden im Urin etwa dreimal so hohe Paracetamolkonzentrationen als im Speichel quantifiziert, bei vergleichbaren Zeiten der Probenentnahme. In Bild 6.10 ist eine zusammenfassende Graphik des zeitlichen Verlaufs der Paracetamolkonzentrationen im Urin und Speichel der Probandin nach oraler Gabe von 1000 mg dargestellt.

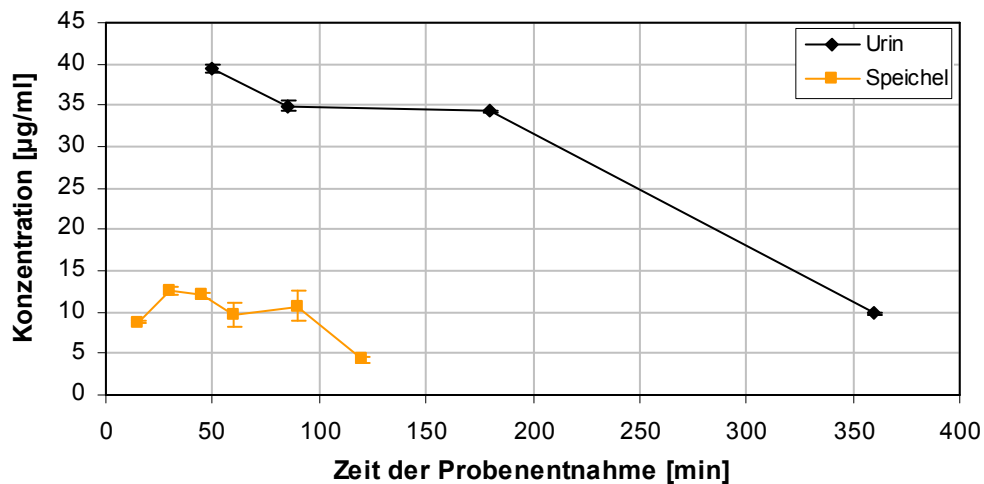


Bild 6.10: Vergleich der Paracetamolkonzentrationen im Urin und im Speichel

6.1.7 Analytische Daten

Für die kapillarelektrophoretische Methode Parac2.M mit einer vorherigen Festphasenextraktion über „Strata X-C[®]“ Kartuschen wurde eine Validierung durchgeführt, um den Nachweis der Zuverlässigkeit der analytischen Methode zu erbringen. Im experimentellen Teil sind alle Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen für die Methode Parac2.M (S. 192) aufgelistet.

Die Überprüfung der Selektivität zeigte im Bereich der nachzuweisenden Substanz Paracetamol keine Störungen durch Signale der Speichelmatrix.

Dies wird im Bild 6.11 (S. 57) durch den Vergleich einer undotierten negativen Speichelprobe zu einer mit Paracetamol ($7 \mu\text{g/ml}$) dotierten negativen Speichelprobe belegt.

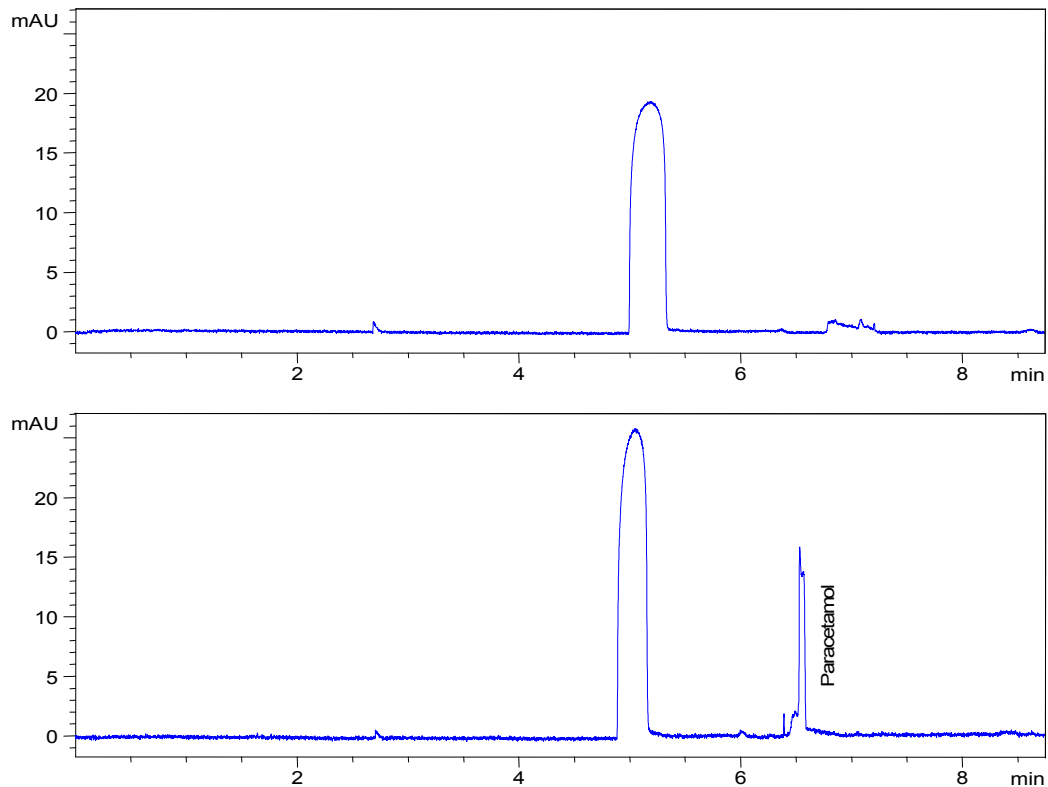


Bild 6.11: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Paracetamol (7 $\mu\text{g/ml}$) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode: Parac2.M

Die Bestimmung der Linearität zeigte eine gute Korrelation der Messgrößen (Korrelationskoeffizient: 0,9992) und eine Reststandardabweichung von 2,65. Die relative Verfahrensstandardabweichung mit 3,06 % der Methode Parac2.M war niedriger als für die Methoden zur Bestimmung der Salicylsäure nach einer Proteinfällung. Die Empfindlichkeit wurde mit $10,24 \pm 0,21$ ermittelt.

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung eine Normalverteilung.

Für die Standardabweichungen und Mittelwerte der Messreihen der „Interday“ Präzisionsbestimmung waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Grundgesamtheit bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % feststellbar.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmung zeigte für die Flächen und Migrationszeiten relative Standardabweichungen unter 4,6 % bzw. 7,5 %. Die Abweichungen der Migrationszeiten waren auf einen schwankenden EOF durch Adsorptionen von Probenbestandteilen an der Kapillarrinnenwand zurückzuführen. Adsorptionen sowie die Probenvorbereitung führten zu Abweichungen der Richtigkeit.

Die Bestimmung der Wiederfindung zeigte gute, reproduzierbare Ergebnisse:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
1,0	92,88	1,09	1,17
7,0	95,08	0,25	0,27
16,0	96,81	0,23	0,24

Tabelle 6.5: Wiederfindungen des Paracetamols (Methode Parac2.M)

Konz. [µg/ml]	1,0	7,0	16,0
Mittelwerte der Richtigkeit [%]	-14,01	7,8	1,1

Tabelle 6.6: Richtigkeit der Methode Parac2.M

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze für die Methode Parac2.M lag bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 % bei folgenden Grenzen:

Nachweisgrenze: 0,95 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 2,97 µg/ml

6.1.8 Diskussion

Das Analgetikum Paracetamol (pK_a -Wert 9,5) reichte sich in einem deutlich höheren Ausmaß im Speichel an als die untersuchten Substanzen Salicylsäure und Ibuprofen. Die ermittelten Paracetamolkonzentrationen im Speichel waren mit den Serumkonzentrationen vergleichbar. Da der Plasmaproteinbindungsanteil mit maximal 10 % deutlich geringer war als bei den untersuchten Substanzen Salicylsäure (80 %) und Ibuprofen (99 %) konnte ein höherer Anteil in den Speichel permeieren. Bei dem pH-Wert des Speichels (5,5-7,0) liegen über 99 % des Paracetamols als ionisierte Form im Speichel vor, so dass es zu einer Anreicherung im Speichel kam.

Die Konzentrationen der Metaboliten im Speichel lagen unter der Nachweisgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode. Die Metabolite sind polare Substanzen, wodurch die Permeation in den Speichel erschwert wurde.

Die entwickelte kapillarelektrophoretische Methode mit einer kurzen Migrationszeit für Paracetamol zeigte gute Ergebnisse der Validierung (S. 192). Eine Verlängerung der Präkonditionierung mit Natronlauge könnte die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten erhöhen. Die kapillarelektrophoretische Methode (Vk der Flächen unter 4,6 %) zeigte im Gegensatz zur spektroskopischen Methode von Adithan et al.⁵⁴ (Vk 12,2 %) eine verbesserte Reproduzierbarkeit.

6.1.9 Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie

6.1.9.1 Einführung

Bei der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC) werden Tenside eingesetzt, die ab einer kritischen Tensidkonzentration als kugelförmige (bis gestreckte) Mizellen vorliegen. Es kommt zur Bildung einer pseudostationären Phase aus wanderungsfähigen geladenen Mizellen. Die Trennung der Analyten basiert auf ihrer unterschiedlichen Verteilung zwischen der Lösung und dem Inneren der Mizelle. Die Verteilungskoeffizienten der Analyten bilden daher die Grundlage der Trenneffekte⁵⁸. Terabe et al.⁵⁹ führten die Zonenelektrophorese kombiniert mit dem chromatographischen Einfluss im Jahre 1984 ein. Von der Direktinjektion aus Plasma berichteten 1989 erstmals Nakagawa et al.⁶⁰. In den letzten 15 Jahren hat die Direktinjektion aus Körperflüssigkeiten für Arzneistoffe, wie z.B. Antibiotika, nicht-steroidale Antirheumatika und Antiepileptika, an Bedeutung gewonnen⁶¹⁻⁶⁵.

Wätzig et al.⁶⁶ stellten bei der kapillarelektrophoretischen Methodenentwicklung zur Direktinjektion aus Körperflüssigkeiten (Plasma, Serum und Urin) fest, dass die Probenmatrix Adsorptionen an der Kapillarinnenwand zeigte. Um dies zu minimieren, gaben sie dem Puffer Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzu und optimierten die Spülschritte zwischen den einzelnen chromatographischen Schritten. Der SDS-Zusatz hatte zur Folge, dass die Matrix-Proteine vom Natriumdodecylsulfat eingeschlossen wurden. Adsorptionen, die durch den SDS-Zusatz nicht verhindert wurden, konnten durch die Spülschritte minimiert werden.

Perrett et al.⁸ entwickelten eine mizellare elektrokinetische kapillarchromatographische Methode zur Quantifizierung von Antipyrin im Speichel. Die Methode konnte so weit optimiert werden, dass die Analysenzeit weniger als 1 Minute betrug.

6.1.9.2 Methodenentwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Direktinjektion aus dem Speichel mit Hilfe der MEKC eine Methode für Paracetamol entwickelt. Das häufig verwendete SDS wurde einem Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 zugesetzt. Wätzig und Lloyd⁶¹ zeigten, dass bei der Analyse von Paracetamol im Plasma SDS-Konzentrationen von über 50 mM benötigt wurden, um die Matrix ausreichend von dem Analyten zu trennen. Bei der Methodenentwicklung für Paracetamol im Speichel konnte dies bestätigt werden. Eine Trennung des Paracetamols von der Speichelmatrix war erst bei einem Zusatz von 59 mM SDS möglich.

Um eine reproduzierbare Methode zu entwickeln, war eine Desorption der adsorbierten Matrixmoleküle, die durch den SDS-Zusatz nicht verhindert werden konnten, nach jeder Analyse wichtig. Diese Adsorptionen wurden durch einen effektiven Spülschritt minimiert. Kunkel et al.⁴ wendeten eine Mischung aus Acetonitril und SDS-Puffer oder Isopropanol und SDS-Puffer als Spülschritt bei der Untersuchung von Plasmaproben an, wobei die Methode mit der Mischung Isopropanol und SDS-Puffer eine niedrigere Bestimmungsgrenze zeigte. Ein Spülschritt nur mit dem SDS-Puffer ist bei Plasmauntersuchungen nicht effizient genug gewesen^{67, 68}. Bei den Speicheluntersuchungen wurde zum Spülen der Kapillare ein Gemisch aus Acetonitril und 60 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 mit 59 mM SDS eingesetzt. Auf den Austausch des Puffers (Replenishment) zwischen den einzelnen Läufen wurde verzichtet, da dieser Vorgang zu einer starken Blasen- und Schaumbildung führte und dadurch eine unregelmäßige Stromstärke bewirkte. Zur hydrodynamischen Injektion wurde ein niedrigerer Druck von 25,0 mbar für 10,0 Sekunden eingesetzt, um auch bei der Injektion die Blasen- und Schaumbildung zu minimieren. Die Methode Parac3.M ist auf S. 171 aufgeführt. Mit dieser Methode war es möglich, den Speichel ohne vorherige Aufbereitung zu vermessen. Dies stellte einen großen Vorteil dar, weil Verluste durch die Extraktion ausgeschlossen werden konnten.

6.1.9.3 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol wurden die Speichelproben einer Probandin nach 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Minuten mit Salivetten[®] entnommen und anschließend mit der kapillarelektrophoretischen Methode Parac3.M direkt, ohne vorherige Aufbereitung, vermessen. In Tabelle 6.7 (S. 61) sind die gefundenen Paracetamolkonzentrationen im Speichel aufgelistet.

Zeit der Probenentnahme [min]	15	30	45	60	90	120	180	240	360
Konz. [$\mu\text{g/ml}$] Paracetamol	12,85	11,66	10,31	9,97	8,50	6,55	5,63	4,30	3,62

Tabelle 6.7: Ermittelte Paracetamolkonzentrationen im Speichel ($n = 3$) mit der Methode Parac3.M

Die Berechnung der Paracetamolkonzentrationen erfolgte unter Berücksichtigung der mit der Migrationszeit korrigierten Flächen.

Der zeitliche Verlauf der Paracetamolkonzentrationen im Speichel wird im Bild 6.12 graphisch verdeutlicht.

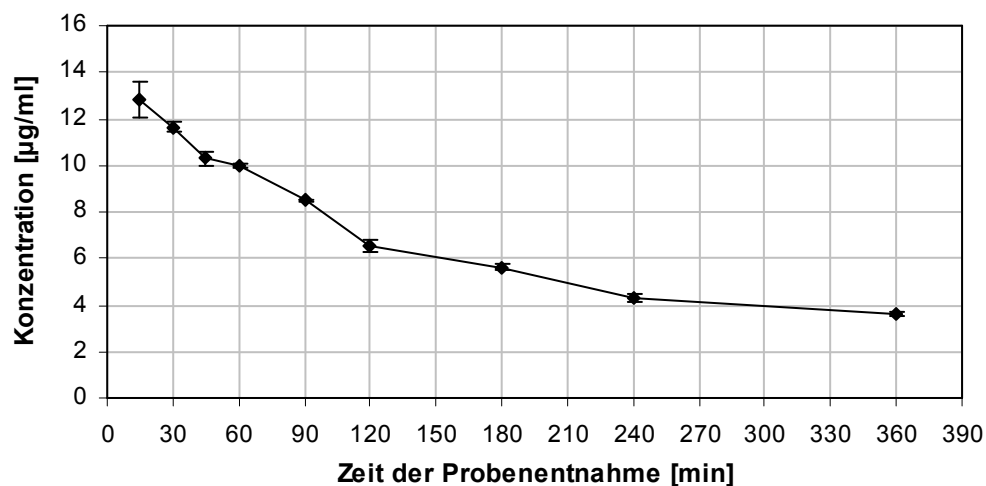


Bild 6.12: Zeitlicher Verlauf der Paracetamolkonzentrationen nach oraler Gabe von 1000 mg

Fagiolino und Vazquez⁶⁹ fanden nach der Einnahme von 1000 mg Paracetamol als Tablette maximale Speichelkonzentrationen von $16,1 \mu\text{g/ml}$ nach 60 Minuten. Sie ermittelten in ihrer Studie von 10 Probanden eine mittlere AUC von $52,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h} \pm 20,72 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$ nach Einnahme von 1000 mg Paracetamol als Tablette. Mit $63,45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$ liegt die aus Bild 6.12 berechnete AUC innerhalb dieses Wertebereichs.

6.1.9.4 Analytische Daten

Im experimentellen Teil sind die Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen der Validierung für die MEKC-Methode Parac3.M (S. 200) aufgelistet.

Die negativen Speichelproben zeigten keine der Matrix zuzuordnende Signale im Bereich der nachzuweisenden Substanz Paracetamol.

Beleg hierfür ist dass im Bild 6.13 aufgeführte Elektropherogramm einer undotierten negativen Speichelprobe im Vergleich zu einer mit Paracetamol (22 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe.

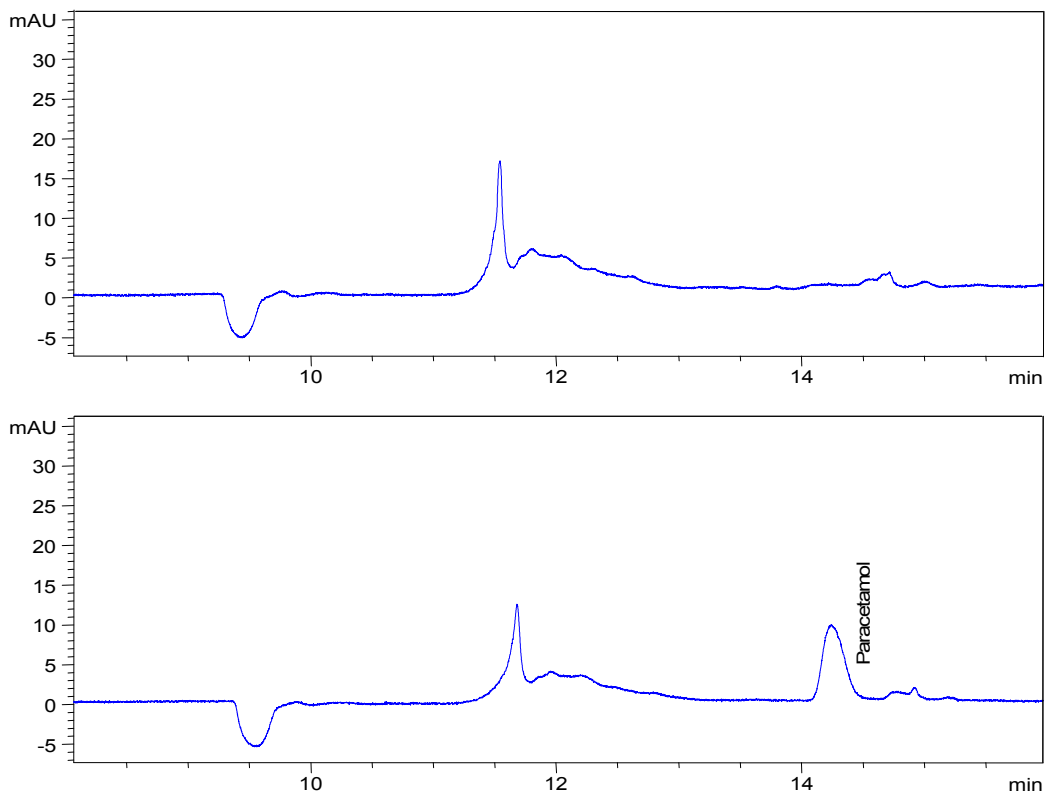


Bild 6.13: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Paracetamol (22 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode: Parac3.M

Die Regressionsanalyse ergab eine lineare Funktion mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9999. Da ein Zusammenhang zwischen den Messgrößen bestand, war sichergestellt, dass das Detektionssystem über den gesamten Konzentrationsbereich exakt arbeitete und die ermittelten Werte zuverlässig quantifiziert werden konnten. Es ergab sich eine niedrige Reststandardabweichung von 0,1, so dass nur geringe Streuungen der Messwerte um die Regressionsgerade auftraten. Die MEKC-Methode wies von allen entwickelten kapillarelektrophoretischen Methoden dieser Arbeit die niedrigste relative Verfahrensstandardabweichung (1,1 %) auf. Die Empfindlichkeit war jedoch mit $0,44 \pm 0,01$ die niedrigste aller Methoden zur Untersuchung von Speichel.

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung eine Normalverteilung. Für die migrationszeitkorrigierten Flächen war kein statistisch signifikanter Unterschied der Grundgesamtheit festzustellen.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmung zeigte für die Flächen und Migrationszeiten relative Standardabweichungen unter 2,5 % bzw. 3,4 %. Abweichungen der Migrationszeiten, wie bei der Methode Parac2.M, waren bei dieser Methode nicht feststellbar. Der SDS-Zusatz und eine effektivere Präkonditionierung mit Natronlauge und Acetonitril/60 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 (1:1) führten dazu, dass Adsorptionen an der Kapillarenwand minimiert wurden. Daraus resultierte ein stabilerer EOF, und die Migrationszeiten wiesen eine hohe Kontinuität auf.

Für die Wiederfindung und Richtigkeit wurden ebenfalls gute, reproduzierbare Ergebnisse erhalten:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
6,0	97,98	1,58	1,61
10,0	100,39	1,27	1,27
18,0	100,07	1,52	1,51

Tabelle 6.8: Wiederfindung des Paracetamols (Methode Parac3.M)

Konz. [µg/ml]	6,0	10,0	18,0
Mittelwerte der Richtigkeit [%]	2,02	-0,39	-0,08

Tabelle 6.9: Richtigkeit der Methode Parac3.M

Für die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze wurden bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 % für neun Messungen pro Konzentrationsniveau folgende Ergebnisse ermittelt:

Nachweisgrenze: 0,46 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 1,59 µg/ml

6.1.9.5 Diskussion

Der große Vorteil der MEKC ist in Direktbestimmungen von Analyten auch in komplexen Matrices zu finden. Dadurch wurden Zeit und Kosten vermindert und zusätzlich die Richtigkeit des analytischen Systems verbessert (Tabelle 6.9). Die gute Reproduzierbarkeit, Wiederfindung und Richtigkeit zeigten, dass die Adsorptionen der Probenmatrix an der Kapillarenwand minimiert wurden. Die Division der Peakfläche durch die Migrationszeit führte zu besseren, reproduzierbaren Ergebnissen. Die Anwendung dieser Methode ist durch die höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenze (0,46 µg/ml; 1,56 µg/ml) eingeschränkt. Arzneistoffe und Metabolite, die in Konzentrationen unter 0,5 µg/ml im Speichel auftraten, waren mit der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie nicht nachweisbar.

7. Untersuchungen basischer Arzneistoffe

Wie bei den sauren Arzneistoffen wurden basische Arzneistoffe mit unterschiedlichen pK_a -Werten untersucht, um eine Abgrenzung vornehmen zu können, ab welchem pK_a -Wert diese Substanzen und deren Metaboliten in den Speichel permeieren.

Nachfolgend sind die untersuchten basischen Arzneistoffe und einige Metabolite mit ihren pK_a -Werten aufgelistet:

Diethylnorephedrin	$pK_a = 9,9$
Pseudoephedrin	$pK_a = 9,6$
Ephedrin	$pK_a = 9,6$
Norephedrin	$pK_a = 9,5$
Ethylnorephedrin	$pK_a = 9,4$
Phenylephrin	$pK_{a1} = 8,9; pK_{a2} = 10,1$
Diphenhydramin	$pK_a = 9,0$
Norpseudoephedrin	$pK_a = 8,9$
Amfepramon	$pK_a = 8,5$
Ethylaminopropiophenon	$pK_a = 7,1$
Dextromethorphan	$pK_a = 8,3$
Carbinoxamin	$pK_a = 8,1$
Ambroxol	$pK_a = 7,9$
Doxylamin	$pK_{a1} = 5,8; pK_{a2} = 9,3$
Nicotin	$pK_{a1} = 3,2; pK_{a2} = 7,9$
Cetirizin	$pK_{a1} = 3,3; pK_{a2} = 6,4$

Zunächst erfolgte die Probenvorbereitung durch eine Proteinfällung, um die auftretenden Verluste bei einer Festphasenextraktion zu minimieren. Da mit dieser Probenvorbereitung die oft notwendigen niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht erreicht wurden, sind für die Speicheluntersuchungen der weiteren Arzneistoffe Festphasenextraktionsvorschriften entwickelt worden. Für die Extraktionen wurden die „Bond Elut Certify[®]“ und „Strata X-C[®]“ Kartuschen verwendet.

Die folgende allgemeine Vorschrift für die Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen wurde für die jeweils untersuchte Substanz angepasst, um optimale Wiederfindungen zu erreichen:

Säulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0

Probenapplikation

1 ml Speichel mit 1,0 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0

Trocknen

5 min mit 500 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 2 % Ammoniak in Ethylacetat

Das Eluat wird bei 820 mbar und 45 °C zur Trockene eingengt. Die Probe wird in 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

Der Trocknungsvorgang der Kartuschen erfolgte bis auf eine Ausnahme (Nicotin) auf gleiche Weise. Bei der Extraktion für Nicotin wurde ein geringerer Druck (350 mbar) und eine kürzere Zeit (1 min) gewählt, da Nicotin volatil ist. Die Festphasenextraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen wurde in folgenden Schritten variiert:

- pH-Wert des Puffers für die Konditionierung
- pH-Wert der Probe
- Zusammensetzung und pH-Wert des Elutionsmittels

Für den Arzneistoff Amfepramon und dessen Metaboliten wurde die folgende Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen angewendet, welche sich als eine akzeptable Alternative zu der oben beschriebenen Vorschrift erwies:

Säulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 ml bidest. Wasser

2 × 2 ml 0,1 M Ammoniumchlorid/Ammoniak pH 6,0

Probenapplikation

1 ml Speichel mit einem pH-Wert von 6,0, eingestellt mit 0,1 N Salzsäure

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml Dichlormethan/Isopropylalkohol/Ammoniak (78:20:2)

Das Eluat wird bei 400 mbar zur Trockene eingengt und in 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

Nachfolgend wird die allgemeine Vorschrift für die Extraktion über die „Strata X-C[®]“ Kartusche für basische Substanzen aufgeführt:

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

1 ml bidest. Wasser

Probenapplikation

500 µl angesäuerte Probe mit 10 µl Phosphorsäure (85 %)

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 5 % Ammoniak in Methanol

Das Eluat wird bei 500 mbar ohne Wärme zur Trockene eingengt und anschließend in 500 µl 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

Variationen der Extraktionen über die „Strata X-C[®]“ Kartuschen wurden mittels pH-Wert Einstellung der Probe und der Auswahl des Elutionsmittels erreicht.

Für die Arzneistoffe Ephedrin und Nicotin wurden noch weitere Festphasenextraktionsvorschriften mit „CBA[®]“, C-18- bzw. „Focus[®]“-Kartuschen erstellt. Diese Extraktionen werden in den Kapiteln der einzelnen Arzneistoffe aufgeführt.

Zur Identifizierung und Quantifizierung von basischen Substanzen wurde ein 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 für die kapillarelektrophoretische Ausgangsmethode verwendet. Als Injektionsart wurde die elektrokinetische mit einer hydrodynamischen Injektion kombiniert, da diese Variation zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit führte. Durch einen kurzen Druckimpuls auf das „Probenvial“ nach der elektrokinetischen Injektion konnte ein Verlust des Analyten durch Konvektion oder Tropfenbildung an dem Kapillarende verhindert werden.

Folgende Methode Phep.M* wurde für basische Substanzen entwickelt:

* Der Methodenname ist eine Abkürzung für Phenylephrin. Diese Methode wurde auch mit dieser Bezeichnung für andere Arzneistoffe angewendet.

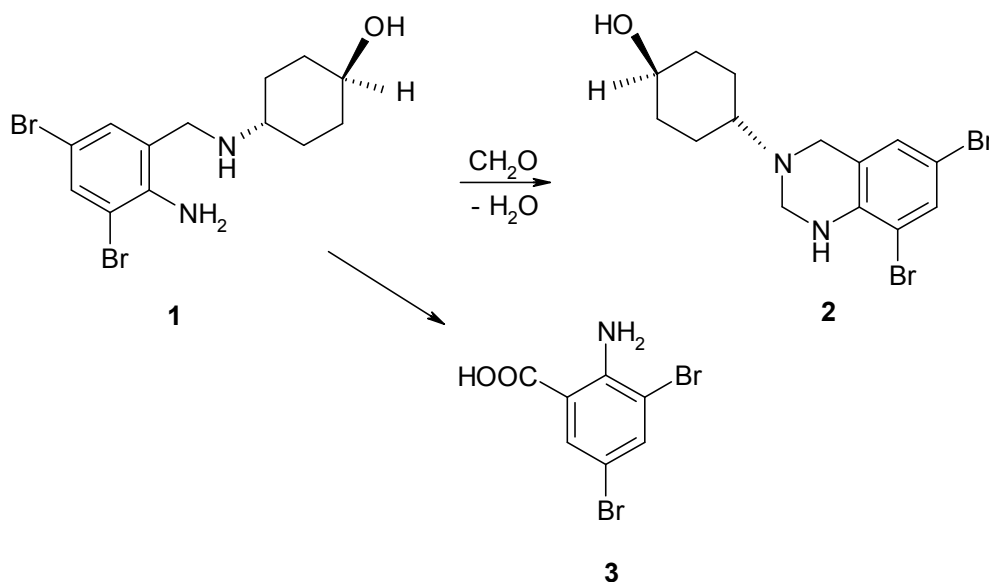
Methode:	Phep.M
Kassettentemperatur	20,0 °C
Puffer:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
Replenishment:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
Präkonditionierung:	1. 1,0 min I: 0,1 M H ₃ PO ₄ 2. 2,0 min I: 50 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 2,5
Elektrik:	Polarität Positiv
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 20,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe
Laufzeit:	20,0 min
Spannung:	15,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

Diese Ausgangsmethode wurde für die untersuchten basischen Arzneistoffe durch wenige Variationen weiter optimiert.

7.1 Ambroxol

7.1.1 Einleitung

Für weitere Untersuchungen wurden apothekenpflichtige Arzneistoffe aus den Indikationsgebieten der Erkältungskrankheiten ausgewählt. Ambroxol* ist ein Sekretolytikum und Expectorans und besitzt eine lokalanästhetische Wirkung, welche zur Therapie von Halsschmerzen ausgenutzt wird⁷⁰. Ambroxol zeigt bei oraler Verabreichung eine Bioverfügbarkeit von etwa 80 %. Maximale Plasmaspiegel wurden bei Tabletteneinnahme nach 1 bis 2, bei Gabe von Lutschtabletten nach 2 bis 3 Stunden erreicht. Die Plasmakonzentration des Ambroxols erreichte bei oraler Gabe von 30 mg einen Spitzenwert von 38,5 ng/ml und bei 60 mg 106,11 ng/ml⁷¹. Die Bindung an Plasmaproteine beträgt 80–90 %. Die Substanz wird mit einer Eliminationshalbwertszeit von 10 Stunden ausgeschieden. Als Hauptmetabolite des Ambroxols (**1**) wurden das 6,8-Dibrom-3-(*trans*-4-hydroxycyclohexyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin (**2**) und die 3,5-Dibromanthranilsäure (**3**) identifiziert (Schema 7.1., S. 69). Der Metabolit **2** entsteht durch Addition eines C-1-Körpers unter Zyklisierung^{72, 73}. Ambroxol wird renal zu 80 % in Form von Konjugaten (Glucuronide) eliminiert, und etwa 10 % einer Dosis werden über den Faeces ausgeschieden. Nur 5 % finden sich in unveränderter Form im Urin wieder.



Schema 7.1: Biotransformation von Ambroxol

* Nach IUPAC: *trans*-4-[(2-Amino-3,5-dibrombenzyl)-amino]-cyclohexanol

7.1.2 Methodenentwicklung

Ambroxol war mit der allgemeinen Methode Phep.M (S. 172) für basische Arzneistoffe in 0,1 mM Phosphorsäure mit einer Konzentration unter 0,02 µg/ml detektierbar. Variationen der Injektion (S. 172) bezüglich einer Wasserzone (Phep1.M) oder einer Erhöhung der Injektionszeit (Phep2.M) erbrachten keine nennenswerte Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, so dass für die weiteren Analysen die Methode Phep.M verwendet wurde.

7.1.3 Probenvorbereitung

Zunächst wurden die Speichelproben nach einer Proteinfällung (500 µl Speichel mit 300 µl Acetonitril) direkt vermessen, um die auftretenden Verluste bei einer Festphasenextraktion zu vermeiden. Die Messungen zeigten, dass nach dieser Probenvorbereitung die Konzentration der Matrixbestandteile nicht ausreichend minimiert war, so dass mit der kapillarelektrophoretischen Methode Phep.M eine Trennung von Matrix und Ambroxol erreicht werden konnte. Die entnommenen Speichelproben wurden mit der allgemeinen Festphasenextraktion für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 163) extrahiert. Die Speichelmatrix war nach dieser Extraktion effektiv minimiert und Ambroxol in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure deutlich nachweisbar.

7.1.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Zur Untersuchung von Ambroxol und dessen Metaboliten im Speichel nahmen die Probanden Ambroxolhydrochlorid als Tablette ein, der Proband A einmalig 60 mg und der Probanden B an drei aufeinander folgenden Tagen 60 mg. Zu definierten Zeiten (60, 90, 120, 180 Minuten und 5, 8, 10, 15 Stunden) wurden die Speichelproben mit den Salivetten[®] entnommen. Nach der Extraktion mit den „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen waren in der 120 und 180 Minuten Speichelprobe des Probanden A und in der 60 und 90 Minuten Speichelprobe des Probanden B Ambroxol mit der Methode Phep.M detektierbar. Ambroxol wurde in den Speichelproben beider Probanden nur über einen kurzen Zeitraum nachgewiesen. Die Zuordnung des Peaks zum Ambroxol erfolgte über das Zudotieren des Ambroxolstandards in einer Konzentration von 1 µg/ml.

Da keine Kalibrationskurve zur Verfügung stand, wurde die Konzentrationsberechnung mit Hilfe einer Vergleichsmessung durchgeführt:

Konzentration in der Vergleichsmessung: $c_x = 0,5 \mu\text{g/ml}$, Peakfläche der Vergleichsmessung: $A_x = 13,6$. Mit A , der gemessenen Fläche, ergaben sich mit der Definition

$$c = \frac{c_x}{A_x} \cdot A \quad (7.1)$$

folgende Konzentrationen in den Speichelproben der beiden Probanden:

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband A (weiblich) Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Proband B (weiblich) Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
1	n.n.	0,32
1,5	n.n.	0,26
2	0,15	n.n.
3	0,11	n.n.
5	n.n.	n.n.
8	n.n.	n.n.
10	n.n.	n.n.
15	n.n.	n.n.
10	n.n.	n.n.

Tabelle 7.1: Ambroxolkonzentrationen im Speichel (n.n. = nicht nachweisbar)

Um eine Zersetzung als Ursache für die eingeschränkte Nachweisbarkeit von Ambroxol im Speichel auszuschließen, wurde eine Zersetzungsuntersuchung durchgeführt. Mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ und $1,0 \mu\text{g/ml}$ Ambroxol dotierte negative Speichelproben wurden direkt nach dem Zusetzen des Ambroxols, nach einem Tag und nach zwei Tagen Standzeit bei Raumtemperatur mit der Kapillarelektrophorese vermessen. Die gemessenen Flächen wurden an den drei Tagen verglichen. Die Messungen zeigten, dass Ambroxol sich innerhalb von 3 Tagen nicht zersetzt. Daher wurden entnommene Speichelproben nach der Entnahme innerhalb von 3 Tagen vermessen.

7.1.5 Diskussion

Da Ambroxol einen pK_a -Wert von 7,9 aufweist, war zu erwarten, dass Ambroxol im Speichel nachzuweisen ist. Bei einem pK_a -Wert von 7,9 liegt ein ausreichender Anteil (25 %) an nicht dissoziierter Form im Blut vor, so dass Ambroxol bei dem physiologischen Blut-pH-Wert von 7,4 ein ausreichendes Permeationsvermögen durch die Lipidmembran besitzt. Zusätzlich weist Ambroxol ein hohes Verteilungsvolumen (7 l/kg) und gute Gewebegängigkeit auf⁷¹. Ungeklärt bleibt, warum bei den vorliegenden Messungen Ambroxol nur über einen so kurzen Zeitraum nachzuweisen war. Es ist anzunehmen, dass zu den weiteren Entnahmezeitpunkten die Ambroxolkonzentrationen unter der Nachweisgrenze der Methode lag. Die überwiegend als Konjugate vorliegenden Metaboliten waren im Speichel mit der kapillarelektrophoretischen Methode Phep.M nicht nachweisbar. Da die Metabolite instabile polare Substanzen sind, war die Permeation durch die Lipidmembran in den Speichel erschwert.

Hinzukam, dass der Metabolit 3,5-Dibromanthranilsäure einen niedrigeren pK_a -Wert als Ambroxol aufweist und somit dissoziiert vorlag.

7.2 Phenylephrin und Carbinoxamin

7.2.1 Einleitung

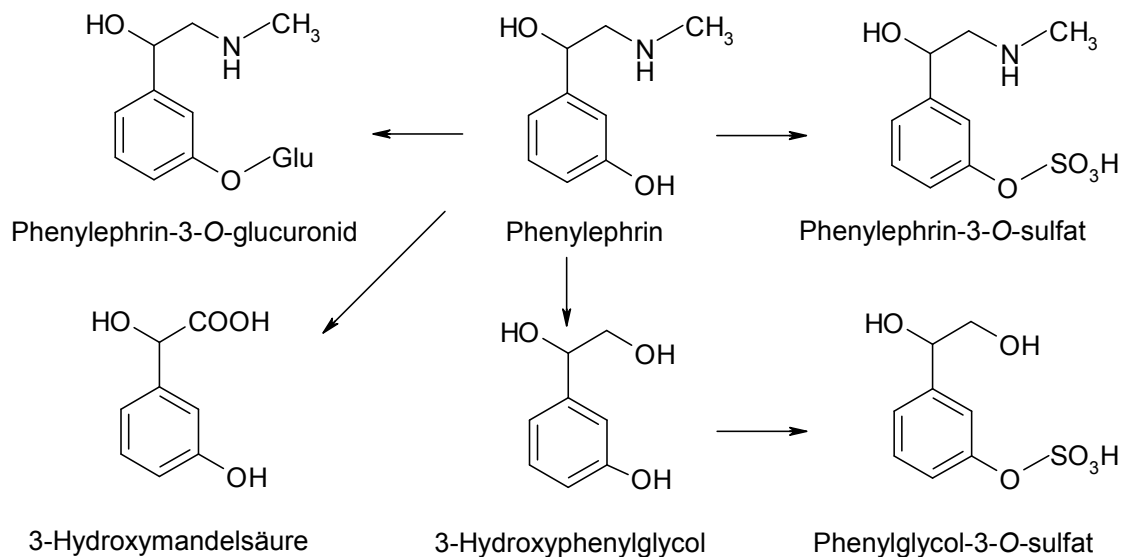
Phenylephrin gehört zu den direkten Sympathomimetika mit vorwiegend α -sympathomimetischer Wirkung. Phenylephrin weist bei oraler Gabe einen ausgeprägten First-Pass-Metabolismus in Leber und Darmwand sowie eine schwankende Resorption auf. Die Bioverfügbarkeit liegt nur bei 20 bis 25 %. Phenylephrin wird deshalb überwiegend lokal zur Schleimhautabschwellung bei unspezifischer und allergischer Sinusitis, Rhinitis und Nasopharyngitis sowie bei einer Konjunktivitis eingesetzt. Zusätzlich ist es in mydriatischen Augentropfen enthalten⁷⁴. Von den zwei Enantiomeren* des Phenylephrins wird das (*R*)-(-)-Enantiomer kommerziell eingesetzt⁷⁵.

Das Carbinoxamin gehört zu den Antihistaminika der 1. Generation. Es hemmt die vermehrte Schleimsekretion und beseitigt allergisch bedingte Symptome an den Schleimhäuten.

In einer Bioverfügbarkeitsstudie von Stockis et al.⁷⁶ wurde die Pharmakokinetik von Carbinoxamin und Phenylephrin, nach Verabreichung der Rhinopront® Retardkapsel und einer wässrigen Lösung, verglichen. Sechs Stunden nach der oralen Gabe der Retardkapsel wurde eine maximale Plasmakonzentration von 4,5 ng/ml Carbinoxamin erreicht. Nach drei Stunden wies Phenylephrin eine maximale Plasmakonzentration von 154 ng/ml auf. Phenylephrin wird nur zu 2,6 % als unveränderte Substanz, zu 45,7 % als Konjugat der Schwefel- und Glukuronsäure, zu 27,5 % als 3-Hydroxyphenylglycol und dessen Konjugat der Schwefelsäure sowie zu 24,2 % als *m*-Hydroxymandelsäure über den Urin ausgeschieden (Schema 7.2, S. 74)⁷⁷. Die Halbwertszeit beträgt für Phenylephrin 2,5 Stunden und für Carbinoxamin über 10 Stunden. Phenylephrin besitzt eine hohe Plasmaproteinbindung (über 90 %).

* (*R*)-(-)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino)-1-ethanol

(*S*)-(+)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino)-1-ethanol



Schema 7.2: Biotransformation von Phenylephrin

Carbinoxamin* unterscheidet sich durch andere Ringsysteme von Diphenhydramin. Es wird zum primären und sekundären Amin sowie zum *N*-Oxid abgebaut. Außerdem entsteht der saure Metabolit [(4-Chlor-phenyl)-pyridin-2-yl-methoxy]-essigsäure.

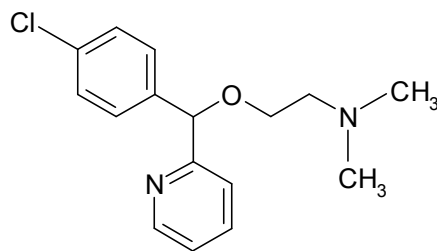


Bild 7.1: Carbinoxamin

Die Methodenentwicklung konzentrierte sich auf die Identifizierung und Quantifizierung von Phenylephrin, da bei dem geringen maximalen Plasmaspiegel von Carbinoxamin nicht zu erwarten war, dass dieses im Speichel überhaupt nachzuweisen ist. Hinzukommt, dass Carbinoxamin heute ohne Bedeutung ist, da zurzeit kein Arzneimittel mit diesem Wirkstoff in Deutschland im Handel ist. Der Hersteller nahm das in dieser Arbeit untersuchte Arzneimittel Rhinopront® mit der Zusammensetzung 20 mg Phenylephrin und 4 mg Carbinoxaminmaleat im Jahr 2003 vom Markt. Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurden vor diesem Zeitpunkt ermittelt.

* Nach IUPAC: 2-[4-Chlor- α -(2-pyridyl)-benzyloxy]-*N,N*-dimethylethylamin

7.2.2 Methodenentwicklung

Mit der Ausgangsmethode Phep.M (S. 172) war Phenylephrin in 0,1 mM Phosphorsäure mit einer Konzentration unter 0,2 µg/ml detektierbar (Bild 7.2).

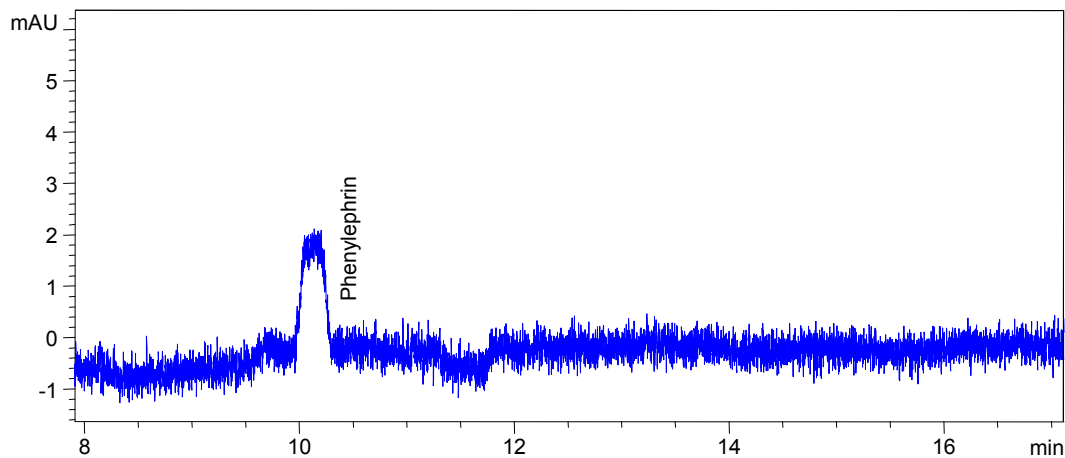


Bild 7.2: Phenylephrin 0,2 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure

Abwandlungen bezüglich Injektionszeit und Injektionsspannung sowie der Pufferkonzentrationen (75 mM KH_2PO_4 pH 2,5 und 100 mM KH_2PO_4 pH 5,3) erbrachten kaum eine Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Durch die unterschiedliche Leitfähigkeit des Puffers und der Probe konnte nur eine geringe Steigerung des „Sample Stacking“-Effekts erreicht werden. Da bei einer konstanten Spannung die Analysenzeit mit steigender Pufferkonzentration zunimmt, wiesen die Analysen mit den höher konzentrierten Puffern längere Migrationszeiten des Analyten auf. Deshalb wurde die Methode Phep.M für die weiteren Messungen beibehalten. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde Phenylephrin mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure sechsmal vermessen. Die Mehrfachbestimmung des Phenylephrins ergab für die Flächen ($\text{Stabw} = 0,8$; $\text{Vk} = 2,6$ %) und für die Migrationszeiten ($\text{Stabw} = 0,1$; $\text{Vk} = 1,2$ %) eine nach Gauß normal verteilte Streuung um den Mittelwert.

7.2.3 Probenvorbereitung

Die allgemeine Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) wurde für eine dotierte negative Speichelprobe (0,2 µg/ml Phenylephrin) angewendet. Bei dieser Extraktion waren in der Flüssigkeit nach der Probenapplikation Substanzverluste festzustellen. Um diesen Verlust zu minimieren, wurde eine niedrige Kartuschendurchflussrate der Probe eingestellt. Dadurch sollte die Retention des Analyten durch den Ionenaustausch verbessert werden.

Zusätzlich wurden bei der Probenapplikation verschiedene Medien mit unterschiedlichen pH-Werten zur Verdünnung der Probe getestet:

- a) 1 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$)
- b) 1 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 3,3 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$)
- c) 1 ml 0,05 M Acetatpuffer pH 3,7

Die 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung mit einem pH-Wert von 3,3 zeigte die besten Ergebnisse. Phenylephrin war in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nach der Extraktion I über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 163), mit der kapillarelektrophoretischen Methode Phep.M quantifizierbar. Die Wiederfindung lag bei 96,7 %.

7.2.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Für die Speicheluntersuchungen nahmen Probanden jeweils eine Rhinopront[®] Kapsel ein, die 20 mg Phenylephrin und 4 mg Carbinoxaminmaleat in retardierter Form enthielt. Nach 30 und 45 Minuten sowie nach 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden wurden die Speichelproben mit Salivetten[®] entnommen und nach der Extraktion I über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen mit der kapillarelektrophoretischen Methode Phep.M vermessen. In der nach zwei Stunden entnommenen Speichelprobe waren Phenylephrin und ein Metabolit detektierbar (Bild 7.3). Der erste Peak konnte einem körpereigenen Stoff zugeordnet werden, da dieser ebenfalls in der negativen Speichelprobe nachzuweisen war. Durch Hinzufügen des Phenylephrinstandards zu der nach zwei Stunden entnommenen Speichelprobe konnte Phenylephrin dem dritten Peak zugeordnet werden. Da keine Referenzsubstanzen der Metaboliten zum Abgleich zur Verfügung standen, konnte keine endgültige Zuordnung des zweiten Peaks zu einem Metaboliten vorgenommen werden. Eine massenspektrometrische Analyse konnte auf Grund der geringen Konzentration nicht vorgenommen werden.

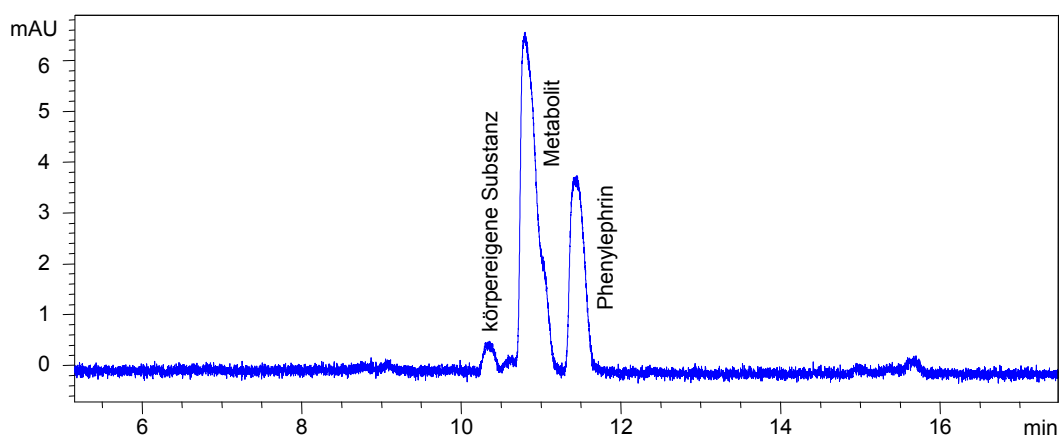


Bild 7.3: 2 Stunden Speichelprobe in 0,1 mM Phosphorsäure

Bei zwei Probanden konnte weder Phenylephrin noch dessen Metaboliten im Speichel identifiziert werden.

7.2.5 Diskussion

Die Speicheluntersuchungen nach Einnahme von Rhinopront® Kapseln zeigten interindividuelle Schwankungen zwischen den Probanden beim Nachweis vom Phenylephrin und dessen Metaboliten. Die pK_a -Werte des Phenylephrins sind pK_{a1} 8,9; pK_{a2} 10,1. Bei einem physiologischen Blut-pH-Wert von 7,4 ist Phenylephrin zu über 95 % protoniert, wodurch die Permeation in den Speichel erschwert wird. Zusätzlich zeigt Phenylephrin eine hohe Plasmaeiweißbindung, eine niedrige Bioverfügbarkeit und die Bildung polarer Metaboliten.

Bei den Probanden, die Phenylephrin und einen Metaboliten im Speichel aufwiesen, trat vermutlich eine höhere Resorption oder eine geringere Proteinbindung des Arzneistoffes auf, so dass im Plasma höhere Konzentrationen von nichtgebundenen Phenylephrin und dessen Metaboliten erreicht wurden. Dies führte zu einer höheren Permeation in den Speichel, so dass Konzentrationen über der Nachweisgrenze der Methode Phep.M erlangt wurden.

Möglicherweise handelt es sich bei dem gefundenen Metaboliten um 3-Hydroxyphenylglycol, da dieser bei Betrachtung der Molekülstrukturen der Metaboliten die geringsten polaren Eigenschaften aufweist und somit am ehesten durch die Lipidmembran permeiert.

Der Speichel wurde nicht weiter auf Carbinoxamin untersucht, da Carbinoxamin einen sehr geringen maximalen Plasmaspiegel (4,5 ng/ml) aufweist und somit nur Konzentrationen im Speichel unter der Nachweisgrenze dieser kapillarelektrophoretischen Methode erreichte.

Die Methode Phep.M lieferte reproduzierbare Messwerte für die Flächen ($V_k = 2,6 \%$) und Migrationszeiten ($V_k = 1,2 \%$). Sie zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und eine verbesserte Reproduzierbarkeit aus. Gomez et al.⁷⁸ beschrieben eine kapillarelektrophoretische Methode zum Nachweis von Phenylephrin im Erkältungssaft mit einer Nachweisgrenze von 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Auch die von Marchesini et al.⁷⁹ (6,6 $\mu\text{g/ml}$) publizierte kapillarelektrophoretische Methode zum Nachweis von Phenylephrin in Nasentropfen wies eine schlechtere Nachweisgrenze auf.

Gallego et al.⁸⁰ entwickelten eine MEKC-Methode, mit der Phenylephrin neben Prednisolon und Naphazolin quantifizierbar ist. Diese Methode wies eine Wiederfindung von 97,9 % auf, die vergleichbar ist mit der Wiederfindung der Extraktion I über die „Bond Elut Certify®“ Kartuschen (96,7 %). Es konnte mit der Extraktion I eine Wiederfindung erreicht werden, die mit einer direkten Analyse ohne vorherige Probenaufbereitung fast identisch war.

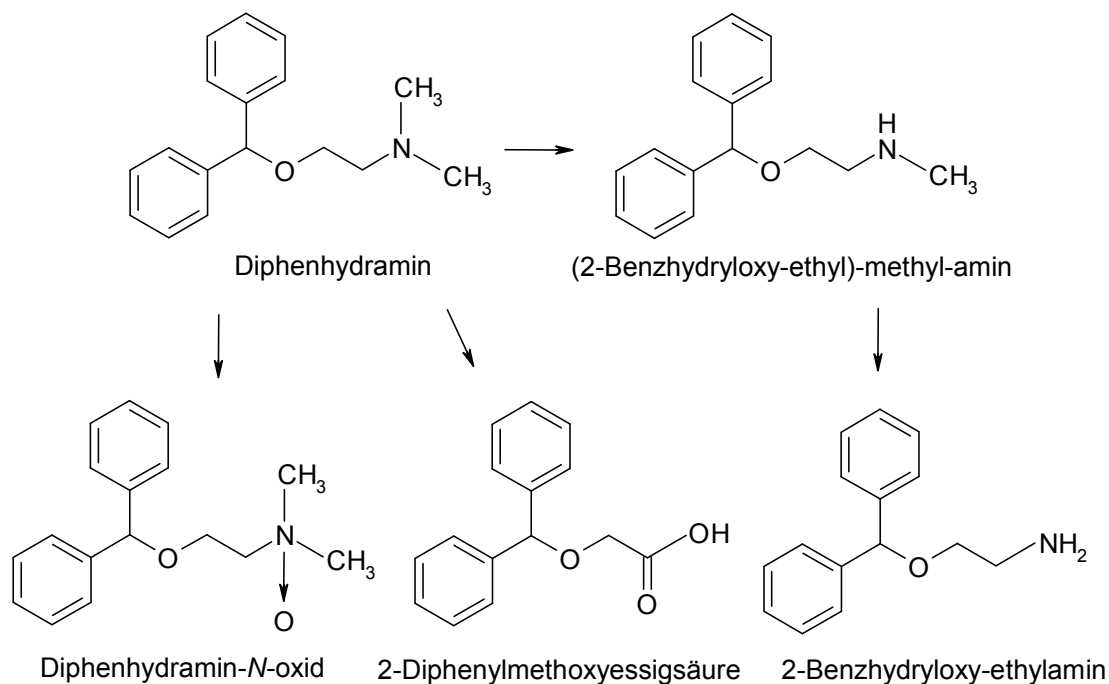
7.3 Diphenhydramin

7.3.1 Einleitung

Diphenhydramin* wurde neben Doxylaminsuccinat, das im Erkältungssaft Wick MediNait® enthalten ist, als weiteres Schlafmittel untersucht. Diphenhydramin unterscheidet sich strukturell von Doxylamin durch das Fehlen einer Methylgruppe und dem Pyridinring. Statt des Pyridinrings besitzt Diphenhydramin einen Benzolring. Die pK_a -Werte sind sehr ähnlich (Diphenhydramin $pK_a = 9,0$; Doxylamin = 9,3). Diphenhydramin wird heute zur Kurzzeitbehandlung bei Ein- und Durchschlafstörungen sowie bei Übelkeit und Erbrechen eingesetzt. Es gehört zu den H_1 -Antihistaminika der ersten Generation. Eine pharmakokinetische Studie von Albert et al.⁸¹ zeigte, dass über 50 % des Diphenhydramins von der Leber metabolisiert werden. Nach Gabe einer oralen Dosis von 100 mg waren die maximalen Plasmaspiegel nach 2 bis 4 Stunden erreicht. Die durchschnittlichen Plasmaspiegel nach der Verabreichung von 100 mg Diphenhydramin lagen zwischen 84 ± 30 und 160 ± 25 ng/ml und nach einer einmaligen p.o. Gabe von 50 mg zwischen 52 und 110 ng/ml⁸². Mehrfach orale Dosen von 50 mg viermal täglich über drei Tage führten zu einem maximalen Plasmaspiegel von 110 ng/ml am 2. Tag⁸³. Die wirksamen Plasmakonzentrationen von 25 ng/ml verursachen die antihistaminerge Wirkung und 30-40 ng/ml führen zur Schläfrigkeit. Das Diphenhydramin zeigt eine Plasmaproteinbindung von 78 ± 3 %⁸⁴.

Unter Bildung des primären und des sekundärenamins sowie des *N*-Oxids wird Diphenhydramin zu basischen Metaboliten abgebaut (Schema 7.3, S. 79). Nach Einnahme von 100 mg Diphenhydramin stiegen die Plasmaspiegel des primären und sekundärenamins auf insgesamt 143 ng/ml. Des Weiteren wird das verabreichte Diphenhydramin schnell der Blutzirkulation entzogen und im Gewebe zur Diphenylmethoxyessigsäure metabolisiert, die ins Blut zurück gelangt und dort fest an Proteine gebunden wird. Der saure Metabolit Diphenylmethoxyessigsäure erreichte eine Konzentration von 0,05 ng/ml bis 1 ng/ml im Plasma innerhalb von sieben Stunden⁸³. Chang et al.⁸⁵ identifizierten die Metabolite von Diphenhydramin im Urin und Plasma mit der GC/MS. In einer geringen Menge konnten unverändertes Diphenhydramin, das primäre Amin und in einer höheren Konzentration das sekundäre Amin identifiziert werden.

* Nach IUPAC: 2-Diphenylmethoxy-*N,N*-dimethylethylamin



Schema 7.3: Biotransformation von Diphenhydramin

7.3.2 Methodenentwicklung

Diphenhydramin war mit der Ausgangsmethode Phep.M (S. 172) in Konzentrationen bis 0,04 µg/ml nachweisbar und bis 0,15 µg/ml quantifizierbar. Speichelkonzentrationen im Bereich der maximalen Plasmaspiegel (81-159 ng/ml) waren mit der Methode Phep.M detektierbar. Abwandlungen bezüglich Injektionszeit und Injektionsspannung erbrachten keine weitere Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Als Alternative wurde die MEKC-Methode Parac3.M (S. 171) für Diphenhydramin angewendet, um eine direkte Speicheluntersuchung zu ermöglichen. Es war aber mit der Methode Parac3.M nicht möglich, die notwendige Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Diphenhydramin im Speichel zu erreichen, so dass nur die Methode Phep.M für die weiteren Analysen verwendet wurde.

7.3.3 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung wurde die allgemeine „Bond Elut Certify[®]“ Extraktion (S. 162) angewendet. Die Wiederfindung für Diphenhydramin betrug im Mittel 73,2 %. Die Elutionsstärke des Elutionsmittels könnte bei einem pH-Wert von 10 an der Grenze gelegen haben, da für eine Neutralisation des Analyten ($pK_a = 9,0$) der pH-Wert des Elutionsmittels zwei Einheiten über dem pK_a -Wert gewählt werden sollte.

Es wurden veränderte Elutionsmittel mit unterschiedlichen basischen Anteilen von Ammoniak getestet:

- a) Elution mit 2 % Ammoniak in Ethylacetat
- b) Elution mit 10 % Ammoniak in Ethylacetat
- c) Elution mit 15 % Ammoniak in Ethylacetat

Die Diphenhydramin-Speichelproben zeigten nach der Elution mit 10 und 15 % Ammoniak in Ethylacetat eine bläuliche Verfärbung. Verunreinigungen des Sorbens und des Elutionsmittels konnten ausgeschlossen werden. Die Verfärbung trat auch ohne Einsatz von Diphenhydramin auf, so dass das Sorbens der Kartusche eine Rolle spielen musste. Die Blaufärbung war umso stärker ausgeprägt, je konzentrierter der Ammoniak (10 bzw. 15 %) war. Durch den Zusatz von Phosphorsäure wurde diese verstärkt. Eine Vermutung war, dass die Benzensulfonsäure bei den höheren pH-Werten von der Kartusche hydrolysiert wurde. Da aromatische Sulfonsäuren häufig Zwischenprodukte von Farbstoffen sind, könnte in diesem Fall die Benzensulfonsäure zu einer farbigen Substanz weiter reagiert haben. Der Hersteller gibt auch für die Sorbentien der Kartuschen nur einen pH-Stabilitätsbereich von 2 bis 8 an. Die Praxis zeigte aber, dass bei den „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (SCX/C-8) ein pH-Wert von 10 eingesetzt werden konnte, da bei einer einmaligen Anwendung der Kieselgelträger nicht hydrolysierte. Da die Elutionskraft nicht wesentlich weiter erhöht werden konnte, wurde die allgemeine Extraktion für basische Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen (Seite 162) angewendet. Die Probe wurde stärker angesäuert als bei der „Bond Elut Certify[®]“ Extraktion, um sicher zu stellen, dass die basische Substanz protoniert vorlag und somit vollständig mit dem Sorbens wechselwirken konnte. Die Festphasenextraktionen über die „Strata X-C[®]“ Kartuschen ergaben die in der Tabelle 7.2 aufgeführten Wiederfindungen.

Konz. [µg/ml]	1. Messung [%]	2. Messung [%]	3. Messung [%]	Mittelwert [%]	Vk [%]
130	94,9	96,2	99,9	97,0	2,7
8	70,2	73,3	70,6	71,3	2,4
5	99,4	94,8	99,4	97,9	2,7

Tabelle 7.2: Wiederfindungen der dotierten negativen Speichelproben mit Diphenhydramin-konzentrationen 130, 8 und 5 µg/ml

Aus Kostengründen stand nur eine geringe Anzahl an „Strata X-C[®]“ Kartuschen zur Verfügung, so dass die „Bond Elut Certify[®]“ Extraktion mit den neuen Erkenntnissen aus der „Strata X-C[®]“ Extraktion abgewandelt wurde.

Die Probe wurde angesäuert und mit 5 % Ammoniak in Methanol von der Kartusche eluiert (Extraktion I über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen S. 163), mit dem Erfolg, dass Diphenhydramin mit einer Wiederfindung zwischen 81 bis 86 % nachzuweisen war.

7.3.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

Zur Untersuchung von Diphenhydramin und dessen Metaboliten im Speichel nahmen die Probanden Tabletten (zweimal 50 mg Diphenhydraminhydrochlorid) des apothekenpflichtigen Antiemetikums Emesan[®] ein. Die Speichelproben wurden nach festgelegten Zeitpunkten mit Salivetten[®] entnommen und nach der Festphasenextraktion I über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 163) mit der Methode Phep.M (S. 172) vermessen. Nach Überprüfung der Spezifität der Speicheluntersuchungen konnten die Diphenhydraminkonzentrationen der Probanden A, B und C (Tabelle 7.3) ermittelt werden.

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband A (männlich) Konzentration [µg/ml]	Proband B (weiblich) Konzentration [µg/ml]	Proband C (weiblich) Konzentration [µg/ml]
1	n.q.	n.n.	-
2	n.q.	0,35	n.n.
3	0,17	-	n.n.
4	0,16	0,54	0,36
4,5	0,36	0,59	0,52
5	0,27	0,27	-
6	0,23	n.n.	0,21
8	n.q.	n.n.	n.q.
10	n.q.	n.n.	n.n.

Tabelle 7.3: Diphenhydraminkonzentrationen im Speichel nach oraler Gabe von zweimal 50 mg (n = 2) (– = keine Probe entnommen; n.n. = nicht nachweisbar; n.q. = nicht quantifizierbar)

In Bild 7.4 sind die mittleren Speichelkonzentrationen der Probanden dargestellt.

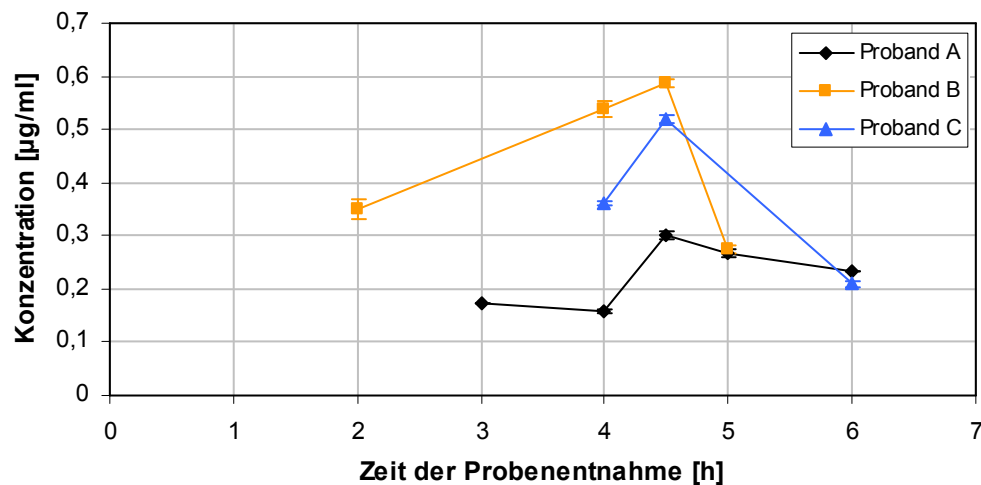


Bild 7.4: Zeitlicher Verlauf der Diphenhydraminkonzentrationen im Speichel; Extraktion I über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen; Methode: Phep.M (n = 2)

Die Probanden zeigten nach Einnahme von 100 mg Diphenhydramin nach 4,5 Stunden die maximalen Diphenhydraminkonzentrationen im Speichel. Beim Vergleich der von Albert et al.⁸¹ und Glazko et al.⁸³ ermittelten maximalen Plasmakonzentrationen zeigte sich, dass die maximalen Diphenhydraminkonzentrationen im Speichel (nach 4,5 Stunden) später erreicht wurden als im Plasma (nach 2 bis 4 Stunden). Die Kurvenverläufe der Diphenhydraminkonzentrationen im Speichel sind mit den von Glazko et al.⁸³ publizierten Diphenhydraminkonzentrationsverläufen im Plasma vergleichbar (ebenfalls nach oraler Verabreichung von 100 mg Diphenhydramin).

Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Zur Überprüfung der kapillarelektrophoretischen Ergebnisse wurden die Speichelproben mit der LC-ESI-MS bei positiver Ionisation vermessen. Die LC diente zur Abtrennung der Speichelmatrix vom Analyten Diphenhydramin. Als Säule wurde eine Waters Symmetrie Shield[®] RP-18 (50-4,9; 5 µm) verwendet. Das Fließmittel bestand aus Methanol und Wasser pH 2,5 (eingestellt mit Ameisensäure) im Verhältnis 50:50. Die Flussrate betrug 1 ml/min, und die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm. Diphenhydramin war nach einer Retentionszeit von 5,1 Minuten im Chromatogramm zu identifizieren. Die Konzentration von 0,1 µg/ml Diphenhydramin war deutlich nachweisbar. Die Analysen der Speichelproben bestätigten, dass Diphenhydramin in den untersuchten Proben vorhanden war. Metabolite wurden, wie bei den kapillarelektrophoretischen Messungen, nicht detektiert.

7.3.5 Diskussion

Diphenhydramin (pK_a -Wert 9,0) zeigte die Eigenschaft sich im Speichel (170-590 ng/ml) im Gegensatz zum Plasma (84-160 ng/ml⁸²) anzureichern. Da die Plasmakonzentrationen⁸³ des primären und sekundärenamins (143 ng/ml) und der Diphenylmethoxyessigsäure (0,05 ng/ml) sehr niedrig waren, lagen die Konzentrationen im Speichel unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Die Diphenylmethoxyessigsäure liegt bei pH-Werten zwischen sechs und acht deprotoniert vor und permeierte somit als hydrophiles Molekül schlecht durch die Lipidmembran der Speicheldrüsen. Zusätzlich wird die Diphenylmethoxyessigsäure fest an Proteine gebunden.

Die Methode Phep.M wies für Diphenhydramin, bei einer vorgegebenen Sicherheit von 99 %, eine Nachweisgrenze von 0,05 µg/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0,15 µg/ml auf.

Die Regressionsanalyse zeigte eine gute Korrelation der Messgrößen (Korrelationskoeffizient: 0,9994). Die Reststandardabweichung betrug 0,83 und die relative Verfahrensstandardabweichung lag bei 2,0 %.

Die Methode Phep.M zeichnet sich für den Arzneistoff Diphenhydramin durch eine niedrigere Nachweisgrenze (0,05 µg/ml) aus als die von Gomez et al.⁷⁸ (5,5 µg/ml) beschriebene kapillarelektrophoretische Methode. Ebenso wies die von Marchesini et al.⁷⁹ (4,5 µg/ml) veröffentlichte kapillarelektrophoretische Methode zum Nachweis von Diphenhydramin in Nasentropfen eine höhere Nachweisgrenze auf.

7.4 Doxylamin

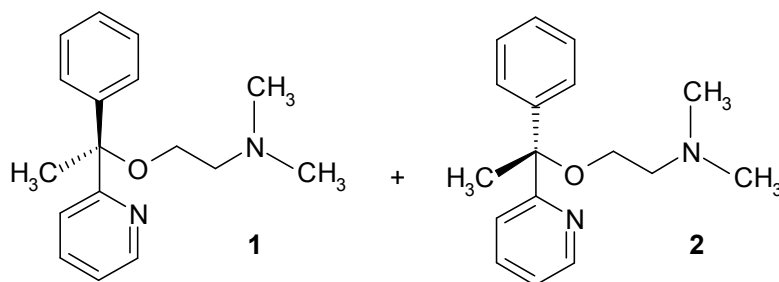


Bild 7.5: Strukturformeln des (*R*)-Doxylamins* (**1**) und des (*S*)-Doxylamins (**2**)

7.4.1 Einleitung

Als Antihistaminikum mit sedativ-hypnotischer Wirkung wird neben Diphenhydramin auch Doxylamin eingesetzt. Für die vorliegende Arbeit wurden Speichelproben nach oraler Gabe des Kombinationspräparates Wick MediNait[®] untersucht, welches u.a. 7,5 mg Doxylaminsuccinat als Racemat enthält. Die Ergebnisse der weiteren Arzneistoffe im Kombinationspräparat (Paracetamol, Ephedrin und Dextromethorphan) sind auf den Seiten 52, 90 und 99 aufgeführt. Nach einer oralen Gabe von 25 mg Doxylamin wurden maximal 99 ng/ml nach 2 Stunden im Serum gemessen¹⁸. Die Plasmaproteinbindung beträgt 71-84 %. Die Eliminationshalbwertszeit von Doxylamin liegt bei 10 Stunden. Der Arzneistoff besitzt keinen aktiven Metaboliten¹⁸. Ganes und Midha⁸⁶ identifizierten massenspektrometrisch die Metabolite *N*-Desmethyldoxylamin, *N,N*-Didesmethyldoxylamin und deren *N*-Acetyl-Konjugate im Urin.

7.4.2 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Nach Einnahme von 30 ml des apothekenpflichtigen Erkältungssafts Wick MediNait[®] mit 7,5 mg Doxylaminsuccinat wurden die entnommenen Speichelproben mit der ESI-MS bei positiver Ionisation mittels Direkteinlass analysiert. Bei keinem Probanden konnte Doxylamin und dessen Metaboliten im Speichel nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde bei der Festphasenextraktions- und kapillarelektrophoretischen Methodenentwicklung Doxylamin nicht weiter berücksichtigt.

* Nach IUPAC: *N,N*-Dimethyl-2-[(1*RS*)-1-phenyl-1-(pyridin-2-yl)-ethoxy]-ethanamin

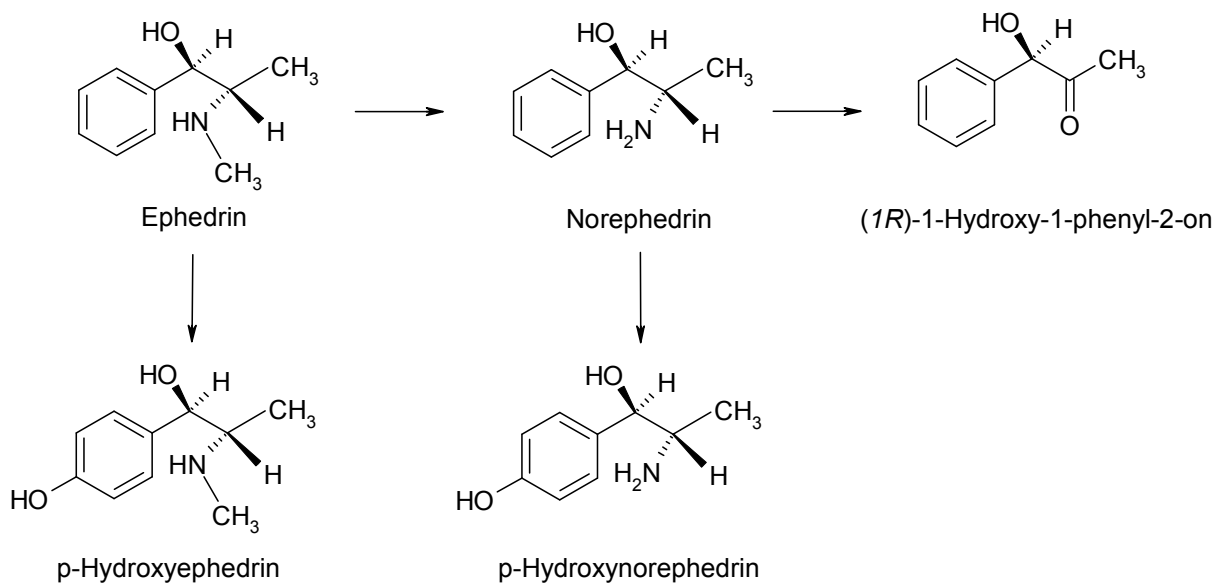
7.4.3 Diskussion

Da nach oraler Gabe von 25 mg nur maximal 99 ng/ml Doxylamin im Serum nachweisbar waren¹⁸, wurden nach oraler Einnahme von 7,5 mg Doxylaminsuccinat so geringe Plasmakonzentrationen erreicht, dass die Konzentrationen im Speichel deutlich unter der Nachweisgrenze der massenspektrometrischen Methode lagen.

7.5 Ephedrin

7.5.1 Einleitung

Ephedrin* ist das Hauptalkaloid verschiedener Ephedra-Arten. Es wird als indirektes Sympathomimetikum zur Nasenschleimhautabschwellung eingesetzt. Im Wick MediNait® Erkältungssaft liegt Ephedrin als (*1R,2S*)-Enantiomer vor. Das (*1S,2R*)-Enantiomer ist nicht in der Ph. Eur. 4.00⁸⁷ spezifiziert und wird deshalb nicht vom Hersteller eingesetzt. Nach Einnahme von 25 mg Ephedrin hat die vollständige Resorption nach 2,5 Stunden stattgefunden⁸⁸. Ephedrin wird in der Leber durch oxidative Desaminierung, Desmethylierung und aromatischer Hydroxylierung metabolisiert. Der Hauptmetabolit ist Norephedrin (Schema 7.4)⁸⁸⁻⁹¹. In der Phase II Metabolisierung treten Konjugate dieser Substanzen auf.



Schema 7.4: Biotransformation von (*1R,2S*)-Ephedrin

Zu 12 % kommt Ephedrin und zu 20 % Norephedrin im Plasma an Proteinen gebunden vor⁹². Im Speichel konnte nach der Verabreichung von 60 mg Ephedrin nach 4 Stunden nur

* Nach IUPAC: (*1R,2S*)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol

maximal 0,08 µg/ml Ephedrin mit der GC/MS ermittelt werden⁹³. Pickup und Paterson⁹⁴ fanden nach der Einnahme von 15 mg Ephedrinsulfat eine maximale Plasmakonzentration von 20 ng/ml Ephedrin. Aymard et al.⁹⁵ ermittelten eine maximale Plasmakonzentration nach einer Stunde von 170 ng/ml Ephedrin nach Applikation einer Kapsel mit 50 mg Ephedrinhydrochlorid. Nach der intravenösen Verabreichung von 20 mg/kg Körpergewicht Ephedrinhydrochlorid an Hunden wurden maximale Plasmaspiegel von 3 µg/ml an Norephedrin gefunden⁹².

7.5.2 Methodenentwicklung

Die allgemeine kapillarelektrophoretische Methode Phep.M (S. 172) für basische Substanzen wurde für die Identifizierung und Quantifizierung der Arzneistoffe Ephedrin und Dextromethorphan und deren Metaboliten (enthalten im Wick MediNait[®] Erkältungssaft) sowie für Pseudoephedrin (enthalten in Reactine[®] duo) optimiert. Die Methode Phep.M wurde bezüglich der Spannung, Temperatur, Präkonditionierung und Injektion verändert (Methode Pseu1.M:s. S. 173). Die Präkonditionierung mit 0,1 M Phosphorsäure konnte auf 0,5 Minuten gesenkt werden. Variationen der Präkonditionierung erbrachten keine weitere Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Die elektrokinetische Injektion erfolgte für 10 Sekunden, so dass Überladungseffekte minimiert wurden. Die Temperatur wurde von 20 °C auf 15 °C gesenkt, um eine Trennung von Ephedrin und dessen Metaboliten Norephedrin zu erreichen (Bild 7.6).

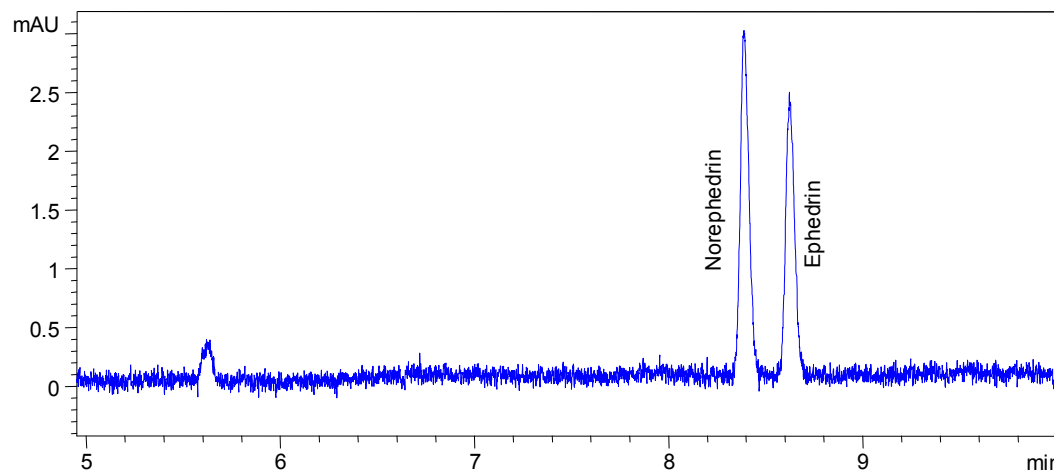


Bild 7.6: Norephedrin und Ephedrin (0,1 µg/ml) dotiert zur negativen Speichelprobe (unten); Methode Pseu1.M; Kapillare: 40/47 cm

Ephedrin und Dextromethorphan waren mit der Methode Pseu1.M ebenfalls zu trennen und in einer Konzentration von 0,05 µg/ml detektierbar (Bild 7.7, S.87).

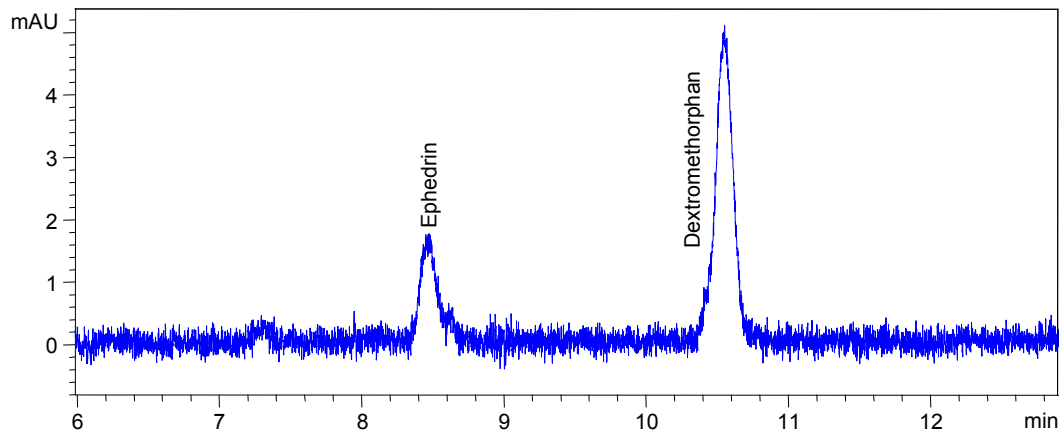


Bild 7.7: Identifizierung und Trennung von Ephedrin und Dextromethorphan in einer Konzentration von 0,05 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure

Zunächst traten bei den Analysen mit der Methode Pseu1.M größere Schwankungen bei den Peakflächen sowie geringe Abweichungen bei den Migrationszeiten auf. Um diese Schwankungen zu verringern, wurden folgende Maßnahmen getestet: Austausch der Elektroden-dichtungen, um Stromschwankungen zu verhindern, Reinigung der Levelsensor Kapillare, um ein exakt funktionierendes Replenishment sicherzustellen, Verwendung der hydrodynamischen statt elektrokinetischen Injektion, Abwandlungen der Präkonditionierung und der Austausch der Kapillare. Keine dieser Variationen führte zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Daraufhin wurde, abweichend von der Empfehlung des Herstellers Agilent[®], auf das Abschmelzen der Polyimidbeschichtung der Kapillarenden verzichtet. Dieser Schritt führte zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit. Vermutlich fanden an den abgeschmolzenen Enden ungleichmäßig in Erscheinung tretende Absorptions- und Desorptionsvorgänge statt. Zur weiteren Verkürzung der Analysenzeit von Norephedrin im Speichel wurde eine Kapillare von 30/37 cm Länge eingesetzt. Es ist die Methode Pseu1.M zu Grunde gelegt und nur eine Spannungsanpassung vorgenommen worden (Methode Eph.M^{*}; Parameter s. S. 173). Zusätzlich erwiesen sich die Extraktion und die kapillarelektrophoretischen Messmethoden des Amfepramons (Methode Amfe1.M und Amfe2.M, s. S. 175) zur Quantifizierung von Norephedrin im Speichel in einer Konzentration unter 0,1 µg/ml als geeignet.

* Methodenname ist eine Abkürzung für Ephedrin. Diese Methode wurde nur bei den Analysen des Arzneistoffes Ephedrin eingesetzt.

7.5.3 Probenvorbereitung

Um für die Substanzen Pseudoephedrin, Ephedrin, Dextromethorphan und deren Metaboliten eine optimale Aufbereitung mit einer Aufkonzentrierung aus dem Speichel zu erreichen, wurde die allgemeine Extraktion für basische Substanzen über „Strata X-C[®]“ (S. 162) Kartuschen variiert. Modifikationen wurden bei der Applikation und Elution durchgeführt:

a) Applikation

Die Speichelprobe wurde mit 1 Tropfen Phosphorsäure (85 %) angesäuert und mit 1 ml eines Gemisches von 5 % Ammoniak in Methanol eluiert.

b) Applikation

Die Probe wurde mit 1 Tropfen Phosphorsäure (85 %) angesäuert und mit 1 ml Methanol eluiert.

c) Applikation

Die Probe wurde nicht angesäuert und mit 1 ml eines Gemisches von 5 % Ammoniak in Methanol eluiert.

Es zeigte sich, dass die Probe nicht angesäuert und nicht mit Methanol eluiert werden durfte, um Substanzverluste zu minimieren („Strata X-C[®]“ Extraktion, S. 164). Die Festphasenextraktion für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) konnte ohne weitere Abwandlungen für die weiteren Analysen nach oraler Gabe von Wick MediNait[®] und Reactine[®] duo angewendet werden.

Um die Probenaufbereitung für Ephedrin bzw. Norephedrin weiter zu optimieren, wurden zusätzlich C-18 und „CBA[®]“-Kartuschen eingesetzt. Bei den „CBA[®]“-Kartuschen war zu beachten, dass die Anreicherung für Norephedrin am besten bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7,0 erreicht wird. Die Elution erfolgte im sauren Milieu (pH von 2), um das Sorbens zu neutralisieren.

Bei den C-18 Kartuschen wurde die Probe auf den pH-Wert 11 eingestellt, damit Ephedrin bzw. Norephedrin nicht protoniert vorlagen und über unpolare Kräfte des Sorbens retiniert wurden. Bei der sauren Elution kam es zur Protonierung des Analyten, um diesen vom Sorbens zu lösen.

Es wurden die Extraktionen I für die C-18 bzw. „CBA[®]“-Kartusche ohne Einengen der Proben nach der Elution (S. 164/165) durchgeführt. Im Eluat der Extraktion I mit „CBA[®]“-Kartuschen war Norephedrin in einer Konzentration von 0,2 µg/ml nachweisbar. Ein Teil des Norephedrins verblieb auf der Kartusche. Im Eluat der C-18 Kartuschen wurde keine Substanz detektiert. Die Ursache könnte sein, dass im basischen Bereich die OH-Gruppe deprotonierte und damit das chromophore System veränderte, so dass die Substanz keine Absorption mehr zeigte. Ein

anderer Grund könnte sein, dass bei den C-18 Kartuschen ebenfalls die Substanz auf der Kartusche verblieb und somit eine Säure mit höherer Elutionskraft notwendig war. Deshalb wurde der Einsatz von Salzsäure erwogen. Die kapillarelektrophoretischen Analysen zeigten aber, wie bei den Nicotinmessungen (S. 116), eine schlechtere Nachweisgrenze bei der Verwendung von Salzsäure. Es musste ein Elutionsmittel gefunden werden, in dem Norephedrin mit einer niedrigen Nachweisgrenze (0,2 µg/ml) direkt nach der Elution kapillarelektrophoretisch detektierbar ist. Mit dem Elutionsmittel 0,1 mM Phosphorsäure pH 2,0 war Norephedrin nach der Extraktion über C-18 bzw. „CBA[®]“-Kartuschen in einer Konzentration bis 0,4 µg/ml nachweisbar. Da dieses Elutionsmittel nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde als weitere Variante zur Elution 10 % Ameisensäure in Methanol verwendet, welches bei 350-500 mbar eingengt und in 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen wurde. Norephedrin war nur mit Verlusten im Eluat nachzuweisen.

Eine Alternative zum Einengen im Eppendorf Concentrator[®] war die Begasung des Eluats mit Stickstoff, welches ebenfalls zu keiner Verbesserung der Wiederfindung von Norephedrin führte. Da mit einem organischen Lösungsmittel keine Erhöhung der Wiederfindung erreicht wurde, ist 1 M Essigsäure für die Elution von der C-18 bzw. „CBA[®]“-Kartusche getestet worden. Norephedrin war in einer Konzentration von 0,2 µg/ml nachzuweisen.

Alle Variationen der Extraktion I über „CBA[®]“-Kartuschen (S. 164) führten zu keinem verbesserten Ergebnis. Zur Elution erwies sich die 1 M Essigsäure als Alternative für den 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,0.

Für die C-18 Kartuschen ist die Extraktion I (S. 165) mit dem Elutionsmittel 1 M Essigsäure einsetzbar.

Als weitere Modifikation wurde die „Focus[®]“-Kartusche*, mit der auf S. 165 beschriebenen Extraktion, eingesetzt. Mit dieser Kartusche wurde aber keine weitere Steigerung bei der Wiederfindung und Nachweisgrenze erzielt.

Neben dem Experimentieren mit anderen Kartuschensorbentien wurde eine andere Festphasenextraktion mit den „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen für Norephedrin verwendet, die ebenfalls Anwendung bei der Probenaufbereitung des Amfepramons (S. 168) fand. Norephedrin war nach dieser Extraktion ebenfalls in einer Konzentration von 0,2 µg/ml nachweisbar.

Bei den folgenden aufgeführten Ergebnissen der Speicheluntersuchungen wurde die allgemeine Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen angewendet, da die Extraktions-

* Das Sorbent der Kartusche ist ein multifunktionales Polymer (Polystyrol-Divinylbenzol) mit verschiedenen, gleichzeitig erfolgenden polaren und unpolaren Retentionsmechanismen.

variationen mit anderen Kartuschenmaterialien zu keiner Steigerung der Nachweisgrenze führten.

7.5.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

Männliche Probanden haben 30 ml des apothekenpflichtigen Erkältungsarfs Wick MediNait[®] eingenommen, der in 30 ml 6,2 mg Ephedrin, 7,5 mg Doxylaminsuccinat, 15 mg Dextromethorphanhydrobromid und 600 mg Paracetamol enthält. Die Speichelproben wurden nach 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 und 300 Minuten mit Salivetten[®] entnommen. Ephedrin ist zurzeit nur in diesem apothekenpflichtigen Kombinationspräparat im Handel erhältlich.

Zur Identifizierung der Peaks im Elektropherogramm wurden Ephedrin und Norephedrin in einer Konzentration von jeweils 0,1 µg/ml den Speichelproben zudotiert. Im Bild 7.8 soll dies für die weiteren Speichelproben einmal dargestellt werden. Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Speichelmatrix zuzuordnen.

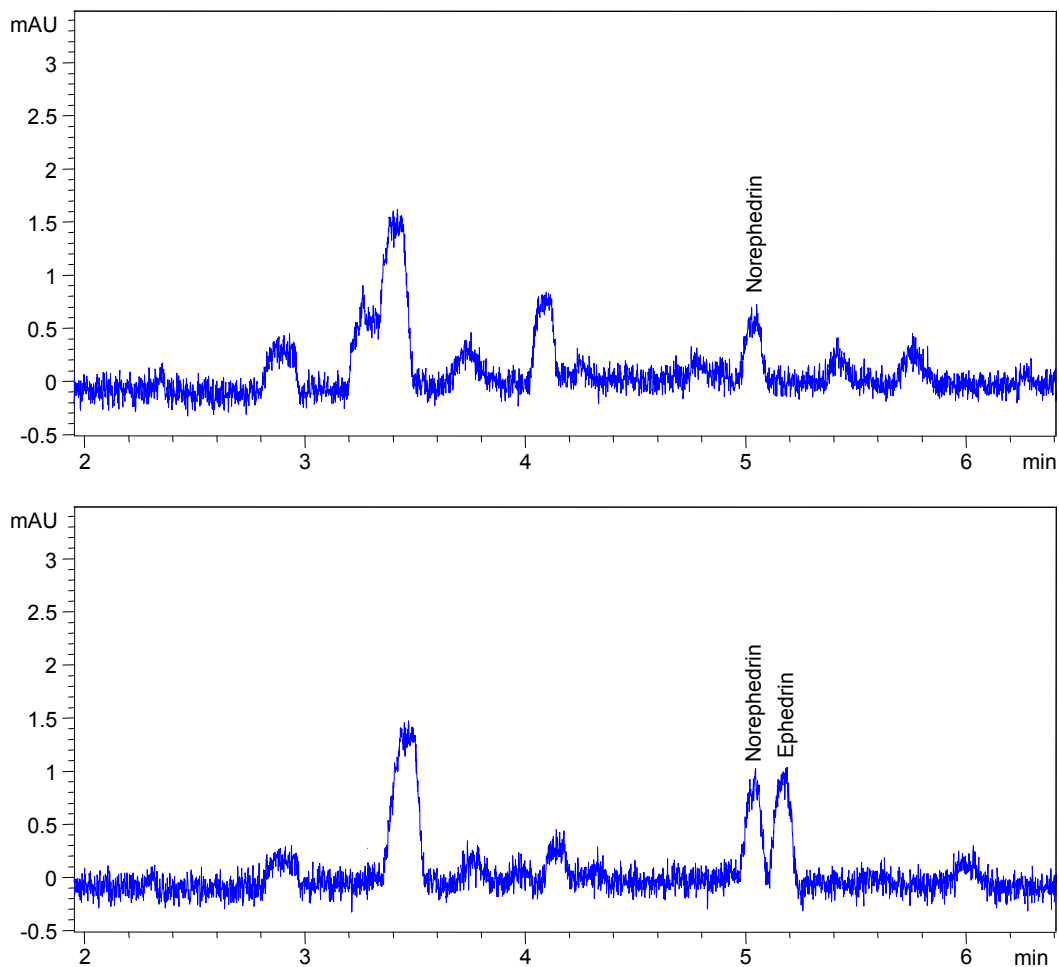


Bild 7.8: oberes Elektropherogramm: 30 min Speichelprobe; unteres Elektropherogramm: mit Norephedrin und Ephedrin (0,1 µg/ml) dotierte 30 min Speichelprobe; Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen; Methode: Eph.M

Die Quantifizierung des Norephedrins nach der „Bond Elut Certify[®]“ Extraktion und Analyse mit der 30/37 cm Kapillare und der 40/47 cm Kapillare erfolgte mit den unkorrigierten Flächen, da keine unterschiedlichen Flächenwerte in Abhängigkeit von der Migrationszeit für den Analyten festzustellen waren. In Tabelle 7.4 sind die mittleren Norephedrinkonzentrationen (n = 3) der Probanden A und B nach oraler Gabe von 30 ml Wick MediNait[®] aufgeführt.

Zeit der Probenentnahme [min]	Proband A Konzentration [µg/ml] 30/37 cm	Proband A Konzentration [µg/ml] 40/47 cm	Proband B Konzentration [µg/ml] 40/47 cm
30	0,47	0,51	2,28
60	0,67	0,61	1,00
90	0,34	0,30	0,80
120	0,51	0,32	1,35
150	0,40	0,42	-
180	-	-	0,73
240	0,25	0,32	0,61
300	-	0,20	-

Tabelle 7.4: Ermittelte Norephedrinkonzentrationen im Speichel (n = 3) (- = keine Probe entnommen)

In Bild 7.9 ist eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen des Metaboliten Norephedrin im Speichel der Probanden A und B dargestellt.

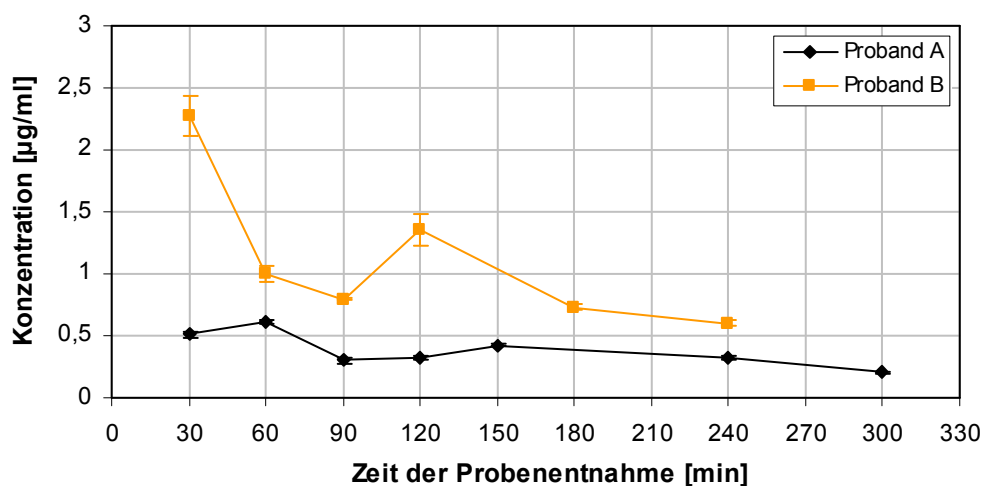


Bild 7.9: Zeitlicher Verlauf der Norephedrinkonzentrationen; Festphasenextraktion über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen; Kapillare 40/47 cm (n = 3)

Der Metabolit Norephedrin war nach Einnahme von 30 ml Wick MediNait[®] Erkältungssaft bei den Probanden A und B in den Speichelproben nachweisbar. Es zeigten sich interindi-

viduelle Schwankungen der Konzentrationen im Speichel. Nach 30 Minuten hatte der Proband B ein wesentlich höheres Maximum erreicht als der Proband A und zeigte insgesamt höhere Konzentrationen im Speichel. Der Proband B wies einen niedrigeren Speichel pH-Wert (6,0) auf als der Proband A (Speichel pH-Wert 7,0), so dass Norephedrin ($pK_a = 9,5$) in einem größeren Ausmaß im Speichel ionisiert vorlag und sich somit anreicherte.

Da keine Publikation zur Verfügung stand, die den Verlauf der Norephedrinkonzentration im Plasma beschrieb, konnte kein Vergleich zwischen den Speichel- und Plasmakonzentrationen vorgenommen werden.

Beim Probanden C konnte nach der „Strata X-C[®]“ Extraktion I für basische Substanzen und der kapillarelektrophoretischen Analyse mit der Methode Pseu1.M nur Ephedrin nachgewiesen werden. In der 60 Minuten Speichelprobe wurden 0,18 $\mu\text{g/ml}$ und in der 90 Minuten Probe 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Ephedrin detektiert. In den Speichelproben, die nach 30, 120, 240, 300 und 360 Minuten entnommen wurden, war Ephedrin qualitativ nachweisbar, aber nicht quantifizierbar, da die Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze der Methode lagen. Beim Vergleich der von Aymard et al.⁹⁵ ermittelten Plasmakonzentrationen zeigte sich, dass die maximale Ephedrinkonzentration ebenfalls nach einer Stunde erreicht wurde.

Die massenspektrometrischen Analysen des Probanden C wiesen nur sehr geringe Konzentrationen von Norephedrin im Speichel nach. Es ist anzunehmen, dass der Proband C Ephedrin nur zu einem geringen Anteil zu Norephedrin metabolisierte. Diese Konzentrationen lagen unter der Nachweisgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode.

Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Bei den massenspektrometrischen Analysen wurde der Speichel mittels Direkteinlass bei positiver Ionisation mit der ESI-MS auf die Massen von $m/z = 166,1$ für Ephedrin und $m/z = 160,1$ für Norephedrin untersucht. Ephedrin und Norephedrin waren in Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,05 $\mu\text{g/ml}$, zudosiert zu einer Speichelprobe, gut nachweisbar. Norephedrin konnte in den Speichelproben des Probanden A und B nachgewiesen werden. Ephedrin wurde nur beim Probanden C in den Speichelproben gefunden. Zusätzlich wurden beim Probanden C Spuren des Norephedrins mit der Massenspektrometrie analysiert.

7.5.5 Analytische Daten

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Validierungen für die Analysen mit der 30/37 cm (Methode: Eph.M) und 40/47 cm (Methode: Pseu1.M) langen Kapillare aufgeführt. Im experimentellen Teil sind die Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen der Methoden Eph.M und Pseu1.M (S. 209) aufgelistet.

Bei der Überprüfung der Selektivität wies keine der sechs untersuchten negativen Speichelproben in dem Bereich des Ephedrins und Norephedrins Signale der Matrix auf. Als Beleg sind im Bild 7.10 für die 40/47 cm Kapillare und im Bild 7.11 (S. 94) für die 30/37 cm Kapillare Elektropherogramme einer undotierten und dotierten negativen Speichelprobe abgebildet.

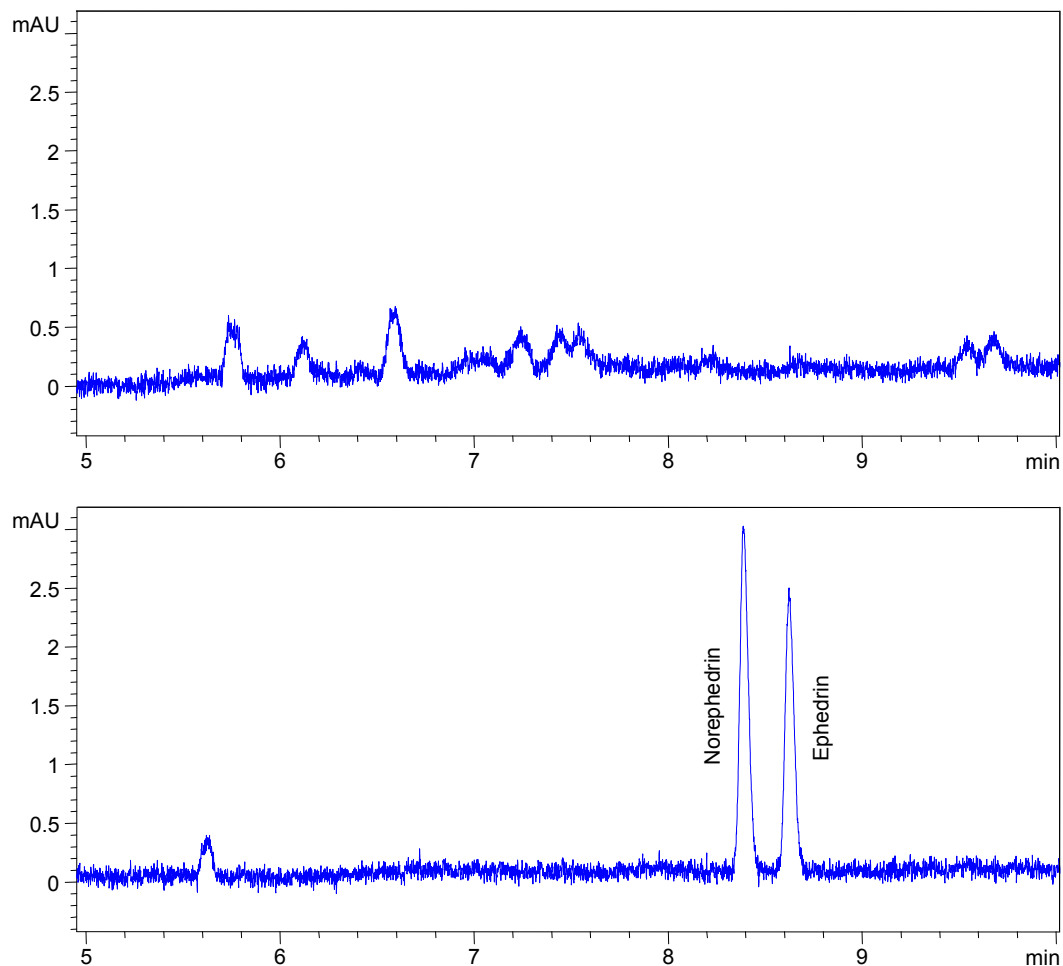


Bild 7.10: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Norephedrin und Ephedrin (0,1 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode Pseu1.M; Kapillare: 40/47 cm

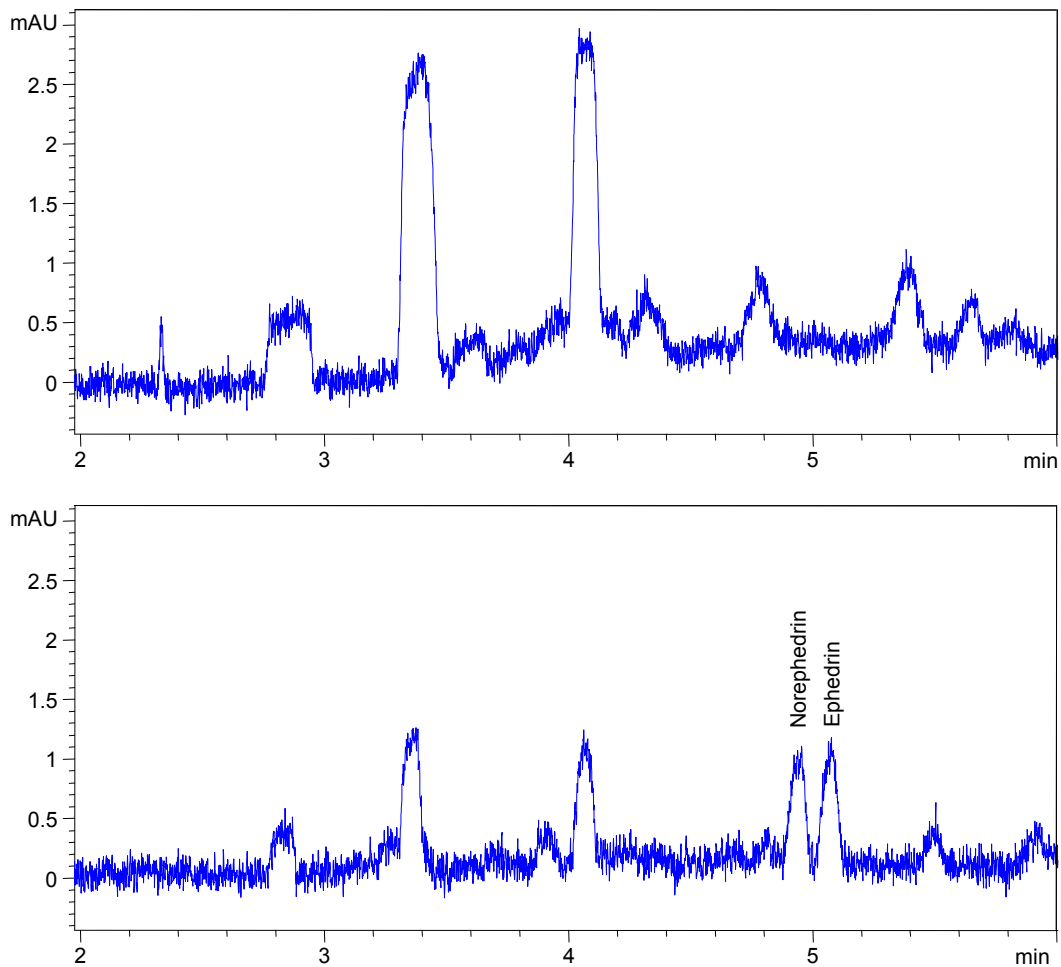


Bild 7.11: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Norephedrin und Ephedrin (0,05 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode Eph.M; Kapillare: 30/37 cm

Die Bestimmungen der Linearität für Norephedrin zeigten eine gute Korrelation der Messgrößen [Korrelationskoeffizienten: 0,9997 (Pseu1.M); 0,9981 (Eph.M)]. Die Regressionsanalyse für Ephedrin (Methde: Pseu1.M) ergab eine lineare Funktion mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9995. Es ergaben sich niedrige Reststandardabweichungen von 0,13 (Pseu1.M) und 0,08 (Eph.M) für Norephedrin und 0,78 (Pseu1.M) für Ephedrin. Es traten geringe Streuungen der Messwerte um die Regressionsgeraden auf.

Die Analysen von Norephedrin zeigten mit der Methode Pseu1.M eine höhere Empfindlichkeit (Steigung: $6,23 \pm 0,07$) als mit der Methode Eph.M (Steigung: $4,26 \pm 0,13$) sowie eine geringere relative Verfahrensstandardabweichung (Pseu1.M: 2,15 %; Eph.M: 3,45 %).

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung von Norephedrin eine Normalverteilung. Der F- und t-Test zeigten, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festzustellen waren.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmungen zeigten für die Flächen und Migrationszeiten relative Standardabweichungen unter 2,0 % bzw. 1,1 % für die Methode Pseu1.M und 2,9 % bzw. 1,6 % für die Methode Eph.M.

Die Methode Pseu1.M lieferte für alle Parameter bis auf die Wiederfindung bessere Ergebnisse. Zwischen den Methoden Eph.M und Pseu1.M waren deutliche Unterschiede für die Wiederfindungen festzustellen:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,4	94,23	2,89	3,06
0,6	91,70	3,60	3,93
0,8	93,08	4,28	4,60

Tabelle 7.5: Wiederfindung des Norephedrins (Methode Eph.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,4	75,16	3,11	4,14
0,6	78,58	4,42	5,62
0,8	71,21	4,00	5,62

Tabelle 7.6: Wiederfindung des Norephedrins (Methode Pseu1.M)

Die kürzere Kapillare wies eine wesentlich bessere Wiederfindung mit geringeren Schwankungen für alle Konzentrationen auf als die längere Kapillare. Es zeigte sich, dass für die Wiederfindung auch das Alter der Kapillare entscheidend war. Bei der längeren Kapillare wurde die zu untersuchende Substanz stärker durch Adsorptionen an der Kapillarinnenwand der Detektion entzogen, da diese schon für eine größere Anzahl an Analysen eingesetzt wurde. Der Einfluss der Speichelmatrix war bei der Bestimmung der Wiederfindung stärker ausgeprägt als bei den Analysen, die zu einem früheren Zeitpunkt untersucht wurden. Diese zeigten keine großen Abweichungen bei den Messungen mit der 30/37 cm bzw. 40/47 cm Kapillare. Die entnommenen Speichelproben wurden mit einer neuen Kapillare analysiert und die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte als letzter Schritt nach den Analysen der Speichelproben und den übrigen Validierungsparameter. Beim Vergleich der Wiederfindung des Norpseudoephedrins (S. 109) ergaben sich bei den Analysen mit einer neueren 40/47 cm Kapillare deutlich bessere Ergebnisse. Diese Resultate zeigten, dass es für die Speichel-

analysen empfehlenswert ist regelmäßig die Kapillare zu erneuern (ca. nach 150-200 Analysen).

Die Bestimmung der Richtigkeit zeigte, dass die von der FDA-Richtlinie vorgegebene maximal erlaubte Abweichung von 15 % für beide Methoden unterschritten wurde:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Richtigkeit [%] Eph.M	Mittelwerte der Richtigkeit [%] Pseu1.M
0,4	11,99	-4,01
0,6	6,21	6,00
0,8	8,71	9,09

Tabelle 7.7: Ergebnisse der Richtigkeit für die „Interday“ Bestimmung mit den Methoden Eph.M und Pseu1.M

Es ist anzunehmen, dass die Abweichungen der Richtigkeit aus der Probenvorbereitung und durch Adsorptionserscheinungen an der Kapillarinnenwand resultierten.

Mit den Methoden Eph.M und Pseu1.M wurden die notwendigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei einer vorgegebenen Sicherheit von 99 % für die Analysen von Norephedrin im Speichel erreicht:

Eph.M:

Nachweisgrenze: 0,09 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,24 µg/ml

Pseu1.M:

Nachweisgrenze: 0,05 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,17 µg/ml

Für Ephedrin wurde mit der Methode Pseu1.M eine Nachweisgrenze von 0,04 µg/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0,14 µg/ml ermittelt.

7.5.6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit war bei den Speicheluntersuchungen der aktive Metabolit (*1R,2S*)-Norephedrin (pK_a -Wert 9,5) nachzuweisen. In den untersuchten Proben wurde Ephedrin (pK_a -Wert 9,6) nur bei einem Probanden im Speichel gefunden. Es ist anzunehmen, dass die Ephedrinkonzentrationen im Speichel nach Einnahme von 6,2 mg bei den übrigen Probanden unter der Nachweisgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode lagen.

Ephedrin und Norephedrin sind mit einem Anteil von 12 % bzw. 20 % an Proteine gebunden⁹², so dass in diesem Fall eine geringere Beeinflussung als bei Diphenhydramin (78 %) oder Phenylephrin (über 90 %) durch die Proteinbindung bei der Anreicherung im Speichel bestand.

Die kapillarelektrophoretischen Methoden (Pseu1.M, Eph.M) zur Untersuchung von Norephedrin im Speichel wiesen Nachweisgrenzen von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,09 $\mu\text{g/ml}$ auf bzw. 0,04 $\mu\text{g/ml}$ für Ephedrin mit der Methode Pseu1.M. Die von Chicharro et al.⁹¹ beschriebene Methode zur kapillarelektrophoretischen Trennung und Quantifizierung von Ephedrin und Norephedrin im Urin zeigte höhere Nachweisgrenzen (0,8 und 0,7 $\mu\text{g/ml}$), eine niedrigere Reproduzierbarkeit (4,5 %) und längere Analysenzeiten. Beim Vergleich der entwickelten kapillarelektrophoretischen Methoden mit der GC-Methode von Pickup und Paterson⁹⁴ zur Untersuchung von Ephedrin im Plasma (Nachweisgrenze: 0,01 $\mu\text{g/ml}$) wird die ungünstigere Konzentrationsempfindlichkeit der Kapillarelektrophorese durch den verkürzten Strahlengang erkennbar. Aymard et al.⁹⁵ konnten unter Einsatz einer HPLC-Methode mit einem Fluoreszenzdetektor Ephedrin und Norephedrin im Serum mit Nachweisgrenzen von 2 ng/ml bzw. 5 ng/ml nachweisen. Diese HPLC-Methode wies aber eine längere Retentionszeit (Ephedrin: 13,6 min; Norephedrin: 11,0 min) auf als die CE-Methoden in dieser Arbeit (Ephedrin: 8,8 min; Norephedrin: 5,5/8,6 min).

7.6 Dextromethorphan

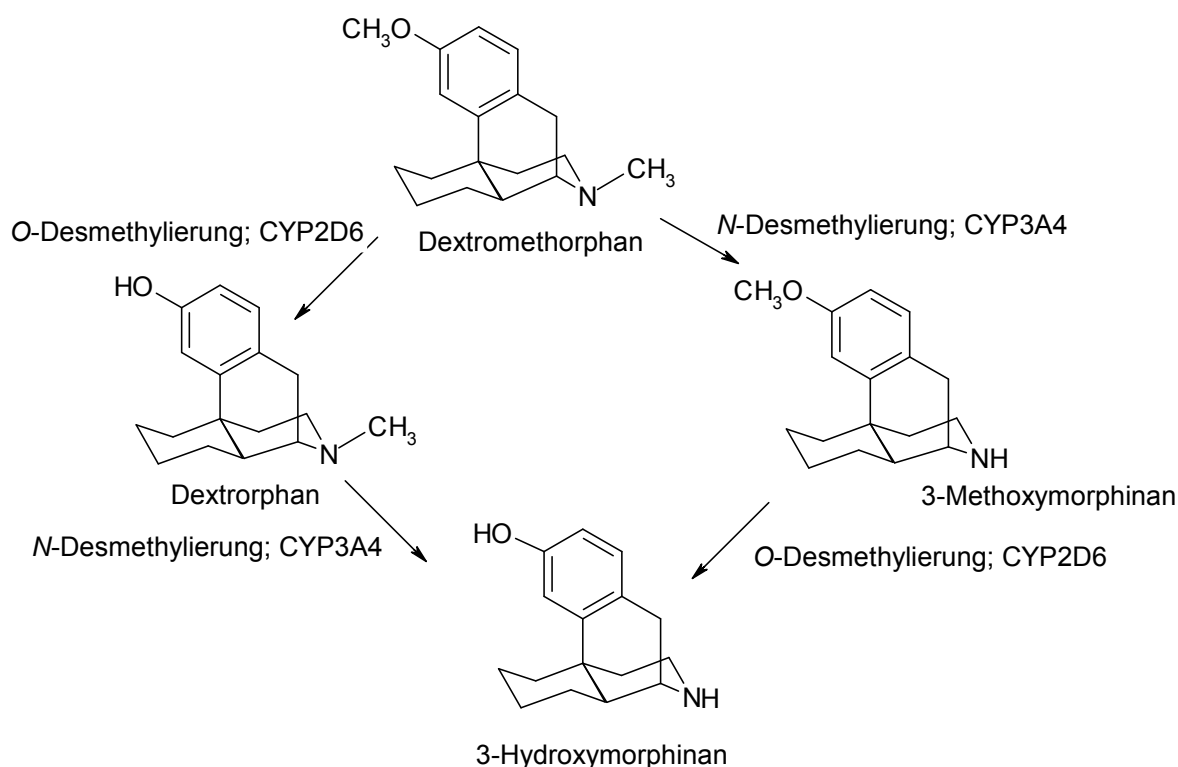
7.6.1 Einleitung

Dextromethorphan* ist ein synthetisches Analogon von Codein und wirkt als Antitussivum bei Reizhusten. Es ist in dem Erkältungssaft Wick MediNait® (15 mg Dextromethorphanhydrobromid) als *R*-Enantiomer enthalten, das weder *in vitro* noch *in vivo* eine Inversion zum *S*-Enantiomer zeigt. Dextromethorphan unterliegt einem erheblichen First-Pass-Effekt durch Cytochrom P450 2D6 bzw. 3A4. Nach einer Einnahme von 60 mg wurde eine maximale Plasmakonzentration von nur 12 ± 13 ng/ml Dextromethorphan gefunden. Bei Patienten, die 120 mg Dextromethorphan für 1 Woche einnahmen, wurde 12 Stunden nach der letzten Einnahme 5 bis 40 ng/ml ermittelt⁹⁶. In den Studien von Zhang et al.⁹⁶ konnte gezeigt werden, dass die niedrigen Plasmakonzentrationen auf den First-Pass-Effekt zurückzuführen sind.

Dextromethorphan wird durch *O*-Desmethylierung zu Dextrorphan, durch *N*-Desmethylierung zu 3-Methoxymorphinan und durch *N,O*-Desmethylierung zu 3-Hydroxymorphinan metabolisiert (Schema 7.5, S. 99)⁹⁷. Kristensen⁹⁸ entwickelte eine kapillarelektrophoretische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten des Dextromethorphans im Plasma mit vorheriger flüssig/flüssig Extraktion. Es wurden die Plasmaspiegel der Metaboliten nach der Applikation eines Pflasters und einer Tablette von einem langsamen und einem schnellen Metabolisierer bestimmt. Die gefundenen maximalen Plasmakonzentrationen nach Einnahme einer Tablette[†] mit Dextromethorphan waren beim schnellen Metabolisierer für Dextrorphan 290 ng/ml, für 3-Hydroxymorphinan 110 ng/ml und für 3-Methoxymorphinan 10 ng/ml. Der langsame Metabolisierer wies maximale Plasmakonzentrationen für Dextrorphan von 13,5 ng/ml, für 3-Hydroxymorphinan von 12 ng/ml und 3-Methoxymorphinan von 9,5 ng/ml auf.

* Nach IUPAC: (+)-3-Methoxy-17-methylmorphinan

† In der Publikation waren keine Angaben zur Dosierung aufgeführt.



Schema 7.5: Biotransformation von Dextromethorphan

7.6.2 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Nach der Einnahme von 30 ml des Erkältungssafts Wick MediNait[®] mit 15 mg Dextromethorphanhydrobromid konnte in den entnommenen Speichelproben der zwei männlichen Probanden nach der allgemeinen Festphasenextraktion über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) und anschließender Analyse mit der kapillarelektrophoretischen Methode Pseu1.M kein Dextromethorphan und dessen Metaboliten im Speichel nachgewiesen werden. Die massenspektrometrischen Analysen mit positiver Ionisierung an der ESI-MS mittels Direkteinlass ließen keinen Unterschied zu den negativen Speichelproben erkennen.

7.6.3 Diskussion

Nach Einnahme von 60 mg Dextromethorphanhydrobromid wurde eine maximale Plasmakonzentration von nur 12 ± 13 ng/ml gefunden, die auf einen erheblichen First-Pass-Effekt zurückzuführen war⁹⁶. Kristensen⁹⁸ wies für die Metabolisierung des Dextromethorphans im Plasma eine Abhängigkeit vom Metabolisierungstyp nach. Bei einem schnellen Metabolisierer wiesen sowohl 3-Hydroxymorphinan als auch Dextrorphan ca. zehnmals höhere Konzentrationen auf als bei einem langsamen Metabolisierer. Die Konzentrationen von 3-Methoxymorphinan waren dagegen unverändert.

Bei Metabolitkonzentrationen in der Größenordnung von 100-250 ng/ml bei einem schnellen Metabolisierer und 10 ng/ml bei einem langsamen Metabolisierer und einer Nachweisgrenze der Methode Pseu1.M von 240 ng/ml (bestimmt für Dextromethorphan) wird deutlich, dass ein Nachweis von Dextromethorphanmetaboliten mit der Methode Pseu1.M nur bei optimalen Bedingungen und einem schnellen Metabolisierer möglich gewesen wäre.

Die niedrigen Nachweisgrenzen (0,5-1 ng/ml) der kapillarelektrophoretischen Methode von Kristensen⁹⁸ zur Quantifizierung von Dextromethorphan und dessen Metaboliten im Plasma sind auf den Einsatz einer blasenförmig aufgeweiteten Kapillare (bubble-Zelle) zurückzuführen. Dadurch wurde eine Vergrößerung der Schichtdicke auf 1,2 mm erreicht.

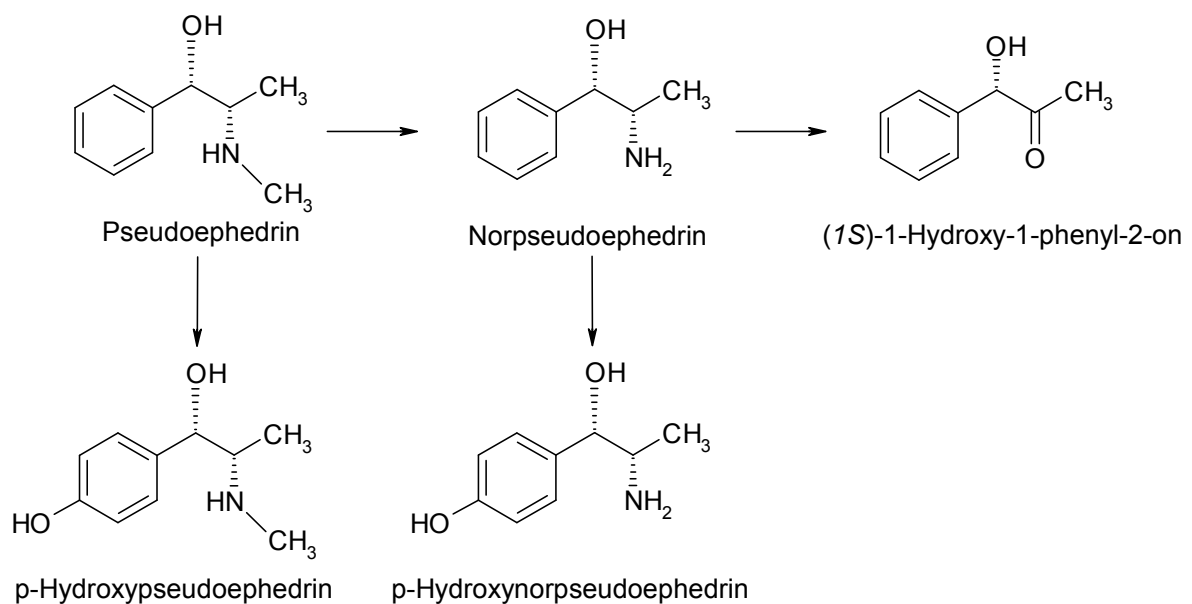
Beim Vergleich der Nachweisgrenze (0,24 µg/ml) der Methode Pseu1.M für Dextromethorphan mit der kapillarelektrophoretischen Methode zur Quantifizierung von Pseudoephedrin (1,94 µg/ml), Diphenhydramin (0,66 µg/ml), Dextromethorphan (0,98 µg/ml) und Chlorpheniramin (1,19 µg/ml) in Erkältungsarzneimitteln von Dong et al.⁹⁹ zeigte sich, dass die Methode Pseu1.M eine niedrigere Nachweisgrenze aufwies.

Die Nachweisgrenze der Methode Phep.M für Diphenhydramin zeichnet sich ebenfalls durch eine niedrigere Grenze (0,05 µg/ml) aus als die Methode von Dong et al.⁹⁹ zur Untersuchung von Erkältungsarzneimitteln (Nachweisgrenze: 0,66 µg/ml).

7.7 Pseudoephedrin und Cetirizin

7.7.1 Einleitung

Pseudoephedrin* ist ein Vasokonstriktor und Sympathomimetikum. Es stellt ein Diastereomer des Ephedrins dar. Kommerziell wird das (1*S*,2*S*)-(+)-Pseudoephedrin eingesetzt, welches in der Ph. Eur. 4.00⁸⁷ in einer Monographie spezifiziert ist. Pseudoephedrin wird nach oraler Gabe vollständig vom Gastrointestinaltrakt resorbiert⁷⁵ und unterliegt einem unvollständigen hepatischen Metabolismus durch *N*-Desmethylierung, oxidativer Desaminierung und aromatischer Hydroxylierung (Schema 7.6). Der Hauptmetabolit ist Norpseudoephedrin. In der Phase II Metabolisierung treten Konjugate der Metaboliten auf¹⁰⁰.



Schema 7.6: Biotransformation von (1*S*,2*S*)-(+)-Pseudoephedrin

Innerhalb von 24 Stunden werden 43 bis 75 % des Pseudoephedrins unverändert renal über den Urin ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 4,3 bis 8 Stunden nach einer einzelnen oralen Dosis. Nach Gabe einer retardierten Tablette (120 mg Pseudoephedrinhydrochlorid) wurden nach 3 bis 5 Stunden maximale Plasmaspiegel von 273 ng/ml Pseudoephedrin erreicht¹⁰¹.

* Nach IUPAC: (1*S*,2*S*)-(+)-2-Methylamino-1-phenyl-1-propanol

Cetirizin* ist ein Antihistaminikum der zweiten Generation ohne sedierende Nebenwirkungen, das als Racemat kommerziell eingesetzt wird.

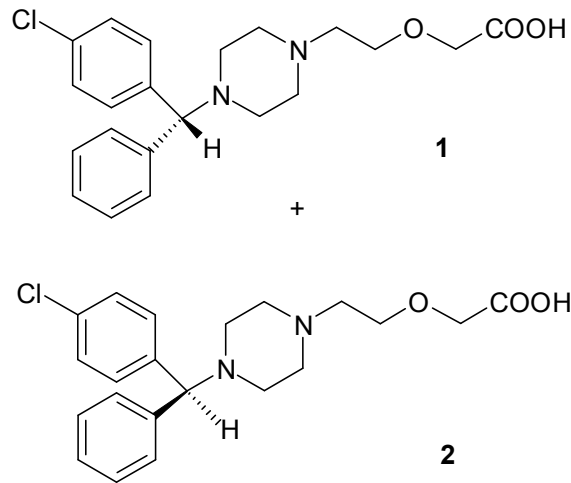


Bild 7.12: Strukturformeln des (*R*)-Cetirizins (**1**) und (*S*)-Cetirizins (**2**)

Cetirizin wird nach oraler Gabe schnell und nahezu vollständig resorbiert sowie zu 93 % an Plasmaproteine gebunden^{102, 103}. Nach oraler Gabe einer retardierten Tablette Reactine[®] duo mit 5 mg Cetirizindihydrochlorid (und 120 mg Pseudoephedrinhydrochlorid) wurden im Plasma nach einer Stunde maximal 141 ng/ml Cetirizin nachgewiesen¹⁰¹. Nach Einnahme von 10 mg Cetirizin wurden maximale Plasmaspiegel von 257 ng/ml nach 40-60 Minuten erreicht¹⁰⁴. Petersen et al.¹⁰⁵ fanden nach oraler Applikation von 10 bzw. 20 mg Cetirizin eine nicht proteingebundene Konzentration von nur 15 ng/ml bzw. 35 ng/ml im Plasma.

Die Plasmahalbwertszeit liegt bei ungefähr neun Stunden. Die Ausscheidung des Cetirizins erfolgt zu 60 % über die Nieren, hauptsächlich in unveränderter Form¹⁰⁴. Cetirizin unterliegt keinem nennenswerten First-Pass-Metabolismus. Ein geringer Anteil wird oxidativ durch *O*-Desalkylierung zu einem inaktiven Metaboliten metabolisiert und erscheint im Plasma nach 10 Stunden^{102, 106}. In dem Artikel von Benedetti et al.¹⁰³ wurde ausführlich der metabolische Abbau von Cetirizin beschrieben.

Für die Speicheluntersuchungen nahmen die Probanden Reactine[®] duo Tabletten (120 mg Pseudoephedrinhydrochlorid und 5 mg Cetirizindihydrochlorid) ein. Die Untersuchungen des Kombinationspräparates Reactine[®] duo beschränkten sich auf den Arzneistoff Pseudoephedrin, da aufgrund dem hohen Proteinbindungsanteil und der daraus resultierenden niedrigen nicht proteingebundenen Plasmakonzentration des Cetirizins nicht zu erwarten war, dass Cetirizin im Speichel nachzuweisen ist.

* Nach IUPAC: (*RS*)-2-[2-[4-[(4-Chlorphenyl)-phenylmethyl]-piperazin-1-yl]-ethoxy]-essigsäure

Hinzukommt, dass Cetirizin keinem nennenswerten First-Pass-Metabolismus unterliegt und somit nur ein geringer Anteil durch oxidative *O*-Desalkylierung zu einem inaktiven Metaboliten umgesetzt wird. Der Arzneistoff wurde deshalb aus den genannten Gründen in dieser Arbeit bei der Methodenentwicklung nicht weiter berücksichtigt.

7.7.2 Methodenentwicklung

Die entwickelte Methode Pseu1.M (S. 173) wies eine Trennung von Pseudoephedrin und dessen Metaboliten Norpseudoephedrin auf. Der Metabolit Norpseudoephedrin war mit dieser Methode im Speichel bis zu einer Konzentration von 0,03 µg/ml nachweisbar, so dass diese Methode Pseu1.M für die kapillarelektrophoretischen Speicheluntersuchungen nach Einnahme von Pseudoephedrinhydrochlorid verwendet wurde.

Neben den Speichelanalysen wurden Urinuntersuchungen nach Einnahme von Pseudoephedrinhydrochlorid durchgeführt. Dazu wurde die Methode Pseu1.M bezüglich der Präkonditionierung und Injektion variiert. Die Zeit für die Präkonditionierung mit 0,1 M Phosphorsäure wurde verlängert, um die Desorptionen der stärker matrixbelasteten Probe von der Kapillareninnenwand zu erhöhen. Statt einer elektrokinetischen Injektion wurde die hydrodynamische Injektion eingesetzt. Die hydrodynamische Injektion zeigte bei der mit Matrix belasteten Urinprobe eine niedrigere Nachweisgrenze als die elektrokinetische Injektion. Es wurden bei der elektrokinetischen Injektion weniger Analytionen injiziert, da durch die erhöhte Leitfähigkeit der Probe auch andere Ionen am Ladungstransport beteiligt waren, so dass nur wenige Analytionen in die Kapillare migrierten. Für die Analysen der Urinproben wurde die Methode PseuU.M (S. 173) angewendet.

7.7.3 Probenvorbereitung

Für den im Speichel nachgewiesenen Metaboliten Norpseudoephedrin erwies sich die allgemeine „Bond Elut Certify[®]“ Extraktion (S. 162) als optimale Festphasenextraktion. Die Wiederfindung für Norpseudoephedrin im Speichel betrug im Mittel über 85 %.

7.7.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

Die Reactine[®] duo Tabletten (120 mg Pseudoephedrinhydrochlorid) wurden dreimal dem männlichen Probanden A verabreicht. Zwischen den Einnahmen des Arzneistoffes lag eine ausreichende Zeit, so dass davon auszugehen ist, dass der Wirkstoff vollständig eliminiert war. Die Probandin B nahm die Tablette Reactine[®] duo einmalig ein. Die Entnahme der Speichelproben erfolgte zu definierten Zeiten mit den Salivetten[®]. Die anschließenden kapillarelektrophoretischen und massenspektrometrischen Analysen des Speichels wiesen Norpseudoephedrin im Speichel nach. Bei dem Probanden A (26 Jahre) und bei der Probandin B (28 Jahre) wurden die in Tabelle 7.4 aufgelisteten Norpseudoephedrinkonzentrationen nach Einnahme einer Reactine[®] duo Tablette ermittelt.

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband A Konzentration [µg/ml] 1. Einnahme	Proband A Konzentration [µg/ml] 2. Einnahme	Proband A Konzentration [µg/ml] 3. Einnahme	Probandin B Konzentration [µg/ml] 1. Einnahme
1	0,34	-	-	0,20
1,5	-	0,21	-	-
2	0,24	-	0,21	0,21
2,5	-	0,29	-	-
3	0,30	-	0,19	0,25
3,5	-	0,41	0,21	0,33
4	0,57	0,45	0,23	0,33
4,5	0,53	0,60	0,20	0,35
5	0,28	0,50	0,28	0,49
5,5	-	0,41	-	0,31
6	0,24	0,38	0,50	0,21
7	-	0,22	-	0,20

Tabelle 7.8: Ermittelte Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel (n = 3)
(- = keine Probe entnommen)

Der zeitliche Verlauf der Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel des Probanden A nach den drei Einnahmen wird im Bild 7.13 graphisch verdeutlicht.

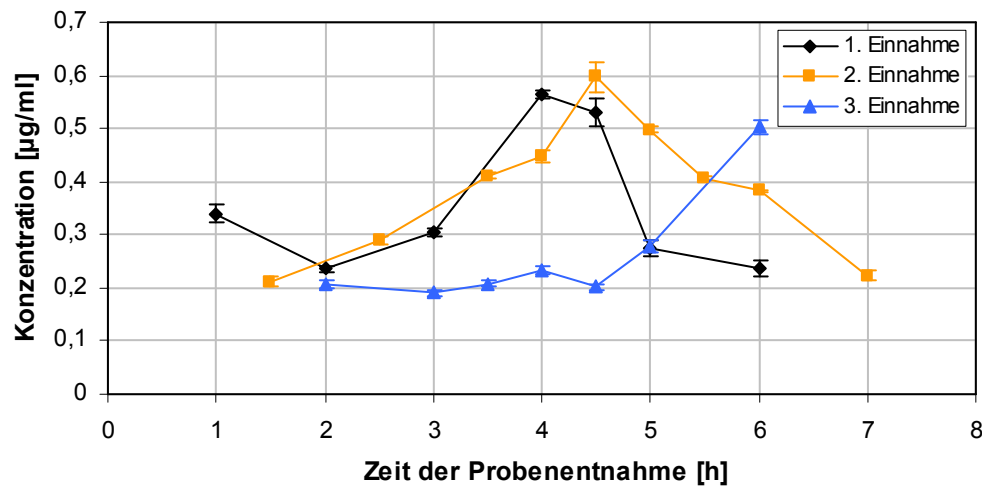


Bild 7.13: Zeitlicher Verlauf der Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel (n = 3)

Im Bild 7.14 wird der zeitliche Verlauf der Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel des Probanden A und der Probandin B graphisch verdeutlicht.

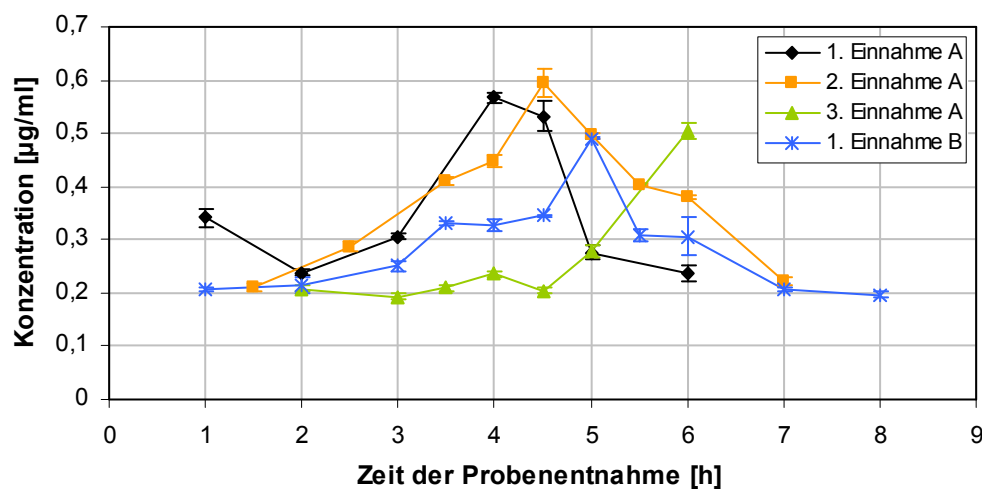


Bild 7.14: Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel der Probanden A und B (n = 3)

Nach Einnahme einer Tablette mit retardierter Freisetzung wurde der maximale Plasmaspiegel des Pseudoephedrins nach vier Stunden nachgewiesen¹⁰¹. Dies spiegelte sich bei den gefundenen Norpseudoephedrinkonzentrationen im Speichel wieder. Die maximalen Konzentrationen wurden zwischen der vierten und fünften Stunde festgestellt. Der abweichende zeitliche Verlauf der Norpseudoephedrinkonzentrationen beim Probanden A nach der dritten Einnahme waren auf eine wesentlich höhere, fettreiche Nahrungsaufnahme vor und während der Probenentnahme zurückzuführen, die zu einem verzögerten Transport des Arzneimittels in den resorptionsaktiven Bereich des Dünndarms führte.

Die unterschiedlichen Zeitpunkte der maximalen Konzentration im Speichel zwischen dem männlichen und weiblichen Probanden kann durch den langsameren Magen-Darm-Transport bei Frauen als bei Männern erklärt werden⁴³.

Ein Vergleich zwischen den Speichel- und Plasmakonzentrationen des Norpseudoephedrins konnte nicht durchgeführt werden, da keine Publikation zur Verfügung stand.

Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Die entnommenen Speichelproben (Pseudoephedrin $m/z = 166,1$; Norpseudoephedrin $m/z = 160,1$) wurden bei positiver Ionisation mit der ESI-MS mittels Direkteinlass analysiert. Mit der ausgewählten Methode konnten $0,1 \mu\text{g/ml}$ Pseudoephedrin bzw. Norpseudoephedrin in $0,1 \text{ mM}$ Phosphorsäure deutlich detektiert werden. In den Speichelproben wurden die Molmassen der Substanzen Pseudoephedrin und Norpseudoephedrin bestimmt. Pseudoephedrin war massenspektrometrisch in einer sehr geringen Konzentration nachweisbar, die bei den kapillarelektrophoretischen Analysen unter der Nachweisgrenze lag. Die maximalen Pseudoephedrskonzentrationen im Speichel traten nach 6 bis $7 \frac{1}{2}$ Stunden auf.

7.7.5 Ergebnisse der Urinuntersuchungen

Die Urinproben wurden nach Einnahme einer Tablette Reactine[®] duo zu festgelegten Zeiten gesammelt und ohne vorherige Aufbereitung mit der kapillarelektrophoretischen Methode PseuU.M vermessen. Urinproben sind stärker mit störender Matrix belastet als Speichelproben, so dass die Quantifizierung mit Butylscopolamin als interner Standard erfolgte, um auftretende Schwankungen auszugleichen.

Um eine Zuordnung zu den Substanzen im Urin vorzunehmen, wurden Urinproben mit Pseudoephedrin und Norpseudoephedrin dotiert. Im Urin waren beide Substanzen nachweisbar. Von Norpseudoephedrin stand eine zu geringe Menge zur Verfügung, um die Validierung und Quantifizierung für die Speichel- und Urinuntersuchungen durchzuführen. Daher erfolgten die Validierung der Speicheluntersuchungen mit Norpseudoephedrin und die Validierung der Urinuntersuchungen mit Pseudoephedrin.

In den Urinproben der Probandin B wurden die in Tabelle 7.9 aufgelisteten Pseudoephedrin-konzentrationen nach Einnahme einer Tablette Reactine[®] duo nachgewiesen.

Zeit der Probenentnahme [h]	1	1,5	2	3	3,5	4,5	5	5,5	6
Konz. [µg/ml] Pseudoephedrin	85,87	152,49	148,24	153,93	202,12	129,23	57,61	49,97	45,08

Tabelle 7.9: Ermittelte Pseudoephedrinkonzentrationen im Urin (n = 3)

Das Pseudoephedrin reichert sich im Speichel zu einem deutlich geringeren Anteil an als im Urin.

Das Bild 7.15 zeigt eine Graphik mit dem zeitlichen Verlauf der mittleren Urinkonzentrationen von Pseudoephedrin.

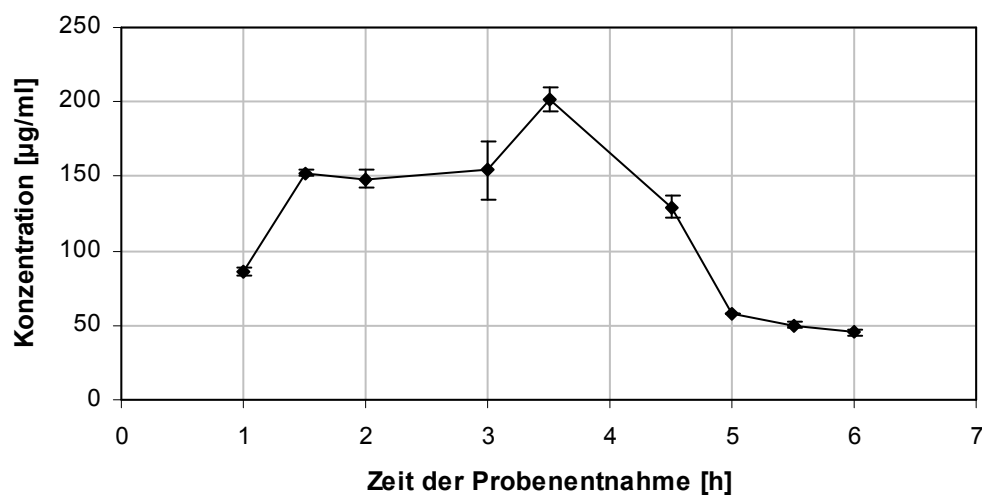


Bild 7.15: Zeitlicher Verlauf der Pseudoephedrinkonzentrationen im Urin (n = 3)

7.7.6 Analytische Daten der Speicheluntersuchungen

Die Speichlextraktion von Norpseudoephedrin wurde für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen und anschließender Vermessung mit der Methode Pseu1.M validiert. Diese Validierung beinhaltete eine Methodenpräzision, die anhand von drei Konzentrationsniveaus mit jeweils sechs separaten Extraktionen pro Tag durchgeführt wurde. Dieser Vorgang wurde an zwei nachfolgenden Tagen wiederholt. Dies bedeutet, dass 54 Kartuschen für eine Vali-

dierung benötigt wurden. Aufgrund der Materialkosten für die Kartuschen war diese Art der Validierung nicht bei allen Methodenpräzisionen anwendbar.

Die Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen sind für die Methode Pseu1.M im experimentellen Teil für Norpseudoephedrin (S. 221) aufgeführt.

Die Überprüfung der Spezifität zeigte im Bereich der nachzuweisenden Substanz Norpseudoephedrin keine Störungen durch die Speichelmatrix. Beleg hierfür ist das in Bild 7.16 aufgeführte Elektropherogramm einer undotierten negativen Speichelprobe im Vergleich zu einer mit Norpseudoephedrin (0,4 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe.

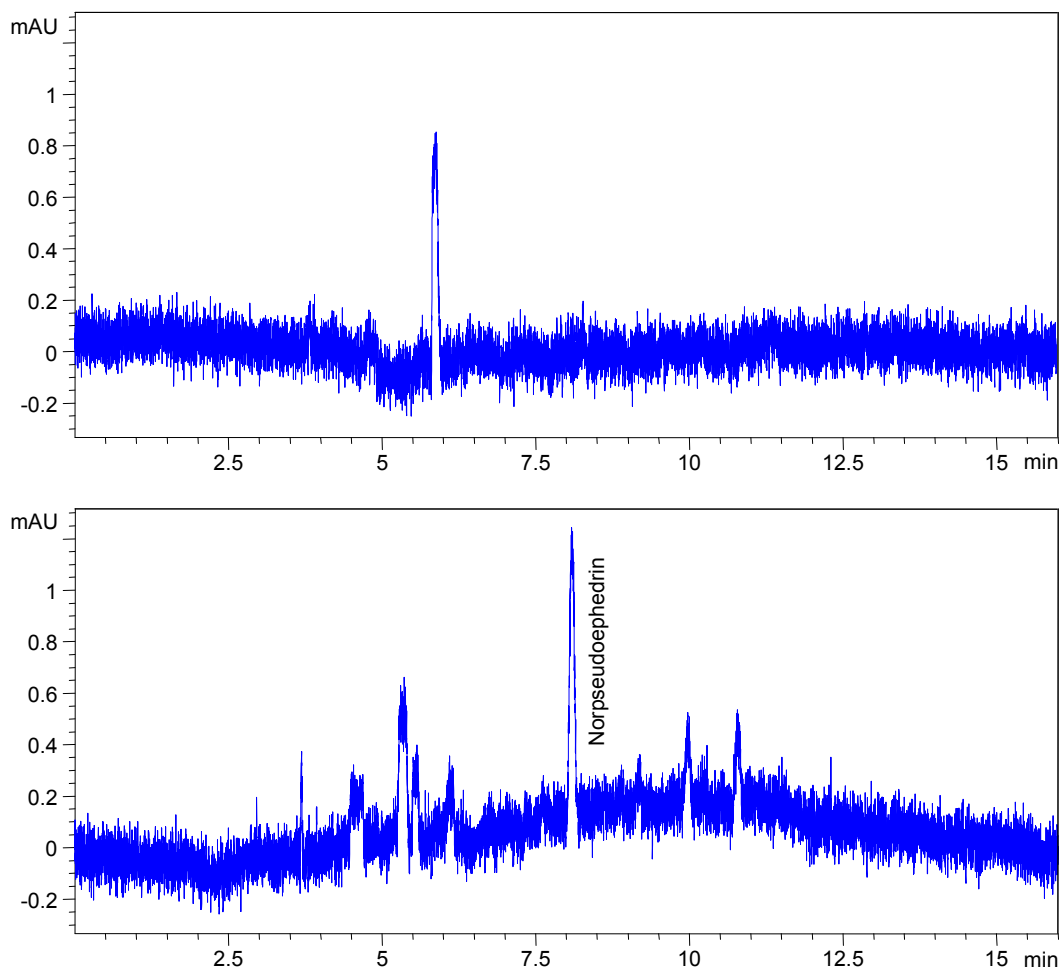


Bild 7.16: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Norpseudoephedrin (0,4 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode Pseu1.M

Die statistische Analyse der gemittelten Werte der Flächen ergab als optimales Regressionsmodell die lineare Regression (Korrelationskoeffizient: 0,9991). Es traten geringere Streuungen der Messwerte um die Regressionsgerade auf (Reststandardabweichung: 0,09) als bei der Bestimmung von Norephedrin mit der Methode Pseu1.M. Die relative Verfahrensstandardabweichung von 1,4 % war für die Bestimmung von Norpseudoephedrin mit der Methode

Pseu1.M ebenfalls niedriger als für Norephedrin (2,2 %) und die Empfindlichkeit mit $18,02 \pm 0,35$ höher.

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung eine Normalverteilung.

Die Standardabweichungen und die Mittelwerte der Messreihen der „Interday“ Präzisionsbestimmung zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied der Grundgesamtheit bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die „Interday“ Präzisionsbestimmung ergab für die Flächen relative Standardabweichungen von 1,0 % bis 4,2 % und für die Migrationszeiten von 2,6 % bis 6,5 %. Die größeren Schwankungen der Migrationszeiten bei einer gewählten Temperatur von 15 °C anstatt 20 °C bestätigten, dass bei 15 °C der radiale Temperatur- bzw. Viskositätsgradient im Puffer beim Abtransport der Joulschen Wärme stärker in Erscheinung trat. Die effektive Kühlleistung sank bei 15 °C gegenüber 20 °C, so dass sich der Puffer in der Kapillarmitte stärker erhitze als an der Kapillarwand. Dadurch wanderten die Substanzen im Bereich höherer Viskosität (Kapillarwand) langsamer als in den Bereichen mit niedrigerer Viskosität (Kapillarmitte).

Zur Verminderung des radialen Temperaturgradienten können Kapillaren mit einem kleineren Innendurchmesser ($< 50 \mu\text{m}$) verwendet werden. Dieser Verringerung des Kapillarinne-
durchmessers sind aber Grenzen gesetzt, da dadurch die Nachweisgrenzen durch die abnehmende Schichtdicke erhöht werden.

Die Bestimmungen der Wiederfindungen wiesen zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse auf.

Konz. [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,25	95,2	7,2	7,6
0,35	93,2	4,6	4,9
0,5	85,4	3,0	3,5

Tabelle 7.10: Wiederfindung des Norpseudoephedrins (Methode Pseu1.M)

Die von der FDA-Richtlinie für die Richtigkeit vorgegebene maximal erlaubte Abweichung von 15 % wurde unterschritten:

Konz. [µg/ml]	0,25	0,35	0,5
Mittelwerte der Richtigkeit [%]	-1,5	-3,3	-10,5

Tabelle 7.11: Ergebnisse der Richtigkeit für die „Interday“ Bestimmung (Methode Pseu1.M)

Die Richtigkeit wies größere Abweichungen für die Konzentration 0,5 µg/ml auf, die auf eine niedrigere Wiederfindung zurückzuführen waren.

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze für Norpseudoephedrin lag bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 % bei folgenden Grenzen:

Nachweisgrenze:	0,03 µg/ml
Bestimmungsgrenze:	0,08 µg/ml

7.7.7 Analytische Daten der Urinuntersuchungen

Die Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen der Validierung für die Methode PseuU.M sind für die Urinuntersuchungen des Pseudoephedrins im experimentellen Teil (S. 228) aufgeführt. Zur Auswertung wurden die Flächen der Probe dividiert durch die Fläche des internen Standards.

Die sechs untersuchten negativen Urinproben zur Überprüfung der Selektivität wiesen in dem Bereich des Pseudoephedrins keine der Matrix zuzuordnende Signale auf. Im Bild 7.17 (S. 111) ist ein Elektropherogramm einer undotierten negativen Urinprobe im Vergleich zu einer mit Pseudoephedrin (60 µg/ml) dotierten negativen Urinprobe dargestellt.

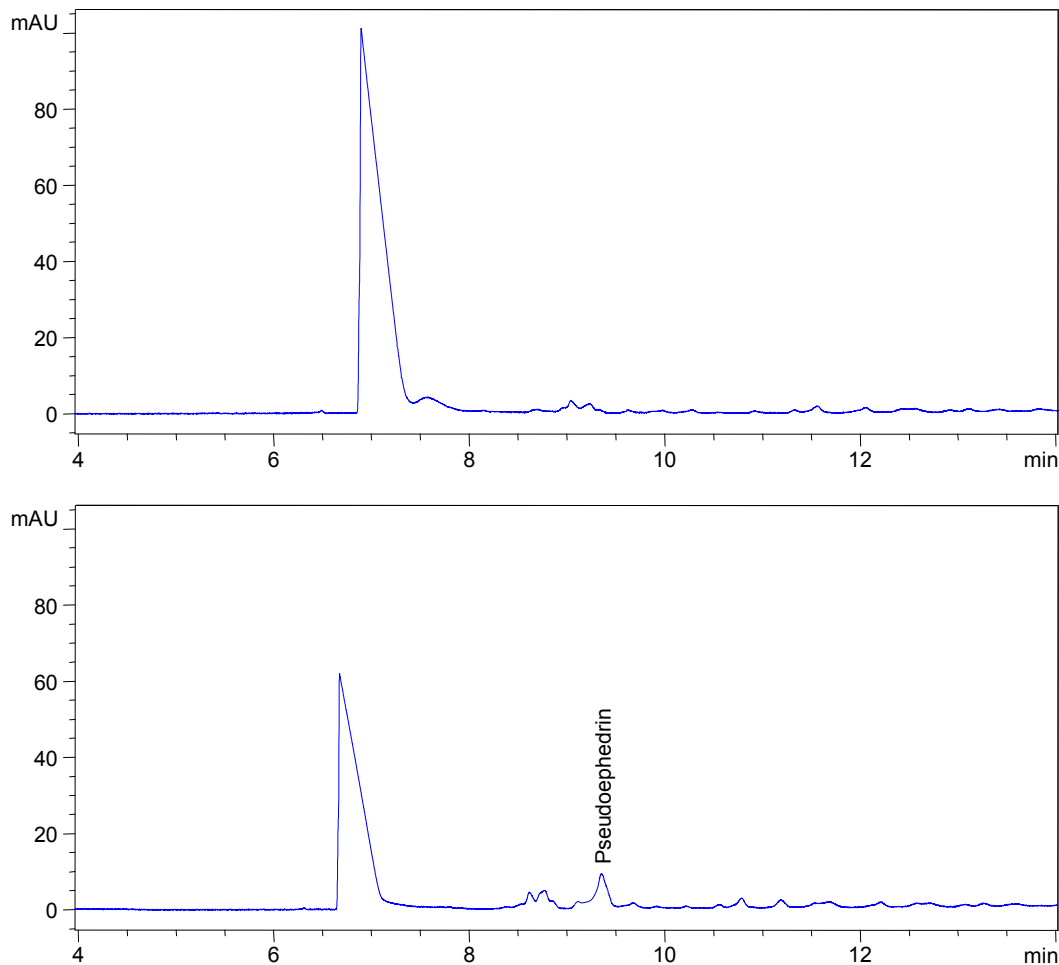


Bild 7.17: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Urinprobe (oben) und einer mit Pseudoephedrin (60 $\mu\text{g/ml}$) dotierten negativen Urinprobe (unten); Methode PseuU.M

Die „Interday“ Präzision der korrigierten Flächen mit relativen Standardabweichungen zwischen 1,8 und 4,2 %, zeigte für eine Direktvermessung einer matrixbelasteten Probe ein gutes Ergebnis. Bei Betrachtung der Migrationszeiten eines Tages ergaben sich relative Standardabweichungen von 0,4 bis 4,9 % (eine Ausnahme: 9,1 %). Die Migrationszeiten der „Interday“ Präzision wiesen Abweichungen zwischen 11,6 und 15,2 % auf. Die Schwankungen der Migrationszeiten der „Interday“ Präzision waren auf Adsorptionen der stark matrixbelasteten Probe an der Kapillarenwand zurück zu führen, die mit zunehmender Analysenanzahl zunahm. Deshalb ist zu empfehlen, dass nur eine begrenzte Anzahl (ca. 50) der Urinanalysen, ohne vorherige Probenaufbereitung, mit einer Kapillare durchgeführt werden. Bei Untersuchungen an verschiedenen Tagen ist eine neue Kapillare einzusetzen.

Die statistische Betrachtung mit dem Schnelltest nach David zeigte, dass die Analysenwerte mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 % normal verteilt sind. Der F- und t-Test ergaben, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festzustellen waren.

Die Bestimmung der Linearität zeigte eine gute Korrelation der Messgrößen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9956 und einer Reststandardabweichung von 0,05. Die relative Verfahrensstandardabweichung mit 5,5 % für die Bestimmung von Pseudoephedrin im Urin war vergleichbar mit den relativen Verfahrensstandardabweichungen der Methoden zur Speichelanalyse mit vorheriger Proteinfällung.

Die Wiederfindungsbestimmung von Pseudoephedrin im Urin zeigte zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	1. Tag	2. Tag	3.Tag	Stabw	Vk [%]
60,0	89,4	88,5	88,5	91,2	1,6	1,8
80,0	83,5	83,2	81,9	85,5	1,9	2,2
100,0	97,8	102,4	94,9	96,1	4,0	4,1

Tabelle 7.12: Wiederfindung des Pseudoephedrins im Urin (Methode PseuU.M)

Die Bestimmung der Richtigkeit zeigte Abweichungen, insbesondere bei der Konzentration 80 µg/ml.

Konz. [µg/ml]	60,0	80,0	100,0
Mittelwerte der Richtigkeit [%]	9,23	14,20	2,24

Tabelle 7.13: Ergebnisse der Richtigkeit für die Methode PseuU.M

Erklären lassen sich die Schwankungen der Richtigkeit durch die niedrigeren Wiederfindungen und dem Einfluss der Matrix.

Für die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze wurde bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 % für die Methoden PseuU.M folgende Grenzen ermittelt:

Nachweisgrenze: 15,60 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 45,35 µg/ml

7.7.8 Diskussion

Nach der oralen Einnahme des Pseudoephedrins war der Metabolit Norpseudoephedrin im Speichel der Probanden nachweisbar. Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen der Speichelproben konnte neben Norpseudoephedrin auch das Pseudoephedrin in einer sehr

niedrigen Konzentration nachgewiesen werden. Diese Konzentrationen lagen unter der Nachweisgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode Pseu1.M.

Die Konzentrationen von Pseudoephedrin im Urin zeigten in welchem Umfang dieses ausgeschieden wird.

Die Methode zur Bestimmung von Pseudoephedrin im Urin zeigte eine vergleichbare Reproduzierbarkeit wie die LC/MS-Methode von Naidong et al.¹⁰⁷. Die Methode von Naidong et al.¹⁰⁷ erreichte eine deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze (5,5 ng/ml). Auf eine Optimierung der kapillarelektrophoretischen Methode wurde verzichtet, da für diese Urinuntersuchungen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ausreichend waren. Die Urinuntersuchungen wurden nur zu einem Vergleich der Konzentrationen zwischen den Körperflüssigkeiten Speichel und Urin herangezogen.

Die Methode Pseu1.M zum Nachweis von Norpseudoephedrin im Speichel wies eine verbesserte Reproduzierbarkeit auf als die GC-Methode zur Bestimmung von Norpseudoephedrin im Plasma von Lo et al.¹⁰⁸. Die Nachweisgrenze der GC-Methode (0,02 µg/ml) war fast identisch mit der kapillarelektrophoretischen Methode (0,03 µg/ml).

7.8 Nicotin

7.8.1 Einleitung

Das Alkaloid Nicotin* kommt mit etwa 1,5 % in *Nicotiana tabacum* L. vor. Nicotin wirkt auf vegetative Ganglien zuerst erregend und nach längerer Einwirkung beruhigend. Anfänglich verursacht es Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Dysphorie. Die Herzrate und der Blutdruck steigen¹⁰⁹. Nicotin wird als Pflaster (Nicorette® 8,3 mg/16,6 mg/24,9 mg; Nicotinell® 17,5 mg/ 35 mg/52,5 mg/24-Stunden), Kaugummi (Nicorette® 2 mg/4 mg; Nicotinell® 2 mg/4 mg) oder als Lutschtablette (Nicotinell® 1 mg; NiQuitin 2 mg/4 mg) zur Raucherentwöhnung in Deutschland eingesetzt.

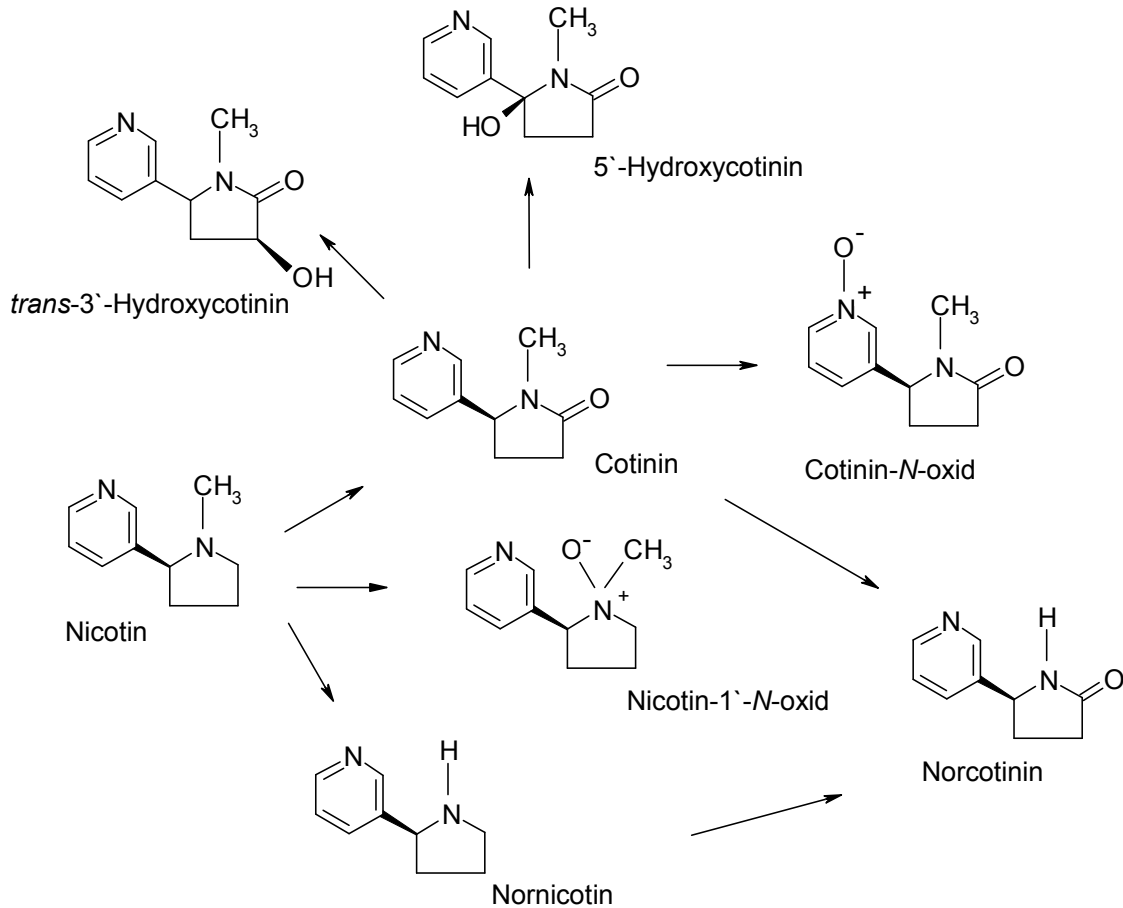
Die wesentlichen Metabolite des Nicotins im Organismus des Menschen werden durch Oxidation bzw. durch *N*-Desmethylierung gebildet (Schema 7.7, S. 114). Es entsteht das Cotinin, das Nicotin-1'-*N*-oxid und das Nornicotin, die der weiteren Metabolisierung unterliegen.

Neben 10 % Nicotin werden 17 % als Cotinin mit dem Urin ausgeschieden¹⁰⁹. Der biliär ausgeschiedene Metabolit Nicotin-1'-*N*-oxid wird durch Darmbakterien zu Nicotin reduziert, welches wieder absorbiert wird. Nicotin unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf¹¹⁰.

* Nach IUPAC: 3-[(2*S*)-1-Methylpyrrolidin-2-yl]-pyridin

Da Nicotin einen pK_a -Wert von 7,9 aufweist, liegen beim pH-Wert des Blutes etwa $\frac{1}{4}$ des Nicotins als nichtionisierte, gut lipidlösliche freie Base vor.

Nicotin besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von 2 Stunden. Die Bindung an Plasmaproteine ist unerheblich¹¹¹.



Schema 7.7: Biotransformation von Nicotin

7.8.2 Methodenentwicklung

Bisher wurden im Rahmen dieser Arbeit Arzneimittel nach oraler Einnahme untersucht. Nun sollte ein weiterer Applikationsweg einbezogen werden. Nicotin wird als Pflaster, Lutschtablette oder Kaugummi zur Raucherentwöhnung eingesetzt. Bei der Verwendung von Kaugummis bzw. Lutschtabletten tritt eine große Beeinflussung der Ergebnisse durch Ablagerung von Nicotin auf der Mundschleimhaut auf, so dass dieser Applikationsweg für Speicheluntersuchungen nicht geeignet war. Der Speichel wurde nach der Applikation eines 52,5 mg/24 Stunden Pflasters untersucht. Lindell et al.¹¹² fanden acht Stunden nach der Applikation eines transdermalen Nicotinplasters (15 mg/16 h) maximale Nicotinkonzentrationen

im Speichel von 76,8 ng/ml*. Die Methodenentwicklung für Nicotin orientierte sich an der nachgewiesenen Speichelkonzentration von Lindell et al.¹¹². Zur Identifizierung und Quantifizierung von Nicotin sollte eine Methode mit einer Nachweisgrenze unter 0,1 µg/ml entwickelt werden.

Zunächst wurde die von Palmer et al.¹¹³ beschriebene kapillarelektrophoretische Methode für Nicotinmetabolite (Nico1.M, S. 174) verwendet, da diese eine hohe Trennleistung und gute Reproduzierbarkeit aufwies. Die Analysen zeigten, dass die Methode zum Nachweis von Konzentrationen unter 0,1 µg/ml Nicotin nicht geeignet war. Die Variationen der Methode, wie eine Verlängerung der Injektionszeit, der Einsatz von „Sample Stacking“, die Verwendung der elektrokinetischen Injektion und das Weglassen des Acetonitrilzusatzes zum Puffer, erbrachten keine verbesserte Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Nicotin. Erst der Austausch des 50 mM Ammoniumformiatpuffers pH 2,8 gegen 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 führte zu einer deutlich niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Es ist anzunehmen, dass der 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 durch seine höhere Ionenstärke zu einer ausgeprägteren Fokussierung der Analyten führte, wodurch eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht wurde. Zur weiteren Optimierung wurde die Injektion variiert. Angefangen mit einer einfachen hydrodynamischen Injektion, wurden eine kombinierte Injektion aus elektrokinetischer mit vorheriger hydrodynamischer Wasserinjektion („Sample Stacking“), eine elektrokinetische Injektion ohne Wasserzone sowie eine elektrokinetische Injektion mit kurz anschließendem Druckimpuls getestet. Nicotin war nun mit der kombinierten Injektion aus elektrokinetischer mit vorheriger hydrodynamischer Wasserinjektion in einer Konzentration von 0,1 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure mit der Methode Nico2.M (S. 174) nachweisbar.

* In der Publikation waren keine Angaben zur verwendeten analytischen Methode aufgeführt.

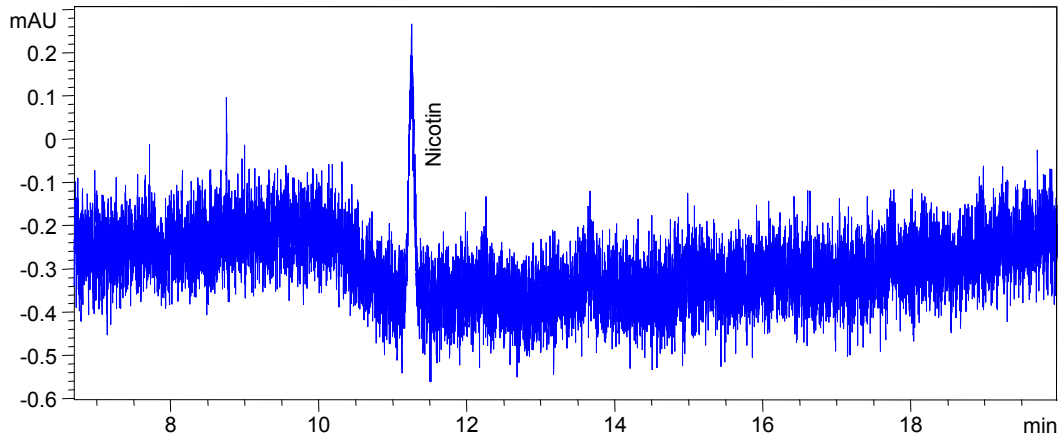


Bild 7.18: Nicotin 0,1 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure; Methode Nico2.M

Zur Minimierung der Analysenzeit wurde eine kürzere Kapillare 40/47 cm eingesetzt und die Spannung auf 17 kV erhöht. Um die pH-Schwankungen bei der Präkonditionierung gering zu halten, wurde ein Spülschritt mit 0,1 M Phosphorsäure verwendet (Nico3.M, S. 175).

Es zeigte sich, dass die Methode Pseu1.M (S. 173) für die Speichelanalysen zum Nachweis von Nicotin ebenfalls geeignet war. Beim Vergleich des Elektropherogramms im Bild 7.18 (Injektion mit „Sample Stacking“) mit dem Elektropherogramm im Bild 7.19 (s. S. 118) wurde der Unterschied der Peakform durch den Einsatz eines „Sample Stackings“ ersichtlich. Die Peakbreite wurde an der Basis minimierte, woraus ein schmalere Peak resultierte.

7.8.3 Probenvorbereitung

Festphasenextraktion

Die Entwicklung einer geeigneten Speichelaufbereitung für Nicotin erwies sich als sehr schwierig, da Nicotin bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck flüchtig ist. Es wurde mit verschiedenen Extraktionen für die „Strata X-C[®]“, „Bond Elut Certify[®]“, „CBA[®]“ und C-18 Kartuschen experimentiert. Nach der allgemeinen Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ (S. 162) bzw. „Strata X-C[®]“ Kartuschen (S. 162) war Nicotin nach Elution mit 2 % Ammoniak in Ethylacetat bzw. 5 % Ammoniak in Methanol in einer Konzentration von 0,2 µg/ml im Eluat nicht nachzuweisen. Bei der Bestimmung der Wiederfindung zeigte sich ein hoher Verlust an Nicotin durch das Einengen.

Eine dotierte negative Speichelprobe mit 60 µg/ml Nicotin wies nach der Extraktion und anschließendem Einengen kein Nicotin auf. Für die Festphasenextraktion war ein Elutionsmittel notwendig, welches sich ohne Einengen direkt mit der Kapillarelektrophorese vermessen lässt. Als am Besten geeignet, erwiesen sich die Elutionsmittel 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung bzw. 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 8,0 für die allgemeine

Extraktion für basische Substanzen über „Strata X-C[®]“ oder „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen. Mit diesen Elutionsmitteln waren aber nur Nicotinkonzentrationen über 0,1 µg/ml im Eluat nachzuweisen.

Als Alternative wurden „CBA[®]“-Kartuschen (= Carboxylic Acid) mit einem schwach sauren Kationenaustauscher verwendet. Als erstes Elutionsmittel wurde ein 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,0 eingesetzt, da ein Puffer mit einem kleineren pH-Wert als 2,8 zur Elution notwendig war, um die funktionellen Gruppen zu neutralisieren. Nach der Extraktion I über die „CBA[®]“-Kartuschen (S. 167) war kein Nicotin in der Waschflüssigkeit und im Eluat zu identifizieren. Nicotin konnte nicht von der Kartusche eluiert werden. Nun wurde für die Elution 1 M Salzsäure pH 2,0 verwendet. Zur Konditionierung wurde ein Natriumdihydrogenphosphatpuffer statt einem Kaliumdihydrogenphosphatpuffer eingesetzt, da Natriumionen weniger stark gebunden werden als Kaliumionen und so ein Austausch der Natriumionen mit dem Analyten leichter erfolgen konnte. Es entstand die auf Seite 167 beschriebene Extraktion II für „CBA[®]“-Kartuschen.

Es war festzustellen, dass die kapillarelektrophoretischen Messungen eine Verschlechterung der Nachweisgrenze zeigten, wenn Nicotin in Salzsäure gelöst vorlag. Nicotin war in einer Konzentration von 10 µg/ml in Wasser gelöst kapillarelektrophoretisch deutlich detektierbar, wohingegen ein Nachweis von 10 µg/ml Nicotin in 1 M Salzsäure nicht möglich war. Die Ursache könnte sein, dass Nicotin nach Zugabe der Salzsäure als Hydrochlorid ausfällt und somit den Messungen entzogen war. Es wurden UV/VIS-spektroskopische Versuche durchgeführt, um zu prüfen, ob Nicotin abweichende UV/VIS-Spektren in verschiedenen Medien (1 M Salzsäure; Wasser; 0,1 mM Phosphorsäure pH 2,0; 0,1 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,0) aufweist. Es war bei der Verwendung von 1 M Salzsäure ein deutlicher „hypochromer Shift“ festzustellen. Die Absorption des Nicotins nahm im Vergleich zu Wasser in 1 M Salzsäure um den Faktor 5 ab. Daraus ist abzuleiten, dass Nicotin in 1 M Salzsäure einen niedrigeren Absorptionskoeffizienten besitzt und sich somit die Nachweis- und Bestimmungsgrenze verschlechtert.

Als weitere Variation wurde eine C-18 Phase anstatt eines Kationenaustauschers verwendet. Zur Retention des Nicotins ($pK_{a1} = 3,2$; $pK_{a2} = 7,9$) wurde die freie Base benötigt, d.h. zur Konditionierung wurde ein pH-Wert von 9 gewählt und die Probe auf einen pH-Wert von 11 mit 0,5 N NaOH eingestellt. Die Elution erfolgte im Säuren mit 0,1 mM Phosphorsäure pH 2,0, damit die Base protoniert vorlag und vom Sorbent der Kartusche eluierte (C-18 Extraktion: S. 168). Es zeigte sich jedoch, dass Nicotin nach der Elution mit 0,1 mM Phos-

phorsäure pH 2,0 nicht vollständig von der Kartusche eluierte (Bild 7.19). Mit der Extraktion über die C-18 Kartuschen wurde lediglich eine Wiederfindung von 51 % erreicht.

Wie bei der Extraktion mit den „CBA[®]“-Kartuschen wurde eine Säure mit höherer Elutionskraft benötigt. Es konnte keine Säure mit ausreichender Elutionskraft gefunden werden, die bei den kapillarelektrophoretischen Messungen eine akzeptable Nachweisgrenze (unter 0,1 µg/ml) für Nicotin aufwies.

Nicotin wurde lediglich nach der allgemeinen Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ (Elution mit 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung bzw. 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 8,0), den „Strata X-C[®]“ (Elution mit 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung bzw. 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 8,0) und den C-18 Kartuschen (Elution mit 0,1 M Phosphorsäure pH 2,0) im Eluat nachgewiesen.

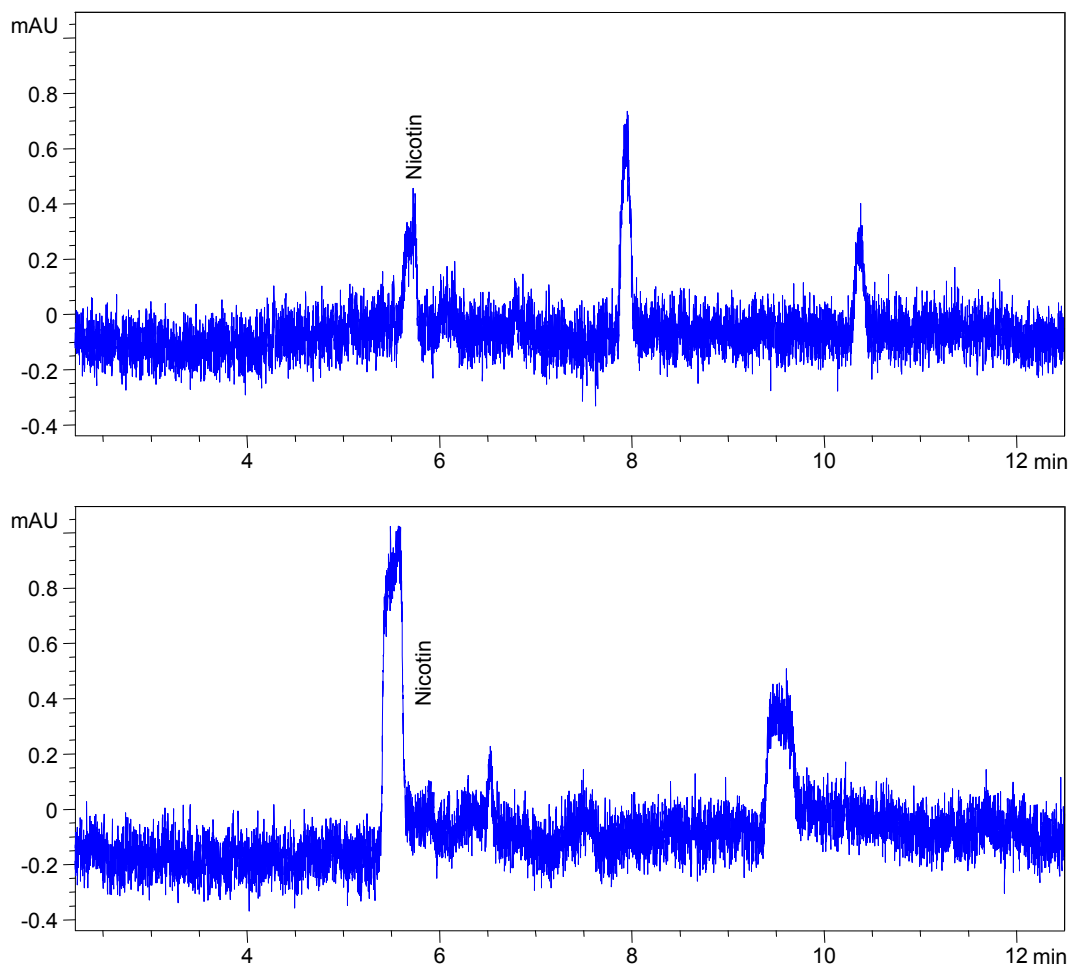


Bild 7.19: oben: C-18 Eluat der mit Nicotin (0,4 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe in Phosphorsäure pH 2,0; unten: Nicotin (0,4 µg/ml) nach der Extraktion zum Eluat hinzugefügt; Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Matrix zuzuordnen; Methode:Pseu1.M

Flüssig-Flüssig Extraktion

Als Probenaufbereitungsvariante wurde eine flüssig-flüssig Extraktion getestet. Zur negativen Speichelprobe wurde eine Nicotinlösung (0,1 µg/ml) gefügt und ein basischer pH-Wert mit einer Natriumhydroxidlösung eingestellt. Die dotierte Speichelprobe wurde mit Ethylacetat/n-Hexan (1:9) extrahiert, anschließend zentrifugiert und die organische Phase direkt mit der Kapillarelektrophorese vermessen. Es zeigte sich, dass mit dieser Probenvorbereitung kein Nachweis von Konzentrationen unter 0,1 µg/ml möglich war. Zusätzlich wies die Extraktion eine schlechte Phasentrennung auf, die keine reproduzierbare Abtrennung der Phasen ermöglichte. Deshalb wurde diese Extraktionsvariante nicht weiter berücksichtigt.

7.8.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Um das Vorhandensein von Nicotin und dessen Metaboliten im Speichel zu untersuchen, wurde ein Nicotin-Pflaster mit 52,5 mg/24 h am Oberarm appliziert und die Speichelproben nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 21 und 24 Stunden mit Salivetten[®] entnommen. Das Eluat der Speichelproben wies nach den Extraktionen über die „Bond Elut Certify[®]“ (Elution mit 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung), „Strata X-C[®]“ (Elution mit 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung) und C-18 Kartuschen (Elution mit 0,1 M Phosphorsäure pH 2,0) kein Nicotin auf. Zur Überprüfung der kapillarelektrophoretischen Ergebnisse wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei positiver Ionisation mit der ESI-MS mittels Direkteinlass. Die Molmassen der Substanzen (Nicotin = 163,2 und Cotinin = 179,2) konnten in den entnommenen Speichelproben nicht bestimmt werden. Die Messungen mit der Massenspektrometrie bestätigten die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese.

Die massenspektrometrischen Analysen wiesen nach der Festphasenextraktion einer mit Nicotin dotierten negativen Speichelprobe (0,26 µg/ml) über die „CBA[®]“-Kartuschen Nicotin nur in Spuren im Eluat (0,1 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,0) nach.

Im Eluat der C-18 Extraktion der dotierten negativen Speichelprobe (0,4 µg/ml Nicotin) war Nicotin deutlich nachzuweisen.

7.8.5 Diskussion

Mit Nicotin sollte die Anreicherung der Metaboliten im Speichel nach transdermaler Applikation untersucht werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung von Nicotin war eine Methode notwendig, die Konzentrationen unter $0,1 \mu\text{g/ml}$ Nicotin nachweist, da Lindell et al.¹¹² nach der Applikation eines transdermalen Nicotinplasters (15 mg/16 h) Nicotinkonzentration von maximal $76,8 \text{ ng/ml}$ im Speichel fanden*. Dies erwies sich als sehr schwierig, da das volatile Nicotin direkt nach der Probenaufbereitung ohne vorheriges Einengen kapillarelektrophoretisch analysiert wurde. Es zeigte sich bei den Methodenentwicklungen, dass alle direkten Vermessungen nach einer Festphasenextraktion höhere Nachweisgrenzen als $0,1 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden bei diesen Speicheluntersuchungen die Grenzen der kapillarelektrophoretischen Detektion erreicht. Der Einsatz des „Sample Stackings“ erbrachte keine ausreichende Aufkonzentrierung, um Nicotin und dessen Metaboliten in Konzentrationen unter $0,1 \mu\text{g/ml}$ im Speichel nachzuweisen.

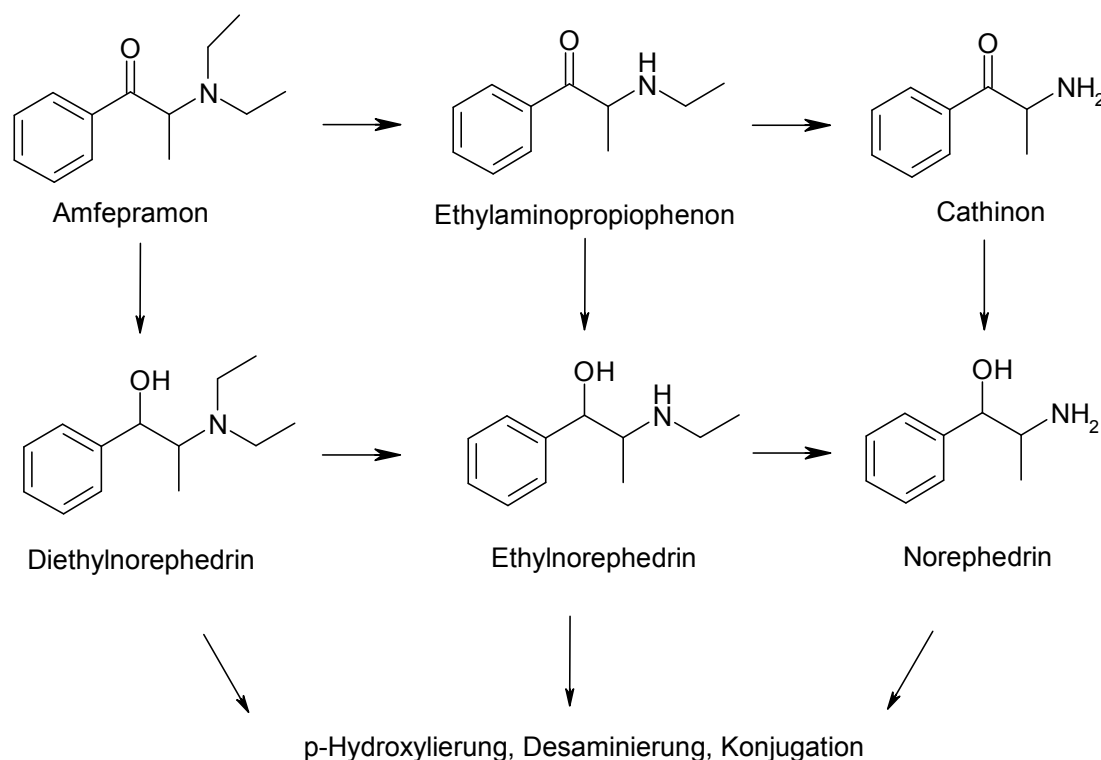
Da Nicotin (pK_a -Werte: 3,2 und 7,9) zu polaren Substanzen metabolisiert wird, werden die Metabolite in noch niedrigeren Konzentrationen als Nicotin in den Speichel permeiert sein. Die Konzentrationen im Speichel lagen deutlich unterhalb der Nachweisgrenze der Methode.

* In der Publikation waren keine Angaben zur verwendeten analytischen Methode aufgeführt.

7.9 Amfepramon

7.9.1 Einleitung

Amfepramon* ist ein Sympathomimetikum, welches als Anorektikum eingesetzt wird. Es wird nach oraler Gabe einer Retardtablette vollständig resorbiert¹¹⁴. Annähernd konstante Plasmaspiegel werden mit einem Maximum zwischen der vierten und achten Stunde erreicht. Nach Absorption wird Amfepramon durch *N*-Desalkylierung (25 %) und Reduktion (20 %) zu aktiven Metaboliten metabolisiert (Schema 7.8).



Schema 7.8: Biotransformation von Amfepramon

Amfepramon erscheint nur zu 2 % unverändert im Urin. Das desalkylierte Produkt Ethylaminopropiophenon wird zu 40 % unverändert ausgeschieden, ebenso das Diethylnorephedrin, das nur zu einem geringen Anteil zum Ethylnorephedrin desalkyliert wird¹¹⁵. Die Eliminationshalbwertszeit von Amfepramon und seinen Metaboliten liegt bei ungefähr 10 Stunden. Die Amfepramonuntersuchungen waren von polizeilichem Interesse, da es im Dezember 2004 zu zwei Vorfällen im Straßenverkehr kam. Im Fall 1 (25-jähriger, männlich, betäubungsmittel-

* Nach IUPAC: 2-Diethylaminopropiophenon

auffällig) zeigte der ärztliche Untersuchungsbericht keine Auffälligkeiten, aber die toxikologischen Untersuchungen wiesen 15 ng/ml Cathin und 10 ng/ml Cathinon im Serum nach.

Im Urin waren beide Substanzen ebenfalls nachweisbar. Die Person hatte vier Stunden vor der Verkehrskontrolle den Appetitzügler Amfepramon (Regenon[®]) eingenommen. In einem 2. Fall hatte ein PKW-Fahrer eingeräumt, die pflanzliche Droge Khat konsumiert zu haben. Die Menge war allerdings unbekannt. Der ärztliche Untersuchungsbericht beschrieb leichte Symptome wie Euphorie, erhöhter Rededrang und Hyperaktivität. Die toxikologischen Untersuchungen ergaben 80 ng/ml Cathinon und 385 ng/ml Cathin im Serum. Khat enthält als Hauptwirkstoffe (-)-Cathinon und (+)-Cathin (= (+)-Norpseudoephedrin), die dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen. Außerdem enthält es (-)-Norephedrin, welches dem Grundstoffüberwachungsgesetz unterliegt¹¹⁶. Seit 2003 dürfen die früher verbreiteten Appetitzügler mit dem Wirkstoff Amfepramon in Deutschland wieder vertrieben werden. Diese Medikamente können zu falsch positiven Befunden bei der Überprüfung auf die Droge Kath führen. Daher war es notwendig, eine Methode zu entwickeln, mit der schnell festgestellt werden kann, ob die Person die Droge Kath oder den Appetitzügler Amfepramon konsumiert. Es gibt in der Literatur keine Hinweise, dass Cathinon zum Ethylaminopropiophenon ethyliert wird, so dass eine analytische Differenzierung durch den Nachweis des Ethylaminopropiophenons möglich ist.

7.9.2 Methodenentwicklung

Die von Ku et al.¹¹⁷ beschriebene kapillarelektrophoretische Methode, zur Untersuchung von traditionellen chinesischen Medikamenten auf Verfälschungen mit synthetischen Anorektika, wurde für die Analysen der Metaboliten Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin des Amfepramons abgewandelt. Auf den Zusatz von Acetonitril zum Puffer wurde verzichtet sowie die Injektionszeit verlängert und die Temperatur (11,5 °C, 13 °C, 15 °C und 20 °C) variiert (Methode Amfe1.M, S. 175). Die Temperaturvariationen erbrachten keine Verbesserung der Basislinientrennung des Amfepramons und dessen Metaboliten. Die Modifikation der Molarität des Puffers (50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5) führte ebenfalls zu keiner vollständigen Trennung der Metaboliten des Amfepramons. Nach der Veränderung des Puffer-pH-Wertes (4,1; 5,8; 6,9) zeigte die Methode (Amfe3.M, S. 175) mit dem pH-Wert 5,8 und einer Temperatur von 15 °C eine vollständige Trennung von Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin, Diethylnorephedrin und Amfepramon (Bild 7.20, S. 123).

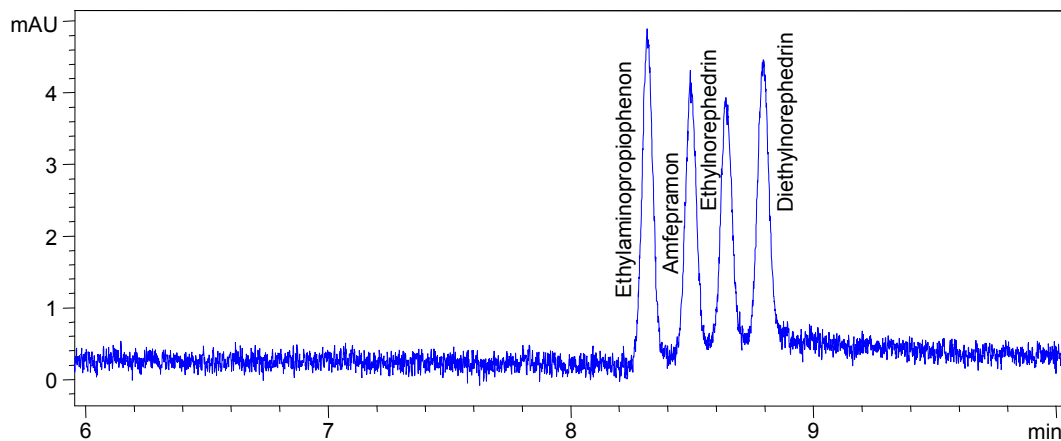


Bild 7.20: Trennung des Amfepramons und dessen Metaboliten mit der Methode Amfe3.M

Die Methode Amfe3.M wies eine gute Trennleistung auf, aber auch Schwankungen der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten unter Verwendung des Puffers mit einem höherem pH-Wert von 5,8. Die Abweichungen der Migrationszeiten sind auf den Einfluss der Speichelmatrix zurückzuführen. Durch Adsorptionen der Matrix an der Kapillarenwand werden die für den elektroosmotischen Fluss verantwortlichen Silanolgruppen blockiert. Dadurch wird der elektroosmotische Fluss langsamer und die Analytione wandern ebenfalls langsamer zum Detektor. Die weiteren kapillarelektrophoretischen Messungen zur Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten wurden bei einem Puffer pH-Wert von 2,1 mit der Methode Amfe2.M (S. 175) durchgeführt. Mit dieser Methode war nur keine ausreichende Trennung des Amfepramons vom Ethylnorephedrin möglich. Da aber die massenspektrometrischen Untersuchungen der entnommenen Speichelproben kein Amfepramon in den Proben nachwies, konnte die Methode Amfe2.M für die weitere Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten im Speichel verwendet werden. Die Methode Amfe2.M unterschied sich von der Methode Amfe1.M durch Kombination der elektrokinetische Injektion mit der hydrodynamischen Injektion. Diese Injektionsvariation verbesserte die Reproduzierbarkeit der Flächen.

Die Identifizierungen der Metaboliten im Speichel erfolgten durch das Zudotieren der Substanzen zur Probe. Für diese Referenzmessungen wurden die Metabolite Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin des Amfepramons benötigt. Die Substanz Ethylaminopropiophenon wurde von dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt und Ethylnorephedrin sowie Diethylnorephedrin wurden synthetisiert (s. S. 141).

7.9.3 Probenvorbereitung

Die von Ku et al.¹¹⁷ beschriebene Festphasenextraktion (S. 168) wurde für die Extraktion der Speichelproben über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen angewendet. Die Wiederfindung zeigte für die Metaboliten Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin des Amfepramons gute, reproduzierbare Ergebnisse (S. 264). Um zu überprüfen, ob eine Verbesserung der Wiederfindung für Ethylaminopropiophenon ($pK_a = 7,14$) und Amfepramon ($pK_a = 8,48$) erreicht werden kann, wurde der pH-Wert der Konditionierungslösung und der Probe von sechs auf vier erniedrigt. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Elutionsmittels auf 10 eingestellt, um sicherzustellen, dass die Substanzen eluieren. Die vorgenommenen Abänderungen der Extraktion führten zu keiner verbesserten Wiederfindung, so dass die aufgeführte Extraktion auf Seite 168 für die weiteren Probenaufbereitungen verwendet wurde.

7.9.4 Ergebnisse der Speicheluntersuchungen

Die Speichelproben männlicher Probanden wurden nach Einnahme einer Tablette Tenuate[®] Retard (75 mg Amfepramonhydrochlorid) zu festgelegten Zeiten mit Salivetten[®] entnommen. Nach Überprüfung der Selektivität konnten die Konzentrationen der Amfepramonmetaboliten im Speichel mit der Methode Amfe2.M ermittelt werden. Das Elektropherogramm (Bild 7.21) bildet eine Speichelprobe mit den Metaboliten ab.

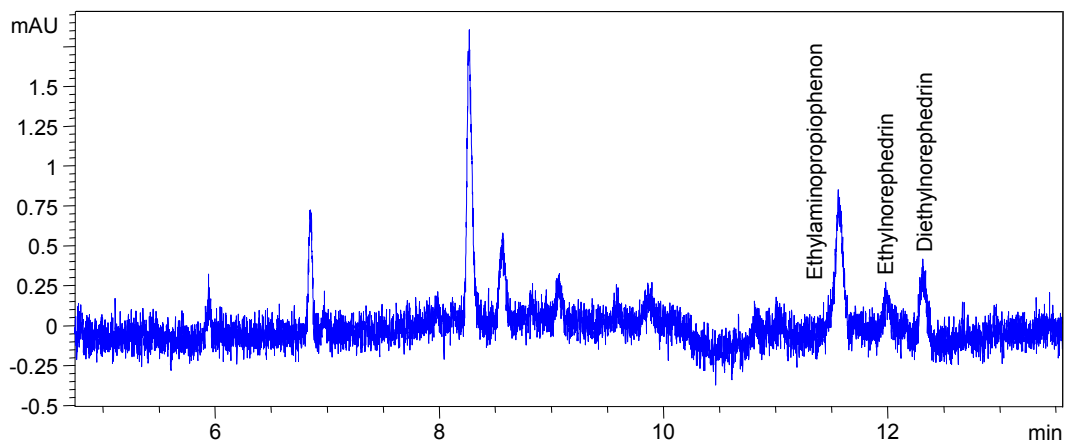


Bild 7.21: 6 Stunden Speichelprobe nach oraler Gabe von 75 mg Amfepramon; Extraktion mit den „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen; Methode Amfe2.M; Die weiteren Peaks im Elektropherogramm sind der Speichelmatrix zuzuordnen.

In Tabelle 7.14 (S. 125) sind die mittleren Konzentrationen ($n = 3$) der Metaboliten des Amfepramons des Probanden A aufgeführt.

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband A Ethylaminopropiophenon Konzentration [µg/ml]	Proband A Ethylnorephedrin Konzentration [µg/ml]	Proband A Diethylnorephedrin Konzentration [µg/ml]
2	0,31	n.n.	0,20
3	0,27	n.n.	0,22
4	0,27	0,15	0,23
5	0,28	0,16	0,18
6	0,25	0,15	0,19
7	0,25	0,15	0,19
8	0,25	0,15	0,17
9	0,21	n.q.	0,17
19	n.q.	n.n.	0,16
21	n.q.	n.n.	0,17

Tabelle 7.14: Ermittelte Konzentrationen der Amfepramonmetaboliten im Speichel (n = 3); (n.q. = nicht quantifizierbar; n.n. = nicht nachweisbar)

Die Tenuate[®] Retard Tabletten wurden zweimal dem männlichen Probanden B verabreicht. Zwischen den Einnahmen des Arzneistoffes lag eine ausreichende Zeit, so dass davon auszugehen ist, dass der Wirkstoff vollständig eliminiert war. Die ermittelten Konzentrationen der Metaboliten des Amfepramons des Probanden B nach den zwei Einnahmen von Tenuate[®] Retard Tabletten sind in der Tabelle 7.15 und Tabelle 7.16 aufgeführt.

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband B Ethylaminopropiophenon Konzentration [µg/ml]	Proband B Ethylnorephedrin Konzentration [µg/ml]	Proband B Diethylnorephedrin Konzentration [µg/ml]
2	0,25	n.n.	n.n.
3	0,22	n.n.	0,17
4	0,71	0,18	0,36
5	0,58	0,18	0,28
6	0,38	0,18	0,23
7	0,25	0,19	0,19
8	0,26	0,17	0,18
9	0,17	0,15	0,17
19	n.q.	n.n.	0,19
21	n.q.	n.n.	n.q.

Tabelle 7.15: Ermittelte Konzentrationen der Amfepramonmetaboliten im Speichel (n = 3); erste Einnahme; (n.q. = nicht quantifizierbar; n.n. = nicht nachweisbar)

Zeit der Probenentnahme [h]	Proband B Ethylamino- propiofenon Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Proband B Ethylnorephedrin Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Proband B Diethylnorephedrin Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
2	0,24	n.n.	n.n.
3	0,37	0,19	0,24
4	0,27	0,16	0,20
5	0,24	-	0,20
6	0,27	0,16	0,18
7	0,27	-	0,18
8	0,24	0,16	0,19
9	n.q.	0,16	0,18
19	n.n.	n.q.	0,20
21	n.n.	n.n.	n.n.

Tabelle 7.16: Ermittelte Konzentrationen der Amfepramonmetaboliten im Speichel (n = 3); zweite Einnahme; (n.q. = nicht quantifizierbar; n.n. = nicht nachweisbar)

In dem Bild 7.22 ist der zeitliche Verlauf der Metaboliten des Amfepramons im Speichel des Probanden A veranschaulicht.

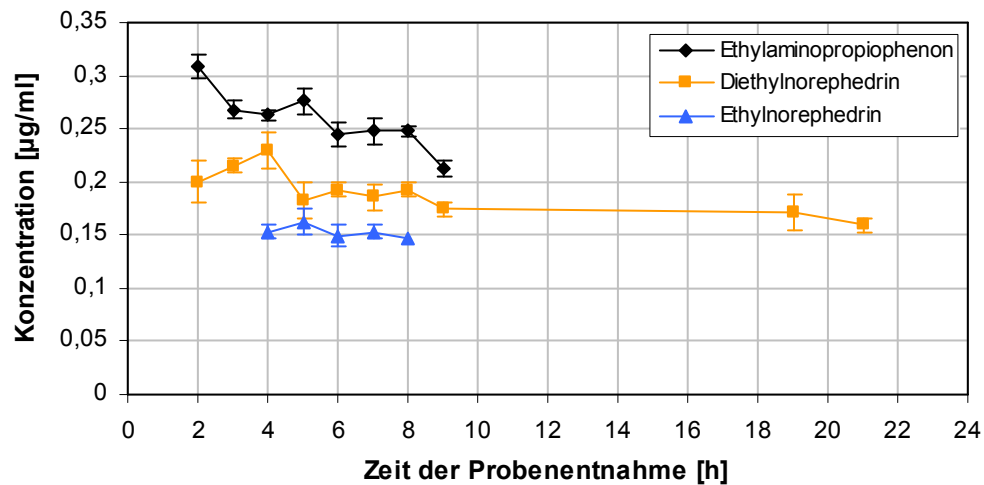


Bild 7.22: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Metaboliten des Amfepramons im Speichel des Probanden A

Das Bild 7.23 und das Bild 7.24 zeigen den zeitlichen Verlauf der Amfepramon Metaboliten im Speichel des Probanden B.

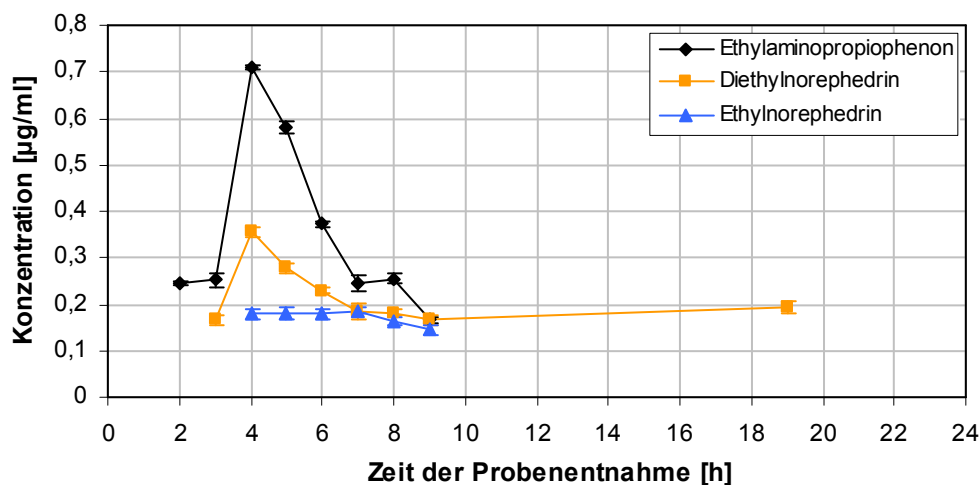


Bild 7.23: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Metaboliten des Amfepramons im Speichel des Probanden B nach der ersten Einnahme

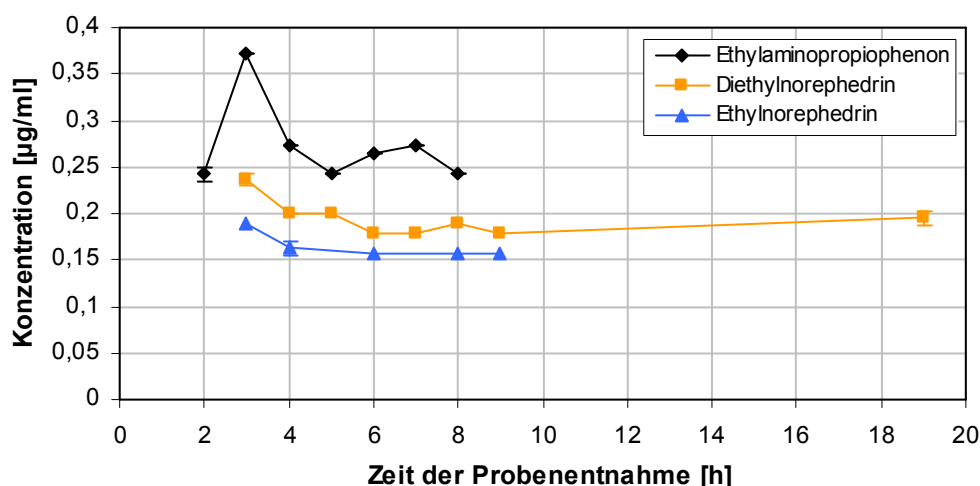


Bild 7.24: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Metaboliten des Amfepramons im Speichel des Probanden B nach der zweiten Einnahme

Es zeigten sich intraindividuelle Schwankungen der Metabolitenkonzentrationen des Probanden B, die besonders bei Ethylaminopropiophenon ersichtlich wurden.

Nach der Einnahme von 75 mg Amfepramonhydrochlorid als Retardtablette wiesen die Kurvenverläufe der ermittelten Metabolitenkonzentrationen von Diethylnorephedrin und Ethylaminopropiophenon im Speichel des Probanden A vergleichbare Verläufe auf wie von Dangor et al.¹¹⁸ publiziert. Dangor et al.¹¹⁸ konnten, nach Einnahme von 75 mg Amfepramonhydrochlorid als Retardtablette, die Metabolite Diethylnorephedrin und Ethylaminopropiophenon mit Hilfe der Gaschromatographie im Plasma, Speichel und Urin nachweisen. Die Konzentrationen der Substanzen waren innerhalb der ersten acht Stunden im Speichel gleich

bleibend. Ethylaminopropiophenon wurde mit einer Konzentration von $209,8 \pm 22,52$ ng/ml und Diethylnorephedrin mit $163,5 \pm 27,19$ ng/ml im Speichel quantifiziert. Diethylnorephedrin wurde mit einer maximalen Konzentration von $23,22 \pm 1,79$ ng/ml und Ethylaminopropiophenon mit $34,88 \pm 3,5$ ng/ml im Plasma nachgewiesen.

Die Konzentrationen der Amfepramon Metaboliten im Speichel des Probanden A blieben im Messzeitraum ebenfalls annähernd konstant und lagen in der gleichen Größenordnung wie die ermittelten Speichelkonzentrationen von Dangor et al.¹¹⁸. Für Ethylnorephedrin stand keine Publikation mit Speichel- oder Plasmakonzentrationsangaben zur Verfügung.

Die Speicheluntersuchungen des Probanden B wurden wiederholt, da die Konzentrationen von Ethylaminopropiophenon deutliche Unterschiede zu den Messungen des Probanden A und den Ergebnissen von Dangor et al.¹¹⁸ aufwiesen. Die Analysen der wiederholten Messungen ergaben für Diethylnorephedrin annähernd konstante Konzentrationen und für Ethylaminopropiophenon einen vergleichbaren Kurvenverlauf zu den ersten Untersuchungen des Probanden B. Die maximal nachgewiesene Ethylaminopropiophenonkonzentration war deutlich niedriger als nach der ersten Einnahme. Die höheren Ethylaminopropiophenonkonzentrationen des Probanden B nach der ersten Einnahme sind auf einen niedrigeren Speichel-pH-Wert (1. Einnahme: 5,5-6,0; 2. Einnahme: 6,5) zurück zu führen. Ethylaminopropiophenon (pK_a -Wert 7,1) lag bei dem niedrigeren pH-Wert um einen 13 bis 18 % größeren Anteil ionisiert im Speichel vor und konnte sich somit in höherem Ausmaß anreichern.

7.9.5 Analytische Daten

Zum Vergleich der analytischen Daten wurde eine Validierung der Amfepramon Metaboliten ohne Speichelmatrix und mit Speichelmatrix durchgeführt. Es sollte der Einfluss der Speichelmatrix auf die Ergebnisse der Analysen festgestellt werden. Dazu wurden die Substanzen direkt aus 0,1 mM Phosphorsäure bzw. bei Einsatz einer Speichelmatrix nach der Festphasenextraktion aus 0,1 mM Phosphorsäure injiziert.

Das Amfepramon wurde bei der Validierung nicht berücksichtigt, da es kapillarelektrophoretisch und massenspektrometrisch in den entnommenen Speichelproben nicht nachweisbar war.

Im experimentellen Teil sind die Messwerte und Ergebnisse der Parameterberechnungen für die Validierungen ohne Speichelmatrix (S. 234) und mit Speichelmatrix der Methode Amfe2.M (S. 250) aufgelistet.

Ergebnisse der Validierung ohne Speichelmatrix

Bei der Überprüfung der Selektivität wiesen die nebeneinander zu bestimmenden Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin keine gegenseitigen Störungen auf.

Die statistische Analyse ergab für jede Substanz als optimales Regressionsmodell die lineare Regression (Korrelationskoeffizienten: 0,9982 für Ethylaminopropiophenon, 0,9992 für Ethylnorephedrin und 0,9993 für Diethylnorephedrin). Es waren geringe Streuungen der Messwerte um die Regressionsgeraden festzustellen (Ethylaminopropiophenon: 0,24; Ethylnorephedrin: 0,11; Diethylnorephedrin: 0,11).

Die Analysen des Ethylaminopropiophenon zeigten eine höher Empfindlichkeit (Steigung: $98,07 \pm 2,67$) als für Ethylnorephedrin (Steigung: $84,25 \pm 1,49$) und Diethylnorephedrin (Steigung: $84,69 \pm 1,45$). Eine geringere relative Verfahrensstandardabweichung wies die Methode für Ethyl- und Diethylnorephedrin (2,0 %) im Vergleich zu Ethylaminopropiophenon (3,33 %) auf.

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung aller Metaboliten eine Normalverteilung. Der F- und t-Test zeigten, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festzustellen waren.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmungen zeigten für die Flächen und Migrationszeiten relative Standardabweichungen unter 2 % bzw. 1 %.

Die Bestimmung der Wiederfindung ergab zuverlässige, reproduzierbare Werte:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,03	97,13	1,78	1,83
0,05	103,88	1,63	1,57
0,1	101,67	1,66	1,63

Tabelle 7.17: Wiederfindung für Ethylaminopropiophenon (Methode Amfe2.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,025	100,79	2,24	2,23
0,04	97,62	0,95	0,98
0,08	97,33	1,52	1,56

Tabelle 7.18: Wiederfindung für Ethylnorephedrin (Methode Amfe2.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,025	103,16	0,94	0,92
0,04	98,13	0,78	0,80
0,08	97,67	1,70	1,74

Tabelle 7.19: Wiederfindung für Diethylnorephedrin (Methode Amfe2.M)

Die Ergebnisse der Richtigkeit zeigten ebenfalls gute, zuverlässige Werte:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Richtigkeit Ethylaminopropiophenon [%]
0,03	2,87
0,05	-3,88
0,1	-1,67

Tabelle 7.20: Ergebnisse der Richtigkeit für Ethylaminopropiophenon

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Richtigkeit Ethylnorephedrin [%]	Mittelwerte der Richtigkeit Diethylnorephedrin [%]
0,025	-0,79	-3,16
0,04	2,38	1,87
0,08	2,67	2,33

Tabelle 7.21: Ergebnisse der Richtigkeit für Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin

Für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden, bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 %, die folgenden Grenzen für die Metaboliten Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin mit der Methode Amfe2.M ermittelt.

Ethylaminopropiophenon:

Nachweisgrenze: 0,01 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,02 µg/ml

Ethylnorephedrin:

Nachweisgrenze: 0,004 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,01 µg/ml

Diethylnorephedrin:

Nachweisgrenze: 0,004 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,01 µg/ml

Ergebnisse der Validierung unter Verwendung der Speichelmatrix

Im Bereich der nachzuweisenden Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin waren keine Störungen durch die Speichelmatrix festzustellen. Als Beleg ist im Bild 7.25 ein Elektropherogramm einer undotierten negativen Speichelprobe im Vergleich zu einer mit Ethylaminopropiophenon (1,5 µg/ml), Ethylnorephedrin (1,5 µg/ml) und Diethylnorephedrin (0,5 µg/ml) dotierten negativen Speichelprobe nach der Extraktion über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen abgebildet.

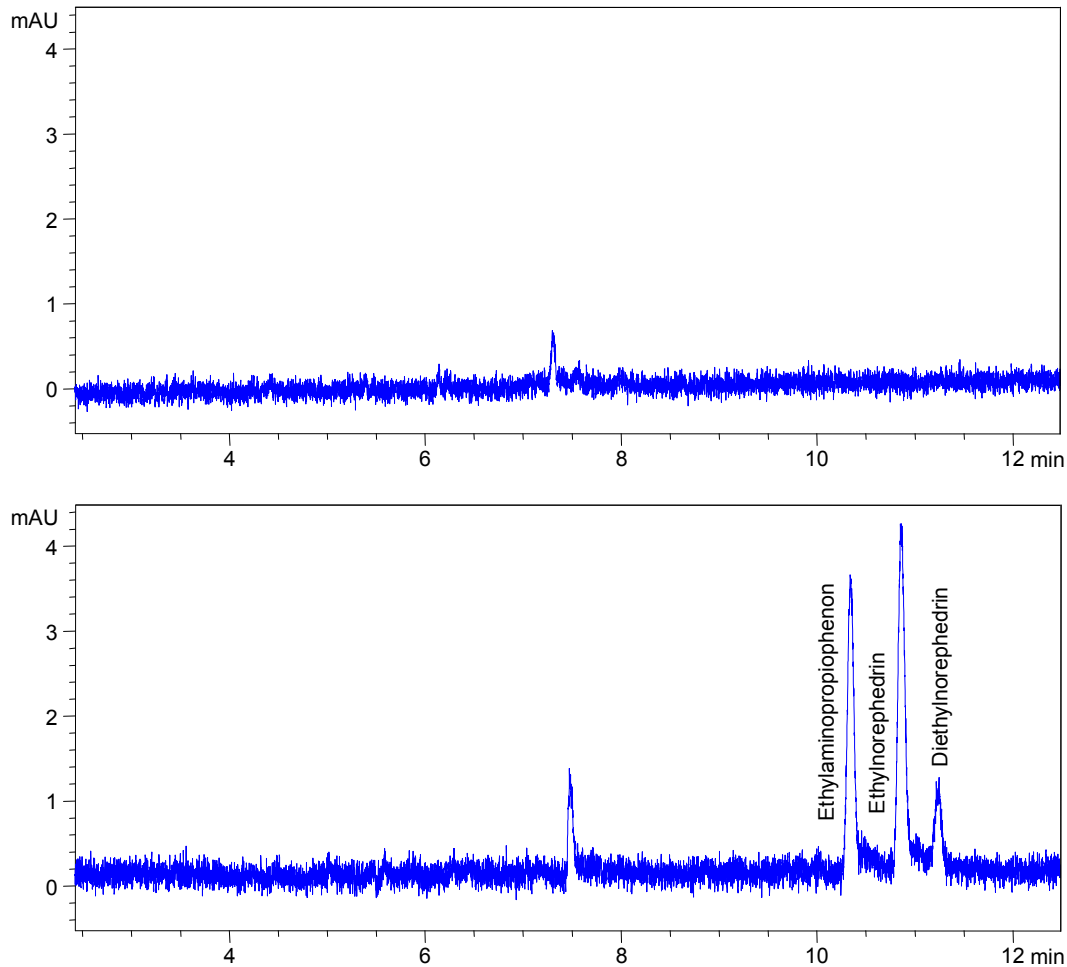


Bild 7.25: Vergleich zwischen einer undotierten negativen Speichelprobe (oben) und einer mit Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin dotierten negativen Speichelprobe (unten); Methode: Amfe2.M

Die Regressionsanalyse wies eine gute Korrelation der Messgrößen (Korrelationskoeffizienten: 0,9983 für Ethylaminopropiophenon, 0,9976 für Ethylnorephedrin und 0,9962 für Diethylnorephedrin) auf. Es ergaben sich niedrige Reststandardabweichungen (Ethylaminopropiophenon: 0,31; Ethylnorephedrin: 0,13; Diethylnorephedrin: 0,17), so dass nur geringe Streuungen der Messwerte um die Regressionsgerade auftraten. Die geringste relative Verfahrensstandardabweichung (2,86 %) wies die Methode für Ethylaminopropiophenon auf.

Für Ethyl- bzw. Diethylnorephedrin lag die relative Verfahrensstandardabweichung der Methode bei 5,71 %.

Die Analysen des Ethylaminopropiophenons zeigten eine höher Empfindlichkeit (Steigung: $13,10 \pm 0,39$) als für Ethylnorephedrin (Steigung: $9,12 \pm 0,32$) und Diethylnorephedrin (Steigung: $8,99 \pm 0,39$).

Der Schnelltest nach David ergab, bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, für die Werte der Präzisionsbestimmung aller Metaboliten eine Normalverteilung.

Mit dem F- und t-Test waren, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keine statistisch signifikanten Unterschiede der Grundgesamtheiten festzustellen.

Die „Interday“ Präzisionsbestimmungen zeigten für die Flächen des Ethylaminopropiophenons und Ethylnorephedrins relative Standardabweichungen unter 3 % und für Diethylnorephedrin unter 5 %. Die Schwankungen der Migrationszeiten lagen unter 2,5 % für alle Metaboliten.

Die Wiederfindungen nach Festphasenextraktionen über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 168) wiesen zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse auf:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,2	89,35	1,00	1,12
0,4	76,59	2,33	3,05
0,8	91,74	1,62	1,77

Tabelle 7.22: Wiederfindung des Ethylaminopropiophenons (Methode Amfe2.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,1	89,62	1,54	1,72
0,2	93,29	0,95	1,02
0,4	79,84	2,76	3,46

Tabelle 7.23: Wiederfindung des Ethylnorephedrins (Methode Amfe2.M)

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Wiederf. [%]	Stabw	Vk [%]
0,1	85,62	3,39	3,96
0,2	90,36	3,39	3,76
0,4	86,36	4,46	5,17

Tabelle 7.24: Wiederfindung des Diethylnorephedrin (Methode Amfe2.M)

Die Bestimmung der Richtigkeit zeigte, dass die von der FDA-Richtlinie vorgegebene maximal erlaubte Abweichung von 15 % für die Metaboliten deutlich unterschritten wurde:

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Richtigkeit Ethylaminopropiophenon [%]
0,2	7,83
0,4	-4,39
0,8	-5,80

Tabelle 7.25: Ergebnisse der Richtigkeit für Ethylaminopropiophenon

Konz. [µg/ml]	Mittelwerte der Richtigkeit Ethylnorephedrin [%]	Mittelwerte der Richtigkeit Diethylnorephedrin [%]
0,1	9,99	4,36
0,2	-1,66	-7,35
0,4	-0,54	-6,52

Tabelle 7.26: Ergebnisse der Richtigkeit für Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin

Für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden, bei der vorgegebenen Sicherheit von 99 %, die folgenden Grenzen für die Metaboliten Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin mit der Methode Amfe2.M ermittelt.

Ethylaminopropiophenon:

Nachweisgrenze: 0,10 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,28 µg/ml

Ethylnorephedrin:

Nachweisgrenze: 0,06 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,17 µg/ml

Diethylnorephedrin:

Nachweisgrenze: 0,08 µg/ml

Bestimmungsgrenze: 0,20 µg/ml

Vergleich der Validierungen mit und ohne Speichelmatrix

Der Vergleich der ermittelten Validierungsergebnisse ohne und mit Einsatz von Speichelmatrix zeigte deutlich den Einfluss der Matrix auf die Ergebnisse.

Unter Verwendung der Speichelmatrix war eine geringere Korrelation der Messgrößen, größere Streuungen der Messwerte um die Regressionsgeraden sowie eine verringerte Empfindlichkeit der Methode Amfe2.M für alle Metaboliten festzustellen. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen waren ebenfalls für Ethyl- und Diethylnorephedrin erhöht. Die Reproduzierbarkeit der Methode Amfe2.M war durch den Einsatz der Speichelmatrix und der Probenvorbereitung (Festphasenextraktion) verringert. Die auftretenden Schwankungen waren aber für Analysen einer Körperflüssigkeit gering. Die FDA-Richtlinie für bioanalytische Analysenverfahren akzeptiert relative Standardabweichung bis zu 15 %.

Die Direktanalyse zeigte deutlich bessere Ergebnis der Wiederfindung als nach einer Festphasenextraktion. In der Praxis der Speichelanalytik traten in der Probenvorbereitung Substanzverluste auf, die keine Beeinträchtigung der Methode bedeuteten. Es konnte gezeigt werden, dass die Festphasenextraktion zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

Zusätzlich war ein deutlicher Unterschied bei der Richtigkeit festzustellen. Die größeren Abweichungen der Richtigkeit beim Vorliegen einer Speichelmatrix waren auf niedrigere Wiederfindungen und den Einfluss der Matrix zurückzuführen.

7.9.6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode mit ausreichender Nachweis- und Bestimmungsgrenze und kurzer Analysenzeit entwickelt, um die Metaboliten des Amfepramons identifizieren und quantifizieren zu können. Mit dieser Methode ist eine Unterscheidung durch den Nachweis des Ethylaminopropiophenons möglich, ob die Person die Droge Kath oder einen Appetitzügler mit Amfepramon konsumiert hat.

Die entwickelte Methode Amfe2.M wies eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze (0,06-0,1 µg/ml) auf als die von Ku et al.¹¹⁷ publizierte kapillarelektrophoretische Methode (0,4 µg/ml). Die Wiederfindung und „Interday“ Präzisionsergebnisse dieser Methoden waren vergleichbar.

Die Metabolite reichern sich im Speichel (s. S. 125/126) im Gegensatz zum Plasma (23-35 ng/ml¹¹⁸) an. Da Ethylaminopropiophenon (pK_a-Wert 7,1) bei einem Blut-pH-Wert von 7,4 zu 67 % als nichtionisierte, gut lipidlösliche freie Base vorliegt und im Speichel zu über 80 % ionisiert, konnte sich dieses von den Metaboliten bevorzugt im Speichel anreichern. Zusätzlich weist Ethylaminopropiophenon die höchste Konzentration im Plasma auf.

7.9.7 Racemattrennung mit Cyclodextrinen

7.9.7.1 Einführung

In der Trennung von racemischen Gemischen hat die Kapillarelektrophorese eine immer größere Bedeutung erlangt. In vielen Labors wird die Kapillarelektrophorese der chiralen flüssigchromatographischen Trennung vorgezogen, weil letztere teure Spezialsäulen voraussetzt. Zur Analytik mit der Kapillarelektrophorese werden meist Cyclodextrine eingesetzt, die dem Puffer hinzugegeben werden und darin gelöst vorliegen. Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide mit 6, 7 oder 8 Glucoseeinheiten. Das α -Cyclodextrin besteht aus sechs, das β -Cyclodextrin aus sieben und das γ -Cyclodextrin aus acht Glucoseeinheiten. Sie bilden einen optisch aktiven, hydrophoben Hohlraum, in den kleine Moleküle oder Molekülteile eindringen können. Der Cyclodextrinzusatz ermöglicht die Trennung optischer Isomere (Enantiomere), wenn die Enantiomere unterschiedlich lang mit dem Cyclodextrin assoziieren²⁰. Die unterschiedlich lange Assoziation führt zur Änderung der Migrationszeiten der jeweiligen Enantiomere. Ist das Cyclodextrin ungeladen, so wird die Geschwindigkeit erniedrigt. Bei der Verwendung von geladenen Cyclodextrinen können die Analytionen abgebremst oder beschleunigt werden. Durch die Optimierung des pH-Wertes und der Cyclodextrinkonzentration wird Einfluss auf die Trennung genommen.

In den letzten Jahren wurde die enantioselektive Kapillarelektrophorese extensiv für Arzneistoffe und deren Metaboliten in biologischen Proben betrieben¹¹⁹⁻¹²¹. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Trennung der Amfepramonmetaboliten in deren Enantiomere, mit Hilfe eines Cyclodextrins, entwickelt.

7.9.7.2 Methodenentwicklung und Ergebnisse

Die synthetisierten Substanzen Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin sowie das Ethylaminopropiophenon und Amfepramon liegen als Racemate vor. Das Ziel der kapillarelektrophoretischen Methodenentwicklung war, die einzelnen Substanzen mit ausreichender Auflösung in einer kurzen Analysenzeit in die Enantiomere zu trennen. Dazu wurden folgende Cyclodextrine getestet:

- 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrin in 120 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,1 (10 mg/ml)
- β -Cyclodextrin in 120 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,1 (15 mg/ml)
- (2-Hydroxy)-propyl- β -cyclodextrin in 120 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,1 (10 mg/ml)

Für die Analysen wurde die Methode Amfe2.M mit einer längeren Analysenzeit und einer veränderten Präkonditionierung unter Einsatz der oben genannten Cyclodextrine verwendet. Es zeigte sich, dass die veränderte Methode Amfe2.M (= Amfe4.M, S. 176) mit dem Cyclodextrin 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrin in 120 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,1 (10 mg/ml) das beste Ergebnis lieferte. Das β -Cyclodextrin führte zu keiner vollständigen Basislinientrennung des Diethylnorephedrins und Ethylaminopropiophenons. Die Messungen mit dem (2-Hydroxy)-propyl- β -cyclodextrin ergaben die schlechtesten Auflösungen zwischen den untersuchten Substanzen.

Im Bild 7.26 sind die Elektropherogramme der Trennungen der Racemate Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin in deren Enantiomere, unter Verwendung des 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrin, abgebildet. Durch das Zudotieren der synthetisierten *1R,2S*-Enantiomere des Ethylnorephedrins und Diethylnorephedrins zu dem jeweiligen Racemat konnte eine Zuordnung der Peaks zu den Enantiomeren vorgenommen werden.

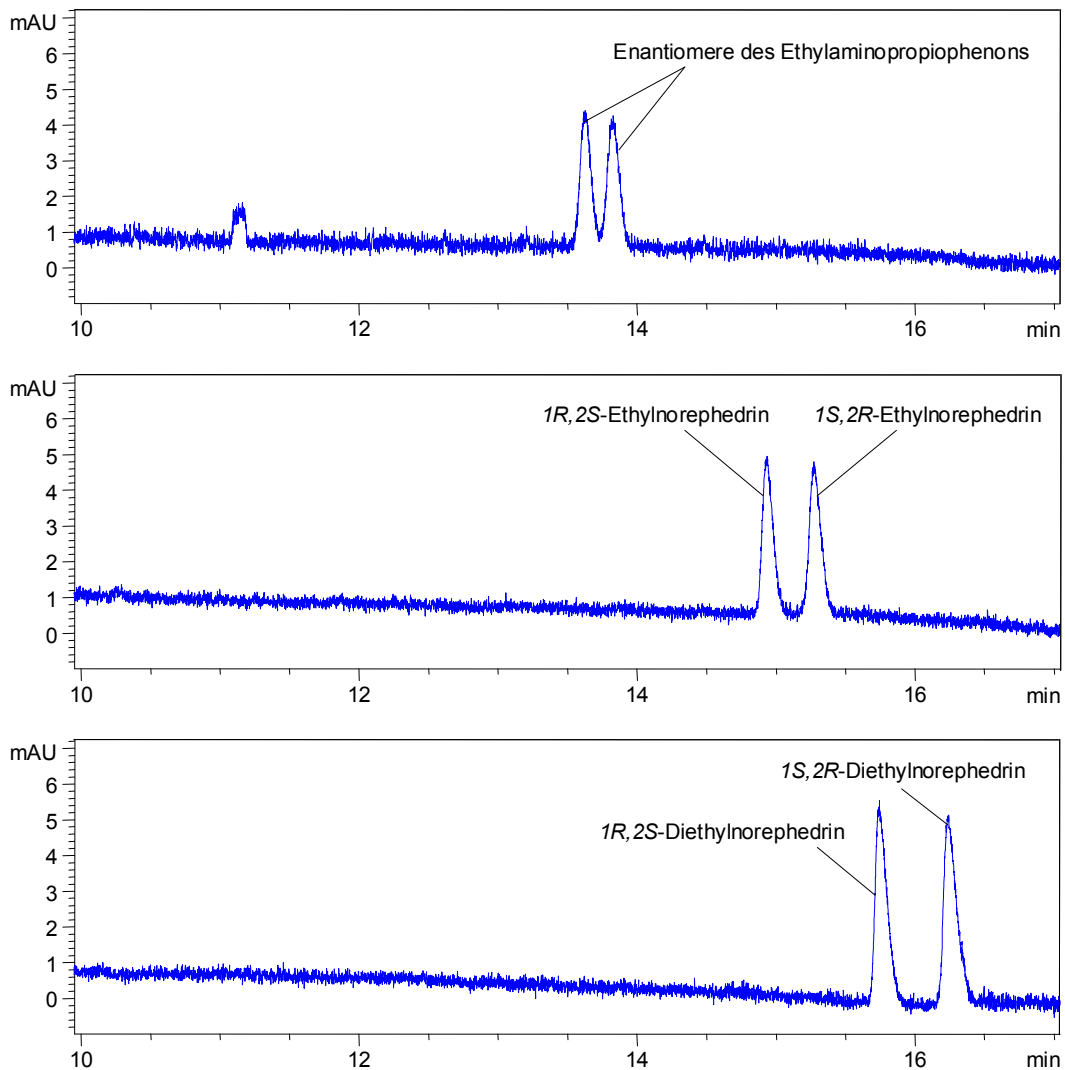


Bild 7.26: Trennungen der Racemate in deren Enantiomere: oben: Ethylaminopropiophenon; mitte: Ethylnorephedrin; unten: Diethylnorephedrin 1,0 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure; Methode: Amfe4.M

Durch das Zudotieren der synthetisierten *1R,2S*-Enantiomere des Ethylnorephedrins und Diethylnorephedrins zu dem jeweiligen Racemat konnte eine Zuordnung der Peaks zu den Enantiomeren vorgenommen werden. Die Analyse (Methode Amfe4.M) des Gemisches Amfepramon, Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin zeigte eine Überlagerung des einen Enantiomers des Amfepramons mit dem *1R,2S*-Ethylnorephedrin (Bild 7.27, S. 139).

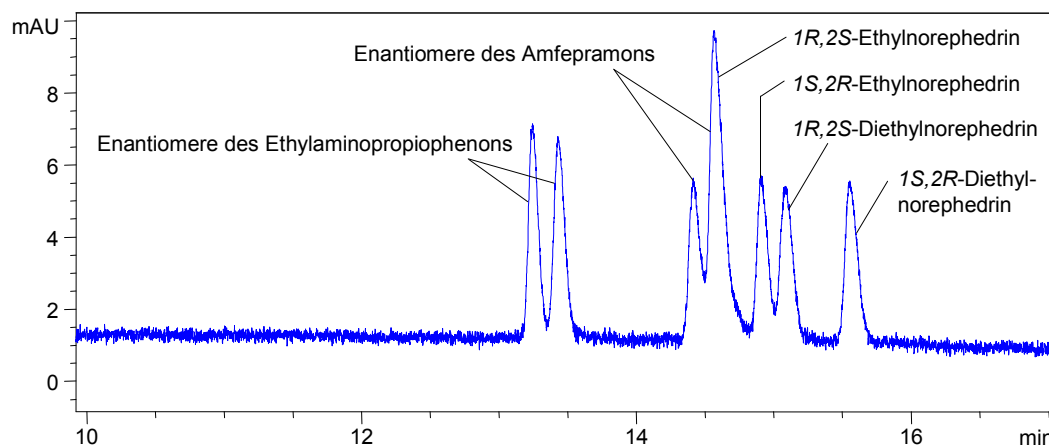


Bild 7.27: Elektropherogramm des Amfepramons und dessen Metaboliten mit der Methode Amfe4.M

Da sich die für die Arzneistoffmetabolitenuntersuchung wichtigen Substanzen mit dem 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrin in 120 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,1 in ihre Enantiomere trennen ließen, sollte eine separate Methode für die Trennung der Enantiomere des Amfepramons entwickelt werden. Dazu wurde die Methode Amfe4.M bezüglich der Spannung (12 kV) und des Puffers [2,6 Di-*O*-methyl- β -cyclodextrin in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer pH 2,5 (10 mg/ml)] abgeändert und die Temperatur (15 °C und 25 °C) variiert. Die Enantiomere des Amfepramons waren bei einer Temperatur von 15 °C zu trennen.

Zusätzlich zur Überlagerung eines Amfepramonenantiomers mit dem *1R,2S*-Ethylnorephedrin wies das Elektropherogramm im Bild 7.27 keine vollständige Basislinientrennung zwischen dem *1S,2R*-Ethylnorephedrin und dem *1R,2S*-Diethylnorephedrin auf.

Die Erhöhung der Temperatur auf 25 °C (Methode: Amfe5.M, S. 176) führte zu einer besseren Auflösung ($R = 0,52$ statt $R = 0,39$)* dieser Enantiomere (Bild 7.28), so dass die Methode Amfe5.M für die weiteren Untersuchungen der Speichelproben verwendet wurde.

* Die Auflösung (R) wurde nach folgender Formel berechnet:
$$R = \frac{2(MT_2 - MT_1)}{(PW_1 + PW_2)}$$

mit MT_1 für die Migrationszeit des 1. Peaks, MT_2 für die Migrationszeit des 2. Peaks, PW_1 für die Peakbreite des 1. Peaks und PW_2 für die Peakbreite des 2. Peaks.

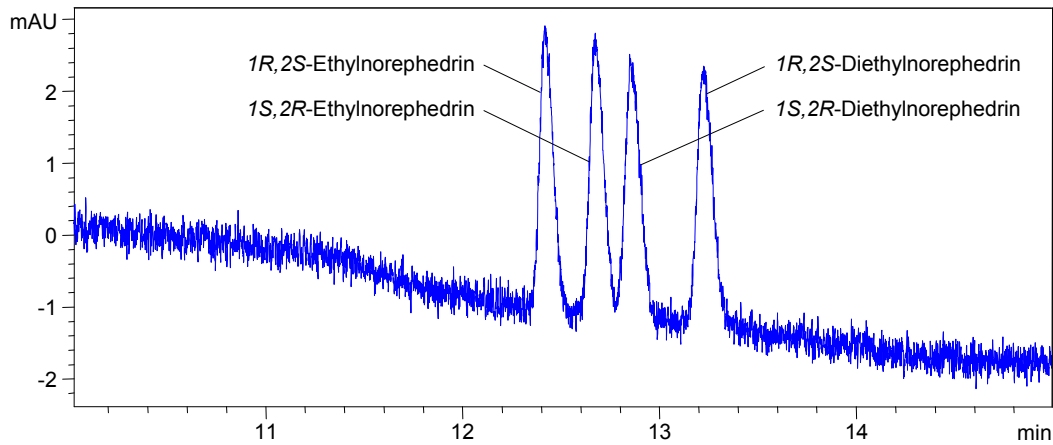


Bild 7.28: Enantiomere des Ethyl- und Diethylnorephedrins 1,2 µg/ml in 0,1 mM Phosphorsäure; Methode: Amfe5.M

7.9.7.3 Diskussion

Mit der entwickelten Methode war es möglich die Metaboliten in einer kurzen Analysenzeit in ihrer Enantiomere zu trennen. Durch das Zudotieren der synthetisierten *1R,2S*-Enantiomere des Ethylnorephedrins und Diethylnorephedrins zu den entnommenen Speichelproben war festzustellen, dass diese Enantiomere nicht im Speichel nachzuweisen waren. Es war anzunehmen, dass *1S,2S*-Diethylnorephedrin und *1S,2S*-Ethylnorephedrin in den Speichel permeierten, da diese mit der höchsten Konzentration im Plasma erschienen.

Banci et al.¹²² untersuchten Urin zur Bestimmung der Exkretion der Amfepramonmetaboliten. Es wurden Urinuntersuchungen im sauren pH-Bereich durchgeführt, da die tubulären Reabsorptionen von basischen Substanzen in diesem pH-Bereich minimiert waren. Die Exkretionsrate war somit proportional zur Plasmakonzentration.

Diethylnorephedrin erschien zu 80 % als *1S,2S*-Enantiomer, zu 18 % als *1R,2R*-Enantiomer, zu 2 % als *1S,2R*-Enantiomer und *1R,2S*-Enantiomer. Ethylnorephedrin war zu 58 % als *1S,2S*-Enantiomer, zu 20 % als *1R,2R*-Enantiomer, zu 15 % als *1S,2R*-Enantiomer und zu 7 % als *1R,2S*-Enantiomer nachzuweisen.

Zur Synthese wurde das Racemat bzw. das (*1R,2S*)-(-)-Norephedrin ausgewählt, weil die *1S,2S*-Enantiomere bzw. *1R,2R*-Enantiomere des Norephedrins nur mit hohen Kosten hätten bezogen werden können. So wurden die Metabolite *1R,2S*-Ethylnorephedrin und *1R,2S*-Diethylnorephedrin synthetisiert, um bei der Analyse des Speichels eine Zuordnung der möglichen Enantiomere der Metaboliten treffen zu können.

8. Synthese der Amfepramon Metaboliten

Für die Referenzmessungen wurden die Metabolite Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin jeweils als Racemate und als *1R,2S* Enantiomere synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Grundlage für die Darstellung beider Metaboliten die Synthesevorschrift von Soai et al.¹²³ angewendet.

8.1 Darstellung von Ethyl- und Diethylnorephedrin

Für die Synthese wurde das DL-Norephedrinhydrochlorid neben dem (*1R,2S*)-(-)-Norephedrin verwendet. Bei DL-Norephedrinhydrochlorid handelt es sich um das Racemat bestehend aus dem *1S,2R*- und *1R,2S*-Enantiomer.

Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin wurden durch den Einsatz von verschiedenen molaren Ansatzverhältnissen von DL-Norephedrinhydrochlorid bzw. (*1R,2S*)-(-) Norephedrin mit Ethyliodid synthetisiert (Ethylnorephedrin 1:2; Diethylnorephedrin 1:15). Die Umsetzung erfolgte mit DL-Norephedrinhydrochlorid bzw. (*1R,2S*)-(-)-Norephedrin, Ethyliodid, Kaliumcarbonat und Ethanol. Die Ansätze wurden für vier Stunden unter Rückfluss erhitzt (S. 268). Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf sechs Stunden erbrachte keine Verbesserung der Umsetzung. Nach dem Rückflusserhitzen wurde der Ansatz filtriert und säulenchromatographisch gereinigt. Auf diese Weise konnte Ethylnorephedrin in Form weißer Kristalle sowie Diethylnorephedrin als gelbes Öl mit Ausbeuten zwischen 34 und 41 % erhalten werden.

8.2 Überprüfung der Reinheit

Zur Überprüfung der Reinheit der synthetisierten Substanzen wurde eine HPLC-Methode mit einer kurzen Retentionszeit und ausreichender Auflösung entwickelt. Als Fließmittel wurde das von Okamura et al.¹²⁴ verwendete Gemisch aus Acetonitril und 14 mM Natriumdodecylsulfatlösung im Verhältnis 35:65 zur Trennung von Ephedrin, Pseudoephedrin, Norephedrin und Methylephedrin eingesetzt.

Der Natriumdodecylsulfatzusatz bewirkte, dass die Dissoziation der Substanzen minimiert wurde. Mit diesem Fließmittel war eine Auftrennung der Substanzen Norephedrin, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin möglich. Zur Verkürzung der Retentionszeiten wurde ein Volumenverhältnis von 50:50 14 mM Natriumdodecylsulfatlösung und Acetonitril gewählt. Es entstand eine reproduzierbare Methode mit einer nach Gauß normal verteilten Streuung der Migrationszeiten um einen Mittelwert ($n = 6$) (Norephedrin: $V_k = 0,34$ %; Ethylnorephedrin: $V_k = 0,5$ %; Diethylnorephedrin: $V_k = 0,61$ %), mit einer kurzen Retentionszeit und guter

Auflösung. Unter Einsatz eines Dioden-Array-Detektors (DAD) konnte über den gesamten Zeitraum der Chromatographie ein komplettes UV-Spektrum aufgezeichnet werden, welches zusätzliche Informationen zur Reinheit lieferte. Die Substanzen Norephedrin, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin erschienen im Chromatogramm (Methode S. 268) nach 3,6, 5,3 bzw. 6,9 Minuten. Beim Vergleich der Retentionszeiten und bei Betrachtung der aufgenommenen UV-Spektren im Wellenlängenbereich 200 bis 400 nm konnten die Reinheiten der synthetisierten Produkte bestätigt werden.

Zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit wurden die synthetisierten Substanzen Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin aus (*1R,2S*)-Norephedrin mit der kapillarelektrophoretischen Methode Amfe4.M (S. 176), unter Verwendung des 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrins in 120 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,1 (10 mg/ml), vermessen. Bis zur Nachweisgrenze von 0,1 μ g/ml war keine Auftrennung in die einzelnen Enantiomere festzustellen. Mit der Methode Amfe4.M konnten nur die synthetisierten Enantiomere (*1R,2S*)-Ethylnorephedrin bzw. (*1R,2S*)-Diethylnorephedrin nachgewiesen werden.

9. Diskussion

9.1 Speicheluntersuchungen

Arzneistoffe und deren Metaboliten müssen bestimmte Eigenschaften aufweisen, damit sich die Konzentrationen zwischen Blut und Speichel in kurzer Zeit angleichen und die Speichelkonzentrationen als repräsentativ für die freie Plasmakonzentration angesehen werden können. Entscheidend für die Sekretion der Substanzen in den Speichel waren die Säure-Base-Eigenschaften der Substanzen, der pH-Wert des Speichels, der Proteinbindungsanteil der jeweiligen Substanz, die Plasmakonzentrationen der Substanzen und die Lipophilie. Arzneistoffe werden durch die Metabolisierung in hydrophilere, ausscheidbare Stoffe umgewandelt. Dies hatte zur Folge, dass einige Phase I-Metaboliten der Arzneistoffe sowie Phase II-Metaboliten aufgrund der polareren Struktur nur erschwert in den Speichel permeierten. Des Weiteren wiesen Arzneistoffe (z.B. Doxylamin, Dextromethorphan, Nicotin) sehr niedrige Plasmakonzentrationen auf, so dass die Konzentrationen der Substanzen im Speichel unter den Nachweisgrenzen der kapillarelektrophoretischen Methoden lagen.

Es zeigte sich, dass die Säure-Base-Eigenschaften der Substanzen Einfluss auf deren Anreicherung im Speichel hatten. Schwach saure Substanzen erreichten im Speichel vergleichbare Konzentrationen wie im Plasma (z.B. Paracetamol) und basische Substanzen wiesen sogar eine Anreicherung im Speichel auf (z.B. Diphenhydramin, die Amfepramon-Metabolite).

9.2 Probenvorbereitung

Die mit Salivetten[®] gewonnenen wasserklaren Speichelproben hatten den Vorteil, dass sie eine niedrige Viskosität aufwiesen und keine Schaumbildung auftrat. So konnten die Proben nach der Entnahme direkt weiter aufbereitet und vermessen werden.

Eventuell zu erwartende Adsorptionseffekte an der Watterolle wurden bei den Bestimmungen der Konzentrationen vernachlässigt.

Proteinfällung

Die Proteinfällung mit einer anschließenden Direktinjektion war nur begrenzt einsetzbar, da diese nicht zu einer effektiven Abtrennung der Speichelmatrix führte. Bei den Substanzen Paracetamol, Ibuprofen und Ambroxol war es mit der kapillarelektrophoretischen Methode nicht möglich, nach einer Proteinfällung eine ausreichende Trennung der Matrix von den gewünschten Substanzen zu erreichen. Die Variationen der Volumenverhältnisse bzw. die Ver-

wendung verschiedener Fällungsmittel brachten keine Verbesserung der Ergebnisse. Da die Matrix nur bei einer Wellenlänge von 200 nm detektiert wurde, konnten die Auswertungen bei einer anderen Wellenlänge (z.B. Ibuprofen 235 nm, Paracetamol 245 nm) erfolgen bzw. die Festphasenextraktion wurde zur Abtrennung der störenden Matrix verwendet.

Die Proteinfällung war mit geringerem Zeitaufwand und niedrigeren Kosten verbunden und verhinderte Substanzverluste, wie sie bei der Festphasenextraktion auftraten. Bei der Proteinfällung zeigten sich aber deutlichere Streuungen der Messwerte und höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen als bei den Methoden mit einer Festphasenextraktion.

Die Validierungen der Methoden für die Untersuchungen von Salicylsäure im Speichel zeigten den Einfluss der Speichelmatrix, die zu Wiederfindungen von über 100 % und schwankenden Werten führte (Streuungen der Flächenwerte zwischen 1 % und 4,6 %; Abweichungen der Migrationszeiten zwischen 1 % und 7 %). Es traten ausgeprägte, unkontrollierte Adsorptions- und Desorptionsvorgänge der Speichelmatrix an der Kapillarenwand auf, die Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit der Flächen und Migrationszeiten der Analyten hatten.

Als sehr gute reproduzierbare Methode mit einer Direktinjektion erwies sich die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC), die unkontrollierte Adsorptionen an der Kapillarenwand deutlich minimierte. Es wurden wesentlich geringere Schwankungen der Flächen und Migrationszeiten sowie eine geringere relative Verfahrensstandardabweichung erreicht. Zusätzlich wies die Methode eine gute Wiederfindung und Richtigkeit auf. Der Einsatz der MEKC-Methode wurde nur durch hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen eingeschränkt.

In der vorliegenden Arbeit sollten Substanzen in sehr niedrigen Konzentrationen reproduzierbar quantifiziert werden (im Nanogramm-Bereich), so dass bei den überwiegenden Analysen die Direktinjektion nach einer Proteinfällung bzw. die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie zu hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aufwiesen.

Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion erwies sich als ein wichtiger Schritt zur Probenvorbereitung, um die Speichelmatrix effektiv zu minimieren. Dies war notwendig, um niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Analyten zu erreichen. Für die Speicheluntersuchungen wurde eine allgemeine Festphasenextraktion über „Bond Certify[®]“ bzw. „Strata X-C[®]“ Kartuschen entwickelt, die nur für einige Substanzen in wenigen Schritten verändert wurden. Durch wenige Variationen der Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ oder

„Strata X-C[®]“ Kartuschen konnten die bestmöglichen Wiederfindungen für die einzelnen Substanzen erreicht werden.

Für den Arzneistoff Amfepramon und dessen Metaboliten wurde eine andere Extraktion für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartusche angewendet, welche sich als eine akzeptable Alternative zu der allgemeinen Extraktion für basische Substanzen erwies.

Für die Arzneistoffe Ephedrin und Nicotin wurden noch weitere Festphasenextraktionsvarianten mit „CBA[®]“, C-18- bzw. „Focus[®]“-Kartuschen durchgeführt, um eine optimale Probenaufbereitung zu entwickeln. Die Extraktionsvariationen mit anderen Kartuschenmaterialien führten aber zu keiner Steigerung der Nachweisgrenze.

Für die Extraktionen des Nicotins konnte kein Elutionsmittel mit ausreichender Elutionskraft gefunden werden, das bei den kapillarelektrophoretischen Messungen eine akzeptable Nachweisgrenze nach einer Direktinjektion des Elutionsmittels aufwies. Es war notwendig, die Probe nach der Elution einzuengen und in 0,1 mM Phosphorsäure aufzunehmen, um niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

Die Festphasenextraktionen zeigten im Gegensatz zur Proteinfällung Substanzverluste. Diese führten aber zu keiner Beeinträchtigung der Methode, da gezeigt werden konnte, dass die Festphasenextraktionen zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Die Wiederfindungen der Festphasenextraktionen können durch zu langes Trocknen der Kartuschen, einem Elutionsmittel mit zu geringer Elutionskraft sowie durch das Einengen reduziert werden. Für die Extraktion konnte nicht immer ein Elutionsmittel mit maximaler Elutionskraft verwendet werden, da die Sorbentien der „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen einen pH-Stabilitätsbereich von 2 bis 8 aufweisen. Die Praxis zeigte, dass bei den „Bond Elut Certify[®]“ (SCX/C-8) Kartuschen ein Elutionsmittel mit dem pH-Wert 10 eingesetzt werden konnte, da bei einer einmaligen Anwendung der Kieselgelträger nicht hydrolysierte.

Um den Verlust beim Trocknen des Sorbens der Kartuschen zu minimieren, mussten kurze Trocknungszeiten gewählt werden. Dieser Schritt sollte nicht übergangen werden, da das Trocknen unabdingbar ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Eine nicht messbare Einflussgröße beim Trocknen war der angelegte Unterdruck an die Kartuschen auf der Vakuumkammer, so dass beim Trocknen Druckschwankungen von Kartusche zu Kartusche aufgetreten sein können.

Zusätzlich war bei der Anwendung der Vakuumstation der Durchfluss durch die Säulen nur schwer regulierbar und könnte von Probe zu Probe stark abweichen. Um eine gleichmäßige Behandlung aller Proben (u.a. durch konstante Flussraten in allen Schritten), eine Verringerung von Arbeitsfehlern (z.B. beim Pipettieren, kein Trockenlaufen) sowie höhere Pro-

bedurchsätze zu erreichen, ist eine Automatisierung der Festphasenextraktion empfehlenswert. Es gibt automatisierte Festphasenextraktionssysteme, die mit positivem Druck arbeiten. Dadurch stellt sich bei allen Pipettierschritten ein konstanter, einstellbarer und reproduzierbarer Fluss durch die Kartuschen ein, wodurch verbesserte Präzisionen und Richtigkeiten erreicht werden können. Die automatisierten Extraktionsverfahren zeigen minimierte schwankende Wiederfindungen und eine verbesserte Robustheit der Methoden (insbesondere bei verschiedenen Untersuchungslaboratorien).

9.3 Kapillarelektrophorese

Es sollte herausgefunden werden, ob allgemein gültige Methoden existieren, die in der Praxis zuverlässig für Metabolismusuntersuchungen von sauren und basischen Arzneistoffen im Speichel eingesetzt werden können. Es wurde jeweils eine Methode für saure, schwach saure und basische Arzneistoffe entwickelt. Dies waren die Ausgangsmethoden, die für die einzelnen sauren, schwach sauren bzw. basischen Arzneistoffe durch wenige Variationen weiter optimiert wurden.

Die kapillarelektrophoretische Methode mit 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 für schwach saure Substanzen wies vergleichbare Ergebnisse auf wie die Methoden zur Analyse von sauren Arzneistoffen nach einer Proteinfällung. Die Methoden für saure und schwach saure Arzneistoffe mit 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 zeigten eine geringere Reproduzierbarkeit der Flächen und Migrationszeiten. Durch Adsorptionen der Matrix an der Kapillareninnenwand werden die für den elektroosmotischen Fluss verantwortlichen Silanolgruppen blockiert. Dadurch trat ein schwankender elektroosmotischer Fluss auf, der die Migration der Analytionen beeinflusste. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen waren bei diesen Methoden höher als bei der Ausgangsmethode Phep.M für basische Substanzen mit einem 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5.

Die Methode Phep.M erwies sich als sehr leistungsfähig, präzise und reproduzierbar, so dass diese Methode für die basischen Arzneistoffe mit teilweise geringen Variationen angewendet wurde. Als Injektionsart wurde die elektrokinetische Injektion mit einer hydrodynamischen Injektion kombiniert, da diese Injektionsvariation gute reproduzierbare Flächenwerte aufwies. Durch einen kurzen Druckimpuls auf das Probenvial nach der elektrokinetischen Injektion wurde ein Verlust des Analyten durch Konvektion oder Tropfenbildung an dem Kapillarende verhindert.

Während der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass die Reproduzierbarkeit für die Flächen und Migrationszeiten verbessert werden konnte, wenn die Kapillarenden nicht von der Polyimidbeschichtung befreit wurden. Es wird angenommen, dass unregelmäßige Adsorptions- und Desorptionsvorgänge an den Kapillarenden stattfanden.

Der verkürzte Strahlengang der Kapillarelektrophorese führt zu einer schlechteren Konzentrationsempfindlichkeit als bei der HPLC. Um die Konzentrationsempfindlichkeit zu steigern, wurde bei den überwiegenden Methoden das „Sample Stacking“ eingesetzt. Dadurch konnten verbesserte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Kapillarelektrophorese erreicht werden. Das eingesetzte „Sample Stacking“ ermöglichte eine genauere Peakintegration, da die Peaks steilere Flanken aufwiesen und sich somit deutlicher von der Matrix abhoben.

Einige Arzneistoffe (z.B. Ibuprofen, Doxylamin, Dextromethorphan, Nicotin) sowie manche Metaboliten wiesen so niedrige Konzentrationen auf, dass diese unter den Nachweisgrenzen der kapillarelektrophoretischen Methoden lagen. Durch die Probenvorbereitung und durch den Einsatz einer „Stacking Technik“ konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methoden nicht so weit abgesenkt werden, dass diese niedrigen Konzentrationen mittels DAD detektierbar wurden.

Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind der Einsatz der CE/MS-Analytik oder eine Vergrößerung der Schichtdicke durch blasenförmige Aufweitungen der Kapillaren bzw. durch die Verwendung von Z-förmigen Kapillaren. Die publizierte kapillarelektrophoretische Methode von Kristensen⁹⁸ zur Quantifizierung von Dextromethorphan und dessen Metaboliten im Plasma wies durch den Einsatz einer blasenförmig aufgeweiteten Kapillare (bubble-Zelle; Schichtdicke 1,2 mm) eine Nachweisgrenze von 0,5-1 ng/ml. Nachteile dieser Kapillaren sind schlechtere Reproduzierbarkeiten durch Blasenbildung an den Ecken bzw. Verengungen sowie auftretende Auflösungsverluste. Zusätzlich ist der Preis für diese Kapillaren sehr hoch.

Vergleiche der entwickelten kapillarelektrophoretischen Methoden mit publizierten Methoden (HPLC, GC, CE) zeigten, dass eine verbesserte Reproduzierbarkeit, Wiederfindung, Korrelation der Messwerte, kürzere Analysenzeiten bzw. niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden konnten.

Um die Reproduzierbarkeit der Methoden für die Speicheluntersuchungen zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, die Kapillare nach ca. 150-200 Analysen zu erneuern.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Temperatur der Kapillare und des Labors Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit nahmen. Entstehende Temperaturunterschiede in der Kapillare führten zu einem Viskositätsgradient im Puffer, wodurch Substanzen in der Kapillarmitte schneller als

an der Kapillarwand wanderten. Um die effektive Kühlleistung der Kapillarelektrophorese zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, in klimatisierten Räumen von 20 °C zu arbeiten.

9.4 Validierung

Im Rahmen der Methodenentwicklung zur Analyse eines Arzneistoffes und dessen Metaboliten im Speichel bzw. Urin musste die Eignung und Zuverlässigkeit der Methode nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen der Selektivität bzw. Spezifität zeigten bei allen analysierten Substanzen keine Beeinträchtigungen durch Signale der Matrix. Es konnte kein Einfluss von individuell abweichend zusammengesetzten Speichelproben auf die Selektivität bzw. Spezifität der Arzneistoffe oder deren Metaboliten festgestellt werden.

Der Vergleich der Validierungen ohne und mit Speichelmatrix (S. 135) zeigte deutlich den Einfluss der Matrix auf die Ergebnisse. Ohne die Speichelmatrix wurden bessere Korrelationen der Messgrößen, niedrigere Streuungen der Messwerte um die Regressionsgeraden, verbesserte Reproduzierbarkeiten sowie höhere Empfindlichkeiten und niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht.

Die MEKC-Methode wies von allen entwickelten kapillarelektrophoretischen Methoden dieser Arbeit die niedrigste relative Verfahrensstandardabweichung (1,1 %) auf. Der SDS-Zusatz führte dazu, dass Adsorptionen an der Kapillarinnenwand minimiert wurden.

Die kapillarelektrophoretischen Methoden mit vorheriger Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung zeichnen sich durch eine niedrigere relative Verfahrensstandardabweichung (2 bis 3 %) aus als die Methoden mit vorheriger Proteinfällung (4,6 bis 5,7 %).

Die Validierungen der Methoden für die Speicheluntersuchungen wiesen für bioanalytische Analysenverfahren zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse auf. Die ermittelten Werte lagen unter den Fehlergrenzen der FDA-Richtlinie für bioanalytische Analysenverfahren.

9.5 Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Einnahme verschiedener Arzneistoffe mit unterschiedlichen Säure-Base-Eigenschaften und anschließenden kapillarelektrophoretischen Speicheluntersuchungen ein pK_a -Wert bestimmt, ab dem ein Arzneistoff bzw. dessen Metaboliten in den Speichel permeieren. Es konnte festgestellt werden, dass Metabolite eines basischen Arzneistoffes mit einem pK_a -Wert über 8,5 im Speichel kapillarelektrophoretisch nachweisbar waren. Eine Ausnahme zeigte Diphenhydramin (pK_a 9,0). Bei basischen Arzneistoffen mit pK_a -Werten unter 8,5 war nur die unmetabolisierte Substanz im Speichel zu identifizieren.

Ausnahmen traten bei den Speicheluntersuchungen auf, da neben dem pK_a -Wert der Proteinbindungsanteil, die Plasmakonzentration der jeweiligen Substanz und die Lipophilie für den Nachweis im Speichel entscheidend waren.

Dies war ebenfalls für die sauren Arzneistoffe festzustellen, bei denen der Nachweis der Metaboliten von der Konzentration, dem nicht an Proteine gebundenen Anteil sowie von der Lipophilie abhängig war. Für die sauren Arzneistoffe konnte kein pK_a -Grenzwert bestimmt werden, ab dem ein Nachweis von Metaboliten im Speichel möglich ist.

Die unmetabolisierte Form des schwach sauren Arzneistoffes erreichte vergleichbare Konzentrationen im Speichel wie im Plasma.

Unterschiede bei den Speichelkonzentrationen und den Zeitpunkten der maximalen Konzentrationen wurden zusätzlich durch Nahrungsmittel, verschiedene Resorptionsraten, Art des Geschlechts und durch unterschiedliche Speichel-pH-Werte hervorgerufen.

Nach Betrachtung der genannten Kriterien kann eine Vorhersage getroffen werden, ob der Arzneistoff mit seinen Metaboliten im Speichel identifizierbar und quantifizierbar ist.

Eine weitere zentrale Aufgabe dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden, die einen möglichst einfachen Nachweis von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Speichel mit der Kapillarelektrophorese ermöglichen sollen. Es konnte für saure, schwach saure bzw. basische Arzneistoffe und deren Metaboliten jeweils eine allgemeine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt werden, die für einzelne Substanzen (z.B. Ambroxol, Ephedrin) mit wenigen Variationen abgewandelt wurde, um niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie kurze Analysenzeiten mit ausreichender Auflösung zu erreichen. Die Kapillarelektrophorese ist ein einfach zu handhabendes analytisches Gerät, an dem schnelle Methodenanpassungen vorgenommen werden können. In der Routineanalytik sollten diese speziellen Methodenanpassungen für einen Arzneistoff und dessen Metaboliten keine Schwierigkeiten bereiten.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich auch die Möglichkeit, die beschriebenen Methoden mit einer ausreichenden Nachweis- und Bestimmungsgrenze für mehrere Substanzen anzuwenden (z.B. Phep.M und Pseu1.M). Während einer Routineuntersuchung ist in diesen Fällen eine Umstellung auf eine andere Methode nicht notwendig.

Die Bestätigung für die Zuverlässigkeit der entwickelten kapillarelektrophoretischen Methoden wurde durch die Validierung dieser Methoden erbracht. Die Matrixeinflüsse konnten durch die Probenvorbereitung mit der Festphasenextraktion minimiert werden. Es wird empfohlen, dass die in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethoden zur Minimierung der Substanzverluste und zur routinemäßigen Anwendung automatisiert werden.

Da die CE/MS-Analytik zunehmend an Bedeutung erlangt, könnten die entwickelten CE-Methoden auf diese Technik übertragen werden, um die Selektivität zu erhöhen und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen weiter zu erniedrigen.

Die kapillarelektrophoretischen Methoden dieser Arbeit können in verschiedenen potentiellen Einsatzbereichen, z.B. in der Diagnostik, zur Überprüfung der Compliance der Patienten, bei gerichtsmedizinischen Untersuchungen sowie bei klinischen Prüfungen eingesetzt werden. Speicheluntersuchungen können für kontrollierte Studien zur Arzneimittelzulassung für das Kindesalter verwendet werden. Viele bei Kindern eingesetzte Medikamente wurden bisher nur an Erwachsenen getestet. Bei sorgfältiger Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses sind klinische Studien mit Kindern unabdingbar, da der kindliche Organismus anders auf bestimmte Wirkstoffe reagiert als der von Erwachsenen. Es wird empfohlen, anhand der Eigenschaften der Arzneistoffe eine Auswahl unter den häufig verordneten Arzneimitteln für Kinder zu treffen. Mit diesen ausgewählten Arzneimitteln könnten klinische Studien mit Kindern unter Verwendung der erarbeiteten kapillarelektrophoretischen Methoden durchgeführt werden, um die richtigen Dosierungen und Einnahmehäufigkeiten festzustellen.

Außerdem können Speichelproben bei Prüfungen im Straßenverkehr eingesetzt werden, wie z.B. bei dem beschriebenen Fall (S. 121) der Einnahme des Appetitzüglers Amfepramon.

Die EU-Kommission hatte im Jahr 2000 angeordnet, dass Zubereitungen mit Amfepramon, Norpseudoephedrin, Phentermin, Clobenzorex, Fenproporex, Mefenorex und Phendimetrazin vom Markt genommen werden müssen. Im Jahr 2001 wurde diese Entscheidung vom Europäischen Gerichtshof für die Zulassungen der Appetitzügler, mit den Wirkstoffen Norpseudoephedrin, Mefenorex und Amfepramon, aufgehoben. Da der Konsum der Droge Khat in den letzten Jahren stieg, ist eine schnelle, sichere Analytik zur Differenzierung zwischen der Droge und dem Appetitzügler Amfepramon wichtig, um Verwechslungen bei den Untersuchungen zu minimieren. Mit der entwickelten kapillarelektrophoretischen Methode ist eine Unterscheidung durch den Nachweis des Ethylaminopropiophenons in einer kurzen Analysenzeit möglich, ob die Person die Droge Khat oder einen Appetitzügler mit Amfepramon konsumiert hat.

Es ist zu erwarten, dass sich in den nächsten Jahren die kapillarelektrophoretischen Methoden in den potenziellen Einsatzbereichen immer mehr etablieren, da sich die Methoden als sehr zuverlässig und reproduzierbar erwiesen und die Kapillarelektrophorese u.a. die Vorteile der hohen Auflösung sowie kleinen theoretischen Trennstufenhöhen aufweist.

10. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden kapillarelektrophoretische Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Speichel entwickelt.

Ziel der Arbeit war es, Speichel als Matrix für Metabolismusstudien zu etablieren, indem einfache Probenvorbereitungen und zuverlässige kapillarelektrophoretische Methoden für die Untersuchungen von Speichel entwickelt wurden. Speichel als Matrix ist für die Arzneistoff- bzw. Metabolitenuntersuchungen von Bedeutung, da er immer die momentanen Wirkstoffkonzentrationen zum Sammelzeitpunkt enthält und ohne invasiven Eingriff auch dann gewonnen werden kann, wenn die Entnahme von Blut oder Urin nicht möglich ist (z.B. bei Verkehrskontrollen).

Die Analysen dieser Arbeit wurden mit der Kapillarelektrophorese durchgeführt, da diese Vorteile gegenüber anderen analytischen Methoden aufweist. Die Kapillarelektrophorese ermöglicht ein automatisiertes Arbeiten mit kleinsten Probenmengen bei einem hohen Probendurchsatz mit kurzen Analysenzeiten, geringstem Lösungsmittelverbrauch und hoher Auflösung sowie kleiner theoretischer Trennstufenhöhe.

Ein weiterer Vorteil der Kapillarelektrophorese liegt in der Direktbestimmung von Analyten in komplexen Matrizen. Häufig ist es sogar möglich, Arzneistoffe aus Körperflüssigkeiten ohne Probenvorbereitung direkt zu injizieren.

Zur Probenvorbereitung wurden sowohl Proteinfällung als auch Festphasenextraktion verwendet. Die Proteinfällung war mit geringerem Zeitaufwand und niedrigeren Kosten verbunden. Die Messwerte wiesen aber ausgeprägtere Streuungen auf und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen waren höher als bei den Methoden mit einer Festphasenextraktion. Zusätzlich war die Proteinfällung mit einer anschließenden Direktinjektion nur begrenzt einsetzbar, da diese häufig nicht zu einer effektiven Abtrennung der Speichelmatrix führte.

Die Festphasenextraktion erwies sich als ein wichtiger Schritt zur Probenvorbereitung, um die Speichelmatrix deutlich zu minimieren und die notwendigen niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erreichen. Für die Speicheluntersuchungen saurer bzw. basischer Arzneistoffe wurde jeweils eine allgemeine Festphasenextraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen der Firma Varian[®] entwickelt. Zusätzlich entstand für schwach saure und basische Arzneistoffe eine allgemeine Festphasenextraktion über „Strata X-C[®]“ Kartuschen der Firma Phenomenex[®]. Durch geringe Variationen der Extraktionsvorschriften konnten die bestmöglichen Wiederfindungsraten für die einzelnen Substanzen erreicht werden.

Zur kapillarelektrophoretischen Analyse wurde jeweils eine Methode für saure, schwach saure und basische Arzneistoffe entwickelt. Dies waren die Ausgangsmethoden, die für die einzelnen Arzneistoffe durch wenige Variationen weiter optimiert wurden.

Die Methoden für saure und schwach saure Arzneistoffe mit 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 zeigte einen schwankenden elektroosmotischen Fluss durch Adsorptionen der Speichelmatrix an der Kapillarenwand. Dies führte zu einer geringeren Reproduzierbarkeit der Flächen und Migrationszeiten. Der Einfluss der Speichelmatrix führte ebenfalls zu höheren Verfahrensstandardabweichungen und höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die Ausgangsmethode für basische Substanzen mit einem 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 erwies sich als sehr leistungsfähig, präzise und reproduzierbar, so dass diese Methode für die basischen Arzneistoffe mit teilweise geringen Variationen angewendet wurde. Um die benötigten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erreichen, war es notwendig, das Eluat der Extraktion für basische Substanzen einzuengen und in 0,1 mM Phosphorsäure aufzunehmen. Durch die Injektion einer Probe niedriger Leitfähigkeit in eine gefüllte Kapillare mit hoher Ionenstärke konnten die Analyten fokussiert werden („Sample Stacking“). Das „Sample Stacking“ wurde eingesetzt, um die niedrigere Konzentrationsempfindlichkeit durch den verkürzten Strahlengang der Kapillarelektrophorese zu verbessern. Zur Analyse der Speichelproben ohne Probenvorbereitung wurde die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie eingesetzt. Diese Methode ergab gute reproduzierbare Werte. Unkontrollierte Adsorption der Speichelmatrix an der Kapillarenwand konnte durch Natriumdodecylsulfatzusatz zum Hintergrundelektrolyten deutlich minimiert werden. Die Methode wies eine gute Wiederfindung und Richtigkeit auf sowie eine Verminderung von Zeit und Kosten. Der Einsatzbereich war nur durch die höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenze eingeschränkt.

In die Untersuchungen dieser Arbeit waren ausschließlich apothekenpflichtige Arzneimittel mit unterschiedlichen Säure-Base-Eigenschaften einbezogen, um zu überprüfen, ob ein pK_a -Wert bestimmbar ist, ab dem Arzneistoffe und deren Metaboliten in den Speichel permeieren und dort nachzuweisen sind.

Ab einem pK_a -Wert von 8,5 eines basischen Arzneistoffes waren dessen Phase I Metaboliten im Speichel kapillarelektrophoretisch nachweisbar. Bei basischen Arzneistoffen mit niedrigeren pK_a -Werten waren nur die unmetabolisierten Substanzen im Speichel zu identifizieren. Die nachzuweisenden schwach sauren bzw. basischen Substanzen wiesen vergleichbare Konzentrationen im Speichel sowie im Plasma oder sogar eine Anreicherung auf.

Entscheidend für die Sekretion der Substanzen in den Speichel war die Säure-Base-Eigenschaft der jeweiligen Substanz, der pH-Wert des Speichels, der Proteinbindungsanteil, die Plasmakonzentrationen der Substanzen und die Lipophilie. Im Speichel waren keine Phase II-Metabolite nachzuweisen, da die Konjugate hydrophile instabile Produkte sind, welche erschwert durch die Lipidmembran permeieren. Die Konzentrationen dieser Metaboliten im Speichel lagen unter den Nachweisgrenzen der kapillarelektrophoretischen Methoden.

Um eine Vorhersage treffen zu können, ob der Arzneistoff und seine Metaboliten im Speichel nachweisbar sind, müssen diese oben genannten Eigenschaften betrachtet werden.

Interindividuelle Unterschiede der Speichelkonzentrationen können durch Nahrungsmittel, Resorptions- bzw. Eliminationsraten und Art des Geschlechts entstehen.

Die kapillarelektrophoretischen Speicheluntersuchungen erwiesen sich als sehr zuverlässig und reproduzierbar, so dass zu erwarten ist, dass sich in den nächsten Jahren immer mehr kapillarelektrophoretische Methoden neben den HPLC-Methoden für die Speicheluntersuchungen etablieren werden.

11. Summary

The objective of this thesis was the development of methods for the identification and the quantification of medications and their metabolites in saliva.

The main focus was the establishment of saliva as a matrix for metabolism studies which was achieved by developing simple sample preparation techniques and reliable capillary electrophoretic methods for the investigation of saliva.

The advantage of saliva is that the composition and concentration of active ingredients reflects the point of time of the sample taking and that the samples can be collected non-invasively. Furthermore, saliva samples can be taken if bloodletting or collection of urine is not possible, e.g. in traffic checks.

The analyses of the present work were done with capillary electrophoresis (CE) because the CE offers some advantages over other analytical systems.

The CE allows for automated analyses of small sample volumes with high flow rates, short analysis times, low solvent consumption, high resolution and small theoretical separation steps.

Another advantage of the CE is the possibility of direct measurements of analytes in complex matrices. Usually, it is possible to inject medications contained in body fluids into the measuring device without any sample preparation.

For sample preparation both protein precipitation and solid phase extraction were used. Protein precipitation featured lower costs and less time consumption, but led to higher dispersion of values and higher limits of detection and quantification than by using methods of solid phase extraction. Furthermore, protein precipitation with subsequent direct injection was only of limited use, because effective separation of the saliva matrix could not be achieved.

Solid phase extraction proved to be a very important method for the sample preparation in order to effectively separate the saliva matrix and to achieve the necessary low limits of detection and quantification. For saliva investigations of acidic and basic medications a general method of solid phase extraction was developed by means of Varian[®] “Bond Elut Certify[®]” cartridges. Moreover, a general method of solid phase extraction was developed for weakly acid and basic medications using “Strata X-C[®]” cartridges by Phenomenex[®]. The best possible retrieval rates for specific substances were found by small variations of the extraction methods.

Different methods for capillary electrophoretic analysis were developed for acidic, weakly acid and basic medications. These methods were optimized by means of small variations.

The methods for acidic and weakly acid medications with a 50 mM sodium tetraborate buffer pH 9.3 showed a varying electroosmotic flow caused by adsorption of the saliva matrix on the inner wall of the capillary. This led to smaller reproducibility of peak areas and migration times. Furthermore, the influence of the saliva matrix also led to higher standard deviations and higher limits of detection and quantification.

The method for basic medications with a 50mM potassium dihydrogen phosphate buffer pH 2.5 proved very efficient, precise and reproducible, so that this method was used for basic medications with little differences. In order to achieve the required limits of detection and quantification, it was necessary to concentrate the extraction eluate and to dissolve it in 0.1 mM phosphoric acid. By injecting the samples of low conductivity into a filled capillary of high ionic strength the analytes could be focussed (“sample stacking”). The sample stacking was applied in order to improve the low concentration sensitivity induced by the shortened optical path of the CE.

For analysing saliva samples without sample preparation the micellar electro-kinetic capillary chromatography was used. This method yielded very reproducible results. Adsorptions on the inner wall of the capillary could be noticeably minimised by addition of sodium dodecyl sulphate to the background electrolyte. The method showed good recovery, good accuracy and a decrease in costs and time consumption. The application of the method was only limited by the increased limits of detection and quantification.

The investigations in this work exclusively included medications that were subjected to sale by pharmacists only. Both acidic and basic substances were used in order to quantify a pK_a value above which medications and their metabolites are detectable in saliva.

The phase I metabolites of basic medications beyond a pK_a value of 8.5 turned out to be detectable in saliva by capillary electrophoretic methods. In case of basic medications with low pK_a values only the non-metabolised substances could be identified. Basic and weakly acid medications showed comparable concentrations in saliva and in plasma. Even an accumulation was observed.

Decisive for the secretion of the medications into saliva were the acid-base-properties of the substance, the pH value of the saliva, the protein-binding ratio, the plasma concentration and lipophilic character of the substances. No phase II metabolites were detectable, because the conjugates were unstable hydrophilic products that hardly permeated through the lipid membrane. The concentrations of these metabolites in saliva were lower than the limits of detection of the capillary electrophoretic methods.

In order to predict the detectability of a medication and its metabolites in saliva the aforementioned features have to be considered.

Inter-individual differences in saliva concentrations can be caused by food, resorption and elimination rates and gender.

The capillary electrophoretic investigations of saliva proved very reliable and reproducible. It may be expected that more capillary electrophoretic methods for saliva investigations will be established alongside the HPLC methods within the next few years.

12. Experimenteller Teil

12.1 Verzeichnis der Geräte

Elementaranalyse:

C, H, N : Heraeus CHN-O-Rapid, Heraeus (Gießen, Deutschland); Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

¹H-NMR Spektren:

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Angaben der chemischen Verschiebung in δ -Werten (ppm), bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als innerer Standard. Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

Der Nachweis der OH-/NH-Protonen erfolgte durch Austausch mit D₂O.

Abkürzungen der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

UV-Spektren:

Perkin Elmer Lambda 40 Spektralphotometer

Die Messungen sind in Quarzküvetten mit einer Dicke von 1 cm vorgenommen worden. Auf eine Temperierung wurde verzichtet.

Dünnschichtchromatographie DC:

DC-Mikrokarten Polygram[®] oder Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄ von Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), 40x80 mm, Schichtdicke 0,25 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator

Alle Untersuchungen wurden über eine Laufstrecke von mindestens 6 cm mit Kammer-sättigung durchgeführt.

Einstellung der Pufferlösungen:

Alle Pufferlösungen wurden mit einem Metrohm E 605 pH-Meter der Deutschen Metrohm GmbH & Co. und einer kombinierte Glaselektrode eingestellt. Die Kalibrierung der Glaselektrode erfolgte vor jeder Einstellung bei 20 °C nach der Ph. Eur. 4.00⁸⁷ mit folgenden Reagenzien:

- Kaliumhydrogenphthalat-Lösung 0,05 M pH 4,00
- Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung 0,009 M und Natriummonohydrogenphosphat-Lösung 0,03 M pH 7,43

- Natriumcarbonat-Lösung 0,025 M und
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,025 M pH 10,06

Kapillarelektrophorese:

System: Agilent 3D CE
DAD (190-600 nm)
Temperatur: 5-40 °C
Spannung: max. 30 kV
Stromstärke: max. 300 µA
Leistung: max. 6 W
Software: HP ChemStation 1990-2002

HPLC:

System: Varian Pro Star 210/215
Hochdruckgradientensystem
Autosampler 410
Solvent Degasser „MetaChem Degassit[®]“
Pumpe 210
DAD 330
Software: Star Chromatography Workstation

HPLC:

System: Merck Hitachi LaChrom
Hochdruckgradientensystem
Autosampler L-7200
Solvent Degasser L-7612
Pumpe L-7100
Column Oven L-7350
Peltier Cooling Module L 7350/7351
UV-Detektor L-7400
DAD L-7455
Software: Merck D-7000 HPLC System Manager für Windows NT 4.0

Massenspektrometer (MS):

System: Varian 1200 L Quadrupole MS/MS

Software: 1200/1200 L MS Workstation

Weitere verwendete Geräte

Waagen	Sartorius micro	M 500 P
	AD & D Instruments LTD	HR-120
Zentrifuge	Kontron	Hermle Z 424
Ultraschallbad	Sonorex Bandelin	TK 52 H
Vakuumpumpe	Vacubrand	CVC 2 mit Pumpe
Vakuum – Kammer	Macherey–Nagel	
Eindampfgerät	Eppendorf	Concentrator 5301
Salivetten [®]	Sarstedt	

12.2 Pufferlösungen

Phosphatpuffer

0,05 M KH_2PO_4 pH 8,0	0,681 g in 90 ml bidest. Wasser lösen, mit 1 M KOH auf pH 8,0 einstellen und auf 100,0 ml auffüllen
100 mM KH_2PO_4 pH 2,0	1,361 g in 90 ml bidest. Wasser lösen, mit 85% H_3PO_4 auf pH 2,0 einstellen und auf 100,0 ml auffüllen
100 mM KH_2PO_4 pH 3,3	1,361 g in 90 ml bidest. Wasser lösen, mit 85% H_3PO_4 auf pH 3,3 einstellen und auf 100,0 ml auffüllen
100 mM KH_2PO_4 pH 6,0	1,361 g in 90 ml bidest. Wasser lösen, mit 1 M KOH auf pH 6,0 einstellen und auf 100,0 ml auffüllen
50 mM KH_2PO_4 pH 2,5	6,805 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 85% H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
50 mM KH_2PO_4 pH 6,8	6,805 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 3 N KOH auf pH 6,8 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
75 mM KH_2PO_4 pH 2,5	10,207 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 85% H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
100 mM KH_2PO_4 pH 5,3	13,609 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 1 N KOH auf pH 5,3 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
50 mM NaH_2PO_4 pH 6,3	6,900 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 85% H_3PO_4 auf pH 6,3 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen

120 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,1	16,559 g in 1000 ml bidest. Wasser lösen, mit 120mM H_3PO_4 auf pH 2,1 einstellen
120 mM NaH_2PO_4 pH 5,8	16,559 g in 1000 ml bidest. Wasser lösen, mit 1 M NaOH auf pH 2,1 einstellen
Boratpuffer	
50 mM NaB_4O_7 pH 9,3	19,069 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 0,1 N NaOH auf pH 9,3 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
60 mM NaB_4O_7 pH 9,3 + 59 mM SDS	2,880 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit 0,1 N NaOH auf pH 9,3 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen; 1,70 g SDS in 100 ml 60 mM NaB_4O_7 pH 9,3 lösen
Carbonatpuffer	
50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pH 11,0	4,804 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit NH_3 auf pH 11,0 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pH 9,0	4,804 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit NH_3 auf pH 9,0 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen
Formiatpuffer	
50 mM $\text{HCO}_2(\text{NH}_4)_2$ pH 2,8 + 10 % Acetonitril	3,153 g in 950 ml bidest. Wasser lösen, mit HCOOH auf pH 2,8 einstellen und auf 1000,0 ml auffüllen; 9 Teile Puffer plus 1 Teil Acetonitril
Acetatpuffer	
10 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ pH 9,0	0,082 g in 90 ml bidest. Wasser lösen, mit 0,1 N NaOH auf pH 9,0 einstellen und auf 100,0 ml auffüllen
0,5 M $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ pH 3,7	3,852 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ in 56,6 ml bidest. Wasser zu 1,302 g CH_3COOH in 43,4 ml bidest. Wasser geben und mit CH_3COOH auf pH 3,7 einstellen

12.3 Festphasenextraktionsvorschrift für saure Substanzen

Allgemeine Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify® II Kartuschen

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

1 ml 10 mM Natriumacetatlösung pH 9,0

Probenapplikation

500 µl Speichel mit 500 µl 10 mM Natriumacetatlösung pH 9,0 verdünnen und mit 0,04 N Natronlauge auf pH 9,0 einstellen.

Trocknen

5 min mit 400 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 100 mM Phosphorsäure/Acetonitril (1:1)

Das Eluat wird direkt vermessen oder bei 180 mbar und 45 °C zur Trockene eingengt. Die Probe wird in 50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3 aufgenommen.

12.4 Festphasenextraktionsvorschrift für schwach saure Substanzen

Allgemeine Extraktionsvorschrift für die „Strata X-C®“ Kartuschen

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

1 ml bidest. Wasser

Probenapplikation

500 µl Probe

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

1 ml Methanol

Das Eluat wird bei 820 mbar und 45 °C zur Trockene eingengt und anschließend in 500 µl 0,1 mM NaOH aufgenommen.

12.5 Festphasenextraktionsvorschriften für basische Substanzen

12.5.1 Allgemeine Extraktionsvorschriften

Allgemeine Extraktionsvorschrift für die „Strata X-C[®]“ Kartuschen

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

1 ml bidest. Wasser

Probenapplikation

500 µl angesäuerte Probe mit 10 µl Phosphorsäure (85 %)

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 5 % Ammoniak in Methanol

Das Eluat wird bei 500 mbar ohne Wärme zur Trockene eingengt und anschließend in 500 µl 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

Allgemeine Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Säulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0

Probenapplikation

1 ml Speichel mit 1,0 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0

Trocknen

5 min mit 500 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 2 % Ammoniak in Ethylacetat

Das Eluat wird bei 820 mbar und 45 °C zur Trockene eingengt und anschließend in 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

Für die untersuchten Arzneistoffe werden im Folgenden nur noch die Variationen der allgemeinen Festphasenextraktionen aufgelistet.

12.5.2 Ambroxol

Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Die Extraktionsvorschrift ist identisch mit der allgemeinen Vorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen.

12.5.3 Phenylephrin

Extraktionsvorschrift I für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Säulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung pH 3,3

Probenapplikation

1 ml Speichel mit 1,0 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung pH 3,3

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Bond Elut Certify[®]“ Extraktionsvorschrift.

12.5.4 Diphenhydramin

Extraktionsvorschrift I für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Probenapplikation

1 ml Speichel verdünnen mit 1,0 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 und mit 1 Tropfen Phosphorsäure (85 %) ansäuern.

Elution

2 × 1 ml 5 % Ammoniak in Methanol

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Bond Elut Certify[®]“ Extraktionsvorschrift.

Extraktionsvorschrift für die „Strata X-C[®]“ Kartuschen

Die Extraktionsvorschrift ist identisch mit der allgemeinen Vorschrift für basische Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen.

12.5.5 Ephedrin

Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Die Extraktionsvorschrift ist identisch mit der allgemeinen Vorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen.

Extraktionsvorschrift I für die „Strata X-C[®]“ Kartuschen

Probenapplikation

500 µl Speichel ohne Ansäuerung

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Strata X-C[®]“ Extraktionsvorschrift für basische Substanzen.

Extraktionsvorschrift I für die „CBA[®]“-Kartuschen

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,8

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 6,5 bis 7,0

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,0

Extraktionsvorschrift II für die „CBA[®]“-Kartuschen

Säulenkonditionierung

1 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,8

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 6,5 bis 7,0

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 1 M Salzsäure pH 2,0

Extraktionsvorschrift I für die C-18 KartuschenSäulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 11,0

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 11, eingestellt mit 0,5 N NaOH

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 1 M Salzsäure pH 2,0

Das Eluat wird direkt vermessen.

Extraktionsvorschrift für die „Focus[®]“-KartuschenSäulenkonditionierung

1 ml Methanol

1 ml 2 % Ammoniak

Probenapplikation

500 µl Speichelprobe mit 500 µl 2 % Ammoniak verdünnen

Waschen

1 ml Wasser

1 ml 10 % Acetonitril

Elution

1 ml Acetonitril-Methanol-Trifluoressigsäure (6:3:1)

Das Eluat wird bei 550 mbar zur Trockene eingengt und anschließend in 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

12.5.6 Dextromethorphan**Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen**

Die Extraktionsvorschrift ist identisch mit der allgemeinen Vorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen.

12.5.7 Pseudoephedrin

Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Die Extraktionsvorschrift ist identisch mit der allgemeinen Vorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen.

Extraktionsvorschrift I für die „Strata X-C[®]“ Kartuschen

Probenapplikation

500 µl Speichel

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Strata X-C[®]“ Extraktionsvorschrift für basische Substanzen.

12.5.8 Nicotin

Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen

Probenapplikation

1 ml Speichel

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

0,5 ml 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung

Das Eluat wird direkt vermessen.

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Bond Elut Certify[®]“ Extraktionsvorschrift.

Extraktionsvorschrift für die „Strata X-C[®]“ Kartuschen

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

0,5 ml 0,01 M Kaliumhydroxid-Lösung

Das Eluat wird direkt vermessen.

Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch mit der allgemeinen „Strata X-C[®]“ Extraktionsvorschrift für basische Substanzen.

Extraktionsvorschrift I für die „CBA[®]“-KartuschenSäulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,8

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 6,5 bis 7,0

Waschen

2 ml bidest. Wasser

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,0

Zunächst das Elutionsmittel 1 bis 2 Minuten einwirken lassen und dann die Elution sehr langsam durchführen. Das Eluat wird direkt vermessen.

Extraktionsvorschrift II für die „CBA[®]“-KartuschenSäulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,3

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 6,5 bis 7,0

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 1 M Salzsäure pH 2,0

Extraktionsvorschrift I für die C-18 KartuschenSäulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 × 2 ml 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 9,0

Probenapplikation

1 ml nicht verdünnte Speichelprobe mit einem pH-Wert von 11, eingestellt mit 0,5 N NaOH

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml 0,1 mM Phosphorsäure pH 2,0

Das Eluat wird direkt vermessen.

12.5.9 Amfepramon**Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen**Säulenkonditionierung

2 ml Methanol

2 ml bidest. Wasser

2 × 2 ml 0,1 M Ammoniumchlorid/Ammoniak pH 6,0

Probenapplikation

1 ml Speichel mit einem pH-Wert von 6,0, eingestellt mit 0,1 N Salzsäure

Trocknen

1 min mit 350 mbar Unterdruck

Elution

2 × 1 ml Dichlormethan/Isopropylalkohol/Ammoniak (25 %) (78:20:2)

Das Eluat wird bei 400 mbar zur Trockene eingengt und in 0,1 mM Phosphorsäure aufgenommen.

12.6 Kapillarelektrophoretische Methoden für saure Substanzen

Vor der ersten Benutzung einer Kapillare musste diese konditioniert werden, was nach folgendem Konditionierungsablauf erfolgte (Hewlett-Packard¹²⁵): 1 N NaOH (10 Minuten), warten (5 Minuten) und Konditionierung mit dem entsprechenden Puffer (20 Minuten). Der Austausch des verwendeten Puffers zwischen den Läufen wird als Replenishment bezeichnet. Die Präkonditionierung erfolgt nach dem Replenishment und beschreibt den Spülschritt der Kapillare. Die angegebene Polung der Elektrik bezieht sich immer auf die Elektrode am Inlet.

12.6.1 Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode

Methode:	<u>ASS1.M</u>
Kapillare:	23/30 cm
Kassettentemperatur:	20,0 °C
Puffer:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Replenishment:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Präkonditionierung:	1. 0,5 min I: 0,1 N NaOH 2. 0,5 min I: Wasser 3. 2,0 min I: 50 mM Boratpuffer pH 9,3
Elektrik:	Polarität Positiv
Hydrodynamische Injektion:	25,0 mbar für 5,0 s Probe
Laufzeit:	20,0 min
Spannung:	12,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

Für die untersuchten sauren Arzneistoffe werden im Folgenden die Variationen der allgemeinen kapillarelektrophoretischen Methode aufgelistet.

12.6.2 Acetylsalicylsäure

Methode:	<u>ASSshort.M</u> (weitere Parameter sind identisch mit ASS1.M)
Elektrik:	Polarität Negativ
Hydrodynamische Injektion:	-25,0 mbar für 5,0 s Probe
Laufzeit:	3,5 min
Spannung:	-15,0 kV
Methode:	<u>ASS2.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit ASS1.M)
Hydrodynamische Injektion	1. 25,0 mbar für 10,0 s Probe 2. 25,0 mbar für 5,0 s Wasser
Laufzeit:	10,0 min

12.6.3 Ibuprofen

Methode:	<u>Ibu1.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit ASS1.M)
Kapillare:	40/47 cm
Hydrodynamische Injektion:	1. 34,0 mbar für 10,0 s Probe 2. 34,0 mbar für 5,0 s Wasser
Laufzeit:	15,0 min
Spannung:	13,0 kV
Detektion:	200 und 235 nm

12.7 Kapillarelektrophoretische Methoden für schwach saure Substanzen

12.7.1 Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode

Methode:	<u>Parac1.M</u>
Kapillare:	40/47 cm
Kassettentemperatur	20,0 °C
Puffer:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Replenishment:	50 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
Präkonditionierung:	1. 1,0 min I: 0,1 N NaOH 2. 2,0 min I: Wasser 3. 2,0 min I: 50 mM Boratpuffer pH 9,3
Elektrik:	Polarität Positiv
Hydrodynamische Injektion:	1. 34,0 mbar für 5,0 s Wasser 2. 34,0 mbar für 10,0 s Probe
Laufzeit:	15,0 min
Spannung:	15,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

12.7.2 Paracetamol

Methode: Parac2.M (die weiteren Parameter sind identisch mit Parac1.M)

Hydrodynamische Injektion: 1. 34,0 mbar für 8,0 s Wasser
2. 34,0 mbar für 10,0 s Probe

Detektionswellenlänge: 200 nm, 245 nm

Methode: Parac3.M

Kapillare: 40/47 cm

Kassettentemperatur 20,0 °C

Puffer: 60 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
+ 59 mM Natriumdodecylsulfat

Replenishment: -

Präkonditionierung: 1. 1,0 min I: 1 M NaOH
2. 2,0 min I: Acetonitril/60 mM Natriumtetraboratpuffer
pH 9,3 (1:1) + 59 mM Natriumdodecylsulfat
2. 4,0 min I: 60 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,3
+ 59 mM Natriumdodecylsulfat

Elektrik: Polarität Positiv

Hydrodynamische Injektion: 25,0 mbar für 10,0 s

Laufzeit: 30,0 min

Spannung: 10,0 kV

Detektionswellenlänge: 200 nm, 245nm

12.8 Kapillarelektrophoretische Methoden für basische Substanzen

12.8.1 Allgemeine kapillarelektrophoretische Methode

Methode:	<u>Phep.M</u>
Kapillare:	40/47 cm
Kassettemperatur	20,0 °C
Puffer:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
Replenishment:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
Präkonditionierung:	1. 1,0 min I: 0,1 M H ₃ PO ₄ 2. 2,0 min I: 50 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 2,5
Elektrik:	Polarität Positiv
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 20,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe
Laufzeit:	20,0 min
Spannung:	15,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm

Für die untersuchten basischen Arzneistoffe werden im Folgenden die Variationen der allgemeinen kapillarelektrophoretischen Methode aufgelistet.

12.8.2 Ambroxol

Methode:	<u>Phep1.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Phep.M)
Hydrodynamische Injektion:	1. 35,0 mbar für 5,0 s Wasser
Elektrokinetische Injektion:	2. 10,0 kV für 20,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion:	3. 10,0 mbar für 2,0 s Probe

Methode:	<u>Phep2.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Phep.M)
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 30,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe

12.8.3 Phenylephrin

Die kapillarelektrophoretische Methode ist identisch mit der allgemeinen Methode Phep.M (S. 172).

12.8.4 Diphenhydramin

Die kapillarelektrophoretische Methode ist identisch mit der allgemeinen Methode Phep.M (S. 172).

12.8.5 Dextromethorphan, Ephedrin und Pseudoephedrin

Methode: Pseu1.M (die weiteren Parameter sind identisch mit Phep.M)
Kassettemperatur 15,0 °C
Präkonditionierung: 1. 0,5 min I: 0,1 M H₃PO₄
2. 2,0 min I: 50 mM KH₂PO₄-Puffer pH 2,5
Elektrokinetische Injektion: 1. 10,0 kV für 10,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion: 2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe
Laufzeit: 10,0 min
Spannung: 17,0 kV

12.8.6 Ephedrin

Methode: Eph.M (die weiteren Parameter sind identisch mit Phep.M)
Kapillare: 30/37 cm
Kassettemperatur 15,0 °C
Präkonditionierung: 1. 0,5 min I: 0,1 M H₃PO₄
2. 2,0 min I: 50 mM KH₂PO₄-Puffer pH 2,5
Elektrokinetische Injektion: 1. 10,0 kV für 10,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion: 2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe
Laufzeit: 8,0 min
Spannung: 15,0 kV

12.8.7 Pseudoephedrin und dessen Metaboliten im Urin

Methode: PseuU.M (die weiteren Parameter sind identisch mit Phep.M)
Kassettemperatur 15,0 °C
Präkonditionierung: 1. 1,0 min I: 0,1 M H₃PO₄
2. 2,0 min I: 50 mM KH₂PO₄-Puffer pH 2,5
Hydrodynamische Injektion: 1. 34,0 mbar für 5,0 s Probe
Laufzeit: 12,0 min
Spannung: 17,0 kV

12.8.8 Nicotin

Methode: Nico1.M
 Kapillare: 53/61,5 cm
 Kassettentemperatur 20,0 °C
 Puffer: 50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 2,8 + 10 % Acetonitril
 Replenishment: 50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 2,8 + 10 % Acetonitril
 Präkonditionierung: 1. 1,0 min I: 0,1 M HCl
 2. 2,0 min I: Wasser
 3. 2,0 min I: 50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 2,8
 + 10 % Acetonitril
 Elektrik: Polarität Positiv
 Hydrodynamische Injektion: 25,0 mbar für 12 s Probe
 Laufzeit: 40,0 min
 Spannung: 30,0 kV
 Detektionswellenlänge: 260 nm

Methode: Nico2.M
 Kapillare: 53/61,5 cm
 Kassettentemperatur 20,0 °C
 Puffer: 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
 Replenishment: 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5
 Präkonditionierung: 1. 1,0 min I: 0,1 M NaOH
 2. 2,0 min I: Wasser
 3. 2,0 min I: 50 mM KH₂PO₄-Puffer pH 2,5
 Elektrik: Polarität Positiv
 Hydrodynamische Injektion: 1. 10,0 mbar für 0,2 s Wasser
 Elektrokinetische Injektion: 2. 10,0 kV für 10,0 s Probe
 Laufzeit: 20,0 min
 Spannung: 16,0 kV
 Detektionswellenlänge: 200 nm

Methode:	<u>Nico3.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Nico2.M)	
Kapillare:	40/47 cm	
Präkonditionierung:	1. 0,5 min	I: 0,1 M H ₃ PO ₄
	3. 2,0 min	I: 50 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 2,5
Spannung:	17,0 kV	

12.8.9 Amfepramon

Methode:	<u>Amfe1.M</u>	
Kapillare:	43/50 cm	
Kassettentemperatur	20,0 °C	
Puffer:	120 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 2,1	
Replenishment:	120 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 2,1	
Präkonditionierung:	1. 1,0 min	I: 1 M NaOH
	2. 1,0 min	I: Wasser
	3. 2,0 min	I: 120 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 2,1
Elektrik:	Polarität	Positiv
Hydrodynamische Injektion:	1. 25,0 mbar für 10,0 s Probe	
Laufzeit:	15,0 min	
Spannung:	16,0 kV	
Detektionswellenlänge:	200 nm	

Methode:	<u>Amfe2.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Amfe1.M)	
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 10,0 s Probe	
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe	

Methode:	<u>Amfe3.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Amfe1.M)	
Kapillare:	43/50 cm	
Kassettentemperatur	15,0 °C	
Puffer:	120 mM NaH ₂ PO ₄ pH 5,8	
Replenishment:	120 mM NaH ₂ PO ₄ pH 5,8	
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 10,0 s Probe	
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe	

Methode:	<u>Amfe4.M</u>
Kapillare:	43/50 cm
Kassettentemperatur	20,0 °C
Puffer:	2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin in 120 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 2,1 (10 mg/ml)
Replenishment:	-
Präkonditionierung:	1. 2,0 min I: 2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin in 120 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 2,1 (10 mg/ml)
Elektrik:	Polarität Positiv
Elektrokinetische Injektion:	1. 10,0 kV für 10,0 s Probe
Hydrodynamische Injektion:	2. 10,0 mbar für 2,0 s Probe
Laufzeit:	20,0 min
Spannung:	16,0 kV
Detektionswellenlänge:	200 nm
Methode:	<u>Amfe5.M</u> (die weiteren Parameter sind identisch mit Amfe4.M)
Kapillare:	43/50 cm
Kassettentemperatur	25,0 °C

12.9 HPLC-Methoden

12.9.1 Acetylsalicylsäure

Für die Analysen wurde die HPLC Pro Star 210/215 von Varian verwendet.

Trennsäule:	Waters Symmetrie Shield [®] 150-3,9, RP-8 (5µm)
Fließmittel:	Methanol/Wasser (85:15) pH 2,5, eingestellt mit Perchlorsäure
Flussrate:	0,5 ml/min
Ofentemperatur:	35 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Laufzeit:	10 min
Messwellenlänge:	236 nm

12.9.2 Ibuprofen

Für die Analysen wurde die LaChrom HPLC von Merck Hitachi verwendet.

Trennsäule:	Waters Symmetrie Shield [®] 125-4, RP-18 (5µm)
Fließmittel:	Methanol/Wasser (85:15) pH 2,5, eingestellt mit Perchlorsäure
Flussrate:	1,0 ml/min
Ofentemperatur:	35 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Laufzeit:	10 min
Messwellenlängen:	214 nm

Für die Analysen wurde die HPLC Pro Star 210/215 von Varian eingesetzt.

Trennsäule:	LiChroCart [®] 125-4, Lichrospher [®] 100 RP-18 (5µm)
Fließmittel:	Acetonitril/75 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5 (50:50)
Flussrate:	1 ml/min
Ofentemperatur:	35 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Laufzeit:	10 min
Messwellenlänge:	214 nm

12.10 Validierung der Methode ASS1.M für Salicylsäure

Linearität

Negative Speichelproben (500 µl) mit 300 µl Fällungsmittel wurden mit sechs verschiedenen Salicylsäurestandardlösungen (200 µl) dotiert und jeweils dreimal vermessen.

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,5	7,54	7,42	7,64	7,53	0,11	1,46
1,0	11,10	10,43	10,78	10,77	0,34	3,11
1,5	12,21	12,54	12,38	12,38	0,17	1,33
2,0	15,32	15,23	15,63	15,39	0,21	1,36
2,5	18,02	18,03	17,15	17,73	0,51	2,85
3,0	19,38	19,80	19,91	19,70	0,28	1,42

Tabelle 12.1: Messwerte der Flächen (Methode ASS1.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.1) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

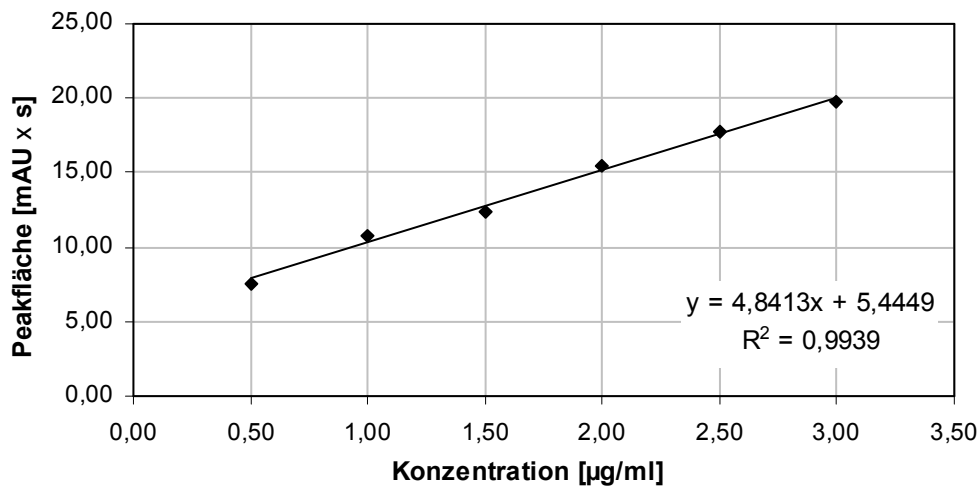


Bild 12.1: Kalibrierkurve für Salicylsäure (Methode ASS1.M; n = 3)

Zur Berechnung der Salicylsäurekonzentrationen wurde die in Bild 12.1 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	1,75
Steigung a :	4,84 ± 0,19
Ordinatenabschnitt b :	5,45 ± 0,37
Korrelationskoeffizient r :	0,9969
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9939
Reststandardabweichung s_y :	0,40
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,08
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	4,57 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Salicylsäure:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,14
	Prüfwert PW : 0,86
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurde negativen Speichelproben Salicylsäure zugesetzt, so dass daraus Konzentrationen von 0,5, 1,0 bzw. 2,0 µg/ml resultierten. Aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (1 mg/ml) wurden für jede Konzentration sechs Verdünnungen hergestellt und 200 µl dieser Lösungen zu jeweils sechs Speichelproben (500 µl) mit 300 µl Fällungsmittel hinzugefügt. Jede dotierte Speichelprobe wurde an drei Tagen injiziert.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	7,93	7,55	8,10	7,88	8,21	8,13
1,0	11,33	11,55	11,49	11,42	12,20	12,03
2,0	14,86	16,12	15,83	15,75	15,78	15,92

Tabelle 12.2: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	5,977	6,026	5,985	6,010	6,009	5,957
1,0	5,957	5,974	5,983	6,005	6,009	5,995
2,0	5,968	5,922	5,943	5,906	5,887	5,743

Tabelle 12.3: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	7,00	7,58	7,17	7,54	7,17	7,13
1,0	11,67	11,74	11,84	11,12	11,39	11,38
2,0	16,54	16,70	15,32	15,94	16,01	16,25

Tabelle 12.4: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	6,504	6,370	6,195	6,387	6,328	6,264
1,0	6,164	6,101	5,937	6,166	5,999	6,069
2,0	6,111	6,021	6,181	6,080	6,273	6,134

Tabelle 12.5: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	7,80	7,74	7,55	7,67	7,64	7,74
1,0	10,83	10,71	10,63	10,62	10,90	10,72
2,0	15,54	15,58	15,75	15,91	15,68	15,33

Tabelle 12.6: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	6,236	6,342	6,202	6,269	5,933	5,849
1,0	5,922	5,958	6,014	5,921	5,825	5,806
2,0	6,110	6,069	5,937	5,806	5,890	5,994

Tabelle 12.7: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
0,5 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	7,97	7,27	7,69	7,64
Stabw	0,24	0,24	0,09	0,35
Vk [%]	3,00	3,30	1,16	4,61
David-Test*	2,76	2,43	2,80	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 7,64 \pm 0,37				

Tabelle 12.8: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$

	Migrationszeiten [min]			
0,5 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,994	6,341	6,139	6,158
Stabw	0,03	0,11	0,20	0,18
Vk [%]	0,43	1,68	3,24	2,83
David-Test	2,71	2,90	2,48	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,158 \pm 0,183				

Tabelle 12.9: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$

* Für den Schnelltest nach David auf Normalverteilung sind für $n = 6$, mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 99 %, die Grenzen $g_u = 2,15$; $g_o = 3,16$ vorgegeben.

1,0 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	11,67	11,52	10,74	11,31
Stabw	0,36	0,27	0,11	0,50
Vk [%]	3,05	2,33	1,04	4,41
David-Test	2,43	2,64	2,61	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,31 ± 0,52				

Tabelle 12.10: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 1,0 µg/ml

1,0 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,987	6,073	5,908	5,989
Stabw	0,02	0,09	0,08	0,08
Vk [%]	0,33	1,50	1,34	1,38
David-Test	2,63	2,51	2,63	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,989 ± 0,087				

Tabelle 12.11: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 1,0 µg/ml

2,0 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	15,71	16,13	15,63	15,82
Stabw	0,44	0,49	0,20	0,27
Vk [%]	2,80	3,07	1,27	1,70
David-Test	2,88	2,81	2,92	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 15,82 ± 0,28				

Tabelle 12.12: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 2,0 µg/ml

2,0 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,895	6,133	5,968	5,999
Stabw	0,08	0,09	0,11	0,12
Vk [%]	1,35	1,42	1,90	2,04
David-Test	2,83	2,90	2,68	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,999 ± 0,128				

Tabelle 12.13: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeitender Konzentration 2,0 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Salicylsäure wurde das Standardadditionsverfahren angewendet. Dotierte Speichelproben mit drei verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils sechsmal vermessen.

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	7,80	7,74	7,55	7,67	7,63	7,73
1,0	10,82	10,71	10,63	10,61	10,90	10,72
2,0	15,54	15,57	15,75	15,91	15,68	15,33

Tabelle 12.14: Messwerte zur Berechnung der Wiederfindung und Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	97,29	94,81	86,96	91,92	90,27	94,40
1,0	111,03	108,75	107,10	106,69	112,68	108,96
2,0	104,26	104,57	106,43	108,08	105,71	102,09

Tabelle 12.15: Wiederfindung der Salicylsäure (Methode ASS1.M)

Richtigkeit

Messwerte:

Für die Ermittlung der Richtigkeit wurden die erhaltenen Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung (Tabelle 12.14) verwendet.

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	2,71	5,19	13,04	8,08	9,73	5,60
1,0	-11,03	-8,75	-7,10	-6,69	-12,68	-8,96
2,0	-4,26	-4,57	-6,43	-8,08	-5,71	-2,09

Tabelle 12.16: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.11 Validierung der Methode ASS2.M für Salicylsäure

Linearität

Negative Speichelproben (500 µl) mit 300 µl Fällungsmittel wurden mit sechs verschiedenen Salicylsäurestandardlösungen (200 µl) dotiert und jeweils dreimal vermessen.

Messwerte:

x-Werte Konz. [µg/ml]	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,5	9,12	10,13	9,74	9,66	0,51	5,27
1,0	16,10	16,42	16,23	16,25	0,16	0,99
1,5	21,48	21,84	21,83	21,72	0,21	0,94
2,0	25,54	27,71	26,63	26,63	1,09	4,07
2,5	29,22	30,00	30,91	30,04	0,85	2,82
3,0	34,29	36,14	36,15	35,53	1,07	3,01

Tabelle 12.17: Messwerte der Flächen (Methode ASS2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.2) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

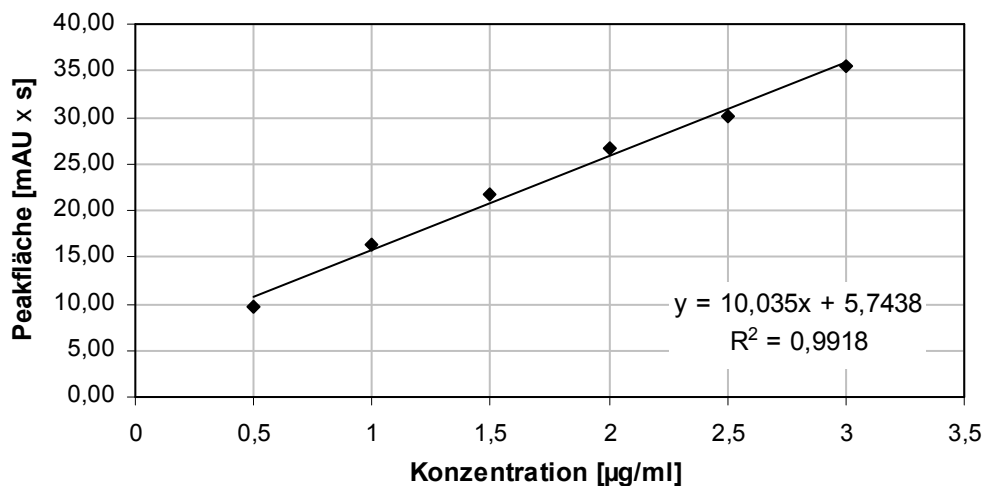


Bild 12.2: Kalibrierkurve für Salicylsäure (Methode ASS2.M; n = 3)

Zur Berechnung der Salicylsäurekonzentrationen wurde die in Bild 12.2 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest® lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	1,75
Steigung a :	10,04 ± 0,46
Ordinatenabschnitt b :	5,74 ± 0,89
Korrelationskoeffizient r :	0,9959
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9918
Reststandardabweichung s_y :	0,96
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,10
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	5,71 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Salicylsäure:	Varianzdifferenz DS^2 : 2,24
	Prüfwert PW : 4,74
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurde negativen Speichelproben Salicylsäure zugesetzt, so dass daraus Konzentrationen von 0,5, 1,0 bzw. 2,0 µg/ml resultierten. Aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (1 mg/ml) wurden für jede Konzentration sechs Verdünnungen hergestellt und 200 µl dieser Lösungen zu jeweils sechs Speichelproben (500 µl) mit 300 µl Fällungsmittel hinzugefügt. Jede dotierte Speichelprobe wurde an drei Tagen injiziert.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	18,82	17,80	18,64	18,13	17,90	18,74
1,0	23,30	24,10	23,74	23,23	24,40	24,15
2,0	37,42	35,70	37,18	35,43	35,94	36,90

Tabelle 12.18: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	5,229	5,375	5,455	5,475	5,454	5,434
1,0	5,496	5,516	5,495	5,558	5,578	5,530
2,0	5,514	5,563	5,585	5,565	5,531	5,559

Tabelle 12.19: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	18,20	18,74	17,39	18,00	19,71	18,93
1,0	24,54	22,30	23,64	22,90	23,47	22,90
2,0	35,94	36,40	34,39	37,12	37,63	37,13

Tabelle 12.20: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	6,504	6,595	6,513	5,619	5,912	5,799
1,0	6,180	6,579	6,122	5,902	5,655	5,675
2,0	5,711	6,054	5,856	6,041	5,508	5,654

Tabelle 12.21: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	18,60	17,54	17,83	17,64	18,11	18,23
1,0	23,80	23,23	23,44	22,79	24,12	23,30
2,0	35,19	34,99	34,58	35,31	35,92	36,14

Tabelle 12.22: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	5,481	5,352	5,499	5,452	5,491	5,513
1,0	5,459	5,547	5,567	5,626	5,808	5,819
2,0	5,690	5,816	5,681	5,852	5,703	5,540

Tabelle 12.23: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
0,5 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	18,34	18,49	17,99	18,27
Stabw	0,45	0,81	0,40	0,26
Vk [%]	2,47	4,40	2,23	1,40
David-Test	2,28	2,87	2,67	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 18,27 \pm 0,27				

Tabelle 12.24: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$

	Migrationszeiten [min]			
0,5 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,404	6,157	5,465	5,675
Stabw	0,09	0,43	0,06	0,42
Vk [%]	1,71	6,95	1,08	7,37
David-Test	2,67	2,28	2,74	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,675 \pm 0,439				

Tabelle 12.25: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$

	Flächen [mAU x s]			
1,0 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	23,82	23,29	23,45	23,52
Stabw	0,48	0,78	0,47	0,27
Vk [%]	2,01	3,34	2,00	1,16
David-Test	2,43	2,89	2,86	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 23,52 \pm 0,28				

Tabelle 12.26: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 1,0 $\mu\text{g/ml}$

	Migrationszeiten [min]			
1,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,529	6,019	5,638	5,728
Stabw	0,03	0,35	0,15	0,26
Vk [%]	0,61	5,83	2,60	4,49
David-Test	2,47	2,64	2,46	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,728 ± 0,270				

Tabelle 12.27: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 1,0 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
2,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	36,43	36,43	35,35	36,07
Stabw	0,84	1,17	0,59	0,62
Vk [%]	2,32	3,21	1,69	1,73
David-Test	2,37	2,77	2,68	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 36,07 ± 0,65				

Tabelle 12.28: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 2,0 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
2,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,552	5,804	5,714	5,690
Stabw	0,03	0,22	0,11	0,13
Vk [%]	0,46	3,78	1,94	2,24
David-Test	2,76	2,49	2,81	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,690 ± 0,134				

Tabelle 12.29: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 2,0 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Salicylsäure wurde das Standardadditionsverfahren angewendet. Dotierte Speichelproben mit drei verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils sechsmal vermessen.

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	18,82	17,80	18,64	18,13	17,90	18,74
1,0	23,30	24,10	23,74	23,23	24,40	24,15
2,0	37,42	35,70	37,18	35,43	35,94	36,90

Tabelle 12.30: Messwerte zur Berechnung der Wiederfindung und Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	114,65	99,46	112,01	104,37	100,99	113,46
1,0	90,58	96,55	93,87	90,09	98,74	96,87
2,0	97,73	91,33	96,82	90,33	92,24	95,80

Tabelle 12.31: Wiederfindung der Salicylsäure (Methode ASS2.M)

Richtigkeit

Messwerte:

Zur Ermittlung der Richtigkeit wurden die erhaltenen Messwerte für die Bestimmung der Wiederfindung (Tabelle 12.30) verwendet.

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5	-14,34	0,54	-12,01	-4,37	-0,99	-13,46
1,0	9,42	3,45	6,13	9,91	1,26	3,13
2,0	2,27	8,67	3,18	9,67	7,76	4,20

Tabelle 12.32: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.12 Kalibrierung für Paracetamol

Die Berechnungen der Paracetamolkonzentrationen im Speichel, nach einer Proteinfällung und anschließender Analyse mit der Methode Parac2.M (S. 49), erfolgten anhand der ermittelten linearen Regressionsgleichungen $y = 2,8484x + 3,2547$ für die unkorrigierten Flächen und mit $y = 0,3467x + 0,7202$ für die korrigierten Flächen. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurden zu negativen Speichelproben (300 μ l) 200 μ l Acetonitril (Fällungsmittel) und 100 μ l der entsprechenden Paracetamolstandardlösung gegeben, so dass daraus Konzentrationen von 1, 3, 5, 7, 10 und 12,5 μ g/ml resultierten. Diese Proben wurden mit der Methode Parac2.M vermessen. Die Auswertung erfolgte bei der Wellenlänge 245 nm.

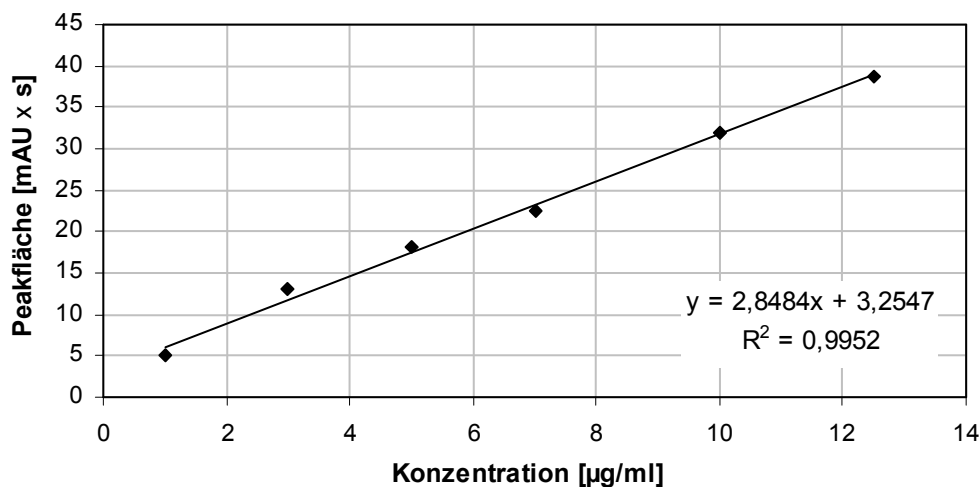


Bild 12.3: Kalibrierkurve für Paracetamol nach Proteinfällung (unkorrigierte Flächen) (n = 3)

Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurden die Mittelwerte verwendet. Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	6,42
Steigung a :	$2,85 \pm 0,10$
Ordinatenabschnitt b :	$3,26 \pm 0,75$
Korrelationskoeffizient r :	0,9976
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9952
Reststandardabweichung s_y :	0,96
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,34
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	5,30 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Paracetamol:

Varianzdifferenz DS^2 : 0,40

Prüfwert PW : 0,37

F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Für die mit der Migrationszeit korrigierten Flächen ergab sich die Kalibrierkurve im Bild 12.4.

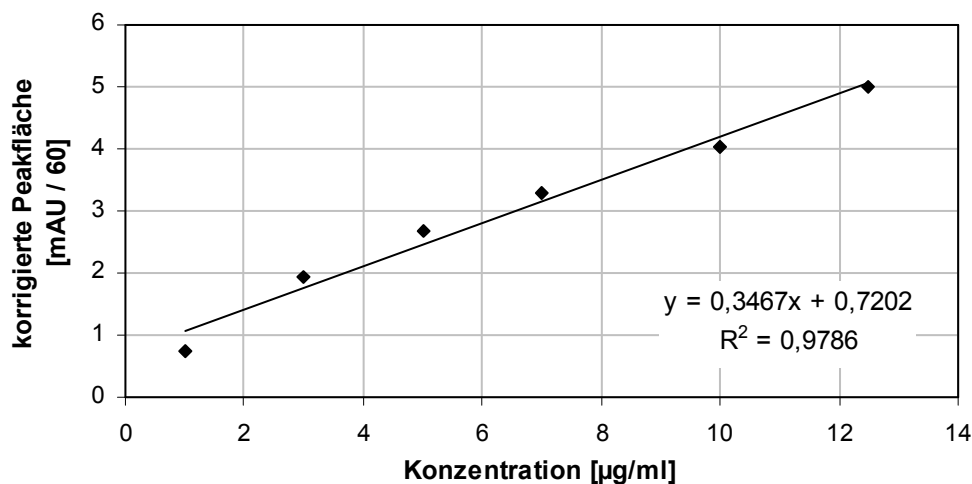


Bild 12.4: Kalibrierkurve für Paracetamol nach Proteinfällung (korrigierte Flächen) (n = 3)

Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurden die gemittelten Werte verwendet. Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	6,42
Steigung a :	$0,35 \pm 0,03$
Ordinatenabschnitt b :	$0,72 \pm 0,20$
Korrelationskoeffizient r :	0,9893
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9786
Reststandardabweichung s_y :	0,25
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,71
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	11,06 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Paracetamol:

Varianzdifferenz DS^2 : 0,03

Prüfwert PW : 0,71

F ($P = 99\%$, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

12.13 Validierung der Methode Parac2.M für Paracetamol

Linearität

Um die verschiedenen Probenvorbereitungen zu berücksichtigen, wurde zur Berechnung der Paracetamolkonzentrationen im Speichel (S. 51), nach der Festphasenextraktion für schwach saure Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen, eine neue Regressionsgleichung mit der Methode Parac.2 ermittelt. Dazu wurden negative Speichelproben (500 μ l) mit sechs verschiedenen Paracetamolstandardlösungen dotiert, so dass daraus Konzentrationen von 1, 4, 7, 10, 13 und 16 μ g/ml resultierten. Diese Speichelproben wurden mit der Festphasenextraktion für schwach saure Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen aufgearbeitet und jeweils dreimal mit der Methode Parac2.M vermessen. Die Flächen wurden zum Vergleich bei der Wellenlänge 200 nm und 245 nm ausgewertet.

Messwerte bei 200 nm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [μ g/ml]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
1	11,70	10,59	11,19	11,16	0,56	4,98
4	39,78	40,42	39,96	40,05	0,33	0,82
7	69,29	69,65	70,90	69,95	0,85	1,21
10	96,98	96,79	97,65	97,14	0,45	0,47
13	135,30	133,40	132,29	133,66	1,52	1,14
16	164,51	163,99	165,42	164,64	0,72	0,44

Tabelle 12.33: Messwerte der Flächen (Methode Parac2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.5) wurden die Mittelwerte der Flächen (ausgewertet bei 200 nm) verwendet.

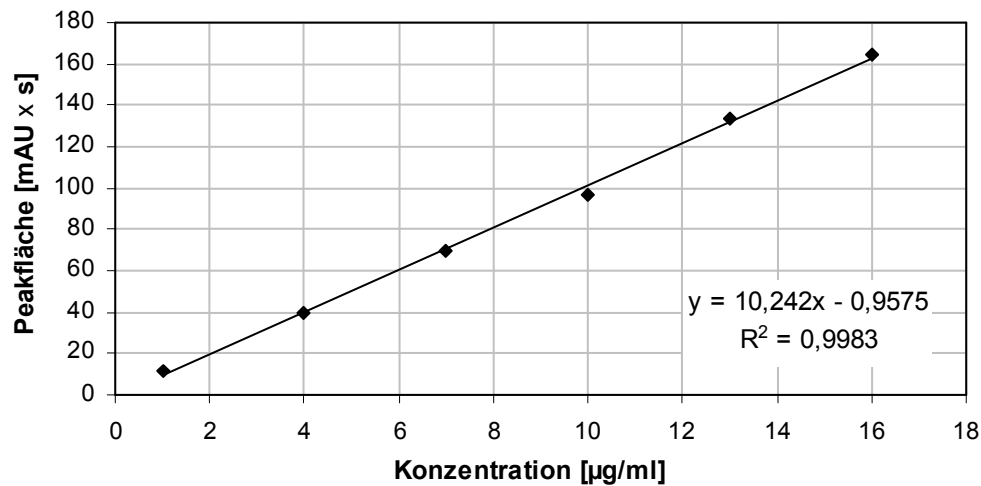


Bild 12.5: Kalibrierkurve für Paracetamol (Methode Para2.M; n = 3)

Zur Berechnung der Paracetamolkonzentrationen wurde die in Bild 12.5 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	8,5
Steigung a :	$10,24 \pm 0,21$
Ordinatenabschnitt b :	$-0,96 \pm 2,09$
Korrelationskoeffizient r :	0,9992
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9983
Reststandardabweichung s_y :	2,65
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,26
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3,06 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Paracetamol:	Varianzdifferenz DS^2 : 16,25
	Prüfwert PW : 4,15
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte bei 245 nm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	Konz. [µg/ml]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw
1	4,21	4,10	4,23	4,18	0,07	1,73
4	14,72	15,01	14,56	14,77	0,23	1,54
7	24,75	26,70	25,26	25,57	1,01	3,96
10	33,45	33,90	34,30	33,89	0,42	1,25
13	44,74	44,68	45,82	45,08	0,64	1,43
16	57,33	57,84	58,80	57,99	0,75	1,29

Tabelle 12.34: Messwerte der Flächen (Methode Parac2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.6) wurden die Mittelwerte der Flächen (ausgewertet bei 245 nm) verwendet.

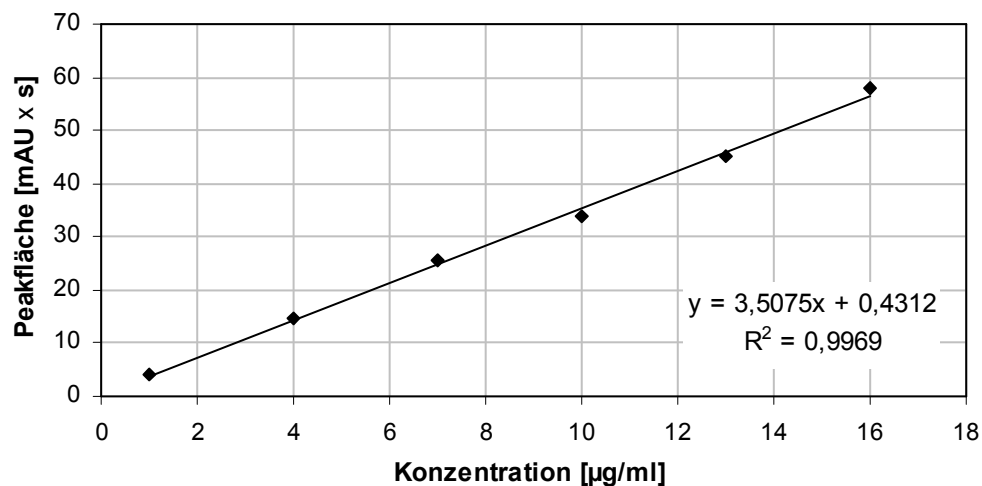


Bild 12.6: Kalibrierkurve für Paracetamol (Methode Para2.M; n = 3)

Die in Bild 12.6 angegebene lineare Regressionsgleichung $y = 3,5075x + 0,4312$ wurde zur Berechnung der Paracetamolkonzentrationen auf Seite 51 verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	8,5
Steigung a :	$3,51 \pm 0,1$
Ordinatenabschnitt b :	$0,43 \pm 0,98$
Korrelationskoeffizient r :	0,9984
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9969
Reststandardabweichung s_y :	1,23

Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,35
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	4,12 %
Bewertung:	
F-Test nach Mandel für Paracetamol:	Varianzdifferenz DS^2 : 2,07
	Prüfwert PW : 1,54
	F ($P = 99 \%$, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden negative Speichelproben mit Paracetamolkonzentrationen von 1, 7 bzw. 16 $\mu\text{g/ml}$ dotiert. Aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (1 mg/ml) wurden für jede Konzentration sechs Verdünnungen hergestellt. Zu jeweils sechs negativen Speichelproben (500 μl) wurden 100 μl der Paracetamolstandardlösung gegeben, sechsmal aufgearbeitet und an drei Tagen sechsmal injiziert.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
16	10,22	10,45	11,11	10,54	10,63	11,31
7	71,34	68,37	67,96	71,13	69,90	72,41
1	156,74	163,30	149,89	161,92	162,94	155,12

Tabelle 12.35: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	6,396	6,887	6,723	6,350	6,266	6,403
7	6,533	6,441	6,385	6,226	6,341	6,570
16	6,572	6,745	7,066	6,609	6,303	6,638

Tabelle 12.36: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
16	11,71	10,94	11,33	11,66	11,81	12,13
7	66,34	70,20	71,42	66,55	68,32	62,17
1	157,73	158,14	159,42	163,98	166,62	163,91

Tabelle 12.37: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	6,348	6,375	6,327	6,344	6,375	6,381
7	6,477	6,422	6,390	6,395	6,400	7,238
16	6,344	6,422	6,297	6,703	6,389	6,351

Tabelle 12.38: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
16	10,37	11,20	10,71	10,70	10,24	11,10
7	64,82	63,66	64,32	66,21	63,96	67,90
1	160,82	162,90	156,49	161,93	162,31	162,20

Tabelle 12.39: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	6,370	6,424	6,336	7,501	8,707	8,460
7	6,396	6,693	6,361	6,363	6,456	6,343
16	6,297	6,444	6,381	6,316	6,470	6,403

Tabelle 12.40: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	10,71	11,60	10,72	11,01
Stabw	0,42	0,41	0,38	0,51
Vk [%]	3,88	3,55	3,56	4,64
David-Test	2,62	2,89	2,52	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,01 ± 0,53				

Tabelle 12.41: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 1 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	6,504	6,358	7,300	6,721
Stabw	0,24	0,02	1,09	0,51
Vk [%]	3,75	0,34	14,92	7,54
David-Test	2,55	2,48	2,18	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,721 ± 0,532				

Tabelle 12.42: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 1 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
7 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	70,19	67,50	65,15	67,61
Stabw	1,76	3,29	1,62	2,52
Vk [%]	2,51	4,87	2,49	3,73
David-Test	2,53	2,82	2,62	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 67,61 ± 2,65				

Tabelle 12.43: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 7 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
7 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	6,416	6,554	6,435	6,468
Stabw	0,13	0,34	0,13	0,07
Vk [%]	1,98	5,14	2,06	1,15
David-Test	2,71	2,52	2,64	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,468 ± 0,078				

Tabelle 12.44: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 7 µg/ml

16 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	158,32	161,63	161,11	160,35
Stabw	5,35	3,68	2,36	1,78
Vk [%]	3,38	2,28	1,47	1,11
David-Test	2,44	2,41	2,71	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 160,35 ± 1,87				

Tabelle 12.45: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 16 µg/ml

16 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	6,656	6,418	6,386	6,486
Stabw	0,25	0,15	0,07	0,15
Vk [%]	3,74	2,28	1,08	2,28
David-Test	3,06	2,78	2,52	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,486 ± 0,155				

Tabelle 12.46: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 16 µg/ml

Wiederfindung

Die negativen Speichelproben wurden wie bei der Präzisionsbestimmung (S. 195) dotiert, mit der Extraktionsvorschrift für schwach saure Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen aufgearbeitet und mit der Methode Parac2.M vermessen. Die Wiederfindung errechnete sich aus dem Quotienten der Peakflächen (A/B) (S. 15).

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
Konz. [µg/ml]						
1 (A)	19,91	19,88	19,95	19,91	0,04	0,18
1 (B)	21,72	21,29	21,30	21,44	0,25	1,15
7 (A)	70,29	70,55	70,42	70,4	0,13	0,18
7 (B)	74,12	74,01	74,05	74,06	0,06	0,08
16 (A)	161,73	161,54	161,82	161,70	0,14	0,09
16 (B)	166,82	166,63	167,62	167,02	0,52	0,31

Tabelle 12.47: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Para2.M; A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
1	91,64	93,37	93,63	92,88	1,09	1,17
7	94,81	95,32	95,10	95,08	0,25	0,27
16	96,95	96,95	96,54	96,81	0,23	0,24

Tabelle 12.48: Wiederfindung des Paracetamols (Methode Parac2.M)

Richtigkeit

Die negativen Speichelproben wurden wie bei der Präzisionsbestimmung (S. 195) dotiert, mit der Extraktionsvorschrift über „Strata X-C[®]“ Kartuschen aufgearbeitet und mit der Methode Parac2.M jeweils sechsmal vermessen.

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	10,37	11,20	10,71	10,70	10,24	11,10
7	64,82	63,66	64,32	66,21	63,96	67,90
16	160,82	162,90	156,49	161,93	162,31	162,20

Tabelle 12.49: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	-10,56	-18,66	-13,88	-13,78	-9,29	-17,68
7	8,26	9,88	8,96	6,32	9,46	3,96
16	1,28	0,01	3,92	0,60	0,37	0,44

Tabelle 12.50: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.14 Validierung der MEKC-Methode Parac3.M für Paracetamol

Linearität

Negative Speichelproben wurden mit fünf verschiedenen Paracetamolkonzentrationen 2, 6, 10, 14 und 18 µg/ml dotiert. Jede Konzentration wurde dreimal aus einer Stammlösung hergestellt. Zu jeweils drei negativen Speichelproben (150 µl) wurden 50 µl der entsprechenden Paracetamolstandardlösung gegeben. Jede Probe wurde mit der Methode Parac3.M dreimal vermessen, d.h. für eine Konzentration ergaben sich neun Messungen. Zur Auswertung wurden die Flächen mit der Migrationszeit dividiert. Die Berechnungen der Paracetamolkonzentrationen im Speichel, nach den Analysen mit der MEKC-Methode Parac3.M, erfolgten anhand der ermittelten linearen Regressionsgleichungen $y = 0,4352 x - 0,0324$.

Messwerte:

x-Werte Konz. [µg/ml]	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
2	0,79	0,84	0,82	0,82	0,03	3,27
2	0,79	0,82	0,85	0,82	0,03	3,62
2	0,82	0,84	0,87	0,84	0,02	2,79
6	2,45	2,54	2,54	2,51	0,05	1,93
6	2,58	2,52	2,53	2,54	0,03	1,30
6	2,67	2,58	2,70	2,65	0,06	2,45
10	4,29	4,25	4,34	4,29	0,04	1,04
10	4,39	4,38	4,38	4,38	0,01	0,13
10	4,46	4,48	4,49	4,48	0,01	0,26
14	5,83	5,84	5,98	5,88	0,09	1,47
14	6,03	5,94	6,06	6,01	0,06	1,08
14	6,17	6,18	6,12	6,16	0,03	0,48
18	7,61	7,81	7,75	7,72	0,10	1,28
18	7,92	7,81	7,94	7,89	0,07	0,89
18	7,78	7,95	7,68	7,80	0,14	1,77

Tabelle 12.51: Messwerte der mit der Migrationszeit korrigierten Flächen (Methode Parac3.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.7) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

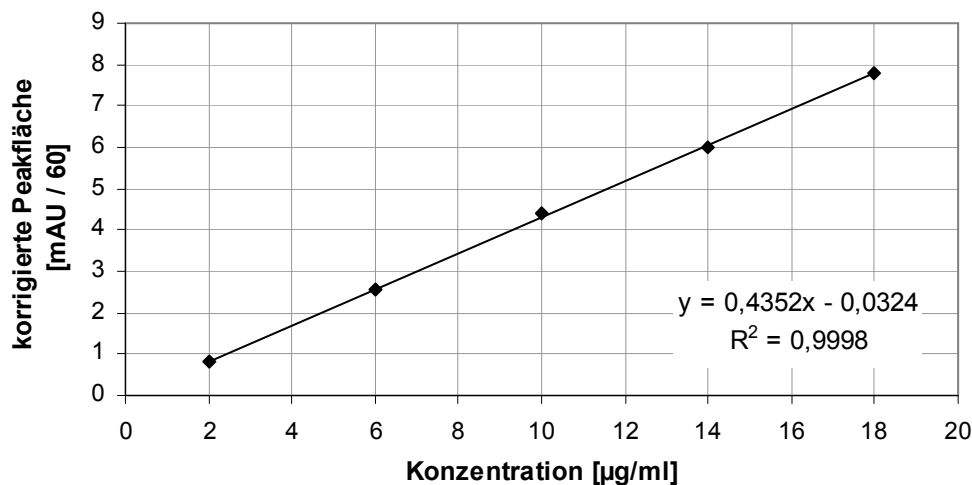


Bild 12.7: Kalibrierkurve für Paracetamol (Methode Parac3.M; n = 9)

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	10,00
Steigung a :	$0,44 \pm 0,01$
Ordinatenabschnitt b :	$-0,03 \pm 0,04$
Korrelationskoeffizient r :	0,9999
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9998
Reststandardabweichung s_y :	0,05
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,11
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	1,05 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Paracetamol:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,01
	Prüfwert PW : 0,26
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 2$): 98,50

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden negative Speichelproben mit drei verschiedenen Paracetamolkonzentrationen 6, 12 bzw. 18 µg/ml dotiert und jeweils sechsfach an drei Tagen mit der Methode Parac3.M vermessen. Die Flächen wurden zur Auswertung mit der Migrationszeit dividiert.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	2,40	2,48	2,49	2,51	2,49	2,53
12	4,48	4,58	4,60	4,37	4,45	4,43
18	7,37	7,38	7,39	7,43	7,53	7,53

Tabelle 12.52: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	13,684	13,660	13,620	13,580	13,545	13,510
12	13,924	13,877	13,849	13,806	13,773	13,739
18	14,078	14,052	14,054	13,962	13,704	13,670

Tabelle 12.53: Präzisionsbestimmung der Migrationszeit des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	2,32	2,45	2,39	2,42	2,47	2,48
12	4,33	4,40	4,49	4,39	4,33	4,49
18	7,33	7,32	7,27	7,22	7,12	7,29

Tabelle 12.54: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	13,937	14,167	14,120	14,024	13,854	13,754
12	14,167	14,332	14,328	14,317	14,290	14,250
18	14,249	14,017	14,087	14,158	14,172	13,667

Tabelle 12.55: Präzisionsbestimmung der Migrationszeit des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	2,55	2,45	2,40	2,42	2,61	2,41
12	4,62	4,47	4,60	4,69	4,74	4,63
18	7,45	7,52	7,39	7,44	7,50	7,62

Tabelle 12.56: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	13,175	13,156	13,126	13,114	13,081	13,087
12	13,257	13,234	13,205	13,187	13,172	13,154
18	13,389	13,372	13,353	13,337	13,322	13,308

Tabelle 12.57: Präzisionsbestimmung der Migrationszeit des 3. Tages

Ergebnisse:

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
6,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,48	2,42	2,47	2,46
Stabw	0,05	0,06	0,08	0,03
Vk [%]	1,86	2,40	3,45	1,33
David-Test	2,91	2,66	2,43	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,46 ± 0,03				

Tabelle 12.58: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 6,0 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
6,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	13,600	13,976	13,123	13,566
Stabw	0,07	0,16	0,04	0,43
Vk [%]	0,49	1,13	0,28	3,15
David-Test	2,59	2,61	2,52	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 13,566 ± 0,449				

Tabelle 12.59: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 6,0 µg/ml

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
12,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,45	4,40	4,63	4,51
Stabw	0,09	0,07	0,09	0,11
Vk [%]	1,97	1,66	2,01	2,50
David-Test	2,62	2,29	2,92	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,51 ± 0,12				

Tabelle 12.60: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 12,0 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
12,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	13,828	14,058	13,202	13,696
Stabw	0,07	0,21	0,04	0,44
Vk [%]	0,50	1,48	0,30	3,24
David-Test	2,70	2,81	2,66	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 13,696 ± 0,465				

Tabelle 12.61: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeit der Konzentration 12,0 µg/ml

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
18,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	7,44	7,26	7,49	7,39
Stabw	0,08	0,08	0,08	0,12
Vk [%]	1,01	1,06	1,07	1,63
David-Test	2,20	2,64	2,84	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 7,39 ± 0,13				

Tabelle 12.62: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 18,0 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
18,0 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	13,920	14,281	13,347	13,849
Stabw	0,19	0,06	0,03	0,47
Vk [%]	1,33	0,44	0,23	3,40
David-Test	2,20	2,60	2,65	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 13,849 ± 0,494				

Tabelle 12.63: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 18,0 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Paracetamol wurde das Standardadditionsverfahren angewendet. Dotierte Speichelproben mit drei verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils sechsmal vermessen.

Messwerte:

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	2,45	2,54	2,54	2,58	2,52	2,53
10	4,29	4,25	4,34	4,39	4,38	4,38
18	7,61	7,81	7,75	7,92	7,81	7,94

Tabelle 12.64: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung

Ergebnisse:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	95,21	98,45	98,39	100,01	97,57	98,23
10	97,62	100,06	99,37	101,55	100,10	101,75
18	99,32	98,41	100,46	101,53	101,30	101,33

Tabelle 12.65: Wiederfindung des Paracetamols (Methode Parac3.M)

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde anhand der Messreihen zur Bestimmung der Wiederfindung ermittelt.

Messwerte:

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	2,45	2,54	2,54	2,58	2,52	2,53
10	4,29	4,25	4,34	4,39	4,38	4,38
18	7,61	7,81	7,75	7,92	7,81	7,94

Tabelle 12.66: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6	0,68	1,59	-0,46	-1,53	-1,30	-1,33
10	2,38	-0,06	0,63	-1,55	-0,10	-1,75
18	4,79	1,55	1,61	-0,01	2,43	1,77

Tabelle 12.67: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.15 Kalibrierung für Diphenhydramin

Die Berechnungen der Diphenhydraminkonzentrationen (S. 81) im Speichel erfolgten anhand der ermittelten linearen Regressionsgleichung $y = 66,309x + 0,187$. Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden negative Speichelproben mit 900 µl 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 verdünnt und 100 µl der entsprechenden Diphenhydraminstandardlösung hinzugefügt, so dass daraus sieben verschiedene Konzentrationen resultierten. Diese Proben wurden mit der Festphasenextraktion I für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 163) aufgearbeitet und mit der Methode Phep.M vermessen.

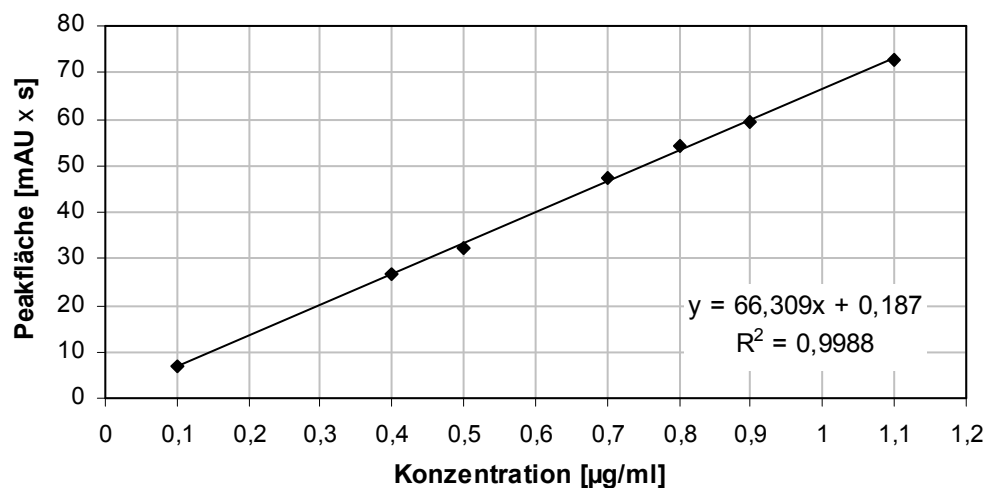


Bild 12.8: Kalibrierkurve für Diphenhydramin (Methode Phep.M; n = 3)

Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurden die Mittelwerte verwendet. Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,64
Steigung a :	$66,31 \pm 1,01$
Ordinatenabschnitt b :	$0,19 \pm 0,72$
Korrelationskoeffizient r :	0,9994

Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9988
Reststandardabweichung s_y :	0,83
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,01
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,03 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Diphenhydramin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,003
	Prüfwert PW : 0,003
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 4$): 21,20

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

12.16 Kalibrierung für Ephedrin

Zur Berechnung der Ephedrinkonzentrationen im Speichel (S. 92) wurde die lineare Regressionsgleichung $y = 77,767x + 0,0168$ verwendet. Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden negative Speichelproben (490 μl) mit 10 μl der entsprechenden Ephedrinstandardlösung dotiert, so dass daraus fünf verschiedene Konzentrationen resultierten. Die Speichelproben wurden mit der Festphasenextraktion I für basische Substanzen über „Strata X-C[®]“ Kartuschen (S. 162) aufgearbeitet und mit der Methode Pseu1.M vermessen.

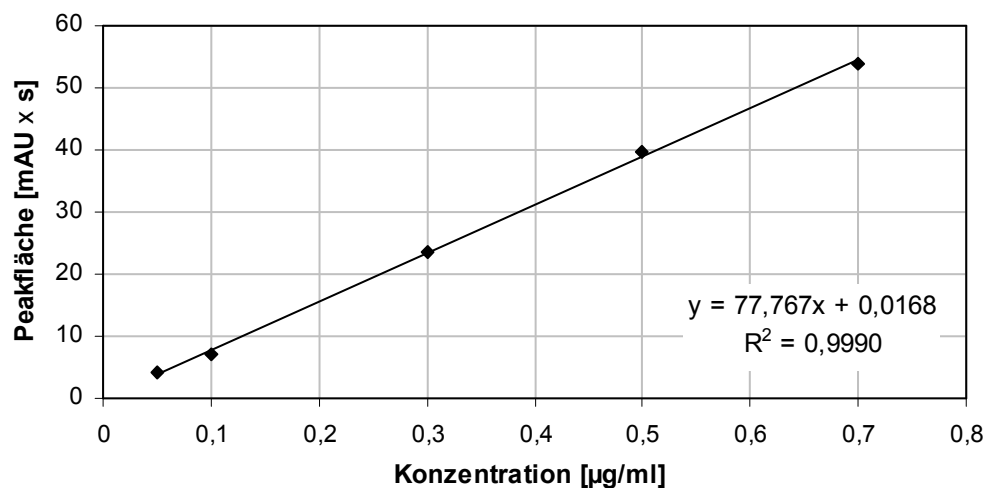


Bild 12.9: Kalibrierkurve für Ephedrin (Methode Pseu1.M; $n = 3$)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurden die Mittelwerte verwendet. Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,33
Steigung a :	$77,77 \pm 1,43$
Ordinatenabschnitt b :	$0,02 \pm 0,59$
Korrelationskoeffizient r :	0,9995
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9990
Reststandardabweichung s_y :	0,78
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,01
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3,03 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Ephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,73
	Prüfwert PW : 1,34
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 98,50

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

12.17 Validierung der Methoden Pseu1.M und Eph.M für Norephedrin

Linearität

Negative Speichelproben wurden mit sechs (30/37 cm Kapillare) bzw. acht (40/47 cm Kapillare) verschiedenen Norephedrinkonzentrationen dotiert, die den zu erwartenden Konzentrationsbereich abdeckten. Zu 1000 µl Speichel wurden 990 µl 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 zur Verdünnung und 10 µl der entsprechenden Norephedrinstandardlösung gegeben. Die Speichelproben wurden nach der allgemeinen Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) aufgearbeitet und jeweils dreimal vermessen. Die Flächenwerte wurden gemittelt und einer statistischen Analyse unterzogen.

Messwerte der Methode Eph.M:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,2	2,25	2,40	2,34	2,33	0,08	3,24
0,4	2,99	3,11	3,20	3,10	0,11	3,40
0,5	3,80	3,61	3,63	3,68	0,10	2,84
0,6	4,10	3,98	4,20	4,09	0,11	2,69
0,8	4,81	4,69	4,83	4,78	0,08	1,59
1,0	5,80	5,81	5,69	5,77	0,07	1,15

Tabelle 12.68: Messwerte der Flächen (30/37 cm Kapillare)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.10) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

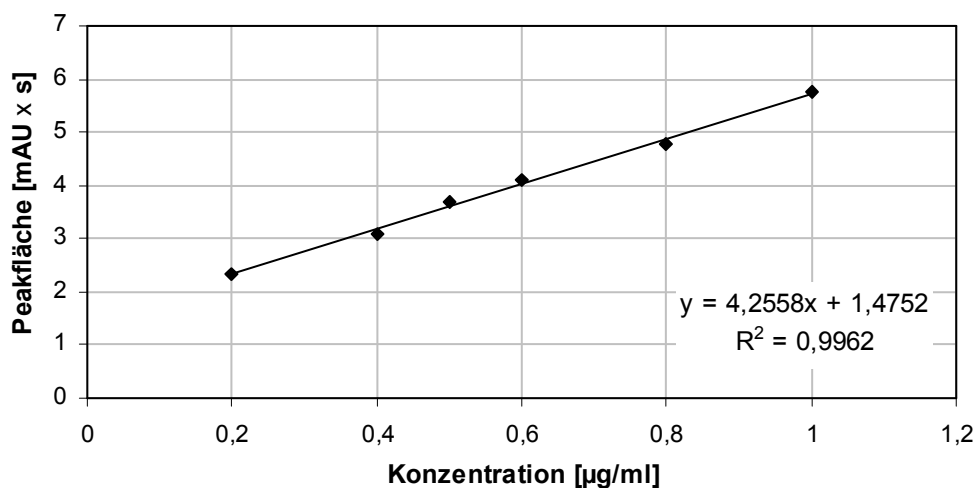


Bild 12.10: Kalibrierkurve für Norephedrin (Methode Eph.M; n = 3)

Zur Berechnung der Norephedrinkonzentrationen der Analysen mit der Methode Eph.M wurde die in Bild 12.10 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,58
Steigung a :	$4,26 \pm 0,13$
Ordinatenabschnitt b :	$1,48 \pm 0,08$
Korrelationskoeffizient r :	0,9981
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9962
Reststandardabweichung s_y :	0,08
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3,45 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Norephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,00
	Prüfwert PW : 0,00
	F ($P = 99 \%$, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte der Methode Pseu1.M:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
Konz. [µg/ml]						
0,2	1,59	1,60	1,70	1,63	0,06	3,73
0,4	2,61	2,70	2,71	2,67	0,06	2,06
0,5	3,40	3,21	3,22	3,28	0,11	3,26
0,6	4,10	3,87	3,92	3,96	0,12	3,05
0,8	5,22	5,05	5,12	5,13	0,09	1,67
1,0	5,89	6,41	6,31	6,20	0,28	4,45
1,4	8,79	9,21	8,93	8,98	0,21	2,38
2,5	15,68	15,49	16,31	15,83	0,43	2,71

Tabelle 12.69: Messwerte der Flächen (40/47 cm Kapillare)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.11) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

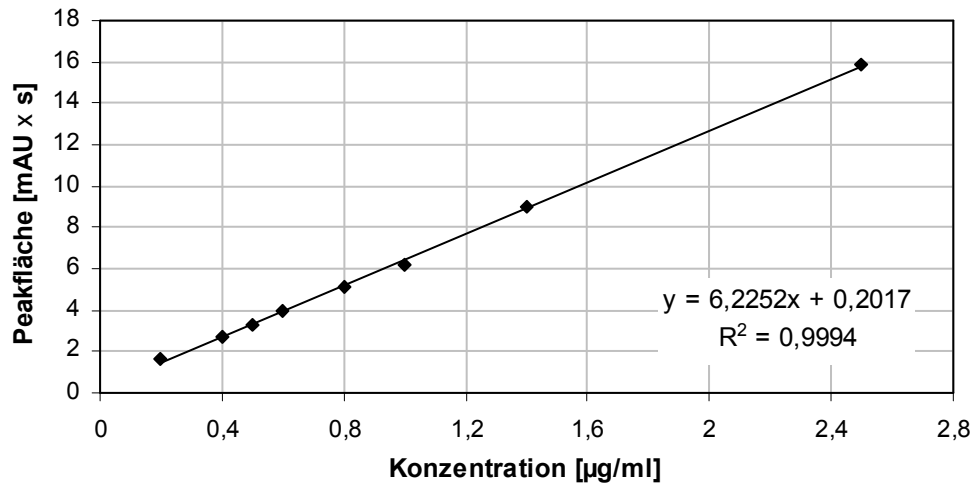


Bild 12.11: Kalibrierkurve für Norephedrin (Methode Pseu1.M; n = 3)

Zur Berechnung der Norephedrinkonzentrationen der Analysen mit der Methode Pseu1.M wurde die in Bild 12.11 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,93
Steigung a :	$6,23 \pm 0,07$
Ordinatenabschnitt b :	$0,20 \pm 0,08$
Korrelationskoeffizient r :	0,9997
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9994
Reststandardabweichung s_y :	0,13
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,15 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Norephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,04
	Prüfwert PW : 3,00
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 5$): 16,26

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Negative Speichelproben wurden mit 0,4, 0,6 bzw. 0,8 µg/ml Norephedrin dotiert. Die Norephedrinstandards wurden aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (1 mg/ml) hergestellt. 1000 µl Speichel wurden mit 990 µl 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 verdünnt und mit 10 µl der entsprechenden Norephedrinstandardslösung dotiert. Diese Speichelproben wurden mit der allgemeinen Extraktion für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) aufgearbeitet und an drei Tagen sechsmal injiziert.

Messwerte mit der Kapillare 30/37 cm:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,94	2,95	2,79	2,95	2,91	3,10
0,6	3,91	3,68	3,90	3,90	3,57	3,92
0,8	4,38	4,83	4,75	4,74	4,54	4,71

Tabelle 12.70: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	5,573	5,482	5,392	5,412	5,592	5,640
0,6	5,480	5,441	5,494	5,554	5,534	5,589
0,8	5,656	5,668	5,698	5,683	5,720	5,753

Tabelle 12.71: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,82	3,01	2,98	3,20	3,05	3,13
0,6	4,12	3,97	3,97	4,03	3,81	4,10
0,8	4,47	4,62	4,54	4,71	4,44	4,45

Tabelle 12.72: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	5,564	5,491	5,487	5,496	5,512	5,751
0,6	5,506	5,539	5,615	5,645	5,608	5,686
0,8	5,832	5,799	5,853	5,902	5,935	5,954

Tabelle 12.73: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,98	3,03	3,12	2,87	2,89	2,78
0,6	3,69	4,01	3,94	3,85	3,72	3,60
0,8	4,52	4,81	4,70	4,54	4,38	4,34

Tabelle 12.74: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	5,513	5,513	5,525	5,469	5,555	5,732
0,6	5,484	5,530	5,742	5,685	5,635	5,703
0,8	5,742	5,772	5,784	5,878	5,883	5,906

Tabelle 12.75: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages mit der 30/37 cm Kapillare

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
0,4 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,94	3,03	2,95	2,97
Stabw	0,10	0,13	0,12	0,05
Vk [%]	3,37	4,33	4,16	1,66
David-Test	3,13	2,89	2,78	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): $2,97 \pm 0,05$				

Tabelle 12.76: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

	Migrationszeiten [min]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,515	5,550	5,551	5,539
Stabw	0,10	0,10	0,09	0,02
Vk [%]	1,84	1,84	1,67	0,37
David-Test	2,44	2,57	2,83	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,539 ± 0,215				

Tabelle 12.77: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

	Flächen [mAU x s]			
0,6 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	3,81	4,00	3,80	3,87
Stabw	0,15	0,11	0,16	0,11
Vk [%]	3,94	2,81	4,15	2,91
David-Test	2,33	2,76	2,60	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 3,87 ± 0,12				

Tabelle 12.78: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

	Migrationszeiten [min]			
0,6 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	5,515	5,600	5,630	5,582
Stabw	0,05	0,07	0,10	0,06
Vk [%]	0,98	1,20	1,82	1,06
David-Test	2,75	2,70	2,52	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,582 ± 0,06				

Tabelle 12.79: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

	Flächen [mAU x s]			
0,8 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,66	4,54	4,55	4,58
Stabw	0,17	0,11	0,18	0,07
Vk [%]	3,58	2,38	3,98	1,45
David-Test	2,70	2,50	2,59	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,58 ± 0,07				

Tabelle 12.80: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,8 µg/ml				
Mittelwerte [min]	5,696	5,879	5,826	5,801
Stabw	0,04	0,06	0,07	0,09
Vk [%]	0,63	1,04	1,19	1,63
David-Test	2,72	2,54	2,36	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,801 ± 0,099				

Tabelle 12.81: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 30/37 cm Kapillare

Messwerte mit der Kapillare 40/47 cm:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,78	3,11	2,79	2,75	2,84	2,78
0,6	3,70	3,72	3,49	3,73	3,81	3,39
0,8	4,70	4,80	4,91	4,59	4,37	4,53

Tabelle 12.82: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	8,522	8,492	8,483	8,495	8,508	8,705
0,6	8,574	8,594	8,610	8,630	8,658	8,643
0,8	8,781	8,823	8,855	8,921	8,756	8,682

Tabelle 12.83: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,75	2,83	2,72	2,90	2,84	2,67
0,6	3,63	3,68	3,90	3,65	3,73	3,74
0,8	4,91	4,90	5,00	4,73	4,49	4,58

Tabelle 12.84: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	8,648	8,640	8,643	8,671	8,646	8,698
0,6	8,704	8,675	8,706	8,736	8,785	8,785
0,8	8,826	8,848	8,888	8,903	8,906	8,989

Tabelle 12.85: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	2,93	2,57	2,82	2,81	2,81	2,48
0,6	3,72	3,65	3,71	3,70	3,91	3,93
0,8	4,39	4,55	4,71	5,21	4,92	4,78

Tabelle 12.86: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,4	8,567	8,573	8,623	8,476	8,542	8,565
0,6	8,663	8,659	8,749	8,696	8,755	8,815
0,8	8,986	8,959	8,971	9,078	9,266	8,707

Tabelle 12.87: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages mit der 40/47 cm Kapillare

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,84	2,79	2,74	2,79
Stabw	0,13	0,09	0,17	0,05
Vk [%]	4,74	3,09	6,30	1,79
David-Test	2,67	2,68	2,61	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,79 ± 0,05				

Tabelle 12.88: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillare

	Migrationszeiten [min]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	8,534	8,658	8,558	8,583
Stabw	0,09	0,02	0,05	0,07
Vk [%]	0,99	0,26	0,56	0,76
David-Test	2,62	2,56	3,06	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 8,583 ± 0,069				

Tabelle 12.89: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillare

	Flächen [mAU x s]			
0,6 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	3,64	3,72	3,77	3,71
Stabw	0,16	0,10	0,12	0,07
Vk [%]	4,46	2,62	3,15	1,77
David-Test	2,58	2,57	2,19	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 3,71 ± 0,07				

Tabelle 12.90: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillare

	Migrationszeiten [min]			
0,6 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	8,618	8,732	8,723	8,691
Stabw	0,03	0,05	0,06	0,06
Vk [%]	0,37	0,52	0,70	0,73
David-Test	2,67	2,42	2,56	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 8,691 ± 0,067				

Tabelle 12.91: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillar

	Flächen [mAU x s]			
0,8 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,65	4,77	4,76	4,73
Stabw	0,19	0,20	0,29	0,07
Vk [%]	4,18	4,25	6,03	1,41
David-Test	2,78	2,52	2,86	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,73 ± 0,07				

Tabelle 12.92: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillare

0,8 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	8,803	8,893	8,995	8,897
Stabw	0,08	0,06	0,18	0,10
Vk [%]	0,94	0,64	2,02	1,08
David-Test	2,88	2,88	3,08	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 8,897 ± 0,101				

Tabelle 12.93: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung mit der 40/47 cm Kapillare

Wiederfindung

Wie bei der Präzisionsbestimmung (S. 212) wurden die Norephedrinstandardlösungen hergestellt, aufgearbeitet und mit der Methode Eph.M und Pseu1.M vermessen. Die Wiederfindung errechnete sich aus dem Quotienten der Peakflächen (A/B) (S. 15).

Messwerte mit der Kapillare 30/37 cm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,4 (A)	3,10	3,09	3,22	3,14	0,07	2,31
0,4 (B)	3,41	3,23	3,35	3,33	0,09	2,75
0,6 (A)	4,15	3,90	4,20	4,08	0,16	3,94
0,6 (B)	4,52	4,43	4,41	4,45	0,06	1,32
0,8 (A)	4,83	4,61	4,81	4,75	0,12	2,56
0,8 (B)	5,00	5,22	5,10	5,11	0,11	2,16

Tabelle 12.94: Messwert zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Eph.M;
A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse mit der Kapillare 30/37 cm:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,4	90,91	95,67	96,12	94,23	2,89	3,06
0,6	91,81	88,04	95,24	91,70	3,60	3,93
0,8	96,60	88,31	94,31	93,08	4,28	4,60

Tabelle 12.95: Wiederfindung des Norephedrins (Methode Eph.M)

Messwerte mit der Kapillare 40/47 cm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,4 (A)	2,68	2,72	2,73	2,71	0,03	0,98
0,4 (B)	3,49	3,80	3,54	3,61	0,17	4,61
0,6 (A)	4,10	3,87	3,90	3,96	0,13	3,16
0,6 (B)	4,90	5,10	5,12	5,04	0,12	2,41
0,8 (A)	5,23	5,08	5,14	5,15	0,08	1,47
0,8 (B)	6,90	7,42	7,41	7,24	0,30	4,11

Tabelle 12.96: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Pseu1.M;
A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse mit der Kapillare 40/47 cm:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,4	76,79	71,58	77,12	75,16	3,11	4,14
0,6	83,67	75,88	76,17	78,58	4,42	5,62
0,8	75,80	68,46	69,37	71,21	4,00	5,62

Tabelle 12.97: Wiederfindung des Norephedrins (Methode Pseu1.M)

Richtigkeit

Es wurden die Messwerte der „Interday“ Präzisionsbestimmung (S. 212-218) zur Auswertung herangezogen, um auch die Richtigkeit bei „Interday“ Messungen zu beurteilen.

Messwerte mit der Kapillare 30/37 cm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“	Stabw	Vk [%]
0,4	2,94	3,03	2,95	2,97	0,05	1,66
0,6	3,81	4,00	3,80	3,87	0,11	2,91
0,8	4,66	4,54	4,55	4,58	0,07	1,45

Tabelle 12.98: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse mit der Kapillare 30/37 cm:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,4	13,95	8,67	13,37	11,99
0,6	8,56	1,12	8,96	6,21
0,8	6,46	9,98	9,69	8,71

Tabelle 12.99: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Messwerte mit der Kapillare 40/47 cm:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“	Stabw	Vk [%]
0,4	2,84	2,79	2,74	2,79	0,05	1,79
0,6	3,64	3,72	3,77	3,71	0,07	1,77
0,8	4,65	4,77	4,76	4,73	0,07	1,41

Tabelle 12.100: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse mit der Kapillare 40/47 cm:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,4	-5,93	-3,92	-1,92	-4,01
0,6	7,97	5,82	4,49	6,00
0,8	10,70	8,29	8,49	9,09

Tabelle 12.101: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.18 Validierung der Methode Pseu1.M für Norpseudoephedrin

Linearität

Zu 1000 µl Speichel wurden 990 µl 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 zur Verdünnung und 10 µl der entsprechenden Norpseudoephedrinstandardlösung dotiert. Die Speichelproben wurden nach der allgemeinen Extraktionsvorschrift für die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) aufgearbeitet und jeweils dreimal mit der Methode Pseu1.M vermessen. Die Flächenwerte wurden gemittelt und einer statistischen Analyse unterzogen.

Messwerte:

x-Werte Konz. [µg/ml]	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,2	3,80	3,74	3,65	3,73	0,08	2,02
0,25	4,70	4,53	4,39	4,54	0,16	3,42
0,3	5,52	5,40	5,51	5,48	0,07	1,22
0,35	6,32	6,08	6,40	6,27	0,17	2,66
0,4	7,31	7,15	6,90	7,12	0,21	2,90
0,45	8,40	8,04	8,21	8,22	0,18	2,19
0,5	9,11	9,30	8,99	9,13	0,16	1,71

Tabelle 12.102: Messwerte der Flächen (Methode Pseu1.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.12) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

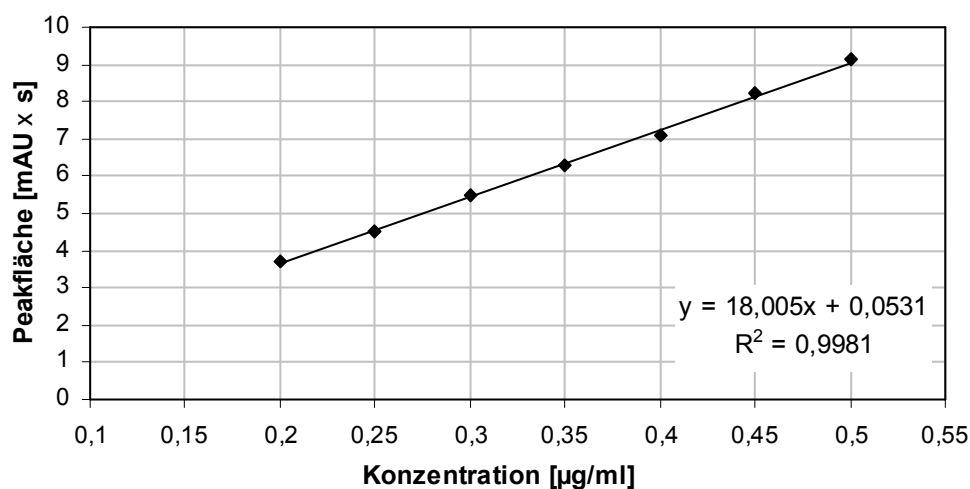


Bild 12.12: Kalibrierkurve für Norpseudoephedrin (Methode Pseu1.M; n = 3)

Zur Berechnung der Norpseudoephedrinkonzentrationen wurde die in Bild 12.12 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,35
Steigung a :	$18,01 \pm 0,35$
Ordinatenabschnitt b :	$0,05 \pm 0,13$
Korrelationskoeffizient r :	0,9991
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9981
Reststandardabweichung s_y :	0,09
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,01
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,86 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Norpseudoephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,03
	Prüfwert PW : 6,02
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 4$): 21,20

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden negative Speichelproben mit den Norpseudoephedrinkonzentrationen 0,25, 0,4 bzw. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dotiert. Aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (1 mg/ml) wurden für jede Konzentration sechs Verdünnungen hergestellt. An jedem Tag wurden 10 μl der Verdünnung zu einer negativen Speichelprobe (1 ml) gegeben, so dass daraus sechs Proben für jede Konzentration resultierten. Diese Speichelproben wurden an drei Tagen über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen nach der allgemeinen Extraktionsvorschrift (S. 162) aufgearbeitet und mit der Methode Pseu1.M vermessen.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	4,39	4,51	4,60	4,70	4,62	4,57
0,4	7,70	7,35	7,62	7,51	7,46	7,40
0,5	9,19	9,47	9,28	9,90	10,50	9,42

Tabelle 12.103: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	11,356	11,538	11,416	11,333	11,833	11,520
0,4	11,826	11,976	12,026	12,034	11,397	12,268
0,5	13,369	12,889	13,366	13,563	13,641	13,266

Tabelle 12.104: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	4,80	4,57	4,65	4,62	4,80	4,71
0,4	7,38	7,52	7,51	7,60	7,52	7,80
0,5	10,71	10,90	9,88	9,16	11,20	10,81

Tabelle 12.105: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	11,544	12,157	12,362	14,788	13,273	12,464
0,4	12,874	12,681	12,829	13,260	13,643	13,648
0,5	13,024	11,568	14,756	14,936	12,887	12,951

Tabelle 12.106: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	4,53	4,71	4,63	4,52	4,68	4,60
0,4	7,42	7,38	7,36	7,55	7,43	7,40
0,5	9,28	9,45	9,62	10,80	10,71	9,97

Tabelle 12.107: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,25	13,820	13,864	13,254	12,900	12,789	11,291
0,4	13,685	13,554	13,448	13,960	10,457	9,710
0,5	12,622	13,029	13,29	10,487	13,983	13,123

Tabelle 12.108: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse:

	Flächen [mAU x s]			
0,25 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,57	4,69	4,61	4,62
Stabw	0,11	0,10	0,08	0,06
Vk [%]	2,32	2,03	1,68	1,32
David-Test	2,93	2,41	2,46	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,62 ± 0,06				

Tabelle 12.109: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,25 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,25 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,499	12,765	12,986	12,417
Stabw	0,18	1,14	0,94	0,80
Vk [%]	1,60	8,91	7,27	6,46
David-Test	2,72	2,85	2,73	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 12,417 ± 0,842				

Tabelle 12.110: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,25 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	7,51	7,56	7,42	7,50
Stabw	0,13	0,14	0,07	0,07
Vk [%]	1,77	1,85	0,90	0,95
David-Test	2,63	3,01	2,83	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 7,50 ± 0,07				

Tabelle 12.111: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,4 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,921	13,156	12,469	12,515
Stabw	0,29	0,43	1,87	0,62
Vk [%]	2,46	3,23	15,00	4,94
David-Test	2,97	2,64	2,27	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 12,515 ± 0,649				

Tabelle 12.112: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,4 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,5 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	9,63	10,44	9,97	10,01
Stabw	0,49	0,77	0,65	0,41
Vk [%]	5,12	7,36	6,51	4,06
David-Test	2,66	2,66	2,34	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,01 ± 0,43				

Tabelle 12.113: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,5 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,5 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	13,349	13,354	12,756	13,153
Stabw	0,26	1,28	1,20	0,34
Vk [%]	1,98	9,56	9,39	2,62
David-Test	2,55	2,64	2,92	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 13,153 ± 0,361				

Tabelle 12.114: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,5 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Norpseudoephedrin wurden negative Speichelproben mit drei verschiedenen Norpseudoephedrskonzentrationen dotiert. Die Proben wurden nach der allgemeinen Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 162) aufgearbeitet und mit der Methode Pseu1.M vermessen. Die Wiederfindung errechnete sich aus dem Quotienten der Peakflächen (A/B) (S. 16).

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,25 (A)	4,70	4,59	4,34	4,54	0,18	4,06
0,25 (B)	4,69	4,71	4,90	4,77	0,12	2,43
0,35 (A)	6,34	6,09	6,49	6,31	0,20	3,20
0,35 (B)	6,42	6,61	7,10	6,71	0,35	5,23
0,5 (A)	9,17	9,34	8,99	9,17	0,18	1,91
0,5 (B)	10,33	10,90	10,81	10,62	0,40	3,80

Tabelle 12.115: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Pseu1.M;
A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,25	100,21	97,45	88,57	95,41	6,08	6,38
0,35	98,75	92,13	91,41	94,10	4,05	4,30
0,5	88,77	85,69	83,16	85,87	2,81	3,27

Tabelle 12.116: Wiederfindung des Norpseudoephedrins (Methode Pseu1.M)

Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden die Messwerte der „Interday“ Präzisionsbestimmung (S. 223-225) herangezogen, um eine Beurteilung für „Interday“ Messungen vornehmen zu können.

Messwerte:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“	Stabw	Vk [%]
0,25	4,57	4,69	4,61	4,62	0,06	1,32
0,35	7,51	7,56	7,42	7,50	0,07	0,95
0,5	9,63	10,44	9,97	10,01	0,41	4,06

Tabelle 12.117: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,25	-0,35	-3,01	-1,24	-1,53
0,35	-3,54	-4,23	-2,29	-3,35
0,5	-6,38	-15,38	-10,16	-10,64

Tabelle 12.118: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.19 Validierung der Methode PseuU.M für Pseudoephedrin

Linearität

Negative Urinproben (200 µl) wurden mit Pseudoephedrinstandardslösungen (20 µl) dotiert, so dass zehn verschiedene Konzentrationen resultierten. Zu 100 µl dieses Gemisches wurde der interne Standard Butylscopolamin (10 µl einer 2,5 mg/ml Stammlösung) gegeben. Jede dotierte Urinprobe wurde ohne vorherige Aufbereitung dreimal vermessen. Zur Auswertung wurden die Flächen der Probe dividiert durch die Fläche des internen Standards.

Messwerte:

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
20	0,20	0,19	0,17	0,18	0,01	4,96
40	0,35	0,36	0,36	0,36	0,00	0,77
60	0,47	0,48	0,48	0,48	0,00	0,58
80	0,70	0,67	0,67	0,68	0,02	2,56
100	0,75	0,83	0,82	0,80	0,05	5,62
120	1,10	1,09	1,12	1,10	0,02	1,70
140	1,15	1,17	1,20	1,17	0,02	2,02
160	1,46	1,42	1,44	1,44	0,02	1,43
180	1,60	1,63	1,60	1,61	0,02	1,07
200	1,67	1,66	1,66	1,66	0,01	0,30

Tabelle 12.119: Messwerte der korrigierten Flächen mit den Flächen des internen Standards (Methode PseuU.M)

Im Bild 12.13 ist die Kalibrierkurve mit den mittleren korrigierten Flächen des Pseudoephedrins dargestellt.

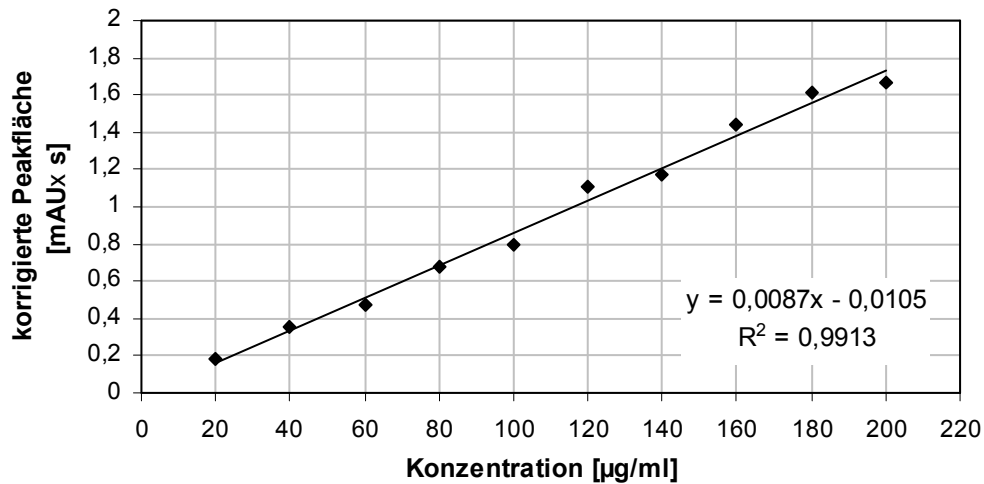


Bild 12.13: Kalibrierkurve für Pseudoephedrin im Urin (Methode PseuU.M; n = 3)

Zur Berechnung der Pseudoephedrinkonzentrationen wurde die in Bild 12.13 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression:

Arbeitsmitte \bar{x} :	110,00
Steigung a :	0,01 ± 0,00
Ordinatenabschnitt b :	-0,01 ± 0,04
Korrelationskoeffizient r :	0,9956
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9913
Reststandardabweichung s_y :	0,05
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	6,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	5,47 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Pseudoephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,0005
	Prüfwert PW : 0,17
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 7$): 12,25

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Aus drei separat eingewogenen Stammlösungen (3 mg/ml) wurden für jede Konzentration (60, 80 und 100 µg/ml) sechs Verdünnungen hergestellt, von denen 20 µl zu jeweils sechs Urinproben (200 µl) gegeben wurden. Zu 100 µl Urin wurde der interne Standard Butylscopolamin (10 µl einer Stammlösung 2,5 mg/ml) dotiert. Jede dotierte Probe wurde an drei Tagen injiziert.

Messwerte:

1. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	0,43	0,46	0,44	0,50	0,45	0,44
80	0,58	0,57	0,58	0,56	0,57	0,56
100	0,87	0,90	0,87	0,90	0,89	0,86

Tabelle 12.120: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	9,678	9,511	9,198	9,432	9,157	8,864
80	9,520	9,374	9,379	8,732	8,716	8,807
100	11,998	11,908	12,099	12,047	12,009	12,027

Tabelle 12.121: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	0,44	0,44	0,44	0,50	0,45	0,44
80	0,56	0,59	0,59	0,54	0,55	0,53
100	0,80	0,78	0,78	0,85	0,88	0,80

Tabelle 12.122: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	11,742	11,708	11,630	12,503	11,928	12,215
80	11,429	11,455	12,313	12,985	12,316	11,942
100	12,446	12,181	12,253	12,180	12,256	12,268

Tabelle 12.123: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	0,49	0,49	0,45	0,45	0,47	0,44
80	0,56	0,58	0,59	0,62	0,60	0,56
100	0,80	0,87	0,83	0,82	0,81	0,82

Tabelle 12.124: Präzisionsbestimmung der korrigierten Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	12,274	12,342	12,098	12,149	12,216	9,607
80	9,662	9,661	9,781	9,700	9,798	9,801
100	9,786	9,841	9,862	9,917	9,883	9,868

Tabelle 12.125: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse:

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
60 $\mu\text{g/ml}$	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	0,45	0,45	0,47	0,47
Stabw	0,02	0,02	0,02	0,01
Vk [%]	5,2	4,80	4,08	1,80
David-Test	2,59	2,67	2,17	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): $0,47 \pm 0,01$				

Tabelle 12.126: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 60 $\mu\text{g/ml}$

	Migrationszeiten [min]			
60 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	9,307	11,954	11,781	11,014
Stabw	0,30	0,34	1,07	1,48
Vk [%]	3,14	2,85	9,07	13,45
David-Test	2,79	2,56	2,56	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,014 ± 1,555				

Tabelle 12.127: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 60 µg/ml

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
80 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	0,57	0,56	0,59	0,57
Stabw	0,01	0,02	0,02	0,01
Vk [%]	1,94	4,30	3,93	2,26
David-Test	2,59	2,50	2,50	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 0,57 ± 0,01				

Tabelle 12.128: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 80 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
80 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	9,088	12,073	9,757	10,306
Stabw	0,37	0,59	0,07	1,57
Vk [%]	4,11	4,92	0,69	15,20
David-Test	2,15	2,62	0,58	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,306 ± 1,644				

Tabelle 12.129: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 80 µg/ml

	korrigierte Flächen [mAU / 60]			
100 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	0,88	0,82	0,83	0,84
Stabw	0,02	0,04	0,03	0,035
Vk [%]	1,79	4,92	3,06	4,16
David-Test	2,66	2,57	2,85	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 0,84 ± 0,04				

Tabelle 12.130: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die korrigierten Flächen der Konzentration 100 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
100 µg/ml				
Mittelwerte [min]	12,015	12,264	9,860	11,380
Stabw	0,06	0,10	0,04	1,32
Vk [%]	0,53	0,79	0,45	11,62
David-Test	3,02	2,74	3,00	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,380 ± 1,388				

Tabelle 12.131: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 100 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Pseudoephedrin wurde das Standardadditionsverfahren angewendet. Die Ergebnisse der drei Konzentrationen 60, 80 und 100 µg/ml der Präzisionsbestimmung wurden zur Berechnung herangezogen, um auch eine „Interday“ Bestimmung bei der Wiederfindung durchzuführen. Die Wiederfindungen sind auf Seite 112 aufgelistet.

Richtigkeit

Die mit den Pseudoephedrinkonzentrationen 60, 80 und 100 µg/ml und dem internen Standard Butylscopolamin (250 µg/ml) dotierten Urinproben wurden jeweils sechsmal vermessen. Die Mittelwerte der berechneten Konzentrationen wurden mit den wahren Konzentrationen verglichen.

Messwerte:

x-Werte	korrigierte Flächen [mAU / 60]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	0,49	0,47	0,45	0,46	0,47	0,44
80	0,58	0,58	0,59	0,62	0,6	0,58
100	0,83	0,87	0,82	0,84	0,83	0,85

Tabelle 12.132: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
60	4,12	7,95	11,78	9,87	7,95	13,70
80	15,16	15,16	13,72	9,41	12,28	15,16
100	3,39	-1,21	4,54	2,24	3,39	1,09

Tabelle 12.133: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.20 Validierung der Methode Amfe2.M für Amfepramon-Metaboliten

Validierung der Methode Amfe2.M ohne Speichelmatrix

Linearität

Die sieben Konzentrationen der Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin in 0,1 mM Phosphorsäure, die den Konzentrationsbereich 0,12 µg/ml bis 0,02 µg/ml abdeckten, wurden jeweils dreimal vermessen.

Messwerte für Ethylaminopropiophenon:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,025	2,39	2,43	2,31	2,38	0,06	2,57
0,03	2,90	2,83	2,82	2,85	0,04	1,53
0,04	4,21	4,08	4,11	4,13	0,07	1,65
0,05	4,87	4,84	5,11	4,94	0,15	3,00
0,075	6,79	7,04	7,20	7,01	0,21	2,95
0,1	10,14	9,98	10,20	10,11	0,11	1,13
0,12	11,39	11,80	11,72	11,64	0,22	1,87

Tabelle 12.134: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.14) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

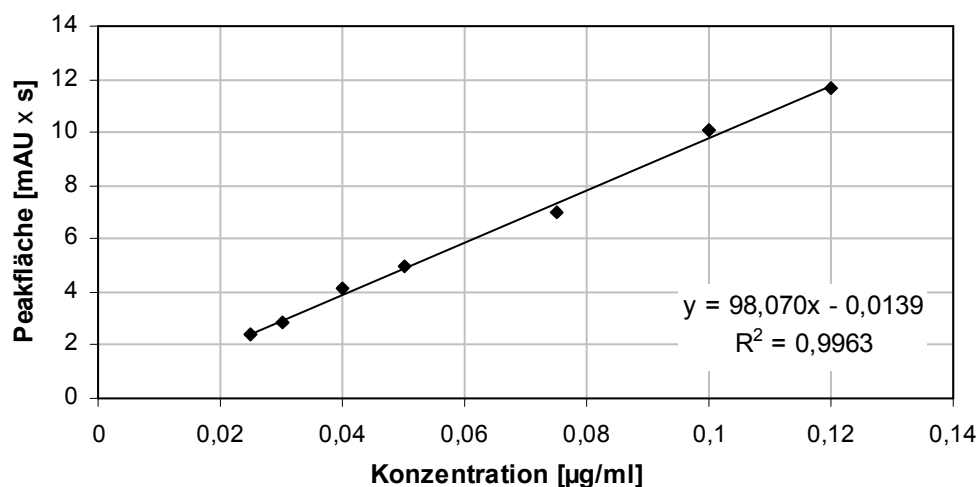


Bild 12.14: Kalibrierkurve für Ethylaminopropiophenon (Methode Amfe2.M; n = 3)

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Ethylaminopropiophenons:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,06
Steigung a :	$98,07 \pm 2,67$
Ordinatenabschnitt b :	$-0,01 \pm 0,19$
Korrelationskoeffizient r :	0,9982
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9963
Reststandardabweichung s_y :	0,24
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,002
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3,33 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Ethylaminopropiophenon: Varianzdifferenz DS^2 : 0,0004

Prüfwert PW : 0,01

F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 4$): 21,20

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte für Ethylnorephedrin:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,02	1,9	1,8	1,8	1,8	0,1	3,2
0,025	2,4	2,3	2,3	2,3	0,1	2,5
0,03	2,5	2,7	2,6	2,6	0,1	3,9
0,04	3,4	3,3	3,2	3,3	0,1	3,0
0,06	5,1	5,0	5,1	5,1	0,1	1,1
0,08	6,8	6,9	7,0	6,9	0,1	1,5
0,1	8,7	8,5	8,5	8,6	0,1	1,4

Tabelle 12.135: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.15) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

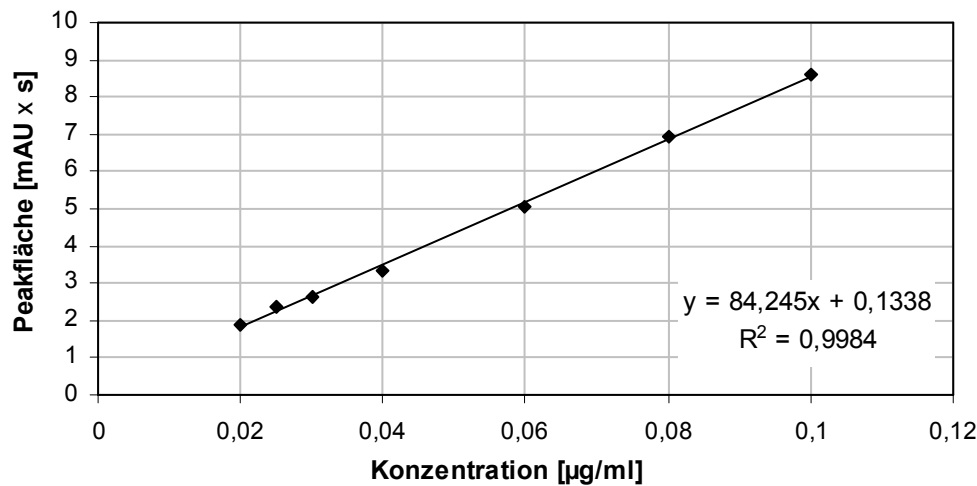


Bild 12.15: Kalibrierkurve für Ethylnorephedrin (Methode Amfe2.M; n = 3)

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Ethylnorephedrin:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,05
Steigung a :	$84,25 \pm 1,49$
Ordinatenabschnitt b :	$0,13 \pm 0,09$
Korrelationskoeffizient r :	0,9992
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9984
Reststandardabweichung s_y :	0,11
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,001
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,00 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Ethylnorephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,03
	Prüfwert PW : 3,44
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 4$): 21,20

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte für Diethylnorephedrin:

x-Werte Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,02	1,82	1,81	1,78	1,80	0,02	1,15
0,025	2,21	2,16	2,20	2,19	0,03	1,21
0,03	2,55	2,71	2,64	2,63	0,08	3,05
0,04	3,30	3,29	3,24	3,28	0,03	0,98
0,06	5,18	5,21	5,23	5,21	0,03	0,48
0,08	6,91	6,77	7,20	6,96	0,22	3,15
0,1	8,37	8,71	8,29	8,46	0,22	2,64

Tabelle 12.136: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.16) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

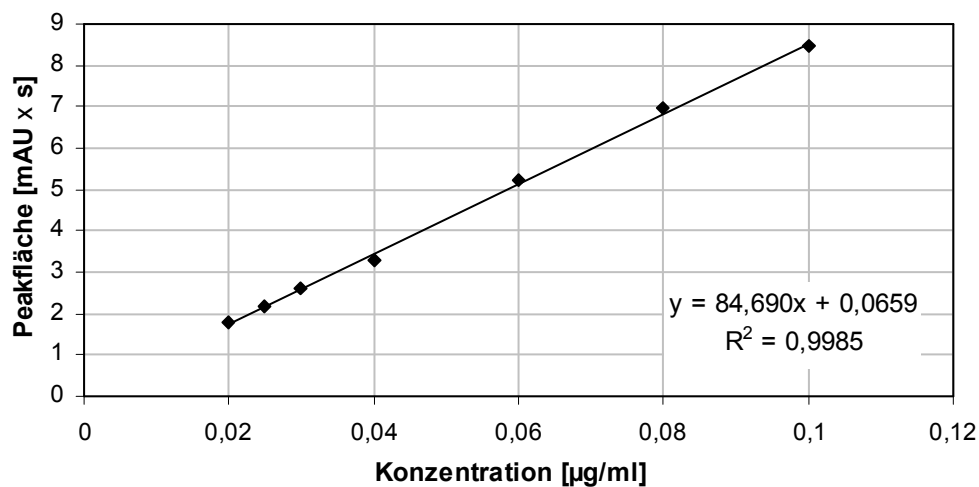


Bild 12.16: Kalibrierkurve für Diethylnorephedrin (Methode Amfe2.M; $n = 3$)

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Diethylnorephedrins:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,05
Steigung a :	$84,69 \pm 1,45$
Ordinatenabschnitt b :	$0,07 \pm 0,08$
Korrelationskoeffizient r :	0,9993
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9985
Reststandardabweichung s_y :	0,11
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,001
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,00 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Diethylnorephedrin:

Varianzdifferenz DS^2 : 0,0006

Prüfwert PW : 0,04

F ($P = 99\%$, $f_1 = 1$, $f_2 = 4$): 21,20

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Ermittlung der Messpräzision wurden die Konzentrationen 0,03, 0,05 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ für Ethylaminopropiophenon und 0,025, 0,04 und 0,08 $\mu\text{g/ml}$ für Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin in 0,1 mM Phosphorsäure hergestellt. Die jeweiligen Gemische wurden an drei Tagen jeweils sechsmal aus derselben Verdünnung vermessen.

Messwerte des Ethylaminopropiophenons:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	2,87	2,91	2,78	2,83	2,92	3,10
0,05	4,99	5,10	4,95	5,02	5,22	5,21
0,10	10,10	9,89	10,21	10,20	9,97	10,04

Tabelle 12.137: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	10,125	10,034	10,181	10,126	10,041	10,009
0,05	9,984	9,982	10,001	9,979	9,950	9,940
0,10	10,474	10,210	10,115	10,182	10,059	10,013

Tabelle 12.138: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	2,91	2,90	2,83	2,77	2,81	2,76
0,05	5,09	5,11	5,13	5,20	5,21	5,23
0,10	9,86	9,69	10,10	10,11	10,23	10,21

Tabelle 12.139: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	10,032	10,047	9,934	9,965	9,997	10,001
0,05	9,927	9,921	9,942	9,929	9,932	9,945
0,10	9,981	9,977	10,003	10,017	10,033	10,031

Tabelle 12.140: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	2,73	2,80	2,72	2,81	2,90	2,84
0,05	4,92	5,01	4,89	5,10	4,95	5,11
0,10	10,20	9,99	9,46	9,73	9,56	9,69

Tabelle 12.141: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,03	10,176	10,125	10,137	9,985	9,937	9,906
0,05	10,018	10,000	10,004	9,993	9,990	9,993
0,1	10,104	9,996	9,983	9,945	9,934	9,953

Tabelle 12.142: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Ethylaminopropiophenons:

	Flächen [mAU x s]			
0,03 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,90	2,83	2,80	2,84
Stabw	0,11	0,06	0,07	0,05
Vk [%]	3,80	2,25	2,42	1,84
David-Test	2,90	2,20	2,65	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,84 ± 0,17				

Tabelle 12.143: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,03 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,03 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,086	10,018	10,044	10,049
Stabw	0,07	0,04	0,12	0,03
Vk [%]	0,67	0,42	1,15	0,34
David-Test	2,55	2,71	2,34	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,049 ± 0,036				

Tabelle 12.144: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,03 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,05 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	5,08	5,16	5,00	5,08
Stabw	0,11	0,06	0,09	0,08
Vk [%]	2,25	1,14	1,86	1,57
David-Test	2,36	2,38	2,37	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,08 ± 0,08				

Tabelle 12.145: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,05 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,05 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	9,973	9,933	9,999	9,968
Stabw	0,02	0,01	0,01	0,03
Vk [%]	0,23	0,09	0,10	0,34
David-Test	2,66	2,62	2,41	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 9,968 ± 0,035				

Tabelle 12.146: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,05 µg/ml

0,1 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	10,07	10,03	9,77	9,96
Stabw	0,13	0,21	0,28	0,16
Vk [%]	1,26	2,13	3,83	1,64
David-Test	2,44	2,53	2,68	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 9,96 ± 0,06				

Tabelle 12.147: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,1 µg/ml

0,1 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,176	10,007	9,986	10,056
Stabw	0,16	0,02	0,06	0,10
Vk [%]	1,61	0,24	0,63	1,03
David-Test	2,82	2,31	2,72	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,056 ± 0,109				

Tabelle 12.148: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,1 µg/ml

Messwerte des Ethylnorephedrins:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,025	2,31	2,21	2,19	2,24	2,15	2,22
0,04	3,24	3,42	3,43	3,51	3,39	3,41
0,08	6,90	6,81	6,59	6,74	7,10	6,73

Tabelle 12.149: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,025	10,604	10,500	10,695	10,641	10,497	10,464
0,04	10,473	10,465	10,471	10,472	10,419	10,406
0,08	11,006	10,71	10,115	10,691	10,565	10,504

Tabelle 12.150: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen[mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	2,27	2,24	2,31	2,33	2,28	2,41
0,04	3,41	3,39	3,62	3,48	3,35	3,52
0,08	6,68	6,59	6,81	6,90	6,43	6,51

Tabelle 12.151: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	10,523	10,522	10,412	10,422	10,522	10,486
0,04	10,413	10,440	10,412	10,430	10,449	10,417
0,08	10,473	10,448	10,464	10,504	10,519	10,506

Tabelle 12.152: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	2,21	2,18	2,20	2,13	2,33	2,41
0,04	3,29	3,52	3,54	3,31	3,45	3,36
0,08	6,47	6,53	6,71	6,72	6,66	6,64

Tabelle 12.153: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	10,634	10,640	10,608	10,538	10,428	10,383
0,04	10,489	10,476	10,487	10,478	10,432	10,459
0,08	10,599	10,464	10,478	10,453	10,420	10,410

Tabelle 12.154: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Ethylnorephedrins:

	Flächen [mAU x s]			
0,025 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,22	2,31	2,24	2,26
Stabw	0,05	0,06	0,11	0,05
Vk [%]	2,42	2,58	4,68	2,09
David-Test	2,98	2,85	2,67	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,26 ± 0,11				

Tabelle 12.155: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,025 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,025 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,567	10,481	10,539	10,529
Stabw	0,09	0,05	0,11	0,04
Vk [%]	0,88	0,49	1,05	0,42
David-Test	2,48	2,15	2,33	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,529 ± 0,046				

Tabelle 12.156: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,025 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,04 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	3,40	3,46	3,41	3,42
Stabw	0,09	0,10	0,11	0,03
Vk [%]	2,60	2,86	3,14	0,94
David-Test	3,05	2,73	2,33	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 3,42 ± 0,03				

Tabelle 12.157: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,04 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,04 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,451	10,427	10,470	10,449
Stabw	0,03	0,02	0,02	0,02
Vk [%]	0,29	0,15	0,21	0,21
David-Test	2,22	2,41	2,65	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,449 ± 0,023				

Tabelle 12.158: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,04 µg/ml

0,08 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	6,81	6,65	6,62	6,69
Stabw	0,17	0,18	0,10	0,10
Vk [%]	2,56	2,68	1,52	1,53
David-Test	2,93	2,62	2,48	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,69 ± 0,05				

Tabelle 12.159: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,08 µg/ml

0,08 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,599	10,486	10,471	10,518
Stabw	0,29	0,03	0,07	0,07
Vk [%]	2,77	0,27	0,65	0,66
David-Test	3,04	2,54	2,78	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,518 ± 0,073				

Tabelle 12.160: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,08 µg/ml

Messwerte des Diethylnorephedrins:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,025	2,32	2,24	2,32	2,28	2,25	2,19
0,04	3,38	3,41	3,40	3,42	3,22	3,33
0,08	7,01	6,63	6,62	6,91	6,90	6,73

Tabelle 12.161: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,025	10,975	10,864	11,054	10,967	10,837	10,878
0,04	10,811	10,807	10,821	10,818	10,767	10,775
0,08	11,384	11,077	10,972	11,019	10,903	10,825

Tabelle 12.162: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	2,24	2,20	2,31	2,19	2,31	2,30
0,04	3,22	3,45	3,52	3,42	3,51	3,30
0,08	6,67	6,72	6,74	6,49	6,92	6,56

Tabelle 12.163: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	10,862	10,898	10,753	10,770	10,838	10,825
0,04	10,746	10,778	10,747	10,777	10,768	10,758
0,08	10,819	10,812	10,809	10,844	10,866	10,858

Tabelle 12.164: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	2,12	2,14	2,21	2,27	2,30	2,31
0,04	3,50	3,51	3,38	3,45	3,24	3,38
0,08	6,45	6,51	6,48	6,62	6,81	6,56

Tabelle 12.165: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,025	10,980	10,999	10,965	10,846	10,781	10,727
0,04	10,877	10,801	10,865	10,802	10,825	10,806
0,08	10,940	10,832	10,837	10,788	10,832	10,763

Tabelle 12.166: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Diethylnorephedrins:

	Flächen [mAU x s]			
0,025 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,27	2,25	2,23	2,25
Stabw	0,05	0,06	0,08	0,02
Vk [%]	2,23	2,46	2,67	0,89
David-Test	2,57	2,16	2,33	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,25 ± 0,02				

Tabelle 12.167: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,025 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,025 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,929	10,824	10,883	10,879
Stabw	0,08	0,06	0,12	0,05
Vk [%]	0,76	0,51	1,05	0,48
David-Test	2,61	2,64	2,21	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,879 ± 0,055				

Tabelle 12.168: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,025 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,04 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	3,36	3,40	3,41	3,39
Stabw	0,08	0,12	0,10	0,03
Vk [%]	2,25	3,52	2,94	0,78
David-Test	2,64	2,51	2,69	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 3,39 ± 0,03				

Tabelle 12.169: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,04 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,04 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,799	10,762	10,829	10,797
Stabw	0,02	0,01	0,03	0,03
Vk [%]	0,21	0,13	0,31	0,31
David-Test	2,35	2,25	2,26	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,797 ± 0,035				

Tabelle 12.170: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,04 µg/ml

0,08 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	6,80	6,60	6,57	6,68
Stabw	0,16	0,15	0,13	0,12
Vk [%]	2,39	2,25	2,00	1,72
David-Test	2,40	2,86	2,51	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 6,68 ± 0,12				

Tabelle 12.171: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,08 µg/ml

0,08 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,03	10,835	10,832	10,899
Stabw	0,20	0,03	0,06	0,11
Vk [%]	1,76	0,23	0,56	1,04
David-Test	2,87	2,32	2,92	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,899 ± 0,119				

Tabelle 12.172: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,08 µg/ml

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung der Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin (ohne vorherige Aufbereitung) wurde das Standardadditionsverfahren angewendet. Die Ergebnisse der „Interday“ Präzisionsbestimmung (S. 238-242) wurden zur Berechnung herangezogen, um eine „Interday“ Bestimmung bei der Wiederfindungsrate durchzuführen.

Messwerte des Ethylaminopropiophenons:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
Konz. [µg/ml]						
0,03	2,90	2,83	2,80	2,84	0,05	1,84
0,05	5,08	5,16	5,00	5,08	0,08	1,57
0,10	10,07	10,03	9,77	9,96	0,16	1,64

Tabelle 12.173: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M

Ergebnisse des Ethylaminopropiophenons:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,03	99,10	96,66	95,64	97,13	1,78	1,83
0,05	103,88	105,51	102,25	103,88	1,63	1,57
0,1	102,82	102,42	99,76	101,67	1,66	1,63

Tabelle 12.174: Wiederfindung des Ethylaminopropiophenons (Methode Amfe2.M)

Messwerte des Ethylnorephedrins:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,025	2,22	2,31	2,24	2,26	0,05	2,09
0,04	3,40	3,46	3,41	3,42	0,03	0,94
0,08	6,81	6,65	6,62	6,69	0,10	1,53

Tabelle 12.175: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M

Ergebnisse des Ethylnorephedrins:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,025	99,05	103,33	100,00	100,79	2,24	2,23
0,04	96,93	98,71	97,22	97,62	0,95	0,98
0,08	99,06	96,69	96,24	97,33	1,52	1,56

Tabelle 12.176: Wiederfindung des Ethylnorephedrins (Methode Amfe2.M)

Messwerte des Diethylnorephedrins:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,025	2,27	2,25	2,23	2,25	0,02	0,89
0,04	3,36	3,40	3,41	3,39	0,03	0,78
0,08	6,80	6,68	6,57	6,68	0,12	1,72

Tabelle 12.177: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M

Ergebnisse des Diethylnorephedrins:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,025	104,10	103,16	102,21	103,16	0,94	0,92
0,04	97,24	98,42	98,72	98,13	0,78	0,80
0,08	99,39	97,62	96,00	97,67	1,70	1,74

Tabelle 12.178: Wiederfindung des Diethylnorephedrins (Methode Amfe2.M)

Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden ebenfalls die Messwerte der „Interday“ Präzisionsbestimmung (S. 238-242) herangezogen.

Ergebnisse des Ethylaminopropiophenons:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,03	-0,90	3,34	4,36	2,87
0,05	-3,88	-5,51	-2,25	-3,88
0,1	-2,82	-2,42	0,24	-2,87

Tabelle 12.179: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Ergebnisse des Ethylnorephedrins:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,025	0,95	-3,33	0,00	-0,76
0,04	3,07	1,29	2,78	2,38
0,08	0,94	3,31	3,76	2,67

Tabelle 12.180: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Ergebnisse des Diethylnorephedrins:

x-Werte	Richtigkeit [%]			
Konz. [µg/ml]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
0,025	-4,1	-3,16	-2,21	-3,16
0,04	2,76	1,58	1,28	1,87
0,08	0,61	2,38	4,00	2,33

Tabelle 12.181: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Validierung der Methode Amfe2.M unter Verwendung von Speichelmatrix

Linearität

Negative Speichelproben wurden mit sechs verschiedenen Konzentrationen der Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin dotiert. Die Speichelproben wurden nach der Extraktionsvorschrift der Amfepramon Metaboliten über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 168) aufgearbeitet und jeweils dreimal vermessen.

Messwerte für Ethylaminopropiophenon:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,2	3,10	3,11	3,12	3,11	0,01	0,32
0,4	6,01	5,92	5,89	5,94	0,06	1,05
0,7	9,43	9,52	9,51	9,49	0,05	0,52
0,8	11,72	11,09	11,71	11,51	0,36	3,14
0,9	12,45	12,71	12,67	12,61	0,14	1,11
1,2	15,98	16,22	16,09	16,10	0,12	0,75

Tabelle 12.182: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.17) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

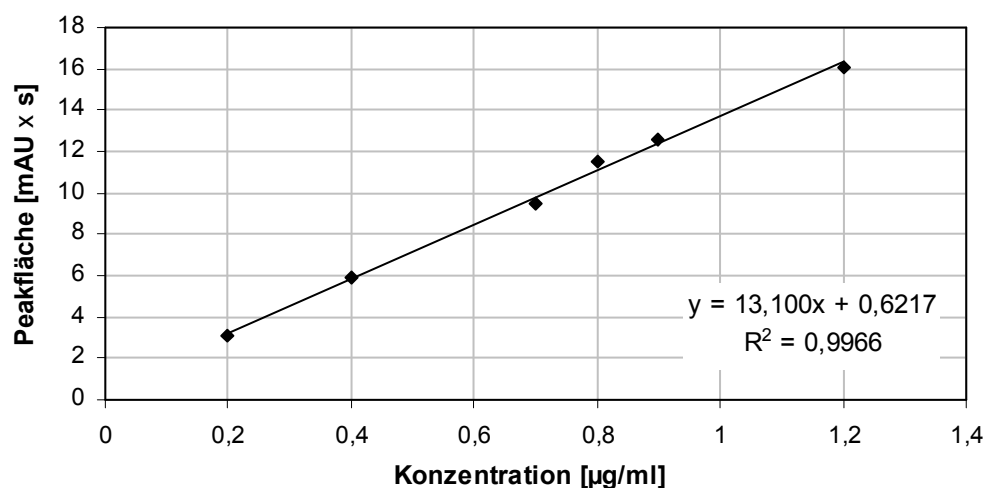


Bild 12.17: Kalibrierkurve für Ethylaminopropiophenon (Methode Amfe2.M; n = 3)

Zur Berechnung der Ethylaminopropiophenonkonzentrationen wurde die in Bild 12.17 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Ethylaminopropiophenons:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,70
Steigung a :	13,10 ± 0,39
Ordinatenabschnitt b :	0,62 ± 0,30
Korrelationskoeffizient r :	0,9983
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9966
Reststandardabweichung s_y :	0,31
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2,86 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Ethylaminopropiophenon: Varianzdifferenz DS^2 : 0,09

Prüfwert PW : 0,87

F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte für Ethylnorephedrin:

x-Werte Konz. [µg/ml]	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1	1,62	1,58	1,61	1,60	0,02	1,30
0,2	2,48	2,74	2,72	2,65	0,14	5,47
0,3	3,57	3,60	3,52	3,56	0,04	1,13
0,4	4,61	4,56	4,39	4,52	0,12	2,55
0,5	5,21	5,17	4,99	5,12	0,12	2,29
0,6	6,25	6,41	6,27	6,31	0,09	1,38

Tabelle 12.183: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.18) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

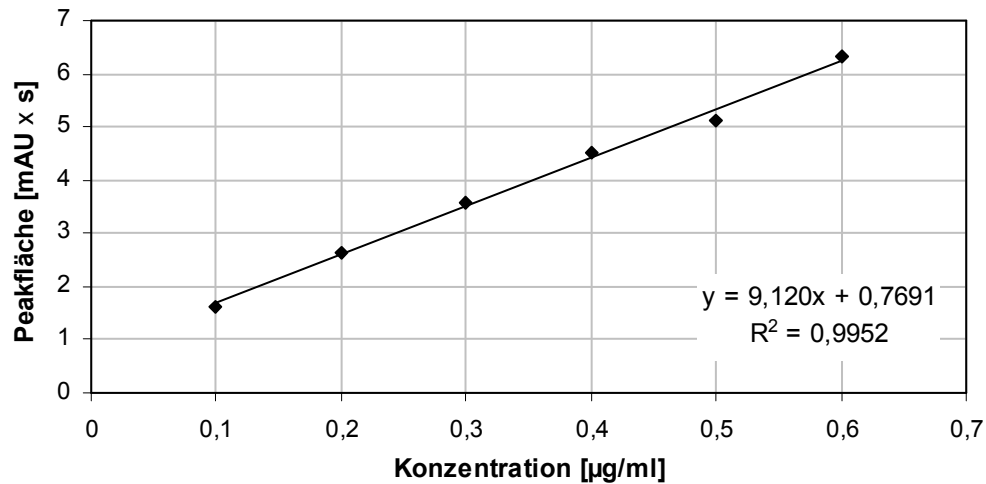


Bild 12.18: Kalibrierkurve für Ethylnorephedrin (Methode Amfe2.M; n = 3)

Zur Berechnung der Ethylnorephedrinkonzentrationen wurde die in Bild 12.18 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Ethylnorephedrins:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,35
Steigung a :	$9,12 \pm 0,32$
Ordinatenabschnitt b :	$0,77 \pm 0,12$
Korrelationskoeffizient r :	0,9976
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9952
Reststandardabweichung s_y :	0,13
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	5,71 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Ethylnorephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,003
	Prüfwert PW : 0,14
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Messwerte für Diethylnorephedrin:

x-Werte Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Flächen [mAU x s]					
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1	1,57	1,61	1,58	1,59	0,02	1,31
0,2	2,59	2,70	2,48	2,59	0,11	4,25
0,3	3,21	3,20	3,09	3,17	0,07	2,10
0,4	4,61	4,52	4,39	4,51	0,11	2,45
0,5	5,22	5,17	5,08	5,16	0,07	1,38
0,6	6,01	6,08	6,12	6,07	0,06	0,92

Tabelle 12.184: Messwerte der Flächen (Methode Amfe2.M)

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Bild 12.19) wurden die Mittelwerte der Flächen verwendet.

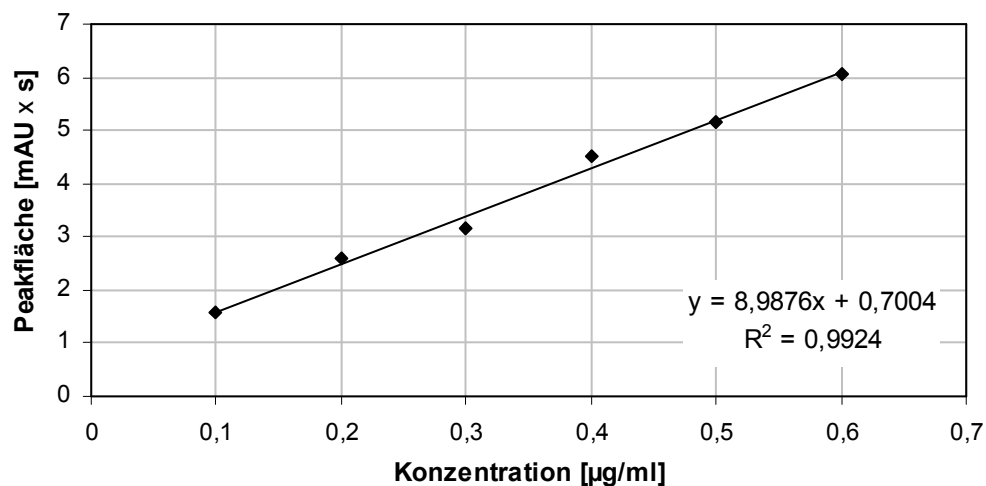


Bild 12.19: Kalibrierkurve für Diethylnorephedrin (Methode Amfe2.M; $n = 3$)

Zur Berechnung der Diethylnorephedrinkonzentrationen wurde die in Bild 12.19 angegebene lineare Regressionsgleichung verwendet.

Dintest[®] lieferte folgende Daten für die lineare Regression des Diethylnorephedrins:

Arbeitsmitte \bar{x} :	0,35
Steigung a :	$8,99 \pm 0,39$
Ordinatenabschnitt b :	$0,70 \pm 0,15$
Korrelationskoeffizient r :	0,9962
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9924
Reststandardabweichung s_y :	0,17

Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,02
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	5,71 %

Bewertung:

F-Test nach Mandel für Diethylnorephedrin:	Varianzdifferenz DS^2 : 0,0073
	Prüfwert PW : 0,20
	F (P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$): 34,12

Nach Mandel ist kein signifikanter Unterschied zwischen der linearen und der quadratischen Regression nachzuweisen. Die Berechnungen erfolgten mit der linearen Regression.

Präzision

Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurden negativen Speichelproben die Substanzen Ethylnorephedrin, Diethylnorephedrin und Ethylaminopropiophenon in Konzentrationen von 0,1, 0,2 und 0,4 µg/ml für Ethyl- und Diethylnorephedrin und 0,2, 0,4 und 0,8 µg/ml für Ethylaminopropiophenon, zugesetzt. Die Proben wurden nach der Extraktionsvorschrift für die Amfepramon Metabolite über die „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 168) aufgearbeitet und an drei Tagen jeweils sechsmal injiziert.

Messwerte des Ethylaminopropiophenons:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	2,98	2,86	3,10	3,04	3,11	3,13
0,4	6,21	6,09	6,22	6,16	5,98	5,89
0,8	11,78	12,02	11,09	11,82	11,74	11,81

Tabelle 12.185: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	10,299	10,317	10,493	10,700	10,731	10,715
0,4	10,143	10,139	10,135	10,993	10,136	10,515
0,8	10,171	10,159	10,149	10,149	10,145	10,146

Tabelle 12.186: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	3,09	3,23	3,11	3,13	3,05	3,08
0,4	5,99	5,94	6,02	6,11	5,84	5,92
0,8	11,28	11,71	11,90	11,54	11,16	11,70

Tabelle 12.187: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	10,155	10,148	10,139	10,146	10,136	10,115
0,4	10,135	10,116	10,130	10,118	10,099	10,099
0,8	10,141	10,123	10,124	10,117	10,127	10,122

Tabelle 12.188: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	3,02	3,21	3,09	3,22	2,97	3,10
0,4	5,90	5,81	5,74	5,73	5,71	5,80
0,8	11,22	10,96	10,72	11,80	11,62	11,31

Tabelle 12.189: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	10,090	10,083	10,135	10,079	10,918	10,089
0,4	10,150	10,133	10,128	10,112	10,105	10,098
0,8	10,146	10,193	10,212	10,230	10,213	10,166

Tabelle 12.190: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Ethylaminopropiophenons:

	Flächen [mAU x s]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	3,04	3,12	3,10	3,09
Stabw	0,10	0,06	0,10	0,04
Vk [%]	3,38	2,01	3,22	1,35
David-Test	2,63	2,88	2,40	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 3,09 ± 0,04				

Tabelle 12.191: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,2 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,543	10,140	10,232	10,305
Stabw	0,20	0,01	0,34	0,21
Vk [%]	19,1	0,14	3,29	2,05
David-Test	2,15	2,88	2,49	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,305 ± 0,221				

Tabelle 12.192: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,2 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	6,09	5,97	5,78	5,95
Stabw	0,13	0,09	0,07	0,16
Vk [%]	2,18	1,55	1,22	2,63
David-Test	2,48	2,92	2,70	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 5,95 ± 0,16				

Tabelle 12.193: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,4 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,4 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,344	10,116	10,121	10,194
Stabw	0,35	0,02	0,02	0,13
Vk [%]	3,40	0,15	0,19	1,27
David-Test	2,44	2,39	2,67	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,194 ± 0,136				

Tabelle 12.194: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,4 µg/ml

0,8 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	11,71	11,55	11,27	11,51
Stabw	0,32	0,28	0,40	0,22
Vk [%]	2,72	2,44	3,56	1,93
David-Test	2,92	2,63	2,69	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,5 ± 0,23				

Tabelle 12.195: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,8 µg/ml

0,8 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,153	10,126	10,193	10,157
Stabw	0,01	0,01	0,03	0,03
Vk [%]	0,1	0,08	0,31	0,34
David-Test	2,59	2,93	2,64	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,157 ± 0,036				

Tabelle 12.196: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,8 µg/ml

Messwerte des Ethylnorephedrins:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,1	1,60	1,55	1,62	1,55	1,58	1,61
0,2	2,43	2,71	2,72	2,57	2,60	2,71
0,4	4,60	4,53	4,31	4,36	4,40	4,42

Tabelle 12.197: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,1	10,670	10,828	11,003	11,283	11,312	11,309
0,2	10,639	10,618	10,626	10,647	10,645	10,642
0,4	10,669	10,668	10,647	10,663	10,653	10,659

Tabelle 12.198: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,44	1,52	1,56	1,54	1,62	1,53
0,2	2,71	2,70	2,67	2,63	2,69	2,51
0,4	4,48	4,56	4,62	4,70	4,55	4,80

Tabelle 12.199: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	10,602	10,645	10,656	10,622	10,620	10,600
0,2	10,638	10,647	10,605	10,616	10,612	10,591
0,4	10,640	10,626	10,621	10,623	10,635	10,632

Tabelle 12.200: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,43	1,50	1,52	1,49	1,60	1,62
0,2	2,63	2,51	2,39	2,46	2,62	2,44
0,4	4,68	4,44	4,48	4,52	4,49	4,48

Tabelle 12.201: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	10,533	10,564	10,636	10,571	10,576	10,599
0,2	10,649	10,617	10,620	10,587	10,563	10,592
0,4	10,659	10,711	10,728	10,747	10,718	10,652

Tabelle 12.202: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Ethylnorephedrins:

	Flächen [mAU x s]			
0,1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	1,57	1,54	1,53	1,55
Stabw	0,06	0,06	0,07	0,02
Vk [%]	3,78	3,82	4,68	1,35
David-Test	2,70	3,07	2,66	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 1,55 ± 0,02				

Tabelle 12.203: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,1 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,068	10,624	10,580	10,757
Stabw	0,28	0,02	0,04	0,27
Vk [%]	2,50	0,21	0,33	2,51
David-Test	2,32	2,48	2,96	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,757 ± 0,283				

Tabelle 12.204: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,1 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,62	2,65	2,51	2,59
Stabw	0,11	0,07	0,07	0,07
Vk [%]	4,35	2,83	4,68	2,84
David-Test	2,54	2,67	2,66	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,59 ± 0,08				

Tabelle 12.205: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,2 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,636	10,618	10,605	10,620
Stabw	0,01	0,02	0,03	0,02
Vk [%]	0,11	0,20	0,29	0,15
David-Test	2,50	2,68	2,85	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,620 ± 0,017				

Tabelle 12.206: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,2 µg/ml

0,4 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,44	4,62	4,5	4,53
Stabw	0,11	0,12	0,08	0,09
Vk [%]	2,45	2,50	1,88	1,99
David-Test	2,67	2,77	2,83	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,53 ± 0,09				

Tabelle 12.207: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,4 µg/ml

0,4 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,660	10,630	10,703	10,664
Stabw	0,01	0,01	0,04	0,04
Vk [%]	0,08	0,07	0,36	0,34
David-Test	2,55	2,57	2,47	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,664 ± 0,039				

Tabelle 12.208: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,4 µg/ml

Messwerte des Diethylnorephedrins:

1. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,1	1,54	1,60	1,53	1,49	1,58	1,70
0,2	2,51	2,73	2,46	2,71	2,66	2,71
0,4	4,67	4,59	4,39	4,37	4,64	4,52

Tabelle 12.209: Präzisionsbestimmung der Flächen des 1. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Konz. [µg/ml]						
0,1	10,836	11,014	11,395	11,669	11,690	11,618
0,2	11,000	11,004	11,007	10,993	10,991	10,991
0,4	11,030	11,026	11,014	11,025	11,010	11,008

Tabelle 12.210: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 1. Tages

2. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,50	1,37	1,49	1,46	1,32	1,46
0,2	2,72	2,59	2,67	2,85	2,61	2,60
0,4	4,45	4,39	4,50	4,53	4,57	4,61

Tabelle 12.211: Präzisionsbestimmung der Flächen des 2. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	10,986	11,011	10,991	11,012	10,973	10,973
0,2	10,981	10,967	10,963	10,964	10,952	10,948
0,4	11,012	10,976	10,990	10,976	10,984	10,977

Tabelle 12.212: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 2. Tages

3. Tag

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,39	1,50	1,41	1,53	1,28	1,51
0,2	2,51	2,50	2,43	2,31	2,54	2,60
0,4	4,31	4,40	4,42	4,44	4,41	4,61

Tabelle 12.213: Präzisionsbestimmung der Flächen des 3. Tages

x-Werte	Migrationszeiten [min]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	10,898	10,922	10,968	10,885	10,918	10,910
0,2	10,973	10,977	10,974	10,950	10,959	10,945
0,4	11,002	11,061	11,098	11,112	11,081	11,023

Tabelle 12.214: Präzisionsbestimmung der Migrationszeiten des 3. Tages

Ergebnisse des Diethylnorephedrins:

	Flächen [mAU x s]			
0,1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	1,56	1,43	1,44	1,48
Stabw	0,10	0,07	0,10	0,07
Vk [%]	6,11	5,02	6,64	4,90
David-Test	2,04	2,50	2,62	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 1,48 ± 0,01				

Tabelle 12.215: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,1 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,1 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,370	10,991	10,917	11,093
Stabw	0,37	0,02	0,03	0,24
Vk [%]	3,21	0,16	0,26	2,19
David-Test	2,34	2,24	2,91	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,093 ± 0,255				

Tabelle 12.216: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,1 µg/ml

	Flächen [mAU x s]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	2,63	2,67	2,48	2,59
Stabw	0,12	0,10	0,10	0,10
Vk [%]	4,40	3,73	4,06	3,86
David-Test	2,33	2,61	2,88	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 2,59 ± 0,11				

Tabelle 12.217: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,2 µg/ml

	Migrationszeiten [min]			
0,2 µg/ml	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	10,998	10,963	10,963	10,974
Stabw	0,01	0,01	0,01	0,02
Vk [%]	0,06	0,11	0,12	0,18
David-Test	2,29	2,82	2,35	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 10,974 ± 0,021				

Tabelle 12.218: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,2 µg/ml

0,4 µg/ml	Flächen [mAU x s]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte	4,53	4,50	4,43	4,49
Stabw	0,13	0,08	0,10	0,05
Vk [%]	2,80	1,78	2,22	1,15
David-Test	2,36	2,75	3,05	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 4,49 ± 0,05				

Tabelle 12.219: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Flächen der Konzentration 0,4 µg/ml

0,4 µg/ml	Migrationszeiten [min]			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	„Interday“
Mittelwerte [min]	11,019	10,986	11,063	11,023
Stabw	0,01	0,01	0,04	0,04
Vk [%]	0,08	0,13	0,39	0,35
David-Test	2,37	2,58	2,55	-
Vertrauensbereich VB von \bar{x} (P = 95 %): 11,023 ± 0,041				

Tabelle 12.220: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung für die Migrationszeiten der Konzentration 0,4 µg/ml

Wiederfindung

Die Herstellung der dotierten Speichelproben mit den verschiedenen Konzentrationen der Substanzen Ethylaminopropiophenon, Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin sowie die Extraktion über „Bond Elut Certify[®]“ Kartuschen (S. 168) erfolgten wie bei der Präzisionsbestimmung (S. 254).

Messwerte des Ethylaminopropiophenons:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,2 (A)	2,96	2,89	3,10	2,98	0,11	3,58
0,2 (B)	3,31	3,20	3,51	3,34	0,16	4,71
0,4 (A)	6,24	6,09	6,27	6,20	0,10	1,56
0,4 (B)	8,43	7,89	7,98	8,10	0,29	3,57
0,8 (A)	11,71	12,02	11,01	11,58	0,52	4,47
0,8 (B)	12,90	12,84	12,12	12,62	0,43	3,44

Tabelle 12.221: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M; A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse des Ethylaminopropiophenons:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,2	89,43	90,31	88,32	89,35	1,00	1,12
0,4	74,02	77,19	78,57	76,59	2,33	3,05
0,8	90,78	93,61	90,84	91,74	1,62	1,77

Tabelle 12.222: Wiederfindung des Ethylaminopropiophenons (Methode Amfe2.M)

Messwerte des Ethylnorephedrins:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1 (A)	1,64	1,59	1,67	1,63	0,04	2,47
0,1 (B)	1,82	1,75	1,90	1,82	0,08	4,12
0,2 (A)	2,48	2,73	2,75	2,65	0,15	5,67
0,2 (B)	2,69	2,91	2,93	2,84	0,13	4,68
0,4 (A)	4,67	4,53	4,32	4,51	0,18	3,91
0,4 (B)	5,74	5,91	5,30	5,65	0,31	5,57

Tabelle 12.223: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M;
A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse des Ethylnorephedrins:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1	90,11	90,86	87,89	89,62	1,54	1,72
0,2	92,19	93,81	93,86	93,29	0,95	1,02
0,4	81,36	76,65	81,51	79,84	2,76	3,46

Tabelle 12.224: Wiederfindung des Ethylnorephedrins (Methode Amfe2.M)

Messwerte des Diethylnorephedrins:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1 (A)	1,59	1,64	1,57	1,60	0,04	2,25
0,1 (B)	1,94	1,85	1,82	1,87	0,06	3,34
0,2 (A)	2,57	2,75	2,49	2,60	0,13	5,12
0,2 (B)	2,88	2,92	2,84	2,88	0,04	1,39
0,4 (A)	4,61	4,54	4,33	4,49	0,15	3,24
0,4 (B)	5,21	5,08	5,33	5,21	0,13	2,40

Tabelle 12.225: Messwerte zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode Amfe2.M;
A = vor der Extraktion dotiert; B = nach der Extraktion dotiert

Ergebnisse des Diethylnorephedrins:

x-Werte	Wiederfindung [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	Mittelwerte	Stabw	Vk [%]
0,1	81,96	88,65	86,26	85,62	3,39	3,96
0,2	89,24	94,18	87,68	90,36	3,39	3,76
0,4	88,48	89,37	81,24	86,36	4,46	5,17

Tabelle 12.226: Wiederfindung des Diethylnorephedrins (Methode Amfe2.M)

Richtigkeit

Zur Ermittlung der Richtigkeit wurden die gleichen drei Konzentrationen ausgewählt wie bei der Präzisionsbestimmung. Jede dotierte Speichelprobe wurde jeweils sechsmal vermessen (S. 254).

Messwerte für Ethylaminopropiophenon:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	2,98	2,86	3,10	3,04	3,11	3,13
0,4	6,21	6,09	6,22	6,16	5,98	5,89
0,8	11,78	12,02	11,09	11,82	11,74	11,81

Tabelle 12.227: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse für Ethylaminopropiophenon:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,2	9,99	14,57	5,41	7,7	5,03	4,26
0,4	-6,65	-4,36	-6,84	-5,69	-2,26	0,54
0,8	-6,47	-8,76	0,11	-6,85	-6,09	-6,76

Tabelle 12.228: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Messwerte für Ethylnorephedrin:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,60	1,55	1,62	1,55	1,58	1,61
0,2	2,43	2,71	2,72	2,57	2,60	2,71
0,4	4,60	4,53	4,31	4,36	4,40	4,42

Tabelle 12.229: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse für Ethylnorephedrin:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	8,89	14,38	6,7	14,38	11,09	7,8
0,2	8,94	-6,41	-6,96	1,27	-0,38	-6,41
0,4	-5,01	-3,09	2,94	1,57	-0,47	-0,08

Tabelle 12.230: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

Messwerte für Diethylnorephedrin:

x-Werte	Flächen [mAU x s]					
Konz. [µg/ml]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	1,54	1,60	1,53	1,49	1,58	1,70
0,2	2,51	2,73	2,46	2,71	2,66	2,71
0,4	4,67	4,59	4,39	4,37	4,64	4,52

Tabelle 12.231: Messwerte zur Berechnung der Richtigkeit

Ergebnisse für Diethylnorephedrin:

x-Werte	Richtigkeit [%]					
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,1	6,58	-0,09	7,7	12,15	2,13	-11,22
0,2	-0,67	-12,91	2,11	-11,8	-9,02	-11,8
0,4	-10,42	-8,19	-2,63	-2,07	-9,58	-6,25

Tabelle 12.232: Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen der Richtigkeit

12.21 Synthesevorschriften für Ethyl- und Diethylnorephedrin

Zur Herstellung von Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin wurden zu 1,88 g (10 mmol) DL-Norephedrinhydrochlorid oder 1,51 g (10 mmol) (*1R,2S*)-Norephedrin, 3,21 g (20 mmol) bzw. 23,40 g (150 mmol) Ethyliodid sowie 2,76 g (20 mmol) bzw. 20,73 g (150 mmol) Kaliumcarbonat hinzugefügt. Nach Zugabe von 10 bzw. 50 ml Ethanol wurden die Ansätze 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abfiltrieren des Kaliumcarbonats wurde mit Dichlormethan gewaschen. Nach dem Einengen bei 30 °C und 60 mbar wurde der Rückstand in 3 ml Fließmittel unter Zusatz von 1-2 ml Methanol gelöst und an Kieselgel mit 500 ml Ethylacetat/Methanol/Ammoniak (25 %) (85:10:5)¹²⁶ chromatographiert. Auf diese Weise war eine Trennung der Produkte möglich.

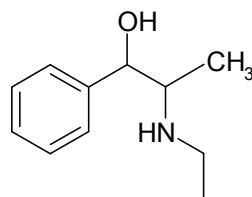
12.21.1 HPLC-Methode zur Reinheitsüberprüfung

Für die Analysen wurde die HPLC Pro Star 210/215 von Varian verwendet.

Trennsäule:	LiChroCart [®] 125-4, Lichrospher [®] 100 RP-18 (5 µm)
Fließmittel:	Acetonitril/14 mM Natriumdodecylsulfatlösung (50:50)
Flussrate:	1 ml/min
Ofentemperatur:	35 °C
Injektionsvol.:	10 µl
Laufzeit:	10 min
Min. Wellenlänge:	200 nm
Max. Wellenlänge:	400 nm
Messwellenlänge:	205 nm

12.21.2 Charakterisierung der synthetisierten Substanzen

Ethylnorephedrin (Racemat)



Aus 1,88 g (10 mmol) DL-Norephedrinhydrochlorid und 3,21 g (20 mmol) Ethyliodid (S. 268) wurde DL-Ethylnorephedrin als weiße Kristalle mit einer Ausbeute von 41 % synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ -DMSO), δ (ppm): 0,77 (d, $J = 6,34$ Hz, 3 H, CH_3CHCH); 0,98 (t, $J = 6,79$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$); 2,57 (q, $J = 6,34$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$); 5,03 (s, 1 H, OH); 2,74 (qd, $J = 4,07$ Hz, 1 H, CH_3CHCH); 4,6 (d, $J = 4,19$ Hz, 1 H, CHOH); 6,68 (s, 1 H, NH); 7,25 (m, 5 H, Aromat)

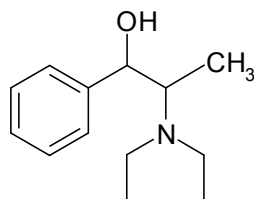
$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$:		179,2 g/mol		
MS (m/z):	$[\text{M} + \text{H}]^+$:	180,2		
Elementaranalyse:	Ber. [%]:	C 73,70	H 9,56	N 7,81
	Gef. [%]:	C 73,53	H 9,28	N 7,81

Ethylnorephedrin (Enantiomer)

Aus 1,513 g (10 mmol) (*1R,2S*)-Norephedrin und 3,21 g (20 mmol) Ethyliodid (S. 268) wurde (*1R,2S*)-Ethylnorephedrin als weiße Kristalle mit einer Ausbeute von 38 % synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ -DMSO), δ (ppm): 0,77 (d, $J = 6,35$ Hz, 3 H, CH_3CHCH); 0,98 (t, $J = 6,92$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$); 2,57 (q, $J = 8,08$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$); 5,06 (s, 1 H, OH); 2,79 (qd, $J = 4,11$ Hz, 1 H, CH_3CHCH); 4,62 (d, $J = 4,14$ Hz, 1 H, CHOH); 6,68 (s, 1 H, NH); 7,25 (m, 5 H, Aromat)

$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$:		179,2 g/mol		
MS (m/z):	$[\text{M} + \text{H}]^+$:	180,2		
Elementaranalyse:	Ber. [%]:	C 73,70	H 9,56	N 7,81
	Gef. [%]:	C 73,47	H 9,59	N 7,82

Diethylnorephedrin (Racemat)

Aus 1,88 g (10 mmol) Norephedrinhydrochlorid und 23,4 g (150 mmol) Ethyliodid (S. 268) wurde Diethylnorephedrin als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 38 % synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ -DMSO), δ (ppm): 0,94 (d, $J = 6,62$ Hz, 3 H, CH_3CHCH); 0,8 (t, $J = 7,42$ Hz, 6 H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$); 2,35 (q, $J = 6,82$ Hz, 4 H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$); 5,04 (s, 1 H, OH); 2,78 (qd, $J = 6,61$ Hz, 1 H, CH_3CHCH); 4,48 (d, $J = 6,42$ Hz, 1 H, CHOH); 7,25 (m, 5 H, Aromat)

$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}$:		207,3 g/mol		
MS (m/z):	$[\text{M} + \text{H}]^+$:	208,3		
Elementaranalyse:	Ber. [%]:	C 75,32	H 10,21	N 6,76
	Gef. [%]:	C 74,96	H 10,09	N 6,57

Diethylnorephedrin (Enantiomer)

Aus 1,513 g (10 mmol) (*1R,2S*)-Norephedrin und 23,4 g (150 mmol) Ethyliodid (S. 268) wurde (*1R,2S*)-Diethylnorephedrin als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 34 % synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ -DMSO), δ (ppm): 0,94 (d, $J = 6,62$ Hz, 3 H, CH_3CHCH); 0,8 (t, $J = 7,14$ Hz, 6 H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$); 2,35 (q, $J = 6,62$ Hz, 4 H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$); 5,04 (s, 1 H, OH); 2,78 (qd, $J = 6,35$ Hz, 1 H, CH_3CHCH); 4,48 (d, $J = 6,61$ Hz, 1 H, CHOH); 7,27 (m, 5 H, Aromat)

$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}$:		207,3 g/mol		
MS (m/z):	$[\text{M} + \text{H}]^+$:	208,3		
Elementaranalyse:	Ber. [%]:	C 75,32	H 10,21	N 6,76
	Gef. [%]:	C 74,97	H 10,20	N 6,52

Die Analysen der synthetisierten Enantiomere Ethylnorephedrin und Diethylnorephedrin aus (*1R,2S*)-Norephedrin zeigten mit der kapillarelektrophoretischen Methode Amfe4.M (S. 176), unter Verwendung des 2,6-Di-*O*-methyl- β -cyclodextrins in 120 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,1 (10 mg/ml) bis zur Nachweisgrenze von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ keine Auftrennung in die einzelnen Enantiomere. Mit der Methode Amfe4.M konnten nur die synthetisierten Enantiomere (*1R,2S*)-Ethylnorephedrin bzw. (*1R,2S*)-Diethylnorephedrin nachgewiesen werden.

13. Anhang

13.1 Gefahrstoffe

Nachfolgende, von mir verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel sind nach Anhang 6 der Gefahrstoffverordnung mit Gefahrensymbolen und Sicherheitsratschlägen versehen.

Stoffname	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Acetonitril	F, Xn	R: 11-20/21/22-36 S: 16-36/37
Acetylsalicylsäure	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26
Ambroxol	Xn	R: 22 S: 36
Ameisensäure	C	R: 35 S: 23-26-45
Amfepramon	Xn	R: 22-36/37/38 S: 22-36/37/39
Ammoniak 25%	C, N	R: 34-50 S: 26-36/37/39-45-61
Ammoniumcarbonat	Xn	R: 36/37/38-52/53 S: 26-36
Ammoniumchlorid	Xn	R: 22-36 S: 22
Ammoniumformiat	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36
Dichlormethan	Xn	R: 40 S: 23.2-24/25-36/37
Dihydroxybenzoesäuren	Xi	R: 36/37/38 S: 24/25
Diphenhydramin	T	R: 25/36/37/38/40-63 S: 20-26-36/37-45-60
Dimethylsulfoxid	Xn	R: 20/21/22 S: 26-28
Dextromethorphanhydrobromid	N, Xn	R: 22-51/53 S: 22-61
Ephedrin	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36
Ethanol	F	R: 11 S: 7-16
Ethylacetat	F, Xi	R: 11-36-66-67 S: 16-26-33

Ethylaminopropiophenon	Xn	R: 36/37/38 S: 26-36
Ethyljodid	Xn	R: 10-20-36/37/38-42/43 S: 23-26-36/37-45
Gentisinsäure	Xi	R: 22-36/37/38 S: 26-37/39
Ibuprofen	-	R: 22 S: 36/37
Kaliumcarbonat	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36
Methanol	F, T	R: 11-23/24/25-39 S: 7-16-36/37-45
Natriumdodecylsulfat	Xn	R: 21/22-36/37/38 S: 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R: 35 S: 26-37/39-45
Nicotin	T+, N	R: 25-27-51/53 S: 36/37-45-61
Norephedrin	Xn	R: 22 S: 2-36/37/39-45
Norpseudoephedrin	Xn	R: 22 S: 2-36/37/39-45
Paracetamol	Xn	R: 22-52/53 S: 22-61
Phenylephrin	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36
Phosphorsäure 85 %	C	R: 34 S: 26-36/37/39-45
2-Propanol	F, Xi	R: 11-36-67 S: 7-16-24/25-26
Pseudoephedrin	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36
Salzsäure konz.	C	R: 34-37 S: 26-36/37/39-45
Salicylsäure	Xn	R: 22-41 S: 22-24-26-39
Trifluoressigsäure	C	R: 20-35-52/53 S: 9-26-27-28.1-45-61

Literatur

1. **Zimmermann, J.:** *Nachweis von Amphetaminderivaten im Speichel mittels immunchromatographischer Teststreifen und enantioselektiver Kapillarelektrophorese.* Fachbereich Chemie, Diss., **2003**, Hamburg.
2. **Mühlenbruch, B.:** *Arzneistoff-Bestimmungen im Speichel.* Pharm. Unserer Zeit, **1982**, 11, p: 41-47.
3. **Feller, K.; Le Petit, G. and Marx, U.:** *Distribution of drugs between saliva and blood plasma.* Pharmazie, **1976**, 31, p: 745-746.
4. **Wätzig, H. and Kunkel, A.:** *Pharmacokinetic Investigations with Direct Injection of Plasma Samples: Possible Savings Using Capillary Electrophoresis (CE).* Arch. Pharm., **1999**, 332, p: 175-178.
5. **Ong, C. P.; Ng, C. L.; Lee, H. K. and Li, S. F. Y.:** *Determination of antihistamines in pharmaceuticals by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr., **1991**, 588, p: 335-339.
6. **Hudson, J. C.; Golin, M. and Malcolm, M.:** *Capillary zone electrophoresis in a comprehensive screen for basic drugs in whole blood.* J. Can. Soc. Forensic Sci., **1995**, 28, p: 137-152.
7. **Thormann, W.; Molteni, S.; Caslavská, J. and Schmutz, A.:** *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis.* Electrophoresis, **1994**, 15, p: 3-12.
8. **Perrett, D. and Ross, G. A.:** *Rapid determination of drugs in biofluids by capillary electrophoresis. Measurement of antipyrine in saliva for pharmacokinetic studies.* J. Chromatogr. A, **1995**, 700, p: 179-186.
9. **Hempel, G. and Blaschke, G.:** *Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites in urine by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **1996**, 675, p: 139-46.
10. **Elgstoen, P. K. B. and Jellum, E.:** *Capillary electrophoresis for diagnosis of metabolic disease.* Electrophoresis, **1997**, 18, p: 1857-1860.
11. **Jellum, E.:** *Capillary electrophoresis for medical diagnosis.* J. Cap. Elec., **1994**, 1, p: 97-105.
12. **Wätzig, H.:** *Grundlagen der Kapillarelektrophorese.* Pharm. Ztg. Prisma, **1996**, 2, p: 126-136
13. **Thews, G.; Mutschler, E. and Vaupel, P.:** *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* 5., völlig neu bearb. und erweít. Auflage, **1999**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
14. **Schmidt, H.:** *Biochemie für Stomatologen.* 1. Auflage, **1982**, Leipzig: Johann Ambrosius Barth.
15. **Buddecke, E.:** *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin.* 3. Auflage, **1981**, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
16. **Edgar, W. M. and O'Mullane, D. M.:** *Saliva and oral health.* 2. Auflage, **1996**, London: British Dental Association.
17. **Matin, S. B.; Wan, S. H. and Karam, J. H.:** *Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva.* Clin. Pharmacol. Ther., **1974**, 16, p: 1052-1058.
18. **Mutschler, E.:** *Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* 7., neu bearb. und erweít. Auflage, **1997**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
19. **Lottspeich, F. and Zorbas, H.:** *Kapillarelektrophorese.* Bioanalytik, 1. Auflage, **1998**, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, p: 253-283.
20. **Wätzig, H.:** *Die Kapillarelektrophorese - eine leistungsfähige analytische Trenntechnik.* Analytiker Taschenbuch, 1. Auflage, H. Günzler, **2000**, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, p: 117-146.

21. **Harris, D. C.:** *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. 1., neu bearb. Auflage, **2002**, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
22. **Skoog, D. A. and Laery, J. J.:** *Instrumentelle Analytik (Grundlagen, Geräte, Anwendungen)*. 1. Auflage, **1996**, Berlin, Heidelberg: Springer - Verlag.
23. **Serwe, M.:** *Troubleshooting and Preventive Maintenance in CE*. Service Handbook, 1. Auflage, A. Technologies, **1996**, Waldbronn: Hewlett-Packard Company, p: 1-51.
24. **Engelhardt, H.; Beck, W. and Schmitt, T.:** *Kapillarelektrophorese : Methoden und Möglichkeiten*. 1. Auflage, **1994**, Braunschweig, Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
25. **Gausepohl, C. and Blaschke, G.:** *Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., **1998**, 713, p: 443-446.
26. **Siluveru, M. and Stewart, J. T.:** *Enantioselective determination of S-(+)- and R-(-)-ondansetron in human serum using derivatized cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and solid-phase extraction*. J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., **1997**, 691, p: 217-222.
27. **Burgi, D. S. and Chien, R.-L.:** *Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis*. Anal. Chem., **1991**, 63, p: 2042-2047.
28. **Chien, R.-L. and Burgi, D. S.:** *Field Amplified Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis*. J. Chromatogr., **1991**, 559, p: 141-152.
29. **Zhang, C.-X. and Thormann, W.:** *Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis: A Robust Approach Providing over 1000-Fold Sensitivity Enhancement*. Anal. Chem., **1996**, 68, p: 2523-2532.
30. **Administration, F. a. D.:** *Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, **2001**, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
31. **Kromidas, S.:** *Handbuch: Validierung in der Analytik*. 1. Auflage, **2000**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
32. **Schmitt, G.:** *Dintest : Auswertung der Kalibrationsgeraden nach DIN 32645*. Institut für Rechtmedizin und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg, **2003**, <http://www.rzuer.uni-heidelberg.de/~df6/download/dintest.htm>.
33. **Zaugg, S.; Zhang, X.; Sweedler, J. and Thormann, W.:** *Determination of salicylate, gentisic acid and salicyluric acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., **2001**, 752, p: 17-31.
34. **Graham, G. G.; Champion, G. D.; Day, R. O. and Paull, P. D.:** *Patterns of plasma concentrations and urinary excretion of salicylate in rheumatoid arthritis*. Clin. Pharmacol. Ther., **1977**, 22, p: 410-420.
35. **Rowland, M. and Riegelman, S.:** *Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma*. J. Pharm. Sci., **1967**, 56, p: 717-720.
36. **Rumble, R. H.; Brooks, P. M. and Roberts, M. S.:** *Metabolism of salicylate during chronic aspirin therapy*. Br. J. Clin. Pharmacol., **1980**, 9, p: 41-45.
37. **Kaneo, Y.; Nishikawa, A.; Fukasawa, K. and Kato, Y.:** *Serum protein binding and salivary secretion of salicylic acid in man*. Chem. Pharm. Bull., **1980**, 28, p: 1251-1257.
38. **Graham, G. and Rowland, M.:** *Application of salivary salicylate data to biopharmaceutical studies of salicylates*. J. Pharm. Sci., **1972**, 61, p: 1219-1222.
39. **Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. and Stark, K.:** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7., völlig neu bearb. Auflage, **1998**, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

40. **Lange, W. E.; Floriddia, D. G. and Pruyn, F. J.:** *In vitro binding of salicylates to saliva proteins.* J. Pharm. Sci., **1969**, 58, p: 771-773.
41. **Pohto, P.:** *Salicylates in saliva.* Acta Odontol. Scand., **1976**, 34, p: 155-161.
42. **Goto, Y.; Makino, K.; Kataoka, Y.; Shuto, H. and Oishi, R.:** *Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis.* J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., **1998**, 706, p: 329-335.
43. **Thürmann, P.:** *Frauen und Männer metabolisieren anders.* Dtsch. Apoth. Ztg., **2004**, 6, p: 577-578
44. **James O'Kruk, R.; Adams, M. A. and Philp, R. B.:** *Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and its metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr., **1984**, 310, p: 343-352.
45. **Reidl, U.:** *Determination of acetylsalicylic acid and metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr., **1983**, 272, p: 325-331.
46. **Liu, J. H. and Smith, P. C.:** *Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **1996**, 675, p: 61-70.
47. **Krivosikova, Z.; Spustova, V. and Dzurik, R.:** *A highly sensitive HPLC method for the simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic and salicyluric acids in biologic fluids: pharmacokinetic, metabolic and monitoring implications.* Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., **1996**, 18, p: 527-532.
48. **Lockwood, G. F.; Albert, K. S.; Gillespie, W. R.; Bole, G. G., et al.:** *Pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/dose relationships.* Clin. Pharmacol. Ther., **1983**, 34, p: 97-103.
49. **Mills, R. F. N.; Adams, S. S.; Cliffe, E. E.; Dickinson, W. and Nicholson, J. S.:** *Metabolism of Ibuprofen.* Xenobiotica, **1973**, 3, p: 589-598.
50. **Shihabi, Z. K. and Hinsdale, M. E.:** *Analysis of ibuprofen in serum by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **1996**, 683, p: 115-118.
51. **Bjoernsdottir, I.; Kepp, D. R.; Tjoernelund, J. and Hansen, S. H.:** *Separation of the enantiomers of ibuprofen and its major phase I metabolites in urine using capillary electrophoresis.* Electrophoresis, **1998**, 19, p: 455-460.
52. **Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. and Stark, K.:** *Paracetamol ; Pharmakokinetik.* Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7., völlig neu bearb. Auflage, **1998**, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, p: 206.
53. **Heitmeier, S. and Blaschke, G.:** *Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection.* J. Chromatogr. B, **1999**, 721, p: 93-108.
54. **Adithan, C. and Thangam, J.:** *A comparative study of saliva and serum paracetamol levels using a simple spectrophotometric method.* Br. J. Clin. Pharmacol., **1982**, 14, p: 107-109.
55. **Kamali, F.; Fry, J. R. and Bell, G. D.:** *Salivary secretion of paracetamol in man.* J. Pharm. Pharmacol., **1987**, 39, p: 150-152.
56. **Gibaldi, M. and Perrier, D.:** *Drugs and the pharmaceuticals science.* Pharmacokinetics, **1975**, New York: Marcel Dekker, Inc.
57. **Smith, M.; Whitehead, E.; O'Sullivan, G. and Reynolds, F.:** *A comparison of serum and saliva paracetamol concentrations.* Br. J. Clin. Pharmacol., **1991**, 31, p: 553-555.

58. **Rücker, G.; Neugebauer, M. and Willems, G. G.:** *Instrumentelle pharmazeutische Analytik : Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden.* 3., völlig neu bearb. Auflage, **2001**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
59. **Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A. and Ando, T.:** *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries.* *Anal. Chem.*, **1984**, 56, p: 111-113.
60. **Nakagawa, T.; Oda, Y.; Shibukawa, A.; Fukuda, H. and Tanaka, H.:** *Electrokinetic chromatography for drug analysis. Separation and determination of cefpiramide in human plasma.* *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, p: 707-711.
61. **Wätzig, H. and Lloyd, D. K.:** *Effect of pH and sodium dodecyl sulfate concentration on the analytical window in the direct-injektion analysis of plasma samples by capillary electrophoresis.* *Electrophoresis*, **1995**, 16, p: 57-63.
62. **Kunkel, A.; Günter, S. and Wätzig, H.:** *Determination of pharmaceuticals in plasma by capillary electrophoresis without sample pretreatment reproducibility, limit of quantitation and limit of detection.* *Electrophoresis*, **1997**, 18, p: 1882-1889.
63. **Schmutz, A. and Thormann, W.:** *Assessment of impact of physico-chemical drug properties on monitoring drug levels by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct serum injection.* *Electrophoresis*, **1994**, 15, p: 1295-1303.
64. **Sandor, V.; Flarakos, T.; Batist, G.; Wainer, I. W. and Lloyd, D. K.:** *Quantitation of the diastereoisomers of L-buthionine- (R,S)-sulfoximine in human plasma: A validated assay by capillary electrophoresis.* *J. Chromatogr. B*, **1995**, 673, p: 123-131.
65. **von Heeren, F. and Thormann, W.:** *Capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis.* *Electrophoresis*, **1997**, 18, p: 2415-2426.
66. **Wätzig, H.; Degenhardt, M. and Kunkel, A.:** *Strategies for capillary electrophoresis: method development and validation for pharmaceutical and biological applications.* *Electrophoresis*, **1998**, 19, p: 2695-2752.
67. **Kunkel, A.; Günter, S. and Wätzig, H.:** *Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision.* *J. Chromatogr. A*, **1997**, 768, p: 125-133.
68. **Kaupp, S.; Steffen, R. and Wätzig, H.:** *Characterisation of inner surface and adsorption phenomena in fused-silica capillary electrophoresis capillaries.* *J. Chromatogr. A*, **1996**, 744, p: 93-102.
69. **Fagiolino, P. and Vazquez, M.:** *Bioequivalence study of paracetamol in saliva.* *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **1993**, Proceedings of the fifth European Congress of Biopharmaceutics and Pharmaceutics, p: 164-168.
70. **Pueschmann, S. and Engelhorn, R.:** *Pharmacological study on the bromhexine metabolite ambroxol.* *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **1978**, 28, p: 889-898.
71. **Nieder, M. and Jaeger, H.:** *Selective quantification of ambroxol in human plasma by HPLC.* *J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun.*, **1986**, 9, p: 561-565.
72. **Jauch, R.; Bozler, G.; Hammer, R.; Koss, F. W., et al.:** *Ambroxol, studies of metabolism in man and the quantitative determination in biological samples.* *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **1978**, 28, p: 904-911.
73. **Hammer, R.; Bozler, G.; Jauch, R.; Koss, F. W. and Hadamovsky, H.:** *Ambroxol, (NA 872 Cl) comparative studies of pharmacokinetics and metabolism in rat, rabbit, dog and man.* *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **1978**, 28, p: 899-903.
74. **Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. and Stark, K.:** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 7., völlig neu bearb. Aufl., **1998**, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

75. **Kanfer, I.; Dowse, R. and Vuma, V.:** *Pharmacokinetics of oral decongestants.* Pharmacotherapy, **1993**, 13, p: 116-128.
76. **Stockis, A.; Deroubaix, X.; Jeanbaptiste, B.; Lins, R.; Allemon, A. M. and Laufen, H.:** *Relative Bioavailability of Carbinoxamine and Phenylephrin from a Retard Capsule after Single and Repeated Dose Administration in Healthy Subjects.* *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **1995**, 45, p: 1009 -1012.
77. **Hengstmann, J. H. and Goronzy, J.:** *Pharmacokinetics of 3H - Phenylephrin in Man.* *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1982**, 21, p: 335-341.
78. **Gomez, M. R.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. and Silva, M. F.:** *Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramin and phenylephrin in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis.* *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 30, p: 791-799.
79. **Marchesini, A. F.; Williner, M. R.; Mantovani, V. E.; Robles, J. C. and Goicoechea, H. C.:** *Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine, and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis.* *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, p: 39-46.
80. **Gallego, J. M. L. and Arroyo, J. P.:** *Determination of prednisolone, naphazoline, and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography.* *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, p: 947-952.
81. **Albert, K. S.; Hallmark, M. R.; Sakmar, E.; Weidler, D. J. and Wagner, J. G.:** *Pharmacokinetics of Diphenhydramine in Man.* *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **1975**, 3, p: 159 -170.
82. **Sharp, M. E.; Wallace, S. M.; Hindmarsh, K. W. and Peel, H. W.:** *Monitoring saliva concentrations of methaqualone, codeine, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses.* *J. Anal. Toxicol.*, **1983**, 7, p: 11-14.
83. **Glazko, A. J.; Dill, W. A.; Young, R. M.; Smith, T. C. and Ogilvie, R. I.:** *Metabolic disposition of diphenhydramine.* *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1974**, 16, p: 1066-1076.
84. **Benet, L. Z.; Oie, S. and Schwartz, J. B.:** *Design and Optimization of Dosage Regimens ; Pharmacokinetic Data.* Goodman & Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. Auflage, J.G. Hardman and L.E. Limbird, **1995**, New York: McGraw-Hill, p: 1707-1792.
85. **Chang, T.; Okerholm, R. A. and Glazko, A. J.:** *Identification of diphenhydramine (Benadryl) metabolites in human subjects.* *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1974**, 9, p: 391-404.
86. **Ganes, D. A. and Midha, K. K.:** *Identification in in vivo acetylation pathway for N-dealkylated metabolites of doxylamine in humans.* *Xenobiotica*, **1987**, 17, p: 993-999.
87. **Europäisches Arzneibuch.** 4. Auflage, **2002**, Stuttgart, Eschborn: Deutscher Apotheker Verlag und Govi Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH.
88. **Wilkinson, G. R. and Beckett, A. H.:** *Absorption, metabolism, and excretion of the ephedrines in man. I. The influence of urinary pH and urine volume output.* *J. Pharm. Exp. Ther.*, **1968**, 162, p: 139-147.
89. **Sever, P. S.; Dring, L. G. and Williams, R. T.:** *The metabolism of (-)-ephedrine in man.* *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1975**, 9, p: 193-198.
90. **Wilkinson, G. R. and Beckett, A. H.:** *Absorption, metabolism, and excretion of the ephedrines in man. II. Pharmacokinetics.* *J. Pharm. Sci.*, **1968**, 57, p: 1933-1938.
91. **Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Bermejo, E.; Perez, J. A. and Hernandez, L.:** *Direct determination of ephedrine and norephedrine in human urine by capillary zone electrophoresis.* *J. Chromatogr.*, **1993**, 622, p: 103-108.

92. **Axelrod, J.:** *Studies on sympathomimetic amines. I. The biotransformation and physiological disposition of l-ephedrine and l-norephedrine.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **1953**, 109, p: 62-73.
93. **Moolenaar, M.; Desmond, P. A.; Mascord, D. J.; Starmer, G. A.; Tattam, B. and Volkerts, E. R.:** *The effects of ephedrine on the development of fatigue in a prolonged driving-related task.* Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp., **1999**, 14, p: 415-427.
94. **Pickup, M. E. and Paterson, J. W.:** *Determination of ephedrine plasma levels by a gas chromatographic method.* J. Pharm. Pharmacol., **1974**, 26, p: 561-562.
95. **Aymard, G.; Labarthe, B.; Warot, D.; Berlin, I. and Diquet, B.:** *Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography.* J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., **2000**, 744, p: 25-31.
96. **Zhang, Y.; Britto, M. R.; Valderhaug, K. L.; Wedlund, P. J. and Smith, R. A.:** *Dextromethorphan: enhancing its systemic availability by way of low-dose quinidine-mediated inhibition of cytochrome P4502D6.* Clin. Pharmacol. Ther., **1992**, 51, p: 647-655.
97. **Yu, A. and Haining, R. L.:** *Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities?* Drug Metab. Dispos., **2001**, 29, p: 1514-1520.
98. **Kristensen, H. T.:** *Simultaneous determination of dextromethorphan and its metabolites in human plasma by capillary electrophoresis.* J. Pharm. Biomed. Anal., **1998**, 18, p: 827-838.
99. **Dong, Y.; Chen, X.; Chen, Y.; Chen, X. and Hu, Z.:** *Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by nonaqueous capillary electrophoresis.* J. Pharm. Biomed. Anal., **2005**, 39, p: 285-289.
100. **Delbeke, F. T. and Debackere, M.:** *The influence of diuretics on the excretion and metabolism of doping agents: part VI. Pseudoephedrine.* Biopharm. Drug Dispos., **1991**, 12, p: 37-48.
101. **Wellington, K. and Jarvis, B.:** *Cetirizine/Pseudoephedrine.* Drug, **2005**, **61**, p: 2231-2240.
102. **Simons, F. E. and Simons, K. J.:** *Clinical pharmacology of new histamine H1 receptor antagonists.* Clin. Pharmacokinet., **1999**, 36, p: 329-352.
103. **Benedetti, M. S.; Plisnier, M.; Kaise, J.; Maier, L., et al.:** *Absorption, distribution, metabolism and excretion of [14C]levocetirizine, the R enantiomer of cetirizine, in healthy volunteers.* Eur. J. Clin. Pharmacol., **2001**, 57, p: 571-582.
104. **Spencer, C. M.; Faulds, D. and Peters, D. H.:** *Cetirizine : A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in selected allergic disorders.* Drugs, **1993**, 46, p: 1055-1080.
105. **Petersen, L. J.; Church, M. K.; Rihoux, J. P. and Skov, P. S.:** *Measurement of interstitial cetirizine concentrations in human skin: correlation of drug levels with inhibition of histamine-induced skin responses.* Allergy, **1999**, 54, p: 607-611.
106. **Wood, S. G.; John, B. A.; Chasseaud, L. F.; Yeh, J. and Chung, M.:** *The metabolism and pharmacokinetics of 14C-cetirizine in humans.* Ann. Allergy, **1987**, 59, p: 31-34.
107. **Naidong, W.; Shou, W. Z.; Addison, T.; Maleki, S. and Jiang, X.:** *Liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalysis using normal-phase columns with aqueous/organic mobile phases - a novel approach of eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well SPE.* Rapid Commun. Mass Spectrom., **2002**, 16, p: 1965-1975.

108. **Lo, L. Y.; Land, G. and Bye, A.:** *Sensitive assay for pseudoephedrine and its metabolite, norpseudoephedrine in plasma and urine using gas-liquid chromatography with electron-capture detection.* J. Chromatogr., **1981**, 222, p: 297-302.
109. **Cone, E. J.:** *Saliva testing for drugs of abuse.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **1993**, 694, p: 91-127.
110. **Russell, M. A. H. and Feyerabend, C.:** *Cigarette smoking: a dependence on high-nicotine boli.* Drug Metab. Rev., **1978**, 8, p: 29-57.
111. **Oldendorf, W. H.:** *Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **1974**, 147, p: 813-815.
112. **Lindell, G.; Lunell, E. and Graffner, H.:** *Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice.* Eur. J. Clin. Pharmacol., **1996**, 51, p: 315-318.
113. **Palmer, M. E.; Smith, R. F.; Chambers, K. and Tetler, L. W.:** *Separation of nicotine metabolites by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis/mass spectrometry.* Rapid Commun. Mass Spectrom., **2001**, 15, p: 224-231.
114. **Banci, F.; Cartoni, G. P.; Cavalli, A. and Monai, A.:** *Effect of the sustained-release on the excretion of some metabolites of diethylpropione.* Arzneim.-Forsch./Drug Res., **1972**, 22, p: 1724-1726.
115. **Vree, T. B.; Muskens, A. T. J. M. and Van Rossum, J. M.:** *Metabolism of N-alkyl substituted aminopropiophenones in man in comparison to amphetamines and ephedrines.* Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., **1972**, 197, p: 392-395.
116. **Burger, A. and Wachter, H.:** *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch.* 8. Auflage, **1998**, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
117. **Ku, Y.-R.; Chang, Y.-S.; Wen, K.-C. and Ho, L.-K.:** *Analysis and confirmation of synthetic amphetamine-like drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. A, **1999**, 848, p: 537-543.
118. **Dangor, C. M. and Veltman, A. M.:** *Salivary monitoring of the bioavailability of diethylpropion in a sustained-release pellet.* S. Afr. J. Sci., **1988**, 84, p: 897-900.
119. **Zaugg, S. and Thormann, W.:** *Enantioselective determination of drugs in body fluids by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. A, **2000**, 875, p: 27-41.
120. **Dethy, J. M.; De Broux, S.; Lesne, M.; Longstreth, J. and Gilbert, P.:** *Stereoselective determination of verapamil and norverapamil by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., **1994**, 654, p: 121-127.
121. **Frost, M.; Köhler, H. and Gottfried, B.:** *Enantioselective determination of methadone and its main metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in serum, urine and hair by capillary electrophoresis.* Electrophoresis, **1997**, 18, p: 1026-1034.
122. **Banci, F.; Cartoni, G. P.; Cavalli, A. and Monai, A.:** *Excretion of some Basic Metabolites of Diethylpropion in Man and Rabbit.* Arzneim.-Forsch./Drug Res., **1971**, 21, p: 1616-1618.
123. **Soai, K.; Yokoyama, S. and Hayasaka, T.:** *Chiral N,N-dialkylnorephedrines as catalysts of the highly enantioselective addition of dialkylzincs to aliphatic and aromatic aldehydes. The asymmetric synthesis of secondary aliphatic and aromatic alcohols of high optical purity.* J. Org. Chem., **1991**, 56, p: 4264-4268.
124. **Okamura, N.; Miki, H.; Harada, T.; Yamashita, S., et al.:** *Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography.* J. Pharm. Biomed. Anal., **1999**, 20, p: 363-372.
125. **Hewlett-Packard:** *Chiral Method Development Kit for Capillary Electrophoresis.* 1. Auflage, **1996**, Waldbronn: Hewlett-Packard Company.
126. **Auterhoff, H. and Kovar, K.-A.:** *Identifizierung von Arzneistoffen.* 6., völlig neu bearb. Auflage, **1998**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Lebenslauf

Name: Katrin Bennesch
Geburtsdatum: 09.06.1976
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung & Berufsausbildung

1987 – 1996 *Gymnasium Hamburg Ohmoor*
Abitur
1997 - 2001 *Universität Hamburg, Institut für Pharmazie*
Pharmaziestudium, Staatsexamen
2002 *Universität Hamburg, Institut für Pharmazie*
Approbation als Apothekerin
Seit 2002 *Universität Hamburg, Institut für Pharmazie*
Doktorandin, Arbeitskreis Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Berufserfahrung

1997 *Kiebitz-Apotheke und Frohme-Apotheke, Hamburg*
Famulatur
2001 – 2002 *GlaxoSmithKline, Bad Oldesloe und Luna Apotheke, Hamburg*
Praktisches Jahr nach der Approbationsordnung für Apotheker
Seit 2002 *Universität Hamburg, Institut für Pharmazie*
Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Praktikumsbetreuung „Instrumentelle Analytik“ für Studenten des 4. Semesters
Seit 2002 *Luna-Apotheke, anschließend Atlantik-Apotheke, Hamburg*
Nebentätigkeit als Apothekerin