

GC-MS 38

Bestimmung von tricyclischen Antidepressiva mit GC/MS im EI und CI Modus

Dipl.-Ing. J. Szigan, Labor Dr. Lembke Dr. Lempfrid, Köln
Dipl. Ing. P. Gerhards, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Barbiturate sind in Europa kaum noch im Handel. An ihre Stelle sind neben den Benzodiazepinen die tricyclischen Antidepressiva getreten. Immer häufiger sind sie auch an Vergiftungen beteiligt. Gängige Methoden zur Bestimmung der tricyclischen Antidepressiva (TCA) sind die immunologischen Verfahren wie TDX, ADX und FLX, HPLC und die GC/MS. Die immunologischen Verfahren für TCA sind nur für Serumproben verfügbar. Die Tests werden aber auch in vielen Laboratorien für die Urinanalytik eingesetzt, obwohl sie hierfür nicht kalibriert sind. Im Zuge der Akkreditierung und Zertifizierung von klinischen Laboratorien kann die Anwendung dieser Tests zu Problemen führen. Es werden in der Literatur Kreuzreaktivitäten für Amoxapin, Maprotilin, Mianserin und Substanzen mit einem ähnlichen chemischen Aufbau wie Carbamazepin, Chlorpromazin, Cyclobenzaparin,

Promethazin, Thioridazin und Diphenhydramin beschrieben. Im Falle einer Intoxikation mit diesen Substanzen muß das Ergebnis mit der GC/MS oder HPLC bestätigt werden.

Die Spezifität der immunologischen Screeningverfahren ist ein Punkt der diskutiert werden muß. Allgemein kann gesagt werden, daß die Möglichkeit falsch negativer Befunde geringer ist, als die falsch positiver Ergebnisse. Aus diesem Grund eignen sich die immunologischen Verfahren gut zum Screening großer Mengen an Proben. Positive Ergebnisse sollten anschließend über chromatographische Verfahren abgesichert werden. In jedem Fall sollten die Angaben des Herstellers sorgfältig beachtet werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Hohe Konzentrationen an Diphenhydramin und Phenotiazinen können auch bei sehr kleinen Kreuzreaktivitäten zu falsch positiven Ergebnissen führen.

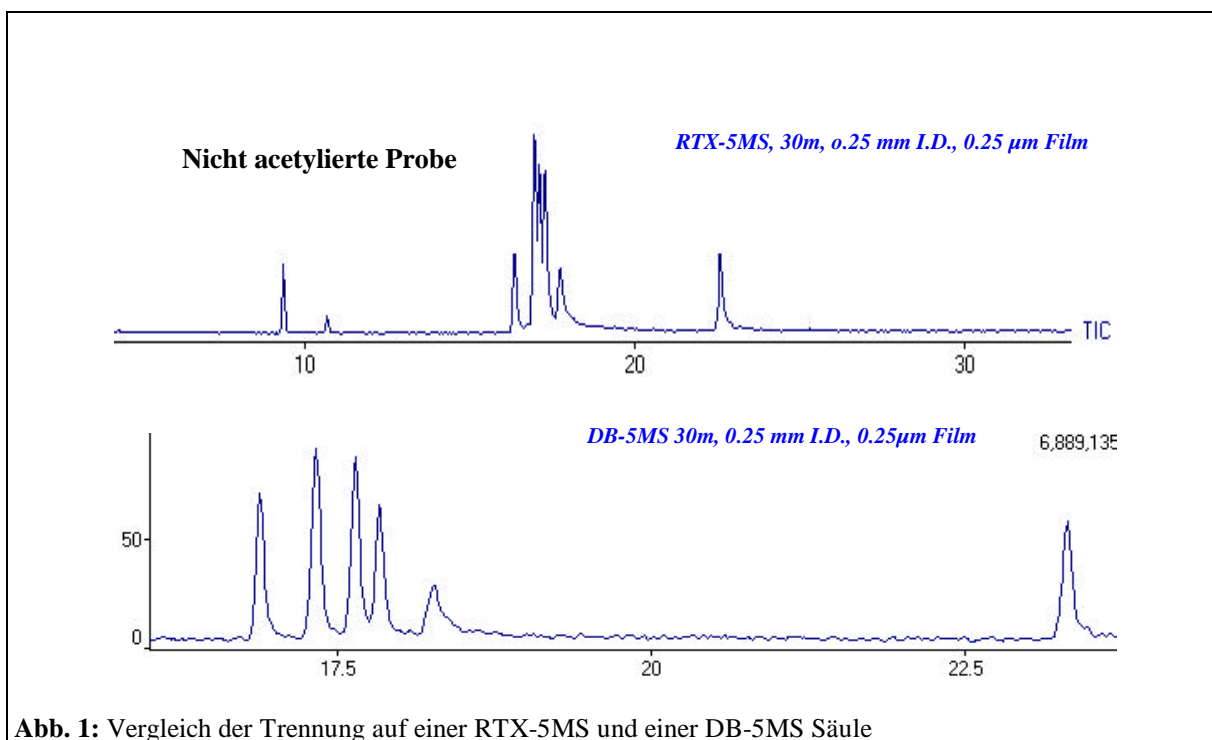


Abb. 1: Vergleich der Trennung auf einer RTX-5MS und einer DB-5MS Säule

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Nachweisgrenze der Methode. Die Frage, wie lange die Applikation eines bestimmten Wirkstoffs zurückliegen könne, wird häufig gestellt, ist aber gleichwohl nicht leicht zu beantworten. Die Elimination hängt von zahlreichen Faktoren ab:

- Absorptions- (Resorptions-) Verhältnisse
- Einfluß von anderen Fremdstoffen (z.B. Nahrung, Antazide u.a.)
- Biotransformation und Pharmakokinetik
- Besonderheiten wie Alter, Krankheit und Gewöhnung
- Diuretische Verhältnisse (Flüssigkeitsaufnahme, Clearance, pH)
- Weiterhin spielen natürlich Applikationsmenge, -form, und -frequenz eine wichtige Rolle. [1]

Bestimmung der GC/MS Parameter für die TCA

In der vorliegenden Applikation wurden die chromatographischen Bedingungen experimentell überprüft. Die Trennung der TCA erfolgte auf zwei Säulen des Typs -5MS. Abb. 1 zeigt den Vergleich der Trennung auf einer RTX-5MS und einer DB-5MS. Beide Säulen wurden zuvor ausreichend konditioniert. Auf der RTX-5MS ist die Trennung der nicht derivatisierten TCA nicht vollständig. Unter Verwendung der DB-5MS konnten die Substanzen getrennt werden, wobei die Peakform zum Teil sehr breit ist.

Für Clomipramin liegt die übliche Dosierung zwischen 75 und 300 mg/d oral. Nach 2 bis 6 Stunden ist die maximale Serumkonzentration erreicht. Nach 7 bis 14 Tagen ist bei einer Einnahme von 100 bis 200 mg/d der „steady state“ erreicht. Die Eliminationshalbwertszeit liegt für Clomipramin zwischen 19 und 37 h und für Desmethylclomipramin zwischen 54 und 77 h. Die Desmethylierung stellt hierbei den Hauptmetabolisierungsweg dar. Der therapeutische Bereich liegt bei 700 µg/l (1990 nmol/l) (Clomipramin plus Desmethylclomipramin). Die Plasmaspiegel von Clomipramin können durch gleichzeitige Verabreichung von Haloperidol, Phenotiazinen und anderen Antidepressiva erhöht werden. [2]

Abb. 2 zeigt den Unterschied zwischen der acetylierten und nicht derivatisierten Trennung. Zur Bestimmung der TCA ist generell eine Derivatisierung anzuraten. Im Zusammenhang mit der Säule sollte noch erwähnt werden, daß die letzten drei TCA auf älteren Säulen (400-500 Drogenanalysen) sehr schlecht eluieren. Die Peaks werden sehr breit und die Substanzen erfahren eine Diskriminierung. Diese ersten Untersuchungen wurden im EI Modus durchgeführt.

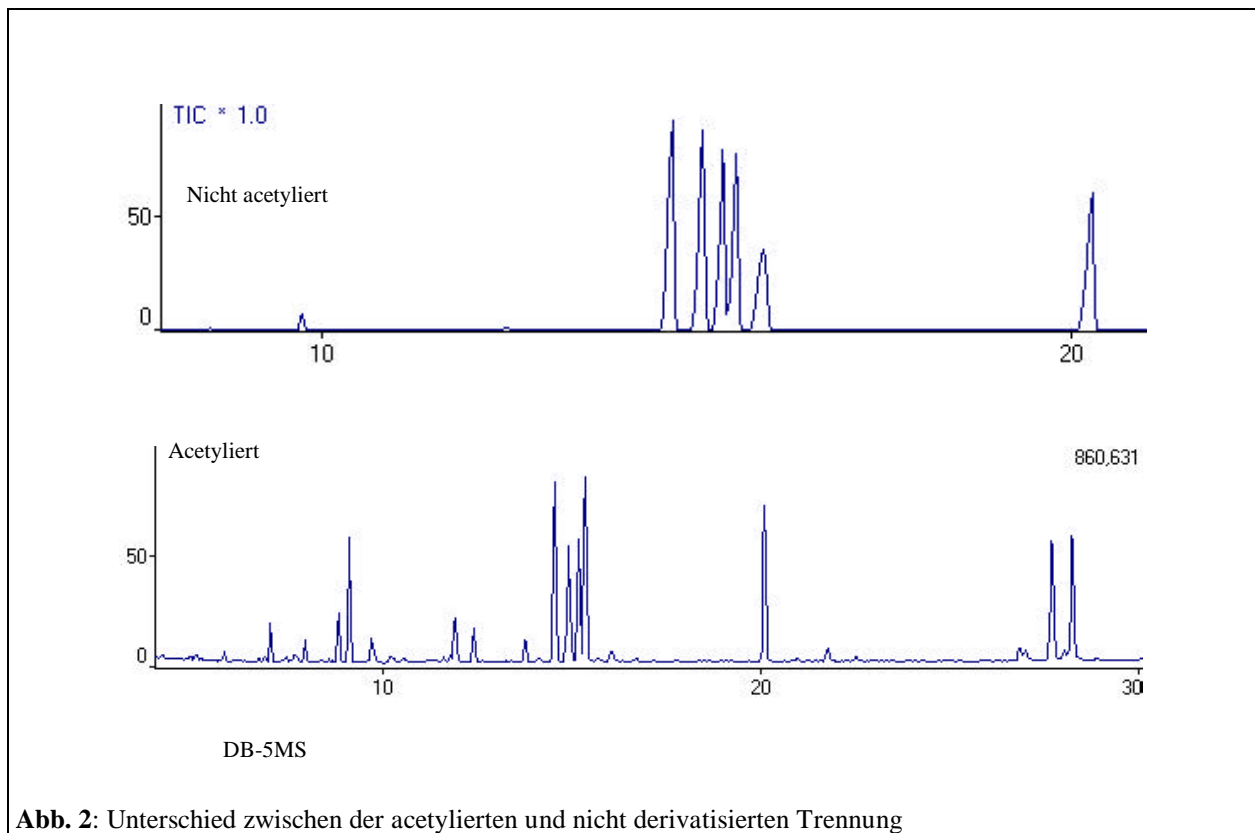


Abb. 2: Unterschied zwischen der acetylierten und nicht derivatisierten Trennung

Einige TCA wie Amitripylin und Doxepin fragmentieren im unteren Massenbereich. Die Spektren sind uncharakteristisch mit m/z 58 als 100 %-Masse. Da m/z 58 stark untergrundbelastet ist, eignet sie sich nicht als Quantifizierungsmasse. Aus diesem Grund wurden die TCA ebenfalls im CI Modus mit Ammoniak als Reaktandgas vermessen. Ammoniak bietet sich für die Analytik der TCA an, da alle TCA Stickstoff-

der Ionisierung, da die Energien in der Quelle stark reduziert werden. Eine Ionisation mit Methan wäre ebenfalls möglich, aber nicht so charakteristisch. Zusätzlich kann es bei Methan zu Clusterbildung kommen. Abb. 3 zeigt das Totalionen-chromatogramm (TIC) der underivatisierten TCA Probe. Hier stört die Coelution einiger TCA nicht, da eine Auswertung über die Molekülmasse erfolgt, die sich bei den einzelnen TCA

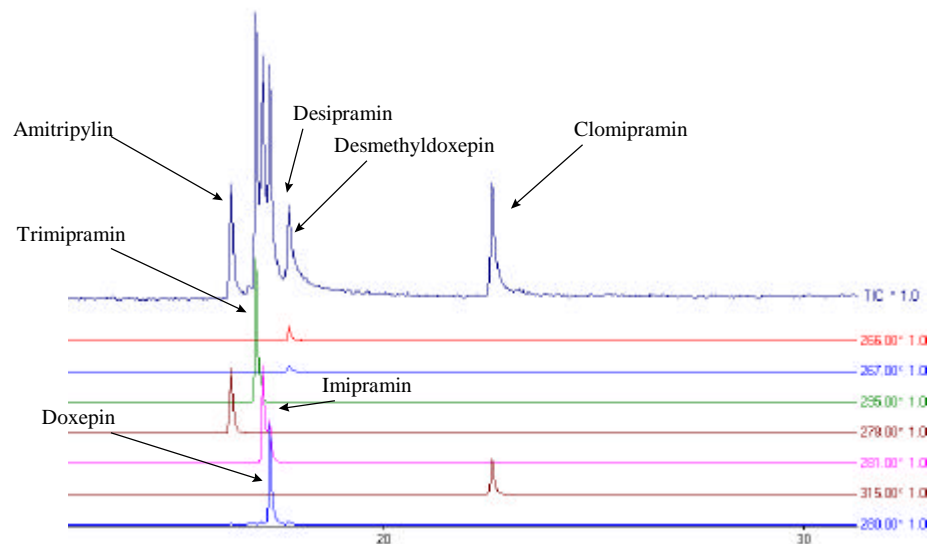


Abb. 3: Totalionenchromatogramm (TIC) der underivatisierten TCA Probe

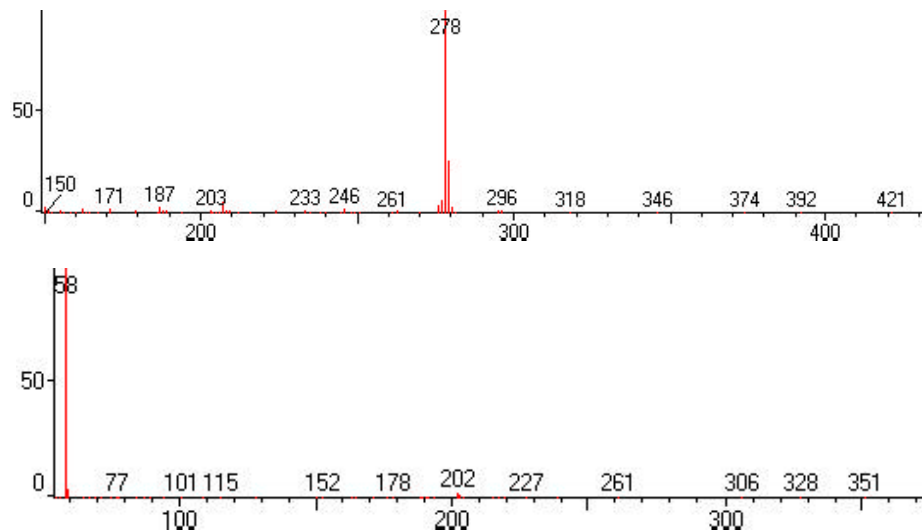


Abb. 4: Spektren von Amitriptylin im CI und EI Modus

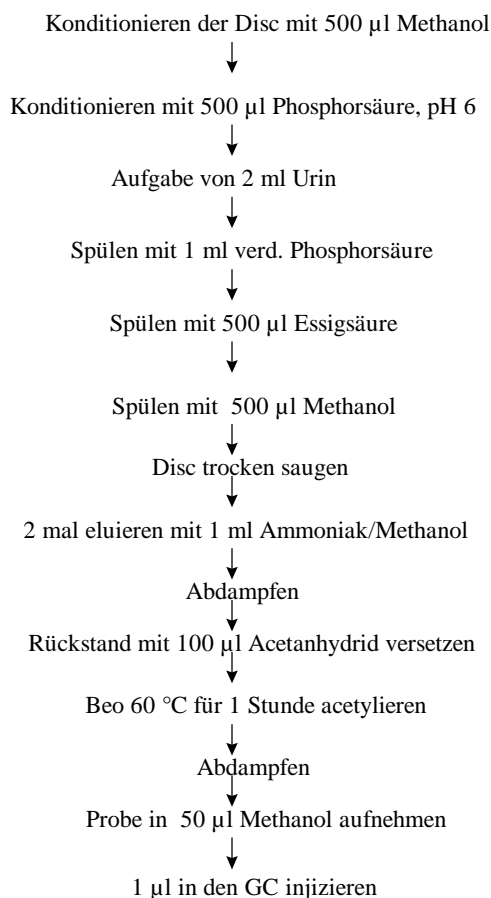
Methodenvalidierung

Für die Qualitätssicherung in einem klinischen Labor ist es wichtig, die Methode zu evaluieren und entsprechend zu dokumentieren. Zur Methodenvalidierung gehört die Bestimmung der nachfolgenden Parameter:

- Probenvorbereitung
- Nachweisgrenzen
- Bestimmungsgrenzen
- Linearität der Methode
- Inter Assay
- Intra Assay

Für ein Drogenscreening werden die Urinproben normalerweise über eine Fest-Phasen-Extraktion (FPE) aufgearbeitet. Hierzu können handelsübliche Mischbettkartuschen verwendet werden, z.B. Bond Eluat Certify. Zur Bestimmung der TCA wurden die Proben einmal über eine FPE aufgearbeitet und als Vergleich über eine Disc von Toxi-Lab. Toxi-Lab bietet spezielle Discs für die Analytik von Drogen an (Spec MP1). Der Vorteil ist hier der geringere Verbrauch an Lösemitteln, was zu einer Reduktion der Kosten für die Probenvorbereitung führt. In **Abb. 5** ist der Ablauf der Probenvorbereitung für die Discs dargestellt.

Abb. 5: Ablauf der Probenvorbereitung



Die Empfindlichkeit für TCA ist bei beiden Probenvorbereitungen vergleichbar. Die saubereren Extrakte werden jedoch mit der DISC gewonnen.

Für eine validierte Methode müssen Nachweisgrenzen bestimmt werden. Die Nachweisgrenze ist definiert als $S/N = 3:1$ (Signal/Rauschen) [3]. Für diese Applikation wurden die Substanzen im Selected-Ion-Monitoring (SIM) vermessen, mit einer Detektorspannung von 1.8 kV. Es kann eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden, wenn die Detektorspannung erhöht wird. Da im therapeutischen Bereich die Konzentrationen im Untersuchungsmaterial sehr hoch sind, wurde eine niedrigere Detektorspannung gewählt, um eine

Sättigung des Detektors zu vermeiden. Desweiteren wurde auf die hinteren drei TCA fokussiert, da der Response für diese Substanzen geringer ist, als für die ersten TCA. Amitriptylin, Trimipramin, Imipramin, Doxepin und Clomipramin werden nicht derivatisiert, wohingegen Nortriptylin, Desmethyldoxepin und Desipramin acetyliert werden. Für die hinteren drei TCA konnte eine Nachweisgrenze von 1 ng/ml in Urin erreicht werden. Diese Nachweisgrenze deckt den therapeutischen Bereich sicher ab. Abb. 6 zeigt die Ionsets für die entsprechenden Substanzen. Hier wurde im EI Modus gemessen, da viele Massenspektrometer in klinischen Laboratorien nicht mit einer CI-Option ausgestattet sind.

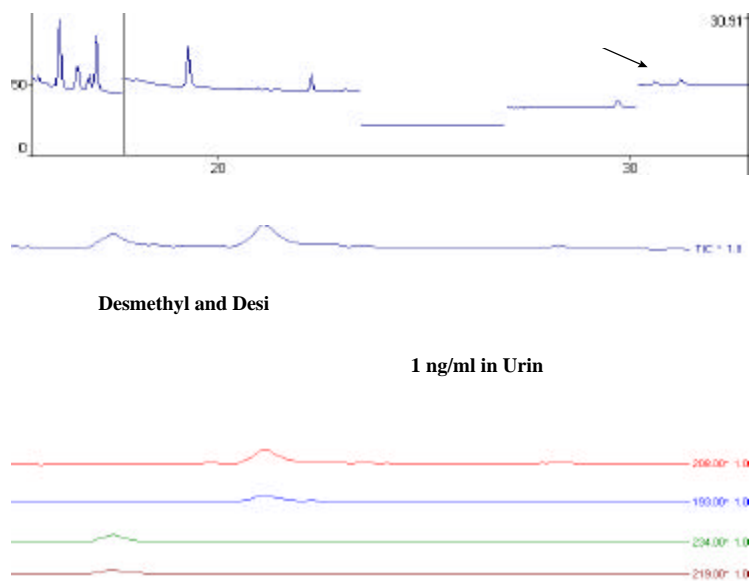


Abb. 6: Ionsets für die entsprechenden Substanzen

Die Bestimmungsgrenze ist definiert als S/N 6:1 [3]. Zur Erfassung der Bestimmungsgrenze wurde wieder mit einer Detektorspannung von 1.8 KV gearbeitet und auf die acetylierten TCA fokussiert. Auch hier könnten mit einer entsprechenden Erhöhung der Detektorspannung bessere Bestimmungsgrenzen erreicht werden. Die letzten TCA könnten zusätzlich verstärkt werden, in dem die Detektorspannung über ein Event Programm erhöht wird. Da aber eine höhere Empfindlichkeit für den therapeutischen Bereich nicht nötig ist, wurde hier auf ein entsprechendes Programm verzichtet. Es konnte eine Bestimmungsgrenze von 5 ng/ml in Urin erreicht werden.

Für eine validierte Methode müssen neben Nachweis- und Bestimmungsgrenzen Wiederfindungsraten und der lineare Bereich überprüft werden. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden methanolische Standards neben einem gespikten Poolurin vermessen. Für die ersten fünf TCA konnten unter Verwendung der Discs Wiederfindungsraten besser als 90 % verzeichnet werden. Diese Wiederfindungsraten setzen sich aus jeweils 20 Meßwerten zusammen. Für die

hinteren TCA konnten Wiederfindungsraten besser als 84 % gemessen werden. Hier kommt als zusätzliches Kriterium noch die Acetylierung hinzu. Wir gehen generell davon aus, daß die TCA zu 100 % acetyliert werden, da entsprechende underivatisierte Massen im SIM nicht bestätigt werden konnten. Zur Überprüfung des Derivatisierungsgrades wurden die Proben mit CI vermessen, um mögliche Coelution über die Molekülonen auszuschließen.

In Abb. 7 ist die Eichkurve zur Überprüfung der Linearität für Nortriptylin dargestellt. In einem Bereich zwischen 1 ng/ml und 100 ng/ml ist die Kurve linear. Ebenfalls zwischen 100 ng/ml und 1000 ng/ml.

Die Quantifizierung der Substanzen im EI Modus ist schwierig, da die verfügbaren internen Standards ebenfalls sehr uncharakteristisch fragmentieren. Bei einem Deuterierungsgrad von d3 bedeutet das für Doxepin beispielsweise, daß für die native Substanz m/z 58 die einzige Quantifizierungsmasse ist und m/z 61 für die deuterierte Substanz.

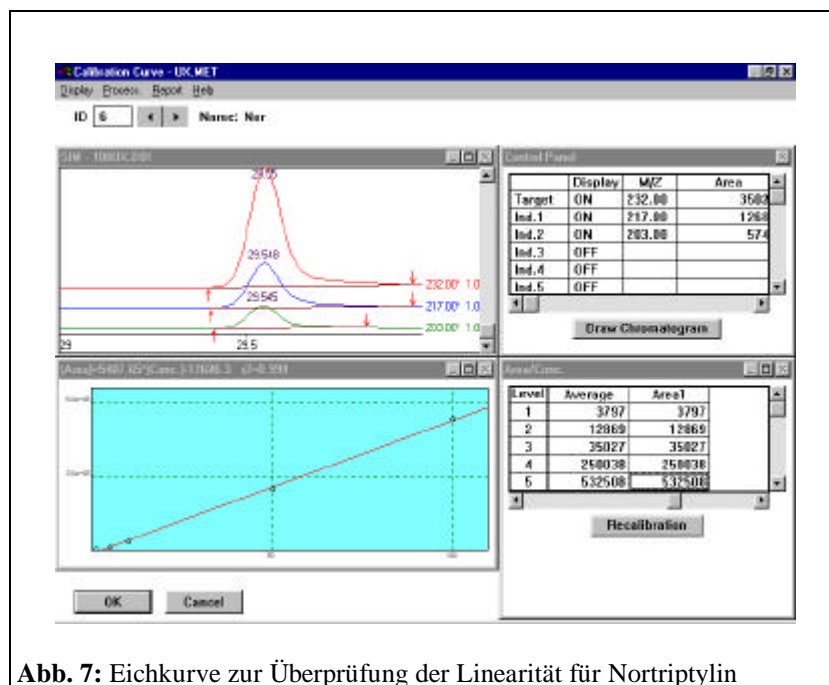


Abb. 7: Eichkurve zur Überprüfung der Linearität für Nortriptylin

Abb. 8 zeigt die für den vorderen Retentionsbereich verwendeten Massenspektren, sowie einen deuterierten Standard der Firma Radian, wo die Deuterierung an einer Abgangsgruppe vorgenommen wurde. Die charakteristischen hohen Massen können hier nicht gescannt werden, da beide Spektren die Massen enthalten. Hier wird man limitiert auf eine einzelne Masse im unteren Bereich. Speziell für die MS im EI Modus sind solche Standards denkbar ungeeignet. Geeigneter wären evt. C-13 gelabelte Standards.

Die großen Abweichungen bedingt durch die niedrigen Massen, zeigen sich auch in der Standardabweichung bei den Inter und Intra Assays. Beim Inter Assay wird ein gepoolter Urin am gleichen Tag mehrfach aufgearbeitet und vermessen. Aus den einzelnen Werten errechnen sich dann der Mittelwert, die Standardabweichung, die Variation, Varianz und die relative Standardabweichung. Für diese Applikation wurden jeweils

zehn Messreihen für die Kalkulation berücksichtigt. Die größten Standardabweichungen von über 8 % wurden bei den Substanzen mit uncharakteristischen Massen im EI Modus berechnet. Für die anderen Substanzen lagen die Standardabweichungen zwischen 5.6 % und 7 %. Es wurde mit insgesamt drei deuterierten internen Standards gearbeitet (Trimipramin d3, Doxepin d3 und Nortriptylin d3). Mit CI können deutlich bessere relative Standardabweichungen berechnet werden, da hier nur mit charakteristischen Molekülonen gearbeitet wird.

Für einen Intra Assay wird der gleiche Urin an 10 (oder mehr) Tagen jeweils 10 mal aufgearbeitet und vermessen. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Tage werden hierbei verglichen. Für diese Applikation wurde der Urin jeweils alle zwei Tage aufgearbeitet. Die durchschnittlichen relativen Standardabweichungen lagen zwischen 10 % und 12 %.

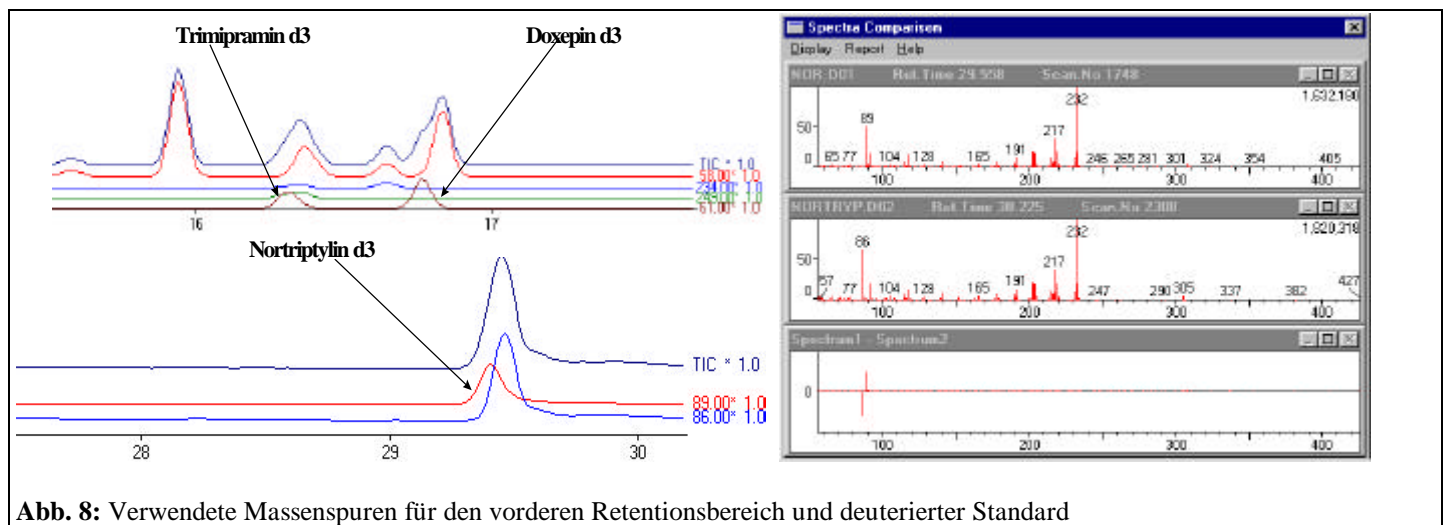


Abb. 8: Verwendete Massenspektren für den vorderen Retentionsbereich und deuterierter Standard

Messung von Realproben

Abschließend wurden unterschiedliche Proben mit der beschriebenen Probenvorbereitung aufgearbeitet und im EI und CI Modus vermessen. Abb. 9 zeigt einen Urin, aufgenommen mit der Fast-GC/MS (Application Note

GC/MS 37) und die Bibliothekssuche für das Spektrum. Die Bibliothek kann hier keine eindeutige Zuordnung machen, da das TCA kein charakteristisches Spektrum hat.

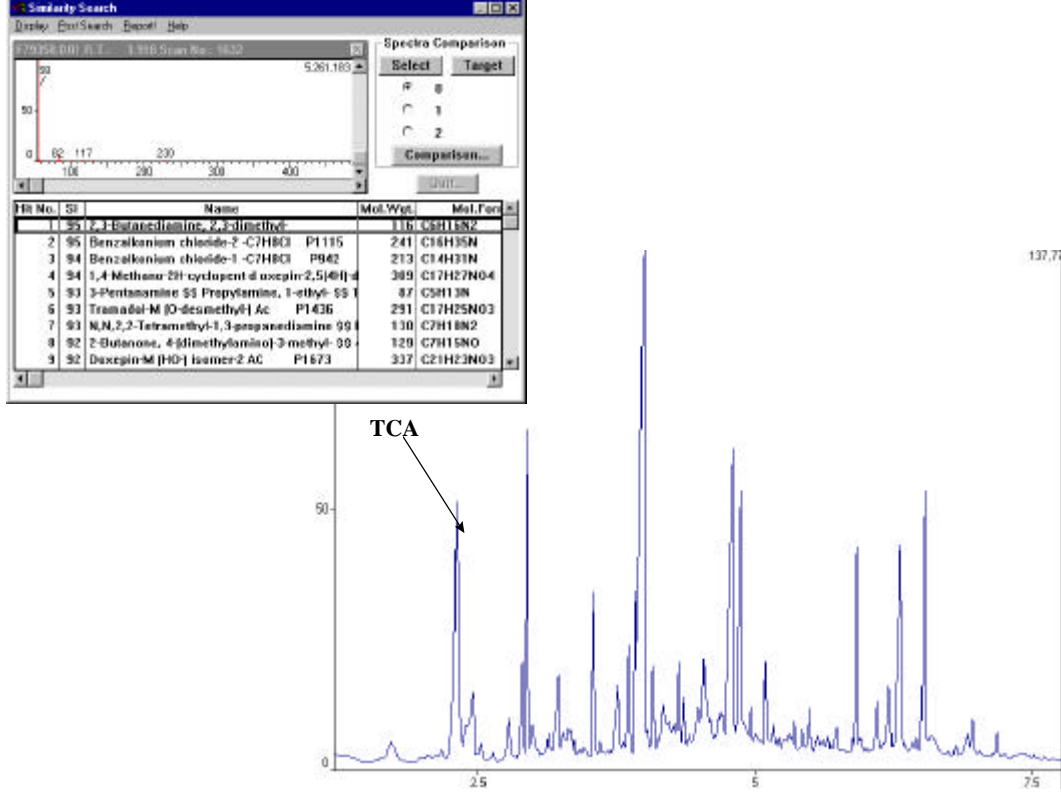


Abb. 9: Urin, aufgenommen mit Fast-GCMS und Bibliothekssuche für das Spektrum

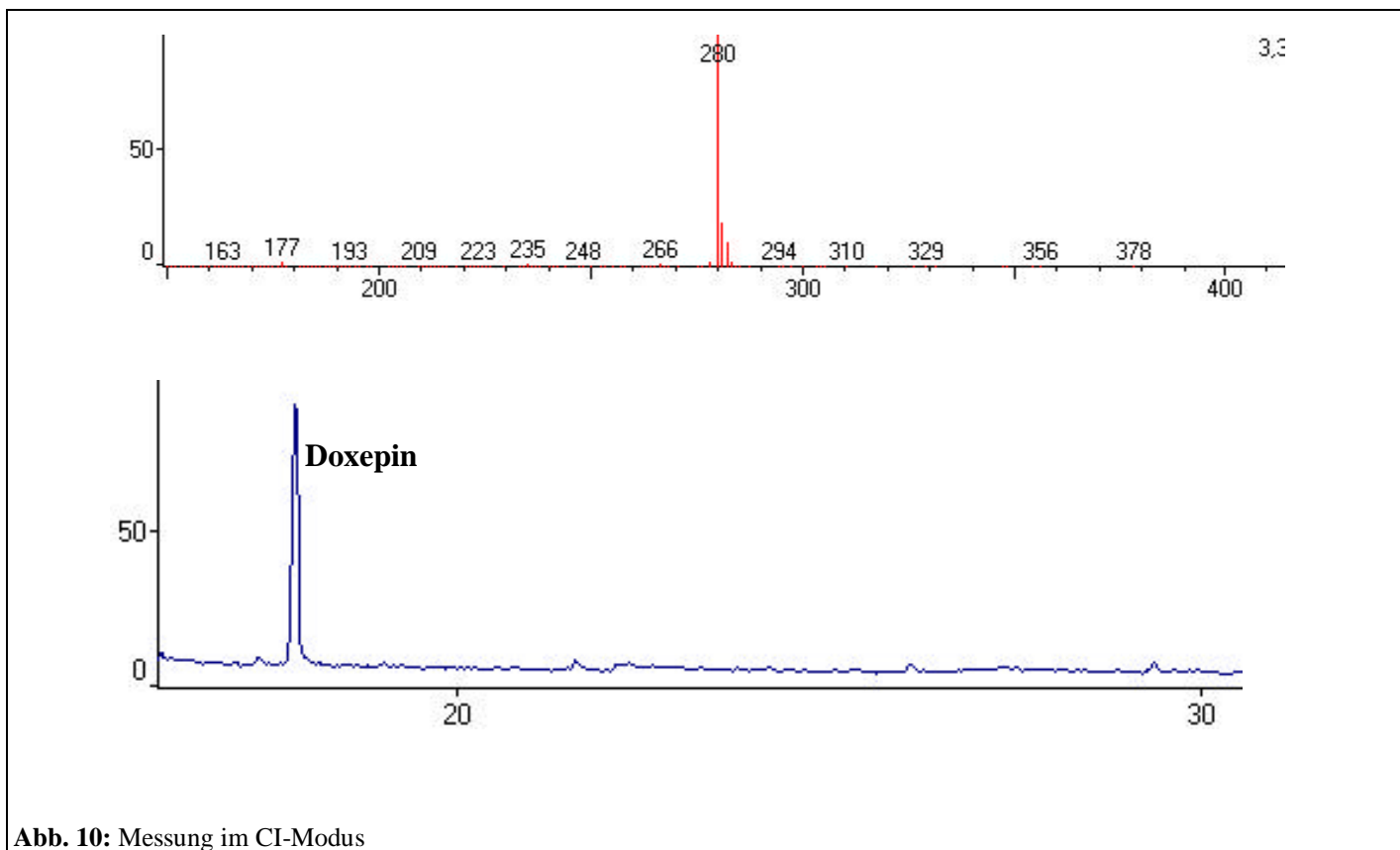


Abb. 10: Messung im CI-Modus

Instrumentierung/ Chromatographische Bedingungen

GC/MS System: EI QP-5000, CI QP-5050A
 Gaschromatograph: GC-17A
 GC/MS Software: CLASS-5000, NIST 75.000, PMW-TOX2
 Trägergas: Helium
 Reaktandgas CI: Ammoniak
 Säule: DB-5MS; 30 m; 0.25 mm I.D.; 0.25 µm Film; J&W Scientific
 Temperaturprogramm: 60 °C/ 1 min, mit 40 °C/min auf 200 °C, mit 2 °C/min auf 250 °C/ 3.5 min
 Druckprogramm: 33 kPa/ 1min, mit 18 kPa auf 114 kPa, mit 1.2 kPa auf 142 kPa/ 4.2 min
 Splitlesszeit: 1 min
 Injektortemperatur: 250 °C, silanisiertes Insert
 Detektortemperatur: 250 °C
 Injektionsvolumen: 1 µl
 Mass Range: EI 55-499 Dalton; CI 150-499 Dalton
 Scan Intervall: 0.5 sec
 Detector Volts: 1.8 kV

Literatur:

- [1] Screening von Drogen und Arzneimitteln mit Immunoassays, -Ein Leitfaden für die Praxis-, Abbott Firmenschrift, 2. Auflage 1993, Dr. H. Schütz
- [2] Drug Monitoring; Leitfaden für die klinische Praxis; 2. Auflage; Abbott Firmenschrift
- [3] DIN 32645; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Programm der Fh aalen, M .Kolb; A. Bahr; S. Hippich, W. Schulz