

*Dissertation zur forensischen Toxikologie*

## **Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS**

---

**Claudia Müller**

---

*Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg, Albertstr.9, 79104 Freiburg i. Br.*

*Promotion an der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.*

*Referent: PD Dr. W. Weinmann*

In den letzten Jahren gewann die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit der Massenspektrometrie (LC-MS) zunehmend im Bereich der forensischen Toxikologie an Bedeutung und wird heute ergänzend zu den etablierten Verfahren wie Gaschromatographie Massenspektrometrie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Photodiodenarraydetektor eingesetzt. Die Identifizierung unbekannter Substanzen wird durch Spektrenbibliotheken unterstützt.

### **Stand der Technik**

Für die Substanzidentifizierung bei einem LC-MS Analysenverfahren auf Arzneistoffe, Drogen und organische Gifte ist es möglich, „Electrosprayionisation collision induced dissociation“ (ESI-CID) zur strukturspezifischen Fragment-Ionenbildung in Kombination mit Massenspektrenbibliotheken einzusetzen. Eine unter standardisierten Bedingungen erstellte LC-MS Bibliothek kann zur Identifizierung mit unterschiedlichen Quadrupol Geräten eingesetzt werden. ESI-CID kann dabei so justiert werden, dass eine Bibliothekssuche möglich ist. Mit den herkömmlichen Quadrupolgeräten können jedoch Substanzen, die in sehr niedrigen therapeutischen Spiegeln vorliegen, nicht ausreichend empfindlich im Scan Modus detektiert werden, weshalb häufig gezielte Verfahren z.B. im „Selected Ion“ oder „Multiple Reaction Monitoring“ Modus entwickelt werden.

Mit der Entwicklung der linearen Ionenfalle (QTrap), bei der die Nachweisempfindlichkeit bei Einsatz des Quadrupols Q3 als Ionenfalle gegenüber herkömmlichen Tripel-Quadrupol-Massenspektrometern deutlich gesteigert werden kann, bieten sich neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Screeningverfahren in Kombination mit „Information Dependent Acquisition“ (IDA) und MS/MS Spektrenbibliotheken. Tandemmassenspektrenbibliotheken können für ein gezieltes Screening auf Wirkstoffe mit bekannten MS/MS Spektren eingesetzt werden.

### **Optimierung eines LC-MS Methode für ein General Unknown Screeningverfahren**

Zunächst wurde ein LC-MS Screeningverfahren basierend auf einer bereits existierenden Screening Methode auf körperfremde Substanzen mit einer ESI-CID Massenspektrenbibliothek weiterentwickelt. Diese Bibliothek musste wegen Umstellung von der Software-Version eines Macintosh basierten Computersystems auf ein Windows NT basiertes System durch Einführung der „Analyst 1.1“ Software im Jahr 2001 neu erstellt werden. Die Ionisierbarkeit von „in-source CID“ mit ESI und „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI) für ausgewählte Substanzen wurde verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass bei APCI häufig stärkere Fragmentierung auftrat (z.B. 1,4-Dihydropyridin Calciumantagonisten, Antidiabe-

tika, Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten), während bei ESI mehr protonierte Moleküle und in geringem Maß eine zusätzliche Alkali-Adduktbildung zu beobachten war. Wegen dieser höheren Spezifität der ESI-Spektren wurde die Bibliothek mittels in-source ESI-CID bei drei unterschiedlichen Kollisionsenergien (20, 50, 80V Declustering Potential (DP)) erstellt: von ca. 430 Substanzen wurden Q1 Scan Massenspektren mit jeweils drei Spektren pro Substanz aufgenommen. Die in-source CID Spektren, Strukturformeln, Substanz und Retentionszeitdaten wurden in einer Access Datenbank zusammengefasst, welche eine Suchfunktion nach Substanzkriterien (protoniertem Molekül, Fragmentationen etc.) und zur Publikation der Massenspektren (<http://www.uniklinik-freiburg.de/i/rme/de/pix/in-source-cid-mueller.pdf>) dient. Die Analyst Software ließ erst in einer späteren Upgrade-Version ab Sommer 2003 eine funktionsfähige Bibliothekserstellung zu (Version 1.4).

Weitere Entwicklung beinhaltete die Untersuchung von möglicher Ionensuppression bei ESI in Abhängigkeit von Extraktionsverfahren. Festgestellt wurden zunehmende Suppressionseffekte mit Zunahme der im Extrakt enthaltenen Verunreinigungen, in der Reihenfolge: Mischphasenextraktion (basischer Extrakt < saurer/neutraler Extrakt) < Flüssig-Flüssig-Extrakt < Proteinfällung.

Zur Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Trennung wurden Retentionszeitmarker eingeführt, mehrere Säulen (zwei RP C18 und eine Phenylpropyl-Phase mit polarem Endcapping) mit unterschiedlichen Gradienten getestet. Am besten geeignet war die Synergi Polar RP Säule mit der Phenylpropyl-Phase, da hiermit die beste Retention von polaren Komponenten und Abtrennung von der LC-Front sowie die optimale Abtrennung von lipophilen Komponenten von spät eluierenden Matrixbestandteilen erreicht wurde.

Die Auswirkungen der Eluentenzusammensetzung auf die Ionisierbarkeit von ausgewählten Substanzen wurde mit Hilfe der „Post Column“ (PC) Zugabe von organischen Lösungsmitteln (Methanol und Acetonitril bzw. Gemischen) untersucht. Steigende Lösungsmittelvolumina wirkten sich bei gleichbleibender Zusammensetzung tendenziell negativ auf die Ionenausbeute aus, während bei einigen Substanzen durch organischen Modifizierzusatz die Ionenausbeute zunahm. Für die Screeningmethode wurde die PC-Zugabe organischer Lösungsmittel nicht generell empfohlen.

### **Entwicklung eines „Multi Target Screeningverfahrens“**

Basierend auf der oben beschriebenen Methodenentwicklung wurde mit Hilfe einer in Zusammenarbeit mit B. Maralíková (Universität Pardubice, Tschechien / Institut für Rechtsmedizin Universitätsklinikum Freiburg) erstellten MS/MS-Bibliothek („MS2-2004“, 730 Substanzen) und einer neuen linearen Ionenfalle (QTrap) ein „Multi Target Screeningverfahren“ auf 302 forensisch relevante Substanzen mit „Information Dependent Acquisition“ und anschließender Identifizierung durch MS/MS Bibliothekssuche entwickelt. Dazu wurde der Multiple Reaction Mode als „Survey Scan“ und der „enhanced“ Produkt-Ionen Scan als „Dependent Scan“ zur Aufnahme der Produkt Ionen Spektren verwendet. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Substanzen in einem Lauf identifizieren und detektieren zu können. Das Verfahren wurde erfolgreich in 30 forensischen Fällen getestet.

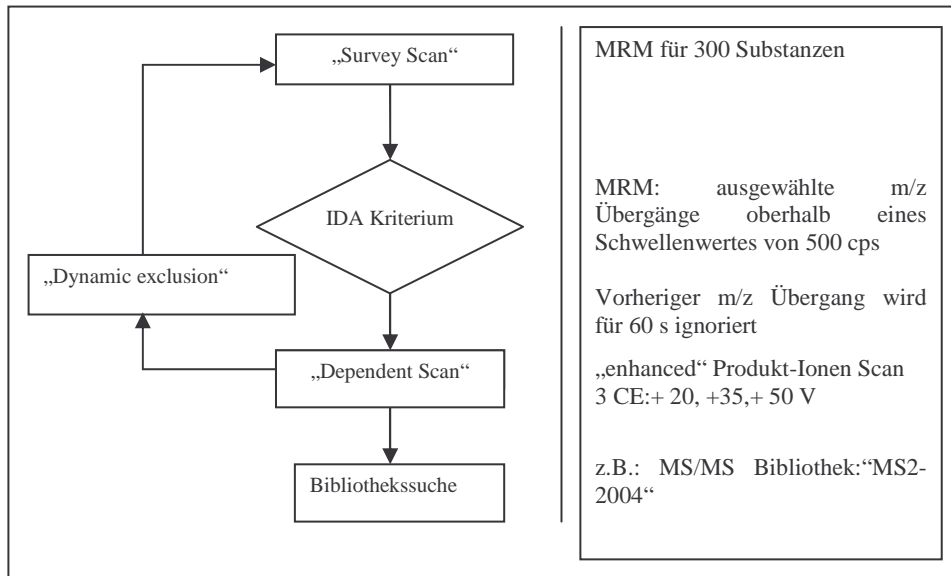


Abb.1: Schema des entwickelten Multi Target Screenigverfahrens

### Entwicklung eines Screeningverfahrens für 1,4-Dihydropyridin Calciumantagonisten

Für klinische und forensische Fragestellungen wurde eine gezielte Methode für die elf in Deutschland zugelassenen 1,4-Dihydropyridin Calciumantagonisten (1,4-DHP) Amlodipin, Felodipin, Isradipin, Lacidipin, Lercanidipin, Nicardipin, Nifedipin, Nimodipin, Nisoldipin und Nitrendipin mit MRM erstellt. Mit Hilfe dieser Methode war der Nachweis von elf 1,4-DHP in therapeutischer und toxischer Konzentration im Serum möglich.

### Resumée

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenen Screeningverfahren zum Nachweis von Arzneistoffen bzw. Arzneistoffen und Metaboliten erfolgreich für den Bereich der forensischen bzw. klinischen Toxikologie (weiter-) entwickelt. Ein Teil der Ergebnisse wurde veröffentlicht [1,2].

### Literatur

[1] Müller C, Schäfer P, Störzel M, Vogt S, Weinmann W: Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. J Chromatogr B, 2002; 773: 47-52

[2] Müller CA, Baranda González AB, Weinmann W: Screening for dihydropyridine calcium channel blockers in plasma by automated solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom, 2004; 39:639-646.