

HOCHSCHULE RHEIN-WAAL

FAKULTÄT LIFE SCIENCES

Methodenentwicklung zur Bestimmung des Serumspiegels und der  
Stabilität von Bupropion und Hydroxy-Bupropion mittels LCMS  
Orbitrap im Zuge des therapeutischen Drug Monitorings

Bachelorarbeit

vorgelegt von

Tristan Tannhäuser

HOCHSCHULE RHEIN-WAAL

FAKULTÄT LIFE SCIENCES

Methodenentwicklung zur Bestimmung des Serumspiegels und der  
Stabilität von Bupropion und Hydroxy-Bupropion mittels LCMS  
Orbitrap im Zuge des therapeutischen Drug Monitorings

Bachelorarbeit

im Studiengang

Bio Science and Health

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science

vorgelegt von

Tristan Tannhäuser

[REDACTED]

[REDACTED]

Matrikelnummer:

26979

Abgabedatum:

08. Mai 2023

Betreuender Referent: Prof. Dr. Peter Scholz

Betreuende Ko-Referentin: Luzia Schaaf (Apothekerin)

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
1. Einleitung .....	1
1.1 Ziel der Arbeit und die Bedeutung des therapeutischen Drug Monitorings .....	1
1.2 Vorstellung des Analyten .....	1
2. Material & Methoden .....	6
2.1 Material .....	6
2.1.1 Die LCMS Orbitrap – Kopplung von HPLC und MS .....	6
2.1.2 Wirkstoffe und Lösungsmittel .....	11
2.1.3 Interner Standard und externe Kontrollen .....	12
2.1.4 Verwendete Software .....	13
2.1.5 Weitere Materialien .....	14
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 Probenaufbereitung mit der AEP-Methode .....	14
2.2.2 Herstellung der AEP-Kalibrationslösungen für die LCMS .....	15
2.2.3 Biphenyl0_3new-Methode (LCMS) .....	15
2.2.4 AEP-Methode (LCMS) .....	16
2.2.5 Statistische Methoden .....	17
3. Ergebnisse .....	18
3.1 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels .....	18
3.2 Auswahl einer geeigneten Vermessungs-Methode für die LCMS .....	18
3.3 Retentionszeitermittlung .....	19
3.4 Messempfindlichkeit .....	20
3.5 Nachweisgrenze .....	20
3.6 Wiederfindungsrate .....	22
3.7 Ionensuppression .....	24
3.7.1 Einführung in die Ionensuppression .....	24
3.7.2 Untersuchung von mit Analyten versetzten Patientenproben .....	25
3.8 Linearität der Methode .....	26

3.8.1 5-Punkt-Kalibration .....	27
3.9 In-Day-Variation .....	32
3.10 Day-to-Day-Variation .....	33
3.11 Stabilitätstests.....	35
3.12 Vergleich mit externem Labor .....	39
3.13 Freigabe für die Routine .....	41
4. Diskussion .....	45
5. Zusammenfassung .....	58
Literaturverzeichnis.....	60
Eidesstattliche Erklärung .....	63
Anhang .....	64

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: chemische Struktur von Bupropion (chirales Zentrum mit \* markiert), seinem Hauptmetabolit (Hydroxybupropion) und seinen Nebenmetaboliten (Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion); nach (Connarn et al., 2016). ..... 2
- Abbildung 2: Der Mechanismus des Cytochrom-*P450*-Systems. 1) Bindung des Substrats (RH) an das Enzym. 2) Reduzierung des Hämeisens durch die Übertragung eines Elektrons an den Enzym-Substrat-Komplex durch Adrenodoxin. 3) Bindung von umgebendem Sauerstoff an das reduzierte  $Fe^{2+}$ -Ion. 4) Erneute Übertragung eines Elektrons durch Adrenodoxin 5) Freisetzung eines Wassermoleküls und Bildung einer  $Fe^{4+} = O$  Zwischenstufe durch Spaltung der Bindung der gebundenen Sauerstoffatome 6) Wiederherstellung des  $Fe^{3+}$ -Zustands durch Freisetzung des hydroxylierten Substrats (Berg et al., 2018, S. 934). ..... 4
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bildung des Taylor-Konus. Die austretenden Tröpfchen zerfallen aufgrund der im Vergleich zur Oberflächenspannung des verbliebenden Lösungsmittels überwiegenden elektrostatischen Abstoßung zu einem feinen Spray (Coulomb-Explosion); Die Wandlung der physikalischen Detektion der Ionen in ein digitales Signal erfolgt durch einen Zeit-Digital-Wandler (TDC) (Gross, 2013, S. 622). ..... 9
- Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Orbitrap-Massenspektrometers; abgebildet ist das Einlasssystem der ESI sowie die verschiedenen Stabsysteme (Quadrupol und C-Trap) bis zum Orbitrap-Detektor (Bhattacharyya, 2018). ..... 10
- Abbildung 5: Retentionszeit von Bupropion (oben) und Hydroxy-Bupropion (unten) im Chromatogramm der HPLC; Die Vermessung der beiden Substanzen erfolgte parallel in einer Probe. .... 19
- Abbildung 6: Signalintensität der zur Bestimmung der Nachweisgrenze vermessenen Bupropionlösungen (A: 0,1 ng/ml; B: 0,5 ng/ml) im Massenspektrometer des Orbitrap-Detektors erstellt durch die TraceFinder-Software. RT steht dabei für die Retentionszeit, AA für die integrierte Fläche und SN für das Signal-Rausch-Verhältnis. .... 21
- Abbildung 7: Signalintensität der zur Bestimmung der Nachweisgrenze vermessenen Hydroxy-Bupropionlösungen (A: 0,5 ng/ml; B: 1 ng/ml) im Massenspektrometer des Orbitrap-Detektors erstellt durch die TraceFinder-Software. .... 21
- Abbildung 8: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Fluperlapin als internen Standard. Hier und in den folgenden Abbildungen ist der Beschriftung oberhalb des Diagramms die Formel der Geraden und der Korrelationskoeffizient zu entnehmen, sowie ob die Gerade durch den Ursprung gezwungen (Origin: Force) wurde oder nicht (Origin: Ignore). .... 29
- Abbildung 9: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Fluperlapin als internen Standard. .... 29

Abbildung 10: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Bromperidol als internen Standard. ....	30
Abbildung 11: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.....	30
Abbildung 12: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die übrigen 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.....	32
Abbildung 13: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die übrigen 25 Proben der 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Bromperidol als internen Standard. ....	32
Abbildung 14: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Bupropion bei Raumtemperatur mit Ausgleichsgerade für alle acht Patientenproben. ....	36
Abbildung 15: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Bupropion im Kühlschrank mit Ausgleichsgerade für alle vier Patientenproben.....	37
Abbildung 16: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Hydroxy-Bupropion bei Raumtemperatur mit Ausgleichsgerade für alle acht Patientenproben. ....	37
Abbildung 17: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Hydroxy-Bupropion im Kühlschrank mit Ausgleichsgerade für alle vier Patientenproben. ....	38
Abbildung 18: Säulendiagramm der prozentualen Abweichung der internen Messwerte für den Gesamtgehalt an Bupropion und Hydroxy-Bupropion der Patientenproben 1 bis 12 zum externen Labor. ....	40
Abbildung 19: Säulendiagramm der prozentualen Abweichung der internen Messwerte für den Gehalt an Bupropion der Patientenproben 1 bis 12 zum externen Labor. ....	41
Abbildung 20: Chemische Struktur von Bromperidol (rechts) und Bupropion (links); Der strukturelle Vergleich zeigt: Beide Moleküle besitzen einen halogenierten Benzolring, an dem über eine Kohlenwasserstoffkette eine Keto-Gruppe gebunden ist (Rot markiert). Eigene Grafik, basierend auf (Connarn et al., 2016) und (Santa Cruz Biotechnology, 2023).....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die von der TraceFinder Software errechneten Gehalte an Bupropion und Hydroxy-Bupropion der zehn aufbereiteten Serumproben im Vergleich zum theoretischen Gehaltswert von 100 % der wässrigen Lösungen und die statistische Datenauswertung (Mittelwert und Standardabweichung).....	23
Tabelle 2: Der errechnete Gehalt in ng/ml an Bupropion und Hydroxybupropion der zehn Patientenproben, die mit den Analyten versetzt wurden und die prozentuale Abweichung vom theoretischen Gehaltswert.....	25
Tabelle 3: Die Konzentrationen der Kalibrationslösungen K1-K5 in ng/ml für die 5-Punktkalibration.....	27
Tabelle 4: Die Ergebnisse der Vermessungen der externen Kontrollen im Verlauf der Linearitätsbestimmung, sowie ihre prozentuale Abweichung vom Sollwert; alle Angaben in ng/ml. ....	28
Tabelle 5: Die Ergebnisse der Vermessung der ersten 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Bupropion und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml.....	28
Tabelle 6: Die Ergebnisse der Vermessung der ersten 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml. ....	29
Tabelle 7: Die Ergebnisse der Vermessung der übrigen 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Bupropion (oben) und Hydroxy-Bupropion (unten) und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml. ..	31
Tabelle 8: Die In-Day-Variation für die K1- und K2- Lösung für Bupropion und Hydroxy-Bupropion in ng/ml und die statistische Auswertung der Daten. ....	33
Tabelle 9: Die Day-to-Day-Variation der verwendeten Präzisionslösung (P1) für Bupropion und Hydroxy-Bupropion in ng/ml und die statistische Auswertung der Daten. ....	34
Tabelle 10: Zusammenfassung der Arbeitsschritte in der Probenaufbereitung und die Parameter der LCMS für die entwickelte Methode zur Serumspiegelbestimmung von Bupropion und Hydroxy-Bupropion. ....	59



## Abkürzungsverzeichnis

AEP	Antiepileptika
AGNP	Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
ESI	Elektronensprayionisation
FT	Fourier-Transformation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K1	Kalibrationspunkt 1
LCMS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometer
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LVR	Landschaftsverband Rheinland
MAOI	Monoaminoxidase-Hemmer
NARI	Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer
NDRI	Noradrenalin-Dopamin-Wiederaufnahme-Hemmer
P1	Präzisionslösung 1
RP	Umkehrphasenchromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
SOP	Standardarbeitsanweisung
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
UV	Ultraviolettstrahlung
VC	Variationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate

## 1. Einleitung

### 1.1 Ziel der Arbeit und die Bedeutung des therapeutischen Drug Monitorings

Um die Konkurrenzfähigkeit des Labors der Apotheke der LVR-Klinik Viersen gegenüber größeren Labordienstleistern auch in Zukunft gewährleisten zu können, muss das Analyseangebot kontinuierlich erweitert werden. Der Arzneistoff Bupropion und sein pharmakologisch wirksamer Metabolit Hydroxy-Bupropion gehörten bisher zu den Analyten, die bei Anforderung einer Analyse im Rahmen des therapeutischen Drug Monitorings (TDM) an ein externes Labor versandt wurden. Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung und Validierung einer eigenen Methode zur Gehaltsbestimmung von Bupropion im humanen Serum für das TDM mittels LCMS.

Bei der Verbesserung von pharmazeutisch gestützten Therapien spielt das TDM eine immer größere Rolle. Dabei können eine Vielzahl an Serumspiegeln der eingenommenen Arzneistoffe des Patienten bestimmt werden, um in Absprache mit dem behandelnden Arzt die individuell richtige Dosis für den Patienten zu finden, damit eine Wirkstoffkonzentration im Blut innerhalb des therapeutischen Bereichs erreicht wird. Auf diese Weise können Intoxikationen oder ein zu geringer Gehalt des Wirkstoffes erkannt werden, bevor sie klinisch sichtbar werden. Damit trägt das TDM zur Verbesserung der Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Arzneimitteltherapie bei und stellt einen wichtigen Baustein der Individualmedizin dar.

### 1.2 Vorstellung des Analyten

Bupropion weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Amphetamin auf und gehört zur Gruppe der Cathinone (Arndt T., 2019). Es besteht aus einem aromatischen Ringsystem (Benzolring) mit einem Chlorsubstituenten, sowie einer über eine Kohlenwasserstoffkette gebundenen Keto-Gruppe und einem sekundären Amin (s. Abb. 1). Bupropion bildet 2 Stereoisomere, die sich jedoch in ihrer pharmakologischen Wirksamkeit nicht unterscheiden. Es besitzt eine Molmasse von 239,74 g/mol und als Salz (Bupropion-Hydrochlorid) eine Löslichkeit von mehr als 25 mg/ml in Wasser (fisher scientific, 2023a). Für die Löslichkeit in Methanol konnte kein Literaturwert ermittelt werden, jedoch sind Bupropion-Lösungen in Methanol im Handel mit einer Konzentration von 1 mg/ml kommerziell erhältlich. Diese Konzentration wäre für alle Konzentrationsstufen, die im Verlauf der Methodenentwicklung verwendet werden, ausreichend.

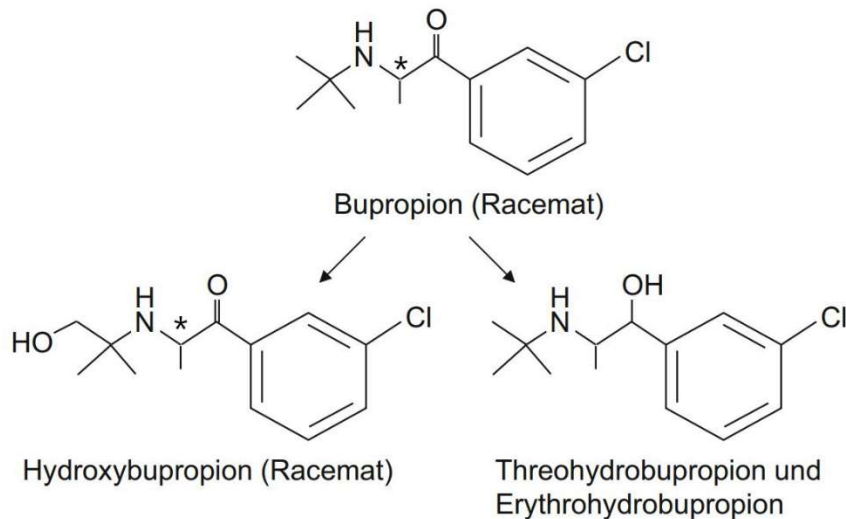


Abbildung 1: chemische Struktur von Bupropion (chirales Zentrum mit \* markiert), seinem Hauptmetabolit (Hydroxybupropion) und seinen Nebenmetaboliten (Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion); nach (Connarn et al., 2016).

Bupropion gehört zur Wirkstoffgruppe der Antidepressiva, die bei Patienten mit Depressionen eine stimmungsaufhellende Wirkung haben können. Weltweit sind derzeit 280 Millionen Menschen von einer solchen Depression betroffen, Tendenz steigend (WHO, 2023).

Die Wirkstoffgruppe der Antidepressiva lässt sich grob in zwei Kategorien einteilen: die erste und die zweite Generation. Zu den Antidepressiva der ersten Generation, die vor allem in den 1950er und 60er Jahren entwickelt wurden, gehören die trizyklischen Antidepressiva (TCA), die die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin im Gehirn hemmen sowie die Monoaminoxidase-Hemmer (MAOI), die den enzymatischen Abbau von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin verhindern und damit die Verfügbarkeit der Neurotransmitter im Gehirn erhöhen. Beides führt zu einer stimmungsaufhellenden Wirkung. Allerdings weisen Antidepressiva der ersten Generation eine unzureichende Selektivität für ihre Zielrezeptoren auf, was häufig zu Nebenwirkungen (s. u.) führt (Freissmuth et al., 2020, S. 338–339). Diese Selektivitätsproblematik konnte bei den Antidepressiva der zweiten Generation, zu denen auch Bupropion gehört, verbessert werden, was sich auch in einem besseren Nebenwirkungsprofil niederschlägt. Diese verbesserte Selektivität findet sich auch in vielen Wirkstoffgruppenbezeichnungen wieder, wie z. B. bei den selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRI). Zur zweiten Generation der Antidepressiva gehört auch die Gruppe der selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (NARI). Zu den NARI zählt auch das Bupropion (Freissmuth et al., 2020, S. 338). Die Inhibierung der Wiederaufnahme von Noradrenalin ist jedoch eher gering. Die eigentliche Wirkung wird durch die Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin erzielt (Huecker et al., 2023), was Bupropion aufgrund dieser einzigartigen neuropharmakologischen Wirkung zum bisher einzigen verfügbaren Noradrenalin-Dopamin-

Wiederaufnahme-Hemmer (NDRI) macht (Stahl et al., 2004). Neben der antidepressiven Wirkung soll dies auch zu einer Minimierung des Nikotinverlangens beitragen (Holm & Spencer, 2000; Tomaz et al., 2022), weshalb Bupropion neben der Behandlung von Depressionen auch zur Therapie der Nikotinabhängigkeit eingesetzt wird und für diese Behandlung eine klinisch erwiesene Wirksamkeit besitzt (Holm & Spencer, 2000; Tomaz et al., 2022). Da es jedoch für diese Therapie mit z. B. Vareniclin besser wirksame Medikamente gibt, ist der Einsatz von Bupropion in diesem Bereich rückläufig (Freissmuth et al., 2020, S. 1003). Die stimmungsaufhellende Wirkung von Bupropion ist in ihrer Wirksamkeit zur Behandlung von Depression vergleichbar mit der von SSRI und TCA, während gleichzeitig typische Nebenwirkungen wie sexuelle Dysfunktion, Gewichtszunahme oder Sedierung seltener auftreten (Stahl et al., 2004). 1989 erfolgte in den USA die Erstzulassung von Bupropion zur Behandlung depressiver Episoden (Stahl et al., 2004) und ist seit 2007 unter dem Handelsnamen Elontril auch in Deutschland zugelassen (GSK, 2023).

Handelsübliche Tabletten bestehen zumeist aus Bupropionhydrochlorid. Die Verwendung eines solchen Salzes als Bindungspartner für einen pharmakologischen Wirkstoff hat sich in der Galenik bewährt, da es nicht nur die Löslichkeit und Stabilität vieler Arzneistoffe erhöht, sondern auch die Verträglichkeit verbessern kann.

Nach der Freisetzung, Absorption und Verteilung einer körperfremden Substanz (Xenobiotikum) erfolgt in einem biologischen System nach dem LADME-Modell die Metabolisierung, um die Ausscheidung des Xenobiotikums zu erleichtern. Dies gilt nicht nur für Toxine, sondern auch für pharmakologisch wirksame Substanzen, die zur Verbesserung des Gesundheitszustands in das System eingebracht wurden. Die Metabolisierung von Bupropion erfolgt zu einem großen Teil über das Cytochrom- $P_{450}$ -System (Pang et al., 2009, S. 475), das vor allem im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen lokalisiert ist (Berg et al., 2018, S. 934). Die zum Cytochrom- $P_{450}$ -System gehörende Monooxygenase CYP2B6 ist maßgeblich für die Verstoffwechslung von Bupropion verantwortlich. Durch die von diesem Enzym katalysierte Hydroxylierungsreaktion (s. Abb. 2), entstehen mehrere pharmakologisch weniger wirksame Metaboliten (s. Abb. 1). Neben Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion wird vor allem Hydroxy-Bupropion gebildet, das auch der einzige für die Gehaltsbestimmung relevante Metabolit von Bupropion ist (Hefner et al., 2018, S. 104). Seine pharmakologische Wirksamkeit beträgt jedoch nur noch 50 % der Wirkung von Bupropion. Die Elimination von Bupropion und seinen Metaboliten erfolgt zu 87 % renal, mit einer Halbwertszeit von 1 bis 15 h für das Bupropion und 17 bis 47 h für das Hydroxy-Bupropion, je nach Art der Applikationsform (Hefner et al., 2018, S. 104).

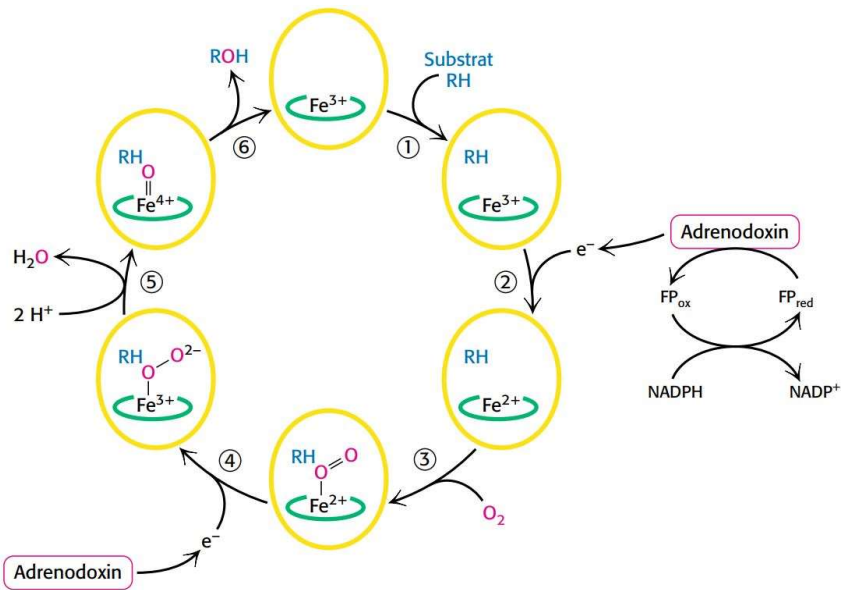


Abbildung 2: Der Mechanismus des Cytochrom-P<sub>450</sub>-Systems. 1) Bindung des Substrats (RH) an das Enzym. 2) Reduzierung des Hämeisens durch die Übertragung eines Elektrons an den Enzym-Substrat-Komplex durch Adrenodoxin. 3) Bindung von umgebendem Sauerstoff an das reduzierte Fe<sup>2+</sup>-Ion. 4) Erneute Übertragung eines Elektrons durch Adrenodoxin. 5) Freisetzung eines Wassermoleküls und Bildung einer Fe<sup>4+</sup>=O Zwischenstufe durch Spaltung der gebundenen Sauerstoffatome. 6) Wiederherstellung des Fe<sup>3+</sup>-Zustands durch Freisetzung des hydroxylierten Substrats (Berg et al., 2018, S. 934).

Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften ist Bupropion dazu in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit seinen Wirkort (den synaptischen Spalt) zu erreichen. Neben dieser physiologischen Barriere, ist Bupropion auch in der Lage über die Plazenta in den Blutkreislauf des ungeborenen Embryos einzudringen und wurde auch in der Muttermilch nachgewiesen. Ob sich daraus die Gefahr einer schädigenden Wirkung für das Kind ergibt, ist klinisch noch nicht bestätigt. Dennoch wird Bupropion für die Therapie während der Schwangerschaft und Stillzeit nicht empfohlen (GSK, 2023).

Nach oraler Einnahme von Bupropion kommt es nach 1 bis 2 Stunden zur Spitzenkonzentration ( $C_{max}$ ) im Blut. Bei Retardpräparaten tritt diese erst nach 4 Stunden auf. Dabei kann der  $C_{max}$  – Wert von Hydroxy-Bupropion 3 bis 14 Mal höher sein als der Bupropion-Gehalt (GSK, 2023).

Zu den klinisch beobachteten Nebenwirkungen einer Behandlung mit Bupropion gehören insbesondere Überempfindlichkeitsreaktionen des Immunsystems, Appetitlosigkeit, Angstzustände, Schwindel, Sehstörungen, Hautausschlag, Fieber und ein erhöhter Blutdruck. Die gleichzeitige Einnahme anderer Medikamenten, wie beispielsweise Valproat zur Behandlung von Migräne (Freissmuth et al., 2020, S. 290), kann durch eine Inhibierung von CYP2B6 die Metabolisierung von Bupropion hemmen bzw. vermindern und dadurch zu einem deutlichen Anstieg der Serumkonzentration führen (GSK, 2023).

Bleibt dieser Anstieg bis zum Auftreten klinischer Nebenwirkungen unerkannt und überschreitet die Warnschwelle von 2000 ng/ml (Gesamtgehalt) (Hefner et al., 2018, S. 104), kann dies zu einer schwerwiegenden Intoxikation mit bleibenden Schäden führen. Eine Verringerung der Serumkonzentration von Bupropion durch die gleichzeitige Einnahme von Medikamenten wie Ritonavir oder Lopinavir (HIV-Proteaseinhibitoren) (Freissmuth et al., 2020, S. 804–806) wurde ebenfalls in klinischen Studien beobachtet. Eine solche verminderte Serumkonzentration kann die Wirksamkeit der Therapie gefährden (GSK, 2023) und kann in der Regel nur durch eine Gehaltsbestimmung oder das Ausbleiben einer klinischen Besserung erkannt werden.

Dieser Auszug von Beispielen verschiedener Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und den damit verbundenen Serumspiegelschwankungen zeigt die Relevanz des TDMs auf. Auch die genetische Einzigartigkeit eines jeden Menschen hat durch die daraus resultierende individuelle Enzymausstattung (Hefner et al., 2018, S. 101–102) einen Einfluss auf den Serumspiegel von Bupropion. Hier kann das TDM als Teil eines individuell angepassten therapeutischen Ansatzes dazu beitragen, den Therapieerfolg zu unterstützen. Um solche Untersuchungen zukünftig auch im Labor der Apotheke der LVR-Klinik Viersen zu ermöglichen, soll nun eine Methode zur Serumspiegelbestimmung von Bupropion für die LCMS entwickelt und validiert werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Die LCMS Orbitrap – Kopplung von HPLC und MS

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist als Trennmethode aus der modernen Analytik nicht mehr wegzudenken (aprentas, 2017a, S. 261). Sie ermöglicht die Auftrennung von komplexen Matrices und die Identifizierung und Quantifizierung einzelner Komponenten (aprentas, 2017a, S. 261).

Die Trennung der Analyten in der HPLC erfolgt durch die Wechselwirkung zwischen einer festen und einer flüssigen Phase. Die zu messende Probe befindet sich in der flüssigen Phase und durchläuft das System bis zur Trennsäule, die die feste Phase darstellt. Der Analyt interagiert dann mit beiden Phasen (Reverse Phase, s. u.) entsprechend seiner chemischen Affinität. Dies führt dazu, dass einzelne Bestandteile der Matrix eine höhere Affinität zur festen oder flüssigen Phase besitzen und unterschiedlich lange auf der Trennsäule verbleiben und sich somit voneinander trennen. Die Zeit, die die voneinander getrennten Komponenten des Analyten benötigen, um die Säule zu durchlaufen, wird als Retentionszeit bezeichnet. Diese Retentionszeit hängt von den chemischen Eigenschaften des Analyten ab, wie z. B. seiner Polarität oder dem Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen. Um die Retentionszeit zu beeinflussen oder die Trennleistung der Säule auf einen bestimmten Polaritätsbereich zu fokussieren, kann die Zusammensetzung der flüssigen Phase über die Zeit in Form eines Gradienten verändert werden (Klein & Haen, 2017, S. 124–125), wie dies bei den in 2.2.3 und 2.2.4 beschriebenen Methoden der Fall ist. Die verwendete mobile Phase besteht aus zwei verschiedenen Fließmitteln. Der Anteil des Fließmittels B (0,1 % Ameisensäure in Methanol) an der mobilen Phase wird dabei mit der Zeit erhöht, wodurch die mobile Phase unpolarer wird. Fließmittel A besteht aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser und sorgt damit für eine höhere Polarität der mobilen Phase zu Beginn der Trennung. Zusätze zur mobilen Phase, wie z. B. Ameisensäure, können durch die Protonierung der Analyten zu einer Verschiebung des Protolysegleichgewichts führen. In sauren Eluentengemischen treten Carbonsäuren, Phenole oder Amide dann als Säure oder als Salz auf, nicht aber in beiden Formen. Dadurch kann die Entstehung von Asymmetrien oder doppelten Signalen im Chromatogramm vermieden werden (aprentas, 2017a, S. 276). Außerdem werden die Analyten durch die Protonierung bereits ionisiert, was für die spätere Analyse mit dem Massendetektor wichtig ist. Bei der im Massenspektrometer verwendeten Elektrospray-Ionisation kommt es nämlich nicht zu einer aktiven Ionisierung der Analyten, sondern lediglich zu einem Ionentransfer (Gross, 2013, S. 608), weshalb bereits vorher Ionen im Fließmittel vorhanden sein müssen. Neben der Zusammensetzung des Fließmittels ist auch der hohe angelegte Druck (10 bis 600 bar) ein charakteristisches Merkmal der HPLC und ermöglicht deutlich schnellere Analysen als es noch bei älteren LC

Modellen der Fall ist (aprentas, 2017a, S. 261). Da sich die Zusammensetzung der Fließmittel bei den verwendeten Methoden (s. 2.2.3 und 2.2.4) verändert (Gradient), bietet ein solcher höherer Druck den Vorteil, dass Verzögerungsvolumen geringer ausfallen und somit konstantere Trennergebnisse erzielt werden (aprentas, 2017a, S. 263).

Die Umkehrphasenchromatographie (RP) ist die am häufigsten verwendete Methode zur Analyse von Arzneimitteln im Serum und wurde auch für diese Arbeit verwendet. Sie besteht aus einer unpolaren stationären Phase, die häufig aus einem Kieselgel besteht, in dem polare Silanolgruppen mit langen unpolaren Kohlenstoffketten umgesetzt wurden und einer polaren mobilen Phase (z. B. Gemische aus wässrigen Puffern und Acetonitril oder Methanol). Unter diesen Bedingungen verlassen die polaren Substanzen aufgrund ihrer höheren Affinität zum Fließmittel die Trennsäule mit einer kurzen Retentionszeit. Je unpolarer (lipophiler) die Probe ist, desto länger ist die Verweilzeit auf der Säule. Im Gegensatz dazu steht die Normalphasenchromatographie, bei der eine intakte Kieselgelpolphase, die polare Silanolgruppen enthält, als Trennsäule und unpolare Lösungsmittel als mobile Phase verwendet werden. Lipophile Analyten werden unter diesen Bedingungen zuerst eluiert, während hydrophile Substanzen eine längere Retentionszeit aufweisen.

Neben Normalphasen- und Umkehrphasensäulen stehen auch stereoselektive Säulen zur Verfügung, die eine Trennung optischer Enantiomere ermöglichen (Klein & Haen, 2017, S. 125). Die Wahl der verwendeten Phasenzusammensetzung richtet sich demzufolge nach den jeweiligen chemischen Eigenschaften (insbesondere nach der Polarität) der Wirkstoffmoleküle. Die im Labor standardmäßig verwendete RP eignet sich aufgrund der amphiphilen Eigenschaften von Bupropion (s. chemische Struktur) für dessen Analyse, da die verwendete stationäre Phase sowohl eine polare als auch eine unpolare Interaktion ermöglicht.

Als Trennsäule für die stationäre Phase wurde eine 100 mm Biphenyl-Säule (Thermo Scientific AccuCORE Biphenyl Umkehrphasen-LC-Säule, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) verwendet. Sie hat einen Partikeldurchmesser von 2,6  $\mu\text{m}$  auf, bei einem Innendurchmesser von 2,1 mm und wird vom Hersteller für eine Flussrate von 0,4 ml/min und einen maximalen Druck von 600 bar empfohlen (vgl. Anhang 1). Aufgrund der an das Kieselgel gebundenen Biphenyl-Gruppen kommt es über van-der-Waals-Kräfte zu Wechselwirkungen mit unpolaren Substanzen. Außerdem treten in der Säule  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen auf, sodass sie sich auch für die Trennung von Aromaten und schwach polaren Substanzen geeignet ist (fisher scientific, 2023b).



Die Detektion erfolgt häufig mit einem UV-Detektor, der die Extinktion  $E$ , d. h. die stoffabhängige Schwächung der Intensität einer Lichtstrahlung, der flüssigen Phase nach Durchtritt durch die Trennsäule misst und über das Lambert-Beer'sche-Gesetz einen direkten Bezug zur Konzentration der Lösung herstellen kann. Das Gesetz lautet:

$$E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

wobei  $\varepsilon_{\lambda}$  den sogenannten Extinktionskoeffizienten darstellt, der für jede Substanz einen individuellen Wert besitzt. Die Konzentration der Analytlösung wird mit  $c$  angegeben und wird mit dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{\lambda}$  und der Schichtdicke der verwendeten Küvette  $d$  multipliziert. (Ritgen, 2019, S. 112). Ist also die Extinktion durch die Messung des UV-Detektors bekannt, kann durch Umstellung der Formel die Konzentration berechnet werden.

Diese Art der Detektion findet ihre Grenzen dann, wenn es durch ähnliches Absorptionsverhalten der Probenbestandteile zu Signalüberlagerungen und damit zu falschen Messergebnissen kommt. Die Kopplung der HPLC mit einem massenspektrometrischen Detektionssystem bietet daher aufgrund der höheren Selektivität einen klaren Vorteil bei der Vermessung von Seren, da es hier nicht zu solchen Signalüberlagerungen kommt. Eine besondere Art von MS-Geräten ist die Orbitrap-Massenspektrometrie, die sich durch den namensgebenden Orbitrap-Detektor (s. u.) auszeichnet und eine hohe Massenauflösung und -genauigkeit bietet (Makarov, 2012). Bauartbedingt eignet sie sich besonders gut für die Identifizierung von Peptiden in der Proteinanalytik, aber auch von organischen Verbindungen wie Pharmazeutika und deren Metaboliten (Kromidas, 2017, S. 34).

Für die Methodenentwicklung wurde das Modell „Exactive Plus Orbitrap“ der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Der charakteristische apparative Aufbau eines Massenspektrometers besteht aus einem Einlasssystem, durch das die Probe eingeführt wird, einer Ionenquelle zur Ionisierung der Probe, einem Analysator, zur Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und einem Detektor (Budzikiewicz & Schäfer, 2012, S. 9).

Das Einlasssystem stellt den Übergang zwischen der HPLC und dem Massenspektrometer dar. Hier gelangen die Komponenten des Analyten entsprechend ihrer Retentionszeit in der HPLC zur Ionenquelle des Systems. Die „Erzeugung“ der Ionen erfolgt mittels Elektronensprayionisation (ESI) (s. Anhang 2), um möglichst schonend arbeiten zu können und die Molekülstruktur nicht zu zerstören (Gross, 2013, S. 601). Wie zuvor bereits angesprochen, werden bei der ESI keine Ionen erzeugt. Die Bildung von Ionen erfolgt durch einen Ladungstransfer, weshalb es wichtig ist, durch die Verwendung angesäuerter Fließmittel bereits geladene Teilchen zu erzeugen. Bei diesem System fließt die mobile Phase aus der HPLC durch eine dünne Sprühkapillare, an deren Spitze eine

Spannung angelegt wird. Durch die elektrostatische Bewegung der Teilchen in Richtung der Gegenelektrode bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Flüssigkeitskonus (Taylor cone). Je nachdem, ob eine Ansammlung von positiven oder negativen Ladungen an der Spitze der Kapillare erwünscht ist, kann die Feldrichtung angepasst werden (Budzikiewicz & Schäfer, 2012, S. 28). Die Probenbestandteile treten als feine Tröpfchen aus der Kapillare aus (s. Abb. 3) und werden durch ein Trägergas auf 225 °C erhitzt (s. Anhang 2). Dadurch verdampft das restliche Lösungsmittel, wodurch das Oberflächen-zu-Ladungs-Verhältnis im Tröpfchen bis zum sog. Rayleigh-Limit ansteigt. Wird diese Grenze überschritten, überwindet die elektrostatische Abstoßung der gleichgeladenen Teilchen die Oberflächenspannung des Tröpfchens und es kommt zur sogenannten Coulomb-Explosion. Bei dieser „Explosion“ kommt es zur fortwährenden Desintegration in kleine Untereinheiten, bis sich nur noch isolierte Ionen in der Gasphase befinden (Gross, 2013, S. 605). Dabei kann es auch zur Bildung von Mehrfachladungen eines einzelnen Teilchens kommen (aprentas, 2017b, S. 251).

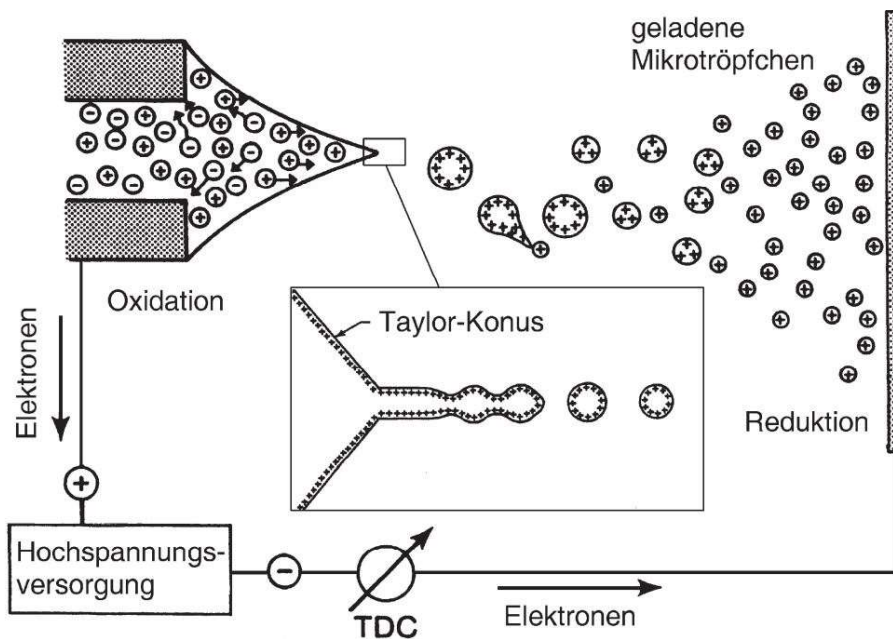


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bildung des Taylor-Konus. Die austretenden Tröpfchen zerfallen aufgrund der im Vergleich zur Oberflächenspannung des verbleibenden Lösungsmittels überwiegender elektrostatischer Abstoßung zu einem feinen Spray (Coulomb-Explosion); Die Wandlung der physikalischen Detektion der Ionen in ein digitales Signal erfolgt durch einen Zeit-Digital-Wandler (TDC) (Gross, 2013, S. 622).

Eine gekrümmte Elektrode hinter dem Einlasssystem sorgt dafür, dass nach der Erzeugung der Ionen nur geladene Teilchen die weiteren Teile des Massenspektrometers passieren, während die ungeladenen Teilchen an den Wänden der Elektrode zurückbleiben. Der in der LCMS-Orbitrap verwendete Quadrupol erfüllt die Funktion eines Massenfilters. Er besteht aus vier Metallstäben, die parallel im Quadrat angeordnet sind und an ihrem Schnittpunkt eine Ebene senkrecht zur Zylinderachse bilden (aprentas, 2017b,

S. 251) (s. Abb. 4). Jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe sind leitend miteinander verbunden. Je nach angelegter Spannung (Wechsel- oder Gleichspannung) entstehen unterschiedliche elektrische Felder und nur Ionen mit einer bestimmten Masse und Ladung können die Ebene des Quadrupols passieren (Budzikiewicz & Schäfer, 2012, S. 33–35).

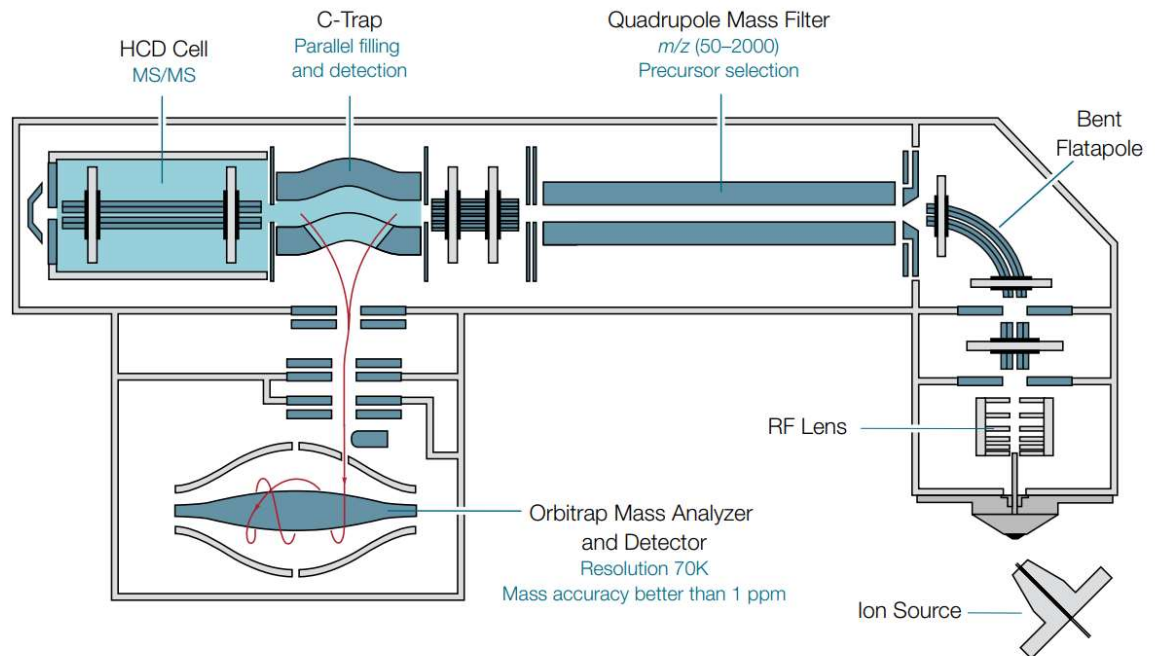


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Orbitrap-Massenspektrometers; abgebildet ist das Einlasssystem der ESI sowie die verschiedenen Stabsysteme (Quadrupol und C-Trap) bis zum Orbitrap-Detektor (Bhattacharyya, 2018).

Um ausreichend lange Transienten für die Auswertung zu erhalten, sind ein geeigneter Ioneneinschuss und ein Ultrahochvakuum für die Orbitrap entscheidend. Um die Ionen vor der Injektion in die Orbitrap zu akkumulieren und zu thermalisieren, werden sie bei niedrigem Stickstoffdruck in einem gekrümmten Quadrupol gehalten, der wegen seiner Form auch *C-Trap* genannt wird (s. Abb. 4). Durch das Herunterkühlen der Teilchen in der C-Trap werden weitere Kollisionen der Teilchen verhindert, die zu einer für das TDM unerwünschten Fragmentierung führen würden (Gross, 2013, S. 213). Nach ausreichender Akkumulation der Ionen werden diese durch Spannungspulse mit einer kurzen Anstiegszeit von mehreren hundert Nanosekunden aus der *C-Trap* geschossen. Die Auswurfbahnen konvergieren durch ein konvexes Linsensystem in Richtung der Öffnung der Orbitrap (Gross, 2013, S. 214) (s. Abb. 4). Die Orbitrap ist Analysator und Detektor in einem. Sie besteht aus einer Zentralelektrode, die von zwei Außenelektroden umgeben ist. Die angelegte Spannung wird beim Eintreffen des Ionenstrahls reduziert, wodurch die Ionen auf eine Kreisbahn um die Zentralelektrode gezwungen werden. Bei dieser Bewegung oszillieren sie charakteristisch für eine spezifische Ladung und Masse (Bhattacharyya, 2018). Die jeweilige Massenträgheit führt dazu, dass ein geladenes Teilchen

mit zunehmender Masse weniger stark von seiner ursprünglichen Bahn abgelenkt wird (Ritgen, 2020, S. 12). Dadurch bildet jedes Teilchen eine charakteristische Schwingungsfrequenz  $\omega$  aus, die durch folgende Formel beschrieben wird:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Mithilfe der Feldkrümmungskonstante  $k$  und der Ladung  $z$  kann daraus die spezifische Masse eines Teilchens bestimmt werden. Die Quantifizierung der Ionen wird durch eine *Fourier-Transformation (FT)* ermöglicht, die von einer Software durchgeführt wird und aus der Schwingungsfrequenz der aperiodischen Signale ein Intensitätssignal auf dem Bildschirm erzeugt (Strupat et al., 2016). Eine *FT* ermöglicht die mathematische Operation der Transformation der komplexen Funktion einer realen Variable in eine andere. Die Ausgangsfunktion bildet dabei die sogenannte Zeitdomäne, während die durch die *FT* erzeugte Funktion die Frequenzdomäne bildet. Erreicht ein transientes Signal am Ende einer Messung die Null-Amplitude, so bildet sich durch die *FT* in der Frequenzdomäne eine sog. Lorentz-Kurve. Je mehr Zyklen das Signal enthält, desto schärfer wird das Signal in der Frequenzdomäne entsprechend der Energie-Zeit-Unschärfe. Bei der Analyse mit einem Massenspektrometer wird jedoch wegen der kurzen Messzeit keine vollständige Dämpfung der Transienten auf null erreicht. Dies führt dazu, dass das Signal, welches von der Software als Lorentz-Kurve dargestellt wird, im eigentlichen Chromatogramm von Seitenbahnen (Wiggles) umgeben ist. Moderne Software, wie die in 2.1.4.1 beschriebene Software TraceFinder, ist dazu in der Lage, diese Seitenbahnen zu „glätten“ und so die Lorentz-Kurve als klareres und symmetrischeres Signal im Massenspektrum darzustellen (Gross, 2013, S. 198–200).

### 2.1.2 Wirkstoffe und Lösungsmittel

Für die Herstellung aller Stammlösungen und für die Verdünnungen in der Bestimmung der Retentionszeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde Methanol in LCMS-Qualität (Methanol Optima LC/MS Grade, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) verwendet. Das im internen Standard verwendete Acetonitril, welches als Fällungsmittel dient, ist ebenfalls von gleicher Qualität (Acetonitril Optima LC/MS Grade) und wird vom selben Hersteller bezogen.

Als Analyten wurden Bupropion in Form einer Matrixtablette mit der Dosis 150 mg (Elontril, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland) und Hydroxy-Bupropion als Reinsubstanz verwendet (Hydroxy Bupropion, Toronto Research Chemicals, North York, Canada). Die Reinheit des Hydroxy-Bupropions wurde seitens des Herstellers mit 95 % angegeben (s. Anhang 3).

### 2.1.3 Interner Standard und externe Kontrollen

Durch die Verwendung eines internen Standards in der analytischen Chemie kann die Richtigkeit und Präzision einer Messung kontrolliert und verbessert werden. Er wird zusammen mit der Probe in die Analyse eingebracht und dient als Referenzwert. Dadurch können Schwankungen in den Messbedingungen und in der Probenvorbereitung identifiziert und die Präzision und Reproduzierbarkeit der Messung verbessert werden. Die Software kalibriert dabei die Signalintensität des Analyten im Vergleich zu der des internen Standards und gleicht Schwankungen bis zu einem gewissen Grad aus. Diese Kalibration ermöglicht die Quantifizierung der vermessenen Substanzen auch ohne einen direkten linearen Zusammenhang, wie er für die Absorption bei einer UV-Detektion durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz gegeben ist. Der interne Standard sollte dabei den chemischen Eigenschaften des Analyten entsprechen, damit die Interaktion mit dem Fließmittel und der Trennsäule tatsächlich vergleichbar ist (Hoffmann & Stroobant, 2007, 266 ff.). Für die Methodenentwicklung wurde der im Labor standardmäßig verwendete interne Standard eingesetzt, welcher aus 40 ng/ml Fluperlapin und 40 ng/ml Bromperidol in Acetonitril besteht.

Die Vermessung eines internen Standards allein reicht jedoch nicht aus, um auch die Richtigkeit der Messungen zu bestätigen. Hierfür werden externe Kontrollen benötigt, die von einem zertifizierten Hersteller (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH) produziert werden. Diese Kontrollen enthalten in der Regel eine Vielzahl an Wirkstoffen der gleichen pharmazeutischen Wirkstoffgruppe (z. B. Antiepileptika oder Antidepressiva) und werden in zwei verschiedenen Konzentrationsstufen vermessen, welche den therapeutischen Bereich vollständig abdecken (vgl. Anhang 4 und 5). Die externen Kontrollen werden vom Hersteller als Pulver geliefert und im Labor dann bei Bedarf in Wasser gelöst. Die Aufbereitung erfolgt entsprechend der Methode, die für den zu untersuchenden Analyten verwendet wird. Die Vermessung der Kontrollen erfolgt zusammen mit den Kalibrationslösungen in der Regel zweimal täglich oder nach Wartungsarbeiten an der Maschine, die einen Einfluss auf die Präzision und Richtigkeit der Messergebnisse der LCMS haben könnten.

Die Verwendung solcher internen und externen Qualitätskontrollen ist im therapeutischen Drug Monitoring obligatorisch und wird beispielsweise durch die DIN EN ISO 15189 oder die Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) vorgegeben (Hefner et al., 2018, S. 132). Auch die Teilnahme an Ringversuchen wird in den Leitlinien vorgeschrieben. Dabei handelt es sich um eine weitere Form der externen Qualitätskontrolle, bei der Proben mit bekannten Konzentrationen von Arzneistoffen an verschiedene Labore versendet werden. Die Labore führen unabhängig voneinander eine Gehaltsbestimmung durch und melden die

Ergebnisse zurück. Liegen die Messwerte außerhalb des Toleranzbereiches, kann dies zu einer Widerrufung der Akkreditierung des Labors führen.

## 2.1.4 Verwendete Software

### 2.1.4.1 Xcalibur ®

Für die Programmierung der Proben auf der LCMS wurde die Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Durch das sogenannte „Batch-Processing“ können Arbeitsabläufe für die Analyse mehrerer Proben automatisiert werden, wodurch Zeit gespart und menschliche Fehler reduziert werden. Dabei kann für jede Probe eine unterschiedliche Methode verwendet werden, wodurch auch verschiedene Analyten in einem Probenlauf untersucht werden können. Xcalibur überwacht während der Messung die Geräteparameter wie Temperatur und Druck, aber auch Qualitätskontrollparameter, wie die Intensität der internen Standards, um die Genauigkeit und Qualität der Analyse während der gesamten Messung sicherzustellen. Durch die Möglichkeit, die Speicherpfade für jede Probe anzupassen, können auch verschiedene Projekte neben den Routinen-Analysen im Rahmen des TDM ohne Unterbrechung programmiert werden, ohne dass es zu einer falschen Datenzuordnung kommt.

### 2.1.4.2 TraceFinder ®

TraceFinder ist eine Software der Firma Thermo Fisher Scientific, die speziell für die Datenauswertung von flüssigchromatographischen und massenspektrometrischen Verbundsystemen entwickelt wurde. Sie ist insbesondere für den Einsatz in der klinischen Diagnostik, der Forschung und weiteren Anwendungsfeldern in der Life-Science-Industrie konzipiert.

Das Programm umfasst dabei drei wesentliche Funktionen:

1. **Datenanalyse:** Die umfangreichen Funktionen und Werkzeuge der Software ermöglichen eine benutzerfreundliche statistische Auswertung und Interpretation der Daten. Zu diesen Werkzeugen zählen insbesondere Signalberechnungen, Kalibrierungen, Identifizierungen, Quantifizierungen und auch die Erfassung von Isotopenverhältnissen. Dabei verwendet TraceFinder die Methode der kleinsten Fehlerquadrate, um den quantitativen Gehalt der Probe zu berechnen.
2. **Datenaufbereitung:** Die vom Detektor des Massenspektrometers ermittelten Rohdaten werden von TraceFinder automatisch aufbereitet, indem Kalibrierkurven bereitgestellt, Integrationsprüfung durchgeführt und Korrekturen für das Hintergrundrauschen vorgenommen werden. Die Datenaufbereitung umfasst auch die Signaldetektion und -integration.

3. Automatisierung: TraceFinder unterstützt die automatische Erfassung und Verarbeitung von Daten, kann daraus Berichte generieren und die Daten in das Laborsystem übertragen.

### 2.1.5 Weitere Materialien

Für die Herstellung der Messlösungen im Rahmen der Methodenentwicklung wurden diverse weitere Laborgeräte eingesetzt. Dazu gehören ein Mörser zur Zerkleinerung der Bupropion-Tablette und ein Ultraschallbad zur optimalen Auflösung des Pulvers (Bupropion und Hydroxy-Bupropion). Die Lösungen wurden in Maßkolben unterschiedlicher Größe (10 und 50 ml) hergestellt. Alle Volumenarbeiten wurden zunächst mit Messpipetten aus Glas und für das exakte Auffüllen der geforderten Volumenmenge bis zur Markierung der Maßkolben im Anschluss mit Mikropipetten durchgeführt, um mögliche Pipettierfehler und Volumenabweichungen bei der Herstellung der Stammlösungen so gering wie möglich zu halten.

Für die Aufbereitung der Proben wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Kunststoff und Vials aus Glas verwendet. Die Arbeitsschritte während der Aufbereitung wurden mithilfe von Mikropipetten, einem automatischen Mehrfachdispenser, einer Labor-Rüttelplatte („Lab-Dancer“) und einer für die Eppendorf-Reaktionsgefäße geeigneten Zentrifuge durchgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probenaufbereitung mit der AEP-Methode

Blut stellt mit seiner komplexen Zusammensetzung aus diversen Proteinen, Spurenelementen, organischen Verbindungen wie Vitaminen, aber auch Fetten und körperfremden Substanzen wie Arzneistoffen eine anspruchsvolle Matrix dar (Clauss & Clauss, 2009, S. 222). Die Zentrifugation der Blutproben und die damit verbundene Trennung von Plasma und Serum ist bereits ein erster Schritt, um größere Bestandteile wie die Erythrozyten aus der Matrix zu entfernen. Um nun auch das verwendete Serum noch weiter aufzureinigen, wird bei der AEP-Methode (interne Methode) eine Acetonitril-Fällung durchgeführt, um zu verhindern, dass Proteine auf die LCMS gelangen und dort zu Verunreinigungen führen. Die AEP-Methode hat sich für die Aufbereitung von Antiepileptika bewährt (L. Schaaf, persönliche Mitteilung, 2022), deren therapeutisch wirksame Blutkonzentration in einem ähnlichen Bereich wie die von Bupropion und Hydroxy-Bupropion liegt, weshalb sie auch als erste Methode für die Gehaltsmessungen dieser Analyten getestet wurde.

Dazu werden 50 µl der Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und zunächst mit 500 µl internem Standard versetzt. Der interne Standard besteht neben den Kontrollsubstanzen Fluperlapin und Bromperidol hauptsächlich aus Acetonitril (LCMS-Qualität), das für die Fällung der Proteine aus dem Serum verantwortlich ist. Nach Zugabe des

internen Standards wird das Reaktionsgefäß sofort für mehrere Sekunden kräftig von Hand geschüttelt und anschließend für eine Minute auf den Labor-Schüttler gestellt. Im Anschluss werden erneut 500 µl interner Standard in das Reaktionsgefäß gegeben und erneut kräftig von Hand geschüttelt. Nachdem das Gefäß erneut für eine Minute auf den Labor-Schüttler gestellt wurde, wird es zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren werden 200 µl des Überstands in ein Glasvial überführt. In das Glasvial wurden bereits zuvor 800 µl einer Pufferlösung, welche aus 0,05-prozentiger Ameisensäure in Methanol und Wasser (LCMS-Qualität) besteht, vorgelegt. Nach dem Verschließen des Vials mit einem für die LCMS geeigneten Deckel wird das Gefäß leicht geschüttelt und kann als Probe mit einem Injektionsvolumen von 5 µl und der Methode „Biphenyl0\_3new“ (s. 2.2.3) auf der LCMS vermessen werden.

### 2.2.2 Herstellung der AEP-Kalibrationslösungen für die LCMS

Alle Kalibrationslösungen, die für die Vermessungen verwendet werden, bestehen aus selbst hergestellten Lösungen mit bekannter Konzentration. Für die Kalibrationspunkte K1, K2 und K3 betragen die Zielkonzentration für Bupropion 10,420; 104,160; und 520,800 ng/ml und für Hydroxy-Bupropion bei 200; 1000 und 1500 ng/ml.

Die hergestellte Präzisionslösung P1 hat einen Zielwert von 52,080 ng/ml für den Bupropion-Gehalt und 800 ng/ml für den Hydroxy-Bupropion-Gehalt. Alle hergestellten Lösungen sind in 5%igem Humanalbumin gelöst.

Zusätzlich zu den Kalibrations- und Präzisionslösungen wurden zwei externe Kontrollen des Unternehmens „Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH“ verwendet. Alle Lösungen wurden mit der in 2.2.1 beschriebenen AEP-Methode aufbereitet und zusätzlich zu den unbekanntenen Proben mit der LCMS vermessen.

### 2.2.3 Biphenyl0\_3new-Methode (LCMS)

Die LCMS Orbitrap erlaubt eine ganze Reihe an Modifikationen, um ein optimales Messergebnis zu erzielen. So kann beispielsweise das Verhältnis der beiden verwendeten Fließmittel A und B zueinander über den Zeitraum der Messung verändert werden. Auch die eingebaute Säule kann an die Spezifikationen der zu untersuchenden Matrix angepasst werden, um die Trennung des Analyten von der Matrix zu verbessern. Neben der Anpassung der chromatographischen Trennung können auch die Parameter der Massenspektrometrie verändert werden. Hierunter fällt unter anderem die Spannung und die Temperatur in der Kapillare, durch die das Eluat fließt, bevor es ionisiert wird. Die Optimierung der Scan-Parameter des Detektors, wie z. B. der erfasste Massendetektionsbereich oder die Auflösung, kann ebenfalls an den Analyten angepasst werden, um Zeit und Datenkapazität zu sparen.

Diese Gesamtkomposition von Anpassungen an der LCMS kann als Methode in der Software erstellt und gespeichert werden. Die Software unterstützt auch die Verwendung



mehrerer Methoden in einem Messdurchlauf, sodass die Messung einer Vielzahl von Analyten unterschiedlicher Affinität oder Polarität automatisiert werden kann. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass die Methoden zu Beginn und am Ende der Analysezeit jeder Probe die gleiche Zusammensetzung von Fließmitteln aufweisen und dies über einen gewissen Zeitraum gehalten wird. Ist diese Pufferzeit zu kurz, kann es zu großen Unterschieden der Fließmittelzusammensetzung an der Pumpe im Vergleich zur Trennsäule kommen (Verzögerungsvolumen). Dies kann dazu führen, dass für die Trennwirkung wichtige Zusammensetzungsstufen zu kurz gehalten werden. Die Einhaltung solcher Pufferzeiten ist auch für eventuelle Temperaturanpassungen in allen Bereichen der LCMS relevant.

Die im Verlauf dieser Methodenentwicklung verwendete Methode ist die Biphenyl0\_3new-Methode (interne Methode). Während der Messung wird ein Durchfluss der Fließmittel von 0,3 ml/min verwendet bei einem Anteil des Fließmittels B von 10 %. Dieser Anteil wird bis Minute 6 der Gesamtmesszeit einer Probe auf 90 % gesteigert und für 2 Minuten gehalten (s. Anhang 6). Dies führt zur Lösung der noch auf der Säule verbliebenden unpolaren Substanzen und ermöglicht eine Trennung der Substanzen über die Zeit entsprechend ihrer Polarität. Ab Minute 8 wird der Anteil des Fließmittels B an der mobilen Phase wieder auf 10 % reduziert und für 3 Minuten gehalten, um die bereits angesprochene Pufferzeit einzuhalten, bis dieses Verhältnis der Fließmittel auch auf der Trennsäule herrscht.

Für die Biphenyl0\_3new-Methode wird eine Spannung von 3,1 kV an der Kapillare angelegt und diese auf 275 °C erhitzt, um die Ionisierung der Moleküle zu beschleunigen. Die untersuchten Massenbereiche liegen zwischen 200 und 600 m/z (vgl. Anhang 2). Eine einzelne Messung benötigt insgesamt 11 Minuten.

#### 2.2.4 AEP-Methode (LCMS)

Bei der AEP-Methode wird der Gradient des Anteils von Fließmittel B an der mobilen Phase im Vergleich zur Biphenyl0\_3new-Methode langsamer gesteigert. So wird der Anteil bis Minute 3 auf 10 % gehalten und erst dann bis Minute 7 auf 90 % gesteigert und für eine Minute gehalten. Ab Minute 8 wird dann genau wie bei der Biphenyl0\_3new-Methode der Anteil wieder auf 10 % reduziert und bis zum Ende der Messung gehalten (s. Anhang 7). Neben der Dauer einer AEP-Vermessung von insgesamt 11 Minuten, entsprechen auch die Parameter des Massenspektrometers denen der Biphenyl0\_3new-Methode. Lediglich der detektierte Massenbereich wurde aufgrund der im Schnitt geringeren Massen der Antiepileptika im Vergleich zu anderen Arzneistoffen von 200 bis 600 m/z (Biphenyl0\_3new-Methode) auf 100 bis 600 m/z erweitert.

### 2.2.5 Statistische Methoden

Für die Analyse und Bewertung der Daten wurden verschiedene statistische Formeln verwendet. Das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  wurde dabei wie folgt berechnet:  $\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$  (Bleymüller & Weißbach, 2015, S. 8), wobei  $N$  die Gesamtzahl aller Messungen und  $x_i$  die Anzahl der Einzelwerte symbolisiert.

Die Standardabweichung  $\sigma$  der Daten ergibt sich aus der Wurzel der Varianz  $\sigma^2$ , welche sich aus der Formel  $\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$  ergibt (Bleymüller & Weißbach, 2015, S. 11).

Die Standardabweichung wird im Folgenden für die Berechnung des Variationskoeffizienten  $VC$  benötigt. Dieser ergibt sich aus der Formel  $VC = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \%$  (Bleymüller & Weißbach, 2015, S. 12). Der Variationskoeffizient stellt somit die relative Streuung einer Verteilung im Verhältnis zu ihrem Mittelwert dar und erlaubt eine Überprüfung der Variabilität von Daten innerhalb einer Verteilung.

Um die Korrelation zwischen zwei Variablen (hier vor allem Wirkstoffkonzentration und Signalintensität) zu überprüfen, wird der lineare Einfachkorrelationskoeffizient  $R$  oder auch Pearson-Korrelationskoeffizient (Bleymüller & Weißbach, 2015, S. 45) mit folgender Formel berechnet:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Dabei gilt es zu beachten, dass  $x_i$  die unabhängigen und  $y_i$  die abhängigen Variablen symbolisiert. Das in dieser Arbeit verwendete lineare einfache Bestimmtheitsmaß ist dabei als  $R^2$  definiert (Bleymüller & Weißbach, 2015, S. 45) und gibt an, wie gut eine lineare Regressionsgerade die beobachteten Datenpunkte approximiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels

Bevor Lösungen auf Basis von aufgereinigten Seren oder Patientenproben verwendet werden konnten, musste ein geeignetes Lösungsmittel für die Herstellung der Stammlösungen ermittelt werden. Die in Abschnitt 1.2 aufgeführten Lösungsmiteleigenschaften von Bupropion zeigen, dass sowohl Wasser als auch Methanol als Lösungsmittel für Bupropion geeignet sind. Wasser ist jedoch aufgrund seiner Anfälligkeit für mikrobielle Kontaminationen und der längeren Auftauzeit nach dem Einfrieren bestenfalls ein Reservemittel. Methanol hingegen weist diese Nachteile nicht auf und hat sich daher als Lösungsmittel für organische Substanzen bewährt. Da die Löslichkeit von Bupropion in Methanol für die benötigten Konzentrationen der Stammlösungen ausreichend ist, wurde Methanol als Lösungsmittel verwendet.

Da Bupropion in Form einer Matrix-Tablette verwendet wurde, war eine Ansäuerung des Lösungsmittels mit Ameisensäure erforderlich. Dadurch wurden die physiologischen Bedingungen im menschlichen Magen imitiert, was zu einer verbesserten Freisetzung des Wirkstoffs aus der Matrix und damit zu einer Vermeidung möglicher Gehaltsverluste führte.

#### 3.2 Auswahl einer geeigneten Vermessungs-Methode für die LCMS

Für die Vermessung von Proben mit der LCMS wird in der Regel zunächst auf bereits entwickelte Methoden zurückgegriffen, die sich in der Praxis bewährt haben. Daher wurden die in 2.2.3 und 2.2.4 vorgestellten Biphenyl- und AEP-Methoden auf ihre Eignung für die Vermessung von Bupropion überprüft. Die Entwicklung einer neuen Methode mit anderen Einstellungen des verwendeten Gradienten oder einer anderen Zusammensetzung der Fließmittel wäre mit einem hohen Kosten- und Arbeitsaufwand für die Laborroutine verbunden. Um standardisiert und kosteneffizient arbeiten zu können, ist es sinnvoll, möglichst viele Analyten in einer Methode unterzubringen, sofern die Messergebnisse den Anforderungen entsprechen.

Die Auswertung der vermessenen Proben ergab für beide Methoden gleich gute Ergebnisse (vgl. Anhang 9 und 10) hinsichtlich der Trennleistung und der Peak-Symmetrie im HPLC-Chromatogramm. Da die Biphenyl-Methode für viele Antidepressiva und Neuroleptika verwendet wird und als Standardverfahren im Labor gilt, wurde sie aufgrund dieses wirtschaftlichen Vorteils für die weiteren Arbeiten in zur Methodenentwicklung verwendet.

### 3.3 Retentionszeitermittlung

Die Retentionszeit eines Analyten ist ein wichtiger Parameter bei der Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen in einer Probe. Die Retentionszeit bezieht sich dabei auf den Zeitpunkt, zu dem ein Analyt nach der Injektion in die Säule von dieser wieder eluiert wird. Sie hängt von mehreren Faktoren ab, wie beispielsweise der Elutionsmethode, der Säulenchemie und den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten. Aus dem Zusammenspiel dieser Faktoren ergibt sich eine charakteristische Retentionszeit für eine Substanz, die in Verbindung mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Vermessung eine eindeutige Identifizierung ermöglicht.

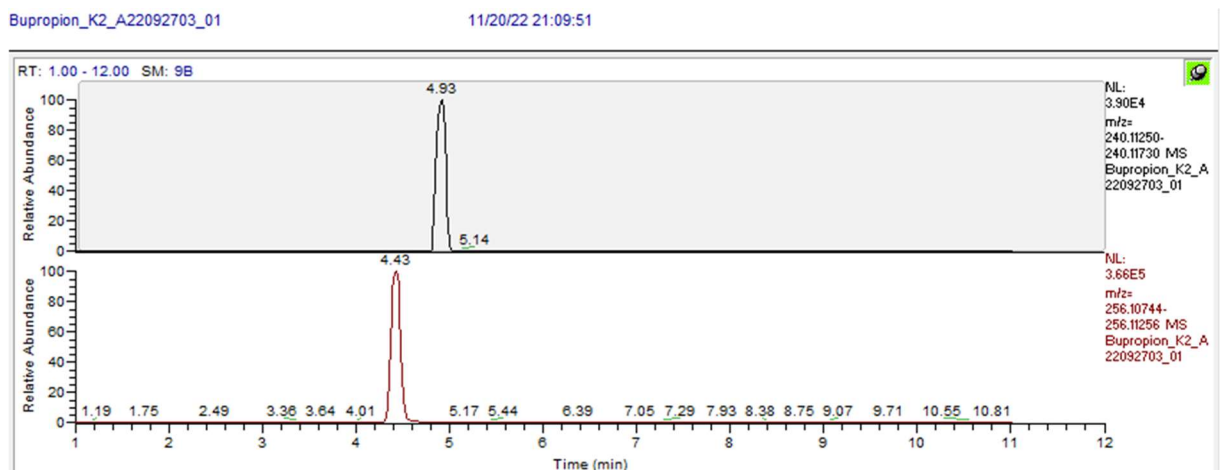


Abbildung 5: Retentionszeit von Bupropion (oben) und Hydroxy-Bupropion (unten) im Chromatogramm der HPLC; Die Vermessung der beiden Substanzen erfolgte parallel in einer Probe.

Für die Vermessung wurden die Standardparameter der Biphenyl0\_3new-Methode verwendet, welche in 2.2.3 bereits erläutert wurden. Dabei ergab sich für das Bupropion eine Retentionszeit von 4,93 Minuten und 4,43 Minuten für Hydroxy-Bupropion (s. Abb. 5). Die ähnliche Retentionszeit der beiden Substanzen ist auf ihre ähnliche Struktur zurückzuführen. Dabei durchläuft das Hydroxy-Bupropion die Säule aufgrund der erhöhten Polarität durch die angelagerte Hydroxy-Gruppe schneller als das Bupropion, da weniger Wechselwirkungen mit der Säule stattfinden. Durch den Massenunterschied von 16 g/mol sind die beiden Substanzen dennoch gut unterscheidbar und können trotz ähnlicher Retentionszeiten in einer Probe gleichzeitig vermessen werden.

Die hohe Symmetrie der Peaks (s. Abb. 5) beider Substanzen spricht ebenfalls für die Eignung der verwendeten Methode und gibt Aufschluss über weitere Charakteristika einer guten Analytik. Zum einen spricht sie für eine hohe quantitative Genauigkeit und leichteres Peak-Picking, da für die TraceFinder Software symmetrische Peaks im Chromatogramm leichter zu identifizieren und integrieren sind, was die Grundlage für eine Automatisierung und die Zeiteffizienz in der Auswertung legt. Andererseits ist die Symmetrie auch ein Zeichen für eine gute Trennung der Komponenten und für die Reproduzierbarkeit und Konsistenz der Analytik.

### 3.4 Messempfindlichkeit

Die Messempfindlichkeit ist ein wichtiger Parameter für die Zuverlässigkeit und Genauigkeit einer analytischen Methode. Sie ist eine individuelle Größe, die von der verwendeten Analyseverfahren, der Probenart und der Matrix selbst abhängt. Um genaue Ergebnisse gewährleisten zu können, muss diese daher für jede Methode und jeden Analyten spezifisch bestimmt werden. Sie wird im therapeutischen Drug Monitoring als die untere Grenze der Nachweisbarkeit (Limit of Detection, LOD) oder der untere Bereich der Messskala (Limit of Quantification, LOQ) definiert. Der LOD stellt dabei den niedrigsten Wert einer Konzentration des Analyten dar, der mit der verwendeten Methode noch detektiert werden kann, während der LOQ den kleinsten Wert darstellt, der noch quantifizierbar ist (aprentas, 2017a, S. 216–217).

Neben dem technischen Nachweislimit des Detektors ist für das TDM vor allem die therapeutische Breite des Arzneistoffs entscheidend. Die notwendige Messempfindlichkeit entspricht dabei einem Wert, der 50 % unter dem unteren Ende der therapeutischen Breite liegt. Bupropion ist bei einer Serumkonzentration von 10-100 ng/ml und Hydroxy-Bupropion von 850-1500 ng/ml wirksam (Hefner et al., 2018, S. 104). Da es durch die verwendete Aufbereitung (AEP-Methode) der Proben zu einer Verdünnung von 1:25 kommt, ergibt sich eine erforderliche Messempfindlichkeit von 0,2 ng/ml für Bupropion und 17 ng/ml für Hydroxy-Bupropion.

### 3.5 Nachweisgrenze

„Die Nachweisgrenze definiert den geringsten Fluss bzw. die geringste Menge eines Analyten, der/die notwendig ist, um ein Signal zu erhalten, das sich vom Hintergrundrauschen abhebt.“ (Gross 2013, S.15). Eine solche Abhebung vom Hintergrundrauschen wird ab einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 als zuverlässig angesehen (aprentas, 2017a, S. 216–217).

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden zunächst drei methanolische Verdünnungen einer Bupropion-Stammlösung mit einer Konzentration von 100, 10 und 1 ng/ml hergestellt und vermessen. Das Signal-Rausch-Verhältnis lag dabei bei allen Lösungen in einem so hohen Verhältnis, dass es von der Software nicht mehr berechnet werden konnte. Deshalb wurden weitere Verdünnungen mit einer Konzentration von 0,5 und 0,1 ng/ml hergestellt. Für die 0,1 ng/ml-Lösung ergab sich ein Signal-Rausch-Verhältnis von 28,85 (s. Abb.6). Da die Konzentration bereits unterhalb der erforderlichen Messempfindlichkeit von 0,2 ng/ml für Bupropion lag, wurden keine weiteren Lösungen vermessen.

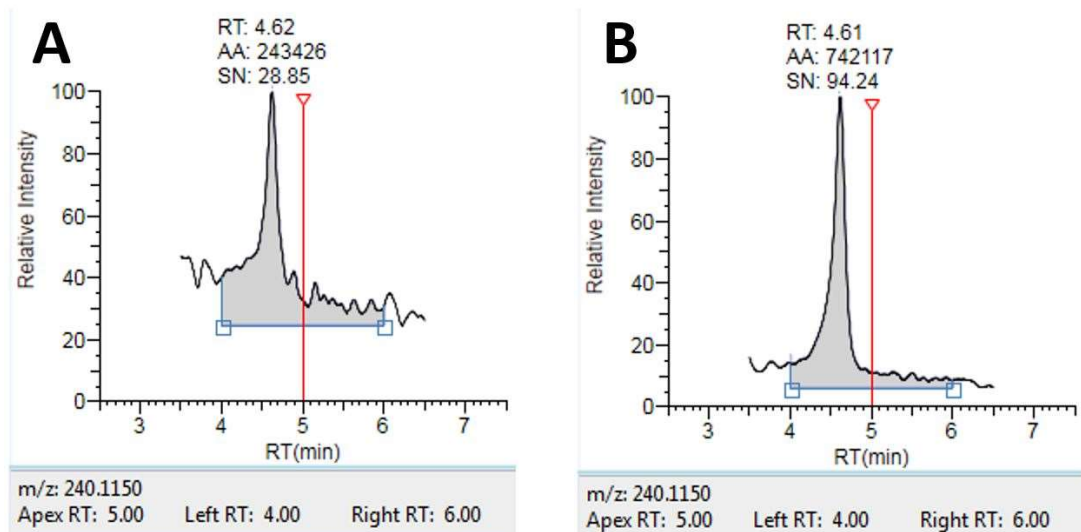


Abbildung 6: Signalintensität der zur Bestimmung der Nachweisgrenze vermessenen Bupropionlösungen (A: 0,1 ng/ml; B: 0,5 ng/ml) im Massenspektrometer des Orbitrap-Detektors erstellt durch die TraceFinder-Software. RT steht dabei für die Retentionszeit, AA für die integrierte Fläche und SN für das Signal-Rausch-Verhältnis.

Auch für das Hydroxy-Bupropion wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 100, 10 und 1 ng/ml in Methanol hergestellt und mit der LCMS vermessen. Dabei ergab sich für die 1 ng/ml-Lösung ein Signal-Rausch-Verhältnis von 261,07 (s. Abb. 7). Für eine weitere Verdünnung auf 0,5 ng/ml ergab sich ein Wert von 144,57 (s. Abb. 7). Beide Konzentrationen liegen weit unterhalb der erforderlichen Messemphindlichkeit von 17 ng/ml für das Hydroxy-Bupropion und liefern zuverlässige Signale mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis. Da auch hier eine weitere Vermessung von niedrigeren Konzentrationen unwirtschaftlich wäre und die erforderlichen Ergebnisse bereits erzielt wurden, wurden keine weiteren Verdünnungen zur Bestimmung der tatsächlichen Nachweisgrenze vermessen.

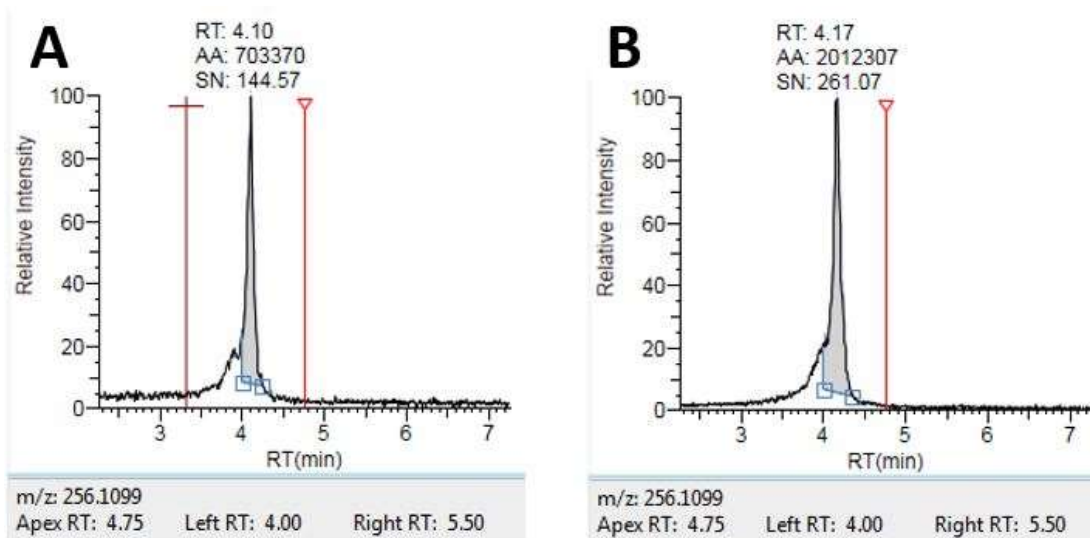


Abbildung 7: Signalintensität der zur Bestimmung der Nachweisgrenze vermessenen Hydroxy-Bupropionlösungen (A: 0,5 ng/ml; B: 1 ng/ml) im Massenspektrometer des Orbitrap-Detektors erstellt durch die TraceFinder-Software.

### 3.6 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate, auch bekannt als Rückgewinnung oder Rückgewinnungsrate, gibt an, wie viel von einer bekannten Menge einer Substanz bei der Analyse einer Probe tatsächlich gefunden wird. Sie ist daher ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Genauigkeit und Zuverlässigkeit einer Analysemethode. Sie erlaubt außerdem Rückschlüsse auf die Interaktion des Analyten mit den Bestandteilen des Serums, sowie auf mögliche Verluste während der Probenaufbereitung. Da es sich bei der AEP-Methode um eine Proteinfällung handelt, sind Einschlüsse der Analyten in gefällten Serum-Proteinen denkbar.

Die Wiederfindungsrate wird berechnet, indem die in der Probe vorhandene Menge der Substanz mit der tatsächlich gefundenen Menge verglichen wird. Sie wird in Prozent ausgedrückt und nach der folgenden Formel berechnet:

$$WFR \% = \frac{x_{ist} \cdot 100}{x_{soll}} \text{ (Soffiantini, 2021, S. 206)}$$

Zur Untersuchung der Wiederfindung wurden für jeden Analyten 20 Proben gleicher Konzentration hergestellt und vermessen. Die ersten zehn Proben bestanden dabei aus einer wässrigen Lösung und dienten als Referenzmaterial, da diese von der Probenaufbereitung nicht beeinflusst werden. Anschließend wurden die mit Bupropion und Hydroxy-Bupropion (5%iges Humanalbumin) versetzten Lösungen vermessen. Sowohl die wässrigen als auch die serumhaltigen Lösungen hatten dabei eine Zielkonzentration von 104 ng/ml Bupropion und 800 ng/ml Hydroxy-Bupropion.

*Tabelle 1: Die von der TraceFinder Software errechneten Gehalte an Bupropion und Hydroxy-Bupropion der zehn aufbereiteten Serumproben im Vergleich zum theoretischen Gehaltswert von 100 % der wässrigen Lösungen und die statistische Datenauswertung (Mittelwert und Standardabweichung).*

<b>Lösung</b>	<b>Bupropion</b>	<b>Hydroxy-Bupropion</b>
Wasser 1	103,2	99,2
Wasser 2	97,1	110,6
Wasser 3	99,2	95,7
Wasser 4	100,9	103,8
Wasser 5	99,7	100,7
Wasser 6	91,9	100,8
Wasser 7	98,0	93,1
Wasser 8	94,5	97,5
Wasser 9	110,3	104,8
Wasser 10	105,3	103,8
<b>Mittelwert</b>	100,0	101,0
<b>Standardabweichung</b>	5,0	4,8
Serum 1	107,4	98,0
Serum 2	110,3	100,2
Serum 3	110,4	100,9
Serum 4	104,0	94,9
Serum 5	116,2	94,1
Serum 6	116,5	112,7
Serum 7	103,8	103,0
Serum 8	115,5	103,4
Serum 9	109,5	100,7
Serum 10	123,3	111,7
<b>Mittelwert</b>	111,7	102,0
<b>Standardabweichung</b>	5,8	5,9

Die vermessenen wässrigen Lösungen zeigen im Mittel einen Gehaltswert von  $100 \pm 5$  % für Bupropion und  $101 \pm 4,8$  % für Hydroxy-Bupropion (s. Tbl. 1), was einer Variation von weniger als 6 % entspricht.

Die Ergebnisse der Vermessung der Serum-Lösungen entsprechen jedoch nicht den Erwartungen. So weist Bupropion im Mittel einen Gehalt von  $111,7 \pm 5,8$  % auf und liegt damit sogar über dem Gehalt der wässrigen Lösungen. Auch für das Hydroxy-Bupropion wurden mit  $102 \pm 5,9$  % durchschnittliche Werte gemessen, die über der Zielkonzentration liegen. Somit scheint die Fällung der Serumproteine zu keinerlei Einschlüssen von Bupropion und Hydroxy-Bupropion zu führen. Dies erklärt jedoch nicht den Anstieg des Gehalts auf Werte von über 100 %.



### 3.7 Ionensuppression

#### 3.7.1 Einführung in die Ionensuppression

Die Ionensuppression stellt eine mögliche Herausforderung bei der Durchführung der Analytik im Zuge des therapeutischen Drug Monitorings dar, da sie den korrekten Nachweis von Arzneistoffen im Blut beeinträchtigen kann.

Zur Ionensuppression kann es kommen, wenn andere Ionen im Blut die Signalintensität der Arzneistoffe in der Quelle reduzieren, wodurch es zu einer falschen Dosisanpassung durch den Arzt für den Patienten kommen kann und infolgedessen nicht nur die Wirksamkeit der Therapie gefährdet ist, sondern auch eine Intoxikation des Patienten nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Ursachen der Ionensuppression sind vielfältig und hängen von verschiedenen Faktoren wie der Probenmatrix, den Eigenschaften des Arzneistoffs und den äußeren Bedingungen während der Analyse ab. Ein wichtiger Faktor ist die Anwesenheit von endogenen Verbindungen, wie Stoffwechselprodukten oder Metallen, die im Serum vorhanden sind und um die Ionisierungsplätze in der LCMS mit dem eigentlichen Analyten konkurrieren.

Da die Patienten, deren Proben im Labor untersucht werden, vorwiegend in psychiatrischer Behandlung sind und in der Regel eine Vielzahl verschiedener Medikamente einnehmen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Effekte in der Analytik auftreten, hoch.

### 3.7.2 Untersuchung von mit Analyten versetzten Patientenproben

Zur Untersuchung der Ionensuppression für die Methode wurde jeweils 1 ml von zehn Patientenseren mit 104,16 ng Bupropion und 800 ng Hydroxy-Bupropion versetzt. Alle Patientenseren wurden zuvor analysiert und waren frei von jeglichen Bupropion- oder Hydroxy-Bupropion-Spuren. Anschließend wurden die Proben mit der AEP-Methode aufbereitet und auf der LCMS vermessen.

*Tabelle 2: Der errechnete Gehalt in ng/ml an Bupropion und Hydroxybupropion der zehn Patientenproben, die mit den Analyten versetzt wurden und die prozentuale Abweichung vom theoretischen Gehaltswert.*

	<b>Bu- propion</b>	<b>Abweichung vom Zielwert (104,16 ng/ml) in %</b>	<b>Hydroxy- Bu- propion</b>	<b>Abweichung vom Zielwert (800 ng/ml) in %</b>
Patientenprobe 1	94,9	-9 %	725,3	-9 %
Patientenprobe 2	97,8	-6 %	694,2	-13 %
Patientenprobe 3	99,4	-5 %	715,8	-11 %
Patientenprobe 4	101,6	-2 %	746,2	-7 %
Patientenprobe 5	104,0	0 %	778,2	-3 %
Patientenprobe 6	101,3	-3 %	758,1	-5 %
Patientenprobe 7	181,4	74 %	648,3	-19 %
Patientenprobe 8	100,3	-4 %	701,7	-12 %
Patientenprobe 9	103,4	-1 %	751,7	-6 %
Patientenprobe 10	102,9	-1 %	792,3	-1 %
<b>Mittelwert</b>	108,7	4,0 %	731,2	-9,0 %
<b>Standardabweichung</b>	24,4	0,2 %	40,9	0,1 %

Für die Patientenseren ergab sich ein mittlerer Bupropion-Gehalt von  $108,7 \pm 24,4$  ng/ml und eine mittlere Abweichung vom Zielwert von  $4 \pm 0,2$  % (s. Tbl. 2). Die hohe Standardabweichung erklärt sich durch einen Ausreißer (Patientenprobe 7), der mit einem Bupropion-Gehalt von 181,4 ng/ml um 74 % vom Zielwert abweicht.

Für das Hydroxy-Bupropion ergab sich ein mittlerer Gehalt von  $731,2 \pm 40,9$  ng/ml und damit im Mittel eine Abweichung von  $-9 \pm 0,1$  % (s. Tbl. 2). Auch hier ist die Patientenprobe 7 auffällig, jedoch weichen die Patientenseren in ihrem Hydroxy-Bupropion nicht mehr als 20 % vom Zielwert ab und liegen damit in einem tolerierbaren Schwankungsbereich.

Bevor aufwendigere Maßnahmen ergriffen wurden, wurde zunächst durch ein erneutes Spiken (Zugabe von Analyten in die Probe) der Patientenprobe 7 kontrolliert, ob die Abweichung durch einen Pipettierfehler in der Vorbereitung zu erklären ist. Die Vermessung ergab einen Bupropion-Gehalt von 92,2 ng/ml und einen Hydroxy-Bupropion-Gehalt von 822,8 ng/ml. Da die Werte weniger als 20 % von ihren jeweiligen Zielwerten abwichen, waren keine weiteren Maßnahmen zur Unterdrückung der Ionensuppression erforderlich.

### 3.8 Linearität der Methode

Die Linearität ist für die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Methode von großer Bedeutung. Linearität bedeutet, dass es eine direkte proportionale Beziehung zwischen der Konzentration des Analyten im Serum und der gemessenen Signalintensität in Form der Peakhöhe oder -fläche gibt.

Diese Linearität kann durch die Anwendung verschiedener statistischer Methoden zur Datenauswertung modelliert werden:

#### 1. Passing-Bablok-Regression (Hilgers R.-D. & S. Stanzel, 2019, S. 2049)

Diese Methode bietet sich insbesondere bei einer unregelmäßigen Verteilung der Daten an. Sie ist Parameter-unabhängig und stützt sich zur Schätzung der Steigung der Regressionsgeraden auf die Berechnung des Medians der Steigungsdreiecke aller Messwertpaare. Somit geht diese Regression im Gegensatz zur klassischen linearen Regression nicht davon aus, dass die Daten einer perfekten Geraden folgen und erlaubt auch das Miteinbeziehen von nicht normalverteilten Daten sowie das Ausgleichen von Verzerrungseffekten durch Ausreißer. Auch zum Vergleich einer neu entwickelten Methode mit einer bereits bestehenden Referenzmethode eignet sich die Passing-Bablok-Regression. Dabei werden die Ergebnisse beider Methoden durch zwei Hypothesentests statistisch ausgewertet.

#### 2. Weighted-Deming-Regression (Cornbleet & N. Gochman, 1979)

Die Weighted-Deming-Regression erweitert die Passing-Bablok-Regression um die Berücksichtigung von Messfehlern und gewichtet diese entsprechend der Höhe ihrer Varianz.

#### 3. Bland-Altman-Plots (Mansournia et al., 2021)

In einem Bland-Altman-Plot werden die Abweichungen der gemessenen Werte und der Referenzwerte in Abhängigkeit von der mittleren Konzentration der Lösungen verglichen. Sind die Abweichungen linear verteilt, so liegt auch eine Linearität der Messmethode vor.

#### 4. Orthogonal-Regression (Lösler & Eschelbach, 2020)

Die Orthogonal-Regression wurde erstmals von dem deutschen Mathematiker Julius Weisbach zur Lösung eines geodätischen Problems eingeführt, um die beste Anpassung einer Ebene zu einer Gruppe von Punkten zu finden. Dieses Prinzip der Minimierung der quadratischen Abstände der Punkte zu einer Ebene lässt sich auch auf eine Linearitätsprüfung anwenden. Dabei tritt die Regressionsgerade an die Stelle der Ebene. Der Unterschied zur „klassischen“ linearen Regression besteht darin, dass auch die Abweichung der x-Werte von der Geraden minimiert wird.

## 5. „Klassische“ Lineare Regression

Die verwendete TraceFinder Software benutzt zur Beurteilung des Zusammenhangs der gemessenen Signalintensität und der Konzentration die Methode der kleinsten Quadrate. Dabei wird die Summe der quadratischen Abweichungen der Messdatenpunkte von der Regressionsgeraden minimiert. Die Software geht dabei von normalverteilten Daten und einem homoskedastischen Fehlerterm, d. h. einer konstanten Varianz des Fehlers, aus.

Ob nun tatsächlich ein linearer Zusammenhang besteht, lässt sich anhand verschiedener Faktoren überprüfen. Die TraceFinder Software gibt für jede modellierte Gerade automatisch den Korrelationskoeffizienten  $R$  an (s. 2.2.5). Je näher der Wert des Koeffizienten bei 1 liegt, desto wahrscheinlicher ist ein linearer Zusammenhang.

Auch die Prüfung der Residuen, also der Abweichungen der gemessenen Werte von der Regressionsgeraden, auf ein systematisches Muster erlaubt eine Beurteilung der Linearität. Eine zufällige Verteilung der Residuen deutet auf eine lineare Beziehung zwischen den x- und y-Werten hin.

Besteht hinsichtlich der Linearität immer noch Unsicherheit, kann ein Modellvergleich durchgeführt werden. Schneidet ein nicht linearer Modellierungsversuch nicht signifikant besser ab als ein linearer, so ist von einem linearen Zusammenhang auszugehen.

### 3.8.1 5-Punkt-Kalibration

Zur Überprüfung der Linearität der neuen Methode wurde eine Kalibration mit fünf verschiedenen Konzentrationsstufen vermessen, die den therapeutischen Bereich der Analyten abdecken (vgl. Tbl. 3). Jeder Kalibrierungspunkt enthielt dabei sowohl Bupropion als auch Hydroxy-Bupropion. Durch die Verwendung von fünf Kalibrierungspunkten wird eine bessere Beurteilung der Linearität erreicht als bei drei Kalibrierpunkten, da die Kalibrierkurve besser definiert und ausführlicher charakterisiert werden kann. Ist die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Methode erst einmal bestätigt, reichen für den Laboralltag drei Kalibrierungspunkte aus. Dadurch wird auch weniger Messzeit benötigt, womit eine höhere Wirtschaftlichkeit erreicht wird, da mehr Patientenproben vermessen werden können.

Tabelle 3: Die Konzentrationen der Kalibrationslösungen K1-K5 in ng/ml für die 5-Punktkalibration.

Analyt	K1	K2	K3	K4	K5
Bupropion	10,42	52,08	104,16	260,4	520,8
Hydroxy-Bupropion	200,0	800,0	1000,0	1500,0	1500,0

Alle Konzentrationsstufen wurden fünfmal an zwei verschiedenen Tagen aufbereitet und vermessen, um nicht nur statistisch relevante Daten zu erhalten, sondern auch mögliche Schwankungen der Fließmittel und des Detektors auszugleichen. Insgesamt wurden

somit 50 Proben vermessen und ausgewertet. Zusätzlich zu diesen Proben wurden an beiden Tagen jeweils zwei externe Kontrollen mit je jeweils Konzentrationsstufen vermessen, um gewährleisten zu können, dass die Maschine nicht nur präzise, sondern auch präzise richtig misst. Die durch die LCMS gemessenen Daten wurden von der TraceFinder Software automatisch ausgewertet und zu einer Regressionsgeraden modelliert. Je nach Ergebnis der Daten wurde die Gerade durch den Nullpunkt gezwungen oder die automatisch ermittelte Gerade beibehalten. Diese Entscheidung hing insbesondere von der Frage ab, ob dadurch die Abweichungen der externen Kontrollen von den Zielwerten verringert werden konnten oder dies zu einer Verbesserung des Korrelationskoeffizienten  $R$  führte. Für alle im Verlauf der beiden Messtage vermessenen externen Kontrollen ergaben sich mit im Durchschnitt  $6 \pm 6 \%$  Abweichungen, die deutlich unter dem Zielwert von 25 % liegen (s. Tbl. 4), was die Richtigkeit der gemessenen Daten bestätigt.

Tabelle 4: Die Ergebnisse der Vermessungen der externen Kontrollen im Verlauf der Linearitätsbestimmung, sowie ihre prozentuale Abweichung vom Sollwert; alle Angaben in ng/ml.

Analyt	Kontrolle 1			Kontrolle 2		
	Sollwert	Istwert	Abweichung in %	Sollwert	Istwert	Abweichung in %
Bu-propion	41,9	44,6	6,4	318,0	355,2	11,7
	41,9	43,5	3,8	318,0	352,8	10,9
	41,9	49,7	18,6	318,0	316,5	- 0,5
	41,9	47,3	12,9	318,0	335,7	5,6
Hydroxy-Bu-propion	238,0	236,7	- 0,5	1903,0	2069,2	8,7
	238,0	229,3	- 3,7	1903,0	2096,5	10,2
	238,0	252,5	6,1	1903,0	1893,0	- 0,5
	238,0	246,3	3,5	1903,0	1961,3	3,1

Die Vermessung der ersten 25 Proben ergab die in Tabelle 5 für Bupropion und in Tabelle 6 für Hydroxy-Bupropion aufgeführten Messwerte.

Tabelle 5: Die Ergebnisse der Vermessung der ersten 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Bupropion und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml.

Bupropion	K1 (10,42)	K2 (52,08)	K3 (104,2)	K4 (260,4)	K5 (520,8)
	11,2	49,9	104,2	251,9	508,6
	10,2	49,1	105,8	231,6	529,3
	13,6	51,2	103,4	239,4	426,6
	11,2	50,6	120,1	256,7	537,2
	11,1	49,8	115,6	284,5	616,4
<b>Mittelwert</b>	11,5	50,1	109,8	252,8	523,6
<b>Standardabweichung</b>	1,1	0,7	6,8	18,2	60,8
<b>Ø prozentuale Abweichung</b>	11,0%	4,0%	6,0%	7,0%	9,0%
<b>RSD</b>	10,0%	1,0%	6%	4,0%	8,0%

Aus diesen Daten ergab sich für Bupropion eine Regressionsgerade mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,98$  (s. Abb. 8).

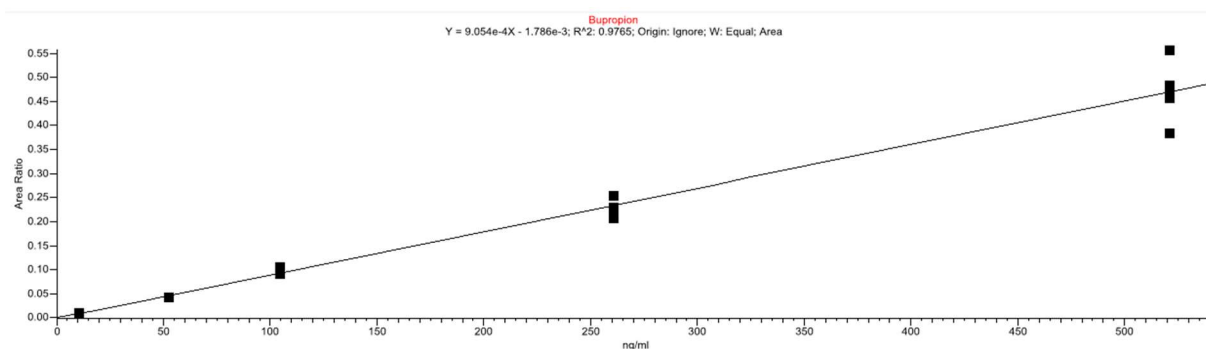


Abbildung 8: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Fluperlapin als internen Standard. Hier und in den folgenden Abbildungen ist der Beschriftung oberhalb des Diagramms die Formel der Geraden und der Korrelationskoeffizient zu entnehmen, sowie ob die Gerade durch den Ursprung gezwungen (Origin: Force) wurde oder nicht (Origin: Ignore).

Tabelle 6: Die Ergebnisse der Vermessung der ersten 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml.

Hydroxy-Bu-propion	K1 (200)	K2 (800)	K3 (1000)	K4 (1250)	K5 (1500)
	209,7	751,3	900,9	1352,7	1470,7
	204,5	703,8	985,2	1220,2	1448,0
	271,7	769,1	963,9	1186,5	1217,1
	212,5	793,8	1114	1330,7	1534,2
	213,7	709,0	988,4	1437,0	1761,6
<b>Mittelwert</b>	222,4	745,4	990,5	1305,4	1486,3
<b>Standardabweichung</b>	24,8	34,6	69,3	91,2	174,5
<b>Ø prozentuale Abweichung</b>	11,0%	7,0%	6,0%	7,0%	9,0%
<b>RSD</b>	12,0%	4,0%	4,0%	4,0%	8,0%

Für das Hydroxy-Bupropion ergab sich eine Regressionsgerade mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,95$  (s. Abb. 9).

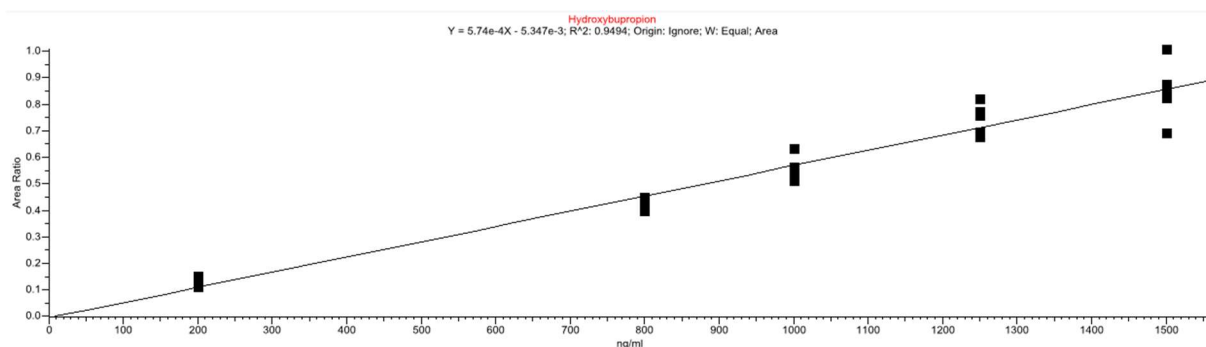


Abbildung 9: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Fluperlapin als internen Standard.

Obwohl der Korrelationskoeffizient der beiden Regressionsgeraden für Bupropion und Hydroxy-Bupropion bereits eine Linearität bestätigt, ist die Streuung der jeweiligen Messpunkte, insbesondere für die höheren Konzentrationen K4 und K5 sowie für die K1, noch sehr hoch (vgl. Tbl. 5 und 6). Daher wurde überprüft, ob ein Wechsel des internen Standards von Fluperlapin zu Bromperidol zu besseren Ergebnissen führt.

Für die gleichen 25 Proben, die bereits mit Fluperlapin als internem Standard ausgewertet wurden, ergab sich für Bupropion mit Bromperidol als internem Standard ein Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden von  $R = 0,998$  (s. Abb. 10) und damit eine nahezu perfekte Linearität für den gemessenen Konzentrationsbereich. Auch für die Gerade von Hydroxy-Bupropion konnte durch den Wechsel des internen Standards eine Verbesserung mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,989$  (s. Abb. 11) erzielt werden.

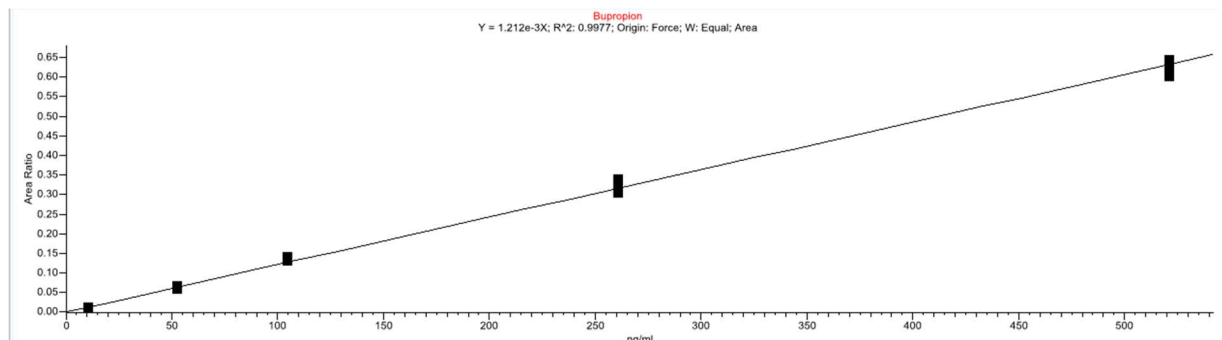


Abbildung 10: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.

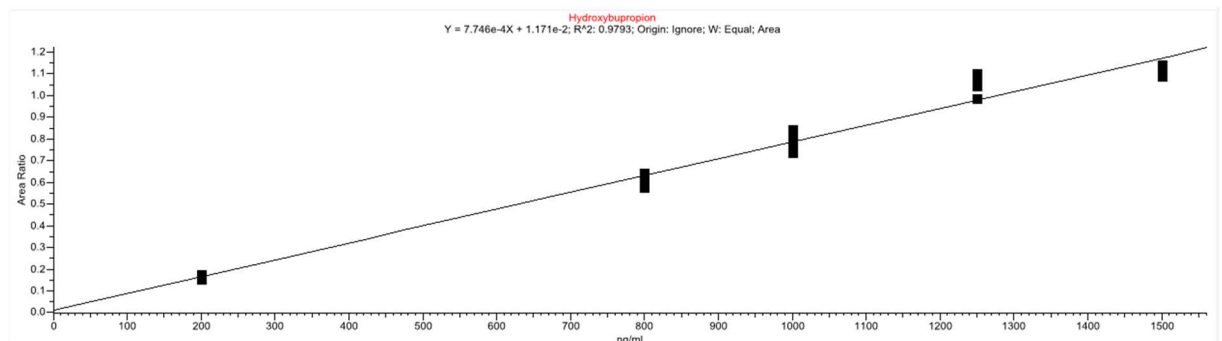


Abbildung 11: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die ersten 25 Proben 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.

Dabei wurde die mittlere prozentuale Abweichung für K5 von  $9\% \pm 8\%$  auf  $3\% \pm 3\%$  für Bupropion und von  $9\% \pm 8\%$  auf  $5\% \pm 2\%$  für Hydroxybupropion verbessert. Auch für die anderen Kalibrationspunkte konnten die Abweichungen verringert bzw. beibehalten werden (vgl. Tbl. 5, 6 und 7).

Tabelle 7: Die Ergebnisse der Vermessung der übrigen 25 Proben für die 5-Punktkalibration von Bupropion (oben) und Hydroxy-Bupropion (unten) und die sich daraus ergebenden statistischen Daten und Abweichungen; alle Angaben in ng/ml.

<b>Bupropion</b>	<b>K1 (10,42)</b>	<b>K2 (52,08)</b>	<b>K3 (104,2)</b>	<b>K4 (260,4)</b>	<b>K5 (520,8)</b>
	9,3	51,1	113,5	252,4	516,1
	9,0	57,0	108,9	272,2	532,0
	9,5	50,0	110,5	281,8	515,8
	10,6	50,0	117,4	268,0	496,6
	9,3	51,4	111,6	254,6	521,9
	7,7	47,1	106,0	245,1	479,2
	8,6	46,6	93,9	249,2	566,8
	8,2	44,2	104,8	271,2	534,6
	9,3	47,1	108,1	259,9	504,3
	9,3	48,7	109,9	256,2	531,9
<b>Mittelwert</b>	9,1	49,3	108,5	261,1	519,9
<b>Standardabweichung</b>	0,8	3,3	5,9	11,2	22,8
<b>Ø prozentuale Abweichung</b>	13,0%	7,0%	6,0%	4,0%	3,0%
<b>RSD</b>	7,0%	4,0%	4,0%	2,0%	3,0%
<b>Hydroxy-Bupropion</b>	<b>K1 (200)</b>	<b>K2 (800)</b>	<b>K3 (1000)</b>	<b>K4 (1250)</b>	<b>K5 (1500)</b>
	183,5	770,5	966,2	1330,1	1461,7
	196,4	818,2	1000,4	1409,0	1424,9
	199,2	751,7	1016,1	1370,9	1440,3
	214,7	785,2	1073,6	1364,3	1388,5
	191,5	732,1	938,2	1260,9	1461,4
	187,9	727,3	956,2	1274,2	1385,3
	200,6	708,5	891,1	1353,1	1581,7
	196,5	738,6	990,8	1441,6	1434,0
	219,8	769,8	980,0	1348,4	1404,9
	206,8	784,5	983,9	1343,9	1543,4
<b>Mittelwert</b>	199,7	758,6	979,7	1349,6	1452,6
<b>Standardabweichung</b>	10,8	31,4	45,9	51,6	61,0
<b>Ø prozentuale Abweichung</b>	4,0%	6,0%	4,0%	8,0%	5,0%
<b>RSD</b>	3,0%	3,0%	3,0%	4,0%	2,0%

Für die übrigen 25 Proben des zweiten Messtags wurde aufgrund der zuvor überzeugenden Ergebnisse nur noch Bromperidol als interner Standard für die Auswertung verwendet. Für die zweite Regressionsgerade ergab sich für Bupropion ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0,99$  (s. Abb. 12), sowie für Hydroxy-Bupropion von  $R = 0,97$  (s. Abb. 13).



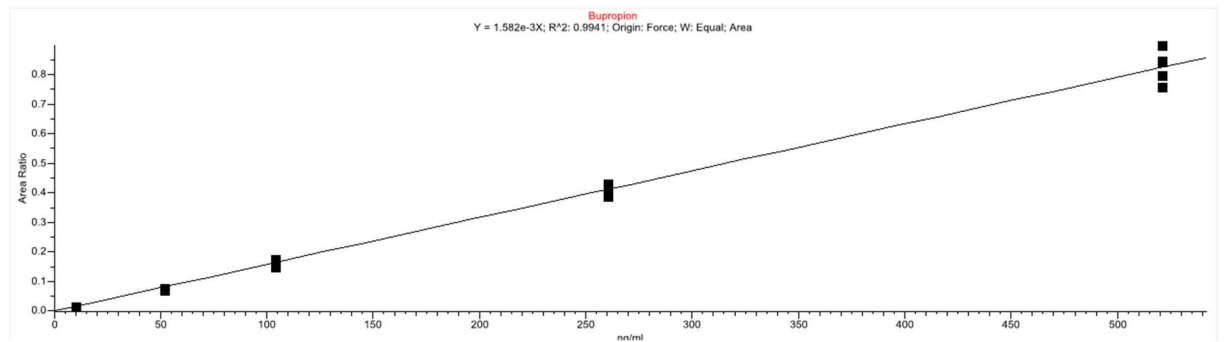


Abbildung 12: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die übrigen 25 Proben der 5-Punktkalibration von Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.

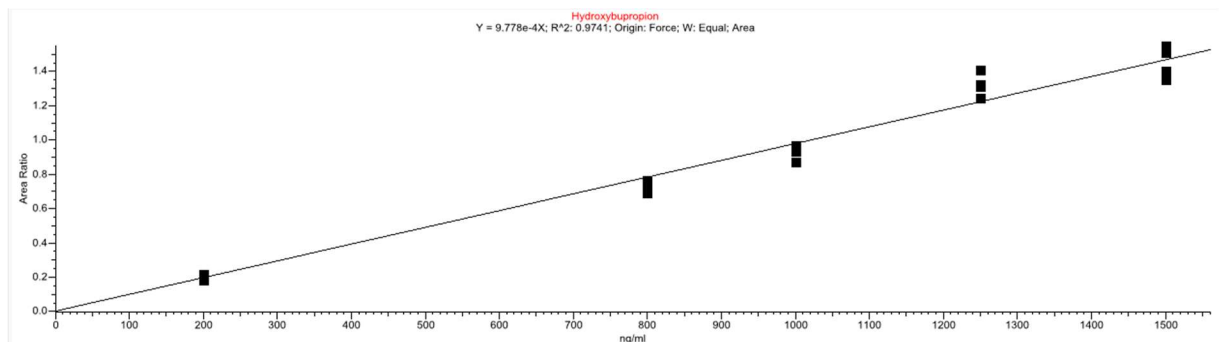


Abbildung 13: Die von der TraceFinder Software angenäherte Regressionsgerade für die übrigen 25 Proben der 5-Punktkalibration von Hydroxy-Bupropion mit Bromperidol als internen Standard.

Somit konnte durch die Auswertung aller 5-Punkt-Kalibrationen und der dazugehörigen Daten der 50 Proben die Linearität für den gesamten therapeutischen Bereich von Bupropion und Hydroxy-Bupropion für die Vermessung mit der LCMS bestätigt werden.

### 3.9 In-Day-Variation

Die Überprüfung der In-Day-Variation ist ein wichtiger Schritt in der Methodenentwicklung im TDM, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der durchgeführten Messungen gewährleisten zu können. Dabei handelt es sich um Messschwankungen, die durch Veränderungen von Faktoren wie dem Fließmittel oder dem Laborpersonal, aber auch dem Detektor oder von Matrixeffekten, im Verlauf eines Tages auftreten können. Bewegen sich diese Schwankungen in einem Toleranzbereich von unter 25 % (Laborinterne Grenze), ist eine weitere Anpassung der Methode nicht erforderlich.

Um die In-Day-Variation zu überprüfen, wird die Analyse von Wiederholungsproben gleicher Konzentration an einem einzigen Tag durchgeführt. Idealerweise werden dabei verschiedene Chargen im Verlauf eines Tages analysiert, um die Bedingungen eines typischen Laborarbeitstages realistisch nachstellen zu können. Zur Bewertung der Ergebnisse können statistische Werte wie die Standardabweichung oder der Variationskoeffizient herangezogen werden.

Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurden für die Überprüfung der In-Day-Variation keine separaten Proben aufbereitet und vermessen, sondern die für die 5-Punkt-Kalibrationsgeraden der Linearitätsprüfung hergestellten Proben unter dem Gesichtspunkt der In-Day-Variation erneut ausgewertet.

*Tabelle 8: Die In-Day-Variation für die K1- und K2- Lösung für Bupropion und Hydroxy-Bupropion in ng/ml und die statistische Auswertung der Daten.*

	Bupropion		Hydroxy-Bupropion	
	K1 (10,42)	K2 (52,08)	K1 (200)	K2 (800)
	9,3	51,1	183,5	770,5
	9,0	57,0	196,4	818,2
	9,5	50,0	199,2	751,7
	10,6	50,0	214,7	785,2
	9,3	51,4	191,5	732,1
	7,7	47,1	187,9	727,3
	8,6	46,6	200,6	708,5
	8,2	44,2	196,5	738,6
	9,3	47,1	219,8	769,8
	9,3	48,7	206,8	784,5
<b>Mittelwert</b>	9,1	49,3	199,7	758,6
<b>Standardabweichung</b>	0,8	3,3	10,8	31,4
<b>Variationskoeffizient</b>	8,2	6,8	5,4	4,1

Beispielhaft wurden in Tabelle 8 die Ergebnisse des Kalibrationspunktes 1 und 2 für Bupropion und Hydroxy-Bupropion dargestellt und die bereits vorhandene Auswertung des Mittelwerts und der Standardabweichung aus der Linearitätsprüfung um den Variationskoeffizienten ergänzt.

Der Variationskoeffizient lag dabei für alle Messwerte unter 10 %, was für eine geringe In-Day-Variation spricht und die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Methode bestätigt. Auch der Mittelwert liegt für Hydroxy-Bupropion nahe am Sollwert. Eine etwas höhere Abweichung zeigt der Mittelwert der K1 von Bupropion. Allerdings liegt auch diese Abweichung mit 13 % auch noch in einem akzeptablen Bereich.

### 3.10 Day-to-Day-Variation

Um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit einer Methode zu bestätigen, muss auch die Variation zwischen verschiedenen Tagen überprüft werden (Kromidas, 2000, S. 50).

Dazu wurden elf Lösungen mit bekannter Konzentration (52,080 ng/ml Bupropion; 800 ng/ml Hydroxy-Bupropion) als unbekannte Probe mit einer 3-Punkt-Kalibration und zwei externen Kontrollen an elf Tagen vermessen.

Die in Tabelle 9 aufgeführten Messwerte wurden bereits um die Abweichung der externen Kontrollen korrigiert (s. Anhang 11) und statistisch ausgewertet.

Tabelle 9: Die Day-to-Day-Variation der verwendeten Präzisionslösung (P1) für Bupropion und Hydroxy-Bupropion in ng/ml und die statistische Auswertung der Daten.

Datum der Messung	Bupropion	Hydroxy-Bupropion
07.11.2022	46,848	682,670
12.12.2022	46,880	643,700
13.12.2022	38,320	677,594
14.12.2022	42,770	726,724
15.12.2022	49,772	696,465
16.12.2022	45,720	711,568
19.12.2022	51,641	754,268
20.12.2022	45,846	749,576
21.12.2022	39,042	655,695
22.12.2022	39,900	647,220
23.12.2022	47,058	763,140
<b>Sollwert</b>	52,080	800,000
<b>Mittelwert</b>	44,891	700,784
<b>Standardabweichung</b>	4,159	41,521
<b>Variationskoeffizient</b>	9,265	5,925
<b>Ø Abweichung vom Sollwert in %</b>	- 17,048	- 14,558

Für Bupropion ergab sich dabei ein Mittelwert von  $52,080 \pm 5,159$  ng/ml und damit eine Abweichung von etwa  $- 14,0 \%$  vom Sollwert. Im Durchschnitt wichen dabei die einzelnen Messungen um  $- 17,0 \%$  vom Sollwert ab. Drei Messwerte wichen dabei sogar um mehr als  $25 \%$  ab. Trotzdem ergab sich ein Variationskoeffizient von  $9,265$  (s. Tbl. 9) und damit insgesamt ein gutes Ergebnis.

Die Messergebnisse für das Hydroxy-Bupropion weisen eine höhere Stabilität auf als die der Bupropion-Messungen. Der Mittelwert von  $700,784 \pm 41,521$  ng/ml lag zwar ebenfalls mit etwa  $- 12,5 \%$  in einem ähnlichen Abweichungsbereich vom Sollwert wie Bupropion, allerdings wichen die einzelnen Messungen im Durchschnitt mit  $- 14,6 \%$  weniger vom Sollwert ab und auch der Variationskoeffizient ist mit  $5,925$  besser (s. Tbl. 9). Dies deutet auf eine bessere Stabilität und Zuverlässigkeit der Methode bei der Vermessung von Hydroxy-Bupropion hin.

Im Vergleich zur In-Day-Variation ist der Variationskoeffizient für Bupropion von  $6,8$  (s. Tbl. 8) auf  $9,265$  (s. Tbl. 9) und für Hydroxy-Bupropion von  $4,1$  (s. Tbl. 8) auf  $5,925$  (s. Tbl. 9) angestiegen.

### 3.11 Stabilitätstests

Die AGNP weist auf eine geringe Stabilität von Bupropion bei Raumtemperatur hin (Hefner et al., 2018, S. 115)(2018, S. 115). Da die im Rahmen des therapeutischen Drug Monitorings eintreffenden Blutproben längere Transportwege haben, bevor sie im Labor eintreffen, ist es wichtig zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Analyten unter den Transportbedingungen auch stabil sind. Ist dies nicht der Fall, können trotz der Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Methode falsche Messergebnisse an die Kliniken zurückgeschickt werden. Der behandelnde Arzt könnte dann durch eine ungerechtfertigte Anpassung der Therapie eine Intoxikation des Patienten verursachen, für welche das Labor verantwortlich wäre. Für die Stabilitätstests war es dabei wichtig, dass die Proben während ihrer Lagerung als Serum vorliegen und erst nach Ablauf des zu untersuchenden Zeitrahmens aufbereitet wurden. Da die Proteinfällung in der AEP-Methode aufgrund der Verringerung von Matrixeffekten zu einer Stabilisierung des Analyten führen würde (Kerns & Di, 2008, S. 337), hätte dies eine Verfälschung der Messdaten zur Folge, da dies nicht den Bedingungen während des Transports der Proben zum Labor entspricht. Daher wurden alle Proben immer erst unmittelbar vor ihrer Messung aufbereitet.

Für die Untersuchung der Stabilität wurden die Proben unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert. Die ersten untersuchten Proben, wurden bei Raumtemperatur (22 °C) für 2, 4 und 6 Stunden gelagert. Die untersuchten Zeiträume richteten sich dabei nach der Transportdauer, die die Proben auf ihrem Weg von den Kliniken zum Labor benötigen. Die Blutabnahme in den Kliniken erfolgt in der Regel um 8 Uhr morgens für die Tal Spiegeluntersuchung. Die Proben werden an einem normalen Tag spätestens um 14 Uhr aufbereitet, sodass eine Untersuchung der Stabilität über einen Zeitraum von 6 Stunden sinnvoll ist. Da die Blutproben bisher immer in einfachen Versandröhrchen ohne externe Kühlung versandt werden, war es wichtig zu wissen, ob dies auch für Bupropion funktioniert oder ob es bereits während des Transports zu einem Abbau kommt.

Für die Stabilitätstests bei Raumtemperatur wurden 8 Patientenproben, die Bupropion enthielten, jeweils 8-mal in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für die spätere Aufbereitung mit der AEP-Methode vorgelegt. Unmittelbar danach wurden die ersten 2 Proben aller 8 Patienten aufbereitet und vermessen, um den Gehalt zum Zeitpunkt  $t_0$  zu ermitteln, der den Ausgangspunkt für einen möglichen Abbau bildet. Weitere 2 Proben von allen 8 Patienten wurden nach 2, 4 und 6 Stunden aufbereitet und vermessen, wobei die Proben während der gesamten Untersuchungszeit bei Raumtemperatur und unter Tageslichteinfluss gelagert wurden.

Die Ergebnisse der Vermessungen wurden wie üblich mit den Abweichungen der externen Kontrollen verrechnet und die Werte mit Excel als Datenwolke visualisiert. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Mittelwert der beiden Messungen zum Zeitpunkt  $t_x$  dar. Eine lineare Ausgleichsgerade veranschaulicht dabei den möglichen Abbau bzw. die Stabilität über die Zeit. Die Fehlerindikatoren der gemessenen Konzentration sind dabei so klein, dass sie von den Datenpunkten verdeckt werden (s. Abb. 14).

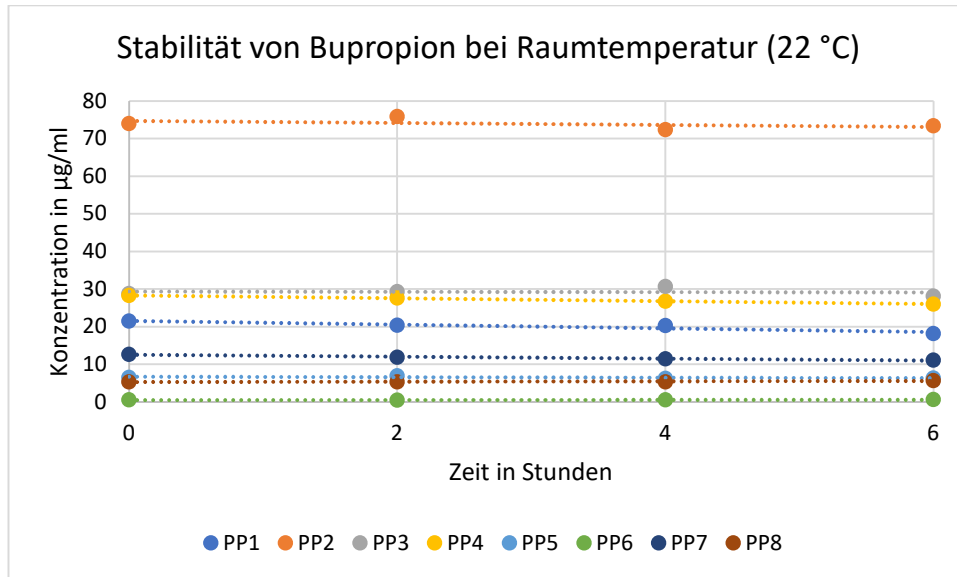


Abbildung 14: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Bupropion bei Raumtemperatur mit Ausgleichsgerade für alle acht Patientenproben.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Messungen ergab, dass bei keiner der 8 Proben ein relevanter Abbau stattgefunden hat (s. Abb. 14). Im Durchschnitt wichen dabei die Proben nach 6-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur um  $-3 \pm 9 \%$  ab. Da die Abweichung aller Messpunkte vom Gehalt zum Zeitpunkt  $t_0$  sich im Bereich der üblichen Messschwankungen bewegt, kann davon ausgegangen werden, dass Bupropion bei Raumtemperatur für mindestens 6 Stunden im Serum stabil ist.

Da alle im Labor eingehenden Blutproben für mögliche Nachmessungen für 48 Stunden im Kühlschrank gelagert werden, musste in einer weiteren Testreihe überprüft werden, ob Bupropion unter den Temperaturbedingungen im Kühlschrank ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) für diesen Zeitraum stabil ist.

Dabei wurden 4 Patientenproben ebenfalls in einer Doppelbestimmung nach 0, 24 und 48 Stunden auf ihren Gehalt untersucht. Auch bei dieser Testreihe wurden die gleichen Vorbereitungsschritte unternommen wie bei der Raumtemperatur-Testreihe und die Proben erst unmittelbar vor ihrer Vermessung mit der AEP-Methode aufbereitet.

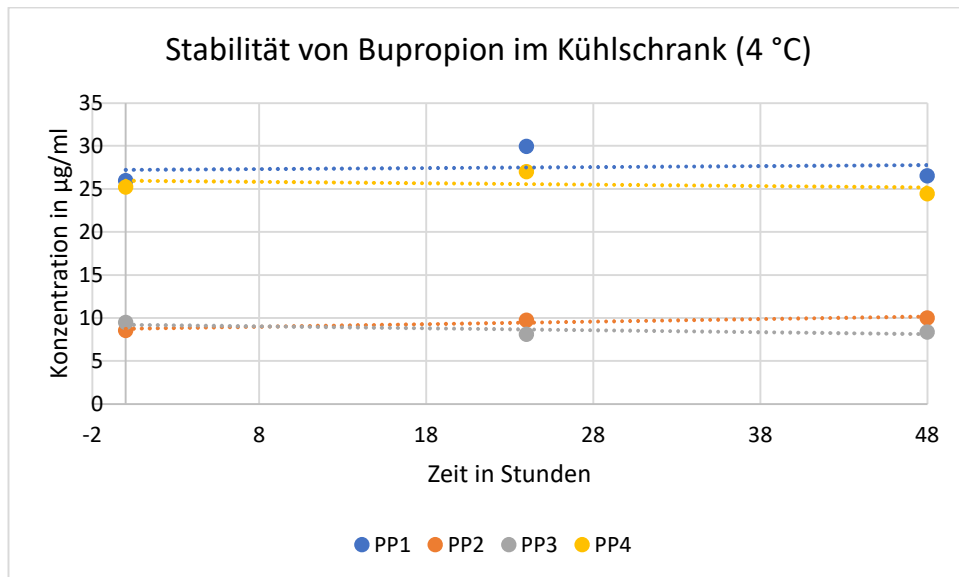


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Bupropion im Kühlschrank mit Ausgleichsgerade für alle vier Patientenproben.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bupropion auch für einen längeren Zeitraum (48 h) im Kühlschrank stabil ist (s. Abb. 15). So wichen die Gehaltswerte nach 48 Stunden um im Durchschnitt  $8,5 \pm 6,3$  % vom Gehalt zum Zeitpunkt  $t_0$  ab. Für die Patientenprobe 2 ergab sich sogar ein Anstieg des Bupropion-Gehalts um 17 % im Verlauf der 48 Stunden. Alle Abweichungen bewegen sich innerhalb der üblichen Messschwankungen und belegen die Stabilität von Bupropions bei Kühlschranktemperaturen für den untersuchten Zeitraum.

Aufgrund der therapeutischen Relevanz des Hydroxy-Bupropions ist es sinnvoll zu überprüfen, ob die Anlagerung der Hydroxy-Gruppe durch die Veränderung der Polarität des Moleküls einen Einfluss auf die Stabilität besitzt.

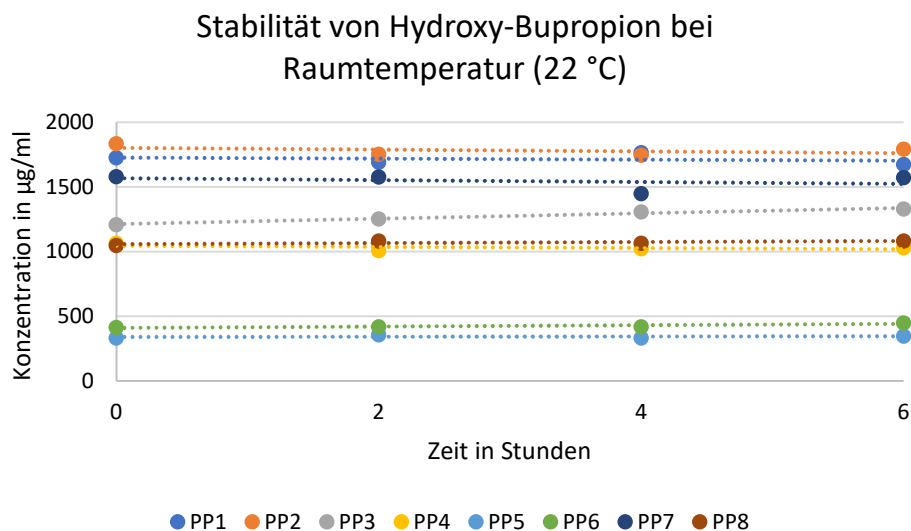


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Hydroxy-Bupropion bei Raumtemperatur mit Ausgleichsgerade für alle acht Patientenproben.

Eine solche veränderte Stabilität des Hydroxy-Bupropion konnte für die Lagerung bei Raumtemperatur jedoch nicht beobachtet werden (s. Abb. 16). So wichen die Gehalts- werte nach 6 Stunden nur um  $2 \pm 5 \%$  voneinander ab und liegen damit ebenfalls inner- halb der üblichen Messschwankungen.

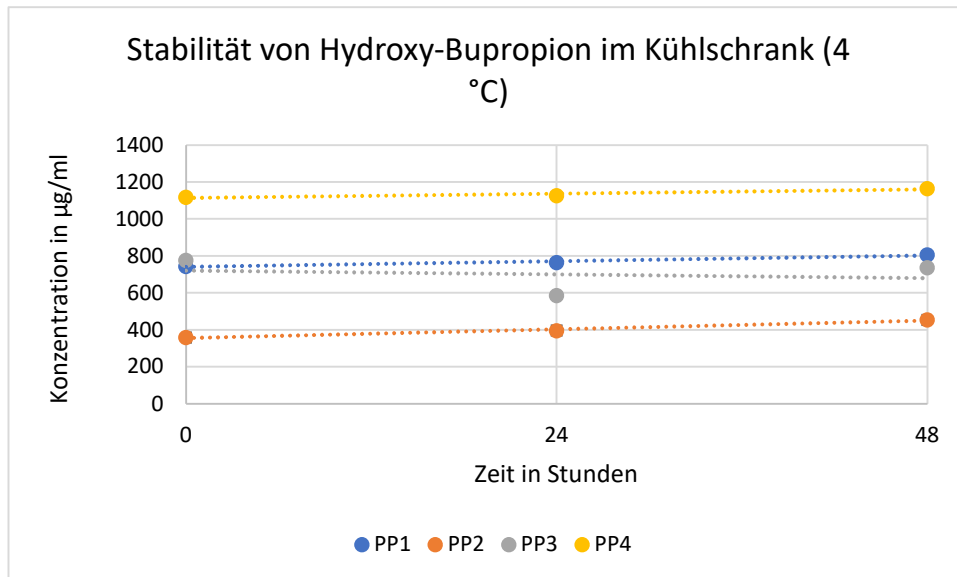


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Messergebnisse der Stabilitätstests von Hydroxy-Bupropion im Kühlschrank mit Ausgleichsgerade für alle vier Patientenproben.

Auch bei der Untersuchung auf die Stabilität von Hydroxy-Bupropion im Kühlschrank ist kein Abbau erkennbar (s. Abb. 17). Im Mittel weicht der Hydroxy-Bupropion-Gehalt dabei um  $8 \pm 12 \%$  ab und liegt damit ebenfalls im tolerierbaren Schwankungsbereich. Eine etwas stärkere Abweichung ist bei der Patientenprobe 3 nach 24 Stunden aufgetreten. Der Gehalt wich dabei um  $-25 \%$  vom Ausgangsgehalt ab, nach 48 Stunden entsprach der Gehalt allerdings wieder annähernd dem  $t_0$ -Gehalt, weshalb auch hier von keinem Abbau ausgegangen werden kann.

Die Untersuchungen konnten somit zeigen, dass sowohl für Bupropion als auch für Hydroxy-Bupropion kein signifikanter Gehalts-Abbau für den untersuchten Zeitraum messbar ist. Da sich diese Stabilitätsuntersuchungen stark an den Bedingungen orientieren, unter denen im Labor gearbeitet wird (Transportdauer von Klinik zum Labor, Aufbewahrung für Nachuntersuchungen im Kühlschrank, etc.), wäre es hier unwirtschaftlich gewesen den Zeitraum der Untersuchungen zu erweitern, um herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt ein messbarer Abbau von Bupropion oder Hydroxy-Bupropion im Serum bei Raumtemperatur oder Kühlschranktemperatur stattfindet.

### 3.12 Vergleich mit externem Labor

Da die Methode bis hierhin zuverlässige Ergebnisse lieferte, wurden für die weitere Validierung echte Patientenserumproben untersucht. Die Patienten befanden sich alle in einer laufenden Bupropion-Therapie, sodass ihre Serumproben auch den Analyten und seinen aktiven Metaboliten Hydroxy-Bupropion enthielten. Dieser Validierungsschritt ist wichtig, um zu überprüfen, ob es noch unbekannte Störfaktoren gibt. Damit sind insbesondere Wechselwirkungen zwischen weiteren Blutbestandteilen, wie anderen Arzneistoffen und deren Metaboliten oder körpereigene Substanzen, und dem Analyten gemeint. Als Messdaten wurden die für die Stabilitätstests untersuchten Patientenproben verwendet, da diese die geforderten Kriterien erfüllen und wertvolle Messzeit gespart wird. Da bis zur Freigabe der entwickelten Methode für die Routine alle Bupropion Anforderungen der Kliniken an ein externes Labor ausgelagert wurden, konnten die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen für Bupropion und Hydroxy-Bupropion aus den Stabilitätstests mit den Ergebnissen des externen Labors verglichen werden, um so eine weitere Validierung der Zuverlässigkeit und Richtigkeit der Methode durchzuführen.

Für die Stabilitätstests wurden insgesamt 12 unterschiedliche Patientenserumproben vermessen (8 für die Raumtemperatur- und 4 für die Kühlschranktemperatur-Untersuchung). Die Ergebnisse des externen Labors für diese Patienten wurden aus den jeweiligen Befunden ermittelt. Der Gesamtgehalt, der für die behandelnden Ärzte der Kliniken im System eingetragen wird, ergibt sich aus der Summe des Bupropion- und Hydroxy-Bupropion-Gehalts. Da der Bupropion-Gehalt (10 – 100 ng/ml) im Serum in der Regel im Vergleich zum Hydroxy-Bupropion (850 – 1500 ng/ml) gering ist, entspricht der Gesamtgehalt also annähernd dem Gehalt des Metaboliten, während der Gehalt an Bupropion selbst für die Angabe der Serumkonzentration von nachrangiger Bedeutung ist. Dennoch ergibt sich hier die Möglichkeit nicht nur den Gesamtgehalt mit dem externen Labor zu vergleichen, sondern auch von Bupropion als Einzelwert.

Die Abweichung wurde dabei mit folgender Formel berechnet:

$$\text{prozentuale Abweichung} = \frac{\text{Wert internes Labor} - \text{Wert externes Labor}}{\text{Wert externes Labor}} \cdot 100 \%$$

Da es sowohl zu positiven als auch zu negativen Abweichungen kommen kann, wurde für die Ermittlung der Mittelwerte, Standardabweichungen und des Medians die Beträge der Abweichung verwendet. Da während der Stabilitätsmessungen für Bupropion und Hydroxy-Bupropion keine Gehaltsabnahme auftrat (s. 3.11), wurde der Mittelwert aller Messungen einer Patientenprobe verwendet, um möglichst zuverlässige Ergebnisse für den internen Laborwert zu erhalten.

Für den Gesamtgehalt ergab sich dabei eine mittlere Abweichung von  $38,1 \pm 32,8 \%$ . Da es insbesondere bei der Patientenprobe 1 und 2 zu extremen Abweichungen



gekommen ist (s. Abb. 18), ist das Miteinbeziehen des Medians sinnvoll, um die Auswirkung dieser Extremwerte auf den Durchschnitt geringer zu gewichten. Dieser liegt mit einem Wert von 28,3 % immer noch in einem hohen Bereich. Dennoch konnten für viele Patientenproben auch sehr gute Werte erzielt werden, welche weniger als 20 % Abweichung zum externen Labor aufwiesen.

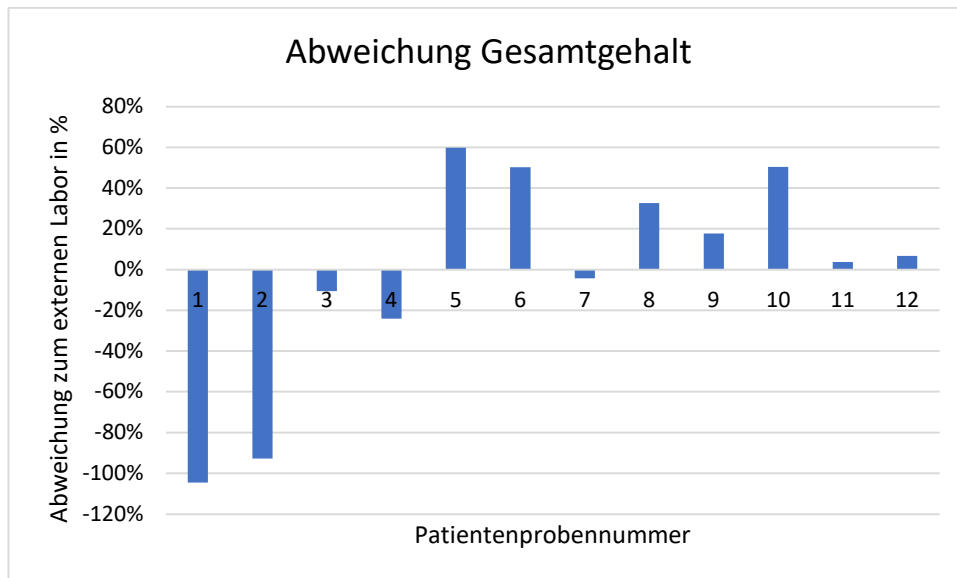


Abbildung 18: Säulendiagramm der prozentualen Abweichung der internen Messwerte für den Gesamtgehalt an Bupropion und Hydroxy-Bupropion der Patientenproben 1 bis 12 zum externen Labor.

Für den Bupropion-Gehalt ergab sich eine mittlere prozentuale Abweichung der eigenen Werte zum externen Labor von  $38,8 \pm 31,9$  %. Da es auch hier zu einzelnen Extremwerten (s. Abb. 19) kam, ist der Median als Maß für den Durchschnittswert der Abweichung aussagekräftiger. Dieser lag bei 32,5 % und entsprach damit ebenso wie die Abweichung des Gesamtgehaltes nicht den Anforderungen einer maximalen Abweichung von 25 %. Für die Patientenprobe 6 und 8 ergab sich eine Abweichung von 0 % (s. Abb. 19). Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Befund des externen Labors für diese Patientenproben lediglich ein Gehaltswert von  $< 10$  ng/ml angegeben wurde, da der Wert unterhalb der therapeutischen Breite von 10 – 100 ng/ml liegt. Dies deckt sich mit dem ermittelten Bupropion-Gehalt durch die eigenen Messungen, womit sich eine Abweichung von 0 % ergibt.

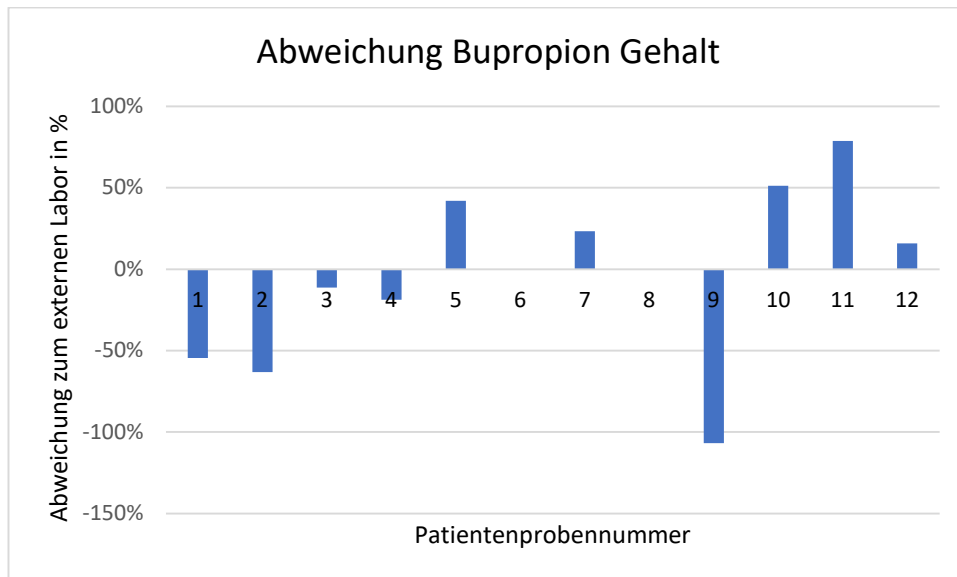


Abbildung 19: Säulendiagramm der prozentualen Abweichung der internen Messwerte für den Gehalt an Bupropion der Patientenproben 1 bis 12 zum externen Labor.

Insgesamt liegen die ermittelten Abweichungen der eigenen Messwerte zu denen des externen Labors in einem zu hohen Bereich. Da allerdings die Präzision und Richtigkeit der Methode bisher bestätigt wurde und auch eine geringe Varianz in der Day-to-Day- und In-Day-Variation aufgetreten ist, lassen sich die Abweichungen nicht durch eine fehlerhafte Methode erklären. Darüber hinaus basieren die eigenen Werte auf Mehrfachbestimmungen und wurden durch die übliche Vermessung von externem Kontrollmaterial in ihrer Richtigkeit bestätigt, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Ausreißern innerhalb der Messungen sehr gering ist. Daher muss eher von einer fehlerhaften Messung seitens des externen Labors ausgegangen werden. Eine weitere Ursache könnten auch die von Probe zu Probe unterschiedlichen Lagerbedingungen sein.

### 3.13 Freigabe für die Routine

Nach der Leitlinie der AGNP sind die entscheidenden Parameter für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit einer Methode, die für das TDM validiert werden soll, die „[...] (1) Genauigkeit, (2) Präzision, (3) Selektivität, (4) Empfindlichkeit, (5) Reproduzierbarkeit und (6) Stabilität.“ (Hefner et al., 2018, S. 132).

Die (1) Genauigkeit der Methode ergibt sich aus der Richtigkeit ihrer Messungen. Eine Messung gilt dann als richtig, wenn sie um weniger als 15 % vom tatsächlichen Gehalt abweicht (Hefner et al., 2018, S. 132). Allerdings ist dies lediglich eine Empfehlung, die in der Praxis häufig überschritten wird, weshalb in der Regel erst ab einer Abweichung von 25 % eine Messung als fehlerhaft gilt. Diese höhere Toleranz ist dadurch begründet, dass durch die Vermessung externer Kontrollen solche Abweichungen entdeckt und auf das Ergebnis aufgeschlagen werden können. Die während der Methodenentwicklung gemessenen Ergebnisse bewegten sich alle innerhalb dieses Toleranzbereichs, wodurch die Genauigkeit der Methode bestätigt wurde.

Eine Möglichkeit zur Bestätigung der Richtigkeit ist die Wiederfindungsrate, da sie angibt, wie effizient eine Methode zur Extraktion eines Analyten aus einer Probe ist und somit fehlerhafte Gehaltsbestimmungen verhindert werden. Die Wiederfindungsrate in der entwickelten Methode lag für das Bupropion bei  $100 \pm 5 \%$  und für Hydroxy-Bupropion bei  $101 \pm 4,8 \%$ . Diese sehr gute Wiederfindung belegt also die vollständige Extraktion aus der Matrix. Sie reicht allerdings als einzelnes Kriterium nicht aus, um die Richtigkeit einer Methode zu belegen.

Der Vergleich mit einem externen Labor kann ebenfalls zur Beurteilung der Richtigkeit herangezogen werden. Hier wurden allerdings mit  $38,1 \pm 32,8 \%$  für den Gesamtgehalt von Bupropion und Hydroxy-Bupropion eine zu hohe Abweichung erreicht, um die Richtigkeit der Methode zu validieren. Allerdings ist dies allein auch kein Nachweis dafür, dass die Methode zu fehlerhaften Messungen führt.

Von besonderer Bedeutung für die Richtigkeit ist vor allem der Vergleich mit zertifiziertem Referenzmaterial, wie externen Kontrollen oder Ringversuchen (Bader et al., 2010, S. 308–311). In 3.8.1 wurden in Tbl. 4 die Abweichungen der vermessenen externen Kontrollen bereits aufgeführt. Solche Kontrollen wurden nicht nur während der Linearitätsprüfung vermessen, sondern auch bei jeder anderen Messung, die während der Methodenentwicklung durchgeführt wurde und werden auch in zukünftigen Routinemessungen von Bupropion im Rahmen des TDM vermessen. Die Vermessung der externen Kontrollen lieferte zuverlässig Abweichungen von unter 25 % und kann somit als Bestätigung der Richtigkeit der Methode herangezogen werden. Zukünftig wird das Labor auch an Ringversuchen teilnehmen, um die Richtigkeit der Methode weiter zu validieren, was aber zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht der Fall war.

Bei der (2) Präzision einer Methode handelt es sich um die Streuung von Analyseergebnissen durch das Auftreten zufälliger Fehler. In der Regel ist die Prüfung der Präzision nur unter Wiederholungsbedingungen für ein Labor möglich. Voraussetzung dafür ist, dass die Probenaufbereitung und -vermessung durch dieselbe Person unter möglichst identischen Arbeitsschritten innerhalb einer Analyseserie oder zwischen verschiedenen Analyseserien erfolgt (Bader et al., 2010, S. 305). Genau dies wurde in der Methodenentwicklung durch die In-Day- und die Day-to-Day-Variation überprüft. Dabei ergab sich für die In-Day-Variation ein Variationskoeffizient von  $< 10 \%$  (vgl. Tbl. 8) und somit ein Wert der den Vorgaben der AGNP von  $< 15 \%$  entspricht (Hefner et al., 2018, S. 132). Auch für die Day-to-Day-Variation konnten mit 9,265 % für Bupropion und mit 5,925 % für Hydroxy-Bupropion (vgl. Tbl. 9) Variationskoeffizienten erreicht werden, die unterhalb der AGNP-Grenze liegen, was die Präzision der Methode bestätigt.

Die (3) Selektivität einer Methode beschreibt die Fähigkeit, verschiedene gleichzeitig zu bestimmende Komponenten einer Matrix eindeutig zu identifizieren, ohne dass eine gegenseitige Beeinträchtigung entsteht und unterscheidet sich somit von der Spezifität,

welche die Fähigkeit einer Methode beschreibt, eine einzelne Komponente aus einer Vielzahl von Bestandteilen einer Probe heraus zuverlässig zu bestimmen (Kromidas, 2000, S. 116). Die Verwendung einer LCMS erlaubt durch die Kopplung einer HPLC und eines Massendetektors, die Selektivität sowohl durch die Ermittlung der Retentionszeit einer Substanz als auch ihrer spezifischen Masse sicherzustellen. Für Bupropion ergab sich dabei bei der verwendeten Methode eine Retentionszeit von 4,93 min und für das Hydroxy-Bupropion von 4,43 min (vgl. 3.3). Die Einstellung des Massendetektors auf die spezifische Masse von Bupropion und von Hydroxy-Bupropion ermöglicht nicht nur die Sicherstellung der Selektivität, sondern auch der Spezifität der Methode.

Ob die Methode eine ausreichende (4) Empfindlichkeit zur Vermessung der Analyten besitzt, wurde durch die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der jeweiligen Substanz sichergestellt. In 3.4 konnte gezeigt werden, dass die Messempfindlichkeit von 0,2 ng/ml für Bupropion und 17 ng/ml für Hydroxy-Bupropion erreicht wird. Die Nachweisgrenze von Bupropion liegt unterhalb von 0,1 ng/ml und unterhalb von 1 ng/ml für das Hydroxy-Bupropion. Damit weist die Methode eine deutlich ausreichende Empfindlichkeit gegenüber den Analyten auf und ist somit für deren Bestimmung geeignet.

Unter (5) Reproduzierbarkeit versteht man die Präzision unter Vergleichsbedingungen (Kromidas, 2000, S. 49), also ob zuverlässige Ergebnisse über einen längeren Zeitraum erzielt werden, welche dabei unabhängig vom Anwender oder der Geräteausrüstung sind. Voraussetzung ist lediglich, dass die gleiche Methodik und identisches Material verwendet wird. Bis zu einem gewissen Grad wurde dies in der Methodenentwicklung auch durch die In-Day- und Day-to-Day-Variation überprüft (vgl. 3.9 und 3.10). Die Variationskoeffizienten der Messergebnisse zeigten die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Analysereihe und über mehrere Tage, allerdings nur mit einem Anwender. Durch die Freigabe der Methode wird diese in Zukunft von weiterem Laborpersonal durchgeführt und dadurch die Reproduzierbarkeit der Methode bei Richtigkeit der Ergebnisse weiter validiert.

Mit der (6) Methodenstabilität ist die „[...] Abhängigkeit eines Ergebnisses von der Zeit bei Anwendung der konkreten Methode unter realen Bedingungen [...]“ (Kromidas, 2000, S. 9) gemeint. Die In-Day- und Day-to-Day-Variation ist auch hier ein legitimes Validierungsverfahren zur Überprüfung dieser Stabilität. Da die Variationskoeffizienten unterhalb der 15 % Grenze der AGNP liegen, eignen sie sich zur Bestätigung der Methodenstabilität.

Die Stabilitätstests (vgl. 3.11) wurden aufgrund der bekannten Problematik der Instabilität von Bupropion durchgeführt und um zu überprüfen, ob diese Instabilität bereits unter den praktischen Bedingungen im Labor (Transport- und Lagerbedingungen) auftritt und es somit trotz Zuverlässigkeit und Richtigkeit der Methode zu falschen Messergebnissen

in der Gehaltsbestimmung kommen kann. Da dies nicht der Fall war, mussten keine weiteren Anpassungen durchgeführt werden.

Das Auftreten von Ausreißern kann einen Einfluss auf die Aussagekraft der Validierung der Methode haben, da sie die Daten verfälschen können. Durch die DIN 53804 wird die Identifizierung eines solchen Ausreißers durch die Durchführung eines Ausreißer- tests/DIXON-Tests empfohlen (Zwanziger & Sorkau, 2021, S. 22–23), aber auch eine visuelle Inspektion von Streudiagrammen oder die Verwendung von Interquartilsabständen sind zulässige Methoden. Während der Methodenentwicklung wurden auftretende Abweichungen, dann als Ausreißer bezeichnet, wenn sie ohne erkennbares Muster, isoliert betrachtet erheblich von den anderen Werten abwichen. Das Auftreten solcher einzelnen Ausreißer ist häufig auf Ungenauigkeiten während der Durchführung der Aufbereitung einer Probe zurückzuführen. Ein gewisser Freiheitsgrad für menschliche Fehler ist also bei jeder Methodenentwicklung einzuplanen, muss allerdings auch immer erklärt und diskutiert werden. Eine Wiederholung von Messungen zur Ergebnisvalidierung ist nur dann erforderlich, wenn ein konstanter Fehler auftritt.

Im Verlauf der Methodenentwicklung konnten die Parameter einer zuverlässigen und reproduzierbaren Methode der AGNP erfüllt werden. Daher ist die Methode für eine Freigabe zur Routineanwendung geeignet und kann in eine Standardarbeitsanweisung (SOP) überführt werden (s. Anhang 14), damit sie in Zukunft vom gesamten Laborpersonal zur Gehaltsbestimmung von Bupropion im Rahmen des TDM eingesetzt werden kann.

#### 4. Diskussion

Zu Beginn der Methodenentwicklung stand die Wahl zwischen der HPLC und der LCMS zur Diskussion. In vielen Laboren wird das TDM von Bupropion mit der HPLC und nicht mit der LCMS durchgeführt. Dies bietet vor allem den Vorteil der Kostenersparnis (Anschaffungspreis) und gilt als eine etablierte Methode. Eine HPLC ist in den meisten Laboren bereits vorhanden und wird seit Jahrzehnten für die Arzneimittelforschung und -entwicklung eingesetzt und ist somit vielen Labortechnikern vertraut (Ritgen, 2019, S. 146–148). Demgegenüber steht die LCMS, die sich vor allem durch ihre hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit auszeichnet und dadurch eine höhere Zuverlässigkeit für das TDM im Allgemeinen bietet. Es wurde jedoch befürchtet, dass aufgrund der großen therapeutischen Breite des Bupropions die LCMS für die hohen Konzentrationen zu empfindlich misst und es zu einer Detektorsättigung kommt, was sich allerdings nicht bestätigte. Ein weiterer Vorteil der LCMS ist ihre Fähigkeit, Substanzen mit ähnlicher Retentionszeit oder vergleichbarem Absorptionsverhalten aufgrund ihrer spezifischen Masse zu identifizieren. Dies ist vor allem dann vorteilhaft, wenn mehrere Analyten in einer einzelnen Messung überprüft werden sollen.

Eine LCMS ist zwar in ihrer Anschaffung mit einem sehr hohen Kostenaufwand verbunden, bietet aber bei voller Auslastung durch ihre deutlich kürzere Messzeit für eine Probe langfristig eine höhere Wirtschaftlichkeit. Genau das ist auch der Grund, weshalb die Methodenentwicklung für Bupropion auf die LCMS ausgelegt wurde. Langfristig sollen die HPLC-Maschinen, die es noch im Labor der Apotheke gibt, durch weitere LCMS-Geräte ausgetauscht und die Methoden für Arzneistoffe, die aktuell noch auf der HPLC laufen, in Zukunft auch für die LCMS validiert werden.

Im Verlauf der Arbeit wurde auch überprüft, welcher Gradient sich am besten für die Bupropion-Proben eignet. Grundsätzlich empfiehlt es sich dabei auf bereits bestehende Methoden und ihre Gradienten zurückzugreifen, um effizienter im Laboralltag arbeiten zu können und keine unnötige Vielzahl an unterschiedlichen Methoden zu entwickeln. Zur Auswahl standen dabei zunächst die AEP-Methode und die Biphenyl-Methode. Wie in 3.2 bereits beschrieben, fiel die Entscheidung am Ende auf die Biphenyl-Methode, da diese gleich gute Ergebnisse in Sachen Peak-Symmetrie und Retentionszeit im Chromatogramm der HPLC aufwies und darüber hinaus häufiger für die Analyse von Proben eingesetzt wird. Sie gilt als Standard-Verfahren im TDM des Labors. Sollte sich also die Möglichkeit ergeben, sie auch für weitere Wirkstoffe einzusetzen, ist dies auch sinnvoll, um die Standardisierung weiter zu erhöhen. Dass beide Methoden trotz der unterschiedlichen Gradienten ähnliche Ergebnisse liefern, erlaubt das Anstellen einiger Überlegungen:

Die stationäre Phase (Biphenyl-Säule) scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Retentionszeit von Bupropion zu besitzen. Sicherlich sind dabei hydrophobe

Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Teilen von Bupropion (aromatischer Ring und aliphatischer Ketoteil) und den hydrophoben Biphenyl-Gruppen der Säule eine wichtige Antriebskraft für die Retentionszeit von Bupropion. Dieser Effekt könnte auch noch durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen verstärkt werden. Auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem sekundären Amin des Bupropions und den verbliebenden Silica-Gruppen der Säulen sind denkbar.

Die Zusammensetzung des Fließmittels scheint keinen erheblichen Einfluss auf die Retentionszeit von Bupropion zu haben. Da Bupropion sowohl polare als auch unpolare Anteile besitzt, geht es zwar Wechselwirkungen mit beiden Fließmitteln (A und B, s. Material-Methoden-Teil) ein, diese sind allerdings nicht sehr intensiv. Die Retentionszeit von Bupropion liegt etwa bei 4,7 bis 5 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Anteil des unpolaren Fließmittels B bei der AEP-Methode bei ca. 40 %, während er in der Biphenyl-Methode schon bei 75 % liegt (vgl. Anhang 6 & 7). Der Anteil des unpolaren Teils am Fließmittel scheint also für die Retentionszeit des Bupropion nicht relevant zu sein. Durch den Anteil an Ameisensäure wäre auch eine Erhöhung des protonierten Anteils von Bupropion denkbar, was die Polarität von Bupropion erhöhen würde. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die geringe Interaktion mit dem unpolaren Fließmittel sein.

Nimmt man diese Erkenntnisse zur Grundlage, ist es nicht überraschend, dass die verwendeten Methoden die gleichen Ergebnisse liefern. Welche Methode also verwendet werden sollte, kann schlussendlich allein von wirtschaftlichen Faktoren, wie der Standardisierung, abhängig gemacht werden.

Wie in 2.1.2 beschrieben wurde für die Herstellung der Stammlösungen eine Matrixtablette verwendet, da zu dem Zeitpunkt keine Reinsubstanz verfügbar war. Die Verwendung einer solchen Tablette birgt allerdings auch gewisse Risiken für die Aussagekraft aller gemessenen Daten und damit für die erarbeitete Methode selbst. Eine Matrixtablette besteht, wie der Name schon sagt, aus einem Matrixgerüst, welches häufig aus Polymerstrukturen oder Cellulosederivaten besteht. In diesem Gerüst ist der pharmakologische Wirkstoff gleichmäßig eingearbeitet und wird bei Applikation verzögert freigesetzt. Daher spricht man auch von einem Retardpräparat (Wesselingh & H. W. Frijlink, 2008, S. 6–7). Dies ist vielleicht aus therapeutischer Sicht sinnvoll, kann sich aber als Problematik für das Herstellen einer Lösung auf Basis einer solchen Tablette erweisen: Da die Matrix auf gewisse Umgebungsfaktoren, wie den pH-Wert reagiert, reicht es nicht aus, die Tablette zu Mörsern und in ein Lösungsmittel zu überführen. Daher wurde Ameisensäure zum Ansäuern der Stammlösung verwendet, um so die physiologischen Bedingungen im Magen nachzuahmen, welche die Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Matrixgerüst fördern. Die Ansäuerung der Lösung führt darüber hinaus auch noch zu einem weiteren positiven Effekt: Wird Bupropion protoniert, ist es besser in polaren Lösungsmitteln, wie dem verwendeten Methanol, löslich, sodass ein

möglicher Wirkstoffverlust beim Überführen der hergestellten Lösung in Aufbewahrungsbehälter oder bei Verdünnungen verhindert werden kann. Spätere Vermessungen auf der LCMS haben gezeigt, dass die hergestellten Lösungen annähernd ihrem theoretischen Gehalt entsprachen. Diese Ergebnisse wurden durch die gleichzeitige Vermessung von externen Kontrollen in ihrer Richtigkeit bestätigt, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Verwendung der Matrixtablette zur Herstellung der Stammlösungen keinen verfälschenden Einfluss auf die Arbeit gehabt hat.

Ein weiterer potenziell verfälschender Einflussfaktor auf die Ergebnisse der Arbeit ist die sogenannte „Prä-Analytik“. Damit sind alle Arbeitsschritte gemeint, die einen Einfluss auf die Probe vor der eigentlichen Analyse eben dieser haben können. Bereits der Zeitpunkt der Blutabnahme kann einen großen Einfluss auf die Ergebnisse des TDM haben. Für die meisten Wirkstoffe erfolgt die Blutabnahme im Talspiegel, also unmittelbar vor Einnahme der nächsten Dosis. Bei diesem Serumspiegel kann am besten beurteilt werden, ob die verabreichte Dosis für den Patienten zu groß oder zu niedrig ist. Liegt der Talspiegel innerhalb des therapeutischen Fensters, deutet dies in der Regel auf eine gute Dosierung und damit auf die Vermeidung von Nebenwirkungen hin. Wird hier eine Blutabnahme zum falschen Zeitpunkt durchgeführt, kann dies einen Einfluss auf die Aussagekraft der TDM-Ergebnisse haben. Auch eine fehlerhafte Probenentnahme, beispielsweise aus einer intravenösen Infusionsleitung, kann zu einer falschen Serumspiegelmessung führen.

Die Veränderung der Umgebungsbedingungen nach der Blutabnahme kann zu Veränderungen der chemischen Struktur des Wirkstoffs im Blut führen. Die veränderten Faktoren Licht, Temperatur und Druck können chemische Reaktionen auslösen und infolgedessen eine Veränderung des Serumspiegels bewirken. Daher empfiehlt die AGNP in ihrer Leitlinie für anfällige Substanzen das Zentrifugieren und Einfrieren unmittelbar nach der Blutabnahme und vor dem Transport zum jeweiligen Labor (Hefner et al., 2018, S. 131). Um zu überprüfen, ob Bupropion ebenfalls durch diese Faktoren während der üblichen Transportdauer bis zur eigentlichen Analyse beeinflusst wird, wurden die Stabilitätstests (vgl. 3.11) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass es zu keinem signifikanten Abbau bei einer Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichteinfluss über einen Zeitraum von 6 Stunden kommt. Dies deckt sich mit den gefundenen Literaturwerten, welche eine Stabilität von Bupropion bei Raumtemperatur von maximal 6 Stunden belegen (Baselt, 2014, S. 300–303). Obwohl das Zentrifugieren und Einfrieren von Bupropion für den Versand durch die AGNP empfohlen wird (Hefner et al., 2018, S. 131), ist dies für die Kliniken, die aktuell Kunde beim Labor der Apotheke sind, nicht erforderlich, da der Versand nicht länger als 6 Stunden dauert. Somit konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätstests aufwändige Arbeitsschritte und damit Zeit



für die Kliniken gespart werden, welche das Angebot des TDMs für Bupropion auch in Zukunft nutzen wollen.

Bei der Überprüfung der Wiederfindungsrate kam es zu Abweichungen der vermessenen Serumlösungen in ihrem Gehalt (vgl. 3.6). Die Ergebnisse der Vermessung lassen sich auf drei Arten erklären:

1. Ein Pipettierfehler hat zum Anstieg der Konzentrationen in den Serum-Lösungen geführt.

Um solche Fehler zu vermeiden, wurden jedoch jeweils fünf Seren an zwei verschiedenen Tagen hergestellt und vermessen.

2. Während der Aufbereitung, Lagerung und Vermessung hat ein Abbau von Bupropion und Hydroxy-Bupropion in den wässrigen Lösungen stattgefunden.

Diese Erklärung ist jedoch hinfällig, da die Gehaltsmessungen der wässrigen Lösungen der Zielkonzentration entsprechen (s. Tbl. 1). Zieht man jedoch mit in Betracht, dass auch die wässrigen Lösungen mit demselben Pipettierfehler wie die Serum-Lösungen hergestellt wurden, erscheint diese Theorie denkbar. Eine Studie von O'Byrne et al. aus dem Jahre 2010 zeigte, dass die Stabilität von Bupropion stark vom pH-Wert abhängig und bei neutralen und basischen pH-Werten niedrig ist, jedoch in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur über 24 Stunden kein signifikanter Abbau nachweisbar ist. Die Anwesenheit bestimmter Metallionen kann die Zersetzung von Bupropion ebenfalls beschleunigen. Da allerdings destilliertes Wasser von hoher Qualität zur Herstellung der Lösungen verwendet wurde, scheint auch dieses Argument keinen Konzentrationsabbau zu erklären.

Somit scheint ein Abbau von Bupropion und Hydroxy-Bupropion unter den Bedingungen, die während der Aufbereitung, Lagerung und Vermessung der Lösungen herrschten, unwahrscheinlich.

3. Da die Abweichungen für jede Messung auf der LCMS alle innerhalb des Toleranzbereichs von 25 % liegen, können sie auf eine unpräzise Messung zurückzuführen sein.

Da während der Wiederfindungsvermessung keine Kalibrationslösungen und externe Kontrollen mit vermessen wurden, können solche Abweichungen nur mithilfe des internen Standards, welcher den Proben in der Aufbereitung zugeführt wurde, beurteilt werden. Dieser zeigte jedoch keine Auffälligkeiten. Dies genügt zwar als Nachweis für die Funktionalität der Maschine, allerdings nicht, um eine solche Messabweichung ausschließen zu können, was nur über die Vermessung externer Kontrollen möglich gewesen wäre. Nimmt man eine solche Messabweichung als Grundlage, würde die Wiederfindung von Bupropion und Hydroxy-Bupropion immer noch weit über dem geforderten

Mindestwert liegen und belegt die Eignung der verwendeten AEP-Methode zur Aufbereitung der Patientenserum.

In 3.7 wurde die Ionensuppression untersucht, wobei es zum Auftreten eines einzelnen Extremwerts kam (Patientenprobe 7, s. Tbl. 2). Daher wurde die Probe erneut mit dem Analyten versetzt und vermessen. Hätte die Vermessung der zweiten Probe wieder zu einer hohen Abweichung geführt, hätte man verschiedene Ansätze zur Verringerung der Ionensuppression in einer massenspektrometrischen Analyse verfolgen können:

1. Überprüfung der in allen Patientenproben vorhandenen Arzneistoffe

Hätte der Patient Nr. 7 ein Medikament eingenommen, das in den anderen Proben nicht nachweisbar ist, hätte man für dieses überprüfen können, ob Interaktionen mit Bupropion im Serum in der Literatur bekannt sind. Somit hätte man einen guten Ansatz, um das Problem durch weitere Schritte zu lösen.

2. Anpassung des Gradienten und der Dauer der Vermessungsmethode

Insbesondere die Trennung von Substanzen unterschiedlicher Polarität kann so verbessert werden, um die Retentionszeiten eben dieser weiter voneinander zu entfernen.

3. Optimierung der Probenaufbereitung

Durch eine effektive Extraktion des Analyten aus der Probenmatrix können Matrixeffekte und Interferenzen minimiert werden. Auch der Einsatz eines zusätzlichen Aufreinigungsschrittes, wie beispielsweise eine Festphasenextraktion, kann zur Entfernung von Verunreinigungen führen. Dies setzt jedoch voraus, dass die chemischen Eigenschaften des Analyten und der Störsubstanzen bekannt sind, um Mengenverluste des Analyten zu vermeiden.

Eine weitere Möglichkeit in der Aufbereitung ist die Proteinabtrennung, wie sie auch in der AEP-Methode verwendet wird. Das im internen Standard, der in dieser Methode verwendet wird, enthaltene Acetonitril führt zur Fällung der Serumproteine, welche sich durch Zentrifugation leicht von den gelösten Substanzen trennen lassen.

Bei schwierigen Fällen mit hoher Ionensuppression stellt die Derivatisierung des Analyten eine weitere Möglichkeit dar, um die Ionisierungseffizienz zu erhöhen und die Bildung von Salzaddukten und anderen Matrixeffekten zu reduzieren (Ritgen, 2019, S. 19–20).

4. Verwendung spezieller Additive oder Spüllösungen

Dies können beispielsweise Essigsäure oder Trifluoressigsäure sein, die zu einer Ladungsneutralisierung störender Ionen führen können. Die Zugabe von Salzlösungen wie Ammoniumacetat oder organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril können die Effekte der Ionensuppression minimieren. Eine erfolgreiche Anwendung setzt jedoch ausreichende Kenntnisse über die chemischen Eigenschaften der Analyten, der Störfaktoren und ggf. auch der Trennsäule voraus (Mallet et al., 2004).

Für die Überprüfung der Linearität wurde zunächst bei der Auswertung der Messergebnisse Fluperlapin als interner Standard verwendet (s. 3.8.1). Dabei kam es insbesondere in den höheren Konzentrationsbereichen zu einer größeren Streuung der Messpunkte. Standardmäßig wird im Labor immer mit zwei internen Standards (Fluperlapin und Bromperidol) gearbeitet, welche jeder Probe hinzugegeben werden (s. 2.2.1) und die strukturelle Vielfalt einer Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen abdecken. Dies bietet den Vorteil, dass mit geringem Arbeitsaufwand der entsprechende interne Standard in der Software ausgewählt werden kann, der die bessere Kalibrierung ermöglicht. Der Vergleich der Ergebnisse in Abbildungen 8 und 9 (Fluperlapin) mit den Abbildungen 10 und 11 (Bromperidol) zeigte deutlich, welchen Einfluss die Wahl des internen Standards haben kann. Dass Bromperidol die bessere Kalibration liefert, ist auf seine (in Teilen) strukturelle Ähnlichkeit mit Bupropion zurückzuführen. Beide Moleküle weisen einen halogenierten Benzolring auf, an dem über eine Kohlenwasserstoffkette eine Keto-Gruppe gebunden ist (s. Abb. 20). Diese strukturelle Ähnlichkeit führt in der HPLC vermutlich zu einer vergleichbaren Eluierbarkeit (Zwanziger & Sorkau, 2021, S. 82), weshalb sich Bromperidol eher als Referenzmaterial zur Beurteilung der Messbedingungen eignet als das Fluperlapin. Daher sollte Bromperidol in Zukunft standardmäßig als interner Standard für die Gehaltsbestimmung von Bupropion verwendet werden.

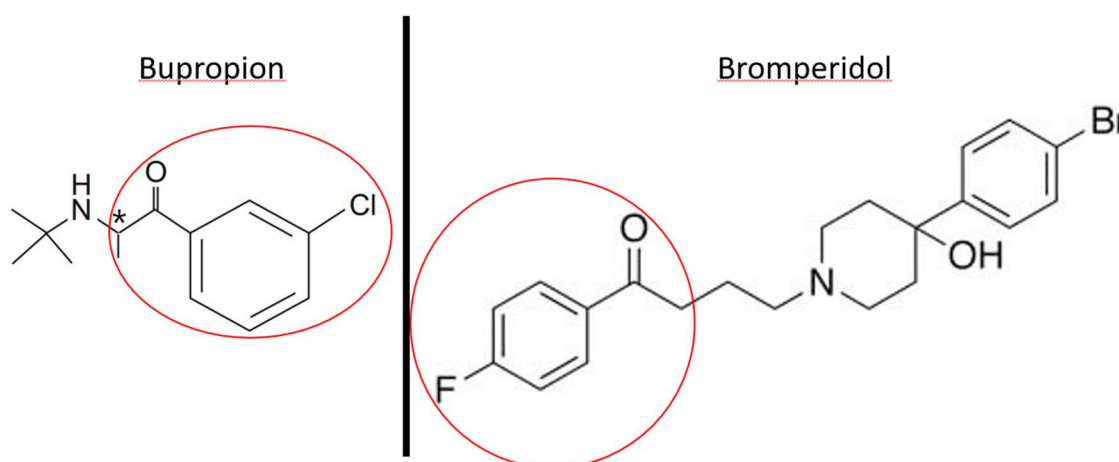


Abbildung 20: Chemische Struktur von Bromperidol (rechts) und Bupropion (links); Der strukturelle Vergleich zeigt: Beide Moleküle besitzen einen halogenierten Benzolring, an dem über eine Kohlenwasserstoffkette eine Keto-Gruppe gebunden ist (Rot markiert). Eigene Grafik, basierend auf (Connarn et al., 2016) und (Santa Cruz Biotechnology, 2023).

Während der Day-to-Day-Variationsüberprüfung kam es beim Bupropion in drei Fällen zu Abweichungen, die oberhalb des Toleranzbereichs von 25 % lagen. Am Beispiel des Ergebnisses für Tag 3 (13.12.2022) soll nun die Bedeutung der Verwendung von externen Kontrollen, eines internen Standards und der richtige Umgang mit der Software TraceFinder, sowie der Unterschied zwischen Präzision und Richtigkeit, erläutert werden. Für jeden Tag wurden dabei externe Kontrollen und die Kalibrationslösungen mit einer Präzisionslösung vermessen. Der gemessene Gehalt der Präzisionslösung bildet

dabei die Grundlage für die Bestimmung der Day-to-Day-Variation. Diese Gehaltsbestimmung errechnet TraceFinder aus der linearen Regression der Kalibrationslösungen, welche es der Software erst ermöglicht eine Signalproportionalität zu bestimmen, um den Zusammenhang der Signalintensität des Massenspektrometers und der Wirkstoffkonzentration herzustellen. Die an Tag 3 ursprünglich vermessene Kalibration zeigte im internen Standard erhebliche Schwankungen, was auf unbeständige Bedingungen, während der Messzeit innerhalb der LCMS hindeutet. Die Kalibration wurde mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 jedoch als nahezu perfekt angegeben und die Präzisionslösungen bewegte sich innerhalb des Toleranzbereichs. Die externen Kontrollen hingegen wichen bei der verwendeten Kalibration um mehr als 25 % von ihrem theoretischen Gehalt ab. Daher wurden die Kalibrationslösungen eines anderen Tages, welche keine Abweichungen im internen Standard aufwiesen, in die Software geladen und mit den neuen Werten die gemessene Signalintensität des Massendetektors in die Wirkstoffkonzentration der externen Kontrollen und der Präzisionslösung durch die Software neu übersetzt. Die Werte der externen Kontrollen verbesserten sich auf eine Abweichung von 10 % von ihrem theoretischen Gehalt, während sich der Gehalt der Präzisionslösung verschlechterte und außerhalb der Toleranz lag. Die Ergebnisse des internen Standards und der externen Kontrollen legten jedoch nahe, dass bei der neuen Berechnung der angegebene Gehalt der Präzisionslösung eher dem tatsächlichen Gehalt der Lösung entspricht, weshalb auch der „schlechtere“ Wert für die Day-to-Day-Variation verwendet wurde. Der alte Wert für die Präzisionslösung entsprach zwar präzise dem theoretischen Gehalt, war jedoch nicht richtig und ist somit als fehlerhafter Wert anzusehen und die Anpassung des Werts folgerichtig.

Insgesamt wichen die Ergebnisse der Day-to-Day-Variation in ihrem Variationskoeffizienten mehr voneinander ab als die der In-Day-Variation (vgl. Tbl. 8 und 9). Ein solcher Anstieg lässt sich dadurch erklären, dass sich zwischen den einzelnen Tagen mehr Einflussfaktoren auf die Messung ändern als innerhalb eines Tages. Dazu gehören insbesondere der Wechsel von Vorsäulen, Trennsäulen und Fließmittel im Zuge der täglichen Gerätewartung, aber auch der Wechsel von Laborpersonal und die damit verbundene unterschiedliche individuelle Arbeitsweise in der Aufbereitung der Proben. Auch minimale Veränderung von Umgebungsfaktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit können einen geringfügigen Einfluss auf die Variation der Ergebnisse haben.

Auch wenn die Daten für Bupropion schlechter sind als die für Hydroxy-Bupropion, erreichen beide Analyten eine ausreichende Messgenauigkeit über den Zeitraum der Day-to-Day-Variationsprüfung. Da der Fehler bei den Bupropion Proben unregelmäßig erscheint, könnte hier die Erklärung für die Abweichungen in einem Pipettierfehler zu finden sein. Es ist jedoch auffällig, dass fast alle Messungen der externen Kontrollen zu hoch waren (s. Anhang 12) und dass die Korrektur der Messdaten um diese Abweichung

dazu führt, dass die Werte alle unter dem Sollwert lagen. Auch ohne diese Korrektur lagen die meisten der Messwerte unterhalb des Sollwerts. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte auch sein, dass die hergestellte Lösung, die für die Messungen verwendet wurde, nicht der Konzentration entspricht, die sie theoretisch haben sollte. Somit könnte auch ein Fehler in der Herstellung dazu beigetragen haben, dass der tatsächlich gemessene Gehalt bei den meisten vermessenen Proben zu niedrig ist.

Unter Berücksichtigung dieses Erklärungsansatzes für die Gehaltsabweichungen und der dennoch guten Variationskoeffizienten beider Analyten während der Day-to-Day-Messungen bestätigen die Ergebnisse eine ausreichende Stabilität der Methode für die Vermessung von Bupropion und Hydroxy-Bupropion für die LCMS.

Die Berechnung des Gesamtgehalts an Bupropion erfolgt nach AGNP-Leitlinie durch einfache Summation des Bupropion- und Hydroxy-Bupropion-Gehalts und entspricht damit aufgrund der unterschiedlichen Höhe der Serumkonzentration im Grunde dem Hydroxy-Bupropion Gehalt (Hefner et al., 2018, S. 104). Da jedoch die pharmakologische Wirksamkeit von Hydroxy-Bupropion im Vergleich zum Bupropion nur bei 50 % liegt, erscheint es aus theoretischer Sicht wenig sinnvoll, eine Summe der beiden Werte zur Angabe des Gesamtgehalts zu bilden. Das Einfließen von lediglich 50 % des Gehalts von Hydroxy-Bupropions als Anteil am Gesamtgehalt scheint hingegen mehr Sinn zu ergeben und wäre sicherlich auch als wissenschaftlich „korrekter“ anzusehen. Fakt ist jedoch, dass sich dies in der Praxis nicht bewährt hat. Die Problematik liegt dabei vor allem in der Vielzahl an Arzneistoffen und ihren pharmakologisch wirksamen Metaboliten, mit denen sich ein behandelnder Arzt auskennen muss, um aus den Ergebnissen des TDMs die richtigen Schlüsse für eine mögliche Anpassung der Therapie des Patienten zu ziehen. Eine Vereinfachung von therapeutischen Referenzwerten ist daher fortlaufendes Ziel der AGNP, auch wenn das bedeutet, dass der Referenzwert aus pharmakologischer Sicht nicht korrekt ist. Dies ist auch der Grund dafür, dass in aktuellen TDM-Befunden der Gesamtgehalt, an denen sich der Arzt orientiert, als Einzelwert auftaucht und keine Aufschlüsselung des Gehalts der Metabolite betrieben wird, da dies in der Vergangenheit immer wieder für Verwirrungen gesorgt hat. Diese Vereinfachung und Orientierung an der Praxis trägt somit auch zur Verbesserung der Qualität des TDMs und der Therapie bei.

Der durchgeführte Vergleich mit den Ergebnissen eines externen Labors für die gleichen Patientenproben steht im Widerspruch zu den bis dahin guten Ergebnisse der Methodenentwicklung. Es gab zum Teil erhebliche Abweichungen zwischen den Ergebnissen, die weit außerhalb des Toleranzbereichs lagen. Auf Grundlage der bis dahin guten Ergebnisse der Methode und der Bestätigung der Richtigkeit aller Messungen durch die Vermessung externer Kontrollen, welche innerhalb der tolerierten Messschwankung

lagen, ist eine fehlerhafte Messung dennoch auszuschließen. Für die Richtigkeit der eigenen Messungen spricht auch die häufige Vermessung der jeweiligen Patientenproben. Da die Stabilitätstests ergaben, dass es keinen signifikanten Abbau gab, konnten alle 8 Messungen für die Patientenproben bei Raumtemperatur im Mittel als Datengrundlage für die Angabe des Bupropion- und Hydroxy-Bupropion-Gehalts genutzt werden. Bei den Daten des externen Labors handelte es sich hingegen um Einfachbestimmungen, bei denen sich ein menschlicher Fehler in der Probenaufbereitung direkt auf das Ergebnis auswirkt und es keinen Vergleichswert gibt.

Es gibt jedoch noch einen weiteren Erklärungsansatz für die hohen Abweichungen der Ergebnisse. Als externes Labor wurde das gleiche Labor genutzt, welches ohnehin alle Bupropion-Anforderungen bis zur Freigabe für die Routine der eigenen Methode für die Vermessung von Bupropion übernommen hat. Kommt ein solcher Auftrag im Labor an, wird ein Teil des Serums sofort eingefroren und zum externen Labor versandt, welches die Ergebnisse der Bestimmung übermittelt. Im Verlauf der Methodenentwicklung wurden vom labortechnischen Personal für die eigenen Stabilitätstests alle Bupropion-Seren eingefroren, während ein Teil des Serums unmittelbar für die Ergebnisermittlung zum externen Labor versandt wurde. Die für die Stabilitätstests verwendeten Seren, welche die Datengrundlage für den Ergebnisvergleich lieferten, wurden also unterschiedlich lange gelagert, da die Tests erst am Ende der Methodenentwicklung durchgeführt wurden. Gleichzeitig kamen aber auch frische Seren zum Lagerbestand hinzu. Die Auswahl der Seren erfolgte allerdings nicht anhand ihrer Lagerzeit, sondern danach, ob sie eine ausreichende Menge an Bupropion enthielten (was sich aus den Ergebnissen des externen Labors ergab). Somit wurden Seren ausgewählt, welche wenige Tage eingefroren waren, während andere möglicherweise schon zwei Monate im Gefrierschrank aufbewahrt wurden. Dieser Unterschied in der Lagerzeit lag bei den Ergebnissen des externen Labors nicht vor, da diese unmittelbar versandt und vermessen wurden. Grundsätzlich gilt das Einfrieren von Proben als zuverlässige Methode, um Wirkstoffe im Serum lange zu erhalten und Veränderungen der Probenmatrix zu verhindern, dennoch kann aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Matrix eine solche Veränderung nie vollständig ausgeschlossen werden. So handelte es sich bei Patientenprobe 1, welche die höchste Abweichung aufwies (s. Abb. 18), mit einer Lagerungszeit von zwei Monaten um die älteste Probe. Diesem Erklärungsansatz stehen die Ergebnisse diverser Studien zur Stabilität von Bupropion bei Temperaturen von  $-20\text{ °C}$  (Gefrierschrank) gegenüber. So kann davon ausgegangen werden, dass Bupropion und Hydroxy-Bupropion im menschlichen Serum bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  mindestens 3 Monate stabil ist (Parekh et al., 2012). Auch die Tatsache, dass es sich bei Patientenprobe 2, welche ebenfalls eine sehr hohe Abweichung aufwies, um eine der frischeren Proben (2 Wochen Lagerung) handelte, spricht gegen eine Veränderung der Probenzusammensetzung

unter den gewählten Lagerbedingungen. Hier hätte sich die Möglichkeit für weitere Stabilitätstests ergeben, um die Auswirkung der Kombination unterschiedlich langer Lagerung bei verschiedensten Temperaturbedingungen und Zeiträumen auf den Bupropion-Gehalt zu überprüfen. Allerdings hätte dies aufgrund des zeitlichen Umfangs durch lange Vorbereitungen den Rahmen der Arbeit gesprengt. Dennoch bietet sich hier ggf. ein Ansatz für eine weitere Optimierung der Methode.

Eine weitere Möglichkeit für die Ergebnisabweichungen könnte auch eine falsche Ergebniszuordnung, also eine Verwechslung von Patientenproben im Rahmen der Prä-Analytik, sein. Solche Verwechslungen treten allerdings durch die Verwendung von Barcodes zur Probenidentifikation äußerst selten auf. Trotzdem kann ein solcher Fehler nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der deutlichen Hinweise auf die Richtigkeit der eigenen Ergebnisse muss abschließend gesagt werden, dass einer der alternativen Erklärungsansätze für die Abweichungen der Messergebnisse der beiden Labore am realistischsten ist. Da bei allen Messergebnissen für den Bupropion-Gehalt jedoch keine Warnschwellen überschritten wurden, ist davon auszugehen, dass eine solche fehlerhafte Ergebnisfreigabe nicht zu einer Patientenschädigung geführt hat. Für die Zukunft bleibt der Anspruch, dass durch die selbst entwickelte und in ihrer Richtigkeit validierte Methode zur Gehaltsbestimmung von Bupropion die Qualität für das TDM verbessert wird und somit die Patienten direkt davon profitieren können.

Die Sinnhaftigkeit des TDM von vielen Arzneistoffen wird häufig infrage gestellt, da es mit erheblichen Mehrkosten für die Versicherungen als Kostenträger verbunden ist und sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Serumkonzentration und klinischer Wirkung in Studien häufig nicht belegen lässt (Klein & Haen, 2017, S. 112). Für Bupropion konnte eine Beziehung zwischen Wirkstoffkonzentration und klinischer Wirkung in einigen Studien belegt werden (Jefferson et al., 2005). So konnte bereits 1993 in einer Studie gezeigt werden, dass bei depressiv erkrankten Menschen die klinische Verbesserung der Symptome mit einer höheren Plasmakonzentration steigt (S. H. Preskorn, 1993). Eine weitere Studie, welche 2001 zur Untersuchung der akuten antidepressiven Wirkung im Zusammenhang mit der Plasmakonzentration von Bupropion an einer pädiatrischen Patientengruppe durchgeführt wurde, zeigte eine hohe Variabilität der Plasmakonzentration von Bupropion und seinen Metaboliten auf, was auf mögliche Unterschiede in der jeweiligen Pharmakokinetik von Kindern und Jugendlichen hindeutet (Daviss et al., 2006). Beide Studien wurden jedoch nur an einer sehr kleinen Personenzahl durchgeführt und reichen allein nicht aus, um den Zusammenhang zwischen Wirkstoffkonzentration und klinischer Wirkung und damit die Sinnhaftigkeit des TDMs für Bupropion zu belegen.

Die schwierige Studienlage ist laut Preskorn auf ein grundsätzliches Problem in der Aufstellung der untersuchten Personengruppen zu finden. Es werden häufig sogenannte

„responder“, die als einzige Gruppe tatsächlich auf eine spezifische Wirkstoffkonzentration ansprechen, mit „non-respondern“ und „placebo-respondern“ gemeinsam im Ergebnis präsentiert. Da es hier keine Trennung der Gruppen gibt, ist für die Durchführenden der Studie die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung auch nicht zu erkennen (Klein & Haen, 2017, S. 112). Preskorn zeigt dabei auf, dass die Arbeitsweise des TDMs nicht immer nur auf universelle Wirkstoffkonzentrationen ausgelegt sein muss, sondern aufgrund der Komplexität der individuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik und -dynamik eines jeden Menschen eine individuell angepasste Therapie ermöglicht werden muss (Sheldon H. Preskorn, 2014). Dies ist nur möglich, wenn die klinischen Pharmakologen mit den therapierenden Ärzten eng zusammenarbeiten. Das TDM ist somit auch eine Form der Individualmedizin.

Solche individuellen Unterschiede sind häufig auf die genetische Variabilität und damit auf die jeweilige Enzymausstattung eines jeden Menschen zurückzuführen. Auch für Bupropion konnte gezeigt werden, dass ein unterschiedlicher CYP2D6-Phänotyp, welcher neben CYP2B6 einen Einfluss auf die Metabolisierung von Bupropion besitzt, einen Einfluss auf dessen Plasmakonzentration hat (Pollock et al., 1996). Infolge solcher Unterschiede kommt es häufig zu unterschiedlichen Verstoffwechslungen eines Arzneistoffs. Sowohl eine sehr schnelle Metabolisierung und infolgedessen eine nur geringe klinische Wirkung als auch ein langsamer oder sogar gehemmter Abbau ist denkbar, was schnell zu einer Intoxikation führen kann. Beides kann im TDM schnell erkannt und eine individuelle Dosisanpassung empfohlen werden. Ein solcher Einfluss kann auch durch die Einnahme von Medikamenten erfolgen, welche einen Einfluss auf das Cytochrom P450-System haben, welches für die Metabolisierung von Bupropion verantwortlich ist.

Darüber hinaus ergibt sich auch eine andere Problematik für das TDM im Allgemeinen: Viele Ärzte sind der Meinung, dass sie nicht auf Wirkstoffkonzentrationsbestimmungen angewiesen sind, da sie die Wirkung oder Toxizität eines Wirkstoffs an den klinischen Werten eines Patienten ablesen können. Jedoch ist dies nach aktuellem Erkenntnisstand zu kurz gedacht. Bis beispielsweise eine toxische Wirkung eines Arzneistoffs sich klinisch bemerkbar macht, kann es bereits zu einer langfristigen Schädigung des Patienten gekommen sein, welche durch die regelmäßige Kontrolle der Serumspiegel des Arzneistoffs möglicherweise nicht nur hätte verhindert, sondern bereits vor ihrer Entstehung entdeckt werden können (Klein & Haen, 2017, S. 113). Dies setzt voraus, dass es auch eine ausreichende Datenlage zu den Warnschwellen für die Wirkstoffkonzentration gibt. Die AGNP gibt hierfür regelmäßig ihre überarbeitete Form der Leitlinien für das TDM heraus und passt ihre Angaben zu therapeutischen Bereichen und Warnschwellen an die aktuelle Studienlage an. Jede aufgeklärte und in Studien entdeckte Nebenwirkung bei gleichzeitig durchgeführtem TDM kann so dabei helfen, die Einstellung von Patienten zu verbessern.



Bisherige Methoden zur Gehaltsbestimmung von Bupropion aus dem Serum nutzen häufig HPLC-Systeme mit UV- bzw. Fluoreszenz-Detektion (Ulu & Tuncel, 2012) oder auch LCMS-MS-Systeme (Grangeon et al., 2017; Ping et al., 2022). Bei einem solchen Tandem-Massenspektrometern ( $MS^n$ ) werden die Ionen einer zweiten massenspektrometrischen Analyse und ggf. auch einer Fragmentierung unterzogen (Gross, 2013, S. 447–448). Dies bietet sich vor allem bei Substanzen an, bei denen es in einem relativ kleinen Massenbereich eine große Vielfalt gibt (z. B. Proteine). Hier kann eine Fragmentierung zu einem einzigartigen Muster führen („Fingerprint“), was die Identifizierung solcher Moleküle ermöglicht (Gross, 2013, S. 569–570). Da solche Untersuchungen jedoch i. d. R. mit längeren Messzeiten verbunden sind, sollte zunächst überprüft werden, ob eine „normale“ massenspektrometrische Untersuchung nicht auch bereits die gewünschten Ergebnisse liefert.

Die Methode von Ping et al. aus dem Jahr 2022 verwendet ein  $MS^n$ -System, weist jedoch ähnliche Ergebnisse auf wie die hier vorliegende Methode. Die Linearität der Methode konnte für einen Konzentrationsbereich von 0,1 – 20 ng/ml (Bupropion) bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9963 belegt werden und liegt damit sogar unter dem eigenen Wert von 0,998 (s. Abb. 10). Für die In-Day-Variation einer 10 ng/ml Bupropionlösung ergab sich eine relative Standardabweichung (RSD) vom Sollwert von 0,92 % und für die Day-to-Day-Variation von 2,75 %. Für die eigene Methode ergab sich für die gleiche Konzentrationsstufe eine In-Day-Variation mit einer RSD von 8,2 % (s. Tbl. 8) und für die Day-to-Day-Variation eine RSD von 9,3 % (s. Tbl. 9). Die eigenen Ergebnisse fallen somit zwar schlechter aus als die von Ping et al., jedoch entsprechen sie den Anforderungen von < 15 % (Hefner et al., 2018, S. 132). Die Wiederfindungsrate von Bupropion wurde von den Autoren für vier verschiedene Konzentrationsstufen (0,8; 10; 16 ng/ml) getestet und liegt zwischen 99,48 und 103,65 % (Ping et al., 2022). Jedoch muss hier die Zuverlässigkeit der ermittelten Daten von Ping et al. infrage gestellt werden, da die Day-to-Day-Variation nur an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht wurde und sich somit keine ausreichende Datenmenge ergibt, die eine ausreichende statistische Sicherheit gibt. Trotzdem befinden sich die Werte für die Wiederfindung in einem vergleichbaren Bereich mit den eigenen Messdaten ( $100 \pm 5$  %; s. 3.6).

Größere Unterschiede hingegen gibt es in der Art der Probenaufbereitung, in der Zusammensetzung der Fließmittel und im Fließmittelgradienten. Für die Probenaufbereitung wurde ebenfalls eine Acetonitril-Fällung verwendet. Allerdings durchliefen die Proben nach dem Schütteln eine Festphasenextraktion, wurden bei 45 °C eingedampft und anschließend mit Methanol aufgenommen. Trotz des im Vergleich zur Probenaufbereitung mit der AEP-Methode (s. 2.2.1) verhältnismäßig großen Arbeits- und Zeitaufwands, zeigen sich in der Wiederfindung keine besseren Ergebnisse, was die Vermeidung von Wirkstoffeinschlüssen durch ausgefällte Proteine betrifft.

Das polare Fließmittel A besteht genauso wie in der eigenen Methode aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser. Im Fließmittel B wurde jedoch die Ameisensäure in Acetonitril statt in Methanol gelöst, wodurch das Fließmittel unpolarer ist. Wie bereits diskutiert, scheint der unpolare Anteil am Fließmittel für die Elutionswirkung von Bupropion weniger wichtig zu sein als die Interaktion mit der verwendeten Säule, weshalb davon auszugehen ist, dass der Wechsel zu Acetonitril keinen erheblichen Einfluss auf die Trennleistung hat. Für die Methode wird ein steiler Gradient verwendet, der bereits in Minute 4 einen Anteil von 90 % des Fließmittels B aufweist und bis zur Minute 13 gehalten wird. Zum Vergleich: Bei der Biphenyl0\_3new-Methode wird dieses Level erst in Minute 6 erreicht. Das Zusammenspiel dieses steilen Anstiegs des Fließmittel B Anteils und des Wechsels auf Acetonitril sorgt für eine unpolarere Umgebung in der Säule als es bei der Biphenyl0\_3new-Methode der Fall ist. Die Interaktion polarer Analyten (oder polarer Anteile des Analyten) mit der Säule führt zu längeren Retentionszeiten, da gleichzeitig der Anteil des polaren Fließmittels abnimmt. Die Retentionszeit von Bupropion beträgt bei der Methode von Ping et al. 6,573 min und benötigt damit mehr als eine Minute länger zum durchlaufen der Säule als bei der Biphenyl0\_3new-Methode. Insgesamt benötigt eine einzelne Messung bei der Methode von Ping et al. 20 Minuten und damit fast doppelt so lange wie eine Messung mit der Biphenyl0\_3new-Methode.

Der Vergleich mit der ausgewählten Methode von Ping et al. zeigt, dass die entwickelte Methode zur Gehaltsbestimmung von Bupropion nicht nur dem Präzisions- und Zuverlässigkeitsniveau bereits validierter Methoden entspricht, sondern auch einen geringeren Arbeits- und Zeitaufwand in der Probenaufbereitung und Vermessung und somit eine höhere Wirtschaftlichkeit für ein Analytik-Labor bietet.

## 5. Zusammenfassung

Patienten in psychiatrischer Behandlung werden in der Regel mit einer Vielzahl von Medikamenten behandelt, deren Wechselwirkungen und der daraus resultierende Einfluss auf die Serumspiegelkonzentration der Arzneistoffe nicht vorhersehbar sind. Auch für das Antidepressivum Bupropion sind solche Wechselwirkungen, sowie das Auftreten von Nebenwirkungen aufgrund falscher Dosierungen in der Therapie bekannt und unterstreichen die Bedeutung des therapeutischen Drug Monitorings für diesen Wirkstoff.

In dieser Arbeit sollte daher eine Methode zur Serumspiegelbestimmung von Bupropion und seinem pharmakologisch wirksamen Hauptmetaboliten Hydroxy-Bupropion für die LCMS entwickelt und validiert werden. Aufgrund der geringen Stabilität von Bupropion bei Raumtemperatur, sollte zudem überprüft werden, welchen Einfluss dies auf die Routinemessungen von Bupropion-Patientenproben im Labor der Apotheke der LVR-Klinik Viersen hat.

Es wurden verschiedene Bupropion Lösungen (in Methanol oder Humanalbumin gelöst) für die Vermessung hergestellt. Diese wurden auf einer LCMS „Exactive Plus Orbitrap“ unter Verwendung einer Biphenyl-Säule als stationäre Phase und diverser Fließmittel, die sich in ihrer Polarität unterscheiden und so die Erzeugung eines Gradienten ermöglichen, analysiert. Als Ionisationsverfahren kam eine Elektronensprayionisation (ESI), sowie ein Orbitrap-Detektor zur Quantifizierung der Probenkonzentration zum Einsatz. Die Vermessung einer 0,1 ng/ml Bupropion-Lösung und einer 0,5 ng/ml Hydroxy-Bupropion-Lösung ergaben ein Signal-Rausch-Verhältnis im Massenspektrum, welches weit über dem erforderlichen 3:1-Verhältnis für die Abhebung vom Hintergrundrauschen lag. Da die Konzentration bereits unterhalb der erforderlichen Messempfindlichkeit von 0,2 ng/ml für Bupropion bzw. 17 ng/ml für Hydroxy-Bupropion lag, wurden aus wirtschaftlichen Gründen keine weiteren Schritte zur Bestimmung der tatsächlichen Nachweisgrenze unternommen, da eine ausreichende Empfindlichkeit der LCMS bereits belegt war.

Die Untersuchungen zur Wiederfindungsrate (*WFR*) und der Ionensuppression konnten zeigen, dass die verwendete Aufbereitung (Proteinfällung mit Acetonitril) zu keinem relevanten Gehaltsverlust führt und keine störenden Effekte durch andere Bestandteile der Probenmatrix während der Vermessung auftreten. Es ergab sich eine *WFR* für Bupropion von  $100 \pm 5 \%$  und für Hydroxy-Bupropion von  $101 \pm 4,8 \%$ . Bei der Untersuchung zur Ionensuppression kam es zu einer Gehaltsabweichung vom Zielwert von  $4 \pm 0,2 \%$  für Bupropion und von  $-9 \pm 0,1 \%$  für Hydroxy-Bupropion.

Die Linearität der Methode wurde durch die Vermessung einer 5-Punkt-Kalibration mit einem Korrelationskoeffizienten für die Regressionsgerade von  $\sim 0,99$  für beide Analyten bestätigt.

Durch die Überprüfung der In-Day- und Day-to-Day-Variation konnte auch die Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt werden. Dabei ergab sich ein Variationskoeffizient für alle durchgeführten Messungen von  $< 10$  für beide Analyten.

*Tabelle 10: Zusammenfassung der Arbeitsschritte in der Probenaufbereitung und die Parameter der LCMS für die entwickelte Methode zur Serumspiegelbestimmung von Bupropion und Hydroxy-Bupropion.*

<b>Methode</b>	<b>Analyten: Bupropion + Hydroxy-Bupropion</b>
Aufbereitung (AEP-Methode)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 µl Probe + 500 µl Interner Standard in Eppendorf-Reaktionsgefäß</li> <li>- Kräftig händisch schütteln + 1 min auf Laborrüttler</li> <li>- + 500 µl Interner Standard</li> <li>- Kräftig schütteln + 1 min auf Laborrüttler + anschließende Zentrifugation (4 min)</li> <li>- 200 µl Überstand in Glasvial (800 µl Fließmittel A vorgelegt) überführen</li> </ul>
Parameter LCMS (Biphenyl0_3new-Methode)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durchfluss 0,3 ml / min</li> <li>- 5 µl Injektionsvolumen</li> <li>- Stationäre Phase: Biphenyl-Säule</li> <li>- Gradient:               <ul style="list-style-type: none"> <li>1 - 6 min: Fließmittel B Anteil von 10 % auf 90 %</li> <li>6 - 8 min: Fließmittel B Anteil 90 %</li> <li>8 – 11 min: Fließmittel B Anteil von 90 % auf 10 %</li> </ul> </li> <li>- Massendetektion: 200 - 600 <math>m/z</math></li> <li>- Spannung und Temperatur Kapillare: 3,1 kV; 275 °C</li> </ul>

Somit konnte erfolgreich eine zuverlässige Methode für die Gehaltsbestimmung von Bupropion mittels LCMS entwickelt und validiert werden (s. Tbl. 10). Durch das Integrieren von Bupropion in die Teilnahme an Ringversuchen, wird die Methode in Zukunft auch weiter validiert und ggf. zertifiziert werden.

## Literaturverzeichnis

- aprentas. (2017a). *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden* (6. Auflage). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0970-2>
- aprentas. (2017b). *Laborpraxis Band 4: Analytische Methoden* (6. Auflage). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0972-6>
- Arndt T. (2019). Bupropion. In A. M. Gressner & T. Arndt (Hrsg.), *Springer Reference Medizin. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 494). Springer.
- Bader, M., Barr, D., Göen, T., Schaller, K. H., Scherer, G. & Angerer, J. (2010). Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material* (2), 284–336. <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Baselt, R. C. (2014). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* (10. Edition). Biomedical Publications.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. & Stryer, L. (2018). *Stryer Biochemie* (8. Auflage). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8>
- Bhattacharyya, D. (2018). LC-MS Innovations: Review of the Technology and its Advancements. *thermo scientific* (White Paper 65145).
- Bleymüller, J. & Weißbach, R. (2015). *Statistische Formeln und Tabellen: Kompakt für Wirtschaftswissenschaftler* (13., überarbeitete Auflage). Verlag Franz Vahlen.
- Budzikiewicz, H. & Schäfer, M. (2012). *Massenspektrometrie: Eine Einführung* (6., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.). Wiley-VCH.
- Clauss, W. & Clauss, C. (2009). *Humanbiologie kompakt*. Springer Akademischer Verlag Heidelberg.
- Connarn, J. N., Luo, R., Windak, J., Zhang, X., Babiskin, A., Kelly, M., Harrington, G., Ellingrod, V. L., Kamali, M., McInnis, M. & Sun, D. (2016). Identification of non-reported bupropion metabolites in human plasma. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 37(9), 550–560. <https://doi.org/10.1002/bdd.2046>
- Cornbleet, P. J. & N. Gochman (1979). Incorrect Least-Squares Regression Coefficients in Method-Comparison Analysis. *CLIN. CHEM.* (25/3), 432–438.
- Daviss, W. B., Perel, J. M., Brent, D. A., Axelson, D. A., Rudolph, G. R., Gilchrist, R., Nuss, S. & Birmaher, B. (2006). Acute antidepressant response and plasma levels of bupropion and metabolites in a pediatric-aged sample: an exploratory study. *Therapeutic drug monitoring*, 28(2), 190–198. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000197093.92559.7a>
- fisher scientific. (2023a). *Bupropion hydrochloride, 99%, Thermo Scientific Chemicals*. [https://www.fishersci.com/shop/products/bupropion-hydrochloride-99-thermo-scientific/AAJ61105MD\\*](https://www.fishersci.com/shop/products/bupropion-hydrochloride-99-thermo-scientific/AAJ61105MD*) [abgerufen am 02.05.2023].
- fisher scientific. (2023b). *Thermo Scientific™ Accucore™ Biphenyl Umkehrphasen-HPLC-Säulen*. [https://www.fishersci.de/shop/products/accucore-biphenyl-reversed-phase-ic-columns/p-8617014\\*](https://www.fishersci.de/shop/products/accucore-biphenyl-reversed-phase-ic-columns/p-8617014*) [abgerufen am 02.05.2023].
- Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2020). *Pharmakologie und Toxikologie* (3. Auflage). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58304-3>
- Grangeon, A., Gravel, S., Gaudette, F., Turgeon, J. & Michaud, V. (2017). Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1040, 144–158. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.006>
- Gross, J. H. (2013). *Massenspektrometrie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2981-0>

- GSK. (2023). *Fachinformation Elontril 150 mg / 300 mg Tabletten mit veränderter Wirkstofffreisetzung*. [https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/de\\_DE/produktinformationen/elontril/FI\\_Elontril\\_150\\_300\\_mg\\_Tabletten\\_mit\\_ver%C3%A4nderter\\_Wirkstofffreisetzung.pdf](https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/de_DE/produktinformationen/elontril/FI_Elontril_150_300_mg_Tabletten_mit_ver%C3%A4nderter_Wirkstofffreisetzung.pdf)\* [abgerufen am 06.05.2023].
- Hefner, G., G. Laux, P. Baumann, N. Bergemann, H.-W. Clement, A. Conca, J. Deckert, K. Domschke, G. Eckermann, K. Egberts, M. Gerlach, C. Greiner, G. Gründer, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, R. Helmer, G. Janssen, E. Jaquenoud, T. Messer, . . . C. Hiemke. (2018). *Konsensus-Leitlinien für therapeutisches Drug-Monitoring in der Neuropsychopharmakologie: Update 2017*.
- Hilgers R.-D., N. H. & S. Stanzel. (2019). Regression nach Passing-Bablok. In A. M. Gressner & T. Arndt (Hrsg.), *Springer Reference Medizin. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 2049). Springer.
- Hoffmann, E. de & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: Principles and applications* (3. ed.). Wiley.
- Holm, K. J. & Spencer, C. M. (2000). Bupropion: a review of its use in the management of smoking cessation. *Drugs*, 59(4), 1007–1024. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059040-00019>
- Huecker, M. R., Smiley, A. & Saadabadi, A. (2023). *Bupropion*.
- Jefferson, J. W., Pradko, J. F. & Muir, K. T. (2005). Bupropion for major depressive disorder: Pharmacokinetic and formulation considerations. *Clinical therapeutics*, 27(11), 1685–1695. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.11.011>
- Kerns, E. H. & Di, L. (2008). *Drug-like properties: Concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*. Elsevier Acad. Press.
- Klein, H.-G. & Haen, E. (Hrsg.). (2017). *Pharmakogenetik und Therapeutisches Drug Monitoring*. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110352900>
- Kromidas, S. (Hrsg.). (2000). *Handbuch Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Kromidas, S. (2017). *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Lösler, M. & Eschelbach, C. (2020). Orthogonale Regression – Realität oder Isotropie? *tm - Technisches Messen*, 87(10), 637–646. <https://doi.org/10.1515/teme-2020-0063>
- Makarov, A. (2012). *Orbitrap Mass Spectrometry: Ultra-high Resolution for Every Lab*. [https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/pp\\_orbitrap\\_ms\\_ultra\\_high\\_resolution\\_pittcon2012\\_en\\_760e51ab42/pp-orbitrap-ms-ultra-high-resolution-pittcon2012-en.pdf](https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/pp_orbitrap_ms_ultra_high_resolution_pittcon2012_en_760e51ab42/pp-orbitrap-ms-ultra-high-resolution-pittcon2012-en.pdf)\* [abgerufen am 02.05.2023].
- Mallet, C. R., Lu, Z. & Mazzeo, J. R. (2004). A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 18(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/rcm.1276>
- Mansournia, M. A., R., W., M. Nazemipour, M. Bland & D. G., A. (2021). Bland-Altman methods for comparing methods of measurement and response to criticisms. *Global Epidemiology*, 3, 100045. <https://doi.org/10.1016/j.gloepi.2020.100045>
- O'Byrne, P. M., Williams, R., Walsh, J. J. & Gilmer, J. F. (2010). The aqueous stability of bupropion. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(3), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.04.024>
- Pang, K. S., A. David Rodrigues & Raimund M. Peter. (2009). *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions: Progress and Future Challenges*. Springer.
- Parekh, J. M., Sutariya, D. K., Vaghela, R. N., Sanyal, M., Yadav, M. & Shrivastav, P. S. (2012). Sensitive, selective and rapid determination of bupropion and its major active metabolite, hydroxybupropion, in human plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study in healthy Indian subjects. *Biomedical chromatography: BMC*, 26(3), 314–326. <https://doi.org/10.1002/bmc.1660>

- Ping, T., Zheng, M., Zhang, P., Yan, T., Miao, X., Wang, K. & Lian, K. (2022). Determination of 12 anti-obesity drugs in human plasma by a 96-well protein precipitation plate using HPLC-MS. *RSC advances*, 12(40), 26016–26022. <https://doi.org/10.1039/d2ra03423a>
- Pollock, B. G., Sweet, R. A., Kirshner, M. & Reynolds, C. F. (1996). Bupropion plasma levels and CYP2D6 phenotype. *Therapeutic drug monitoring*, 18(5), 581–585. <https://doi.org/10.1097/00007691-199610000-00010>
- Preskorn, S. H [S. H.]. (1993). Dose-Effect and Concentration-Effect Relationships with New Antidepressants. In L. F. Gram, L. P. Balant, H. Y. Meltzer & S. G. Dahl (Hrsg.), *Psychopharmacology Series: Bd. 10. Clinical Pharmacology in Psychiatry: Strategies in Psychotropic Drug Development*. Springer.
- Preskorn, S. H [Sheldon H.] (2014). Therapeutic Drug Monitoring (TDM) in psychiatry (part I): why studies attempting to correlate drug concentration and antidepressant response don't work. *Journal of psychiatric practice*, 20(2), 133–137. <https://doi.org/10.1097/01.pra.0000445247.54048.68>
- Ritgen, U. (2019). *Analytische Chemie I*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60495-3>
- Ritgen, U. (2020). *Analytische Chemie II*. Springer Spektrum.
- Santa Cruz Biotechnology. (2023). *Bromperidol (CAS 10457-90-6)*. [https://www.scbt.com/de/p/bromperidol-10457-90-6\\*](https://www.scbt.com/de/p/bromperidol-10457-90-6*) [abgerufen am 06.05.2023].
- Soffiantini, V. (Hrsg.). (2021). *Analytical Chemistry*. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110721201>
- Stahl, S. M., James F., P., Barbara. R., H., Jack G., M. & Carol B., Rockett and Susan Learned-Coughlin (2004). A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 6 (4), 159–166.
- Strupat, K., Olaf, S. & Maciej, B. (2016). High-Resolution, Accurate-Mass Orbitrap Mass Spectrometry – Definitions, Opportunities, and Advantages. *thermo scientific* (Technical Note 64287).
- Tomaz, P. R. X., Gonçalves, T. S., Santos, J. R., Scholz, J., Abe, T. O., Gaya, P. V., Figueiredo, E. C., Faria, H. D. de, Martins, I., Pego, A. M. F., Bismara, B. A., Yonamine, M., Pereira, A. C. & Santos, P. C. J. L. (2022). Evaluation of the nicotine metabolite ratio in smoking patients treated with varenicline and bupropion. *Frontiers in pharmacology*, 13, 900112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.900112>
- Ulu, S. T. & Tuncel, M. (2012). Determination of bupropion using liquid chromatography with fluorescence detection in pharmaceutical preparations, human plasma and human urine. *Journal of chromatographic science*, 50(5), 433–439. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms020>
- Wesselingh, J. A. & H. W. Frijlink. (2008). Mass Transfer from Solid Oral Dosage Forms. In L. L. Augsburger & S. W. Hoag (Hrsg.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets: Volume 2: Rational Design and Formulation* (3. Aufl.). Informa Healthcare.
- WHO. (2023). *Factsheet: Depressive disorder (depression)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression\\*](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression*) [abgerufen am 06.05.2023].
- Zwanziger, H. W. & Sorkau, E. (2021). *Kalibration analytischer Methoden: Theorie & Techniken - eine Orientierungshilfe*. <https://doi.org/10.25673/38489>

### Eidesstattliche Erklärung

Ich, Tristan Tannhäuser, 26979, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Methodenentwicklung zur Bestimmung des Serumspiegels und der Stabilität von Bupropion und Hydroxy-Bupropion mittels LCMS Orbitrap im Zuge des therapeutischen Drug Monitorings“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde, keinem Seminar und keiner Vorlesung oder anderen Veranstaltungen vorgelegen.

Kleve, 08.05.2023



Tristan Tannhäuser



## Anhang

eingebaut  
17.11.21 Orbit  
ly

thermoscientific

Column: Accucore™ Biphenyl

Length (mm): 100

Part No: 17826-102130

Stored in 100% Methanol

I.D. (mm): 2.1

Serial No: 20080391

Particle Size (µm): 2.6

Lot Number: 16121

## Chromatographic Parameters



Mobile Phase: 55/45 Methanol/Water



Flow Rate: 0.4 mL/min



Temperature (°C): 40

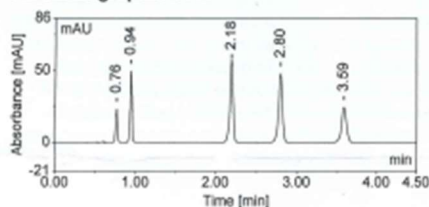


Sample Volume: 1.0 µL



Wavelength: UV @ 254 nm

## Chromatographic Test



	Specification		Result
	Minimum	Maximum	
Retention Time- min (o-Xylene)	3.48	3.76	3.59
Capacity Factor (o-Xylene)	3.4	4.2	3.71
Efficiency- N/m (o-Xylene)	170000	230000	182540
USP Tailing Factor (o-Xylene)	0.9	1.2	0.96
Column Back Pressure* - psi	3668	4483	3967

\*These values are for column testing in the factory. Actual upper pressure limit for the column is higher. Please check the Technical Guide for more details. To convert PSI to Bar divide by 14.5.

QC Verification:


Legacy Production\LTVIL-LEGPROD12\ID5205\2020-02\11



Certificate of Analysis

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC


Anhang 1: Die Parameter (Länge (Length)), innerer Durchmesser (I.D.) und Porengröße (Particle Size)) der verwendeten Biphenyl-Trennsäule in der LCMS.

 **Scan parameters** ^

History	→	
Scan range	200.0 to 600.0 m/z	
Fragmentation	None	
Resolution	140,000	
Polarity	Positive	
Microscans	1	
Lock masses	Off	
AGC target	3e6	
Maximum inject time	500	

Hot link


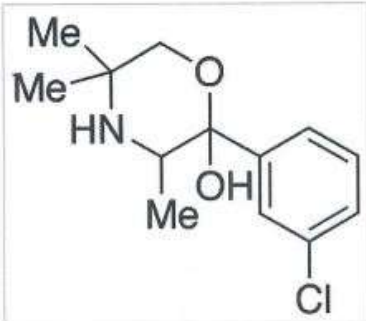
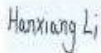


---

 **HESI source** ^

		<b>actual</b>
Sheath gas flow rate	35	36
Aux gas flow rate	3	3
Sweep gas flow rate	1	1
Spray voltage (  kV  )	3.10	3.12
Spray current (µA)		10.80
Capillary temp. (°C)	275	275
S-lens RF level	50.0	
Aux gas heater temp (°C)	225	236

Hot link

Anhang 2: Oben: Die Parameter (Scan-Range, Spannung, Temperatur) des Orbitrap-Massendetektors; Unten: Die Parameter (Temperatur, Spannung und Druck) der „heatet elektroprayionisation“ (HESI) für die verwendete Biphenyl-Methode in der LCMS.

		<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b> 20 Martin Ross Avenue, North York, ON, M3J 2K8, CANADA Tel: (416) 665-9696, Fax: (416) 665-4439 Email: orders.trc@lgcgroup.com Website: www.trc-canada.com		
<b>1. Identification</b>				
<b>Catalogue Number:</b>	H830675	<b>CAS Number:</b>	357399-43-0	
<b>Product:</b>	Hydroxy Bupropion	<b>Synonym:</b>	2-Hydroxy-2-(3'-chlorophenyl)-3,5,5-trimethylmorpholine; 2-(3-Chlorophenyl)-3,5,5-trimethyl-2-morpholinol; Bupropion morpholinol; Bupropion Morpholinol Impurity	
<b>Structure:</b>			<b>Molecular Formula:</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub>
			<b>Molecular weight:</b>	255.74
			<b>Source of Product:</b>	Synthetic
			<b>Solubility:</b>	Chloroform (Slightly), DMSO (Slightly)
<b>Lot Number:</b>	3-MUH-164-2	<b>Purity:</b>	95%	
<b>Shipping Condition:</b>	This Product Is Stable To Be Shipped At Room Temperature	<b>Storage Condition:</b>	-20°C	
<b>2. Warning</b>				
<b>Warning 1:</b>	<b>Warning 2:</b>	<b>Warning 3:</b>		
<b>3. Analytical Information</b>				
<b>Tests:</b>	<b>Specifications:</b>	<b>Results:</b>		
Appearance	White to Pale Yellow Solid	White to Off-White Solid		
NMR	Conforms to Structure	Conforms		
Elemental Analysis	Conforms	%C: 60.70, %H: 7.22, %N: 5.45		
MS	Conforms to Structure	Conforms		
HPLC Purity	Report Result	97.97% (215 nm)		
<b>Additional Information:</b>	N/A			
<p>Purity is based on the analytical results of the tests performed. NMR and Elemental Analysis (if available) may have an accuracy of ± 2%. Isotopic purity is based on mass distribution observed. The contents of the specifications are subject to change without advance notice, and the specification values displayed here are the most up to date values.</p>				
<b>4. Signatures</b>				
<b>Reviewed By</b>	<b>Reviewed By</b>	<b>C of A Approved By</b>	<b>Test Date</b>	<b>Retest Date</b>
Hanxiang Li	Toni Rantanen	Christina Goullaras	5/19/2021	5/17/2025
				

Anhang 3: Das mitgelieferte Zertifikat zur Qualität der für die Methodenentwicklung verwendeten Hydroxy-Bupropion-Reinsubstanz, Die Reinheit (Purity) wird mit 95 % angegeben.

**Concentrations/Konzentrationen**  
**MassCheck® Antidepressants 2/Psychostimulants/EXTENDED**  
**Plasma Control Level I**

**Order no: 0231/XT**  
**Lot no: 1621**  
**Exp. Date: 2024-04-01**

An excel file is also available in the  
download center of our website.

Substance Substanz	Method of analysis Analysemmethode	Unit Einheit	Target value* Zielwert*	Range Bereich
Atomoxetine	LC-MS/MS	µg/l	108	86,4 - 130
Clomethiazol	LC-MS/MS	µg/l	530	424 - 636
N-Desmethyldosulepin	LC-MS/MS	µg/l	89,2	71,4 - 107
Dosulepin	LC-MS/MS	µg/l	48,3	38,6 - 58,0
Methylphenidate	LC-MS/MS	µg/l	9,83	7,86 - 11,8
Mianserin	LC-MS/MS	µg/l	22,7	18,2 - 27,2
Milnacipran	LC-MS/MS	µg/l	54,3	43,4 - 65,2
Moclobemide	LC-MS/MS	µg/l	371	297 - 445
Opipramol	LC-MS/MS	µg/l	91,0	72,8 - 109
Reboxetine	LC-MS/MS	µg/l	56,5	45,2 - 67,8
Ritalinic acid	LC-MS/MS	µg/l	65,4	52,3 - 78,5
Tianeptine	LC-MS/MS	µg/l	57,6	46,1 - 69,1
Tranlycypromine	LC-MS/MS	µg/l	76,3	61,0 - 91,6
Trazodone	LC-MS/MS	µg/l	511	409 - 613
Vilazodone	LC-MS/MS	µg/l	29,8	23,8 - 35,8
Vortioxetine	LC-MS/MS	µg/l	19,4	15,5 - 23,3
Bupropion	LC-MS/MS	µg/l	41,9	33,5 - 50,3
erythro-Dihydrobupropion	LC-MS/MS	µg/l	42,1	33,7 - 50,5
Hydroxybupropion	LC-MS/MS	µg/l	238	190 - 286
threo-Dihydrobupropion	LC-MS/MS	µg/l	171	137 - 205

**\*Method of Analysis/Analysemmethode**

Chromsystems reagent kit **MassTox®** TDM Basic Kit Series A, order no./Best.-Nr. 92111 and  
**MassTox®** TDM Parameter Set Antidepressants 2/Psychostimulants/EXTENDED, order no./Best.-Nr. 92915/XT.

An Excel file is available in the download center of the website for a fast and simple data transfer. / Für eine schnelle und einfache Datenübertragung können sie die Werte auch als Excel-Tabelle im Download-Center der Website herunterladen.

Date/Datum: 17.05.2021

*Anhang 4: Das verwendete externe Kontrollmaterial „Plasma Control Level I“ des Unternehmens „Chromsystems“ für die Antidepressiva II; Der Zielwert des Herstellers wird für Bupropion mit 41,9 µg/l und für Hydroxy-Bupropion mit 238 µg/l angegeben.*



**Concentrations/Konzentrationen**  
**MassCheck® Antidepressants 2/Psychostimulants/EXTENDED**  
**Plasma Control Level II**

**Order no: 0232/XT**  
**Lot no: 1322**  
**Exp. Date: 2025-03-01**

An excel file is also available in the  
download center of our website.

Substance Substanz	Method of analysis Analysemmethode	Unit Einheit	Target value* Zielwert*	Range Bereich
Atomoxetine	LC-MS/MS	µg/l	880	704 - 1056
Clomethiazol	LC-MS/MS	µg/l	5010	4008 - 6012
N-Desmethyldosulepin	LC-MS/MS	µg/l	221	177 - 265
Dosulepin	LC-MS/MS	µg/l	331	265 - 397
Methylphenidate	LC-MS/MS	µg/l	55,3	44,2 - 66,4
Mianserin	LC-MS/MS	µg/l	129	103 - 155
Milnacipran	LC-MS/MS	µg/l	341	273 - 409
Moclobemide	LC-MS/MS	µg/l	2162	1730 - 2594
Opipramol	LC-MS/MS	µg/l	526	421 - 631
Reboxetine	LC-MS/MS	µg/l	301	241 - 361
Ritalinic acid	LC-MS/MS	µg/l	207	166 - 248
Tianeptine	LC-MS/MS	µg/l	341	273 - 409
Tranlycypromine	LC-MS/MS	µg/l	614	491 - 737
Trazodone	LC-MS/MS	µg/l	2151	1721 - 2581
Vilazodone	LC-MS/MS	µg/l	83,3	66,6 - 100
Vortioxetine	LC-MS/MS	µg/l	83,4	66,7 - 100
Bupropion	LC-MS/MS	µg/l	320	256 - 384
erythro-Dihydrobupropion	LC-MS/MS	µg/l	307	246 - 368
Hydroxybupropion	LC-MS/MS	µg/l	1939	1551 - 2327
threo-Dihydrobupropion	LC-MS/MS	µg/l	1421	1137 - 1705

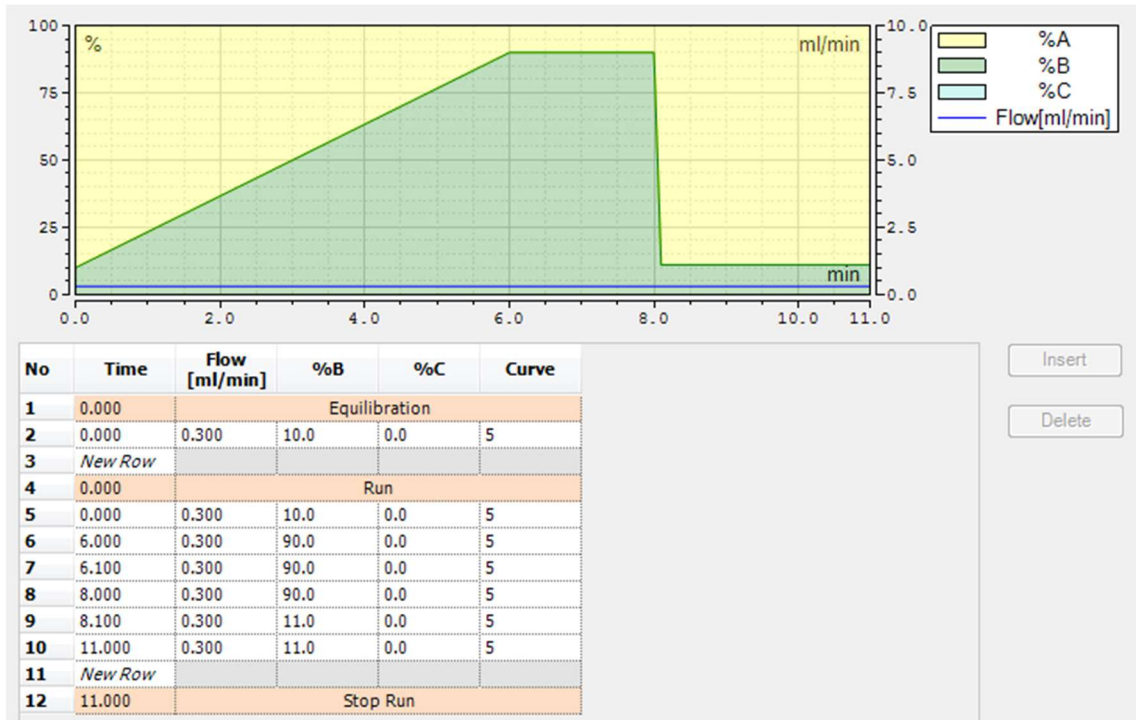
**\*Method of Analysis/Analysemmethode**

Chromsystems reagent kit **MassTox®** TDM Basic Kit Series A, order no./Best.-Nr. 92111 and  
**MassTox®** TDM Parameter Set Antidepressants 2/Psychostimulants/EXTENDED, order no./Best.-Nr. 92915/XT.

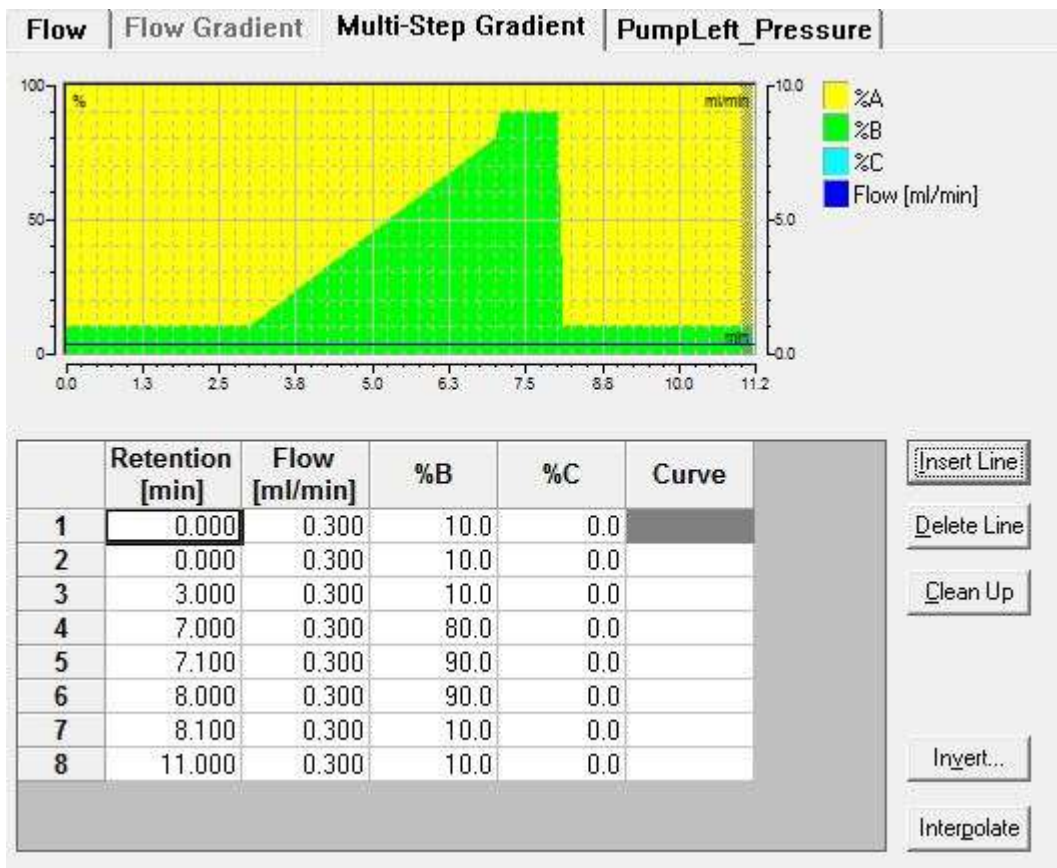
An Excel file is available in the download center of the website for a fast and simple data transfer. / Für eine schnelle und einfache Datenübertragung können sie die Werte auch als Excel-Tabelle im Download-Center der Website herunterladen.

Date/Datum: 06.05.2022

*Anhang 5: Das verwendete externe Kontrollmaterial „Plasma Control Level II“ des Unternehmens „Chromsystems“ für die Antidepressiva II; Der Zielwert des Herstellers für Bupropion wird mit 320 µg/l und für Hydroxy-Bupropion mit 1939 µg/l angegeben.*

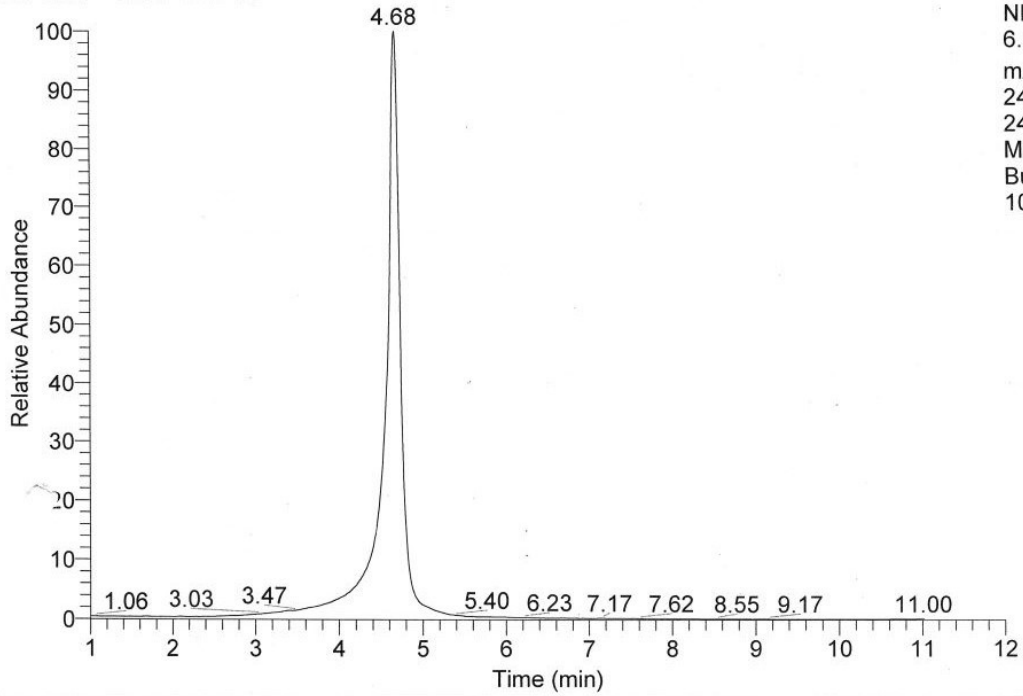


Anhang 6: Die Parameter (Flow-Rate und Fließmittelgradient) der verwendeten „Biphenyl0\_3new-Methode“ für die chromatographische Trennung mit der LCMS.



Anhang 7: Anhang 8: Die Parameter (Flow-Rate und Fließmittelgradient) der verwendeten „AEP-Methode“ für die chromatographische Trennung mit der LCMS.

RT: 1.00 - 12.00 SM: 9B

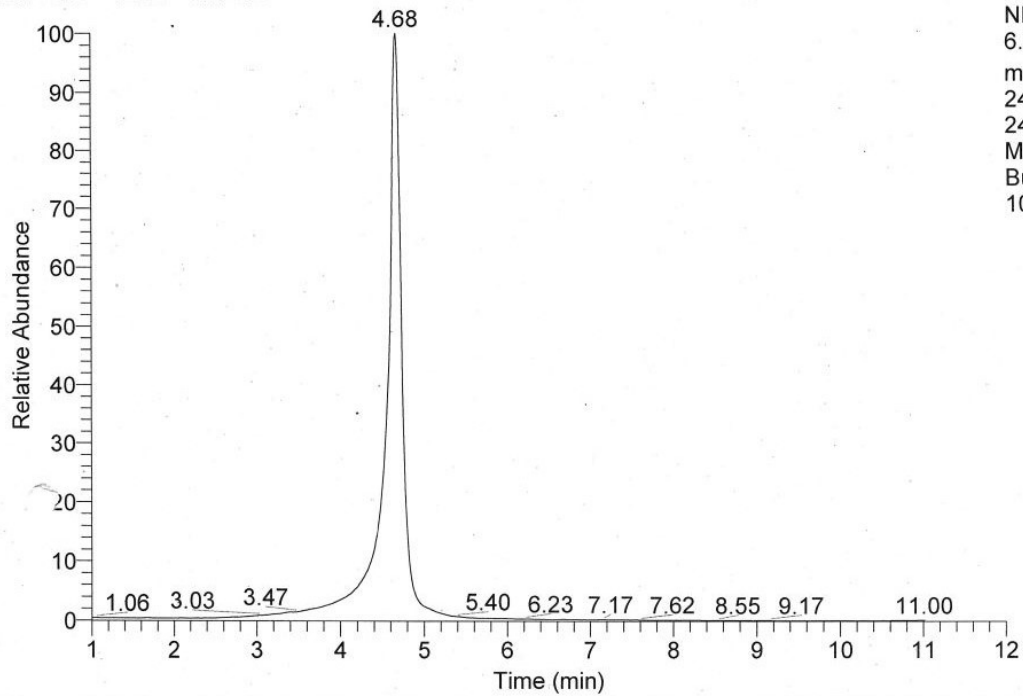


NL:  
6.60E6  
m/z=  
240.11250-  
240.11730  
MS  
Bupropion\_  
100ng\_ml

Bupropion\_100ng\_ml  
Thermo Scientific SII for Xcalibur

Anhang 9: Das Chromatogramm einer 100 ng/ml Bupropion-Lösung (Methanol) bei Verwendung der „AEP-Methode“ für die Parameter der HPLC-Trennung auf der LCMS

RT: 1.00 - 12.00 SM: 9B



NL:  
6.60E6  
m/z=  
240.11250-  
240.11730  
MS  
Bupropion\_  
100ng\_ml

Bupropion\_100ng\_ml  
Thermo Scientific SII for Xcalibur

Anhang 10: Das Chromatogramm einer 100 ng/ml Bupropion-Lösung (Methanol) bei Verwendung der „Biphenyl0\_3new-Methode“ für die Parameter der HPLC-Trennung auf der LCMS

Level	Filename	Sample Type	Area	Theoretical Amt	Calculi	Active	%Diff	%RSD	% CV
K1	Bupropion_K1_A22092603_01	Cal Std	58459	10.420	9.146	<input checked="" type="checkbox"/>	-12.23	N/A	N/A
K2	Bupropion_K2_A22092704_01	Cal Std	686026	104.160	113.710	<input checked="" type="checkbox"/>	9.17	N/A	N/A
K3	Bupropion_K3_A22092702_01	Cal Std	3486505	520.800	518.916	<input checked="" type="checkbox"/>	-0.36	N/A	N/A
	Bupropion_K2a_A22092703_01	Unknown	347994	N/A	54.141	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	N/A
AD2_P_L1	Antidep_Psy2_Level1_1621	QC Std	304853	41.900	47.243	<input checked="" type="checkbox"/>	12.75	N/A	N/A
AD2_P_L2	Antidep_Psy2_Level2_1621	QC Std	2318660	318.000	336.880	<input checked="" type="checkbox"/>	5.94	N/A	N/A

Anhang 11: Bildausschnitt der Benutzeroberfläche der TraceFinder Software; zu sehen sind die Messergebnisse des fünften Tages der Day-to-Day-Variation: Die ersten drei Reihen sind die Kalibrationspunkte 1-3, gefolgt von der Präzisionslösung P1 (hier K2a) und den externen Kontrollen; die prozentuale Abweichung ist unter dem Reiter „%Diff“ angegeben und beträgt hier für Level I der externen Kontrolle 12,75 % und für Level II 5,94 %; hier werden also 8 % (Mittelwert der Abweichungen) vom errechneten Gehalt abgezogen: so ergibt sich für die P1-Lösung eine Gehaltsanpassung von 54,141 auf 49,772 (s. Tbl. 9).


Datum	Bupropion				Hydroxy-Bupropion			
	Level I (Sollwert: 41,90)	Abweichung in %	Level II (Sollwert: 318,00)	Abweichung in %	Level I (Sollwert: 238,00)	Abweichung in %	Level II (Sollwert: 1903,00)	Abweichung in %
07.11.22	45,40	7,71	318,00	0,00	270,80	12,11	1845,80	-3,10
12.12.22	52,00	19,42	404,60	21,40	300,80	20,88	2252,90	15,53
13.12.22	53,60	21,83	393,10	19,10	272,20	12,56	2248,50	15,37
14.12.22	45,60	8,11	350,00	9,14	238,50	0,21	2039,30	6,68
15.12.22	47,20	11,23	336,90	5,61	230,10	-3,43	2013,70	5,50
16.12.22	46,50	9,89	350,10	9,17	269,80	11,79	2175,70	12,53
19.12.22	33,20	-26,20	319,90	0,59	227,60	-4,57	1966,30	3,22
20.12.22	51,20	18,16	400,40	20,58	266,80	10,79	2299,80	17,25
21.12.22	51,80	19,11	389,60	18,38	284,60	16,37	2423,00	21,46
22.12.22	51,40	18,48	368,90	13,80	275,40	13,58	2325,80	18,18
23.12.22	43,40	3,46	352,40	9,76	222,80	-6,82	1850,20	-2,85
<b>Mittelwert</b>	47,39	10,11	362,17	11,59	259,95	7,59	2131,00	9,98
<b>Standardabweichung</b>	5,52	12,84	29,82	7,33	24,69	9,02	188,74	8,15

Anhang 12: Die Messergebnisse aller während der Day-to-Day-Variationsprüfung vermessenen externen Kontrollen (Level I und II) für Bupropion und Hydroxy-Bupropion mit ihrer prozentualen Abweichung vom Sollwert sowie Mittelwert und Standardabweichung der Daten



Herstellungsprotokoll		FB3.6-02-04		Ch.-B.: A220926 103	
Bezeichnung: Bupropion K1 (c: Bup.: 10,42 ng/ml) (c: OH-Bup.: 200 ng/ml)				Datum: 26.09.22	
Herstellungsmenge: 10 ml		Darreichungsform: Albumin		Hergestellt von: T.T.	
Herstellungsanweisung:					
Vorsichtsmaßnahmen:					
Herstellungsformel			Einwaage(g)		gewogen von
Bestandteile	Qualität	Prüf-Nr. oder Ch.B.:	Soll	Ist	
Bupropion 1302 ng/ml		A220926 101	80 µl	80 µl	
OH-Bupropion 100 µg/ml		A220926 102	20 µl	20 µl	
albumin 5%		PC45A6649	ad.	10 ml	
Gesamtmasse:					
Herstellungsvorschrift			Inprozesskontrolle	durchgeführt von	
A Albumin in 10 ml Messkolben vorlegen					
B 80 µl Bupropion 1302 ng/ml hinzugeben					
C 20 µl OH-Bupropion 100 µg/ml hinzugeben					
D ad. 10 ml mit Albumin auffüllen					
E					
F					
G					
H					
Gesamtausbeute:					
Verpackung: Braunglasflasche					
Haltbarkeit:					
Aufbewahrung: Gefrierschrank 3 Schublade 2					
Mindesthaltbarkeit bis:					
Produktprüfung <input type="radio"/> Siehe Prüfprotokoll					
Freigabe: <input checked="" type="radio"/> Ja					
<input type="radio"/> Nein					
Datum		Unterschrift verantwortlicher ApothekerIn			
16.09.23		Ulrich			

Anhang 13: Beispielhaftes Herstellungsprotokoll, welches für alle im Verlauf der Methodenentwicklung hergestellten Lösungen verfasst werden musste; Angegeben ist die Herstellungsformel mit allen Chargenbezeichnungen und der benötigten Einwaage aller verwendeten Stoffe, die Herstellungsvorschrift mit genauen Anweisungen zu den Arbeitsschritten, sowie Angaben zur verwendeten Verpackung, der Aufbewahrung, hergestellten Menge, der Konzentration und Darreichungsform.

LVR - Klinik Viersen Apotheke		
Standardarbeitsanweisung ( SOP )		Nr.: <b>PROB-046-03_23</b>
Thema: <b>Aufbereitung Bupropion und Hydroxy-Bupropion für LCMS-Orbitrap</b>		Seite 1/1
Anwender: Apotheker, PTAs		
gültig ab: 02.03.2023    ersetzt SOP vom: -----    neuer Revisionsstermin: 03/2025		
<p><b>Arbeitsanweisung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Standards --&gt; siehe Gefrierschrank Nr.3 Schublade 2</li> <li>- folgende Standards werden benötigt:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bupro. K1, Bupro. K2 und Bupro. K3</li> <li>- Chromsystems Antidepressants 2 Psychostimulants Level 1/2</li> </ul> </li> <li>- zuerst 50 µl Standard bzw. Probe mit einer Eppendorfpipette in ein Eppendorfhütchen füllen</li> <li>- danach 500 µl Multi Interner Standard (40 ng/ml Fluperlapin und 40 ng/ml Bromperidol in Acetonitril, LC-MS Grade) mit autom. Dispenser zusetzen</li> <li>- direkt kräftig schütteln</li> <li>- direkt auf "Lab-Dancer" schütteln</li> <li>- erneut 500 µl Multi Interner Standard mit autom. Dispenser zusetzen</li> <li>- direkt auf "Lab-Dancer" schütteln und anschließend zentrifugieren</li> <li>- 800 µl (2x400µl mit autom. Dispenser) Puffer Orbitrap (Wasser LCMS, 0,05% Ameisensäure, 100 ml Methanol LCMS) in ein Glasvial vorlegen</li> <li>- 200 µl Probe oder Standard in Glasvial zupipettieren, schütteln</li> <li>- auf LCMS Exactive Orbitrap starten (Injektionsvolumen 5µl; Method: Biphenyl_03new_test)</li> </ul>		

	Name	Funktion	Unterschrift
Erstellt:	Schaaf	Apothekerin	
Geprüft:	Todeskino	Apotheker	
Freigegeben:	Sewazki	Lap	

Anhang 14: Die neue Standardarbeitsanweisung (SOP) für die Probenaufbereitung von Bupropion und Hydroxy-Bupropion mittels LCMS