

Identifizierung und Interpretation von Wirkstoffmetaboliten in der systematischen toxikologischen Analyse unter Verwendung der HPLC mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) und der Flüssigchromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-TOF-MS)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apotheker Abdulsallam Bakdash

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. F. Pragst

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M.F. Melzig

Disputation am: 04.07.2011

Danksagung:

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pragst für die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas und die hervorragende fachliche Unterstützung während der gesamten Promotionsarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Melzig vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin danke ich für die freundliche Hilfe in fachlichen und organisatorischen Fragen.

Ein weiterer Dank geht auch an Herrn Dr. Hallbach und Herrn Dr. von Meyer und die Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie am Klinikum Schwabing, München, für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Charité, auch über die Abteilung Toxikologische Chemie hinaus, die in kollegialer Zusammenarbeit dazu beigetragen haben, diese Arbeit erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Besonderer Dank geht in dieser Beziehung an Frau Dr. Herre und dem ehemaligen Kollegen Herrn Dr. Nadulski.

Danken möchte ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Frau und meinen Kindern für die Geduld und das große Verständnis für meine Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	5
2.1 Metabolismus von Wirkstoffen	5
2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD)	9
2.2.1 Funktionsprinzip und Anwendung in der systematischen toxikologischen Analyse	9
2.2.2 Metabolite in der HPLC-DAD	10
2.3 Flüssigchromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-MS TOF)	13
2.3.1 Probenvorbereitung für LC-TOF-MS	13
2.3.2 Anforderungen in die Flüssigchromatographie für LC-TOF-MS	15
2.3.3 Ionisation in der LC-MS	18
2.3.3.1 Elektrosprayionisation (ESI)	18
2.3.3.2 Chemische Ionisation unter atmosphärischem Druck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	20
2.3.3.3 Collision Induced Dissociation CID	21
2.3.3.4 Fragmentierung in der Ionenquelle (In-source CID)	23
2.3.3.5 Ionen in der ESI-MS	24
2.3.4 Flugzeit-Massentrennung (Time of flight, TOF)	25
2.3.4.1 Lineares TOF	25
2.3.4.2 Verzögerte Extraktionen von Ionen	27
2.3.4.3 Reflektor TOF-Instrumente	28
2.3.4.4 Orthogonal Beschleunigung im TOF Massenspektrometer	29
2.3.4.5 Q-TOF	30
2.3.4.6 Leistungsfähigkeit moderner LC-TOF-MS-Geräte	31
2.4 Literaturbeispiele für die Anwendung von LC-TOF/MS in der forensisch-toxikologischen Analyse	32
2.5 Identifizierung von Metaboliten durch LC-TOF-MS	36

3. Experimenteller Teil	41
3.1 Verwendete Instrumente	41
3.1.1 HPLC-DAD-Systeme	41
3.1.2 GC/MS-System	41
3.1.3 LC-TOF-MS Systeme	42
3.1.4 Laborgeräte	43
3.2 Verwendete Chemikalien und Lösungen	44
3.2.1 Chemikalien	44
3.2.2 Lösungsmittel	44
3.2.3 Pufferlösungen	45
3.3 Probenmaterialien und Probenvorbereitung	46
3.3.1 Probenmaterial	46
3.3.2 Saure und basische Extraktion von Blutproben	46
3.3.3 Saure Extraktion von Blutproben mit Ethylacetat	47
3.3.4 Proteinfällung von Blutproben mit Acetonitril	47
3.3.5 Aufarbeitung von Urinproben	48
3.3.6 Aufarbeitung von Organ- und Muskelproben	48
3.4 Durchführung der Messungen	49
3.4.1 HPLC-DAD	49
3.4.2 LC-MS-TOF	50
4. Ergebnisse und Diskussion	52
4.1 Untersuchungsschema zur Identifizierung von Metaboliten ausgewählter Wirkstoffe	52
4.2 Amprenavir	57
4.3 Citalopram	71
4.4 Clozapin	83
4.5 Diphenhydramin	101
4.6 Flecainid	112
4.7 Ketamin	121
4.8 Amitriptylin	136
4.9 Levomeprazin	140

4.10 Mirtazapin	145
4.11 Quetiapin	148
4.12 Saquinavir	152
4.13 Sertralin	154
4.14 Venlafaxin	157
4.15 Verapamil	160
4.16 Charakterisierung von Metaboliten im Überblick	164
4.16.1 Desalkylierung	164
4.16.2 Oxidative Desaminierung	166
4.16.3 Oxidation am Kohlenstoff	167
4.16.3.1 Hydroxylierung	167
4.16.3.2 Epoxidierung	169
4.16.4 Oxidation am Stickstoff	171
4.16.5 Oxidation am Schwefel	173
4.16.6 Dehalogenierung	175
5. Schlussfolgerungen	176
6. Zusammenfassung	180
7. Literaturverzeichnis	185
8. Publikationsverzeichnis	197
9. Lebenslauf	199

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Atmosphärendruck Chemische Ionisation)
API	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Atmosphärendruck Ionisation)
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization (Atmosphärendruck Photoionisation)
Btm	Betäubungsmittel
CE-TOF	Capillary Electrophoresis-Time-of-Flight
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
CLND	Chemiluminescent Nitrogen Detector, Chemilumineszenz-Stickstoffspezifischer Detektor
CRM	Charge Residue Model
CYP	Cytochrome P450
DAD	Dioden-Array-Detektor
DE	Delayed Extraction
EI	Electron Ionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESI	Elektrospray Ionisation
FFR	feldfreien Region
FWHM	Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite
GC	Gaschromatographie
H/D	Hydrogen-deuterium exchange
HEPT	the height equivalent to a theoretical plate, Höhe äquivalent einer theoretischen Trennstufe
HPLC / LC	High Performance Liquid Chromatography (Hochdrucks-flüssigkeitchromatographie)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography , Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
IDA	Information Dependent Acquisition
IEM	Ionen- Evaporation-Modell
ITMS	Ion trap mass spectrometers, Ionenfallen-Massenspektrometer
LLE	Liquid-Liquid-Extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MPPH	5-(4-Methylphenyl)5-phenylhydantoin
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Oa	orthogonal acceleration
PAHs	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
ppm	parts per million , Teil von einer Million

PPT	Proteinfällung
Q	Quadrupol
Rf	Retentionsfaktor
RRT	Relative Retentionszeit (Relative Retention Time)
RT	Absolute Retentionszeit (Absolute Retention Time)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
S/N	Signal to Noise (Signal-Rausch-Verhältnis)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
STA	Systematische Toxikologische Analyse
T₀	chromatographische Totzeit
TLC	Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography)
TOF	Time-of-Flight
UPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett, UV-Spektroskopie

1. Einleitung:

Metabolische Studien sind von wesentlicher Bedeutung für die Beurteilung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit von Arzneimitteln. Solche Studien ergeben ein besseres Verständnis der Wirkungsweise, der Toxizität, und der Interaktion mit anderen Medikamenten. Sie erklären auch die biochemischen Reaktionsmechanismen, die an der Biotransformation und der Toxizität der Wirkstoffe beteiligt sind [1].

In der forensischen Toxikologie ist die Kenntnis der metabolischen Prinzipien von Bedeutung, um die richtige Wahl einer biologischen Probe für die Analyse zu treffen und um die Anwesenheit und Konzentration der Metabolite einer Substanz aus den Ergebnissen der toxikologischen Untersuchungen zu interpretieren. Der Nachweis von Metaboliten bei klinischen oder postmortalen Proben ist ein wichtiger Beweis für die Exposition mit der Muttersubstanz - insbesondere wenn diese selbst nicht mehr nachweisbar ist.

General-Unknown-Analysen sind eine fortlaufende Herausforderung der klinischen und forensischen Toxikologie [2]. Diese Herausforderung wird mit einem gut geplanten, und systematischen analytischen Ansatz - der systematischen toxikologischen Analyse (STA) - umschrieben und beinhaltet die Anwendung einer geeigneten analytischen Strategie für die Suche nach potentiell toxischen Verbindungen und deren Metaboliten in biologischen Proben.

Der Prozess der STA umfasst die Probenahme, die Probenvorbereitung, die Auftrennung der Bestandteile, sowie deren Identifizierung und Quantifizierung. In der forensischen Toxikologie muss wegen der schwerwiegenden rechtlichen Folgen gerichtlicher Fälle besondere Betonung auf die Qualität und die Zuverlässigkeit analytischer Ergebnisse gesetzt werden.

In der systematischen toxikologischen Analyse ist die eindeutige Identifizierung von Metaboliten sehr wichtig, weil dieses die Richtigkeit der qualitativen Ergebnisse erhöht und man zudem häufig zusätzliche Informationen über die Art und Weise und den Zeitpunkt der Giftdarreichung erhält. Darüber hinaus können Metabolite wesentlich zu den toxischen Wirkungen beitragen. Mögliche Aussagen aus der Anwesenheit und der Konzentrationen von Wirkstoffmetaboliten, die für forensische wie für klinische Fragestellungen in gleicher Weise nützlich sein können, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Angaben zur Art der Aufnahme.

- Identifizierung der aufgenommenen toxischen Substanz, wenn nur noch Metabolite nachweisbar sind oder unter Nutzung der Metabolite als zusätzliches Identifizierungskriterium.
- Abschätzung der aufgenommenen Menge der toxischen Substanz oder zu deren vorher im Blut vorhanden gewesenen Konzentration aus Konzentrationsangaben der Metabolite.
- Angaben zum zeitlichen Verlauf der Vergiftung aus den Konzentrationsverhältnissen von Wirkstoff zu Metabolit oder der Metaboliten untereinander. Hier ist vor allem der Zeitpunkt der Giftaufnahme vor der Probenentnahme, bzw. bei Todesfällen die Überlebenszeit nach der Giftaufnahme von Interesse.

Bei therapeutischen oder subtherapeutischen Dosen sind die Wirkstoffe in biologischen Proben (z. B. Blut oder Urin) in der Regel in sehr niedrigen Konzentration enthalten, aber ihre primäre Metabolite können in höheren Konzentrationen vorliegen. Der Nachweis von Metaboliten wird bei jenen Wirkstoffen wichtig, die bei niedrigen Dosen/Konzentrationen wirksam sind und/oder extensiv durch die First Pass Biotransformation abgebaut werden, wie zum Beispiel Diltiazem [3].

Techniken, die derzeit hauptsächlich zur STA in der klinischen und forensischen Toxikologie angewendet werden sind: Immunoassays, Dünnschichtchromatographie (TLC), Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC), Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) mit UV- oder Diodenarray-Detektion (LC-UV oder LC-DAD) und die Gaschromatographie (GC) mit verschiedenen Detektoren, insbesondere mit der Massenspektrometrie.

Immunoassays werden meist als einleitendes Screening angewendet. Positive Ergebnisse müssen mit anderen Techniken bestätigt werden. Der Vorteil der klassischen TLC ist die einfache und kostengünstige Instrumentierung [4]. Sie eignet sich für viele Arten von Verbindungen. Jedoch fehlt die Spezifität, auch wenn korrigierte Rf-Werte, in-situ-UV-Spektren und Farbreaktionen für die Identifikation benutzt werden.

Die GC mit Stickstoff-selektivem Detektor wurde - vor allem für das Screening von häufig eingesetzten Medikamenten - die Methode der Wahl. Die GC gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-MS) hat sich aufgrund ihrer großen Anwendungsbreite für verdampfbare oder gasförmige Substanzen und wegen der hohen chromatographischen Trennleistung von Kapillarsäulen in vielen Bereichen der analytischen Chemie, unter anderem auch in der forensischen Toxikologie, bewährt [5].

Die hohe Trennleistung, die Spezifität und Reproduzierbarkeit der EI-Massenspektren und die sehr umfangreichen spektralen Bibliotheken sind die wichtigsten Vorteile des GC-MS, auch wenn ihre Eignung für polare, thermolabile oder hochmolekulare Verbindungen eingeschränkt ist. Darüber hinaus ist die Vorbereitung der Probe, die neben der Extraktion auch oft eine Derivatisierung erfordert, häufig komplex und zeitaufwendig. Die LC hat den Vorteil, auch für schwerflüchtige und thermolabile Verbindungen angewendet werden zu können, da die Verbindungen nur in einem geeigneten Lösemittel löslich sein müssen. Allerdings ist die Trennleistung begrenzt. Für eine zuverlässige Identifizierung ist ein spezifisches Nachweisverfahren wie das UV-Spektrum in der HPLC-DAD [6] oder das Massenspektrum in den verschiedenen LC-MS-Kopplungen [7,8] erforderlich.

Seit der Einführung der Ionisation unter atmosphärischen Druck (Atmospheric Pressure Ionization, API) Mitte der 1970er Jahre [9,10], welche eine einfache Kopplung der Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer ermöglichte, wurden die LC-MS-Systeme zu einer der Hauptstützen der Analyse von Drogen und Medikamenten, sowie ihrer Metaboliten.

In neuerer Zeit ermöglichten es die linearen Ionen-Trap (LIT) und die Time-of-Flight (TOF) Massenspektrometer [11,12], die eine noch höhere Empfindlichkeit und Selektivität besitzen, die elementare Zusammensetzung (Summenformel) von monoisotopischen Molekülionenpeaks und ihre Fragment-Ionen aus der exakten Masse zu berechnen. Mit Verbesserungen der Kontroll- und Auswertungssoftware werden LC-TOF-MS-Systeme in der Zukunft eine immer größere Rolle bei Metabolismusstudien und Biomarker-Identifizierung spielen.

Die hochaufgelöste Massenspektrometrie nach Elektrospray-Ionisierung (ESI) oder die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) erleichtern die Erkennung von Wirkstoffen und Metaboliten in biologischen Proben. Viele Biotransformationsreaktionen, z.B. Oxidation, Hydroxylierung, Desalkylierung, Hydrolyse und Reduktion können erkannt werden. Weitere Bestätigungen und/oder Strukturaufklärungen der Metaboliten sind mit der Vielfalt der MS-MS-Plattformen oder durch LC-MS/MS mit Fragmentierung durch Kollisionsinduzierte Dissoziation (ESI-CID) möglich.

In dieser Promotionsarbeit soll die Rolle der Metabolite in der systematischen toxikologischen Analyse durch kombinierte Anwendung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) und der Flüssigchromatographie-Flugzeit-

Massenspektrometrie (LC-TOF-MS) auf akute überlebte Vergiftungsfälle und auf Todesfälle untersucht werden. Dabei waren folgende Aufgaben zu lösen:

- Vergleichende Untersuchung einer großen Zahl von Blutproben von Vergiftungsfällen mittels HPLC-DAD und LC-TOF-MS. Hierbei war das im Institut für Rechtsmedizin der Charité entwickelte System von Probenaufbereitung und HPLC-DAD Untersuchung [6] zu nutzen.
- Vergleich der durch HPLC-DAD und LC-TOF-MS in der STA erhaltenen Chromatogramme und Zuordnung von HPLC-DAD Peaks zu bestimmten Metaboliten mit Hilfe der MS Spektren.

2. Theoretischer Teil

Die vorliegende Arbeit basiert einerseits auf den Grundlagen zum Metabolismus toxischer Substanzen im menschlichen Körper und erfordert andererseits den Einsatz spezieller analytischer Verfahren. Daher sollen in diesem Kapitel die wesentlichen Prinzipien der Biotransformation von Wirkstoffen und die Funktionsweise der HPLC-DAD und der LC-TOF-MS als Voraussetzung für das Verständnis der Arbeit auf der Basis der aktuellen Literatur dargelegt werden.

2.1 Metabolismus von Wirkstoffen

Ein Wirkstoff (Medikament oder Gift) durchläuft im menschlichen Körper folgende Stufen: Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (Englisch ADME-Konzept: Absorption, Distribution, Metabolization and Excretion) [13]. Die Teilschritte sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

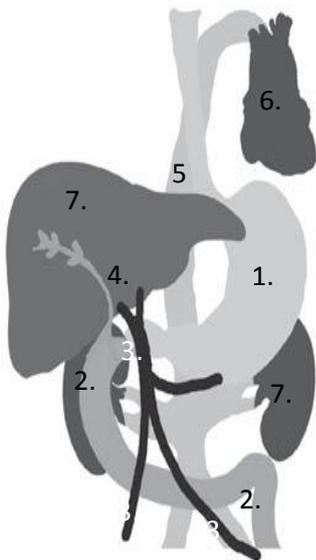
Das Ziel des Metabolismus ist, in die Wirkstoffe hydrophile Gruppen einzufügen, so dass sie besser wasserlöslich werden und leichter durch die Nieren ausgeschieden werden können. Geeignete strukturelle Änderungen der Wirkstoffmoleküle erhöhen ihre Wasserlöslichkeit, verringern ihre Fettlöslichkeit und beschleunigen die Geschwindigkeit der Ausscheidung mit dem Urin. Die Biotransformationenprozesse lassen sich in zwei Phasen (I und II) teilen, die häufig, aber nicht immer, sequenziell auftreten [14-16]. Der Phase-I-Metabolismus wird dominiert von der microsomalen mischfunktionalen Monooxygenase, dem Cytochrom P450. Es ist bekannt, dass dieses System sowohl am Stoffwechsel endogener Verbindungen (Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Fettsäuren, Prostaglandine) als auch an der Biotransformation von Wirkstoffen (oder anderen Xenobiotika) beteiligt ist [17-20].

Die Reaktionen verlaufen unter Mitwirkung von Diphosphat. Das Enzym Cytochrom P450 (CYP) befindet sich in Mikrosomen von vielen Zellen insbesondere der Leber, der Niere, der Lunge und des Darms, und katalysiert viele unterschiedliche Funktionalisierungsreaktionen. Es besteht aus einer größeren Anzahl von Isoenzymen, die in Familien und Subfamilien unterteilt sind.

Der Cytochrom-P450-abhängige Stoffwechsel von Medikamenten und Xenobiotika im Menschen wird in erster Linie durch Enzyme der CYP1, CYP2, CYP3 und CYP4 Familien vermittelt. Beim Menschen ist die CYP3A4-Isoform am häufigsten, die ungefähr 30% der spektroskopisch nachweisbar Cytochrom P450 in der Leber ausmacht. CYP1A2 repräsentiert 13%, CYP2A6 4%, die CYP2C-Enzyme 20%, CYP2D6 2% und CYP2E1 7%

[21]. Die Wichtigkeit der Isoformen im Wirkstoffmetabolismus hängt nicht nur von ihrem Vorkommen ab, sondern auch von dem Ausmaß, in dem ihre Substratspezifität mit den praktisch auftretenden Arzneimitteln und Xenobiotika übereinstimmt.

Oral aufgenommener Wirkstoff



1. Magen
 - Auflösung
 - Beginnende Absorption
2. Duodenum und Dünndarm
 - Absorption
 - pre-systemische Metabolisierung
3. Pfortader, direkter Stofftransport zur Leber
4. Leber
 - pre-systemische (Leber) Metabolisierung (First-Pass-Metabolismus)
 - pre-systemische Ausscheidung (Galle)
5. Lebervene zu Hohlvene
6. Herz: Systematische Zirkulation, Transport zu allen Organen
7. Niere und Leber
 - post-systematische Metabolisierung
 - post-systemische Ausscheidung mit Urin und Galle.

Abbildung 2.1: Körperpassage oral aufgenommener Wirkstoffe (ADME-Konzept: Absorption, Distribution, Metabolization and Excretion Konzept).

CYP3A4, CYP2D6 und die CYP2C Enzyme sind für den Großteil der Stoffwechsel von Arzneimitteln zuständig, jedoch können andere Isoformen eine entscheidende Rolle mit spezifischen Substraten spielen. In der Praxis nimmt man an, dass CYP3A4 etwa 50% des gesamten P450-abhängigen Arzneimittel-Metabolismus katalysiert, CYP2D6 und CYP2C9 jeweils etwa 15%, und die restlichen Enzyme, insbesondere CYP2E1, CYP2C19, CYP2C8, CYP2B6, CYP2A6, CYP1B1, CYP1A2 und CYP1A1, für den kleinen verbleibenden Prozentsatz [22-24].

Die relative Bedeutung der verschiedenen Isoenzyme hängt von der Genetik der Individuen und von der Geschichte der Exposition gegenüber Umweltfaktoren wie Alkohol oder Arzneimitteln ab. Bestimmte P450-Enzyme, insbesondere CYP2C19 und CYP2D6, sind in der menschlichen Bevölkerung polymorph verteilt [22,25]. So sind CYP2D6 nur in ca. 7% der kaukasischen Bevölkerung anzutreffen, und die Fähigkeit, in dieser Untergruppe Substrate wie Debrisoquin zu metabolisieren ist teilweise beeinträchtigt [26].

Häufige Phase I-Metabolisierungsreaktionen sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt, wobei die Änderung der Summenformel sowie der nominalen und der akkuraten Molmasse als Kriterien für die LC-TOF-MS-Untersuchung ebenfalls angegeben sind.

Tabelle 2.1: Häufige Phase I-Metabolisierungsreaktionen und die durch sie bedingten Änderungen in der Summenformel sowie der nominalen und der exakten Molmasse.

Reaktionstyp	Veränderung der Summenformel	Nominale m/z Veränderung	Exakte m/z Veränderung
Hydroxylierung/N-Oxidation/S-Oxidation	+ O	+16	+15,9949
Dihydroxylierung	+ 2O	+32	+31,9898
Dehydrierung der Reduktion	- H ₂	-2	-2,0156
Demethylierung	- CH ₂	-14	-14,0156
Deethylierung oder zweifache Demethylierung	- C ₂ H ₄	-28	-28,0312
Depropylierung	- C ₃ H ₆	-42	-42,0468
Oxidative Deaminierung	- NH ₃ + O	-1	-1,0316
Oxidative Dechlorierung	- Cl + OH	-18	-17,9662
Oxidative Defluorierung	- F + OH	-2	-1,9957
Hydratisierung	+ H ₂ O	+18	+18,0105
Methyl → Carbonsäure	- H ₂ + O ₂	+30	+29,9742

Die wichtigste Phase-I-Reaktion ist die Oxidation durch Einführung von Sauerstoff in das Substrat. Wie bereits beschrieben, handelt es sich um eine Monooxygenation bei der nur eines der beiden Atome des Sauerstoffmoleküls auf das Substrat übertragen wird. Auch die metabolische N- und O-Desalkylierung weisen als erste Stufe eine Sauerstoffübertragung auf das α -C-Atom der Alkylgruppe auf [17,19,20].

Die Phase-I-Enzyme sind fast ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Im Gegensatz dazu befinden sich die meisten Phase-II-Enzyme im Zytoplasma. Die Phase-I-Enzyme sind einzigartig in ihrer Fähigkeit zur Einführung von polaren funktionellen Gruppen in Moleküle, die grundsätzlich unpolar sind, wie gesättigte oder aromatische Kohlenwasserstoffe. Sie sind auch entscheidend für die Metabolisierung von lipophilen Verbindungen ohne geeignete funktionelle Gruppe für Konjugationsreaktionen. Auf der anderen Seite bewirken die Reaktionen, die durch die Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert werden, manchmal, dass relativ harmlose Substrate zu chemische reaktiven Giften oder krebserregenden Stoffen umgewandelt werden (metabolische Giftung) [18,19]. Beispiel ist das reaktive Zwischenprodukt mit Chinonimin-Struktur aus dem Stoffwechsel von Paracetamol, das die Hepatotoxizität von Paracetamol bedingt [27,28].

Produkte von Phase-I-Reaktionen können entweder pharmakologisch aktiv oder inaktiv sein. Sie sind in der Regel Substrate für Phase-II-Enzyme. In den Phase-II-Biotransformations-

Reaktionen, die auch als Konjugation bezeichnet werden, werden die Wirkstoffe oder ihre Metabolite typischerweise einer Knüpfung an hydrophile endogene Moleküle unterzogen wie Glucuronsäure, Sulfat und Glutathion.

Die entsprechenden Enzyme wie die Glucuronosyltransferase unterliegen ebenfalls einem genetischen Polymorphismus [29,30]. Ein Merkmal der meisten Konjugationsreaktionen ist der Austausch eines Wasserstoff-Atoms in einer Hydroxyl-, Amino- oder Carboxyl-Gruppe durch das endogene Molekül.

In der Regel haben die dabei entstehenden konjugierten Metabolite keine pharmakologische Aktivität, sind sehr gut wasserlöslich und werden daher leicht im Urin ausgeschieden. Diese Reaktionen sind in der Regel Detoxikations-Reaktionen. Wichtige Phase-II-Reaktionen sind Glucuronidierung, Sulphatierung, Acetylierung, und Konjugation mit Glutathion oder Aminosäuren [31-33].

Häufige Phase II-Metabolisierungsreaktionen sind in Tabelle 2.2 wiederum mit den entsprechenden Änderungen der Summenformel und der Molmasse zusammengestellt.

Tabelle 2.2: Häufige Phase II-Metabolisierungsreaktionen und die durch sie bedingten Änderungen in der Summenformel sowie der nominalen und der exakten Molmasse .

Reaktionstyp	Veränderung der Summenformel	Nominal m/z Veränderung	Exakte m/z Veränderung
Glucuronidierung	+C ₆ H ₈ O ₆	+176	+176,0321
Sulfatbildung	+SO ₃	+80	+79,9568
Glutathion-Konjugation	+C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	+305	+305,0681
	+C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	+307	+307,0837
Cysteine-glycine Konjugation	+C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	+178	+178,0410
Cysteine Konjugation	+C ₃ H ₇ N ₂ O ₂ S	+121	+121,0196
N-Acetyl-cysteine Konjugation	+C ₅ H ₉ NO ₃ S	+163	+163,0301

Die verschiedenen Metabolisierungsreaktionen führen zu Produkten, die sich von der Ausgangssubstanz charakteristisch in der Molmasse unterscheiden. Dieses wird in Abbildung 2.2 am Beispiel des Citaloprams deutlich. Während die Abspaltung einer Methylgruppe die Molmasse um 14 vermindert, steigt diese bei einer Hydroxylierung um 16 und bei einer Glucuronidierung um 176. Dieses nutzt man bei der Zuordnung von Metaboliten in der Massenspektrometrie [34] (Tabelle 2.3).

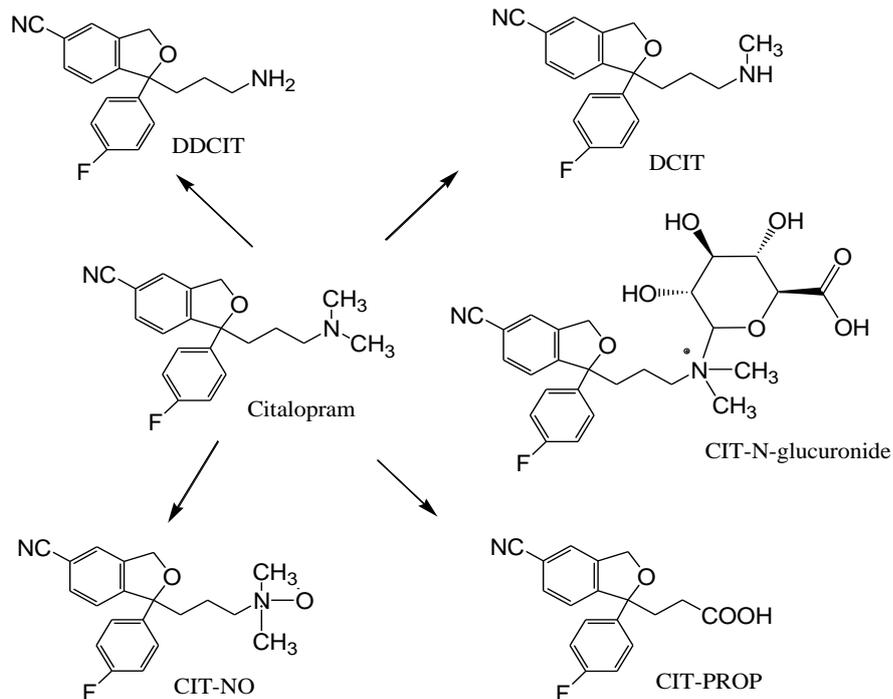


Abbildung 2.2: Metabolisierungsreaktionen von Citalopram.

Tabelle 2.3: Formelbeispiel für verschiedene Metabolisierungsreaktionen von Citalopram mit Molmassen.

Erwarteter Metabolit	Summenformel	Masse	charakteristischer m/z Unterschied
Citalopram	C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₂ F	324,16379	M
Desmethylcitalopram	C ₁₉ H ₁₉ N ₂ O ₂ F	310,14814	M-14
Didesmethylcitalopram	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₂ F	296,13249	M-28
Citalopram-N-Oxide	C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₂ F	340,15871	M+16
Citalopram- Propionsäure	C ₁₈ H ₁₄ NO ₃ F	311,09577	M-29
Citalopram-N-Glucuronid	C ₂₆ H ₃₀ FN ₂ O ₇ +	501,2032	MH+176

2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD)

2.2.1 Funktionsprinzip und Anwendung in der systematischen toxikologischen Analyse

HPLC-DAD ist eine der grundlegenden Techniken, die in forensisch- und klinisch-toxikologischen Labors benutzt werden. Da es sich um ein Verfahren handelt, das bereits lange in der toxikologischen Routinenanalytik eingesetzt wird, soll hier nur ein kurzer Überblick gegeben werden. Die Methode ist bekannt für ihre hohe Robustheit, einfache Handhabung, geringen Kapital- und Betriebskosten, exakte Reproduzierbarkeit der UV-Spektren und der Konzentrations-Extinktions-Beziehungen, geringe Empfindlichkeit gegenüber Störungen durch Matrix-Komponenten, wie Fettsäuren, Cholesterin und Kohlenhydrate, hohe Detektorempfindlichkeit und hohe Substanzspezifität der UV-

Spektren. Die Verwendung von HPLC-DAD in der systematischen toxikologischen Analyse (STA) wurde zum ersten Mal von Demorest et al. [35] und später in mehreren Publikationen beschrieben [36,37]. In der HPLC-DAD wird die Substanzidentifizierung auf der Grundlage des UV-Spektrums und über die Retentionszeit durchgeführt. Von diesen beiden Parametern ist das UV-Spektrum der spezifischere [38].

Für die Identifizierung einzelner Peaks im Chromatogramm werden die UV-Spektren und die Retentionszeiten mit einer Datenbank von toxikologisch relevanten Stoffen abgeglichen. Solche Datenbanken enthielten oft nur 100-600 Stoffe [36,39]. Die Ergebnisse in dieser Promotionsarbeit wurden unter Nutzung der UV-Spektren-Bibliothek von Pragst et al. mit 3300 Verbindungen bestimmt [40]. Eine Übersicht zur Probenvorbereitung, Durchführung der Messungen und Auswertung einschließlich Peakidentifizierung und einfacher Methoden zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung wurde von den gleichen Autoren publiziert [6] und befindet sich auch im Handbuch zu dieser Datenbank [40].

2.2.2 Metabolite in der HPLC-DAD

In den Chromatogrammen der Extrakte aus Blut-, Urin- und Organproben in der toxikologischen Analyse treten in der Regel neben dem Peak des Wirkstoffs mehrere Metabolitenpeaks auf. Nur eine kleine Zahl von ihnen ist mit Referenzspektren in der Spektrenbibliothek vorhanden und kann auf der Basis von UV-Spektrum und Retentionszeit identifiziert werden. Jedoch ist es auch ohne Referenzsubstanz häufig möglich, durch HPLC-DAD einen Peak einem Metaboliten über die Ähnlichkeit der UV-Spektren und eine charakteristische Verschiebung der Retentionszeit zuzuordnen [41,42]. Insgesamt können folgende Kriterien für die Zuordnung von Metaboliten herangezogen werden:

A - Steht der Metabolit als Referenzsubstanz zur Verfügung oder kann leicht beschafft werden, ist eine einfache Zuordnung möglich. Als Beispiel sind die Metabolite von p-Nitroanilin zu nennen, das im Körper zu p-Nitroacetanilid und 2-Hydroxy-4-nitroanilin umgewandelt wird. Diese Substanzen sind alle im Chemikalienhandel erhältlich.

B - Regelmäßiges Auftreten eines bestimmten Peaks neben dem Wirkstoffpeak bei Vergiftungsfällen mit dem Wirkstoff. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Metabolitenpeak. Zum Beispiel wurde bei 30 Vergiftungen mit Citalopram neben dem Peak der Ausgangssubstanz bei 7,11 min immer auch ein Peak mit der Retentionszeit von 7,06 min gefunden, der mit Hilfe weiterer Kriterien (UV Spektrum, Q_{RRT} und Massenspektrum) als Desmethylcitalopram identifiziert werden konnte.

C - Ähnlichkeit des UV-Spektrums mit dem des Ausgangswirkstoffs. Metaboliten haben identische oder sehr ähnlichen Spektren wie die Muttersubstanz, wenn die Metabolisierungsreaktion außerhalb des für die UV-Absorption zuständigen konjugierten Elektronensystems stattfindet. Dies ist z. B. der Fall für Hydroxylierung und N- oder O-Desalkylierung im aliphatischen Teil der Moleküle, z. B. Demethylierung des Doxepins. Aber auch Desalkylierung an N- oder O-Atomen des Chromophors (z. B. Bildung von Morphin aus Codein oder Nordazepam aus Diazepam) ändert das Spektrum nicht wesentlich. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.3a dargestellt. Eine deutliche Änderung des Spektrums kann hingegen beobachtet werden, wenn die Metabolisierungsreaktion zu einer Änderung des π -Elektronen-Systems des Chromophors führt, wie zum Beispiel im Falle von aromatischen Hydroxylierungen, Bildung der Sulfoxide aus Thioethern, der Reduktion von aromatischen Nitro- zu Amino-Gruppen oder der Oxidation von aromatisch gebundenem $-\text{CH}_3$ zu $-\text{COOH}$, Beispiel in Abbildung 2.3b [43].

D - Die Zuordnung eines Peaks zu einem bestimmten Metaboliten kann auch durch eine charakteristische Veränderung der Retentionszeit unterstützt werden [42].

Die Retentionszeit spielt allgemein eine große Rolle als HPLC-Kriterium bei der Substanzidentifizierung [44-50]. Für die reproduzierbare Charakterisierung wurde dabei häufig anstelle der absoluten Retentionszeit RT die relative Retentionszeit RRT verwendet, die sich auf einen Referenzstandard bezieht und um die Totzeit T_0 korrigiert wurde. Als Standardsubstanz wird bevorzugt 5-p-Methylphenyl-5-phenylhydantoin (MPPH) verwendet.

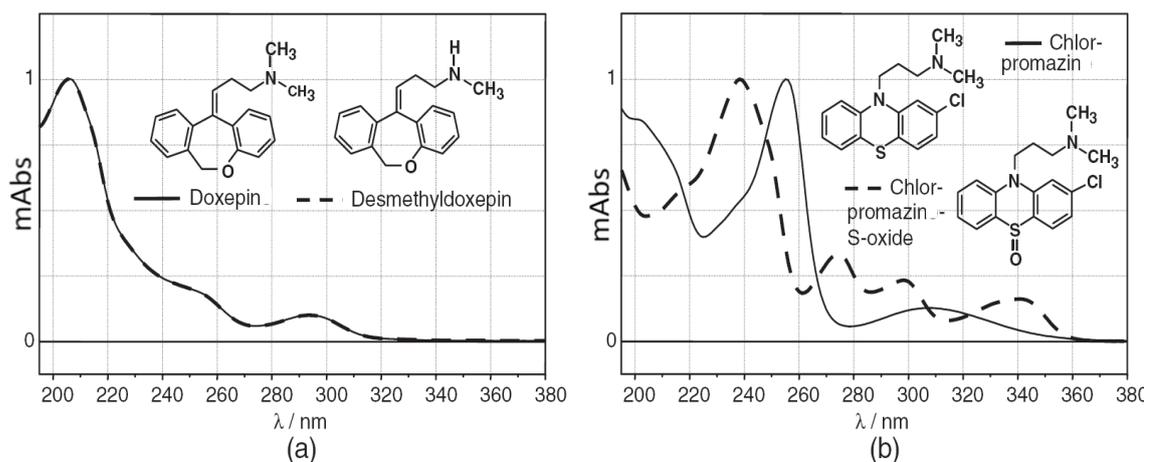


Abbildung 2.3: Vergleich der UV-Spektren von Wirkstoffen und deren Metaboliten. (a) Demethylierung von Doxepin an der isolierten Aminogruppe bewirkt keine Veränderung des UV-Spektrums (Similarity Index SI 1,0000). (b) Im Chlorpromazin ist das S-Atom Teil des Lichtabsorbierenden, konjugierten Elektronensystems. Oxidation zum S-oxid führt zu einer deutlichen Veränderung des Spektrums (SI 0,8838) [43].

Gleichung (2.1) mit $RRT_x =$ relative Retentionszeit der Substanz X, bezogen auf den Standard S, $RT_x =$ absolute Retentionszeit von X, $RT_s =$ absolute Retentionszeit des Standard S und $T_0 =$ Totzeit.

$$RRT_x = \frac{RT_x - T_0}{RT_s - T_0} \quad (2.1)$$

Für die Abschätzung der Retentionszeitverschiebung durch die im Allgemeinen geringe Strukturänderung bei der Metabolisierung wurden die Struktur-Retentionszeit-Zusammenhängen an Umkehrphasen zugrundegelegt.

Die meisten Metabolisierungs-Reaktionen (Hydroxylierung, Bildung von Nor-Metaboliten) erhöhen der Hydrophilie und führen damit zu einer Verringerung der Retentionszeit an RP-Säulen.

Umgekehrt bewirkt eine Zunahme der Lipophilie eine Erhöhung der Retentionszeit, was bei der Metabolisierung allerdings selten eintritt. Eine solche Erhöhung erfolgt z. B. wenn ein kationisches Zentrum eines Wirkstoffs durch die Metabolisierung beseitigt wurde, z. B. durch Desaminierung. In diesem Fall wird die Ammonium-Gruppe, die in der sauren mobilen Phase sehr hydrophil ist, durch die weniger hydrophile -OH oder -COOH Gruppen ersetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von Diphenylmethoxyessigsäure aus Diphenhydramin [42,51].

Als Maß für den Einfluss der Strukturänderung wurde der Quotient Q_{RRT} oder Q_{RT} von Metabolit und Wirkstoff (Gleichungen 2.2, 2.3) herangezogen, wobei entweder die relative korrigierte Retentionszeit bezogen auf MPPH oder nur die absolute Retentionszeit verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten Metabolisierungsreaktionen eine charakteristische Verschiebung der Retentionszeiten (Q_{RRT} - oder Q_{RT} -Bereiche) aufweisen.

$$Q_{RRT} = \frac{RRT(\text{Metabolit})}{RRT(\text{Wirkstoff})} \quad (2.2)$$

$$Q_{RT} = \frac{RT(\text{Metabolit})}{RT(\text{Wirkstoff})} \quad (2.3)$$

Häufig besitzen diese Möglichkeiten der Strukturzuordnung von Metabolitenpeaks nur hinweisenden Charakter, z. B. wenn mehrere Isomere möglich sind oder das UV-Spektrum des Metaboliten sich von dem des Wirkstoffs unterscheidet. Hier können massenspektrometrische Methoden weitergehende Informationen liefern.

2.3 Flüssigchromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-MS TOF)

Die Teilschritte, die eine Substanz von der zu untersuchenden Probe bis zur Identifizierung der toxischen Bestandteile bei der LC-MS-TOF-Methode durchläuft, sind in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Nach einer geeigneten Probenvorbereitung, z. B. Extraktion oder Proteinfällung von Blutproben, wird der Extrakt durch Flüssigchromatographie in die Bestandteile aufgetrennt. Dabei muss das chromatographische System neben der Trennung auch geeignete Voraussetzungen für die Ionisierung im Massenspektrometer erfüllen.

Die in der Ionenquelle für jeden chromatographischen Peak gebildeten positiven oder negativen Ionen werden danach entsprechend ihrem Ladung/Masse-Verhältnis aufgetrennt und schließlich durch ein geeignetes Detektionssystem als Massenspektrum (Ionenhäufigkeit als Funktion von m/z) aufgezeichnet. Moderne Flugzeit-Massenspektrometer sind dabei durch eine sehr hohe Massenauflösung und Massengenauigkeit gekennzeichnet.

Unter bestimmten Bedingungen können die in der Ionenquelle zunächst gebildeten Molekülionen durch Zusammenstoß (Kollision) mit einem zugesetzten Gas in typische Fragmente gespalten werden. Exakte Molmasse, Fragmentspektrum und weitere Parameter (s. u.) dienen schließlich zur Identifizierung der Substanz, während die Ionenhäufigkeit nach entsprechender Kalibration ein Maß für die Konzentration in der Probe darstellt. Im Folgenden sollen die instrumentellen Bedingungen und Prozesse auf molekularer Ebene für diese Teilschritte etwas näher betrachtet werden.

2.3.1 Probenvorbereitung für LC-TOF-MS

Zur Verbesserung der Sensitivität, Spezifität und / oder Robustheit wurden verschiedene Probenvorbereitungsmethoden für die LC-MS verwendet. Das betrifft Festphasenextraktion (SPE), Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und Proteinfällung (PPT). Die Extraktion wird entweder off-line durchgeführt und ist völlig unabhängig von der LC-MS-Analyse oder wird on-line direkt in den LC-MS-Analyse integriert. Einige der wichtigsten Möglichkeiten werden hier kurz diskutiert und allgemeine Leitlinien können in einem Buch von Wells gefunden werden [52].

In der frühen Phase der Anwendung versuchten einige Autoren, LC-MS-MS in einem Flowinjektion-Modus zu verwenden, d.h., die Extrakte von Serum und Urin wurden direkt in API / MS ohne chromatographische Trennung injiziert. Dieses Verfahren wurde nur für eine begrenzte Anzahl von Wirkstoffe (Morphin, Codein, Amphetamin und Benzoyllecgonin)

überprüft. Ein Problem war unter anderem, dass die Matrix-Effekte nicht erkannt wurden [53].

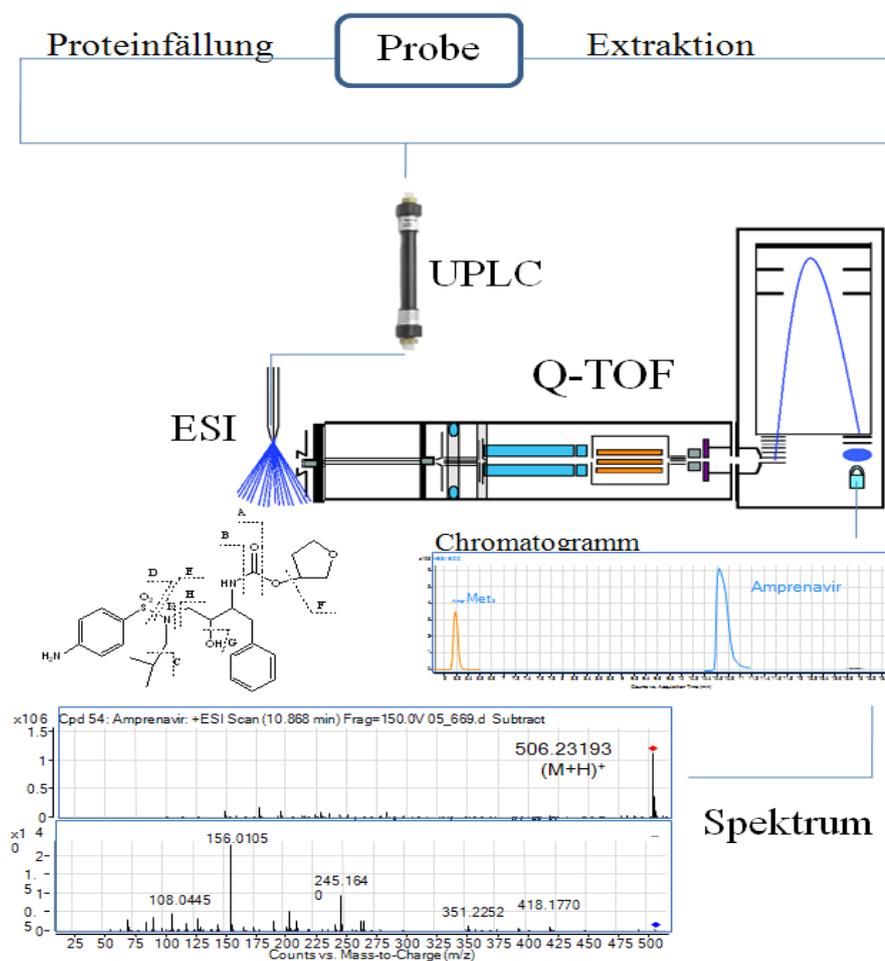


Abbildung 2.4: Teilschritte der Analyse einer Probe durch LC-TOF-MS, ESI = Elektrosprayionisation, UPLC = Ultra-High Performance Liquid Chromatography, Q-TOF-MS = Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer.

Proteinfällung als Probenvorbereitungsmethode ist sehr populär in der quantitativen Bioanalytik. Es ist ein sehr schnelles und fast quantitatives Verfahren. Nach Zugabe des Proteinfällungsadditivs, Mischen und Zentrifugieren kann der Überstand direkt in das LC-MS-System injiziert werden. Typische Zusätze sind Trichloressigsäure (TCA), Zinksulfat-Lösung, Acetonitril, Ethanol oder Methanol.

Urinproben können im Prinzip direkt nach Verdünnung in die LC-Säule injiziert werden, aber sie werden in der Regel vorher hydrolysiert, um die Konjugate zu spalten, und dann vor der Injektion zentrifugiert. Proteinfällung von Blut und Verdünnung von Urin sind schnelle und einfache Methoden und reduzieren die Vorbereitungszeit und die Verwendung von Verbrauchsmaterial. Nachteilig wirkt sich aus, dass große Mengen von Matrix-Bestandteilen co-injiziert werden, die die LC-MS-Analyse stören [54-58].

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eine leistungsfähige Probenvorbereitung auf der Grundlage der selektiven Trennung der Analyten zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen. Sie ist einfach, schnell und effizient bei der Abtrennung von nichtflüchtigen Verbindungen. Die Analyten werden aus der wässrigen biologischen Flüssigkeit durch ein nicht mischbares organisches Lösungsmittel, z. B. Dichlormethan, 1-Chlorbutan, Ether, Ethylacetat, Methyl-t-butylether, Chloroform oder Hexan oder Mischungen dieser Lösungsmittel extrahiert. Die Anreicherung der Analyten erfolgt durch anschließende Verdampfung der Lösungsmittel. Die Extraktion kann durch eine sorgfältige Auswahl der Lösungsmittel und des pH-Wertes der wässrigen Phase selektiv gestaltet werden [59-61]. Eine automatische LLE im 96-well Platten-Format, wurde von der Gruppe Henion beschrieben und kann zeitsparend und arbeitsintensiver sein. Ein entscheidender Schritt in diesem Prozess ist die Phasentrennung. Ein Nachteil ist der Verbrauch von erheblichen Mengen an organischen Lösungsmitteln [62].

Festphasenextraktion (SPE) ist eine zunehmend nützliche Probenvorbereitungstechnik in LC-MS Applikationen. Mit SPE können viele der Probleme der Flüssig/Flüssig-Extraktion verhindert werden [63,68]. Als alternativer Ansatz verbindet on-line SPE-Extraktion die traditionelle off-line Probenvorbereitung direkt am LC-MS-System. Diese Systeme haben den Vorteil des unbeaufsichtigten Betriebes. Während der LC-MS-Analyse der ersten Probe erfolgt schon die Vorbereitung der zweiten Probe, wodurch Zeit gespart wird [69-73]. Letztere Technik nutzt in der Regel die direkte Injektion von Plasma-Proben, die Extraktion der Analyte(n) wird auf einer „trapping“-Säule und die Elution auf der analytische Säule durchgeführt [69,74].

2.3.2 Anforderungen in die Flüssigchromatographie für LC-TOF-MS

In den letzten 30 Jahren gehört die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) zu den am meisten genutzten Labortechniken weltweit. Dabei hat es sowohl hinsichtlich der Empfindlichkeit, Trennleistung, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit als auch in der Erschließung neuer Trennmaterialien und in der Maßstabsverkleinerung erhebliche Fortschritte gegeben. Das betrifft auch die Säulenchemie, Säulengröße und Partikelgröße, wo wichtige Entwicklungen durch Verkleinerung von 5 auf 1,7 μm erzielt wurden. Die Grundlage der mit diesen Materialien durchgeführten Ultra-High Performance Liquid Chromatographie (UPLC) soll im Folgenden etwas näher erläutert werden.

Die van Deemter Gleichung ist in der HPLC eine empirische Formel, welche die Beziehung zwischen der linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase und der Höhe der theoretischen

Böden beschreibt [75]. Die Partikelgröße ist eine der Variablen, die in der Gleichung van Deemter auftritt. Wie in Abbildung 2.5 gezeigt wird, erhöht sich die Trennleistung, wenn die Partikelgröße sich auf weniger als 2,5 μm verringert. Außerdem wird die Effizienz nicht mit steigenden Flussraten oder Lineargeschwindigkeiten beeinträchtigt, wenn kleinere Partikel verwendet werden.

Das hat zur Folge, dass durch die Verwendung von kleineren Partikeln die Geschwindigkeit und die Peakkapazität eines Laufes erheblich erweitert werden. Diese Trennung wird als Ultra Performance Flüssigkeits-Chromatographie Technologie oder UPLC bezeichnet. Die Erreichung der höheren Peakkapazität und Trennung mit kleineren Partikeln erfordert aber einen viel höheren Druck im Vergleich mit der herkömmlichen HPLC.

Der berechnete Druckabfall bei optimalem Durchsatz und maximaler Effizienz in einer 15-cm-langen Säule mit 1,7- μm -Partikel liegt im Bereich von 15,000 psi (1034,21 bar). Deshalb ist eine Pumpe erforderlich, die die Beförderung der mobilen Phase reibungslos und reproduzierbar bei sehr hohen Drücken inklusive Ausgleich der Lösungsmittel-Kompressibilität sowohl in der Gradienten- als auch in der isokratischen Trennung bewerkstelligt [76-82].

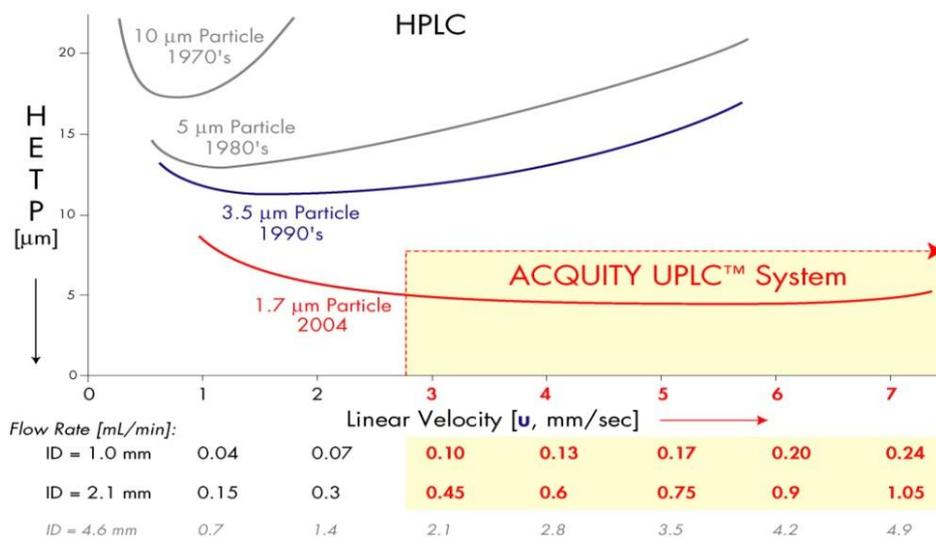


Abbildung 2.5: Dargestellt sind Kurvenverläufe der van Deemter Gleichung für unterschiedliche Partikelgrößen. HEPT = height equivalent to a theoretical plate. Man sieht, dass durch die Verkleinerung der Partikel in der Trennsäule auf 1,7 μm die realisierbare Fließgeschwindigkeit bei gleichbleibender Trennleistung deutlich erhöht ist. Ein Grund dafür ist, dass die Zwischenräume zwischen den Partikeln in der Säule kleiner sind, und die Analyten dadurch einfacher von Partikel zu Partikel transportiert werden können.[83]

Durch die Verwendung der UPLC-Technologie kann bei höherem Fluß eine schnellere Trennung mit hervorragender Peakkapazität für sehr komplizierte Matrices wie Plasma,

Galle oder Urin erreicht werden. Zur Veranschaulichung wird in Abbildung 2.6 der Vergleich der Trennung von in-vitro-Dextromethorphan Metaboliten mittels HPLC und UPLC dargestellt [83].

UPLC wurde als ideale Trennmethode in Wirkstoffmetabolismus-Studien auf Grund der besseren chromatographischen Auflösung, Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Analyse sehr schnell akzeptiert. Die typischen Peakbreiten, die von der UPLC System generiert werden, sind im Bereich von 1-2 s. Die Verringerung der Peakbreite erhöht die Empfindlichkeit auf das Drei- bis Fünffache. Die erhöhte Effizienz ergibt eine Reduzierung der Laufzeit der Analyse um den Faktor 5, während die chromatographische Auflösung beibehalten wird [77, 84].

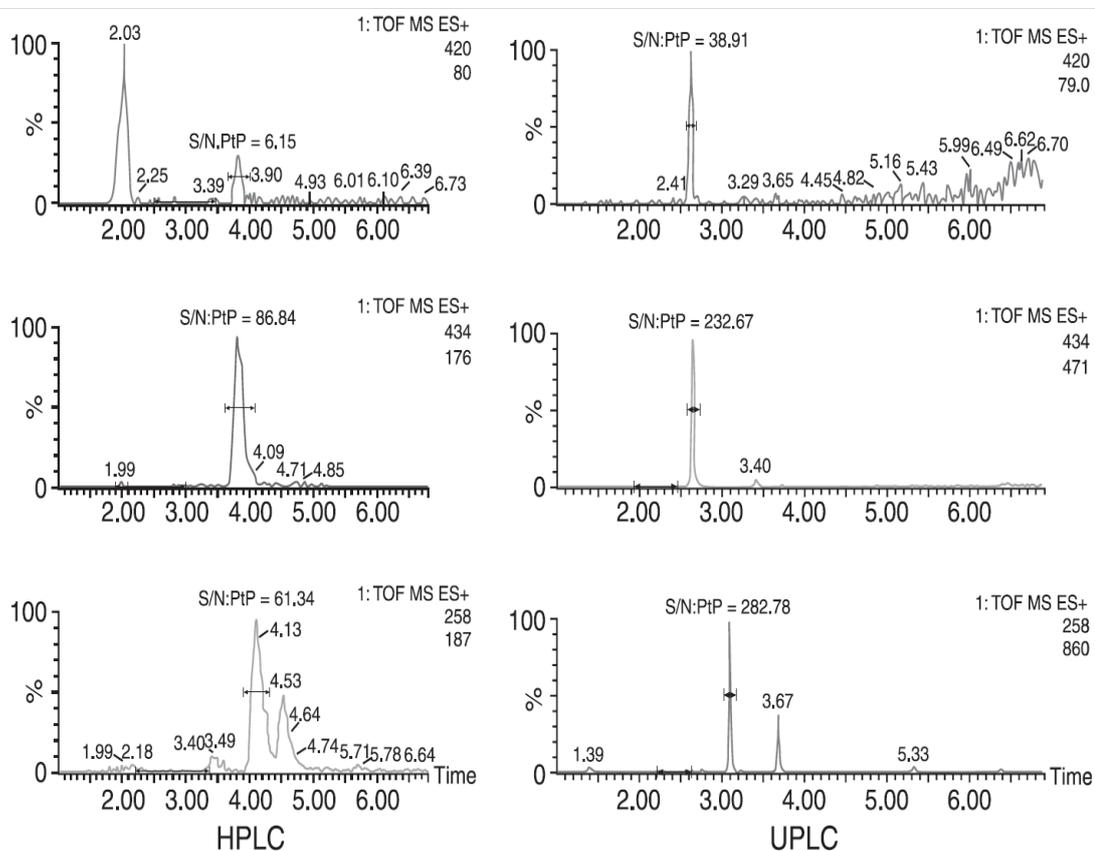


Abbildung 2.6: Trennung von in-vitro-Metaboliten von Dextromethorphan mit HPLC und UPLC [83]. Unten: Desmethyl-dextromethorphan (m/z 258); Mitte: Desmethyl-dextromethorphan-glucuronid (m/z 434); oben : Di-desmethyl-dextromethorphan-glucuronid (m/z 420); wobei S/N: PtP = Peak-zu-Peak Signal-zu-Rausch-Verhältnis bedeutet.

Castro-Perez et al. berichten über den Nachweis von zusätzlichen Prochlorperazin Metaboliten nach Inkubation mit Ratten-Lebermikrosomen mittels UPLC gekoppelt an einen Q-TOF Massenspektrometer [85] (Abbildung 2.7). In der HPLC-Trennung wurden nur drei der doppelt hydroxylierten Metabolite nachgewiesen, während mit der UPLC-Analyse alle acht Metaboliten innerhalb von 4,5 min Laufzeit detektiert wurden.

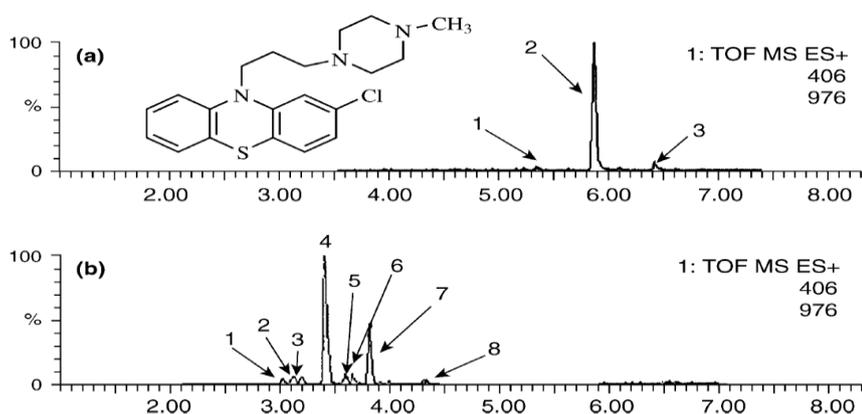


Abbildung 2.7: Vergleich der extrahierten Ionenchromatogramme für doppelt hydroxylierte Metabolite (m/z 406) von Prochlorperazin nach Inkubation mit Rattenleber-Mikrosomen, erhalten aus HPLC/MS (a) und UPLC/MS (b).[85]

2.3.3 Ionisation in der LC-MS

Die häufigsten Ionisationstechniken der LC-MS in der Bioanalytik sind Elektrospray Ionisation (ESI) [86,87], chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) [87,88] und weniger häufig, die relativ neue Photo-Ionisation bei Atmosphärendruck (APPI) [89]. Bei allen drei Ionenquellen erfolgt die Ionisation bei atmosphärischem Druck (API = Atmospheric Pressure Ionization).

2.3.3.1 Elektrosprayionisation (ESI)

Im letzten Jahrzehnt wurde die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung (ESI-MS) zur am häufigsten angewendeten massenspektrometrischen Technik für nichtflüchtige, thermolabile Moleküle von kleinen Verbindungen (300 - 1000 Dalton) bis zu großen Biomolekülen mit Molekulargewichten von mehr als 150 kDa. Die Forschung zum Thema der Elektrospray Phänomene geht mehr als 80 Jahre zurück zu den ursprünglichen Forschungen von Zeleny [90-92] und späteren Studien [93-96]. Fenn und seine Mitarbeiter haben 1984 zum ersten Mal eine ESI-Quelle mit einem Quadrupolmassenanalysator gekoppelt [97]. Im Jahre 1990 beschrieben van Berkel et al. die Kombination von ESI mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (ITMS) [98]. Über erste ESI/TOF-Systeme wurden im Jahr 1991 von Sin et al. [89] und auch von Boyle und Whitehouse [99] berichtet. Die Kombination von ESI mit orthogonaler Extraktion Flugzeit Massenspektrometrie [100] wurde erstmals im Jahr 1991 von Dodonov et al. vorgestellt [101].

In der ESI wird die Probe in einem polaren, flüchtigen Lösungsmittel aufgelöst und durch eine Edelstahlkapillare versprüht, an der ein hohes positives oder negatives Potential anliegt

[97,102,103] (Abbildung 2.8). Die hohe elektrische Spannung (1 bis 4 kV) zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode bewirkt, dass die Flüssigkeit am Ende der Kapillare einen Taylor-Kegel bildet und an der Spitze mit positiven oder negativen Ionen angereichert ist. Ein Spray von geladenen Tröpfchen wird aus dem Taylor-Kegel durch das elektrische Feld emittiert. Die Tröpfchen schrumpfen durch Verdampfung mit Hilfe eines warmen Stickstoffstroms, der durch die Vorderseite der Ionenquelle hindurchgeht [91,94]. Dies führt zu einer steigenden Abstoßung gleicher Ladungen auf der Oberfläche des Tropfens bis dieser die Rayleigh-Stabilitätsgrenze erreicht. Die Rayleigh-Gleichung liefert die Bedingungen, bei denen die elektrostatische Abstoßung gleich der durch die Oberflächenspannung hervorgerufenen Kraft ist. Wenn der Tropfenradius R und die Ladung q die Rayleigh-Gleichung erfüllen, wird der Tropfen instabil. Experimentell wurde beobachtet dass Tropfen zerfallen, wenn sie das Rayleigh-Limit erreichen (Coulomb-Explosion).

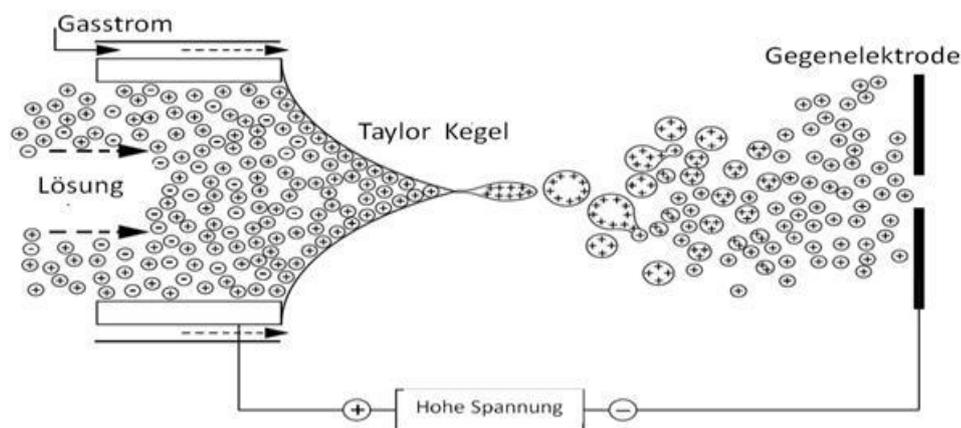


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Taylor-Kegel Bildung, Auswurf eines Tröpfchensprays und dessen Zerfall in einen feinen Sprühnebel [104].

Dieser Prozess sollte wiederholt auftreten, um immer kleinere Mikrotröpfchen zu generieren. Während dieses Modell der kaskadenartigen Verkleinerung gültig bleibt, haben neuere Arbeiten gezeigt, dass die Mikrotröpfchen nicht explodieren, sondern eine Reihe von viel kleineren Mikrotröpfchen aus einem länglichen Ende emittieren (Abbildung 2.9) [104-106].

Die Probenvorbereitung erfordert nur Auflösung der Probe bei einer geeigneten Konzentration in einem Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel, meist Methanol, Isopropanol oder Acetonitril. Eine Spur von Ameisensäure oder Essigsäure wird oft hinzugefügt, um die Protonierung der Analyt-Moleküle in den positiven Ionisations-

Modus zu unterstützen. Im negativen Ionisierungsmodus wird Ammoniaklösung oder ein flüchtiges Amin zugesetzt, um Deprotonierung der Analyt-Moleküle zu begünstigen.

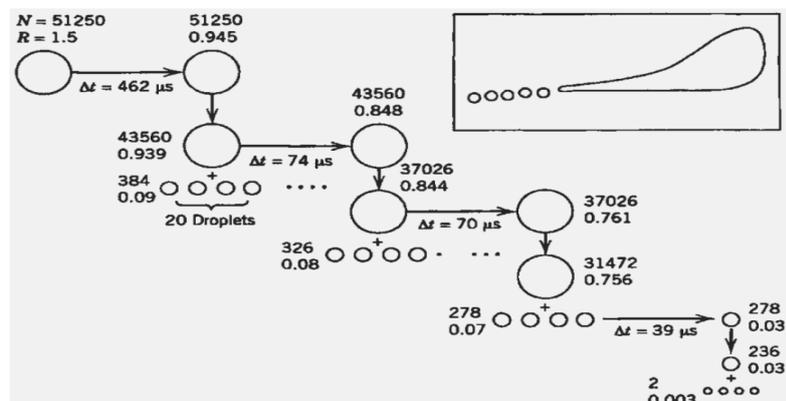


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Tropfenspaltung bei ESI. Die durchschnittliche Anzahl von Ionen pro Tröpfchen N und der Radius der Tropfen R sind dem Zeitplan von Ereignissen zugeordnet. Der Ausschnitt zeigt eine Zeichnung des Tropfens in dieser „Jet-Spaltung“, der auf einer tatsächlichen Blitz-photographie basiert [104].

Es gibt zwei Modellvorstellungen für die Auflösung der geladenen Tröpfchen und Entstehung der freien Ionen. Das ältere Modell der Ionen-Bildung CRM geht von einem aufeinanderfolgenden Verlust aller Lösungsmittel-Moleküle aus den Tröpfchen aus, die schließlich so klein sind, dass nur ein Analyt-Molekül am Ende einer Kaskade von Coulomb Spaltungen übrig bleibt [107-112]. Die Ionen (Protonen) dieser letzten Tropfen werden auf das Molekül übertragen. Dies würde erlauben, dass auch große Protein-Moleküle einzeln geladene Ionen bilden können [112]. Eine spätere Theorie, das *Ionen- Evaporation-Modell* (IEM) [109,110], beschreibt die Bildung von desolvatisierten Ionen als direkte Verdampfung von der Oberfläche des hoch geladenen Mikrotropfens [111]. Die auf diesem Wege bei Atmosphärendruck gebildeten Ionen dringen durch eine kegelförmige Öffnung in die intermediäre Vakuumregion des Massenspektrometers ein, und gelangen von dort durch eine kleine Öffnung in das Hochvakuum des Massen-Analysators. ESI wird in Verbindung mit allen gängigen Massen-Analysatoren verwendet.

2.3.3.2 Chemische Ionisation unter atmosphärischem Druck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI))

In Gegensatz zur Electrospray-Ionisation, bei der der Ionisationsprozess in Lösungsphase geschieht, ist die APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) ein Gasphasen-Ionisationsprozess, bei dem die Moleküle vor der Ionisation vom Trägerlösungsmittel befreit werden [113].

Das Prinzip ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Typische HPLC-Flussraten liegen im Bereich 200-1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zuerst wird ein Aerosol mit Hilfe eines pneumatischen Nebulizers mit Stickstoff gebildet. Dieses Aerosol entsteht direkt in einer beheizten Quarz- oder Keramik-Röhre (typische Temperaturen 200-500 $^{\circ}\text{C}$), wobei die mobile Phase und die Analyten verdampft werden. Die Temperatur der versprühten mobilen Phase bleibt aufgrund der Verdunstungsenthalpie im Bereich zwischen 120-150 $^{\circ}\text{C}$. In einem zweiten Schritt wird die verdunstete Flüssigkeit den elektrischen Ladungen der Koronaentladungsnadel ausgesetzt [114].

Die Polarität der Nadelspannung bestimmt, ob eine positive oder negative Ionisierung erfolgt. Zunächst bilden sich Primärionen der Gasmoleküle (z. B. N_2^+ , O_2^+ bzw. O_2^-). Diese Primärionen übertragen ihre Ladung auf sogenannte Reaktandionen, die aus dem Lösungsmittel oder zugesetztem Puffer stammen (z. B. CH_3OH_2^+ , H_3O^+ , CH_3O^- , OH^-) [115]. Danach erfolgt die Ladungsübertragung vom Reaktandion auf das Analytmolekül über Ladungstransfer oder Protonentransfer [116]. Im positiven Modus können basische Zentren z.B. durch NH_4^+ protoniert werden oder das Ammoniumion kann sich als Cluster anlagern (Abbildung 2.10).

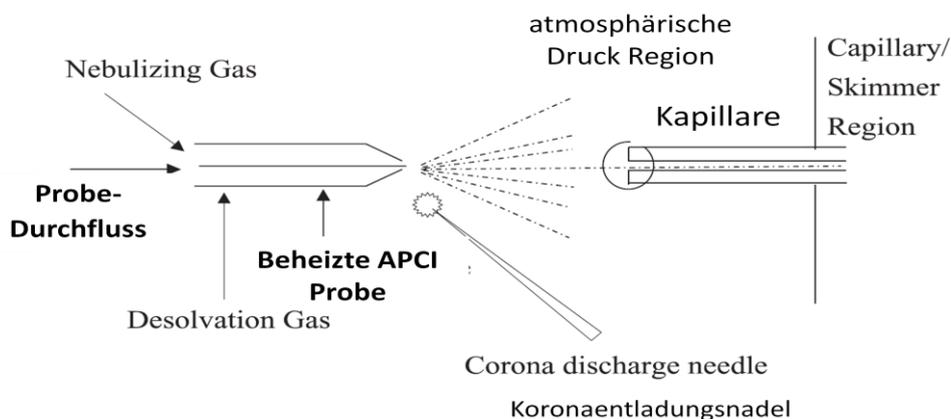


Abbildung 2.10: Schema einer APCI Quelle. (APCI=Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

2.3.3.3 Kollisions-induzierte Dissoziation (Collision Induced Dissociation, CID)

Hierunter versteht man die strukturspezifische Fragmentierung von Molekülionen mit dem Ziel der Verbesserung der Substanzidentifizierung. Die Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) erfolgt in der Regel beim Durchtritt eines Ionenstrahls durch eine Kollisionszelle, in der sich ein Kollisionsgas (He, N_2 , Ar) bei einem Druck deutlich über dem umgebenden Hochvakuum befindet. Dies kann durch die Einführung des Gases über ein Nadelventil in

einem vergleichsweise engen Band nur mit einem schmalen Eingang und Ausgang für den Ionenstrahl (Abbildung 2.11) erreicht werden [117,118].

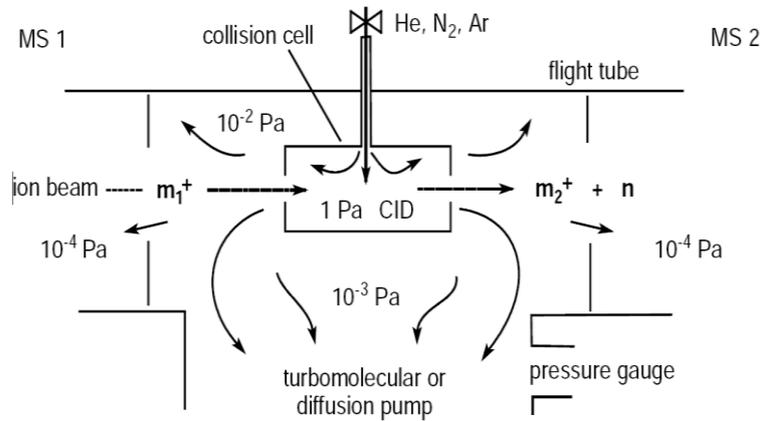


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung einer Kollisionszelle für CID Experimente. CID = Collision Induced Dissociation. [aus Mass Spectrometry a text book, 2004, ed. Gross J.H., 54]

Die in der Ionenquelle gebildeten und beschleunigten Ionen (Vorläufer- oder Precursor-Ionen) kollidieren mit Gasatomen oder Molekülen, wie Stickstoff, Argon oder Helium, und werden dabei fragmentiert. Bei der Kollision wird ein Teil der kinetischen Energie in Schwingungs- und Rotationsenergie umgewandelt. In der Folge kommt es zu Bindungsspaltungen, wobei als Grundregel möglichst stabile Produkte unter Spaltung möglichst schwacher Bindungen entstehen. CID ist besonders nützlich für die Strukturaufklärung von Ionen mit geringer innerer Energie, wie sie z. B. durch Soft-Ionisation-Methoden erzeugt werden. Diese Technik wird auch im Q-TOF/MS verwendet (Abbildung 2.12) [113,119].

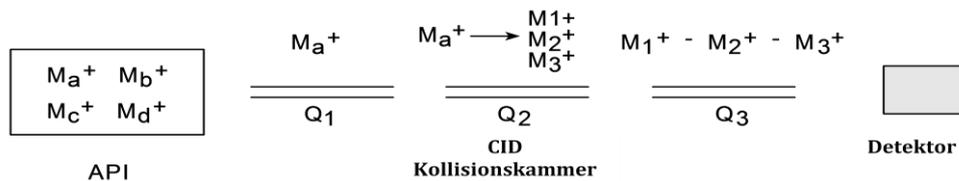


Abbildung 2.12: Der erste Massenanalysator Q1 wird verwendet, um ein bestimmtes Ion (M_a⁺) in die Kollisionskammer Q2 einzubringen. Das ausgewählte Ion erleidet einen CID Prozess durch ein Stoßgas (z.B. Argon) in der Kollisionskammer und die resultierenden Fragmentationen werden von einem weiteren Massenanalysator Q3 aufgelöst. API = Atmosphärendruck-Ionisierung, CID = Collision Induced Dissociation.

2.3.3.4 Fragmentierung in der Ionenquelle (In-source CID)

Die Potentiale in dem Vakuum-Interface der Ionenquelle können so verändert werden, dass die solvatisierten Ionen in einer Region mit relativ hohem Druck auf höhere kinetische Energien beschleunigt werden (Abbildung 2.13).

Während unter milden Bedingungen die Lösungsmittel-Clusters lediglich zerfallen und den Desolvatisierungsprozess vervollständigen, kann bei erhöhter kinetischer Energie eine Ionenfragmentierung induziert werden.

Diese Fragmentierung in der Ionenquelle wird als „in-source collision induced dissociation“ (In-source CID) bezeichnet. In-source CID unterscheidet sich von der Fragmentierung in echten MS-MS-Geräten dadurch, dass es keine Abtrennung ausgewählter Vorgänger-Ionen gibt, so dass die Fragmente durch die Dissoziation von allen in der Quelle anwesenden Vorgänger-Ionen gebildet werden können, einschließlich Lösungsmittel und Hintergrund Spezies.

Die beobachtete Fragmentierung hängt stark von der Kollisionsenergie der primär gebildeten Ionen ab, die wiederum durch die Potentiale in dem Vakuums-Interface bestimmt wird. Ein Beispiel wird in Abbildung 2.14 gegeben, wo die ESI-MS Spektren von Diphenhydramin bei zwei verschiedenen Vakuum-Interface Potentialen dargestellt sind. Während bei einer Spannung von 10 V im Wesentlichen nur das Molekülion sichtbar ist, dominieren bei 50 V Fragmentionen.

Fragmentierungskurven können durch Auftragen der relativen Häufigkeit der Fragmentionen erhalten werden, wenn die Vakuum-Interface Potentiale verändert werden [120]. Solche Fragmentierungskurven sind zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für den Nachweis eines charakteristischen Fragment-Ions [121] und bei der Suche nach standardisieren Fragmentierungsbedingungen zur Erstellung einer Bibliothek für die Prüfung auf Wirkstoffe in Serum [122] benutzt worden.

Trotz der Einschränkungen hinsichtlich der Selektivität bei den Ausgangsionen kann die in-source CID in vielen Fällen nützliche Informationen über die Struktur einer Substanz, zum Beispiel zur Unterscheidung und strukturellen Zuordnung von Isomeren mit gleicher Molasse, liefern.

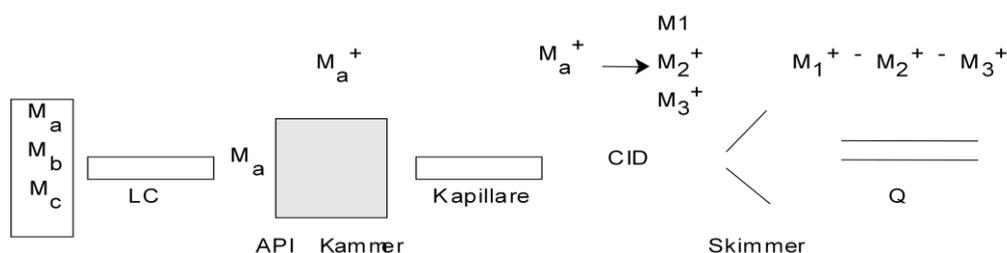


Abbildung 2.13: Elektrische Felder in der API-MS Transportregion werden genutzt, um eine Stoßaktivierung von Ionen in der Region mittleren Druckes (~0.01 - 1 torr) zu erreichen, durch die CID Massenspektren erzeugt werden.

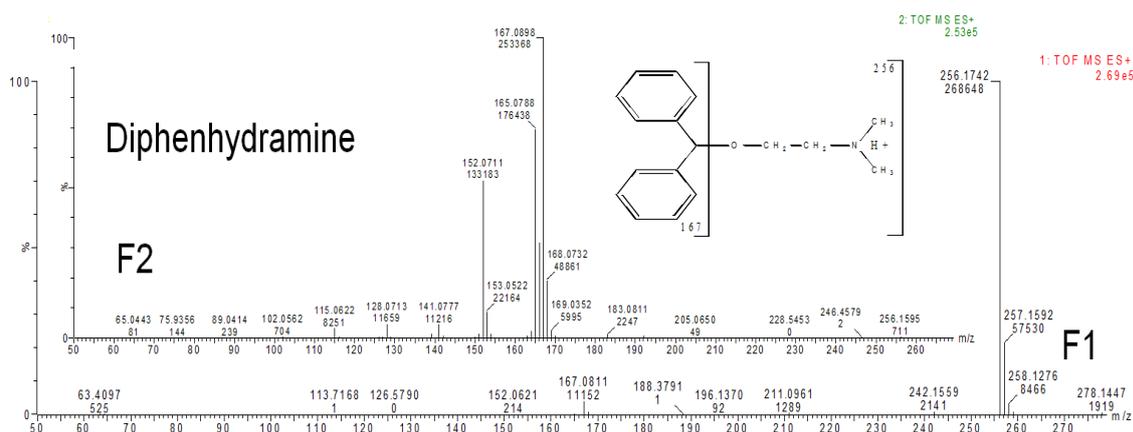


Abbildung 2.14: In-Source CID. Wirkung der Potentialstärke auf das ESI-MS Spektrum von Diphenhydramin. Die Beschleunigungsspannung der Ionen wird von (F1) 10V auf (F2) 50V erhöht.

2.3.3.5 Ionen in der ESI-MS

Die Elektrospray-Ionisation neigt dazu, Ionen mit relativ geringen inneren Energien zu produzieren, und daher sind Fragment-Ionen relativ selten in ESI-Massenspektren [123]. Die Kollisions-induzierte Dissoziation in der API Quelle führt jedoch zu Spaltung von Lösungsmittel-Clustern, und wenn die Kollisionsenergie hoch genug ist, können auch Fragment-Ionen beobachtet werden.

Die Ionen, die in der ESI von kleinen Molekülen beobachtet werden, sind ähnlich wie die Ionen, die bei anderen weichen Ionisationstechniken beobachtet. Positive ESI-Massenspektren von kleinen polaren oder basischen Moleküle werden von Protonen unter Bildung von $[M+H]^+$ dominiert. Weitere Kationen sind $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ oder $[M+NH_4]^+$. Vorgeformte Ionen wie quaternäre Ammoniumsalze werden als M^+ festgestellt. Negativ-Ionen-Massenspektren zeigen $[M-H]^-$ von Verbindungen, die ein Proton verlieren. Unter den geeigneten Bedingungen können elektrochemische Reaktionen auch molekulare

Radikationen aus Verbindungen wie polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) oder Porphyrinen produzieren [124].

Die Tendenz zur Erzeugen Dimeren wie $[2M+H]^+$ oder $[2M+Na]^+$ steigt mit Analyt-Konzentration. Dies ist ein allgemeines Problem bei allen weichen Ionisationsmethoden und kann zu Problemen bei der Interpretation der Daten führen. Die Reduzierung der Analytkonzentration kann Dimerbildung vermindern [125]. Einer der interessantesten Aspekte der ESI ist die Tendenz zur Bildung mehrfach geladener Ionen wie $[M+nH]^{n+}$, $[M+nNa]^{n+}$ oder $[M-nH]^{n-}$. Diese Tendenz steigt mit zunehmendem Molekulargewicht. Kleine Peptide wie Enkephalin produzieren fast ausschließlich einfach geladene Ionen, $[M+H]^+$, während die etwas größeren Peptide wie die zyklisches Peptid Gramacidin S ein intensives $[M+2H]^{2+}$ und ein weniger intensiv $[M+H]^+$ produzieren [124]. Die beobachtete Verteilung der Ionen hängt dabei sowohl von der mobilen Phase als auch von den die ESI-Source-Bedingungen ab [126-130].

2.3.4 Flugzeit-Massentrennung (Time-of-flight-Massenspektrometrie, TOF-MS)

2.3.4.1 Lineares TOF

In den letzten Jahren wurde die Eignung von LC-TOF-MS Instrumenten für forensische Anwendungen mehrfach untersucht [131]. Das Grundprinzip der Trennung von Ionen durch Flugzeit-Massenspektrometrie wurde 1946 von Stephens [132] konzipiert. Dieser Massen-Analysator besteht aus einem ca. 100 cm langen evakuierten Flugrohr, in dem Ionen auf der Grundlage ihre Geschwindigkeitsunterschiede getrennt werden. Ein kurzer Puls von Ionen mit gleicher definierter kinetischer Energie wird dabei nach der Flugzeit aufgetrennt. Die Geschwindigkeiten v der Ionen, die durch ein Potential V beschleunigt werden, sind eine inverse Funktion der Quadratwurzel ihrer (m/q oder m/z) Werte (Gleichung 2.4):

$$v = \sqrt{\frac{2qV}{m}} \quad (2.4)$$

Deshalb sind die leichteren Ionen schneller und erreichen den Detektor früher als die schwereren Ionen. Der kurze Puls von Ionen wird daher in Ionen gleicher Masse aufgetrennt (Abbildung 2.15). Die Zeit der Ankunft eines Ions (Flugzeit t) wird durch Gleichung 2.5 gegeben.

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qV}} \quad (2.5)$$

Die gemessenen Flugzeiten aller Ionen bilden ein Zeitspektrum ab, das nach Kalibrierung des Instruments zu einem Massenspektrum umgewandelt wird. Eine allgemein akzeptierte Kalibriergleichung (Gleichung 2.6) ist:

$$\frac{m}{q} = at^2 + b \quad (2.6)$$

In dieser Gleichung, ist a Proportionalitätsfaktor zwischen der Ankunftszeit eines Ions und ihres m/q und b ist ein Zeitoffset, das sich aus dem Zeitabstand zwischen der Ionenextraktion und dem Beginn der Datenerfassung ergibt. Diese Konstanten sind mit zwei verschiedenen Ionen der bekannten m/q -Werte bestimmbar.



Abbildung 2.15: Prinzip der Trennung von Massen in einem Time-of-Flight-Massen-Analysator. Ionen werden auf der Grundlage ihrer m/q getrennt, die schwereren m/q -Ionen (große Kreise) bewegen sich bei gleicher kinetischer Energie langsamer als die leichteren m/q -Ionen (kleiner Kreis) [133].

Im TOF-MS wird die Masseauflösung durch die Breite des Zeitfensters bestimmt, in dem die Ionen mit gleicher Masse auf den Detektor auftreffen ($R = t / \Delta t$). Die beschleunigten Ionen werden von unterschiedlichen Stellen (Startposition der Ionen zum Zeitpunkt der Beschleunigung) und mit leicht unterschiedliche Ausgangsgeschwindigkeit (aufgrund von Unterschieden in der initialen kinetischen Energie der Ionen) beschleunigt. Das sind die zwei primären Faktoren, die die Auflösung in TOF Instrument begrenzen [134-136]. Die räumliche Verteilung und initiale kinetische Energie von Ionen können durch verzögerte Extraktion und durch Reflektiongeräte minimiert werden. Bei Gasphasen-Ionisationstechniken wird das Zeitfenster, in dem die Ionen gleicher Masse aus der Quelle austreten als Umkehrzeit (turn around time) bezeichnet. Aufgrund ihre unterschiedlichen initialen kinetischen Energie, ihres Ausgangsorts in der Quelle und dem Zeitpunkt des Eintretens aus der Ionenquelle werden sie nicht zur gleichen Zeit beschleunigt. D.h., dass manche Ionen ihre Flugrichtung umkehren müssen bevor sie ihren Flug in Richtung des

Detektors beginnen können, sie bleiben also hinter anderen Ionen mit identischer ursprünglichen Geschwindigkeit zurück. Längere Flugstrecken und längere Flugzeiten können die Wirkung der Umkehrzeit reduzieren. Der Unterschied in den Ankunftszeiten von Ionen, die sich in der Masse von 1 Dalton unterscheiden (z. B. 2000 und 2001 Dalton) liegt im Bereich von Nanosekunden. Daher ist die Masseauflösung von TOF-Instrumenten auch durch das zeitliche Auflösungsvermögen des Detektions-Systems beschränkt.

2.3.4.2 Verzögerte Extraktionen von Ionen

Das Verzögerte Extraktions Prinzip (Delayed Extraction, DE) wurde zum ersten Mal von Wiley und McLaren im Jahr 1956 in Form des Zeit-Verzögerungs-Fokussierens aufgeführt [137]. Es ist ein Weg zur Verbesserung der Auflösung von linearen TOF-Massen-Spektrometern [138-140]. Dieses Verfahren verwendet eine Doppel-Phasen-Ionen-Extraktionsoptik mit zwei unterschiedlichen getrennten Extraktions- und Beschleunigungs-Regionen (Abbildung 2.16).

Während des Ionisierungs-Pulses ist kein Potential auf die Extraktion Region angelegt. Daher driften Ionen in dieser Region in einer feldfreien Umgebung mit ihrer ursprünglichen Geschwindigkeit v_0 . Nach einer kurzen Verzögerung von ein paar hundert Nanosekunden wird das Beschleunigungspotential zur Extraktion der Ionen aus der Quelle angelegt. Während dieser Wartezeit bleiben die langsam fliegenden Ionen hinter den schnell fliegenden Ionen zurück. Ionen in der Nähe der Repellerelektrode (d.h. weiter vom Extraktionsgitter entfernt) werden zu dem größeren elektrischen Potential stärker als die Ionen nahe des Extraktionsgitters gezogen. Aufgrund dieses Unterschieds in der Beschleunigung werden die weiter entfernten Ionen auf eine höhere Geschwindigkeit beschleunigt. Mit einer korrekten Einstellung der Verzögerungszeit und der Amplitude des Extraktionspulses kann erreicht werden, dass alle Ionen einer bestimmten Masse trotz verschiedener kinetischer Anfangsenergie den Detektor zur gleichen Zeit erreichen.

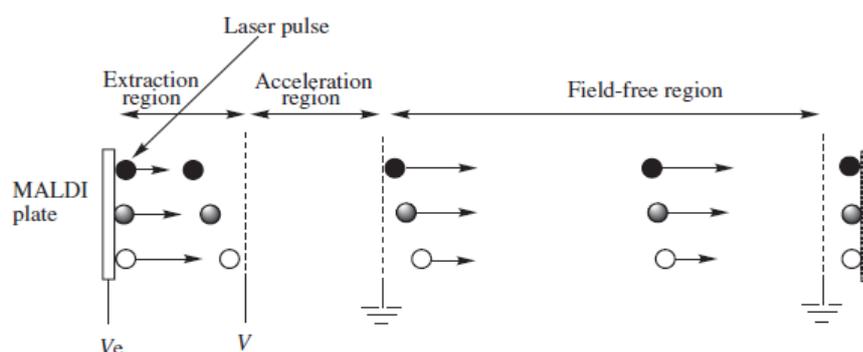


Abbildung 2.16: Prinzip der Fokussierung durch zeitlichen Verzögerung.

2.3.4.3 Reflektor TOF-Instrumente

Ein Reflektor ist eine Energiekorrektur-Anordnung, die die Auswirkungen der initialen räumlichen- und Energieverbreitung des Ionenstroms reduzieren kann [141]. Dieser elektrostatische Spiegel besteht aus einem Gitter und einer Reihe von Ring-Elektroden, je mit einer schrittweise Erhöhung des abstoßenden Potentials (Abbildung 2.17). Der Spiegel befindet sich am Ende des Flugrohrs [d.h., der ersten feldfreien Region (FFR) der Länge L_1] und arbeitet nach dem Prinzip, dass die Ionen nach dem Eintreten in diesen Bereich durch das abstoßende elektrische Feld verlangsamt werden bis sie zur Ruhe kommen. Danach kehrt sich ihre Bewegungsrichtung um, und sie werden wieder in der zweiten feldfreien Region FFR der Länge L_2 beschleunigt.

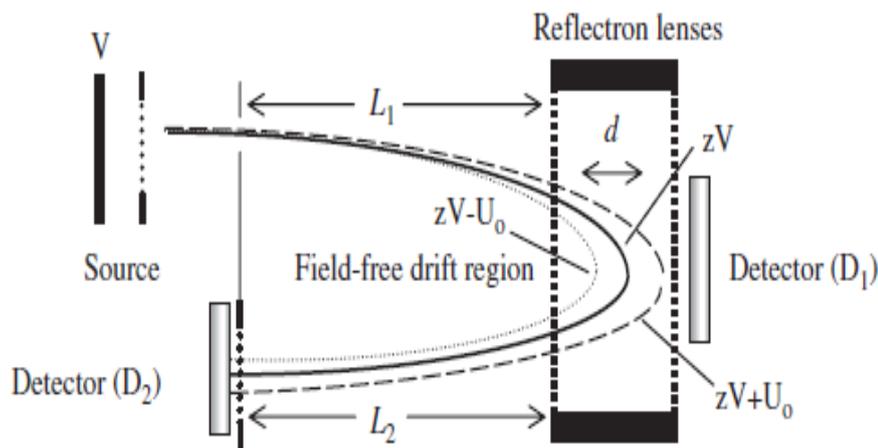


Abbildung 2.17: Reflektor-Flugzeit-Massenanalysator.

Ionen mit einer überhöhten Energie $qV + U_0$ (wobei $U_0 = 1/2 mv_0^2$) treten früher in den Reflektor ein, sie verbringen aber mehr Zeit im reflektierenden Bereich, weil sie mit größerer Tiefe (d) eindringen als Ionen mit durchschnittlicher Energie qV .

Bei einer richtigen Einstellung der Ringspannungen, wird die kürzere Flugzeit der schnellen Ionen somit durch diese zusätzliche Zeit in dem Spiegel kompensiert. Als Folge werden alle Ionen mit dem gleichen m/q -Wert gleichzeitig beim Detektor am Ende des zweiten FFR ankommen, das Ergebnis ist eine Verbesserung der Massenauflösung. Die zusätzliche Flugstrecke durch die zweiten FFR trägt ebenfalls zu besserer Auflösung bei. Der Spiegel bringt auch den Raum der Fokussierungsebene in eine nützliche Entfernung von der Quelle. Er ermöglicht die Verwendung eines höheren Extraktionbereichs, und reduziert damit die Umkehrzeit [141-143].

2.3.4.4 Orthogonal Beschleunigung im TOF Massenspektrometer

Die orthogonale Beschleunigung (orthogonal acceleration, oa) ist ein Merkmal eines oa-TOF-Massen Analysators und ermöglicht die Verwendung von kontinuierlich arbeitenden Ionenquellen [100,144]. Der Ionenstrahl aus der externen Quelle tritt in die Ionen-Beschleunigungs-Region senkrecht zur Hauptachse des TOF-Instruments ein (Abbildung 2.18).

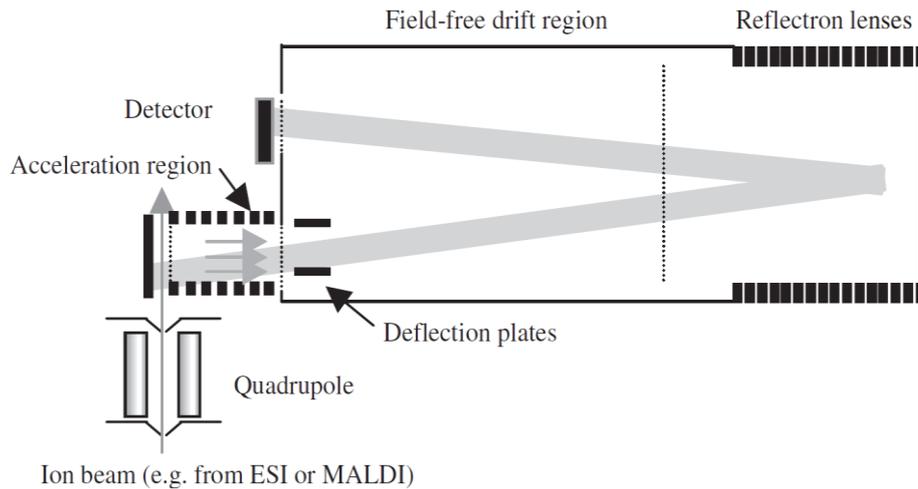


Abbildung 2.18: Prinzip des orthogonalen Time-of-Flight-Massenanalysators.

Um die Ionen effizient von einem Abschnitt des Strahls der Massentrennung zuzuführen, wird ein kurzer Puls auf den orthogonalen Beschleunigungsbereich angelegt. Dieser Ansatz bietet einen hohen Wirkungsgrad um Ionen aus einer externen Quelle einzuschleusen. Darüber hinaus reduziert er die räumliche und energetische Inhomogenität der in der Quelle gebildeten Ionen durch Minimierung des Turn-around-Effekts [145].

Die Kopplung einer externen kontinuierlichen Ionenquelle mit der Ionen-Beschleunigungs-Region eines oa-TOF Massenspektrometers erfolgt über eine ionenoptische Fokussierung, um so viele Ionen wie möglich in Richtung der Massenanalysators zu übertragen. Ursprünglich wurde eine Serie von drei flachen Linsen verwendet, wie sie üblicherweise in EI/CI Quellen vorkommt.

Es wurde gezeigt, dass eine bessere Ionen-Übertragung in dieser Region durch den Ersatz des Linsen-Stapels durch einen mit Radiofrequenz betriebenen Multipol (Quadrupol, Hexapol oder Octopol mit entweder mit 4, 6 oder 8 Stäben) erreicht werden kann [146-148]. Dabei wird die Ionenstrahl-Divergenz minimiert und zur Erhöhung der Ionen-Transport-Effizienz beigetragen.

2.3.4.5 Hybrid Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (QTOF-MS)

Einige Massenspektrometer kombinieren verschiedene Arten von Massenanalysatoren. Diese heißen hybride Instrumente [149]. Die Vorteile der oa-TOF-Analysatoren mit kontinuierlichen Ionenquellen wurden seit den 1990er Jahren in hybriden Instrumente genutzt, wo diese Analysatoren als zweiten Massenanalysatoren installiert werden [149]. Der erste Massen-Analysator wird mit dem TOF in einer Weise gekoppelt, dass die Beschleunigung der Ionen im TOF-Rohr senkrecht zu der ersten Bahn der Ionen erfolgt. Der TOF-Analysator ist als zweite Stufe des Instruments vorteilhaft, weil seine Fähigkeit zur gleichzeitigen Übertragung aller Ionen zu einer erheblichen Steigerung der Empfindlichkeit führt.

Tatsächlich hat der TOF-Analysator den Vorteil der gleichzeitigen Erfassung aller Ionen mit einer guten Genauigkeit, weil der Analysator die Ionen nacheinander beim Scannen in der Zeit detektiert. Daher bietet diese Kombination klare Vorteile bezüglich Messgeschwindigkeit und Empfindlichkeit, auch wenn ein breiter Massenbereich analysiert wird. Dies gilt sowohl in MS und MS/MS-Modus.

Die erfolgreichsten hybriden Instrumente sind die, in denen ein oa-TOF mit einem Quadrupol-Analysator in einer Q-TOF-Konfiguration kombiniert wurde. Diese Instrumente sind leistungsfähig und robust mit einzigartigen Leistungen [150-152]. Sie bieten eine hohe Empfindlichkeit im Attomol-Bereich (10^{-18} mol).

Die Auflösung von 10 000 FWHM ermöglicht die Zuweisung der Ladungszahl von mehrfach geladenen Ionen, ein Masse-Bereich erweitert bis ca. $m/z = 20\ 000$, und eine gute Massengenauigkeit von etwa 2 bis 10 ppm. Der schnelle Erfolg dieser Art von Hybrid-Geräten basiert auf der günstigen Kombination der Einfachheit des Quadrupols mit der hohen Leistungsfähigkeit des TOF.

Die hohe Empfindlichkeit und hohe Massengenauigkeit sind im MS- und im MS/MS-Modus vorhanden [150,153,154]. Wie Abbildung 2.19 zeigt, bestehen die am häufigsten verwendeten Q-TOF Instrumente aus einem Quadrupol-Analysator Q1 einer Quadrupol-Kollisionszelle q2 und einem oa-TOF. Sie haben damit die QqTOF Konfiguration. In einigen kommerziellen Instrumenten, wurde der q2 Quadrupol durch ein Hexapol ersetzt, aber das Prinzip bleibt das gleiche [149].

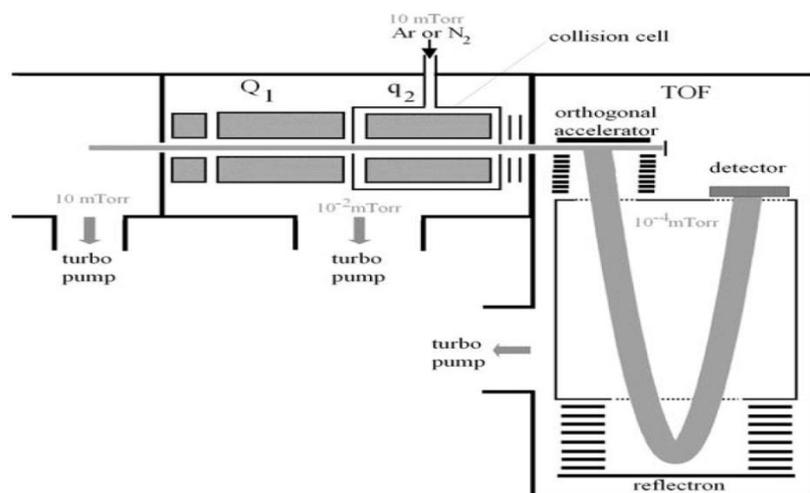


Abbildung 2.19: Schema eines Hybrid-Massenspektrometers bestehend aus einem Quadrupol-Analysator, einer Quadrupol-Kollisionszelle und einem oa-Flugzeit-Massenanalysator.[aus 149]

Im MS-Modus werden die beiden Quadrupole Q1 und q2 im RF-Modus betrieben und fungieren nur als Ionenleiter, sind aber in ihrem Massebereich begrenzt. Der TOF analysiert alle Ionen, die orthogonal beschleunigt werden und funktioniert als der einzige Masse-Analysator. Die daraus resultierenden Spektren nutzen die guten Leistungen des TOF-Analysators in Bezug auf Auflösung und Massengenauigkeit, aber mit einem begrenzt Massenbereich durch die Übertragung der Quadrupole. Dabei ist es unwichtig, ob der q2-Quadrupol ein Kollisionsgas enthält oder nicht [151].

Im MS/MS-Modus wird die Filterleistung von Q1 hingegen zur Selektion von interessierenden Vorläufer-Ionen benutzt. Diese Ionen werden dann durch eine Potentialdifferenz - die zwischen 10 und 60 eV beträgt - beschleunigt, bevor sie in die Kollisionszelle q2 eintreten, wo sie durch Kollision mit den neutralen Gasmolekülen fragmentiert werden (in der Regel Argon oder Stickstoff). Die daraus resultierenden Fragment-Ionen und das verbliebene Vorläufer-Ion werden dann als hochaufgelöste Massenspektren im TOF-Analysator registriert [149,152].

2.3.4.6 Leistungsfähigkeit moderner LC-TOF-MS-Geräte

Seit der Einführung der kommerziellen orthogonalen Flugzeit Instrumente (oa - TOF) in der Mitte der 1990er-Jahren wurden signifikante Verbesserungen sowohl bei den Ionenquellen als auch bei der TOF-Massenspektrometrie selbst vorgenommen. Heute bieten mehrere Hersteller oa-TOF-MS und oa-TOF-MS/MS-Instrumente an, die als Vorteil eine einzigartige Kombination aus Geschwindigkeit, Empfindlichkeit, Auflösungsvermögen, und Massengenauigkeit aufweisen.

In Kombination mit einer Flüssig-Chromatographie ist oa-TOF daher eine effiziente Methode für die Analyse und Identifizierung von Spuren organischer Substanzen. Tabelle 2.4 zeigt die Leistungen, die mittels der TOF Instrumente erzielt werden können. Einzigartig bei TOF ist, dass jede dieser Spezifikationen gleichzeitig erreicht werden kann [155].

Tabelle 2.4: Eigenschaften eines High Performance oa - TOF-System

Eigenschaften	Spezifikation
Massengenauigkeit	< 2 ppm
Massenbereich	> 10,000 m/z
Auflösungsvermögen	bis zu 20,000
Sensitivität	< 10 pg
Dynamischer Bereich — im Spektrum	bis zu 5 Dekaden
Geschwindigkeit — Spektren/sec	bis zu 40/sec
Kosten	moderat

Hervorzuheben sind insbesondere die hohe Massengenauigkeit und das hohe Auflösungsvermögen. Da sich die exakten monoisotopischen Molmassen bedingt durch den unterschiedlichen Massendefekt der Atome je nach der elementaren Zusammensetzung unterschiedlich stark von den ganzzahligen Werten unterscheiden, kann aus ihnen die Summenformel der jeweiligen Verbindung abgeleitet werden. Dabei werden zusätzlich auch die Isotopenpeaks, die durch Anwesenheit von Deuterium, ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O oder ^{37}Cl bedingt sind, ausgewertet, wobei sowohl das Intensitätsverhältnis (abundance match) als auch der m/z-Abstand (spacing match) als Kriterium für die Richtigkeit einer Summenformel mit angewendet werden (Isotopenmuster). Die Software von LC-TOF-MS-Geräten ermöglicht eine automatische Berechnung der Summenformel auf der Basis dieser Messdaten.

2.4 Literaturbeispiele für die Anwendung von LC-TOF/MS in der forensisch-toxikologischen Analyse

Die anhaltenden Entwicklungen in der analytischen Instrumentierung während der letzten Jahre hatten einen großen Einfluss auf das forensische Labor. Unter den instrumentellen Methoden der forensischen Toxikologie ist das Massenspektrometer zur Methode der Wahl geworden. Während bis vor etwa 10 Jahren GC/MS mit Elektronenstoß-Ionisation (EI), und später mit chemischen Ionisation (CI), die einzigen verwendeten Massenspektrometrie-Techniken waren, findet sich heute ein Vielzahl von MS-Techniken in forensischen Labors.

Dazu zählen vor allem LC/MS mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) oder chemischer Ionisation unter atmosphärischen Druck (APCI) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sowie auch MS-TOF. Diese Techniken ermöglichen die Erkennung und

Identifizierung von Spuren-Komponenten in komplexen Gemischen mit einer hohen Empfindlichkeit sowie eine Analyse von nichtflüchtigen und thermisch labilen Verbindungen. Die Einbeziehung der neuen Techniken der Massenspektrometrie in das forensische Labor ebnete den Weg für neue Anwendungen in der forensischen Analyse.

Obwohl die im vorangegangenen Abschnitt zusammengefassten Eigenschaften des LC-TOF-MS ein hohes Potential für die forensische Toxikologie bieten, wurden bislang nur relativ wenige Arbeiten hierzu publiziert. Einen Überblick über bisherige Anwendungen in der systematischen toxikologischen Analyse gibt Tabelle 2.5.

Einige der in Tabelle 2.5 aufgeführten Arbeiten sollen etwas näher erläutert werden. Gergov et al. beschrieben 2001 erstmalig ein Screening-Konzept für Drogen und Arzneimittel im Urin mit Hilfe der Summenformel-Identifizierung durch LC/TOF-MS [163].

Tabelle 2.5: Literaturübersicht zur bisherigen Anwendung von LC-TOF-MS oder LC-QTOF-MS zum toxikologischen Screening.

Autoren	LC- TOF Modus	Massen- genauigkeit	Kriterien für Subst. Ident.	Bibliothek	Proben Vorbereitung	praktische Anwendung
Pelander et al. 2003 [156]	LC-TOF	5 ppm	Exak. Masse, RT , Metab.	In-Haus, 637 Verbindungen	SPE	Urin
Ojanperä et al. 2006 [157]	LC-TOF	5 ppm	Exak. Masse, RT, Isotopenmuster, Metab.	In-Haus, 735 Verbindungen	SPE	Urin
Pelander et al. 2008 [158]	LC-TOF	5 ppm	Exak. Masse, RT , Isotopenmuster.	In-Haus, 815 Verbindungen	Digestion im NaOH, SPE	Haare
Decaestecker et al. 2004 [159]	LC-QTOF	-	IDA, CID Spektren	In-Haus, 300 Verbindungen	SPE	Blut
Kaufmann et al. 2007 [8]	LC- TOF	5 ppm	Exak. Masse, in- source CID Spektren	In –Haus, 100 Verbindugen	Dilution mit Acetonitril	Urin
Polettini et al. 2008 [160]	CE-TOF	5 ppm	Exak. Masse	PubChem Subst, 50500 Substantz.	LLE	Haare, Blut, Urin.
Lee et al. 2009 [161]	LC-TOF	5 ppm	Exakt. Masse, in- source CID Spektren	In –Haus, 300 Verbindugen	LLE	Urin
Kolmonen et al. 2007 [162]	LC-TOF	5 ppm	Exak. Masse, RT , Isotopenmuster	In –Haus, 124 Verbindugen und 70 Metabolten	SPE	Urin

Die Methode wurde seither verbessert und validiert [156]. Neben der forensischen und klinischen Toxikologie war die Methode auch nützlich für die Doping-Kontrolle [162]. Die Verfahren basieren auf der Messung der genauen Masse der Wirkstoffe kombiniert mit der gezielten Suche in einer Datenbank von theoretisch berechneten akkuraten mono-isotopen Massen der wichtigsten toxikologisch relevanten Substanzen. Einträge in dieser großen Datenbank, die die Summenformeln der Referenzsubstanzen und deren Metaboliten repräsentieren, werden mit den gemessenen Massen für protonierten Moleküle MH^+ verglichen.

Die Probenvorbereitung basiert auf der Festphasenextraktion der Urinproben mittels Kationenaustausch/C-4 Säulen nach vorheriger Hydrolyse mit Glucuronidase [157]. Die Methode ermöglicht die Extraktion von basischen und amphoteren Verbindungen mit breitem Spektrum der Polarität. Die chromatographische Trennung basiert auf einer Luna C - 18 (2) 100×2 mm ($3 \mu m$) (Phenomenex, Torrance, CA)-Säule mit einem Gradienten mit 5 mM Ammoniumacetat in 0,1% Ameisensäure und Acetonitril als mobile Phase. ESI-TOF-MS wurde im positiven Modus betrieben. Neben der Messung der genauen Masse stützte sich die Identifikation auf Isotopenmustern, Retentionszeit (wenn eine Referenzsubstanz verfügbar ist), und dem Nachweis bekannter Metaboliten im Urin. In einer Studie mit Autopsie Urinproben waren der Mittelwert und der Median des Massefehlers der absolute 2,5 ppm und 2,2 ppm, entsprechend 0,65 und 0,60 mDa [157].

In einer post-mortem Urinprobe wurden zum Beispiel folgende 13 Wirkstoffe, zusammen mit einigen von ihren Metaboliten und dem interne Standard Dibenzepin identifiziert: Oxazepam, Temazepam, Carbamazepin, Carbamazepin-10,11-Epoxid, 10,11-Dihydroxycarbazepin, Iminostilben, Clobazam, Norclobazam, Cotinin, Hydroxycotinin, Paracetamol, Phenylethylmalonamid, 4-Hydroxyalprenolol, Noralprenolol, 7-Aminonitrazepam, 7-Acetamidonitrazepam, Tramadol, O-Desmethyltramadol, Nortramadol, O-Desmethylnortramadol, Normedazepam, Dinorvenlafaxin, Warfarin, Oxcarbazepin, Levetiracetam, Dibenzepin und Bisoprolol. Die Einträge in dem Bericht Clobazam ($m/z=301,0731$) und Norclobazam ($m/z=287,0577$) erwiesen sich als falsch positive Ergebnisse, die entsprechenden Massen gelten gleichermaßen für die isomeren Verbindungen Temazepam ($m/z=301,0731$) und Oxazepam ($m/z=287,0577$).

Darüber hinaus wurde die Masse für Nortramadol und O-Desmethyltramadol ($m/z=250,1802$) fälschlicherweise dem isomeren Dinorvenlafaxine ($m/z=250,1802$) zugeordnet. Diese falsch-positiven Ergebnisse demonstrieren die Tatsache, dass die Summenformel

wegen der Vielzahl möglicher Isomere zur Identifizierungen bei weitem nicht ausreicht und dass weitere Kriterien zur Bestätigung erforderlich sind.

In einer anderen Arbeit untersuchten Ojanperä et al. [164] drei postmortem Urinproben mit LC-TOF-MS (Applied Biosystems) und verglichen die Ergebnisse mit denen der LC-FTMS (*Fourier Transformation Mass Spectrometry*). Für die Identifizierung wurden zwei Datenbanken mit den theoretischen Massen von 637 bzw. 7640 Verbindungen [156,165] benutzt. Durch die Messung der exakten Masse wurden alle Wirkstoffe, die mit LC-TOF/MS nachgewiesen wurden, auch mit LC-FTMS festgestellt. Die Konzentrationen lagen dabei im Bereich 0,01-31 mg/L. Ausnahmen bildeten Amphetamin in der Probe 1 sowie Nikotin und Dibenzepin in der Probe 2. Da mit zunehmender Anzahl von Verbindungen in der Datenbank auch die Zahl der als Suchergebnis vorgeschlagenen Substanzen ansteigt, werden zusätzliche Informationen wie Retentionszeit, MS-MS Fragmentation und Metabolite unbedingt benötigt, um eine sichere Identifizierung zu erreichen.

ElSohly und seine Mitarbeiter [166] untersuchten mit LC-TOF/MS 156 Urinproben von vermutlichen Opfern von sexuellem Missbrauch nach Beibringung von K.-O.-Mitteln. Von den häufigsten 22 Benzodiazepinen werden wurden 19 nachgewiesen. Die Nachweisgrenze lag im Bereich von 0,5 bis 3,0 ng/ml und die Bestimmungsgrenze zwischen 2 und 10 ng/ml. In der Mehrheit der Proben wurde mindestens eines der folgenden Benzodiazepine identifiziert: Temazepam, Nordiazepam, Diazepam, und/oder Oxazepam. Die nächsthäufigen Benzodiazepine waren α -Hydroxyalprazolam und Alprazolam, 7-Aminoclonazepam und Lorazepam.

Die Substanzidentifizierung mit Hilfe der Summenformel erfordert eine einfache Referenz-Datenbank, die aus einer Liste von Verbindungen mit deren Namen und den Summenformeln besteht. Ojanpera et al. [157] erstellten eine In-Haus-Datenbank mit 735 pharmazeutisch oder toxikologisch relevanten Substanzen einschließlich therapeutischen und illegalen Drogen, Designerdrogen und Metaboliten.

Weiterhin haben sie eine Datenbank mit 124 Dopingsubstanzen (70 Metabolite) entwickelt [184]. Die kommerzielle Datenbank von Pfleger, Maurer und Weber (PMW) [167] mit mehr als 7800 Substanzen einschließlich Metabolite ist aufgrund der Derivate GC orientiert hat deshalb nur begrenzten Nutzen im TOF-MS Screening. Poletini et al. [160] haben durch gezielte Auswahl aus dem PubChem-Substanzpool eine Referenz-Datenbank von 50500 Substanzen für die General-unknown-Untersuchungen erstellt und diese in der Praxis getestet [168].

Hayashida und seine Kollegen [169] haben unter Verwendung der Ergebnisse der TOF-MS-Messung eine Datenbank von 41 verschiedenen Benzodiazepinen mit Summenformel, Retentionszeit und akkurater Masse publiziert. In der Analyse von Proben von Patienten, die mehr als 2 Benzodiazepine genommen hatten, wurde die Selektivität mit Hilfe der exakten TOF-MS Massen-Datenbank verbessert. TOF-MS ist effektiv für forensische Toxikologie in der Unterscheidung ähnlicher Benzodiazepine und deren Metaboliten menschlichen Proben.

Analyse von kontrollierten Drogen ist ein fester Bestandteil der Aufgaben des kriminaltechnischen Labors. Laks et al. haben gezeigt, dass die Straßendrogen auch bei Fehlen eines Referenzstandards durch eine Kombination von zwei modernen Techniken analysiert werden können: Identifizierung durch Summenformel-basierte Analyse mittels LC-TOF-MS und Quantifizierung mit Hilfe Stickstoff-Chemilumineszenz-Detektors (LC/CLND) [170]. LC/TOF-MS wurde auch bereits auf alternative Matrices angewandt, z. B. Cannabis im Speichel [171] und Drogen im Haar [172].

2.5 Identifizierung von Metaboliten durch LC-TOF-MS

Die hohe Sensibilität, Selektivität, und Massengenauigkeit der LC/MS-Technik hat es erlaubt, sie als ein analytisches Routineinstrument für Drogenstoffwechselstudien zu benutzen [173,174]. Seit TOF Massenspektrometer auch in hoher Auflösung (5000-20000) arbeiten, erreichen diese Instrumente eine ausreichend hohe Massengenauigkeit (<5 ppm) zur Berechnung der elementaren Zusammensetzung der Ionen und ihre Fragment-Ionen [175-177].

Mit Verbesserungen in der Softwares der LC-TOF-MS-Systeme [178], hat sich diese Technologie eine starke Position bei der Aufklärung des Medikamentenstoffwechsels gesichert, und für die Zukunft ist zu erwarten, dass sie eine viel breitere Rolle bei der Metaboliten- und Biomarker-Identifizierung spielen wird.

Mit Hilfe der hochaufgelösten Massenspektren kann in den Chromatogrammen verhältnismäßig leicht auf das Vorhandensein von (erwarteten) Phase-I-Metabolite eines nachgewiesenen Wirkstoffs untersucht werden.

Tabelle 2.6 zeigt eine Liste von allgemeinen Phase-I-Biotransformationen und die entsprechenden Masseänderungen.

Die häufigsten Metabolismusprozesse sind Oxidationen, die einen Metaboliten mit der Molmasse $M + 16$ DA erzeugen. In vitro werden für die Bildung von Phase-I-Metaboliten einer Verbindung häufig Lebermikrosomen verwendet. Die meisten Phase-I-Biotransformationen werden durch Cytochrom P450-Enzyme vermittelt. Tabelle 2.7 enthält

eine Liste von allgemeinen Phase-II-Biotransformationen und die entsprechenden Masseänderungen.

Tabelle 2.6: Allgemeine Phase-I-Biotransformationen und die entsprechende Änderung in der Molmasse der Muttersubstanz.

Masseänderung	Art der Biotransformation
- 28,0312	Deethylierung (-C ₂ H ₄) oder zweifache Demethylierung
14,0157	Demethylierung (-CH ₂)
2,0157	Zwei-electronische Oxidation (-H ₂)
+ 2,0157	Zwei-electronische Reduktion (+H ₂)
+ 13,9792	Addition von Sauerstoff und zwei-electronische Oxidation (+O,-H ₂)
+ 15,9949	Addition von Sauerstoff (+O), Hydroxylierung, Epoxidbildung
+ 18,0106	Hydratation (+H ₂ O)
+ 29,9741	Addition von zwei Sauerstoff u. zwei -electron Oxidation (+2O-H ₂)
+ 31,9898	Addition von zwei Sauerstoff Atomen (+2O)

Tabelle 2.7: Allgemeine Phase-II-Biotransformationen und die entsprechende Änderung in der Molmasse der Muttersubstanz.

Masseänderung	Art der Biotransformation
+ 42,0106	Acetylierung
+79,9568	Sulfatbildung
+57,0215	Zwei-electronische Oxidation (-H ₂)
+ 107,0041	Addition von Taurin
+ 176,0321	Glucuronidierung
+307,0837 oder 305,0682	Addition von Glutathion

Obwohl die exakte Massenänderung ausreichend zur Bestimmung der Art einer Biotransformation ist, sind die durch Fragmentierung gebildeten Produkt-Ionen (MS/MS-Spektren oder in-source collision induced dissociation CID) zur Bestimmung der Position im Molekül, in der die strukturelle Änderung stattfand, sehr wichtig.

Die Produkt-Ionen (MS/MS, CID) können eine beträchtliche Menge an strukturellen Informationen für die Metaboliten-Identifizierung geben. Trotzdem ist es manchmal schwer, zwischen Strukturisomeren zu unterscheiden. Daher werden auch zusätzliche Werkzeuge für Metaboliten-Identifizierung benutzt.

Zum Beispiel war es nicht möglich, basierend auf den Produkt-Ionen (MS/MS-, CID-Spektren) allein die Position der Glucuronidierung für zwei Konjugate 1 und 2 der CP-101606 (ein NMDA-Rezeptor-Antagonist beim Menschen) festzustellen [179]. Die Position der Konjugation ergab sich erst nach Derivatisierung der Probe mit Diazomethan. Manchmal wird die Derivatisierung eines Metaboliten auch angewandt, um eine weitere hydrophobe, leicht ionisierbare Einheit zu schaffen.

Dalvie et al. (1998) [180] dansyliert mehreren polaren Metaboliten einer Verbindung im Urin, die durch Radiochromatography nachweisbar waren, aber nicht durch LC-MS identifiziert werden konnte. Die Präsenz der Dimethylamino-Funktion in der Dansyl Gruppe erleichterte die Protonierung und die Charakterisierung der Metaboliten durch LC-MS. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Erhöhung des Molekulargewichts des Analyten und häufig die chemischen Interferenzen reduziert.

Wenn die Mutterverbindung ein charakteristisches (stabiles) Isotopen-Muster enthält, zum Beispiel bei der Anwesenheit von einem oder mehreren Chlor- oder Bromatomen, können die Metaboliten durch Untersuchung dieses speziellen Isotopen-Musters identifiziert werden (Clusteranalyse).

Die Anwesenheit des gewünschten Isotopen-Musters erhöht die Sicherheit, dass das Signal in der Tat im Zusammenhang mit der verabreichten Verbindung steht. Wienkers et al. (1995, 1996) [181,182] identifizierten Metaboliten von Tirilazad ($C_{38}H_{52}N_6O_2$), einem potenten Inhibitor der Membranlipide-Peroxidation, und sie benutzten als isotopes Label das [2,4,6- $^{13}C_3$,1,3- $^{15}N_2$ -pyrimidin] Tirilazad. Die Metaboliten wurden, durch das Auftreten zweier Signale mit gleicher Abundance aber getrennt um 5 Da identifiziert (Abbildung 2.20).

Wasserstoff-Deuterium (H/D) Austausch ist eine weitere nützliche massenspektrometrische Methode bei der Metaboliten-Identifizierung. Der Online-H/D Austausch bei der LC/MS ist dabei ein besonders schneller Weg [183,184]. H/D Austausch erleichtert durch Bestimmung der aziden Wasserstoff-Atome (z. B. in -OH, -SH oder -NH) die strukturelle Charakterisierung und die Interpretation von MS/MS-Daten.

Es gibt viele Publikationen für die Verwendung von LC-TOF-MS in der Identifizierung von Phase I und Phase II Metaboliten [186-195]. Die vermeintlichen verbindungsbedingten HPLC-Peaks wurden durch einen Vergleich mit den entsprechenden Vordosis Proben bestätigt.

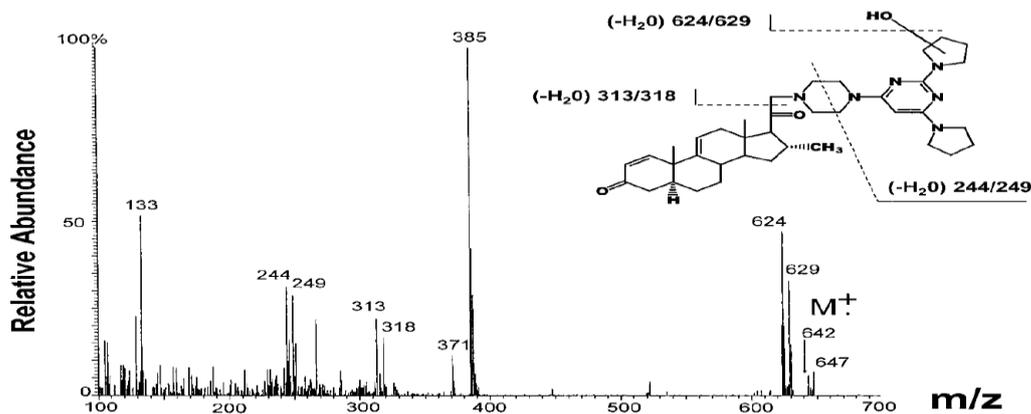


Abbildung 2.20: LC-MS-Elektronen-Ionisations-Massenspektrum für den oxidierten Metaboliten von U-89678 DHT-1. Das Massenspektrum wurde nach Co-Inkubation von U-89678 mit einem äquimolaren Verhältnis von [$^{13}\text{C}3$, $^{15}\text{N}2$] U-89678-Mesylat in menschlichen Lebermikrosomen erhalten. Wienkers et al (1998) [185].

In diesem Ansatz wird jedes Masse-Chromatogramm in dem gewählten Massen Bereich mit einem gleichwertigen Masse-Chromatogramm aus einer Vordosis-Probe verglichen. Chromatographische Peaks, die in der Probe gefunden werden, aber nicht in der Kontrolle Probe präsent sind, sind in der Regel der Mutterverbindung und deren Metaboliten oder dem Vehikel zuzuordnen. Dieser Prozess führt zu Informationen über Molekulargewicht (abgeleitet von den ermittelten $[\text{M}+\text{H}]^+$ oder $[\text{M}-\text{H}]^-$ Ionen), welches man in einigen Fällen nutzen kann, um einen Stoffwechselprozess nachzuweisen.

Kommerzielle Software für die Suche und Identifizierung der Metaboliten (z. B. Metabolynx der Firma Waters und Metabolit ID MassHunter der Firma Agilent) wurde vor kurzem für die automatisierte Verarbeitung von Masse-Chromatogrammen und Spektren entwickelt [196-198].

Die Software sucht nach erwarteten Metaboliten und nach den Unterschieden zwischen zwei oder mehr LC/MS Läufen und kann MS/MS Experimente zur Bestätigung der Identität des Metaboliten steuern. Ein Isotopen-Cluster-Analyse-Werkzeug für Halogen-Verbindungen oder andere Funktioneinheiten ist in der Software integriert. Eine besondere Beschränkung der Software ist, dass sie nicht alle theoretisch möglichen Biotransformationen-Reaktionen für ein bestimmtes Medikament erfassen kann. Deshalb muss der Benutzer die meisten der wichtigsten erwarteten Metaboliten manuell hinzufügen. Computer-basierte Systeme für die Vorhersage der Drogenstoffwechselwege stehen somit zur Verfügung, und sind umso zuverlässiger je mehr Stoffwechsel-Daten für verschiedene Verbindungen beinhaltet sind. Aber es ist noch nicht möglich den kompletten Stoffwechsel einer Verbindung ausschließlich auf der Grundlage ihrer Struktur vorherzusagen [199-201].

Das Massendefekt Filterprogramm, das von Zhang et al. eingeführt wurde, entfernt effektiv aus der Matrix herrührende Ionen aus den exakten Masse Analysen. Ein Massedefekt wird als die Differenz zwischen der exakten Masse und der nominalen Masse einer Verbindung definiert. Phase-I- und Phase-II-Reaktionen haben eindeutig unterschiedliche Massendefekte, die in der Regel innerhalb von 50 mDa liegen. Zum Beispiel ist der Massendefekt im Bezug zur Muttersubstanz 5 mDa für Hydroxylierung, -23 mDa für Demethylierung und 32 mDa für Glucuronidierung. Auf der Grundlage dieser Informationen, kann ein Massenfenster definiert werden. Dadurch werden Ionen, deren Massedefekt außerhalb des Fensters liegt, ausgefiltert.

3. Experimenteller Teil

3.1 Verwendete Instrumente

3.1.1 HPLC-DAD-Systeme

Für die HPLC-DAD-Untersuchungen wurden zwei HPLC-DAD-Anlagen mit folgender Konfiguration und folgenden Messbedingungen angewendet:

- HPLC-System 1:

Autoinjektor: SIL-6B, Shimadzu, Japan

Systemcontroller: SCL-6B, Shimadzu, Japan

Detektor 1: SPD-M10A, Shimadzu, Japan

Detektor 2: SPD-M10A VP, Shimadzu, Japan

Pumpe: LC-6A, Shimadzu, Japan

Entgaser: DG-1210, Uniflows (Tokio, Japan)

Analytische Trennsäule: CC 250/4 LiChrospher 100 RP8 ec mit Vorsäule 8x4 mm
(Macherey-Nagel, Düren)

Mobile Phase A: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (37/63, (V: V))

Mobile Phase B: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (63/37, (V: V))

Mobile Phase C: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (20/80, (V:V))

Mobile Phase E: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (10/90, (V:V))

Flussrate: 1,0 ml/min

- HPLC-System 2:

Autoinjektor: SIL-10A XL, Shimadzu, Japan

System controller: SCL-10A VP, Shimadzu, Japan

Detector: SPD-M10A VP, Shimadzu, Japan

Entgaser: DGU-14A, Shimadzu, Japan

Pumpe: LC-6A, Shimadzu, Japan

Software: LcSolution, Version 1.2.1 SPI

Analytische Trennsäule: CC 250/4 LiChrospher 100 RP8 ec mit Vorsäule 8 x 4 mm
(Macherey-Nagel, Düren)

Mobile Phasen: A-B-C-E (s. HPLC-System 1) *Flussrate:* 1,0 ml/min

3.1.2 GC/MS-System

Die GC-MS-Untersuchungen erfolgten mit einer Anlage folgender Konfiguration

Gaschromatograph: 6890N (G1530N), Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)

Massenselektiver Detektor: 5973N (Network) MSD, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)

Autosampler: Multi Purpose Sampler MPS2, Gerstel (Mühlheim/Ruhr, Germany)

GC/MS-Trennsäule: PTA-5-Säule (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm), Supelco (Bellefonte, USA)

Software Steuerung des Autosamplers: PAL Cycle Composer 1.5.2, Gerstel (Mühlheim/Ruhr, Germany)

Einstellung der Messparameter für GC/MS: Enhanced Chemstation G1701DA, Version D.00.01.27, Agilent Technologies, 2002

Spektrenbibliotheken:

Hans H. Maurer, Karl Pflieger, Armin A. Weber: Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites, Version 2007, 7840 Einträge

NIST02 (175 000 Einträge), National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA)

NIST05 (190 000 Einträge), National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA)

3.1.3 LC-TOF-MS Systeme

LC-FOF-MS-Untersuchungen wurden im Laufe der Arbeit drei Gerätekombinationen eingesetzt, zwei des Herstellers Agilent und eins der Firma Waters:

- Agilent 1100 Serie LC-Anlage, gekoppelt mit einem Agilent 6210 ESI-MS-TOF Instrument

HPLC Säulen: Eclipse XDB-C18, 2,1x100mm, 1,8µm, 600bar, CoO: US

Eclipse Plus C18, 2,1x50mm, 1,8µm, 600bar, CoO: US

Extend-C18, 2,1x100mm, 1,8µm, 600bar, CoO: US

Eclipse Plus C18, 2,1x12,5mm, 5µm, 4pk CoO: US

Eclipse Plus C18, 2,1x100mm, 1,8µm, 600 abr, CoO: US

Extend-C18, Grd.Crt. 2,1x12,5mm, 4pk CoO: US

Fließmittel: Fließmittel A: Wasser (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Fließmittel B: Acetonitril (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Gradient: s. Abschnitt 3.4.2

Software: Agilent MassHunter Workstation Version A. 02.01 B726

Analyst QS Ver. 1.1 Build, 9865 Applied Biosystems.

- Agilent 1200 Serie LC-Anlage gekoppelt mit einem Agilent 6530 Accurate-Mass ESI-Q-TOF-MS Instrument

HPLC Säule: Eclipse Plus C18 3:5 μm 2,1x150 mm.

Fließmittel: Fließmittel A: Wasser (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Fließmittel B: Methanol (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Gradient: s. Abschnitt 3.4.2.

Software: MassHunter Workstation Software Version B.03.01 (Agilent)

- LC-TOF-MS Waters System

LC- TOF-MS System: LCT Premier TOF-MS, Benchtop-LCT-Premier™-XE, ein orthogonal-beschleunigendes-Flugzeit-(oa-TOF)-Massenspektrometer gekoppelt mit einem Waters Aquity UPLC System

HPLC Säule: Acquity UPLC HSS T3 Säule (2,1x100 mm, 1,8 μm particles)

Fließmittel: Fließmittel A: Wasser (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Fließmittel B: Methanol (Baker) w/ 0,1% Ameisensäure

Gradient: s. Abschnitt 3.4.2.

Software: Masslynx (MassFragment und Metabolynx) V 4.1. SCN639 Build 137 Waters.

3.1.4 Laborgeräte

Sämtliche Einwaagen wurden an einer Feinanalysenwaage CP 2245-CE der Firma Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Das Temperieren von Blut- und Plasmaproben erfolgte in einem Trockenschrank ULM 400 der Firma Memmert (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland).

Zum Zentrifugieren der Vollblutproben wurden die Zentrifugen Labofuge 400 und Megafuge 1,0 der Firma Heraeus (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) verwendet. Für alle Flüssigextraktionen wurden der Thermomixer 5433 Comfort bzw. der Mixer 5432 der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt. Zum kurzzeitigen Schütteln von Proben diente ein Vortex-Rüttler VF 2 der Firma Janke& Kunkel (Janke&Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland).

Zum Einengen und Verdampfen der Lösungsmittel und zum Temperieren von Proben und Extrakten z.B. bei Derivatisierungsreaktionen wurde ein Metallblockthermostat Evaporator 2366-DA der Firma Liebisch (Gebr. Liebisch GmbH, Bielefeld, Deutschland) mit einer Stickstoffzufuhr über ein Multiplex Ventildepot herangezogen.

Zur Messung der pH-Werte bei der Herstellung der Pufferlösungen wurde eine Glaselektrode Sure-Flow Silver-Chloride in Kombination mit dem Messgerät PerpHecT Meter Serie Modell 370 der Firma ATI (ATI Orion Inc., Boston, USA) verwendet. Für Extraktions-, Reinigungs- bzw. Aufschlussschritte wurden die Ultraschallbäder Sonorex Super RK 255H und Sonorex TK 52 der Firma Bandelin electronic (Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt.

3.2 Verwendete Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Chemikalien:

Die in dieser Arbeit untersuchten Medikamentwirkstoffe wurden von den jeweiligen Herstellerfirmen zur Verfügung gestellt und ohne weitere Reinigung für die Messungen verwendet. Dabei handelte es sich um Referenzsubstanzen der UV-Spektrenbibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“, und ihre Identität wurde durch Vergleich der UV-Spektren mit der UV-Spektrenbibliothek gesichert [40].

Alle Chemikalien und Reagenzien, welche für die Herstellung der Pufferlösungen sowie für die Probenaufbereitungsverfahren verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen erworben und ohne weitere Aufreinigung oder Vorbehandlung verwendet:

Firma Merck (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland): Ameisensäure 90%ig, Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat p.A., Essigsäure 100%, β -Glucuronidase (Helix Promatia), Kalium-dihydrogenphosphatmonohydrat p.A., Kaliumhydroxid p.A., Natriumchlorid p.A., Natriumhydroxid, 1N Natronlauge, Perchlorsäure /Perchlorat-lösung zur Entweißung, Phosphorsäure 85%ig, Salzsäure 32%ig 1M Schwefelsäure. und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.A.

Sigma-Aldrich bzw. Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz): Ammoniumchlorid, Ammoniumhydroxid-Lösung 33%ig in Wasser, Magnesiumsulfat, Natriumhydrogencarbonat.

Serva (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland): MPPH 5-(4-Methylphenyl)5-phenylhydantoin research grade.

3.2.2 Lösungsmittel

Es wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt:

Firma Merck (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) : Uvasolv-Qualität: Acetonitril, Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, n-Hexan und Methanol; *Lichrosolv-Qualität:* 1-Chlorbutan, n-Heptan und Wasser; *Seccosolv-Qualität* iso-Octan.

Firma Riedel-de-Häen (Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland):
Methyl-tert-butylether (MTBE).

Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz): iso-Propanol, n-Propanol und Toluol.

Firma J. T. Baker (Deventer, Netherlands): Chloroform.

Alle Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Zur Herstellung der Pufferlösungen und Laufmittel für die HPLC wurde deionisiertes Wasser verwendet, welches im Labor zusätzlich über Kaliumpermanganat destilliert wurde. Wasser und Methanol für die LC-TOF-Messungen von der Firma J. T. Baker (Deventer, Niederlande) bezogen und ohne weitere Reinigung oder Vorbehandlung verwendet.

3.2.3 Pufferlösungen

Die für verschiedene Zwecke verwendeten Pufferlösungen wurden nach den folgenden Vorschriften selbst hergestellt. Zum exakten Einstellen des pH-Wertes wurde eine Glaselektrode mit dem Messgerät PerpHecT Meter Serie Modell 370 der Firma ATI (ATI Orion Inc., Boston, USA) verwendet.

Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,3 (0,1M)

6,66g Kaliumdihydrogenphosphatmonohydrat wurden in 900mL destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde während der Messung des pH-Wertes mittels einer Glaselektrode mit konzentrierter Phosphorsäure (85%ig, ca. 2,8 mL) auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt. Danach wurde die Lösung in einen 1000mL Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,0 (0,1M)

800 mL destilliertes Wasser wurde im Becherglas mit 5,7mL Eisessig vermischt und dann während der Messung des pH-Wertes über eine Glaselektrode mit 1M KOH-Lösung (ca. 16mL) auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 1000mL Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 (0,1M)

13,61g Kaliumdihydrogenphosphatmonohydrat wurden in 900mL destilliertem Wasser gelöst und die Lösung während der Messung des pH-Wertes mittels einer Glaselektrode mit 1M KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Danach wurde die Lösung in einen 1000mL Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 (0,1M)

3,52g Kaliumdihydrogenphosphatmonohydrat und 9,10g Dinatriumhydrogen-phosphat - dihydrat wurden in 900mL destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde während der Messung des pH-Wertes mittels einer Glaselektrode mit 1M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde sie in einen 1000mL Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Trislösung mit einem pH-Wert von 9,0 (0,2M)

24,3g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurden in 900mL destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in einen 1000mL Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

3.3 Probenmaterialien und Probenvorbereitung

3.3.1 Probenmaterial:

Es wurden Extrakte sowohl aus Blut, Urin, Mageninhalt, Leber, Niere, Hirn, und Muskeln von postmortem Fällen, die im Institut für Rechtsmedizin der Charité obduziert worden waren, als auch aus Blut- und Urinproben von klinischen Fällen aus den Rettungsstellen der Charité untersucht. Mehr als 50 Wirkstoffe, die in den positiven Proben ab dem Jahr 2000 gefunden wurden, wurden in dieser Arbeit erneut mit Hinblick auf die Metaboliten untersucht.

Für die Ketamin und Azaperon Untersuchungen wurde zusätzlich Schweinsersum aus der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin (Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Ketamin/Azaperon-Allgemeinanästhesie bei Schweinen, Prof. K.H. Lahrman) untersucht. Nur die Blutproben wurden erneut mit LC-TOF-MS analysiert.

Die Proben wurden nach der Asservierung bis zur Erstuntersuchung bei 4°C und danach bis zu den HPLC-DAD und LC-MS-TOF-Messungen bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2. Saure und basische Extraktion von Blutproben

0,5 mL Blut bzw. Serum wurde bei saurem und bei basischen pH-Wert mit Methylenchlorid extrahiert. Zum Einstellen des sauren pH-Wertes wurde 0,1 mL Phosphat-Puffer (pH-Wert 2,3) zugesetzt. Substanzen, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure und Diphenylmethoxyessigsäure, die sich nur im stark sauren Milieu gut extrahieren lassen, wurden nach Zusatz von 0,1 mL 1N HCl extrahiert. Zum Alkalisieren wurden 0,1 mL Tris-Puffer mit dem pH-Wert von 9,0 zugesetzt. Anschließend wurden 0,4 mL Methylenchlorid, welches nur für die HPLC-DAD Messungen 2,5 µg/mL des Standards MPPH enthielt, hinzugefügt.

Die Proben wurden danach 2 min auf einem Vortexer geschüttelt und 5 min scharf zentrifugiert (3000U/min). 0,2 mL der unten befindlichen organischen Phase wurden entnommen und unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockne eingedampft. Zur HPLC-DAD, LC-TOF-MS Agilent und LC-TOF-MS Waters Analyse wurde der Rückstand in 0,1 mL der jeweiligen mobilen Phase aufgenommen und je nach Aufgabenstellung wurden 1 bis 50 µL injiziert.

Dieses Aufarbeitsverfahren diente als Standardaufarbeitsmethode und wurde beim Vorhandensein von Blutproben in allen Untersuchungsfällen eingesetzt.

Einige der zu untersuchenden Substanzen waren unter diesen Extraktionsbedingungen jedoch nicht oder nur in ungenügendem Maße zugänglich. Für solche Spezialfälle, wie beispielsweise die Paracetamolextraktion mit Ethylacetat, oder für die Analyse von Urin, anderen Körperflüssigkeiten sowie Organ- und Muskelproben kamen gelegentlich Aufarbeitsverfahren mit entsprechenden auf die Art des Untersuchungsmaterials abgestimmten Variationen zur Anwendung. Diese Verfahren werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.3.3. Saure Extraktion von Blutproben mit Ethylacetat

Zu 0,5 mL Blut oder Serum wurden 0,1 mL Acetonitril (mit 10µg/mL MPPH für HPLC-DAD Messungen), 0,1 mL Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 2,3 und 0,4 mL Essigester gegeben.

Das Gemisch wurde 2 min am Vortexer geschüttelt und anschließend 5 min bei 3000U/min zentrifugiert. Danach wurden 0,2 mL organische Phase entnommen und unter Stickstoff zum Trocknen eingedampft. Zur HPLC-DAD, LC-TOF-MS Agilent und LC-TOF-MS Waters Analyse wurde der Rückstand in 0,1 mL der jeweiligen mobilen Phase aufgenommen und es wurden je nach Aufgabenstellung 1 bis 50 µL injiziert.

3.3.4. Proteinfällung von Blutproben mit Acetonitril

Bei einigen Substanzen, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften mit keinem Extraktionsmittel ausreichend zugänglich waren, wurde eine Proteinfällung mit Acetonitril durchgeführt. Blut oder Serum wurden im Verhältnis 1:1 (0,5 mL + 0,5 mL) mit Acetonitril behandelt.

Die Proben wurden 1 min am Vortexer geschüttelt und anschließend bei 3000U/min zentrifugiert. 0,2 mL organische Phase wurden abgenommen und direkt für die HPLC-DAD, LC-TOF-MS Agilent bzw. LC-TOF-MS Waters Analyse verwendet.

3.3.5. Aufarbeitung von Urinproben

Urinproben enthalten im überwiegenden Maße die Metabolisierungsprodukte der zu untersuchenden Substanzen. Sie wurden entweder analog zu den unter Abschnitt 3.3.2 genannten Vorschriften für die saure und alkalische Blutextraktion aufgearbeitet, oder zwecks Spaltung der konjugierten Metabolisierungsprodukte durch saure Hydrolyse oder durch enzymatische Konjugatspaltung mittels β -Glucuronidase und anschließende saure oder alkalische Extraktion bearbeitet.

Bei der sauren Hydrolyse wurden 0,5 mL Urin mit 0,2 mL 1N Salzsäure versetzt. Dieses Gemisch wurde 30 min in einem Schraubröhrchen im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung der Probe wurde zum Neutralisieren der Lösung 1N NaOH dazugegeben (pH-Wert kontrollieren). Anschließend erfolgte je nach Aufgabenstellung entweder eine saure oder alkalische Extraktion mit Methylenchlorid (Abschnitt 3.3.2) oder es wurde wie beispielsweise beim Nachweis von Opiaten mit Chloroform/Isopropanol (9:1) extrahiert, wobei hier der pH-Wert 9,0 exakt eingehalten werden musste, da die Opiate nur im Bereich eines pH-Wertes zwischen 8,0 und 10,0 als lipophile Neutralsubstanzen vorliegen.

Bei der enzymatischen Konjugatspaltung mit β -Glucuronidase wurden 2,0 mL Urin und 4,0 mL 1M Acetat-Puffer (pH-Wert 5,0) mit 2000 U β -Glucuronidase über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1N Natronlauge auf 8,5 eingestellt und die Probe mit 5,0 mL Chloroform/Isopropanol (3:1) extrahiert.

Um eine höhere Reinheit der Extrakte zu erzielen, wurde die organische Phase nochmals mit 5,0 mL 0,1N Salzsäure rückextrahiert, die wässrige Phase mit 1N Natronlauge wieder auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und erneut mit 5,0 mL Chloroform/Isopropanol (3:1) für 1min auf dem Vortexer geschüttelt. Danach wurden die Proben bei 3000U/min zentrifugiert und 0,2 mL der organischen Phase unter Stickstoff eingengt. Zur Analyse erfolgte die Aufnahme der Rückstände in 0,1 mL mobiler Phase, wovon je nach Aufgabenstellung wieder 1 bis 50 μ L injiziert wurden.

3.3.6. Aufarbeitung von Organ- und Muskelproben

2,0 g Leber-, Niere oder Hirnprobe und 2,0 mL H₂O werden in einem Gefäß mit einem Homogenisator Ultra Turrax zerkleinert. Zu dem Homogenisat wurden 10,0 mL 4%-ige Perchlorsäure zum Enteiweißen hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde bei 3000U/min zentrifugiert, der erhaltene Überstand filtriert und mit 1N Natronlauge auf einen pH-Wert von 9-11 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 20,0 mL Methylenchlorid geschüttelt, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationverdampfer

zur Trocknung eingeengt. Zur Analyse wurden die eingedampften Proben in 0,5 mL mobiler Phase aufgenommen und davon 10 µL zur HPLC-DAD- und 1µL zur LC-TOF-MS-Trennung injiziert.

Die Aufarbeitung von Muskelproben erfolgte aufgrund eigener Erfahrungen in leicht abgewandelter Form: Die Extraktreinheit und die Wirkstoffausbeute aus den häufig bereits fäulnisveränderten Muskelproben konnten verbessert werden. Hierbei wurden 5,0 g Muskelgewebe mit 20 ml 3%-iger Weinsäure in Aceton homogenisiert. Nach einer Standzeit von 2 Stunden wurde die Lösung filtriert, mit Aceton nachgespült und Ammoniumsulfat zur weiteren Eiweißfällung zugesetzt.

Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand mit dem gleichen Volumen heißem Wasser versetzt. Die anschließende Extraktion erfolgte nach der pH-Wert Einstellung im sauren Milieu mit 10,0 mL Chloroform und im alkalischen Milieu mit 10,0 mL Chloroform/Isopropanol (3:1). Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trocknung eingeengt. Zur Analyse erfolgte wiederum die Aufnahme des Rückstandes in 0,5 mL mobiler Phase, wovon 1, 10 oder 20 µL injiziert wurden.

3.4 Durchführung der Messungen

3.4.1 HPLC-DAD

Das verwendete HPLC-DAD-Verfahren hat sich seit vielen Jahren in der Abteilung Toxikologische Chemie am Institut für Rechtsmedizin bewährt. Eine umfangreiche Beschreibung der Methode findet sich u.a. in [202,203] und vor allem [41].

Um eine ständige Betriebsbereitschaft der HPLC-Anlage zu gewährleisten, und um den Lösungsmittelverbrauch so niedrig wie möglich zu halten, wurde das isokratische Laufmittelgemisch im Kreislauf geführt. Dieses ist ohne Probleme bis ca. 14 Tagen bei voller Auslastung des Systems durchführbar. Als Standardverbindung, auf die alle Retentionszeiten bezogen wurden, diente 5-(4-Methylphenyl)-5-phenylhydantoin (MPPH). Das injizierte Probenvolumen lag je nach Aufgabenstellung zwischen 10 und 50 µl. Für die Bestimmung der Totzeit wurde Histaminhydrochlorid verwendet.

Bei der Chromatographieaufzeichnung durch den Photodiodenarraydetektor wurde der Bereich von 195-380 nm mit einer Zeitkonstanten von 1,28 s als Optimum zwischen notwendiger Auflösung und erforderlichen Speicherbedarf gewählt. Eine Analyse wurde in der Regel auf 30 min begrenzt.

Substanzen mit einer längeren Retentionszeit wurden in zusätzlichen Messungen in der mobilen Phase B gemessen. Die mobilen Phasen C oder E wurden verwendet, wenn schlecht aufgelöste Peaks im kurzen Retentionszeitbereich besser getrennt werden mussten. Zwischen den verschiedenen mobilen Phasen konnte durch Umschaltventile gewählt werden. Die Funktionsfähigkeit der HPLC-Anlage wurde durch tägliche Messung von 10 µl einer Kontrolllösung bestehend aus Histaminhydrochlorid (0,1 mg/ml, Totzeitkontrolle), Coffein (0,1 mg/ml, Peakflächenkontrolle), MPPH (0,1 mg/ml, Standard für relative Retentionszeit) und Benzol (1,0 mg/ml, Wellenlängenrichtigkeit und Auflösungsvermögen des Detektors) in der mobilen Phase A überprüft.

3.4.2 LC-MS-TOF

Für die LC-MS-TOF-Messungen wurden folgende Bedingungen angewendet:

- Messungen mit der UPLC-TOF-MS Anlage der Firma Waters

Fluss: 0,3 ml/min, Run Time: 20 min

Gradient: Fließmittel B%: 0-1min 10% B, 1-8min 10-75% B, 8-17 min 75-95% B, 17-18,50 min 95% B, 18,50-18,60 min 95-10% B, 18,60-20 min 10% B.

Ionenquelle: ESI, positiv oder negativ.

Referenzlösungen: 1ml 10mg/l Leucin Enkephalin-Lösung + 332 ml Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) + 0,3 ml Ameisensäure.

Säulentemperatur: 35,0 C°

MS-TOF-Parameter:

Funktion 1: W Modus, Zeit: 0,00 – 18,00 min, Min Mass Range: 50, Max Mass Range: 900, Sample Cone (V): 30, Aperture 1 (V): 10, Reference Cone (V): 50, Reference Aperture 1 (V): 10, Gas Temp (C): 300, Nebulizer (psig): 50.

Funktion 2: W Modus, Zeit: 0,00 – 18,00 min, Min Mass Range: 5, Max Mass Range: 900, Sample Cone (V): 60, Aperture 1 (V): 50, Reference Cone (V): 50, Reference Aperture 1 (V): 10, Gas Temp (C): 300, Nebulizer (psig): 50.

- Messungen mit den LC-TOF-MS-Anlagen der Firma Agilent

a. Agilent 1100 Serie LC-Anlage, gekoppelt mit einem Agilent 6210 ESI-MS-TOF Instrument

Fluss: 0,3 ml/min, Stopp Zeit: 16 min

Gradient: Fließmittel B%: 0-1min 5% B, 1-4min 5-75% B (linear), 4-10 min 75-100% B (linear), 10-11 min 100% B, 11-11,1 min 100-55% B (linear), 11,1-13 min 5% B.
Ionenquelle: ESI, Positive oder Negative.

Referenzlösungen: für positiven und negativen Mode, A: 947ml Acetonitril, 50 ml H₂O, aus API-TOF Reference Mass Solution 2ml Purin, 0,8 HP0921 (Agilent), 1 ml TFANH₄ (Agilent).

Säulentemperatur: 35,0C°

MS-TOF-Parameter: Min Range: 100, Max Range: 1100, Bin Width(nsec): 104992, Fragmentor (V): 120, Skimmer (V): 60, OCT RFV (V): 250, Gas Temp (C): 300, Nebulizer (psig): 50, Drying Gas (l/min): 10,0, Capillary (V): 4000, Reference Masses: 121,050873-922,009798.

b. Agilent 1200 Serie LC-Anlage gekoppelt mit einem Agilent 6530 Accurate-Mass ESI-Q-TOF-MS Instrument

Fluss: 0,4 ml/min, Stopp Zeit: 16,5 min

Gradient: Fließmittel B%: 0-11min 5% B, 11-16min 5-5% B , 16-16,5 min 5-85% B (linear).

Ionenquelle: ESI, Positive oder Negative.

Referenzlösungen: für positiven und negativen Mode, A: 947ml Acetonitril, 50 ml H₂O, aus API-TOF Reference Mass Solution 2ml Purin, 0,8 HP0921 (Agilent), 1 ml TFANH₄ (Agilent).

Säulentemperatur: 30,0 C°

MS-TOF-Parameter: Acquisition Mode MS Min Range: 100, MS Max Range: 1200, MS/MS Min Range: 50, MS/MS Max Range: 1200, MS Scan Rate 3, MS/MS Scan Rate 3. Fixed Collision Energy 25C°. Source Parameter Gas Temp (C°) 250, Gas Flow (l/min) 8, Nebulizer (psi) 35, Sheath Gas Temp (C°) 300, Sheath Gas Flow (l/min) 11. Scan Source Parameter VCap 3000, Nozzle Voltage (V) 300, Fragmenter 150 Skimmer1 65 OctopoleRFPeak 750.

4. Ergebnisse und Diskussion.

4.1. Untersuchungsschema zur Identifizierung von Metaboliten ausgewählter Wirkstoffe

Wie bereits in der Einleitung gezeigt wurde, spielen Metabolite häufig eine entscheidende Rolle zur Identifizierung eines Giftes in der systematischen toxikologischen Analyse. Ziel dieses Teils der Arbeit war daher die Identifizierung und analytische Charakterisierung von Metaboliten ausgewählter Medikamentenwirkstoffe durch die Auswertung geeigneter Intoxikationsfälle, wobei eine methodische Beschränkung auf HPLC-DAD und LC-TOF-MS erfolgte. Die hierbei gesammelten Daten sollen anschließend in der Praxis der Vergiftungsaufklärung Anwendung finden. Es war daher wichtig, sowohl das Untersuchungsmaterial als auch die Untersuchungsbedingungen möglichst praxisnah zu gestalten. Aus diesem Grunde handelte es sich bei den untersuchten Proben fast ausschließlich um Blut, und nur in Ausnahmefällen wurden Urin- oder Organproben einbezogen.

Insgesamt wurden Proben von 430 Vergiftungsfällen mit 47 Wirkstoffen analysiert, wobei diese Wirkstoffe mit einer Häufigkeit zwischen 1 und 90 in den Fällen vorkamen. Einen Überblick über alle untersuchten Wirkstoffe, die zugehörige Anzahl von Fällen und die jeweils festgestellte Anzahl der Metabolite gibt Tabelle 4.1.1.

Tabelle 4.1.1: Anzahl der insgesamt untersuchten Wirkstoffe, Häufigkeit ihres Auftretens in den Falluntersuchungen und Zahl der festgestellten Metabolite

	Wirkstoff	Zahl der Fälle	Zahl der Metabolite	Zahl der Metabolite
		T Todesfall, K klinisches fall	HPLC/DAD	LC-TOF/MS
1	Ajmalin	2 T	1	3
2	Ambroxol	14 T	1	8
3	Amiodaron	10 T	1	11
4	Amitriptylin	25 T	3	20
5	Amprenavir	1 T	2	16
6	Bromazepam	7 T	4	4
7	Carbamazepin	31 T	1	16
8	Chlorprothexin	4 T	1	9
9	Citalopram	30 T / 50 K	4	4
10	Clobazam	3 T	1	1
11	Clomethiazol	6 T	2	7
12	Clomipramin	4 T	3	6
13	Clopenthixol	2 T	1	8
14	Clozapin	12 T	5	27
15	Diazepam	82 T	3	5
16	Diphenhydramin	60 T / 70 K	7	9
17	Doxepin	35 T	2	10
18	Doxylamin	7 T	2	7
19	Enoximon	2 T	0	1
20	Flecainid	2 T / 89 K	2	8

	Wirkstoff	Zahl der Fälle	Zahl der Metabolite	Zahl der Metabolite
		T Todesfall, K Klinikalfall	HPLC/DAD	LC-TOF/MS
21	Fluconazol	4 T	0	1
22	Fluoxetin	10 T	1	4
23	Flunitrazepam	13 T	3	4
24	Flurazepam	2 T	3	10
25	Ketamin	18 T / 160 Schwein	10	17
26	Levomepromazin	2 T	7	19
27	Metamizol	90 T	4	7
28	Metoprolol	9 T	2	2
29	Midazolam	72 T	2	3
30	Mirtazapin	7 T	2	5
31	Nevirapin	3 T	0	3
32	Nitrazepam	16 T	2	4
33	Opi Pramol	6 T	2	11
34	Perazin	5 T	6	14
35	Promazin	4 T	2	9
36	Promethazin	18 T	2	8
37	Propranolol	7 T	3	5
38	Quetiapin	11 T	13	28
39	Saquinavir	3 T	1	3
40	Sertralin	7 T / 10 K	5	4
41	Prothipendyl	2 T	3	15
42	Trimipramin	22 T	3	9
43	Venlafaxin	5 T	3	11
44	Verapamil	45 T	10	16
45	Zolpidem	9 T	2	3
46	Zopiclon	4 T	3	4
47	Zuclopenthixol	3 T	1	7

Die Proben wurden, wie im experimentellen Teil beschrieben aufgearbeitet und mittels beider Methoden gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme und UV- bzw. Massenspektren erfolgte nach einem einheitlichen Schema. Zunächst wurden die Literaturerkenntnisse zum Metabolismus der jeweiligen Substanz zusammengetragen. Dann wurden die von den Falluntersuchungen erhaltenen Chromatogramme entsprechend den in den Abschnitten 2.2.2 und 2.5 beschriebenen Kriterien auf die Anwesenheit von Metaboliten überprüft und so weit als möglich strukturell zugeordnet.

Für die Identifizierung der Metabolite durch LC-TOF-MS wurden die Strukturformeln der theoretisch möglichen Metabolite für die jeweiligen Wirkstoffe gezeichnet, die Summenformeln und akkuraten Mollmassen berechnet und als Exel. CSV-File gespeichert (s. Abbildung 4.1.1 für das Beispiel Amprenavir). Dieses CSV-File wurde als Datenbank bei der Suche nach möglichen Metaboliten im Chromatogramm benutzt. Die als Metabolite vorgeschlagenen Peaks wurden anschließend manuell verifiziert. Als Kriterien für einen positiven Befund wurden die Massengenauigkeit des Precursors mit <5ppm, eine Übereinstimmung des Isotopenverhältnisses von >90% (s. Abbildung 4.1.2), eine Zuordnung

der Hauptfragmente des MS-MS-Experiments, die relative Retentionszeit RT und der Retentionszeitquotient Q_{RT} von Metabolit und Wirkstoff herangezogen.

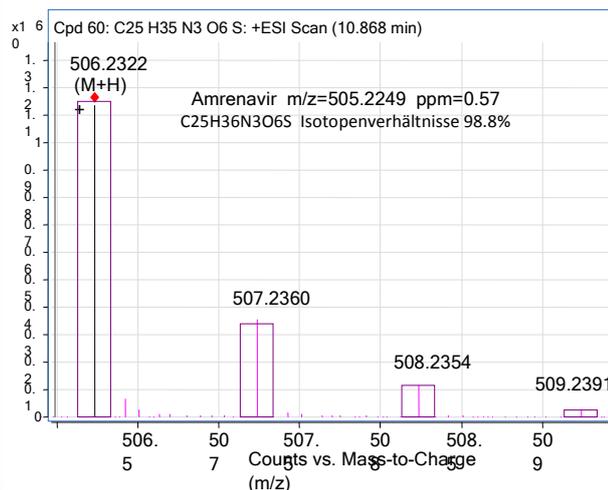
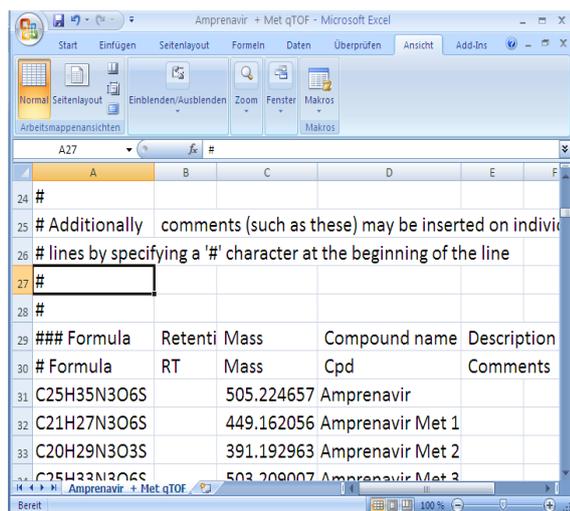


Abbildung 4.1.1: CSV-File mit Summelformeln, Molmassen und vorgeschlagenen Metaboliten als Suchdatenbank **Abbildung 4.1.2:** Übereinstimmung des Massen-spektrum

Die aus den CID-Spektren ersichtlichen Fragmentierungen führten zu Strukturvorschlägen, die sich aus der Berechnung der verbliebenen Massen ergaben. Dieses ist in Tabelle 4.1.2 und Abbildung 4.1.3 am Beispiel des Doxepins gezeigt. Hierbei erwies sich die Massfragment Software (Trail Version von Waters) zur Gewinnung der Strukturvorschläge als sehr nützlich. Die abgespaltenen Bruchstücke wurden mit Buchstaben gekennzeichnet, der verbleibende Teil ist Bestandteil des Fragmentions.

Tabelle 4.1.2 : Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Doxepin und Desmethyldoxepin.

Doxepin				Desmethyldoxepin		
Charakteristische m/z-Werte	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler		Charakteristische m/z-Werte	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
280,1718	Doxepin+H C ₁₉ H ₂₂ N O	DOX 2,3		266,1538	Desmethyldoxepin + H DDOX C ₁₈ H ₂₀ N O	DOX- 14 0,38
235,1119	C ₁₇ H ₁₅ O	DOX - A -0,5		235,1096	C ₁₇ H ₁₅ O	DDOX - A 9,16
207,102	C ₁₅ H ₁₃ N	DOX - B 10,72		207,1017	C ₁₅ H ₁₃ N	DDOX - B 4,43
84,0811	C ₅ H ₁₀ N	C -3,73		70,0653	C ₄ H ₈ N	D (C - 14) -2,5

In den HPLC-DAD-Kurven wurde für alle nicht anderweitig identifizierten Peaks überprüft, ob es sich um Metabolite des jeweiligen Wirkstoffs handeln könnte. Bei identischen oder sehr ähnlichen Spektren wurde dabei davon ausgegangen, dass die Metabolisierung nicht am Chromophoren stattfand.

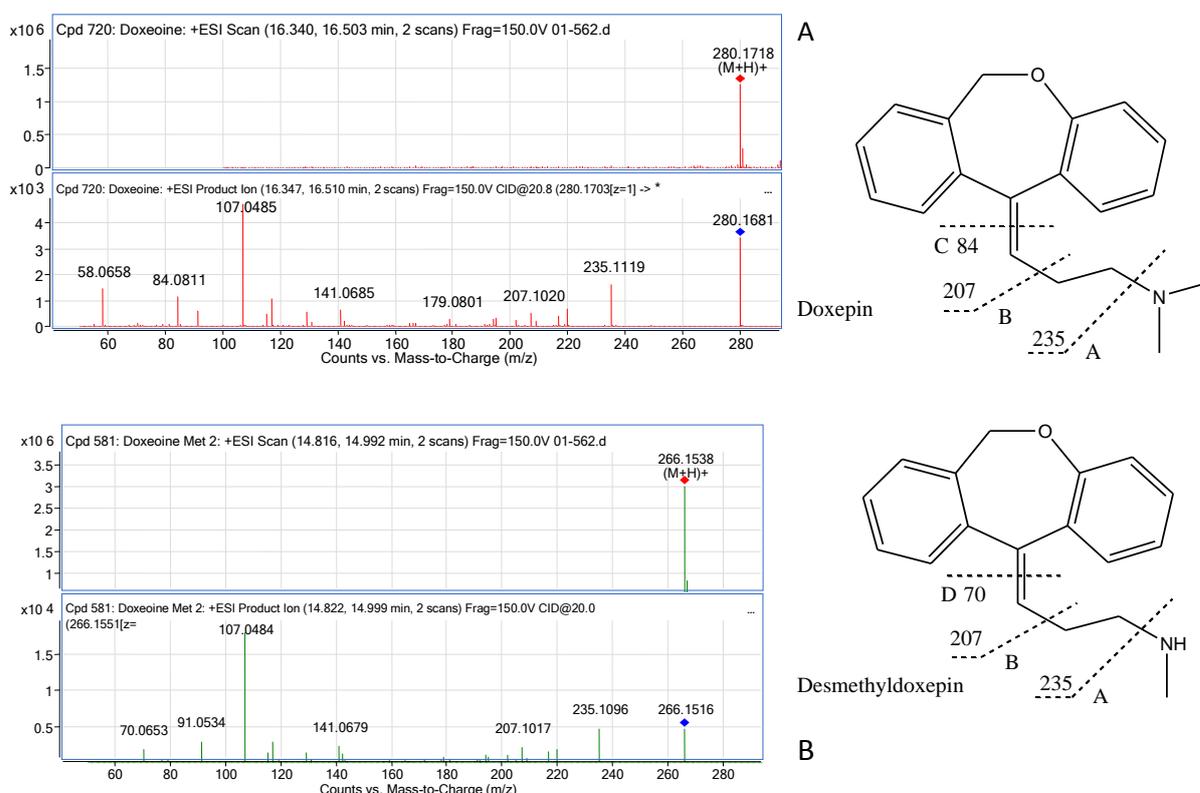


Abbildung 4.1.3: MS und MS-MS Spektren von Doxepin (A) und Desmethyldoxepin (B) aus Untersuchung basischen Blutextrakte einer Doxepin Intoxikation und die mögliche Fragmentierungsschema.

Bei abweichenden Spektren wurde nach Metaboliten mit Strukturänderung am Chromophoren gesucht. Als weiteres Kriterium wurde auch hier die Verschiebung der Retentionszeit im Vergleich zur Muttersubstanz ausgewertet. Gleichzeitig wurde versucht, trotz der verschiedenen chromatographischen Bedingungen die LC-TOF-MS- und HPLC-DAD- Signale miteinander zu verknüpfen und den gleichen Metaboliten zuzuordnen.

Die Quantifizierung der Metabolitenpeaks erfolgte aus den HPLC-DAD-Chromatogrammen in üblicher Weise mit Hilfe der Peakintegrale, wenn die Metabolite als Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Andernfalls war bei Übereinstimmung der UV-Spektren nur eine näherungsweise Bestimmung (1,2) möglich, wobei vorausgesetzt wurde, dass die Extraktionsausbeuten bei der Probenaufarbeitung für den Wirkstoff und den Metaboliten gleich sind, und dass beide auch im integrierten Wellenlängen-Bereich) eine gleiche molare Extinktion besitzen. Die Faktoren zur Berechnung der Massenkonzentration (in $\mu\text{g/mL}$) verhalten sich dann zueinander wie die Mollmassen.

$$\text{Peakfläche} \times \text{Faktor} = \text{Massenkonzentration} \quad (1)$$

$$F_M = F_A \left(\frac{M_M}{M_A} \right) \quad (2)$$

F_M =Faktor Metabolit

M_M =Molmasse Metabolit

F_A =Faktor Ausgangsverbindung

M_A =Mollmase Ausgangsverbindung

Voraussetzung zur Anwendung dieser Nährung ist, dass die UV-Spektren der Ausgangsverbindung und des Metaboliten nahezu identisch sind, wie in Abbildung 4.1.4 am Beispiel der Spektren von Doxepin und Desmethyldoxepin gezeigt wird.

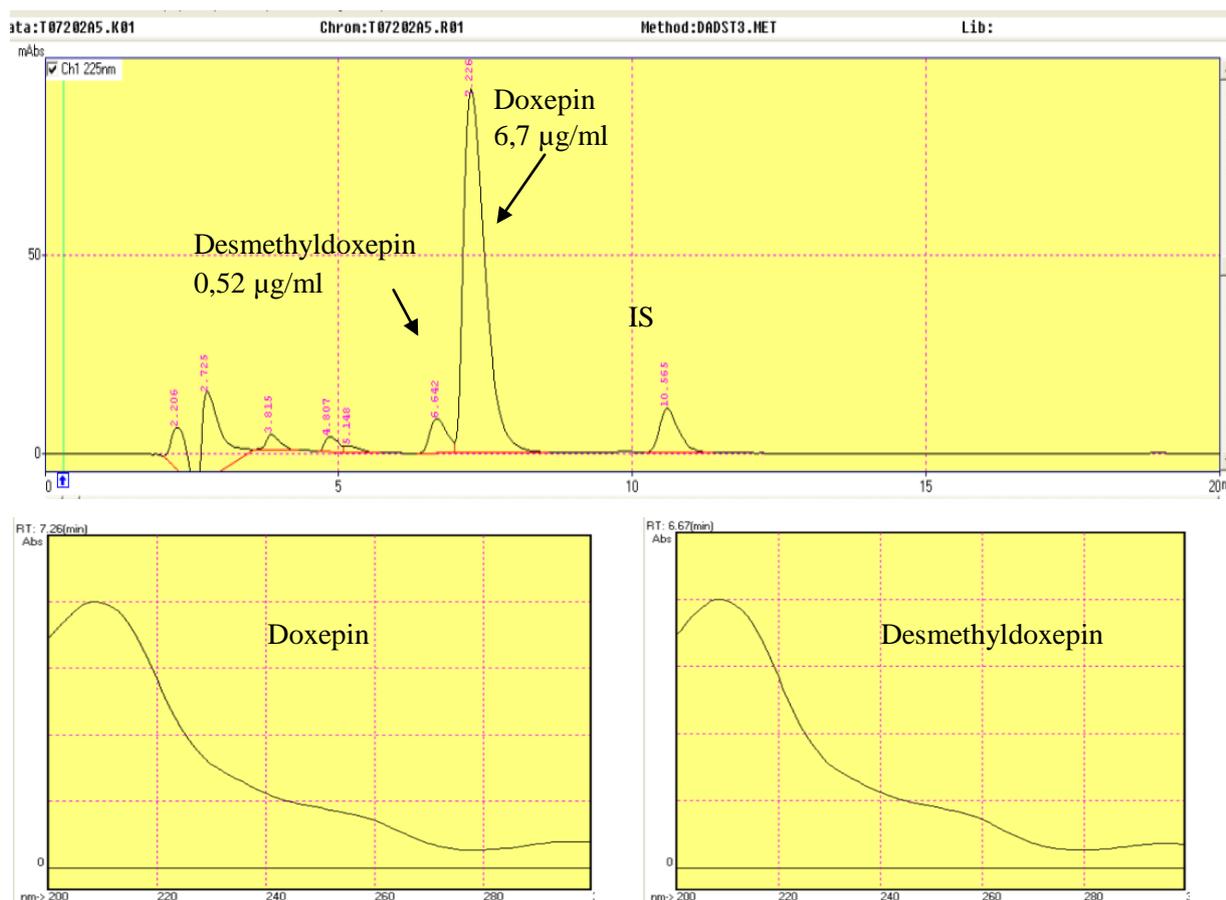


Abbildung 4.1.4: HPLC einer Doxepin-Intoxikation, alkalischer Blutextrakt, und die UV-Spektren von Citalopram und N-Desmethyldoxepin.

Die UV-Spektren und relativen Retentionszeiten von Metaboliten, die auf die oben beschriebene Weise unter Zuhilfenahme von LC-TOF-MS strukturell identifiziert werden konnten, wurden in die HPLC-DAD-Datenbank aufgenommen.

Um zwischen den Metaboliten, die mit LC-TOF/MS identifiziert wurden und den Metaboliten die mit HPLC-DAD identifiziert wurden zu unterscheiden, wurden die ersten als Met 1, Met 2, Met 3 usw. und die anderen als Met A, Met B, Met C usw. nummeriert.

Wegen des großen Umfanges des Daten konnten nicht alle untersuchten und in der Tabelle 4.1.1 aufgeführten Wirkstoffe in dieser Arbeit ausführlich beschrieben werden, sondern es musste eine Auswahl getroffen werden. Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Substanzen wurden daher als Beispiele ausgewählt, um die Vorgehensweise und die Probleme bei der Metabolitenzuordnung möglichst eindeutig zu demonstrieren.

4.2 Amprenavir

Amprenavir AMP ist ein Proteasehemmer zur Behandlung der HIV-1-Infektion in Kombination mit anderen antiretroviralen Arzneimitteln. Inaktivierung oder Hemmung der Proteasen reduzieren die infektiöse Kapazität der Viren und bilden die Grundlage der Behandlung von HIV-infizierten Patienten. Die präklinische Studien haben gezeigt, dass oral verabreichtes Amprenavir hauptsächlich als unveränderte Substanz in den Faeces der Hunde ausgeschieden wird, oder im Urin und Faeces von Ratten als Produkte der Monooxygenasen mit nachfolgender Glukuronsäurekonjugation. [204,205].

Bei in-vitro-Metabolismusstudien wurden mittels HPLC/MS-Detektion Metabolite experimentell als Produkte der Oxidation und Glucuronidierung identifiziert. Hauptmetabolite resultierten dabei aus der Oxidation an der Benzyl-Position und am Anilinring oder aus der Öffnung des Tetrahydrofuran-Ringes [206]. Die vermuteten Metabolite sind in Abbildung 4.2.1 zusammengestellt.

Untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit eine letale Intoxikation mit Amprenavir. Mittels LC-MS/TOF (Agilent und Waters) wurden nach der genauen Masse (Feinmasse) 16 mögliche Metabolite festgestellt. Die in Tabelle 4.2.1 aufgeführten Massen wurden in einem Blutextrakt gefunden und entsprechenden Metaboliten zugeordnet.

Tabelle 4.2.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF Untersuchung des basischen Blutextraktes mit positiven Amprenavir Befund. (Agilent und Waters LC-TOF/MS), vgl. Abbildung 4.2.1.

Metabolit	Summenformel	Masse	RT	ppm	Modus	Q _{RT}
AMP	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₆ S	505,22466	10,847	0,57	+	
Met 2	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₃ S	391,19296	6,117	0,57	+	0,56
Hydroxy-Met 2	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₄ S	407,18788	5,207	-5,24	+	0,48
N-Acetyl-Met 2	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₄ S	433,20353	6,136	-3,51	+	0,57
N-Formyl-Met2	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₄ S	419,18788	5,962	1,52	+	0,55
Met3	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆ S	503,20901	9,522	1,7	+	0,88
Met 4	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆ S	503,20901	8,681	-2,41	+	0,80
Met 5	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₇ S	519,20392	10,255	-4,18	+	0,95
N-Acetyl-Met 6	C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₉ S	579,22505	13,01	8,69	-	1,20
N-Formyl-Met 7	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	417,17223	10,613	-1,8	+	0,98
Met 8	435.2094 [M+H] ⁺		10,378		+	0,96
Met 9	462.2420 [M+H] ⁺		6,993		+	0,64
Met 10	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₇ S	521,21957	8,399	-2,09	+	0,77
Met 11	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₇ S	521,21957	8,901	-1,65	+	0,82
Met 12	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₇ S	521,21957	10,427	-2,44	+	0,96
N-Actyl-AMP	C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₇ S	547,23522	10,935	-2,73	+/-	1,01
N-Formyl-AMP	C ₂₆ H ₃₅ N ₃ O ₇ S	533,21975	10,695	1,7	+	0,99

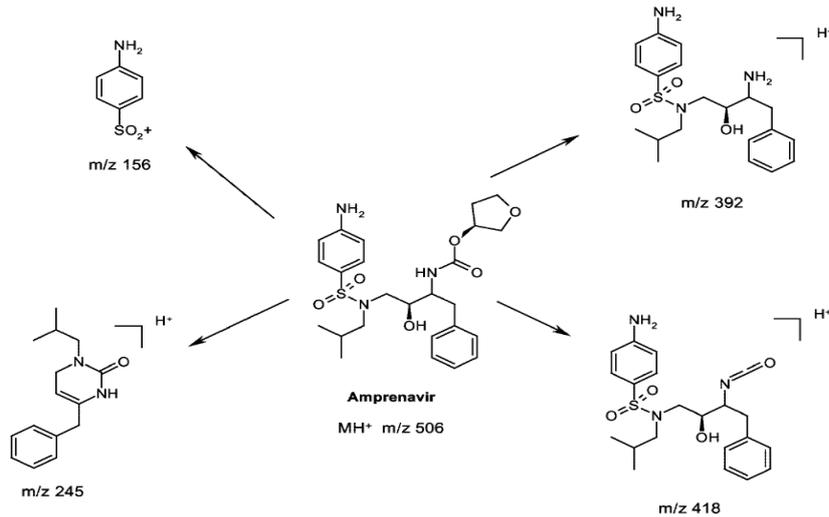


Abbildung 4.2.2: Struktur der charakteristischen Fragmentationen von Amprenavir.

Das Produktions-Massenspektrum der [M+H]⁺ und die vorgeschlagenen Struktur für die Ionen sind in der Abbildung 4.2.2, Tabelle 4.2.2 und Abbildung 4.2.4 gezeigt. Die wichtigsten Fragmente sind m/z 418 (M - THF-Ring), 392 (M - CO - THF Ring), 245 (M - Anilin - sulfonat - CO - THF Ring) und 156 (Anilin sulfonat). Dieses MS/MS Fragmentierungsmuster von Amprenavir wurde verwendet, um Positionen der Biotransformation innerhalb des Moleküls durch Vergleich mit der Fragmentierung der Metaboliten zu ermitteln.

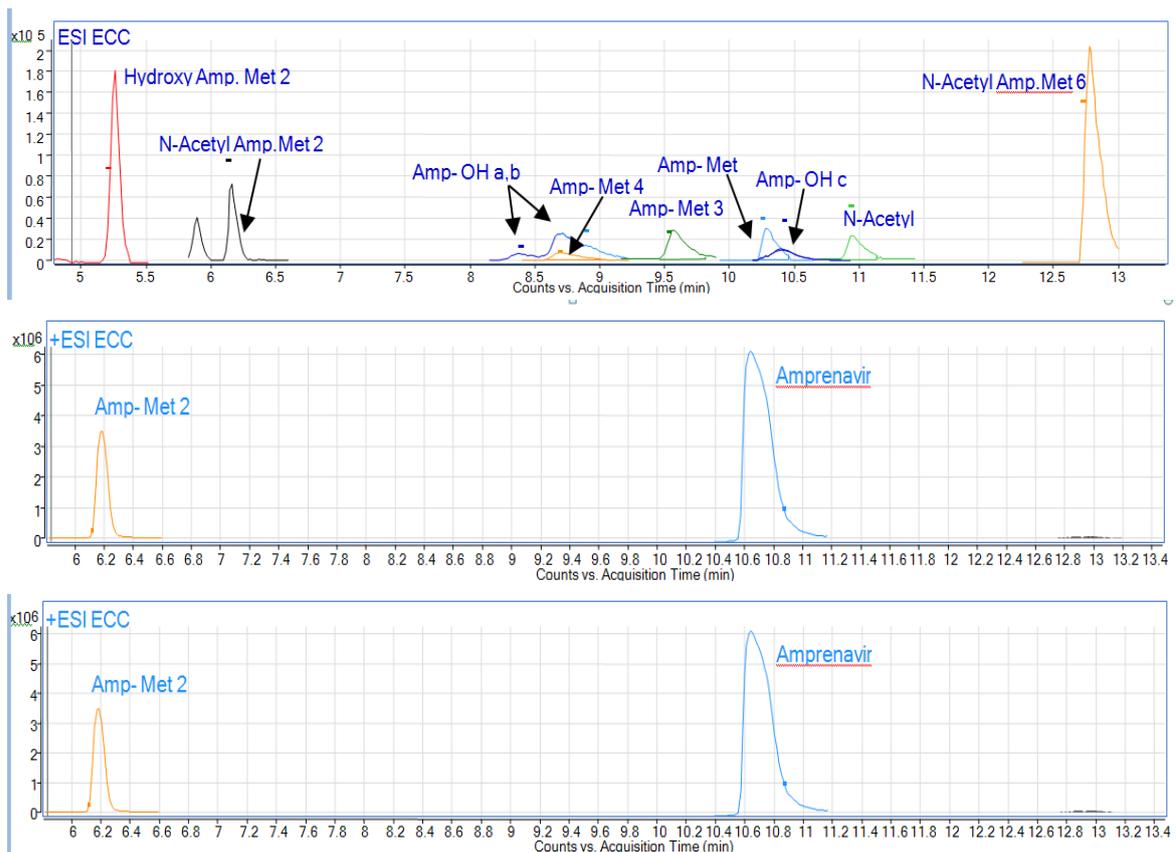


Abbildung 4.2.3: LC-EIC des alkalischen Extraktes der Blutprobe der Amprenavir Intoxikation.

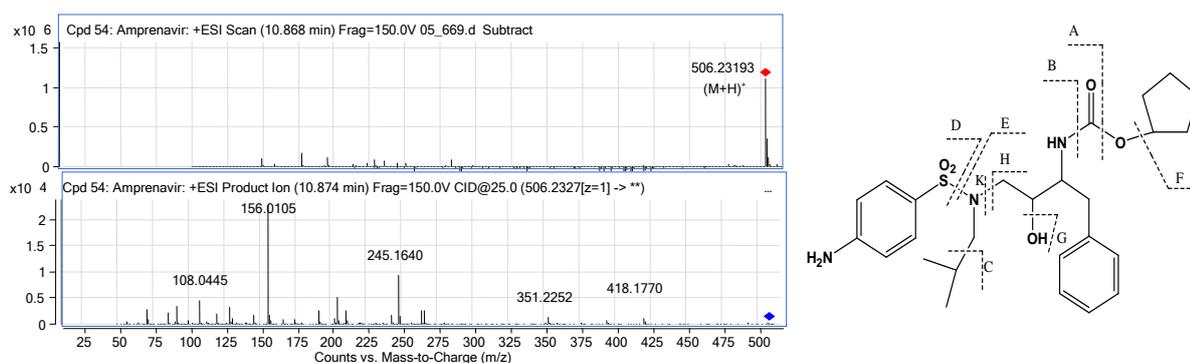


Abbildung 4.2.4: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Amprenavir und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.2.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Amprenavir.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
506,23193 [M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O ₆ S	Amprenavir + H	0,57
418,177	C ₂₁ H ₂₈ N ₃ O ₄ S	506 – A (C ₄ H ₈ O ₂ = 88,0524)	6,05
392,199	C ₂₀ H ₃₀ N ₃ O ₃ S	506 – B (C ₅ H ₆ O ₃ = 114,0317)	1,97
351,2252	C ₁₉ H ₃₁ N ₂ O ₄	506 – D (C ₆ H ₅ N ₂ O ₂ S = 155,0041)	7,48
263,1754	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₂	506 – A – D (C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₄ S = 243,0565)	0,05
245,164 (263-H ₂ O)	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O	506 – A – D – G (C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₅ S = 261,0671)	3,51
241,1019	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ S	506 – H (C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₄ S = 265,1314)	-5,7
208,0966	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃	506 – K – F (C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ S = 298,1351)	1,02
189,1014	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	506 – B – C – D (C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O ₅ S = 317,1297)	4,38
156,0105	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ S	506 – E (C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₄ S = 350,2206)	5,56
146,0948	C ₁₀ H ₁₂ N	506 – K – B – G (C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₆ S = 360,1355)	10,82
71,049	C ₄ H ₇ O	F 506 – (C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₅ S = 435,1828)	1,55

Die ESI-LC/MS Analyse von Met 10 bei 8,383 min, Met 11 bei 8,891 min und Met 12 bei 10,427 min zeigte die Bildung protonierter Molekülonen bei m/z 522 (Abbildungen 4.2.5, 4.2.6 und 4.2.7) mit einer um 16 Einheiten höheren Masse. Basierend auf dem Molekulargewicht und den Fragmentierungsmustern der Produktionenspektren (Abbildungen 4.2.5, 4.2.6 und 4.2.7) wurden diese Metabolite als Hydroxylierungsprodukte festgestellt.

Die Ionen bei m/z 416 ($418 + 16 - 18$, Hydroxylierung und Wasserabspaltung an diesem Fragment) in den Spektren von Met 10 und Met 11 zeigen, dass die Hydroxylierung nicht an dem THF-Ring aufgetreten ist.

Auch die Anwesenheit von einem Fragment-Ionen bei m/z 156 legt nahe, dass die Hydroxylierung sich nicht am Anilin-Ring ereignet hat, sondern eher am aromatischen Ring oder an der aliphatischen Kette mit m/z 348 bzw. 261.

Es wird daher vorgeschlagen, dass Amprenavir für den Metaboliten Met 10 an der Benzylposition und für Met 11 an der Phenylgruppe hydroxyliert wurde, die charakteristischen Ionen sind in den Tabellen 4.2.3 und 4.2.4 erklärt. Die genaue Position der Hydroxylierung konnte nicht bestimmt werden.

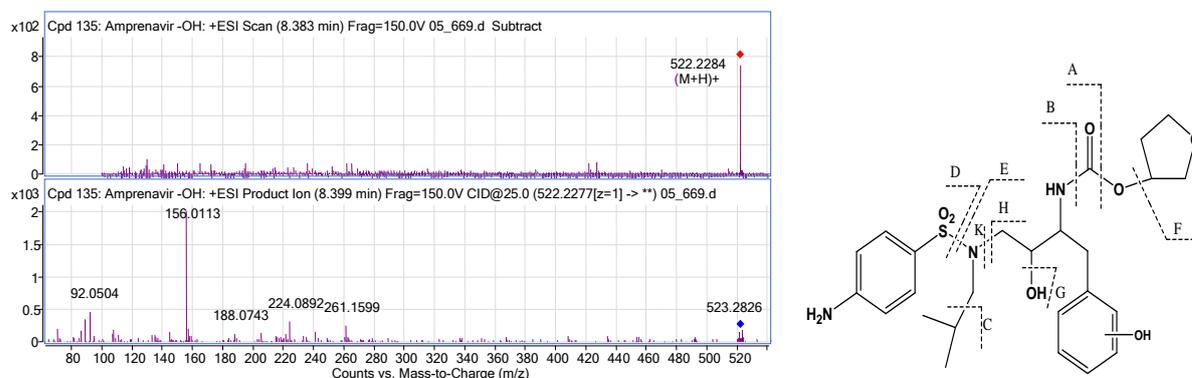


Abbildung 4.2.5: MS und MS/MS Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 10 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.3: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 10.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
522,2284 (506+16) [M+H] ⁺	C25 H36 N3 O7 S	Met 10 + H	-2,9
261,1599 (245+16)	C15 H21 N2 O2	522 – A – D – G (C10 H15 N O5 S = 261,0671)	-0,74
241,0958 (241)	C11 H17 N2 O2 S	522 – H (C14 H19 N O5 = 281,1263)	19,41
224,0892 (208+16)	C11 H14 N O4	522 – K – F (C14 H22 N2 O3 S = 298,1351)	11,25
205,0978 (189+16)	C11 H13 N2 O2	522 – B – C – D (C14 H23 N O5 S = 317,1297)	4,38
156,0113 (156)	C6 H6 N O2 S	522 – E (C19 H30 N2 O5 = 366,2155)	0,64
92,0504 (92)	C6 H6 N	522 – (E-SO ₂) (C19 H30 N2 O7 S = 430,1774)	-10,11
71,0489	C4 H7 O	F 522 – (C21 H29 N3 O6 S = 451,1777)	3,12

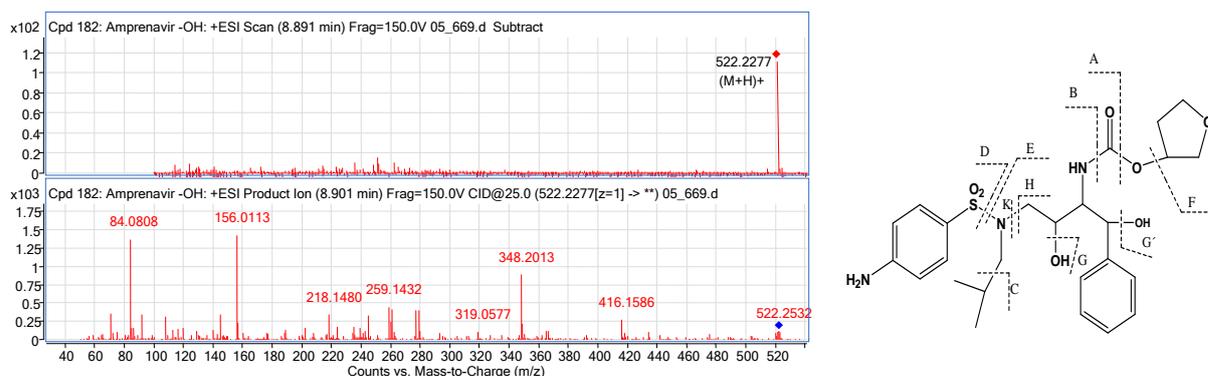


Abbildung 4.2.6: MS und MS/MS Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 11 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.4: Met 11 Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
522,2284 (506+16) [M+H] ⁺	C25H36N3O7S	Met 11 + H	-2,44
434,1696 (418+16)	C21 H28 N3 O5 S	522 – A (C4 H8 O3 = 104,0473)	10,99
416,1586	C21 H26 N3 O4 S	522 – A – G' (C4 H10 O3 = 106,063)	12,63
348,2013	C19 H28 N2 O4	522 – D – G' (C6 H8 N O3 S = 174,0225)	8,68
279,1669 (263+16)	C15 H23 N2 O3	522 – A – D (C10 H13 N O4 S = 243,0565)	12,19
261,1555 (245+16)	C15 H21 N2 O2	522 – A – D – G (C10 H15 N O5 S = 261,0671)	16,41
241,0950 (241)	C11 H17 N2 O2 S	522 – H (C14 H19 N O5 = 281,1263)	-2,21
224,0914 (208+16)	C11 H14 N O4	522 – K – F (C14 H22 N2 O3 S = 298,1351)	1,68
156,0113 (156)	C6 H6 N O2 S	522 – E (C19 H30 N2 O5 = 366,2155)	0,43
92,0477 (92)	C6 H6 N	522 – (E-SO ₂) (C19 H30 N2 O7 S = 430,1774)	19,48
71,0515	C4 H7 O	F 522 – (C21 H29 N3 O6 S = 451,1777)	3,12

Vergleicht man das Produktionspektrum von Met 12 (Abbildung 4.2.7) mit dem des ursprünglichen Moleküls (Abbildung 4.2.4), so wird das charakteristische Fragment m/z 156 (p-Aminophenyl-sulfonyl) nicht mehr gesehen. Stattdessen wird ein Ion bei m/z 172 ($156 + 16$) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die p-Aminophenyl-sulfonyl-Einheit mit einer entsprechenden Erhöhung der Masse hydroxyliert wurde. Basierend auf dem Molekulargewicht und dem Fragmentierungsmuster (Tabelle 4.2.5) wurde die Struktur von Met 12 wie in Abbildung 4.2.7 gezeigt zugeordnet.

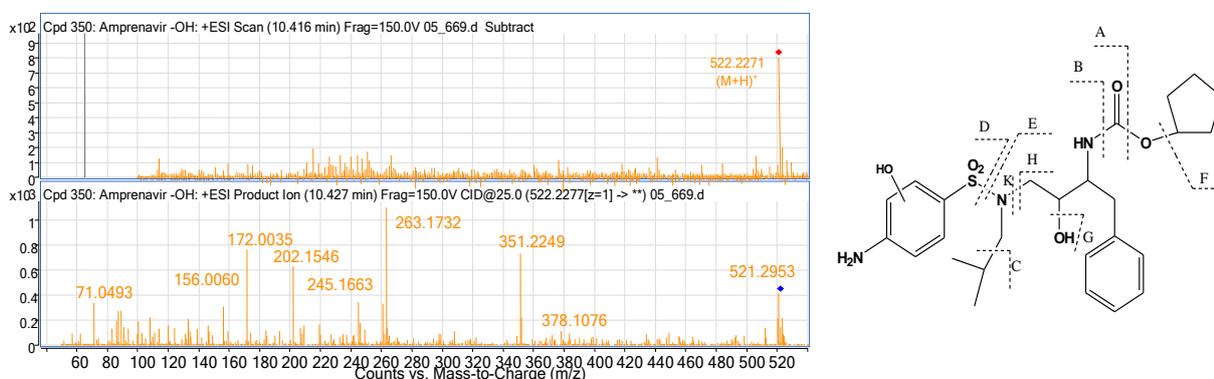


Abbildung 4.2.7: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 12 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.5: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 12.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
522,2284 (506+16) $[M+H]^+$	C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O ₇ S	Met 12 + H	-2,44
351,2249	C ₁₉ H ₃₁ N ₂ O ₄	522 – D (C ₆ H ₅ N ₃ O ₃ S = 170,999)	8,46
263,1732	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₂	522 – A – D (C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₅ S = 259,0514)	8,45
245,1663	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O	522 – A – D – G (C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S = 277,062)	-5,88
172,0035 (156 + 16)	C ₆ H ₆ N ₃ O ₃ S	522 – E (C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₄ = 350,2206)	16,19
108,0438 (92 + 16)	C ₆ H ₆ N ₃ O	522 – (E-SO ₂) (C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₆ S = 414,1825)	5,22
71,0493	C ₄ H ₇ O	F 522 – (C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₆ S = 451,1777)	-2,54

Metabolit Met 2 eluierte bei 6,110 min. Dieser Metabolit resultiert aus der Hydrolyse der Carbamatgruppe und das Massenspektrum zeigt ein Moleküllion $M+1$ bei m/z 392 (Abbildung 4.2.8). Weiter Fragmente zeigten eine hohe Übereinstimmung mit der Fragmentierung des Amprenavirs (Tabelle 4.2.6).

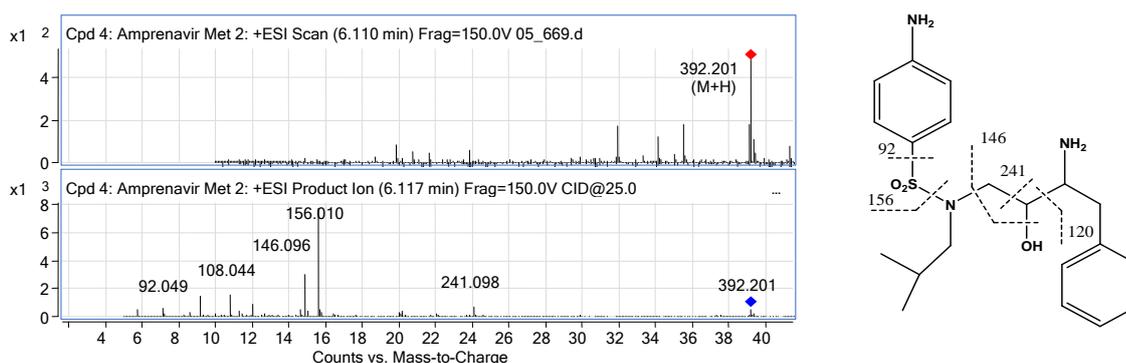


Abbildung 4.2.8: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 2 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.6: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 2.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
392,20024 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ N ₃ O ₃ S	Met 2 + H	0,57
241,0983	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ S	392 – (C ₉ H ₁₃ N O = 151,0997)	9,15
156,0106	C ₆ H ₆ N O ₂ S	392 – (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O = 236,1889)	4,82
146,0962	C ₁₀ H ₁₂ N	392 – (C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ S = 246,1038)	1,47
120,0801	C ₈ H ₁₀ N	392 – (C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S = 272,1195)	5,92
92,0496	C ₆ H ₆ N	392 – E (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₃ S = 300,1508)	-1,89

Aus der Hydroxylierung von Met 2 oder auch aus der Hydrolyse der Carbamatgruppe von Met 11 entsteht der Metabolit Hydroxy-Met 2 mit RT von 5,207 und m/z von 407 (Abbildung 4.2.9). Auch hier legt die Anwesenheit des Fragmentions bei m/z 156 nahe, dass die Hydroxylierung sich nicht am Anilin-Ring ereignet hat, sondern eher an dem aromatischen Ring oder der aliphatischen Kette mit den Fragmenten bei m/z 234 und 241 (Tabelle 4.2.7). Weiterhin wurde der Metabolit N-Acetyl-Met 2 durch Acetylierung an der p-Aminophenyl-sulfonylgruppe oder auch durch der Hydrolyse der Carbamatgruppe aus N-Acetylamprenavir mit [M+H]⁺ m/z 434 gebildet. Dieser besitzt eine RT von 6,126 min (Abbildung 4.2.10). Das charakteristische Fragment m/z 156 (p-Aminophenylsulfonyl) wird hier nicht mehr gesehen. Stattdessen wird ein Ion bei m/z 198 (156 + 42) beobachtet (Tabelle 4.2.8).

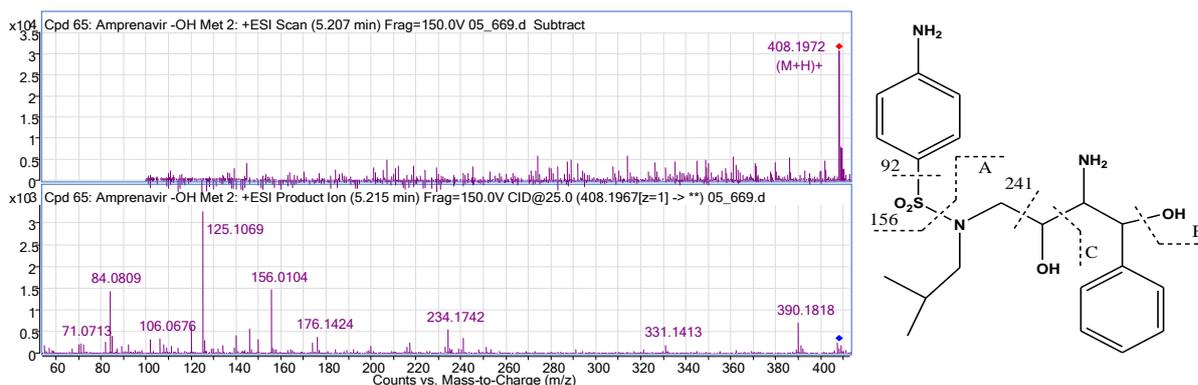


Abbildung 4.2.9: MS- und MS/MS-spektrum von Hydroxy-Met 2 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.7: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Hydroxy-Met 2.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
408,1972 (M+H) ⁺	C ₂₀ H ₃₀ N ₃ O ₄ S	Hydroxy-Met 2 + H	-5,24
390,1818	C ₂₀ H ₂₈ N ₃ O ₃ S	408 – 18 (H ₂ O)	7,04
234,1742	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	408 – A – B (C ₆ H ₈ N O ₃ S = 174,0225)	-6,46
241,1025	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ S	408 – (C ₉ H ₁₃ N O ₂ = 167,0946)	-8,37
156,0104	C ₆ H ₆ N O ₂ S	408 – (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₂ = 252,1838)	6,03
146,0961	C ₁₀ H ₁₂ N	408 – (C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ S = 262,0987)	2,23
92,0496	C ₆ H ₆ N	408 – (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₄ S = 316,1457)	5,04

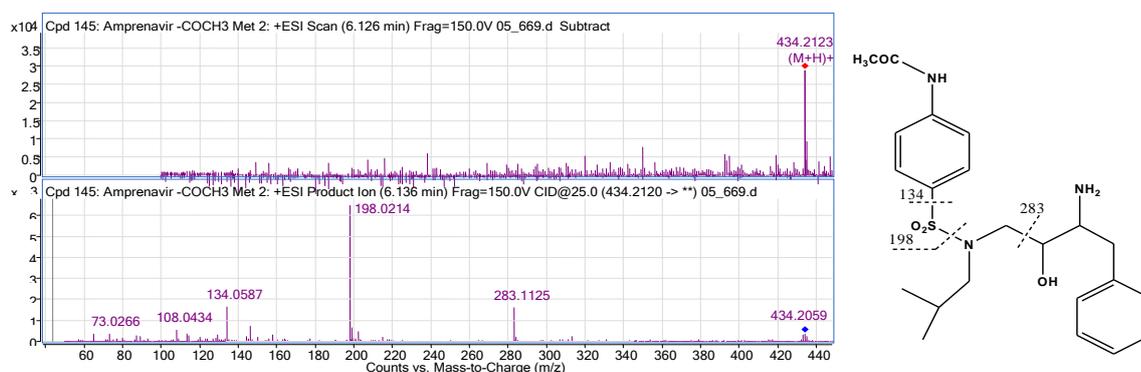


Abbildung 4.2.10: MS- und MS/MS-spektrum von N-Acetyl-Met 2 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.8: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Acetyl-Met 2.

Charakteristische m/z-Werte	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
434,2108 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₂ N ₃ O ₄ S N-Acetyl-Met 2 + H	-3,51
283,1125 (241 + 42)	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₃ S 434 – (C ₉ H ₁₃ N O = 151,0997)	-5,15
198,0214 (156 + 42)	C ₈ H ₈ N O ₃ S 434 – (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O = 236,1889)	2,9
134,0587 (92 + 42)	C ₈ H ₈ NO 434 – (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₃ S = 300,1508)	9,77

Zwei weitere Metabolite N-Acetyl-Met 6 und Met 5 waren ebenfalls in dem EIC zu sehen (Abbildung 4.2.3). ESI-LC/MS Analyse des Metaboliten Met 6 ergibt eine Masse [M + H]⁺ m/z 538 was der Erhöhung um 32 Masseinheiten gegenüber der Muttersubstanz entspricht. Es wurde nur das Acetylierungsprodukt dieses Metaboliten gefunden mit der Masse [M + H]⁺ 578,2177 m/z (538+42). Das Fragmentierungsmuster weist ein Basision bei m/z 444 auf, das durch Verlust von 134 ((88 +32)+14) aus dem protonierten Molekül-Ion (Abbildung 4.2.11) entsteht. Darüber hinaus scheinen diagnostische Fragmentationen bei m/z 532, 466 und 401 (Tabelle 4.2.9). Dieses deutet darauf hin, dass der THF-Ring durch eine Hydrolyse zur γ -Hydroxycarbonsäure erfahren hat (Abbildung 4.2.1). Metabolit Met 6 cyclisiert leicht zum entsprechenden γ -Lacton (Met 5) mit einem [M+H]⁺ Ion bei m/z 520 (Abbildung 4.2.12, Tabelle 4.2.10)

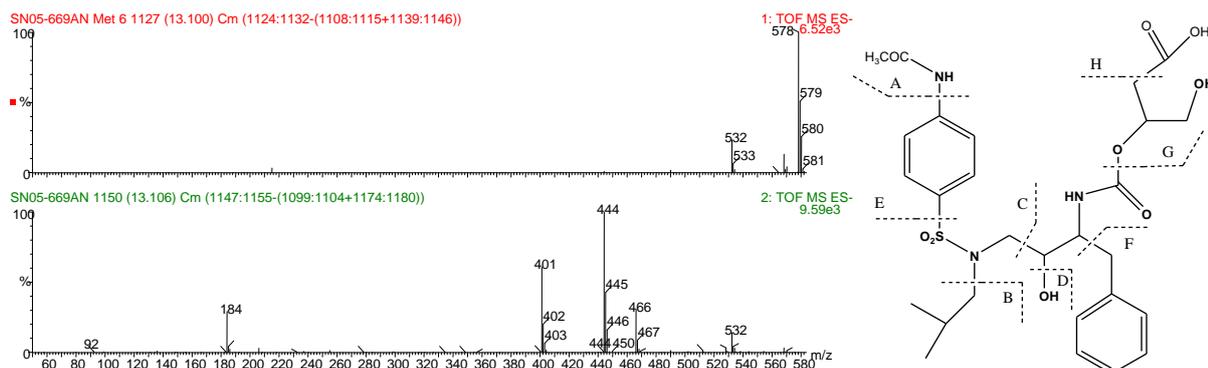


Abbildung 4.2.11: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-Met 6 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.9: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Acetyl- Met 6.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
578,2177 (M-H) ⁻	C27 H36 N3 O9 S	N-Acetyl-Met 4 +H	8,69
532,2125	C26H34N3O7S	578 – H (CH2O2)	0,8
466,1424	C21H26N2O8S	578 – A – B (C6H12NO)	1,04
444,1985	C23H30N3O4S	578 – D – G (C4H8O5)	2,8
401,1711	C18H29N2O6S	578 – E – H (C9H7NO3)	0,6
184,0242	C7H6NO5	578 – C – D – F (C20H32N2O4S)	-0,4

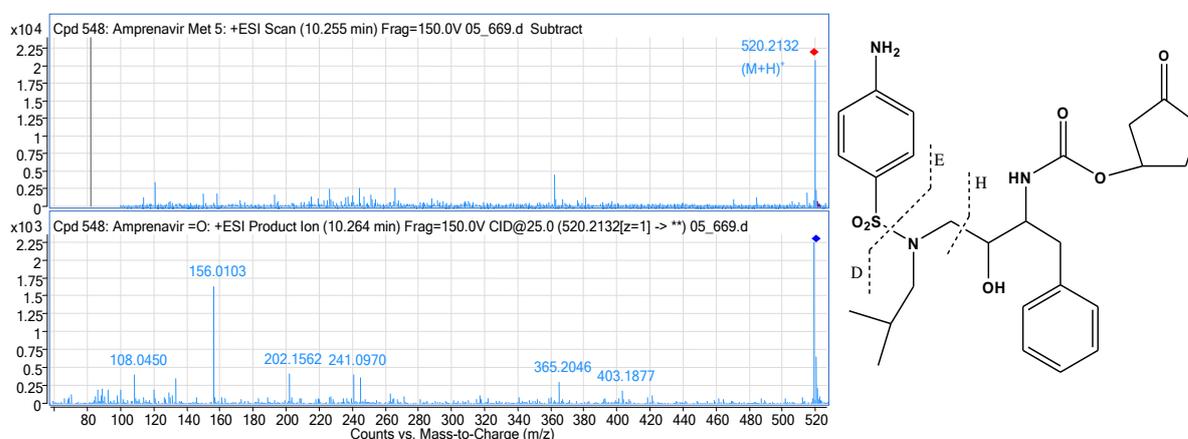


Abbildung 4.2.12: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 5 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tab. 4.2.10 Met.5 Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation.

Charakteristische m/z-Werte	Formula	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
520,2132 (506+14) [M+H] ⁺	C25H34N3O7S	Met 5 + H	-4,18
365,2046 (351+14)	C19 H29 N2 O5	520 – D (C6 H5 N O2 S = 155,0041)	3,46
241,097 (241)	C11 H17 N2 O2 S	520 – H (C14 H17 N O5 = 279,1107)	14,76
156,0103	C6 H6 N O2 S	520 – E (C19 H28 N2 O5 = 364,1998)	6,61

Die [M+H]⁺ ion von N-Acetylamprenavir wurde bei m/z 548 mit 10,935 min gefunden mit einer Erhöhung von 42 Masseneinheiten zur protonierten Masse des Amprenavirs. Die diagnostischen Massen sind m/z 198 (156+42), 283 (241+42) und 434 (392+42), (Abbildung 4.2.13, Tabelle 4.2.11).

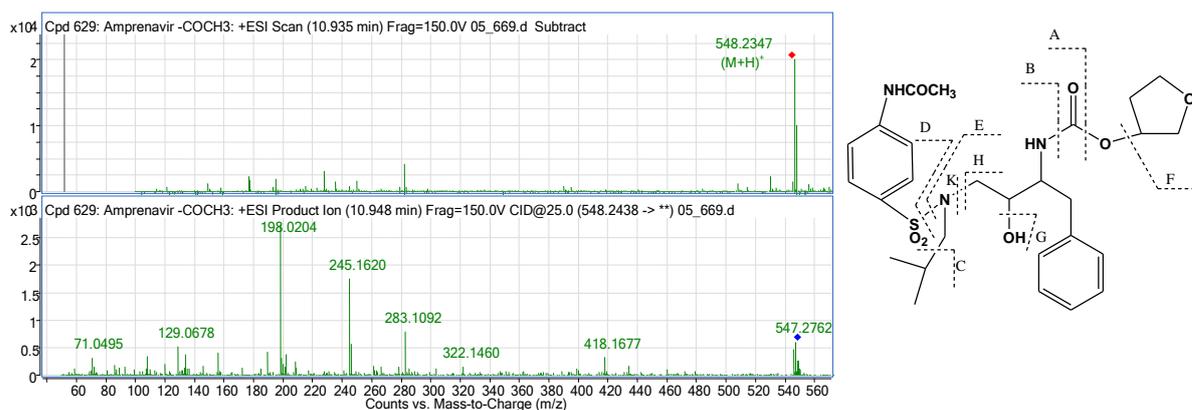


Abbildung 4.2.13: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-amprenavir und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.11: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Acetylamprenavir.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
548,2437 $[M+H]^+$	C27 H38 N3 O7 S	N-Actyl-Amp + H	-2,37
418,1677	C21 H28 N3 O4 S	548 – A – COCH2 (C6 H10 O3 = 130,0630)	5,02
434,2064 (392+42)	C22 H32 N3 O4 S	548 – B (C5H6O3 = 114,0317)	10,2
245,1620	C15 H21 N2 O	548 – A – D – G (C12 H17 N O6 S = 303,0777)	11,44
283,1092 (241+42)	C13 H19 N2 O3 S	548 – H (C14 H19 N O4 = 265,1314)	6,74
189,1014	C11 H13 N2 O	548 – B – C – D (C16 H25 N O6 S = 359,1403)	13,07
198,0204 (156+42)	C8 H8 N O3 S	548 – E (C19 H30 N2 O4 = 350,2206)	7,63
71,049	C4 H7 O	F 548 – (C23 H31 N3 O6 S = 477,1934)	-4,9

Basierend auf identischen ESI-LC/MS und MS/MS-Daten ergibt sich, dass der Metabolit Met 3 die Masse des $[M + H]^+$ -Ions bei m/z 504 hat (Abbildung 4.2.14), also 2 Einheiten weniger als die Ausgangssubstanz. Basierend auf dem Fragmentierungsmuster, d.h. der Bildung der Ionen m/z 349 (351-2), 276 (278-2) und der Masse m/z 202, könnte die Ursache hierfür der ungesättigte THF Ring, also ein Dihydrofuran sein. Ein Vergleich mit dem Fragmentierungsmuster der Ausgangsverbindung (und anderer Metabolite) zeigt, dass die intakte THF-Einheit als Fragment m/z 88 fehlt. Beim Metaboliten Met 3 hat somit eine Biotransformation der THF-Einheit zu einem Dihydrofuran stattgefunden (Abbildung 4.2.14, Tabelle 4.2.12).

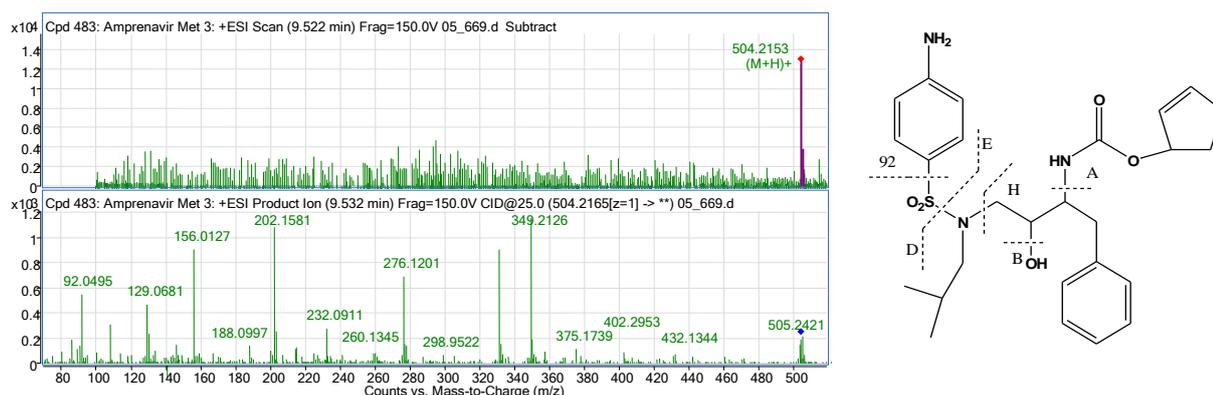


Abbildung 4.2.14: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 3 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.12: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 3.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
504,2153 (506-2) $[M+H]^+$	C25 H34 N3 O6 S	Met 3 + H	1,7
349,2126 (351-2)	C19 H29 N2 O4	504 – D (C6 H5 N O2 S = 155,0041)	-1,21
276,1201 (278-2)	C15 H18 N O4	H 504 - (C10 H16 N2 O2 S = 228,0932)	10,62
202,1581 (202)	C14 H20 N	504 – D – A – B (C11 H14 N2 O6 S = 302,0573)	4,81
156,0127 (156)	C6 H6 N O2 S	504 – E (C19 H28 N2 O4 = 348,2049)	-8,63

Das $[M+H]^+$ -ion des Metaboliten Met 4 (m/z 504) ist ebenfalls um 2 Masseneinheiten leichter als Amprenavir, was auf eine zusätzliche Doppelbindung hinweist. Die Masse m/z 260 ist die charakteristische Masse nach dem Verlust von p-Aminophenylsulfonyl und auch 3-Hydroxyl-THF. Weitere Informationen zeigen die Bildung von Ionen m/z 349 und 156 (Abbildung 4.2.15, Tabelle 4.2.13).

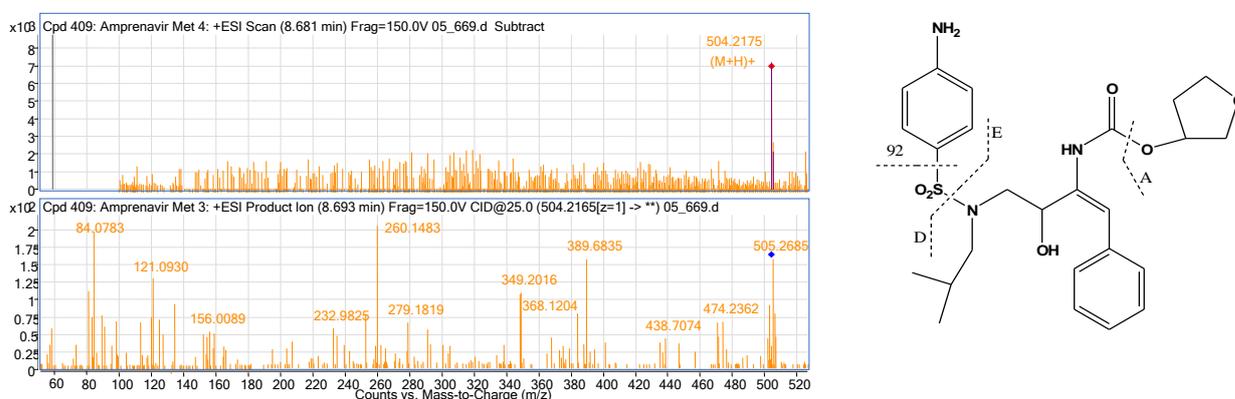


Abbildung 4.2.15: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 4 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.13: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 4.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
504,2163 (506-2) $[M+H]^+$	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O ₆ S	Met 4 + H	-2,41
349,2016 (351-2)	C ₁₉ H ₂₉ N ₂ O ₄	504 – D (C ₆ H ₅ N O ₂ S = 155,0041)	10,65
260,1483	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	504 – A – D (C ₁₀ H ₁₄ N O ₄ S = 244,0644)	13,93
156,00089 (156)	C ₆ H ₆ N O ₂ S	504 – E (C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₄ = 348,2049)	15,69

Das unter den Bedingungen der ESI-Ionisation entstehende Formylierungsprodukt des Amprenavir und dessen Metabolite wurden auch bei diesen Untersuchungen festgestellt. Das N-Formyl-amprenavir und das N-Formyl-Met 2 eluieren gleichzeitig mit der Muttersubstanz. Die charakteristischen Massen sind m/z 184 (156+28) und 269 (241+28). (Abbildung 4.2.16,4.2.17, Tabelle 4.2.14,4.2.15)

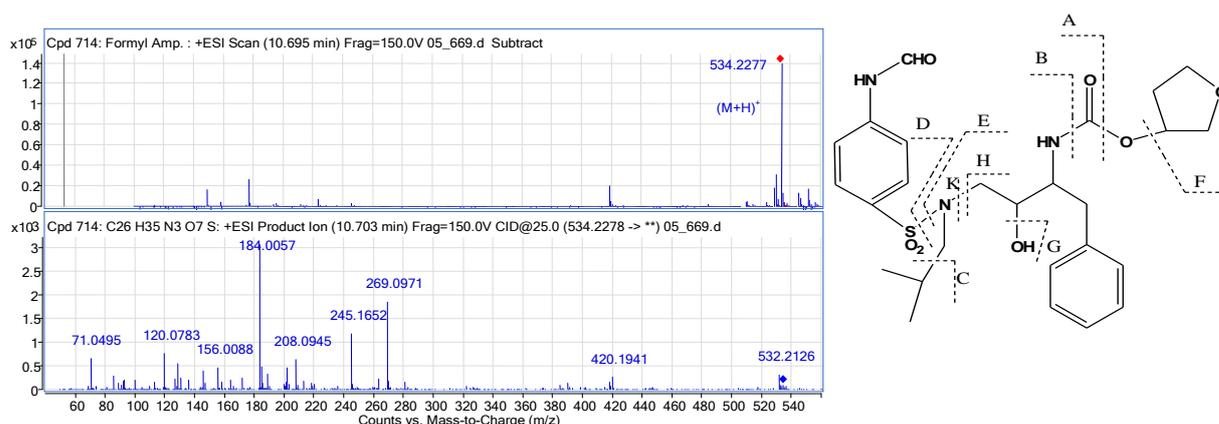


Abbildung 4.2.16: MS und MS/MS Spektrum von N-Formyl-amprenavir und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.14: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Formyl-amprenavir.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
534,2277 (506+28) [M+H] ⁺	C26 H36 N3 O7 S	N-Formyl-Amp + H	1,7
420,1941 (392+ 28)	C21 H30 N3 O4 S	534 – B (C5H6O3 = 114,0317)	2,45
245,1652	C15 H21 N2 O	534 – A – D – G (C11 H15 N O6 S = 289,062)	-1,64
269,0971 (241+28)	C12 H17 N2 O3 S	534 – H (C14 H19 N O4 = 265,1314)	-6,31
208,0945	C11 H14 N O3	534 – K – F (C15 H22 N2 O4 S = 326,13)	1,02
184,0057 (156+28)	C7 H6 N O3 S	534 – E (C19 H30 N2 O4 = 350,2206)	3,4
71,0495	C4 H7 O	F 534 – (C22 H29 N3 O6 S = 463,1777)	-4,94

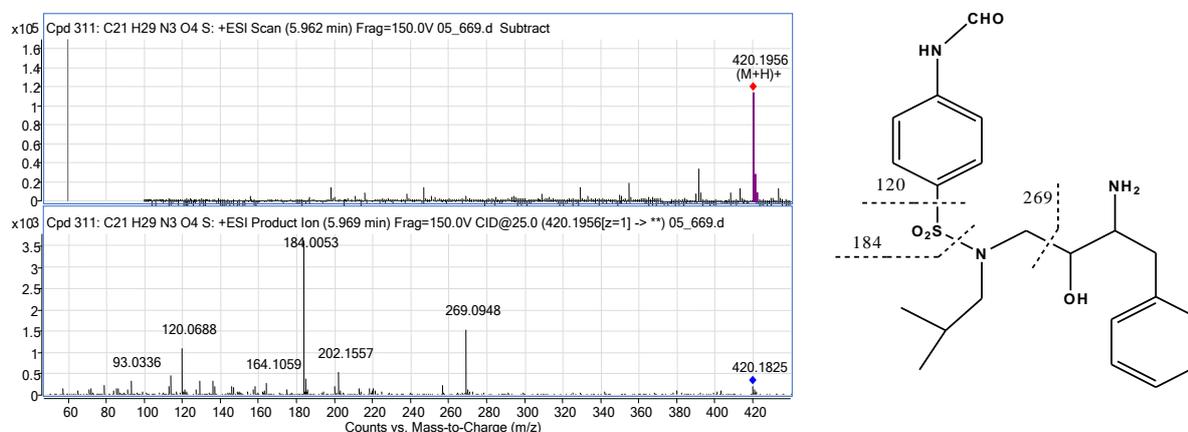


Abbildung 4.2.17: MS- und MS/MS-Spektrum von N-Formyl-Met2 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.15: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Formyl-Met 2.

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Nögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
420,1956 [M+H] ⁺	C21 H30 N3 O4 S	N-Formyl-Met 2 + H	1,52
269,0948 (241 + 28)	C12 H17 N2 O3	420 – (C9 H13 N O = 151,0997)	2,42
184,0053 (156 + 28)	C7 H6 N O3 S	420 – (C14 H24 N2 O = 236,1889)	5,34

Ein weiterer Metabolit Met 7, der durch Wasserabspaltung aus dem Hydroxy-Met 2 entsteht, wurde als N-Formyl-Ion mit RT= 10,613 min eluiert. Die diagonstische Masse ist m/z 263, andere Fragmente m/z 92 und 156 sind identisch mit Met 2 (Abbildung 4.2.18, Tabelle 4.2.16).

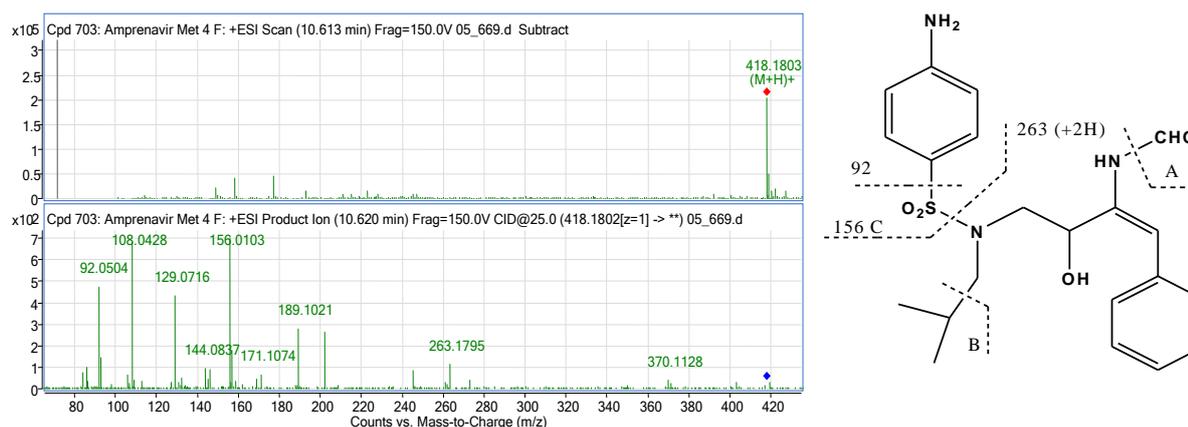


Abbildung 4.2.18: MS- und MS/MS-Spektrum von N-Formyl-Met 7 und mögliches Fragmentierungsschema.

Tabelle 4.2.16: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Formyl-Met 7.

Charakteristische m/z -Werte	Formula	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
418,1803 $[M+H]^+$	C ₂₁ H ₂₈ N ₃ O ₄ S	N-Formyl-Met 7 + H	-1,8
263,1795	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₂	418 - (C ₆ H ₅ N O ₂ S = 155,0041)	-15,57
189,1021	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	418 - A - B - C (C ₁₀ H ₁₅ N O ₃ S = 229,0773)	0,92
156,0103	C ₆ H ₆ N O ₂ S	418 - (C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂ = 262,1681)	6,72

Weitere Peaks mit charakteristischen Massen für Amprenavir wie Met 8 $[M+H]^+$ m/z 435 (506-71) 156, 202 und 245. Met 9 $[M+H]^+$ m/z 462 (506-44) 156, 202 und 241 konnten strukturell nicht erklärt werden (Abbildung 4.2.19).

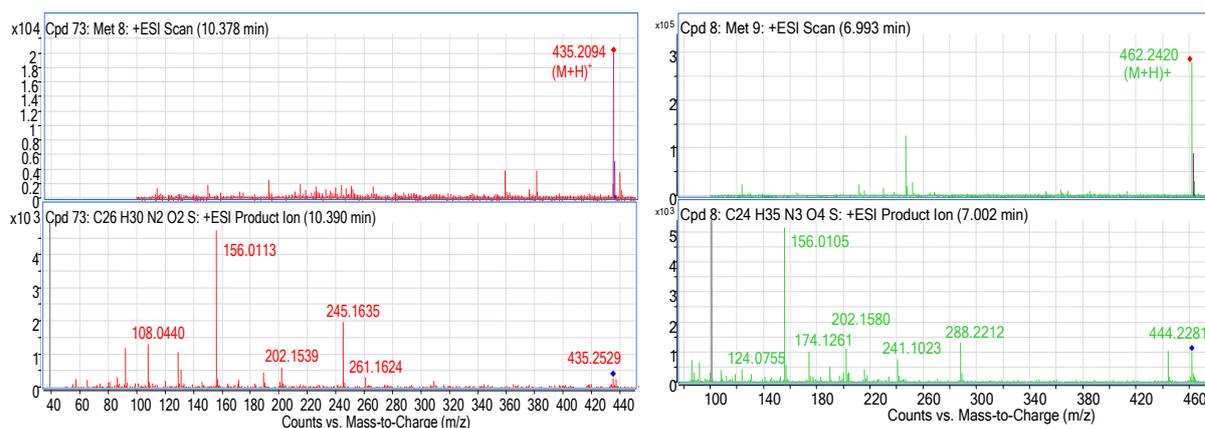


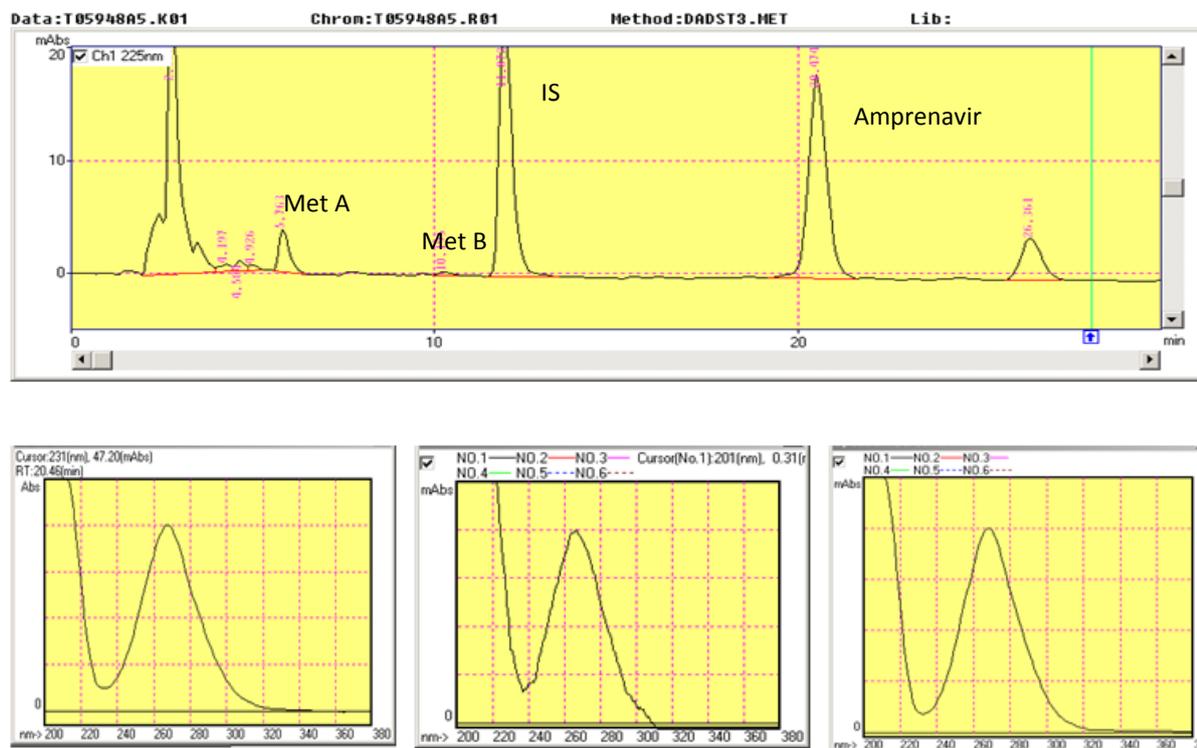
Abbildung 4.2.19: MS- und MS/MS-Spektren der Metabolite Met 8 und Met 9.

Mittels HPLC- DAD konnten nur Amprenavir und weitere zwei Metabolite Met A und Met B nach Vergleich der UV-Spektren festgestellt werden. Beide Metabolite weisen mit $RT_{MA} = 5,763$ min und $RT_{MB} = 10,195$ min eine wesentlich kürzere Retentionszeit als die Ausgangsverbindung $RT_{Amp} = 20,46$ min auf, was auf eine deutliche Erhöhung der Hydrophilie schließen lässt. Die Zuordnung erfolgt zum einen durch Vergleich mit vorhandenen ESI-LC-TOF/MS Peaksflächen (Met 2, N-Acetyl-Met 2), zum anderen durch die Retentionszeit.

Met A wurde als Met 2 (Hydrolyse der Carbamatgruppe) identifiziert, da Met 2 im LC-MS-Chromatogramm in vergleichsweise höchster Konzentration vorhanden war.

Dies wird unterstützt durch die hohe spektrale Ähnlichkeit zwischen diesem Metaboliten und dem Amprenavir, da die N-Desalkylierung nicht zur spektralen Änderung führt, und gleichzeitig durch die Erhöhung der Hydrophilie infolge der Protonierung des neuen freien basischen Stickstoffatoms. Das bedeutet dass Met. 2 der Hauptmetabolit des Amprenavirs ist. Für die Zuordnung des Metabolits Met B ($RT = 10,195$) trifft am besten N-Acetyl-Met A zu, wenn man die an Modellverbindungen gefundenen Retentionszeitverschiebungen durch N-Acetylierung des Met A ($RT = 5,762$) zugrunde legt.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse des Falles (Suizid durch Kopfschuss) durch HPLC-DAD und GC-MS sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Bei dem an Aids erkrankten Betroffenen ließen sich die Einnahme der Virustatika Saquinavir und Amprenavir (Metabolit vom Fosamprenavir) sowie der Opiate Morphin und Codein nachweisen. Alle diese Wirkstoffe gehörten laut Vorgeschichte zur Medikation des Betroffenen, welche seinem Krankheitsbild entsprechend angelegt war.



Amprenavir, RT = 20,46

Met B, RT =10,195 min

Met A, RT =5,763 min

Abbildung 4.2.20: HPLC Chromatogramme der alkalischen Extraktes der Blutprobe der Amrenavir Intoxikation und UV-Spektren von Amprenavir, Met A und Met B.

Aufgrund der relativ hohen Wirkstoffkonzentrationen im Mageninhalt, vor allem vom Saquinavir, muss davon ausgegangen werden, dass er einen Teil dieser Medikamente erst kurz vor dem tödlichen Kopfschuss eingenommen hatte. Die ermittelte Konzentration an Met A lag beim 1,37 µg/ml, hier spielten der first-pass-Metabolismus oder die postmortale Hydrolyse offensichtlich eine wesentliche Rolle.

Tabelle 4.2.17: Wirkstoffkonzentrationen in einem Todesfall mit therapeutischer Einnahme von Amprenavir.

Wirkstoff	Blut	Urin	Mageninhalt	Leber
Saquinavir	0,84 µg/ml	----	20,97 mg/ml	8,5 µg/g
Amprenavir	11,4 µg/ml	----	295 µg/ml	99,8 µg/g
Metabolit A	1,37 µg/ml	----	----	29,5 µg/g
Mizolastin	----	----	131 µg/ml	----
Morphin	0,017 µg/ml	0,193 µg/ml	----	----
Codein	0,009 µg/ml	0,031 µg/ml	----	----

4.3 Citalopram

Citalopram (CIT) ist ein selektiver und potenter Serotonin-Reuptake-Hemmer (SSRI), der als racemische Zubereitung zur Behandlung depressiver Erkrankungen verwendet wird. In der Literatur wurde der Nachweis von vier Metaboliten beschrieben.

Hauptsächlich wird racemisches CIT durch N-Desmethylierung zu Desmethylcitalopram (DCIT) und Didesmethyl-citalopram (DDCIT) und durch N-Oxidation zu Citalopram-N-oxid (CIT-NO) verstoffwechselt [207,208]. CIT, DCIT und DDCIT werden durch Deamination stereoselektiv unter Einfluss der Monoaminoxidase (MAO) zum Propionsäure-Derivat (CIT-PROP) umgewandelt [209,210]. Abbildung 4.3.1 zeigt das Metabolisierungsschema von Citalopram.

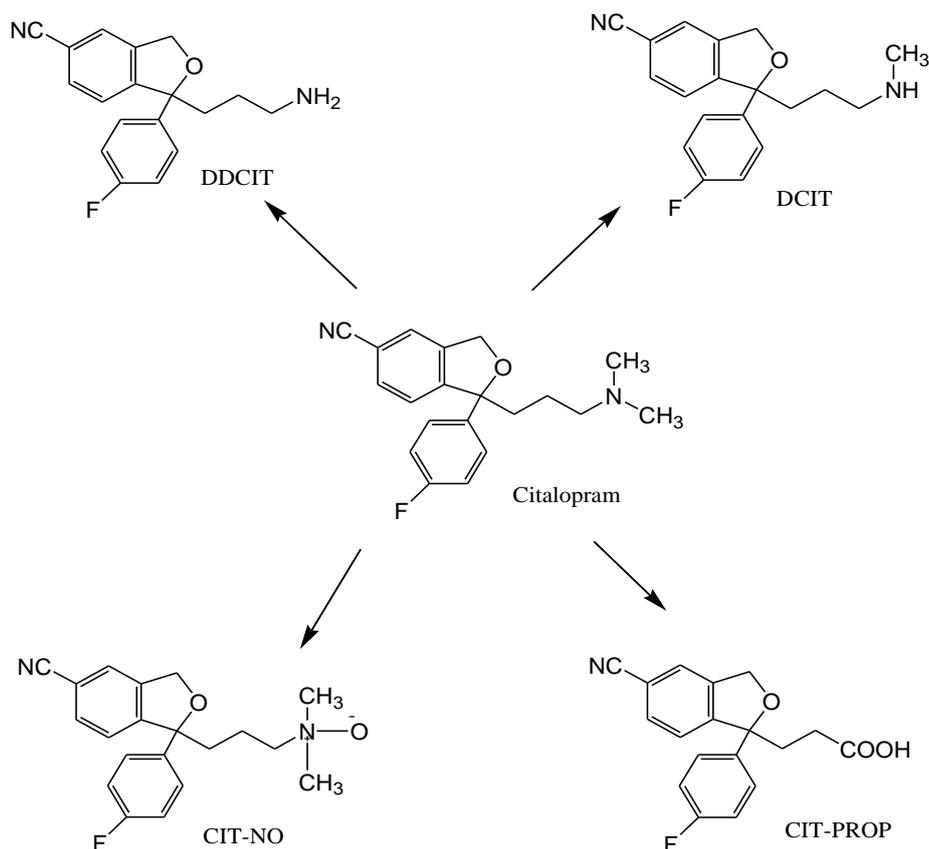


Abbildung 4.3.1: Metabolisierungsschema von Citalopram

Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit 30 Todesfälle und 50 Fälle von akuten überlebten Intoxikationen, bei denen Citalopram nachgewiesen werden konnte.

Mittels HPLC-DAD wurde in Blut- und Leberproben nach Metaboliten gesucht, und mittels LC-MS-TOF nur in Blutproben. Im Rahmen der HPLC-DAD-Untersuchungen konnten vier Metabolite des Citaloprams nachgewiesen werden. Die Zuordnung der Peaks zu den Metaboliten erfolgte aufgrund der spektralen Ähnlichkeit mit der Ausgangssubstanz.

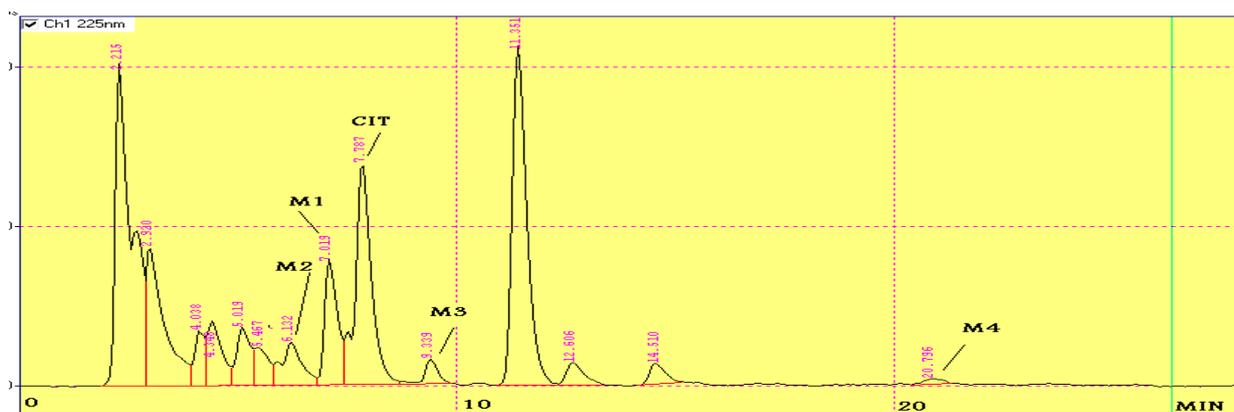


Abbildung 4.3.2: HPLC-DAD-Chromatogram des basischen Blutextraktes einer Citalopram-Intoxikation Met 1=M1, Met 2= M2, Met 3=M3 und Met 4=M4.

In meisten Fällen wurden der Metabolit Met 1, $RT_{Met1}=7,019$ min ($Q_{RT}=0,900$) und der Metabolit Met 2, $RT_{Met2}=6,132$ min ($Q_{RT}=0,785$) gefunden. Beide Metabolite weisen eine wesentlich kürzere Retentionszeit als die Muttersubstanz Citalopram, $RT_{CIT}=7,787$ min auf. Der Metabolit Met 3, $RT_{Met3}=9,339$ min ($Q_{RT}=1,120$) und der Metabolit Met 4, $RT_{Met4}=20,796$ min ($Q_{RT}=2,670$) wurden in der Hälfte der Fälle gefunden. Den Metaboliten Met 4 findet man in hoher Konzentration bei der sauren Extraktion der Proben.

Mittels LC-MS-TOF (Agilent-Gerät) wurde nach der genauen Masse (Feinmasse) möglicher Metabolite gesucht. Tabelle 4.3.1 zeigt die gefundenen Massen und entsprechenden Zuordnungen zu den Metaboliten.

Tabelle 4.3.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF Untersuchung der basischen Blutextrakte von 32 Fällen mit positiven Citalopram Befund (Agilent-Messgerät)

Erwarteter Metabolit	Summenformel	Masse	Fälle/ Ionisation	RT min	Q_{RT}	Ppm Err.
Citalopram (M)	C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₂ F	324,16379	~ Alle/ Pos	7,11	1	0,2
Met 1 DCIT (M-14)	C ₁₉ H ₁₉ N ₂ O ₂ F	310,14814	27/Pos	7,06	0,9930	0,5
Met 2 DDCIT (M-28)	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₂ F	296,13249	5/Pos	7,01	0,9929	1
Met 3 CIT N-oxid (M+16)	C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₂ F	340,15871	15/Pos	7,16	1,0347	2
Met 4 CIT Prop (M-13)	C ₁₈ H ₁₄ NO ₃ F	311,09577	5/Neg	8,01	1,1187	2

Mittels LC-MS-TOF unter Verwendung des Waters-Gerätes wurde nach der genauen Masse und nach den Fragmenten in den Spektren gesucht.

Die Metaboliten zeigten mit der Ausgangssubstanz eine hohe Übereinstimmung in der Fragmentbildung (Tabelle 4.3.2), Abbildung 4.3.3 zeigt für Citalopram die Struktur der meisten der entstandenen charakteristischen Fragmentationen [211,212].

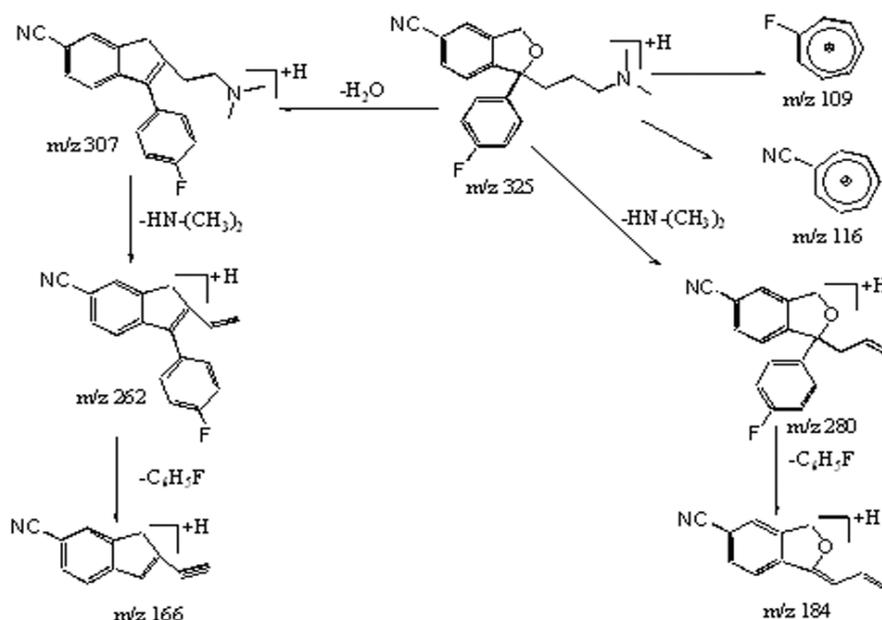


Abbildung 4.3.3: ESI-MS Fragmente von Citalopram und deren Strukturinterpretation

Für die Zuordnung der Peaks zu den jeweilig Citalopram-Metaboliten wurden die RT-Werte und Retentionszeitveränderungen Q_{RT} von Herre [213] zum Vergleich herangezogen. Der Metabolit Met 1 ist dem Desmethylcitalopram und Met 2 dem Didesmethylcitalopram zuzuordnen, diese weisen hierbei eine Retentionszeitverkürzung von $Q_{RT\text{Met}1}=0,9$, $Q_{RT\text{Met}2}=0,785$ mittels HPLC-DAD und $Q_{RT\text{Met}1}=0,9930$, $Q_{RT\text{Met}2}=0,9929$ mittels LC-MS-TOF am Agilent-Gerät auf, was dem oberen Bereich der Retentionszeitveränderung durch Desmethylierung bei Modellverbindungen entspricht. Die RT, Feinmasse der Peaks $[M+H]^+$ und die Fragmentbildung an der Waters-Anlage ergibt eine genaue Übereinstimmung mit diesen Metaboliten.

Tabelle 4.3.2: Ergebnisse der LC-MS-TOF-Untersuchung (Waters-Instrument) der basischen Blutextrakte von 32 Fällen mit positiven Citalopram Befund und Fragmente der Metabolite.

Metabolite	RT	Q_{RT}	$[M+H]^+ ES^+$			Fragmente				
CIT	10,00	1,00	325	307	280	262	234	166	116	109
Met 1 DCIT (M-14)	9,98	0,998	311	293	280	262	234	166	116	109
Met 2 DDCIT (M-28)	9,95	0,995	297		280	262	234	166	116	109
Met 3 CIT N-oxid (M+16)	10,40	1,04	341		280	262	234	166	116	109
$[M-H]^- ES^-$										
Met 4 CIT Prop (M-13)	13,55	1,355	310							

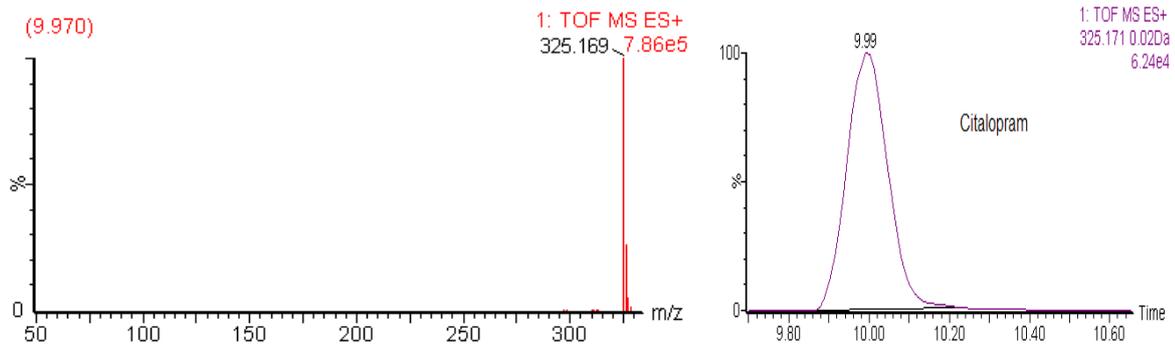


Abbildung 4.3.4: XIC (rechts) und Massenspektrum (links) von Citalopram, gemessen mit dem Waters-Gerät bei DP = 10 V.

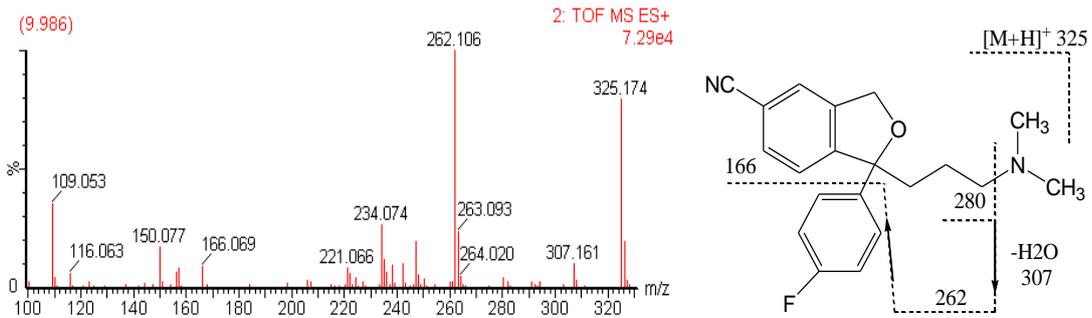


Abbildung 4.3.5: Massenspektrum von Citalopram gemessen mit dem Waters-Gerät bei DP = 20 V und mögliche Fragmentierungsinterpretation.

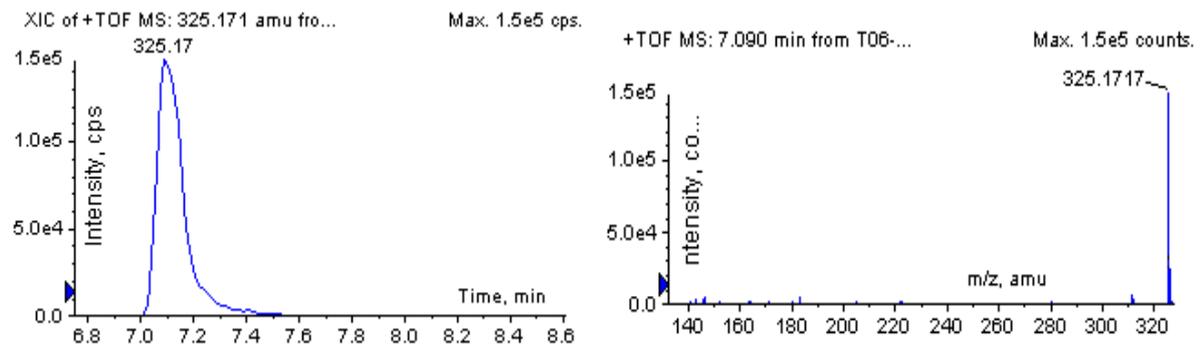


Abbildung 4.3.6: XIC (links) und Massenspektrum (rechts) von Citalopram gemessen mit dem Agilent-Gerät

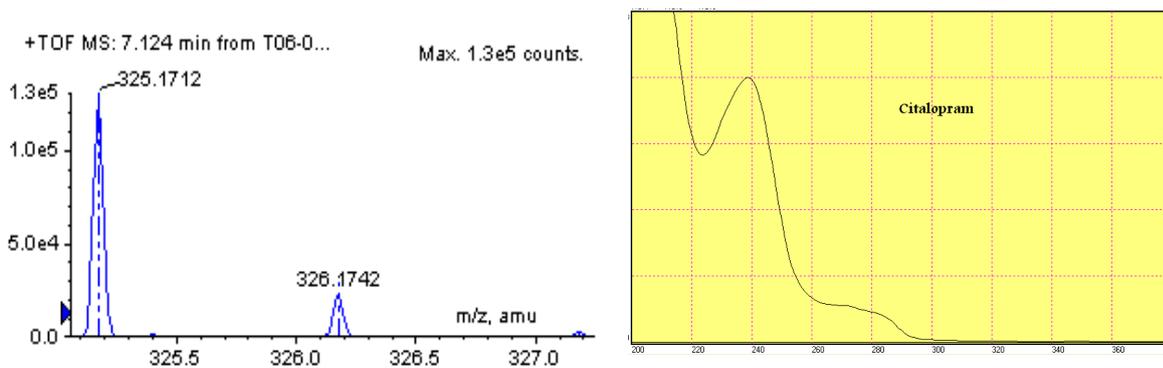


Abbildung 4.3.7: Isotopenverhältnis des Moleküllonenpeaks gemessen mit dem Agilent-Gerät Agilent (links) und UV-Spektrum (rechts) von Citalopram.

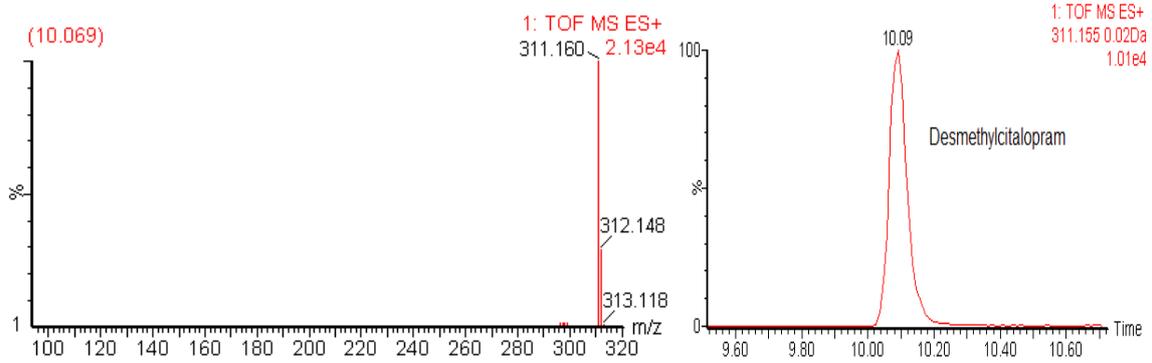


Abbildung 4.3.8: XIC (rechts) und Massenspektrum (links) von Desmethylcitalopram gemessen mit dem Waters-Gerät bei DP = 10 V.

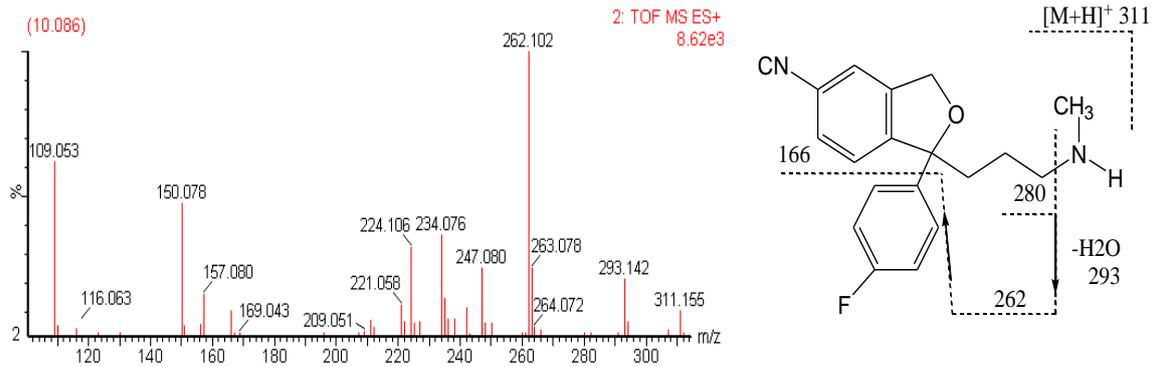


Abbildung 4.3.9: Massenspektrum gemessen mit dem Waters-Gerät bei DP = 20 V und Interpretation der Fragmentierung von Desmethylcitalopram.

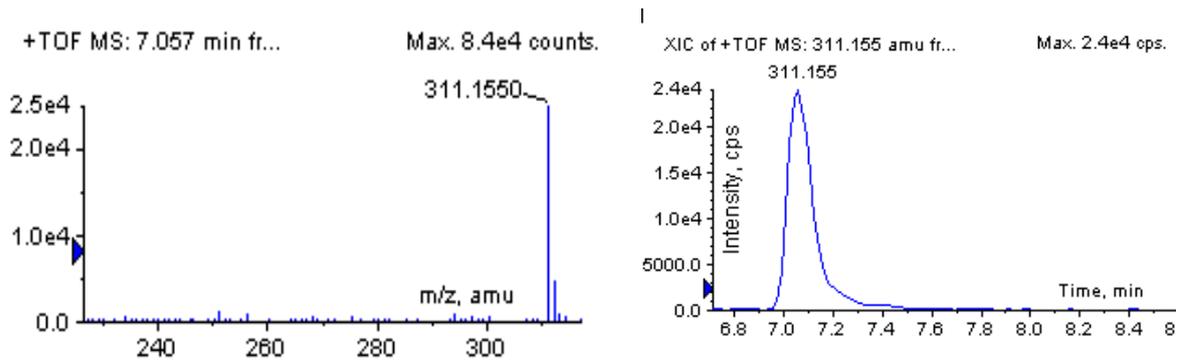


Abbildung 4.3.10: XIC (rechts) und Massenspektrum (links) von Desmethylcitalopram, gemessen mit dem Agilent-Gerät.

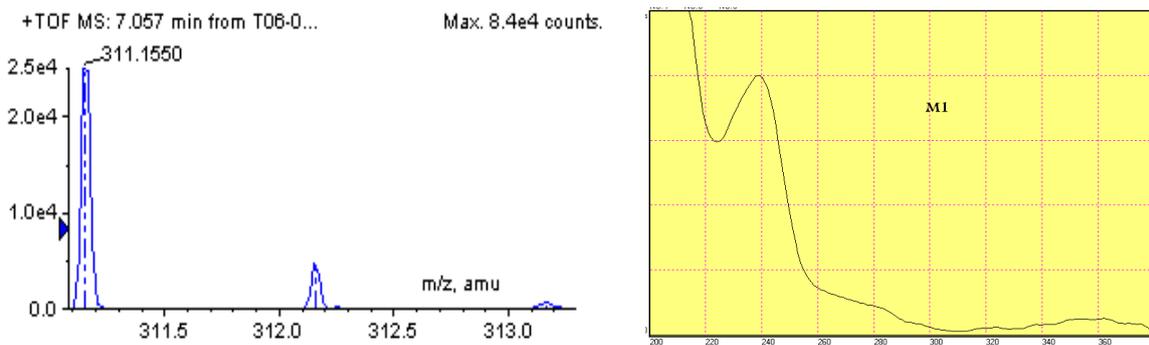


Abbildung 4.3.11: Isotopenverhältnis des Molekülionenpeaks gemessen mit dem Agilent-Gerät (links) und UV-Spektrum (rechts) von Desmethylcitalopram.

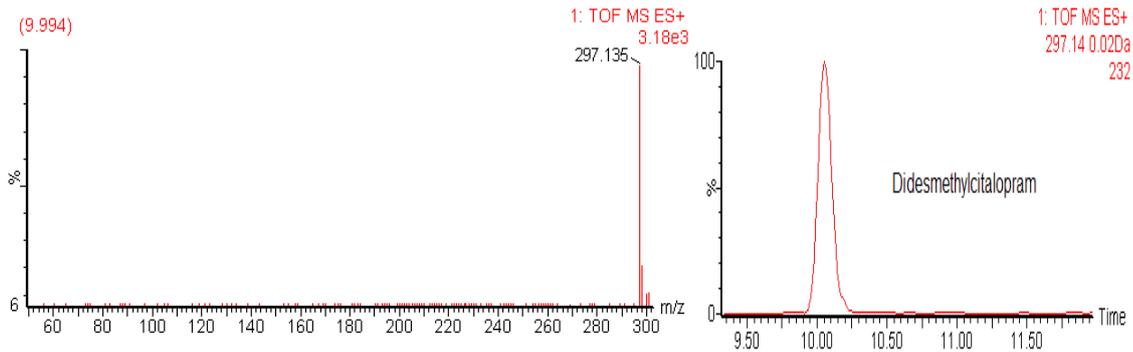


Abbildung 4.3.12: XI C(rechts) und Massenspektrum (links) von Didesmethylcitalopram Waters-Gerät bei DP = 10 V.

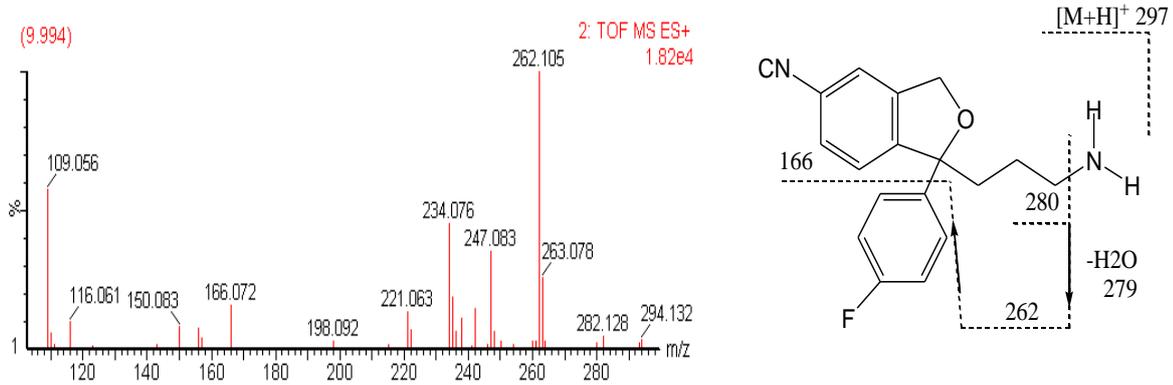


Abbildung 4.3.13: Massenspektrum bei DP = 20 V DP gemessen mit dem Waters-Gerät(links) und Interpretation der Fragmentierung (rechts) von Didesmethylcitalopram.

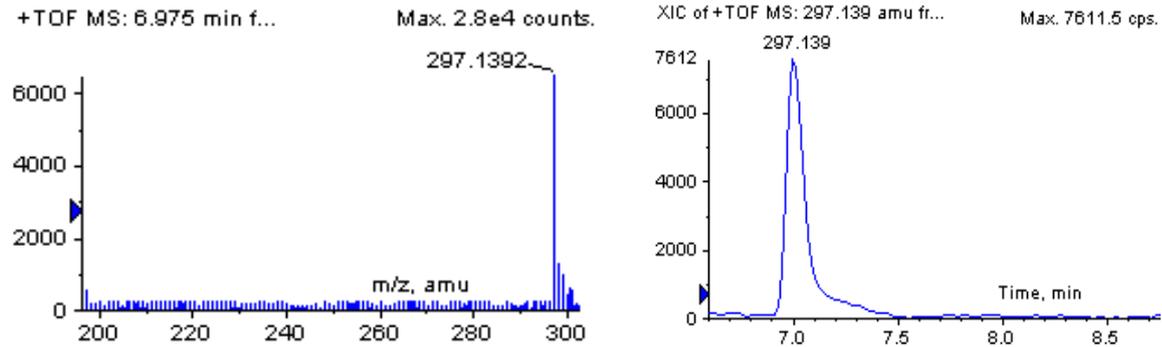


Abbildung 4.3.14: XIC (rechts) und Massenspektrum von Didesmethylcitalopram (links) gemessen mit dem Agilent-Gerät.

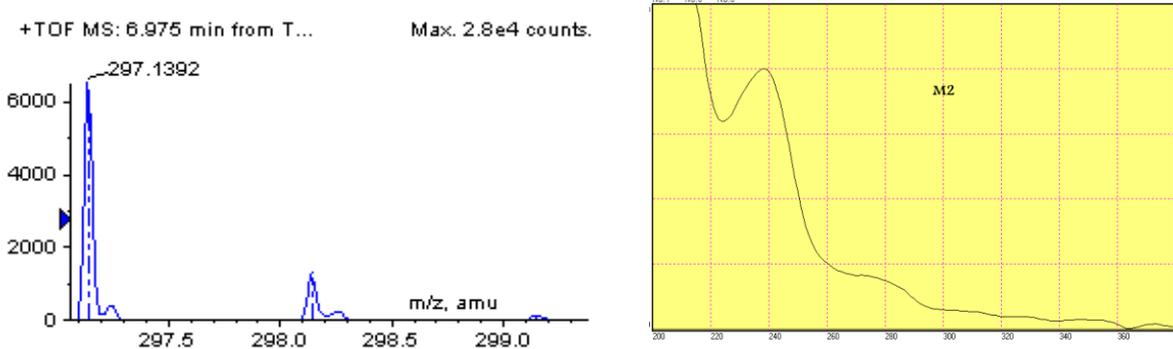


Abbildung 4.3.15: Isotopenverhältnisses Molekülonenpeaks, gemessen mit dem Agilent-Gerät (links) und UV-Spektrum (rechts) von Didesmethylcitalopram.

Für die Masse 340,1587 ($M+16$) ergab sich $RT=7,16$ min mit $Q_{RT}=1,037$ mittels LC-MS-TOF Agilent, und $RT=10,4$ min mit $Q_{RT}=1,04$ mittels Waters-Anlage. Beide wurden in 15 Fällen gefunden. Nach der RT und der Fragmentbildung und dem Vergleich mit LC-MS/MS Ergebnissen [214] ist dies Citalopram-N-oxid. Das entspricht auch dem HPLC-DAD-Peak des Met3 mit Q_{RRT} von 1,120.

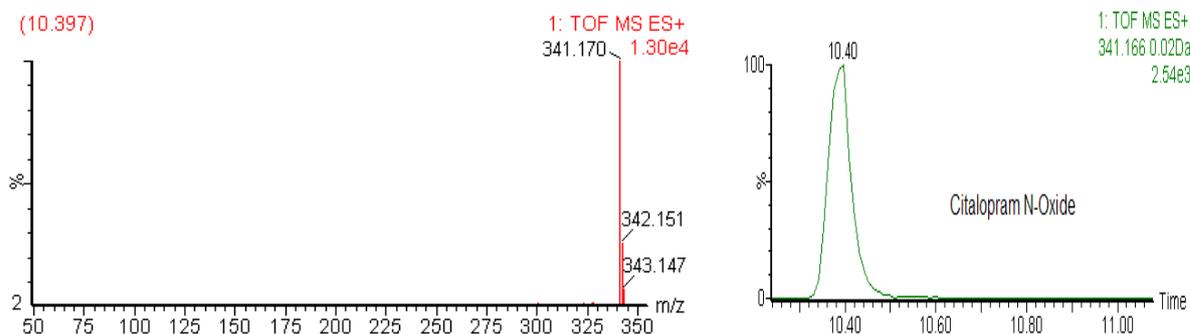


Abbildung 4.3.16: XIC (rechts) und Massenspektrum (links) von Citalopram N-oxid gemessen mit dem Waters-Gerät bei $DP = 10$ V

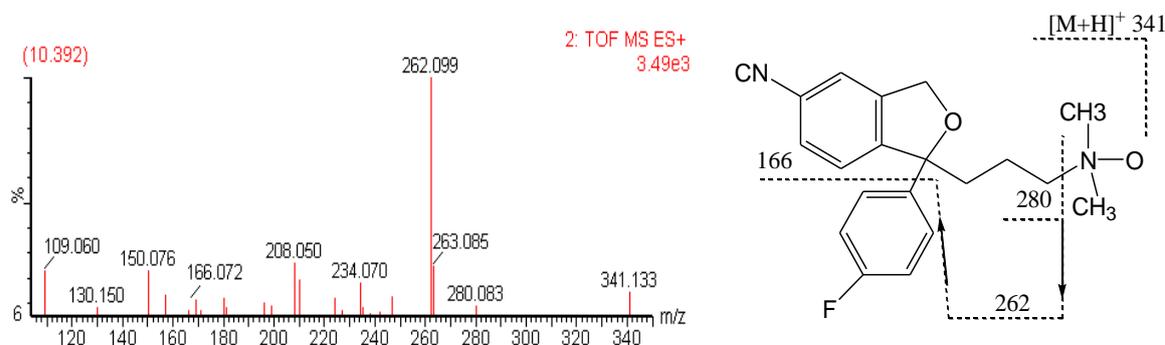


Abbildung 4.3.17: Massenspektrum von Citalopram N-oxid gemessen mit dem Waters-Gerät bei $DP = 20$ V und Interpretation der Fragmentierung.

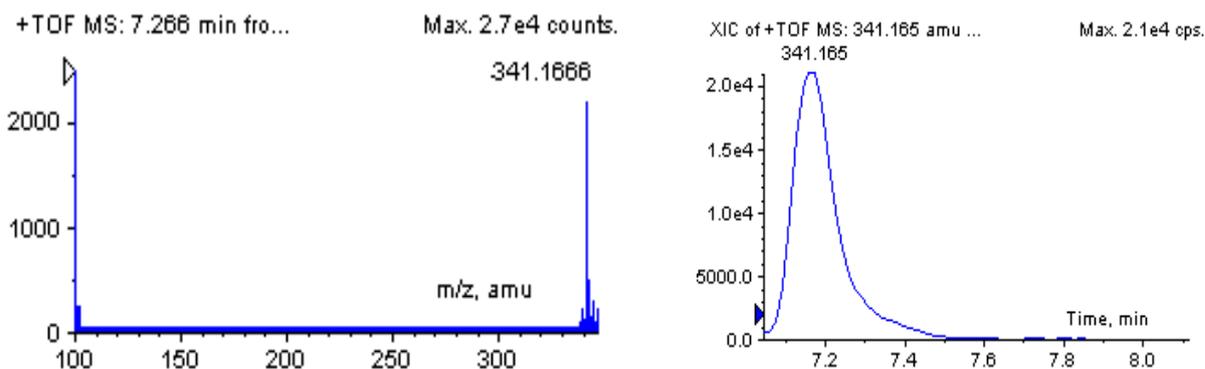


Abbildung 4.3.18: XIC (rechts) und Massenspektrum (links) gemessen mit dem Agilent-Gerät von Citalopram N-oxid.

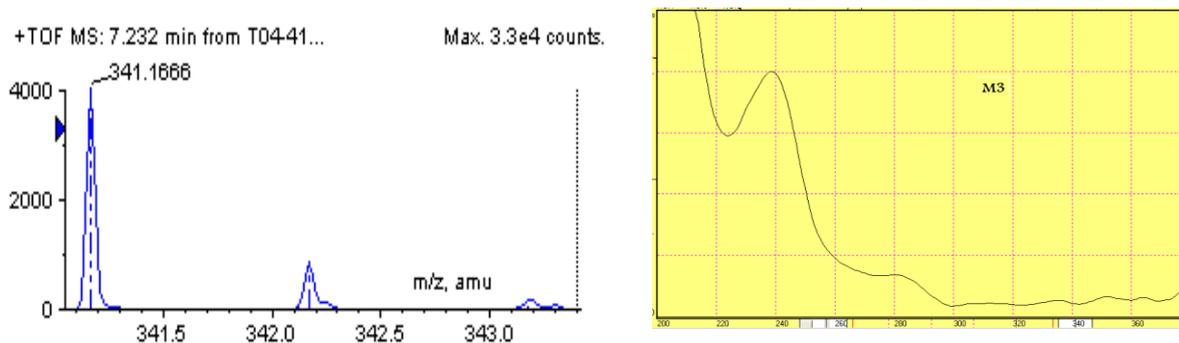


Abbildung 4.3.19: Isotopenverhältnis des Molekülionenpeaks gemessen mit dem Agilent-Gerät und UV-Spektrum von Citalopram N-oxid

Die Identifizierung des in 13 Fällen vorhandenen Peaks Met4 als Carboxy-Citalopram erfolgte durch Retentionszeitvergleich $Q_{RT}=2,670$ mit dem Carboxy-Metaboliten des Diphenhydramin [51], und aufgrund der Ähnlichkeit der UV-Spektren. Zusätzlich ist diese Substanz in den sauer extrahierten Proben mit höchster Konzentration vorhanden, wurde mit LC-MS/TOF mit der Masse von 311,09557 nur im Negativmodus nachgewiesen und hat hier einen Q_{RT} von 1,1187. Dies ist vereinbar mit einem Carboxy-Metaboliten. Die Fragmentbildung konnte nicht untersucht werden, weil der Metabolit in einer zu geringen Konzentration vorlag.

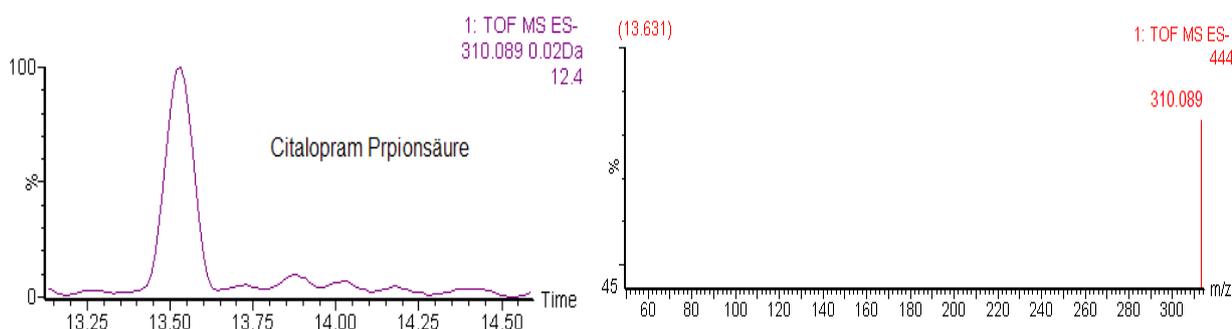


Abbildung 4.3.20: XIC (links) und Massenspektrum (rechts) von Citalopram Propionsäure gemessen mit dem Waters-Gerät bei $DP = 10$ V.

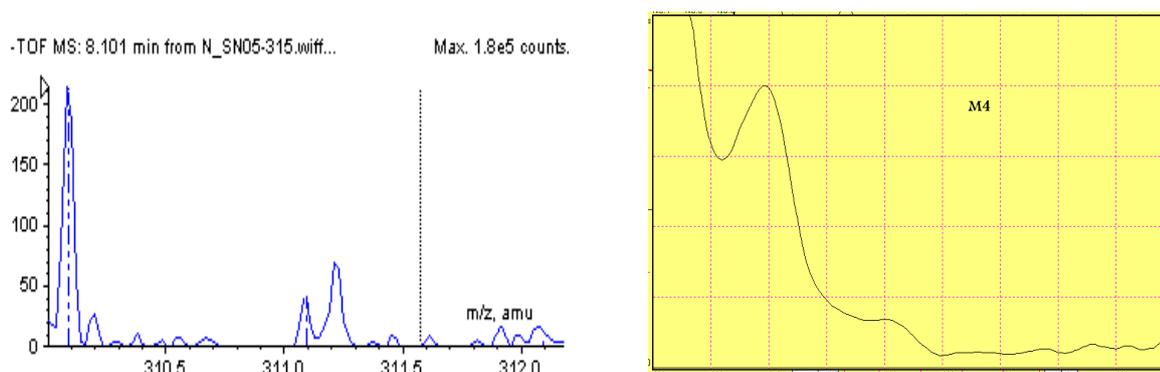


Abbildung 4.3.21: Isotopenverhältnis des Molekülionenpeaks gemessen mit dem AgilentGerät und UV Spektrum von Citalopram Propionsäure

In den 59 im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Todesfällen mit Citalopram wurde das Desmethylcitalopram als Hauptmetabolit in 37 Blutproben identifiziert und quantifiziert (Abbildung 4.3.22). Es ergab sich, dass Desmethylcitalopram nicht oder nur in relativ niedriger Konzentration im Blut nachweisbar war. Aus Abbildung 4.3.22 ist ersichtlich, dass die ermittelten Citalopram-Blutkonzentrationen in 23 der 59 Fälle (10 davon Monointoxikationen) nach Vergleich mit Literaturdaten [215,216] und früher bei uns analysierten Fällen im therapeutischen Bereich (0,06-0,3 µg/mL) lagen. In diesen Fällen wurde die Einnahme des in der Vorgeschichte benannten citalopramhaltigen Antidepressivums in therapeutischer Dosierung bestätigt. Diese Medikation sollte in der hier ermittelten Konzentration für den Todeseintritt aus toxikologischer Sicht ohne Bedeutung sein.

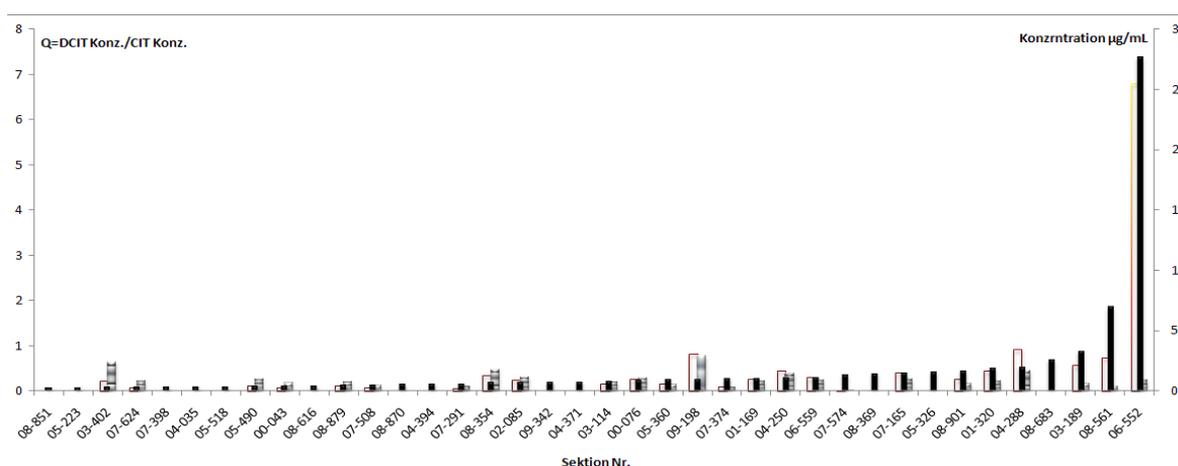
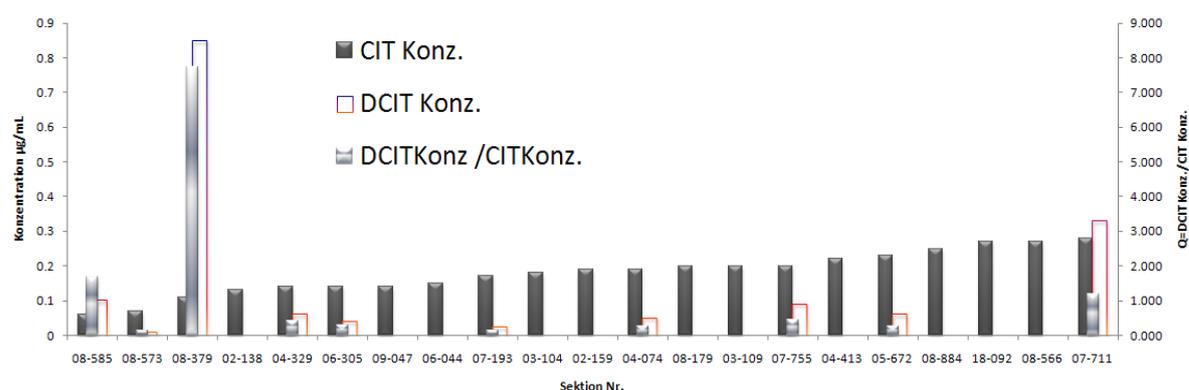


Abbildung 4.3.22: Konzentrationen von Citalopram und Desmethylcitalopram sowie deren Verhältnis in Blutproben von 59 Todesfällen von Citalopram Blau, Desmethylcitalopram Rot und die Konzentrationquotienten $Q = \frac{\text{DCIT Konz.}}{\text{CIT Konz.}}$.

In 34 Fällen, davon 6 Monointoxikation, befand sich die ermittelte Citalopram-Blutkonzentrationen im Bereich 0,3-3,5 µg/mL, (also oberhalb des bis 0,3 µg/ml geltenden therapeutischen Bereiches. Hierdurch wird die Einnahme eines citalopramhaltigen Medikamentes in hoher therapeutischer Dosierung, wahrscheinlich über einen längeren Zeitraum, belegt.

Ein Teil der Werte ist durch Kumulationseffekte erklärbar. Es ist auch bekannt, dass es gerade bei älteren Betroffenen mit einer möglichen Leberfunktionsstörung zum Anstieg des Citalopram-Spiegels kommen kann, da der Wirkstoff Citalopram vorwiegend hepatisch ausgeschieden wird [217-219]. Eine todesursächliche Intoxikation mit Citalopram sollte in diesem Konzentrationsbereich noch nicht vorgelegen haben.

Nur in zwei Fällen liegt die gemessene Citalopram-Konzentration deutlich oberhalb 5–6 µg/ml, bei denen in der Literatur Todesfälle durch Citalopram beschrieben wurden. Beim ersten Fall war der 58-jährige Betroffene auf dem Dachboden seines in Sanierung befindlichen Wohnhauses erhängt aufgefunden worden. Seine Hände seien auf dem Rücken mit Handschellen, in denen der Schlüssel noch steckte, gefesselt gewesen.

Die ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 4.3.3 ersichtlich. Der Betroffene sollte demnach durch die aufgenommene Citalopram-Dosis deutlich in seinem Handlungs- und Reaktionsvermögen beeinträchtigt gewesen sein. Es ist denkbar, dass er unter dieser Citalopram-Wirkung bewusstlos geworden ist und final in das Strangwerkzeug gefallen sein kann.

Tabelle 4.3.3: Konzentrationen an Citalopram und Desmethylcitalopram einem Todesfall (58 m) mit Erhängen als finaler Todesursache.

Wirkstoff	Blut	Mageninhalt
Citalopram	7,0 µg/ml	4,9 µg/ml
Desmethylcitalopram	0,74 µg/ml	0,75 µg/ml

Bei dem zweiten Fall sei die 46-jährige Betroffene leblos und bereits fäulnisverändert in ihrer Wohnung aufgefunden worden. In der Wohnung habe man diverse Drogen-Utensilien vorgefunden.

Die ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 4.3.4 ersichtlich. Bei der Betroffenen ließ sich eine letale Mischintoxikation mit Opiaten, Cocain, dem zur Substitution verordneten Methadon, mit dem Lokalanästhetikum und Antiarrhythmikum Lidocain, welches möglicherweise als Streckmittel in den illegalen Drogenmischungen enthalten war, und dem Antidepressivum Citalopram nachweisen.

Die im Venenblut gemessenen Konzentrationen liegen nach Vergleich mit Literaturdaten und früher bei uns analysierten Fällen für die illegalen Drogen in dem Bereich der Werte, die in der Regel bei Todesfällen mit diesen Substanzen gemessen werden. Der Tod der Betroffenen kann daher ursächlich durch eine Intoxikation mit diesen Wirkstoffen herbeigeführt worden sein.

Tabelle 4.3.4 Ergebnisse der toxikologischen Analyse bei einer letalen Mischintoxikation bei erheblicher Mitwirkung von Citalopram.

Wirkstoff	Blut	Fäulnisflüssigkeit	Mageninhalt	Leber
Morphin	0,276 µg/ml	-----	----	-----
Codein	0,022 µg/ml	-----	----	-----
Cocain	0,234 µg/ml	-----	----	-----
BE	0,201 µg/ml	-----	----	-----
ME	0,557 µg/ml	-----	----	-----
Methadon	0,174 µg/ml	1,03 µg/ml	0,78 µg/ml	0,29 µg/g
EDDP	0,343 µg/ml	0,18 µg/ml	----	----
Citalopram	----	27,7 µg/ml	10,8 µg/ml	8,2 µg/g
Desmethylcitalopram	----	6,8 µg/ml	2,6 µg/ml	4,5 µg/g
Lidocain	----	35,8 µg/ml	29,6 µg/ml	13,7 µg/g

Die Citalopram- und Lidocain-Konzentrationen in der Fäulnisflüssigkeit liegen beide deutlich im toxischen bzw. komatös-letalen Bereich, wobei die ermittelten Werte durch die Überlagerung mit Fäulnisprodukten erhöht worden sein können. Es wird jedoch die Einnahme einer größeren Menge dieser Wirkstoffe belegt, die im Zusammenwirken mit der Aufnahme der illegalen Drogen die toxische Wirkung verstärkt haben können. Aus der Klinik wurden in den letzten 9 Jahren 97 Fälle mit Citalopram untersucht. In 47 dieser Spiegelbestimmungen war nur das Metabolisierungsprodukt Desmethylcitalopram mit HPLC-DAD nachweisbar (Abbildung 4.3.23).

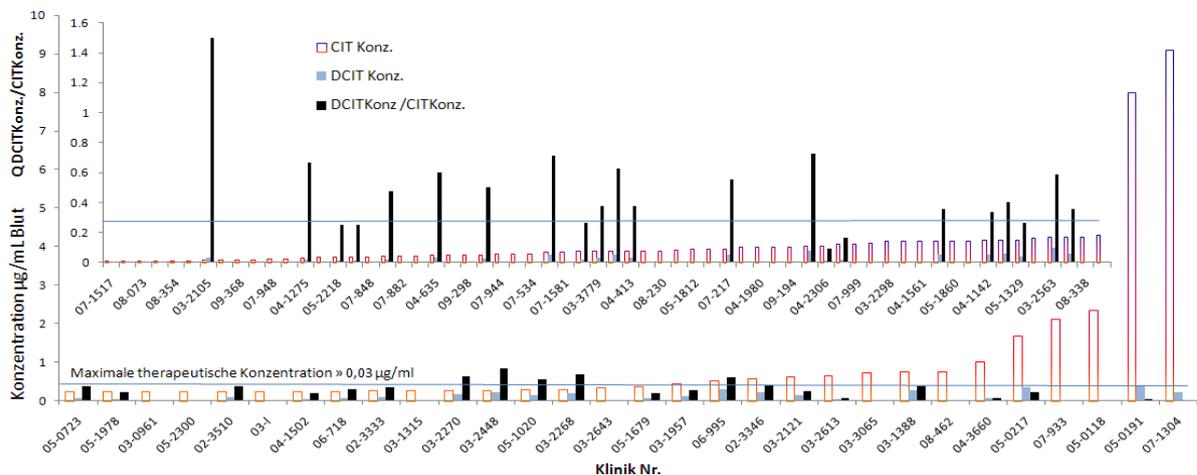


Abbildung 4.3.23: Konzentrationen von Citalopram, Desmethylcitalopram und die Konzentrations-Quotienten $Q = \frac{DCIT_{Konz}}{CIT_{Konz}}$ in 97 Klinik Proben .

Das Konzentrationsverhältnis Desmethylcitalopram/Citalopram erreichte Werte zwischen 0,025 und 1,50. Eine Erklärung für die überhöhten Werte bei gleichzeitiger sehr niedriger Metabolitskonzentration ergab sich aus der Applikationsform des Citaloprams. Da die auch als i.v. applizierten Citalopram Tropfen eine höhere Bioverfügbarkeit als die Tabletten

haben, kam es unter Umgehung des first-pass-Effektes nur zu einer schwachen Metabolisierung. Die hohen Werte für die Konzentrationquotienten Q lassen sich somit dadurch erklären, dass ein erheblicher Anteil bereits während der ersten Leberpassage metabolisiert wurde, wobei entweder eine therapeutische Dauermedikation oder aber eine längere Zeit zwischen Aufnahme und Blutentnahme vorgelegen haben muss. Eine weitere Erklärung sind Kumulationseffekte.

Bei den Fällen mit Citalopram-Konzentration über der Grenze der Kumulationseffekte handelt es sich um die akuten Citalopram-Intoxikationen (Tabelle 4.3.5).

Tabelle 4.3.5: Citalopram-Konzentrationen in Blutproben von akuten Citalopram-Intoxikationen

Fall	CIT Konz. $\mu\text{g/mL}$	DCIT Konz. $\mu\text{g/mL}$	$Q = \text{DCITKonz} / \text{CITKonz}$
07-1304	9,1	0,23	0,025
05-0191	7,98	0,39	0,049

4.4 Clozapin

Clozapin CLZ ist ein Neuroleptikum, gilt als erster Vertreter der atypischen Neuroleptika und gehört chemisch zur Gruppe der Dibenzodiazepine. Im Metabolismus wird Clozapin fast vollständig vor der Ausscheidung umgesetzt. Dieses erfolgt durch N-Desmethylierung, N-Oxidation, Hydroxylierung des Chlors enthaltenden Ringes und Thiomethyl- Konjugation [220]. Als Hauptmetabolite wurden das N-Desmethylclozapin DM-CLZ und das Clozapin-N-oxid CLZ-NO angegeben [221-223].

Bei weiteren Metaboliten wurde der Chlor-substituent durch eine Hydroxy- oder eine Methylthio-Gruppe ersetzt [224]. Durch eine Hydroxylierung konnte im Urin das 7-Hydroxy-desmethylclozapin-O-Sulfat und das Glucuronid von 7-Hydroxyclozapin nachgewiesen werden, und 8-Deschlor-8-hydroxydesmethylclozapin [225-227].

Zum Clozapin wurden in der vorliegenden Arbeit 12 letale Fallbeispiele ausgewertet. Mittels LC-MS-TOF ließen sich 27 Abbauprodukte des Clozapins nachweisen.

Die diesen Meaboliten zugeordneten Massen sind in Tabelle 4.4.1 angegeben und in Abbildung 4.4.1 dargestellt. Die MS- und MS/MS-Spektren, Fragmentierungsschemata und Zuordnung der Fragmente sind für alle Metabolite in Tabellen 4.4.1 bis 4.4.26 und den Abbildungen 4.4.2 bis 4.4.27 aufgeführt.

Tabelle 4.4.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF Untersuchung des basischen Blutextraktes in Fällen mit positivem Clozapin-Befund. (Agilent und Waters LC-TOF/MS), vgl. Abbildung 4.4.1.

Metabolit	Strukturvorschlag	Formula	M	RT	ppm Err.	Q _{RT}
CLZ	Clozapin	C ₁₈ H ₁₉ N ₄ Cl	326,12982	17,038	1,55	1,000
Met 1	DM-CLZ	C ₁₇ H ₁₇ N ₄ Cl	312,11410	15,078	1,57	0,885
Met 2	Clozapin-N-oxid	C ₁₈ H ₁₉ CIN ₄ O	342,12474	15,146	5,70	0,889
Met 3	Piperazin-2-on-CLZ	C ₁₈ H ₁₇ CIN ₄ O	340,10909	16,520	0,51	0,970
Met 4	8-Hydroxy-CLZ	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O	308,16371	12,848	1,25	0,754
Met 5	8-Methylthio-CLZ	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ S	338,15652	16,730	5,46	0,982
Met 6	7-Methylthio-CLZ	C ₁₉ H ₂₁ CIN ₄ S	372,11755	18,880	1,20	1,108
Met 7	7-methanesulfinyl-CLZ	C ₁₉ H ₂₁ CIN ₄ OS	388,11246	16,669	3,86	0,978
Met 8	8-Hydroxy-CLZ -N-oxid	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₂	324,15863	10,866	3,16	0,638
Met 9	8-Methanesulfinyl-CLZ -N-oxid	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₂ S	370,14635	11,015	3,47	0,646
Met 10	8-Methanesulfonyl -CLZ -N-oxid	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	386,14126	11,405	4,49	0,669
Met 11	Piperazin-2-on- 8-hydroxy-CLZ	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	322,14298	12,805	1,43	0,752
Met 12	Dihydroxy-CLZ	C ₁₈ H ₁₉ Cl N ₄ O ₂	358,11965	13,104	5,35	0,769
Met 13	N-Acetyl-8-hydroxy- DM-CLZ	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₂	336,15863	13,152	1,92	0,772
Met 14	N-Acetyl-8-methylsulfinyl -DM-CLZ	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₂ S	382,14635	13,186	6,97	0,774
Met 15	7- Hydroxy-piperazin-2-on-CLZ	C ₁₇ H ₁₅ Cl N ₄ O ₂	342,08835	14,192	4,69	0,833
Met 16	8-Methylthio-CLZ-N-oxid	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O S	354,15143	15,029	0,94	0,882
Met 17	N-Acetyl 8-methylthio- DM-CLZ	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O S	366,15143	16,417	1,28	0,964
Met 18	Hydroxy-DM-CLZ	C ₁₇ H ₁₇ Cl N ₄ O	328,10909	16,764	3,57	0,984

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.4.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF Untersuchung des basischen Blutextraktes in Fällen mit positivem Clozapin-Befund. (Agilent und Waters LC-TOF/MS), vgl. Abbildung 4.4.1.

Metabolit	Strukturvorschlag	Formula	M	RT	ppm Err.	Q _{RT}
Met 19	N-Acetyl-DM-CLZ	C19 H19 Cl N4 O	354,12474	16,750	1,10	0,983
Met 20	N-Acetyl-7-methylsulfonyl- DM- CLZ	C20 H21 Cl N4 O S	400,11246	18,381	7,00	1,079
Met 21	7-Methylsulfonyl-CLZ -N-oxid	C19 H21 Cl N4 O3 S	420,10229	14,988	6,63	0,880
Met 22	N-Acetyl-7-methylsulfonyl-DM-CLZ	C20 H21 Cl N4 O3 S	432,10229	16,561	6,65	0,972
Met 23	7-Methylsulfonyl- piperazin-2-on-CLZ	C19 H219 Cl N4 O S	386,09681	18,258	1,94	1,072
Met 24	7-Methylsulfonyl-CLZ	C19H21ClN4O2S	404,1074	--	7,04	--
Met W1	Met W1	C15 H16 N4 O2	284,1273	7,924	0,76	0,465
Met W2	7-Methylsulfonyl-piperazin-2-on-CLZ	C18H17ClN4O3S	404,0710	15,835	---	0,929
Met W3	N-Acetyl-7-hydroxy-CLZ	C19H19ClN4O	370,1197	15,097	4,34	0,886

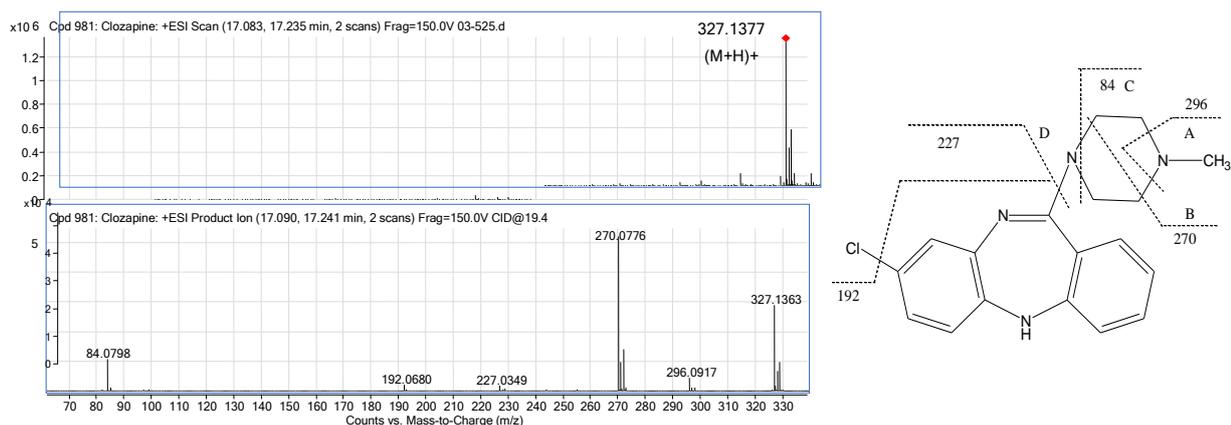


Abbildung 4.4.2: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Clozapin und Interpretation der Fragmentierung

Tabelle 4.4.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Clozapin

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
327,1371 [(M+H) ⁺]	C18 H20 Cl N4	Clozapin + H	1,55
296,0917	C17 H15 Cl N3	327 - A (31,0422 = C H5 N)	10,96
270,0776	C15 H13 Cl N3	327 - B (57,0578 = C3 H7 N)	6,08
227,0349	C13 H8 Cl N2	327 - D (100,1 = C5 H12 N2)	10,41
192,068	C13 H8 N2	327 - D - Cl (135,0689 = C5 H12 Cl N2)	0,88
84,0798	C5 H10 N	C (C5 H10 N)	11,06

Ergebnisse und Diskussion

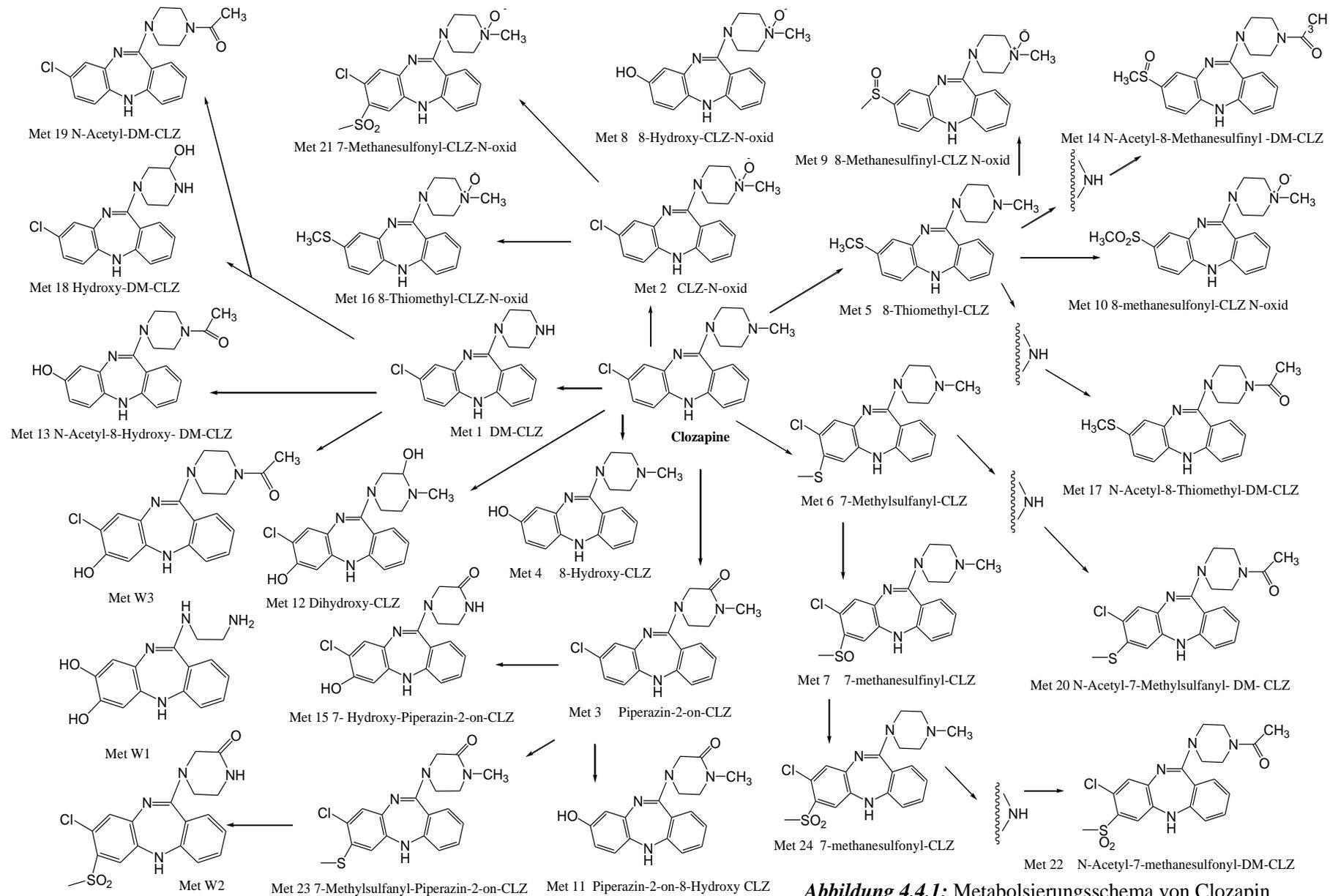


Abbildung 4.4.1: Metabolisierungsschema von Clozapin

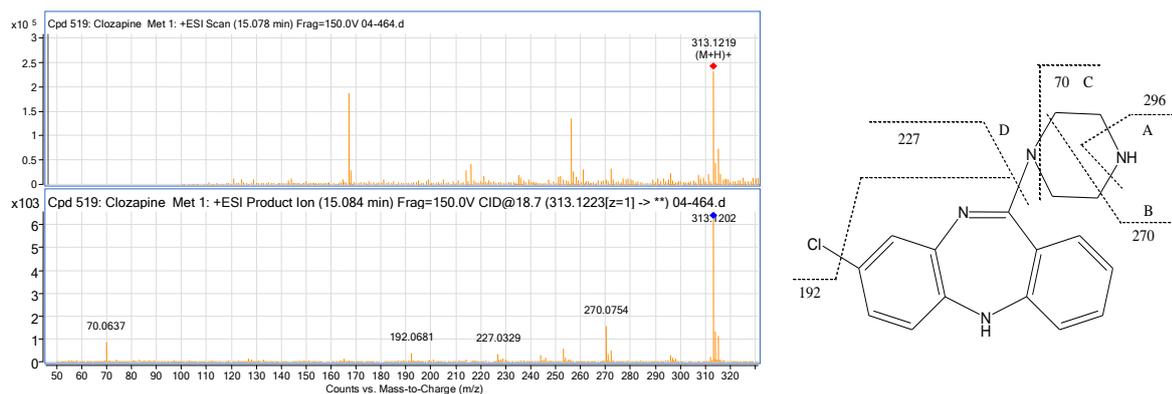


Abbildung 4.43: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Desmethylclozapin und Interpretation der Fragmentierung

Tabelle 4.43: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Desmethylclozapin

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
313,1215 [M+H] ⁺	C17 H18 Cl N4	Desmethylclozapin + H	1,57
296,0979	C17 H15 Cl N3	313 - A (17,0265 = H3N)	-10,12
270,0754	C15 H13 Cl N3	313 - B (43,0422 = C2H5N)	14,39
227,0329	C13 H8 Cl N2	313 - D (86,0844 = C4H10N2)	7,73
192,0681	C13 H8 N2	313 - D - Cl (121,0533 = C4H10ClN2)	0,43
70,0637	C4 H8 N	C (C4H8N)	20,35

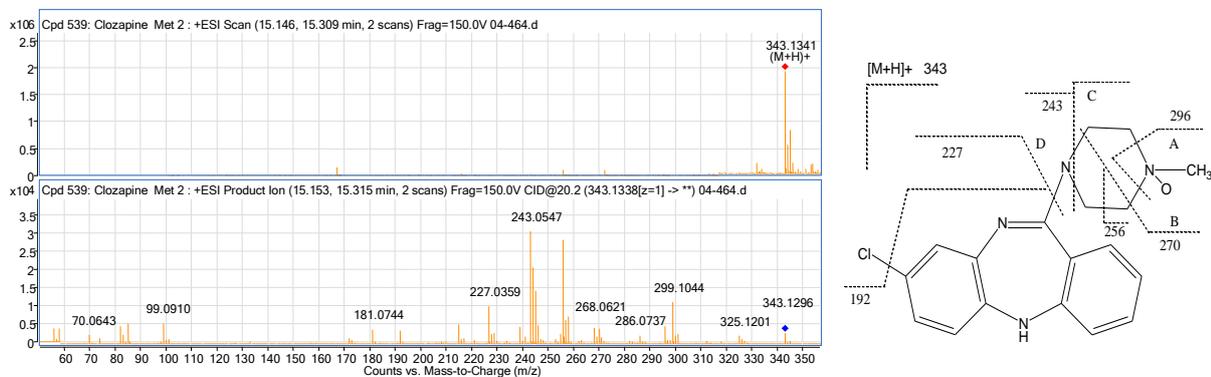


Abbildung 4.44: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Clozapin-N-oxid und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.44: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Clozapin-N-oxid

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
343,132 [M+H] ⁺	C18 H19 Cl N4 O	Clozapin N-oxid + H	5,7
296,0941	C17 H15 Cl N3	343 - A (47,0371=CH5NO)	2,66
270,0736	C15 H13 Cl N3	343 - B (73,0528=C3H7NO)	21
243,0547	C13 H10 Cl N3	343 - C (100,0762=C5H10NO)	4,65
227,0359	C13 H8 Cl N2	343 - D (116,095=C5H12N2O)	5,03
192,0668	C13 H8 N2	343 - D - Cl (151,0638=C5H12ClN2O)	7,03

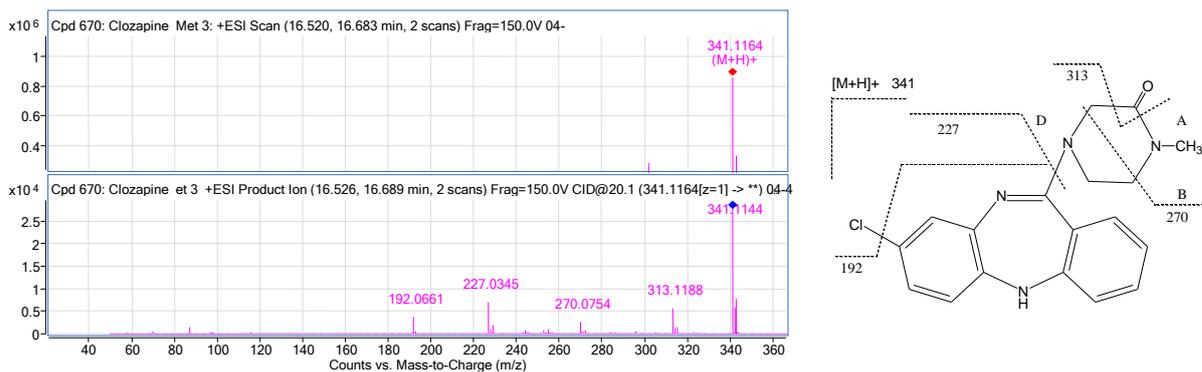


Abbildung 4.45: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Piperazin-2-on-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.45: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Piperazin-2-on-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
341,1164 [M+H] ⁺	C18 H18 Cl N4 O	Piperazin-2-on-CLZ + H	0,51
313,1188	C17 H18 Cl N4	341 - CO (27,9949=C O)	8,05
270,0754	C15 H13 Cl N3	341 - B (71,0371=C3 H5 N O)	14,38
227,0345	C13 H8 Cl N2	341 - D (114,0793=C5 H10 N2 O)	11,27
192,0661	C13 H8 N2	341 - D - Cl (149,0482=C5 H10 Cl N2 O)	10,85

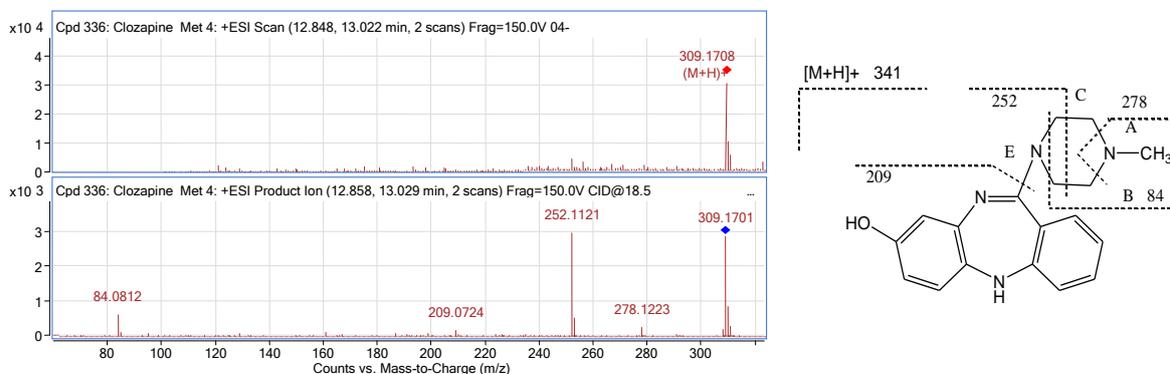


Abbildung 4.46: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 8-Hydroxy-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.46: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Hydroxy-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
309,171 [M+H] ⁺	C18 H21 N4 O	8-Hydroxy-CLZ + H	1,25
278,1223	C17 H16 N3 O	309 - A (31,0422=C H5 N)	23,39
252,1121	C15 H14 N3 O	309 - C (57,0578=C3 H7 N)	4,22
209,0724	C13 H9 N2 O	309 - E (100,1=C5 H12 N2)	-6,84
84,0812	C5 H10 N	C (C5 H10 N)	-5,34

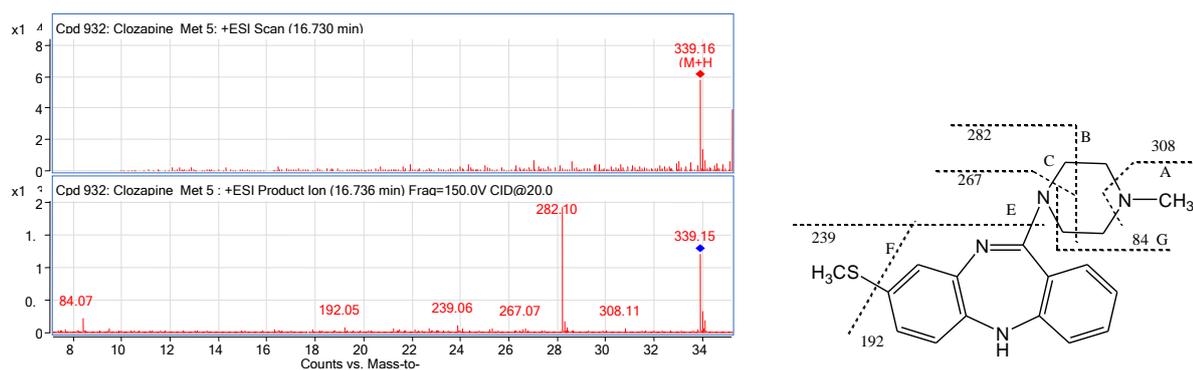


Abbildung 4.4.7: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 8-Methylthio-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.7: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Methylthio-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
339,1638 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ N ₄ S	8-Methylthio-CLZ + H	5,46
308,1175	C ₁₈ H ₁₈ N ₃ S	339 - A (31,0422=C H ₅ N)	13,22
282,1036	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ S	339 - B (57,0578=C ₃ H ₇ N)	8,28
267,0755	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ S	339 - C (72,0813=C ₄ H ₁₀ N)	26,13
239,0693	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ S	339 - E (100,1=C ₅ H ₁₂ N ₂)	23,34

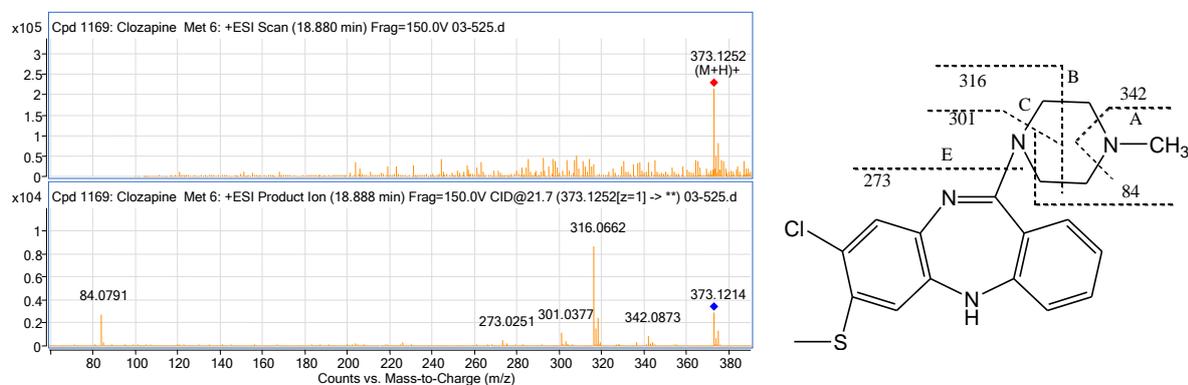


Abbildung 4.4.8: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 7-Methylthio-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.8: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 7-Methylthio-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
373,1248 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ Cl N ₄ S	7-Methylthio-CLZ + H	1,2
342,0873	C ₁₈ H ₁₇ Cl N ₃ S	373 - A (31,0422=C H ₅ N)	-13,74
316,0662	C ₁₆ H ₁₅ Cl N ₃ S	373 - B (57,0578=C ₃ H ₇ N)	2,47
301,0377	C ₁₅ H ₁₂ Cl N ₃ S	373 - C (72,0813=C ₄ H ₁₀ N)	19,16
273,0251	C ₁₄ H ₁₀ Cl N ₂ S	373 - E (100,1=C ₅ H ₁₂ N ₂)	-1,03

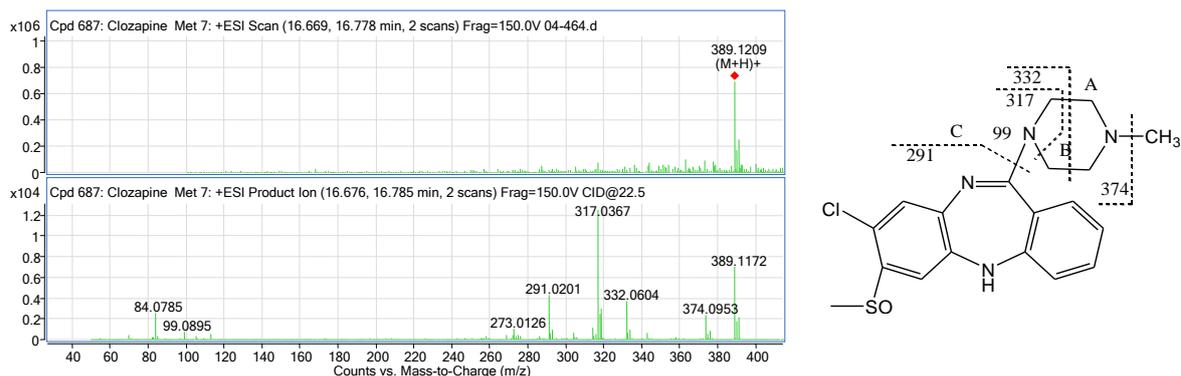


Abbildung 4.4.9: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 7-Methylsulfinyl-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.9: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 7-Methylsulfinyl-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
389,1197 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ Cl N ₄ O S	7-Methanesulfinyl-CLZ + H	3,86
374,0953	C ₁₈ H ₁₉ Cl N ₄ O S	389 – CH ₃ (15,0235=C H ₃)	2,61
332,0604	C ₁₆ H ₁₅ Cl N ₃ O S	389 - A (57,0578=C ₃ H ₇ N)	4,35
317,0367	C ₁₅ H ₁₂ Cl N ₃ O S	389 – B (72,0813=C ₄ H ₁₀ N)	5,27
291,0201	C ₁₃ H ₁₀ Cl N ₃ O S	389 – E (98,097=C ₆ H ₁₂ N)	9,05
99,0895	C ₅ H ₁₁ N ₂	C = C ₅ H ₁₁ N ₂	22,09

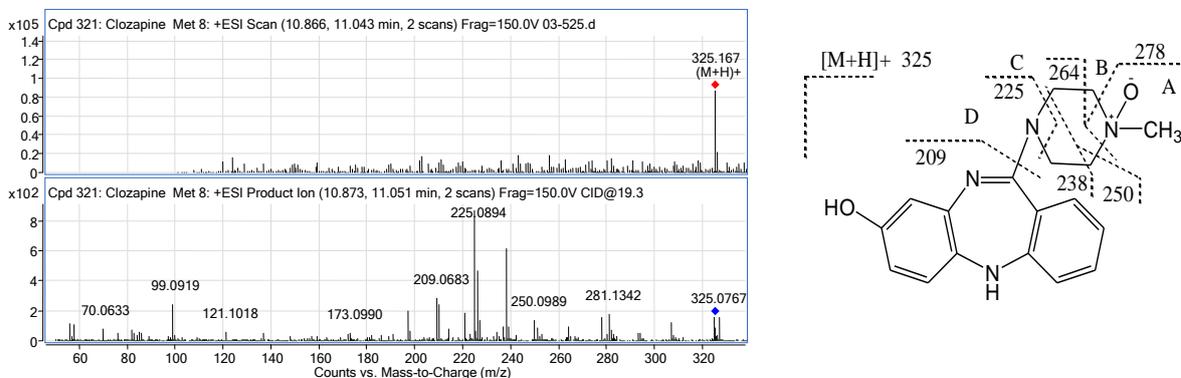


Abbildung 4.4.10: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 8-Hydroxy-CLZ-N-oxid und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.10: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Hydroxy-CLZ-N-oxid.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
325,1659 [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₁ N ₄ O ₂	8-Hydroxy-CLZ N-oxid + H	3,16
278,1256	C ₁₇ H ₁₆ N ₃ O	325 - A (47,0371=C H ₅ N O)	11,36
238,0964	C ₁₄ H ₁₂ N ₃ O	325 – (87,0684=C ₄ H ₉ N O)	4,51
225,0894	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O	325 – C (100,0762=C ₅ H ₁₀ N)	1,11
209,0683	C ₁₃ H ₉ N ₂ O	325 – D (116,095=C ₅ H ₁₂ N ₂ O)	-12,44

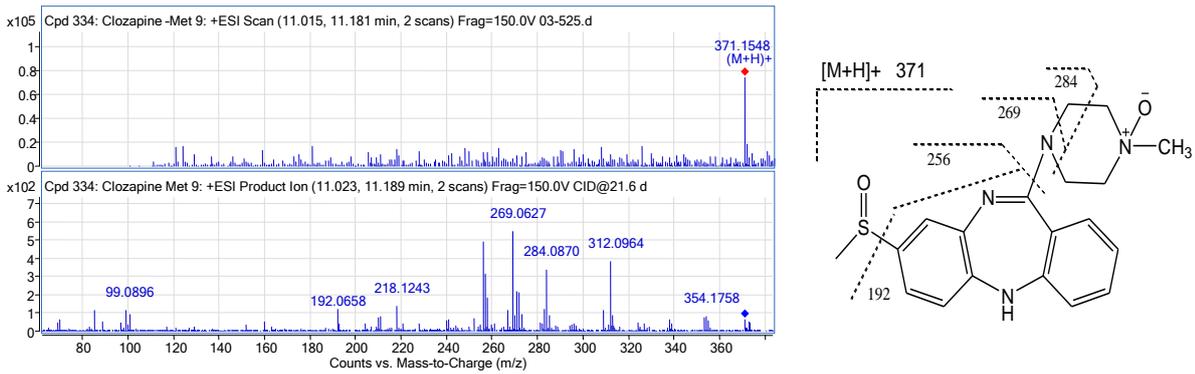


Abbildung 4.4.11: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten 8-Methylsulfinyl-CLZ-N-oxid und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.11: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Methylsulfinyl-CLZ-N-oxid.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
371,1536 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ N ₄ O ₂ S	8-Methylsulfinyl -CLZ-N-oxid + H	3,47
284,087	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O S	371 - (87,0684=C ₄ H ₉ N O)	-6,19
269,0627	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O S	371 - (102,0919=C ₅ H ₁₂ N O)	-3,69
256,0538	C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O S	371 - (115,0997=C ₆ H ₁₃ N O)	0,51
	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O S		---
192,0658	C ₁₃ H ₈ N ₂	371 - (179,0854=C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂ S)	12,45

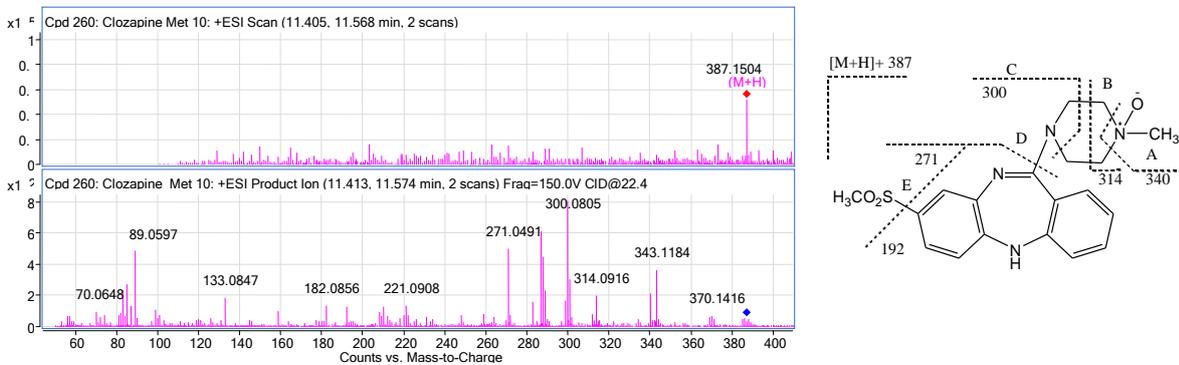


Abbildung 4.4.12: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten 8-Methylsulfonyl-CLZ-N-oxid und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.12: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Methylsulfonyl-CLZ-N-oxid

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
387,1485 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ N ₄ O ₃ S	8-Methylsulfonyl -CLZ N-oxid + H	4,49
340,1131	C ₁₈ H ₁₈ N ₃ O ₂ S	387 - A (47,0371=C ₅ H ₅ N O)	-4,83
314,0916	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₂ S	387 - B (73,0528=C ₃ H ₇ N O)	13,37
300,0805	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₂ S	387 - C (87,0684=C ₄ H ₉ N O)	-1,25
271,0491	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₂ S	387 - D (116,095=C ₅ H ₁₂ N ₂ O)	16,37
192,0714	C ₁₃ H ₈ N ₂	387 - D - E (195,0803=C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₃ S)	-16,78

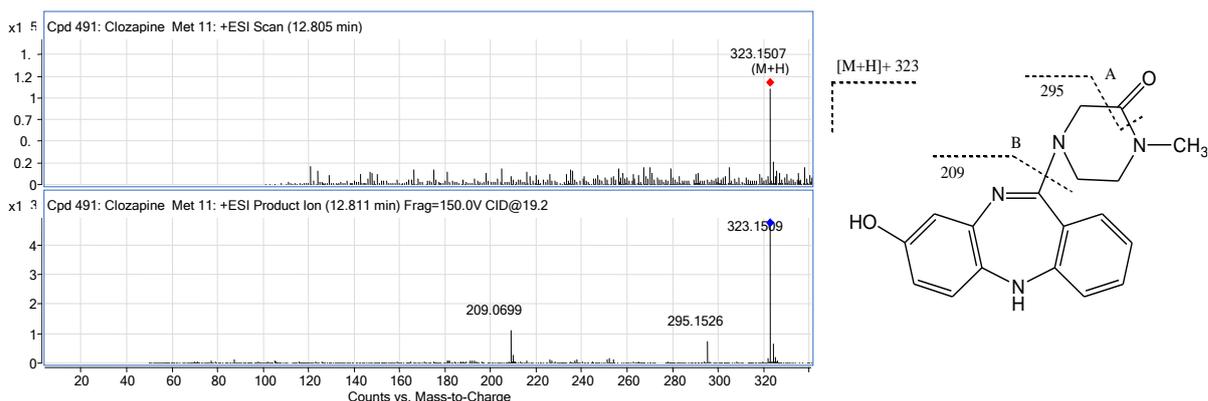


Abbildung 4.4.13: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Piperazin-2-on-8-hydroxy-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.13: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Piperazin-2-one-8-hydroxy-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
323,1503 [M+H] ⁺	C18 H19 N4 O2	Piperazin-2-on- 8-hydroxy CLZ + H	1,43
295,1526	C17 H19 N4 O	323 - A (27,9949=C O)	9,27
209,0699	C13 H9 N2	323 - B (114,0793=C5 H10 N2 O)	5,15

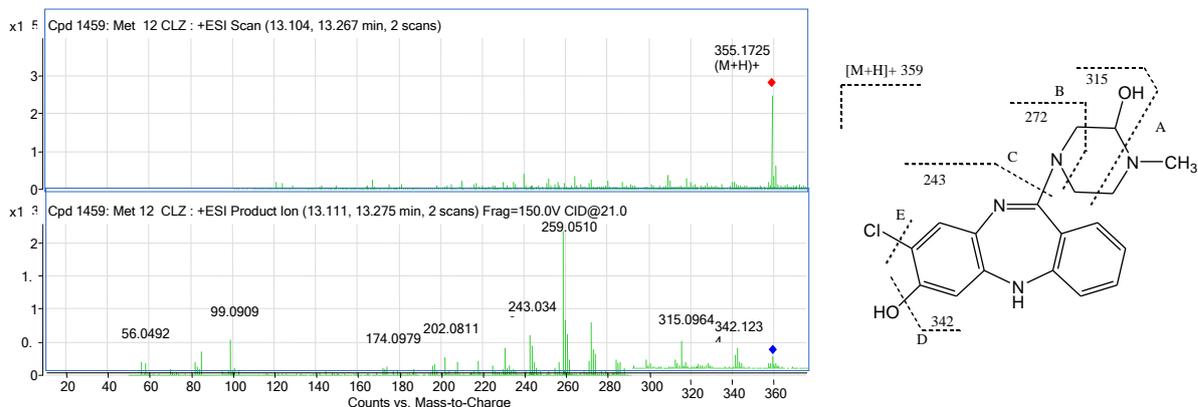


Abbildung 4.4.14: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Dihydroxy-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.14: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Dihydroxy-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
359,1269 [M+H] ⁺	C18 H20 Cl N4 O2	Dihydroxy CLZ + H	5,35
342,1234	C18 H19 Cl N4 O	359 - D (17,0027=HO)	2,27
315,0964	C16 H16 Cl N4 O	359 - A (44,0262=C2H4O)	13,57
272,057	C14 H11 Cl N3 O	359 - B (87,0684=C4 H9NO)	5,5
243,0346	C13 H8 Cl N2 O	359 - C (116,095=C5H12N2O)	-10,69
208,0618	C13 H8 N2 O	359 - C - E (151,0638=C5H12Cl N2O)	6,48

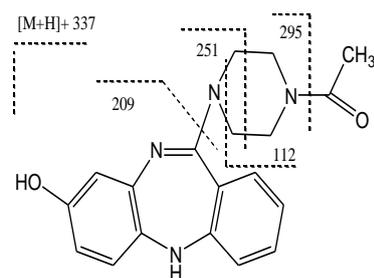
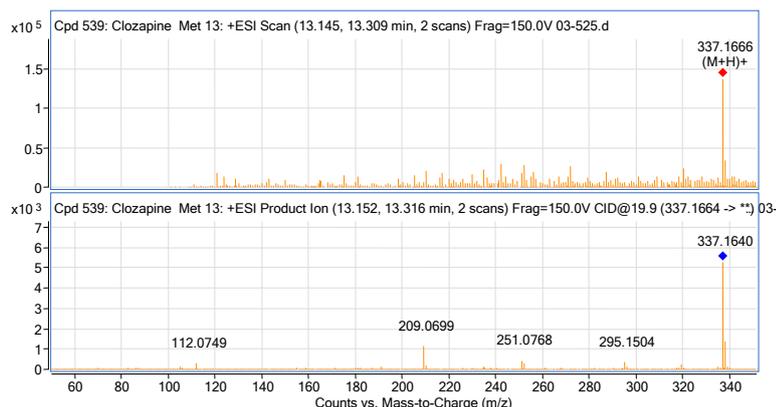


Abbildung 4.4.15: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-8-hydroxy-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.4.15: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von N-Acetyl-8-hydroxy-DM-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
337,1659 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₁ N ₄ O ₂	N-Acetyl- 8-hydroxy- DM-CLZ + H	1,92
295,1504	C ₁₇ H ₁₉ N ₄ O	337 - (42,0106=C ₂ H ₂ O)	16,75
251,0768	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O	---	---
209,0699	C ₁₃ H ₉ N ₂ O	337 - (128,095=C ₆ H ₁₂ N ₂ O)	4,49
112,0749	C ₆ H ₁₀ N O	337 - C (225,0902=C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O)	7,4

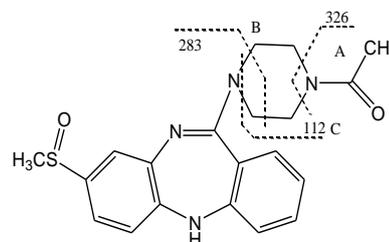
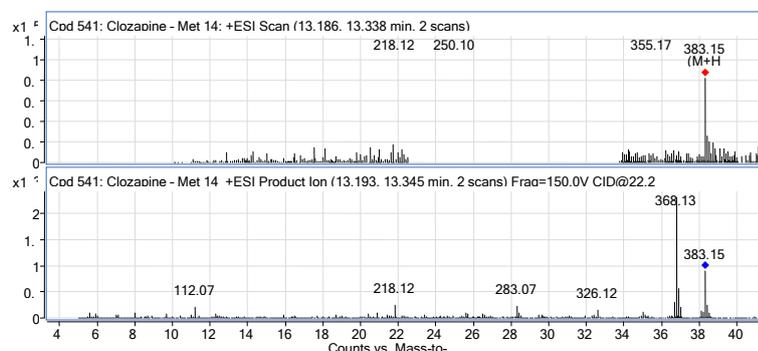


Abbildung 4.4.16: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-8-methylsulfinyl-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.4.16: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Acetyl-8-methylsulfinyl-DM-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
383,1536 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₃ N ₄ O ₂ S	N-Acetyl-8-methylsulfinyl-DM-CLZ + H	6,97
326,1207	C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O S	---	---
283,0732	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O S	383 - (100,0762=C ₅ H ₁₀ N O)	14,87

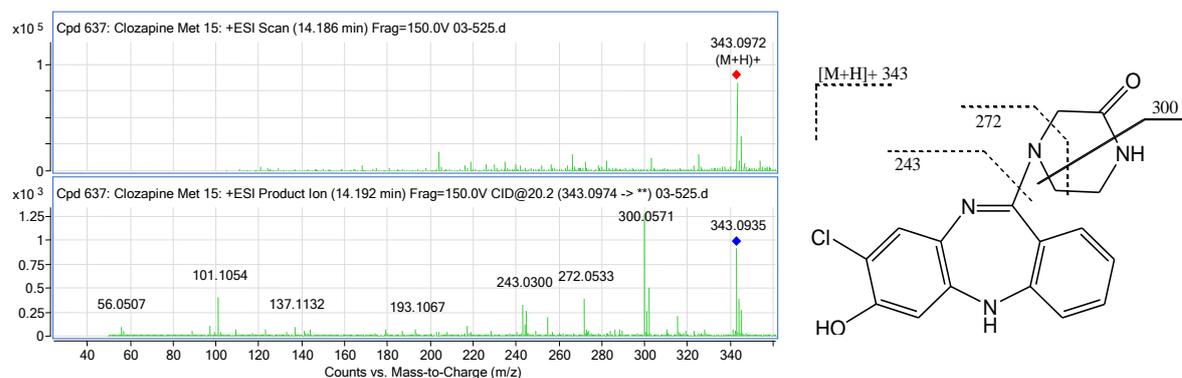


Abbildung 4.4.17: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 7-Hydroxy- piperazin-2-on-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.17: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 7- Hydroxy-piperazin-2-one-CLZ

Charakteristische m/z- Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
343,0956 [M+H] ⁺	C17 H16 Cl N4 O2	7- Hydroxy - piperazin-2-on-CLZ + H	4,69
300,0571	C15 H11 Cl N3 O2	343 - (43,0422=C2 H5 N)	-12,26
272,0533	C14 H11 Cl N3 O	343 - (71,0371=C3 H5 N O)	19,34
243,03	C13 H8 Cl N2 O	343 - (100,0637=C4 H8 N2 O)	7,9

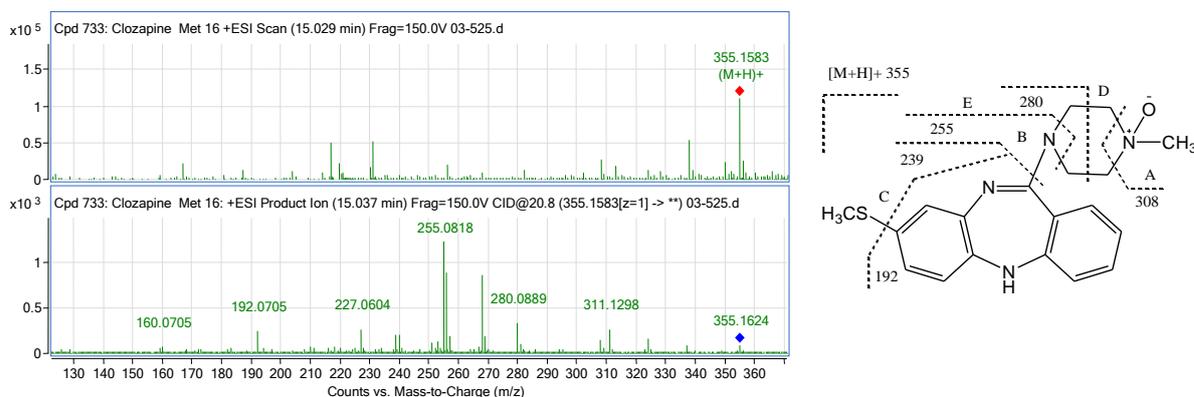


Abbildung 4.4.18: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 8-Methylthio-CLZ-N-oxid und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.4.18: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 8-Methylthio-CLZ-N-oxid

Charakteristische m/z- Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
355,1587 [M+H] ⁺	C19 H23 N4 O S	8-Methylthio-CLZ-N-oxid + H	0,94
308,1215	C18 H18 N3 S	355 - A (47,0371=C H5 N O)	0,15
280,0889	C16 H14 N3 S	355 - D (75,0684=C3 H9 N O)	4,96
255,0818	C14 H13 N3 S	355 - E (100,0762=C5 H10 N O)	16,84
239,0611	C14 H11 N2 S	355 - B (116,095=C5 H12 N2 O)	2,72
192,0705	C13 H8 N2	355 - C (163,0905=C6 H15 N2 O S)	-11,85

Ergebnisse und Diskussion

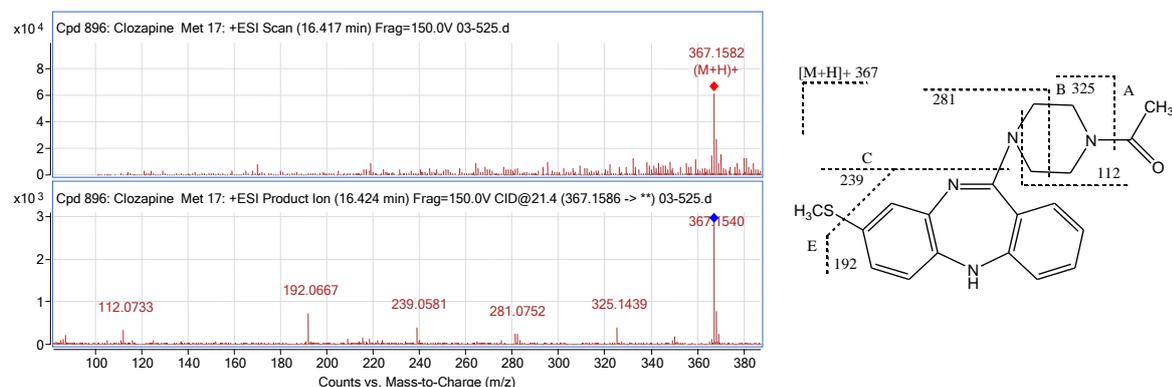


Abbildung 4.4.19: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-8-methylthio-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.19: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von N-Acetyl-8-methylthio-DM-CLZ

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
367,1587 $[M+H]^+$	C ₂₀ H ₂₃ N ₄ O S	N-Acetyl-8-methylthio-DM-CLZ + H	1,28
325,1439	C ₁₈ H ₂₁ N ₄ S	367 - A (42,0106=C ₂ H ₂ O)	12,98
281,0752	C ₁₆ H ₁₃ N ₂ O S	367 - B (86,0844=C ₄ H ₁₀ N ₂)	-3,09
239,0581	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ S	367 - C (128,095=C ₆ H ₁₂ N ₂ O)	23
192,0667	C ₁₃ H ₈ N ₂	367 - E (175,0905=C ₇ H ₁₅ N ₂ O S)	-7,59

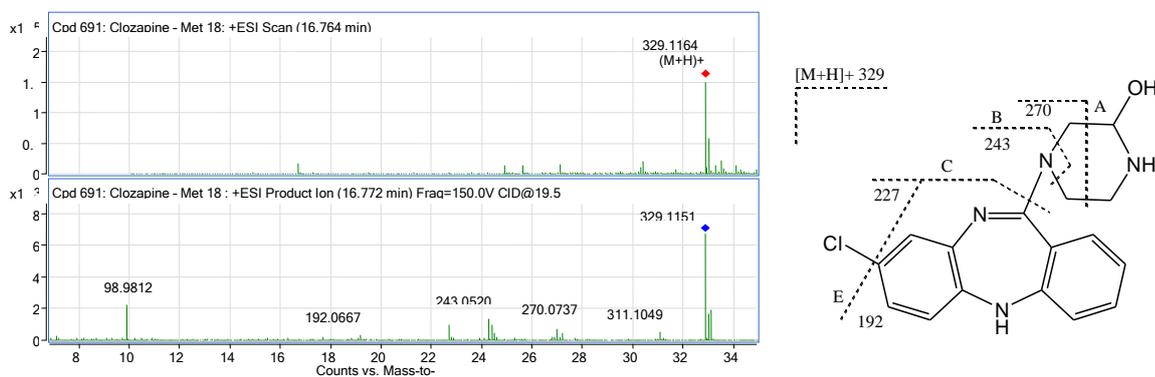


Abbildung 4.4.20: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Hydroxy-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.4.20: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von Hydroxy-DM-CLZ

Charakteristische m/z -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
329,1164 $[M+H]^+$	C ₁₇ H ₁₈ Cl N ₄ O	Hydroxy-DM-CLZ + H	3,57
311,1049	C ₁₇ H ₁₆ Cl N ₄	329 - H ₂ O (18,0106=H ₂ O)	2,87
270,0737	C ₁₅ H ₁₃ Cl N ₃	329 - A (59,0371=C ₂ H ₅ N O)	20,48
243,052	C ₁₃ H ₁₀ Cl N ₃	329 - B (86,0606=C ₄ H ₈ N O)	15,63
227,0373	C ₁₃ H ₈ Cl N ₂	329 - C (102,0793=C ₄ H ₁₀ N ₂ O)	-1,01
192,0667	C ₁₃ H ₈ N ₂	329 - C - E (137,0482=C ₄ H ₁₀ Cl N ₂ O)	7,85

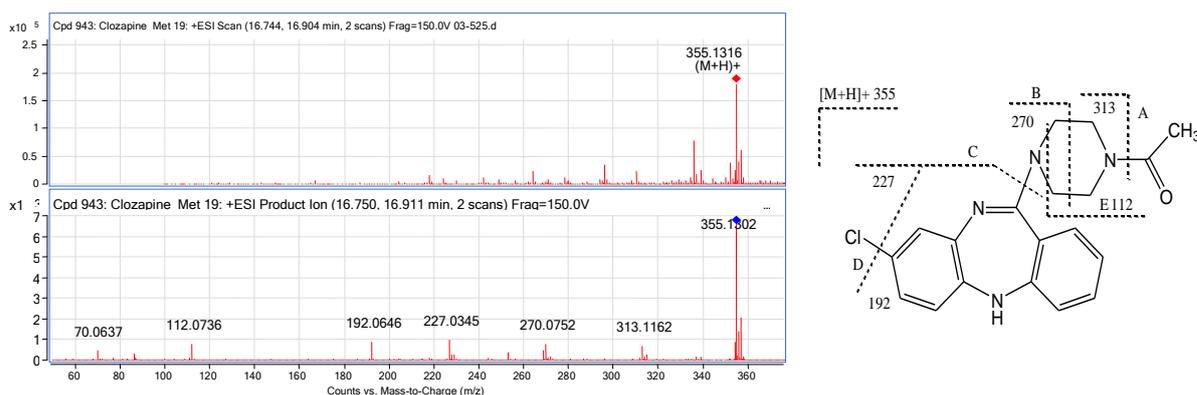


Abbildung 4.421: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.421: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von N-Acetyl-DM-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
355,132 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₀ Cl N ₄ O	N-Acetyl-DM-CLZ + H	1,1
313,1162	C ₁₇ H ₁₈ Cl N ₄	355 – A (42,0106=C ₂ H ₂ O)	16,79
270,0752	C ₁₅ H ₁₃ Cl N ₃	355 – B (85,0528=C ₄ H ₇ N O)	15,17
227,0345	C ₁₃ H ₈ Cl N ₂	355 – C (128,095=C ₆ H ₁₂ N ₂ O)	11,42
192,0646	C ₁₃ H ₈ N ₂	355 – C - D (163,0638=C ₆ H ₁₂ Cl N ₂ O)	18,72

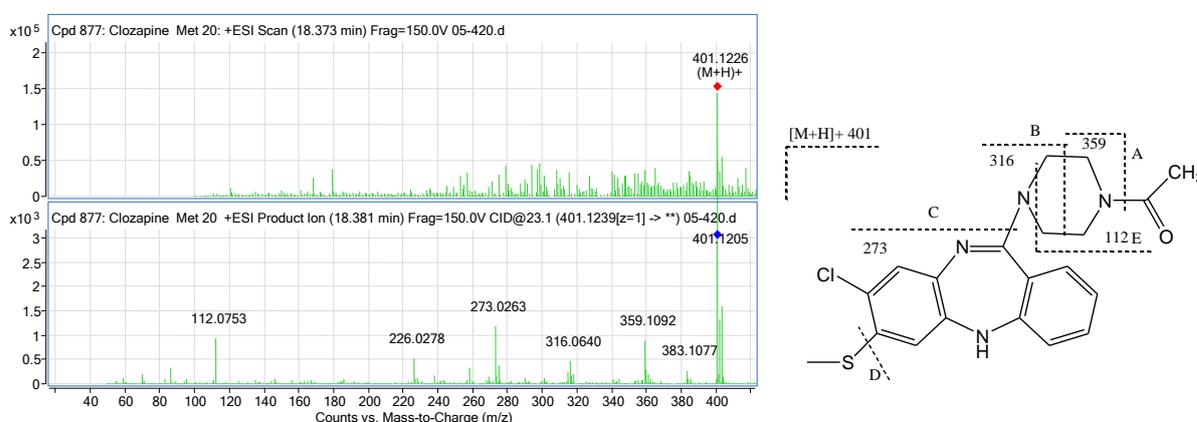


Abbildung 4.422: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-7-methylthio-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.422: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von N-Acetyl-7-methylthio-DM-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
401,1197 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₂ Cl N ₄ O S	N-Acetyl 7-methylthio-DM- CLZ + H	7,00
383,1077	C ₂₀ H ₂₀ Cl N ₄ S	401 – (18,0106=H ₂ O)	3,78
359,1092	C ₁₈ H ₂₀ Cl N ₄ S	401 – A (42,0106=C ₂ H ₂ O)	-0,12
316,064	C ₁₆ H ₁₅ Cl N ₃ S	401 – B (85,0528=C ₄ H ₇ N O)	9,41
273,0263	C ₁₄ H ₁₀ Cl N ₂ S	401 – C (128,095=C ₆ H ₁₂ N ₂ O)	-5,71
226,0278	C ₁₃ H ₇ Cl N ₂	401 – C – D (175,0905=C ₇ H ₁₅ N ₂ O S)	6,49
112,0753	C ₆ H ₁₀ N O	E	3,92

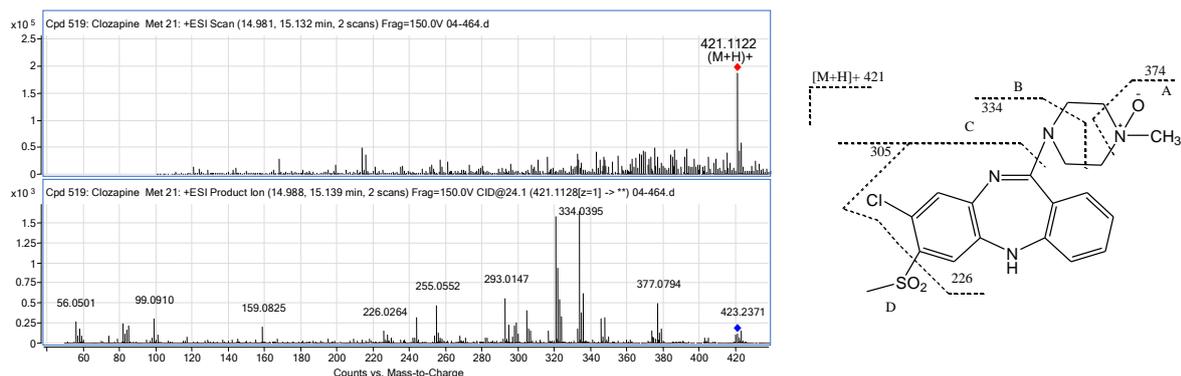


Abbildung 4.423: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 7-Methylsulfonyl-CLZ-N-oxid und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.423: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von 7-methanesulfonyl-CLZ-N-oxid

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
421,1096 [M+H] ⁺	C19 H22 Cl N4 O3 S	7-methylsulfonyl-CLZ- N-oxid + H	6,63
374,0728	C18 H17 Cl N3 O2 S	421 – A (47,0371=C H5 N O)	-0,9
334,0395	C15 H13 Cl N3 O2 S	421 – B (87,0684=C4 H9 N O)	5,01
305,0105	C14 H10 Cl N2 O2 S	421 – C (116,095=C5 H12 N2 O)	13,49
226,0264	C13 H7 Cl N2	421 – C – D (195,0803=C6 H15 N2 O3 S)	12,6

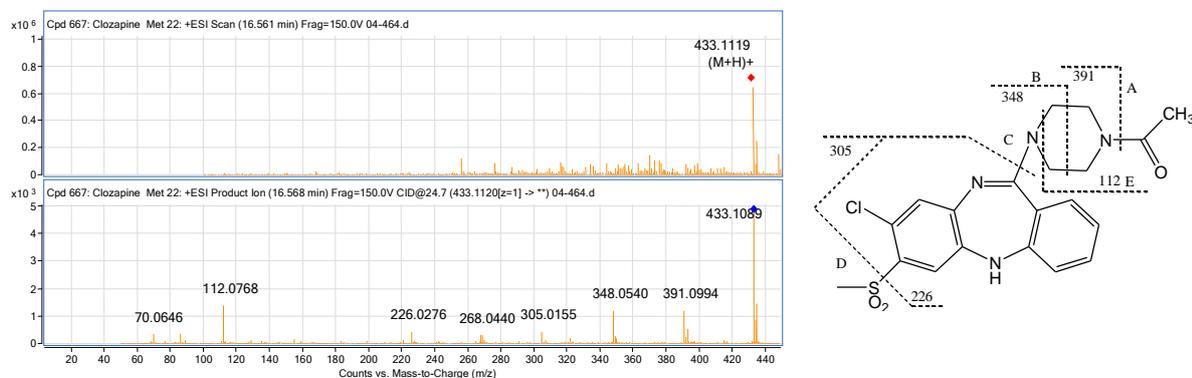


Abbildung 4.424: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem N-Acetyl-7-methylsulfonyl-DM-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.424: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation der Fragmente von N-Acetyl-7-methylsulfonyl-DM-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
433,1096 [M+H] ⁺	C20 H22 Cl N4 O3 S	N-Acetyl-7-methanesulfonyl-CLZ + H	6,65
391,0994	C18 H20 Cl N4 O2 S	433 – A (42,0106=C2 H2 O)	-0,9
348,054	C16 H15 Cl N3 O2 S	433 – B (85,0528=C4 H7 N O)	8,08
305,0155	C14 H10 Cl N2 O2 S	433 – C (128,095=C6 H12 N2 O)	-2,97
226,0276	C13 H7 Cl N2	433 – C – D (207,0803=C7 H15 N2 O3 S)	7,31

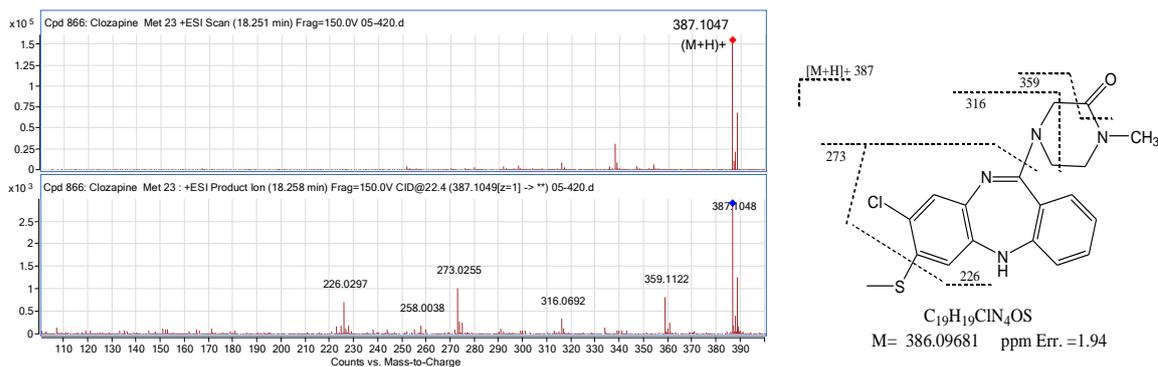


Abbildung 4.4.25: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem 7-Methylthio-piperazin-2-on-CLZ und Interpretation der Fragmentierung.

Tabelle 4.4.25: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von 7-Methylthio-piperazin-2-on-CLZ

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
387,1041 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₀ ClN ₄ O S	7-Methylsulfanyl- piperazin-2-on-CLZ + H	1,94
359,1122	C ₁₈ H ₂₀ ClN ₄ S	387 - (27,9949=C O)	-8,35
316,0692	C ₁₆ H ₁₅ ClN ₃ S	387 - (71,0371=C ₃ H ₅ N O)	-6,95
273,0255	C ₁₄ H ₁₀ ClN ₂ S	387 - (114,0793=C ₅ H ₁₀ N ₂ O)	-2,52
226,0297	C ₁₃ H ₇ ClN ₂	387 - (161,0749=C ₆ H ₁₃ N ₂ O S)	-2,1

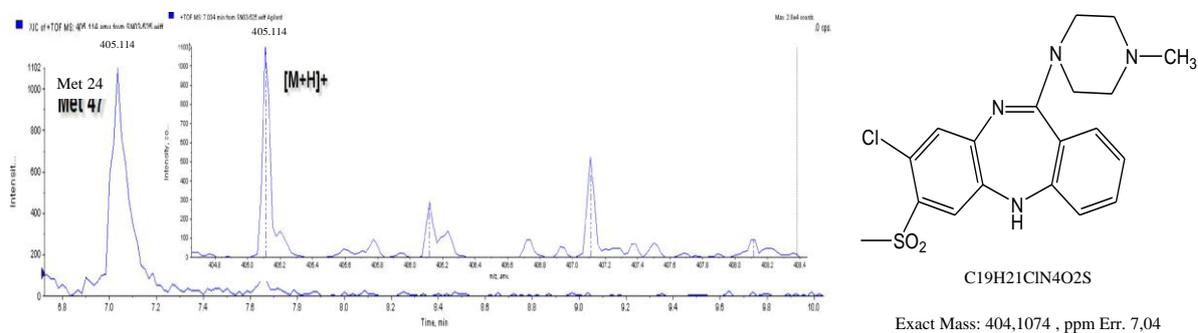


Abbildung 4.4.26: EIC und Isotopenverhältnis von 7-Methylsulfonyl-CLZ (Agilent ohne Fragmentation)

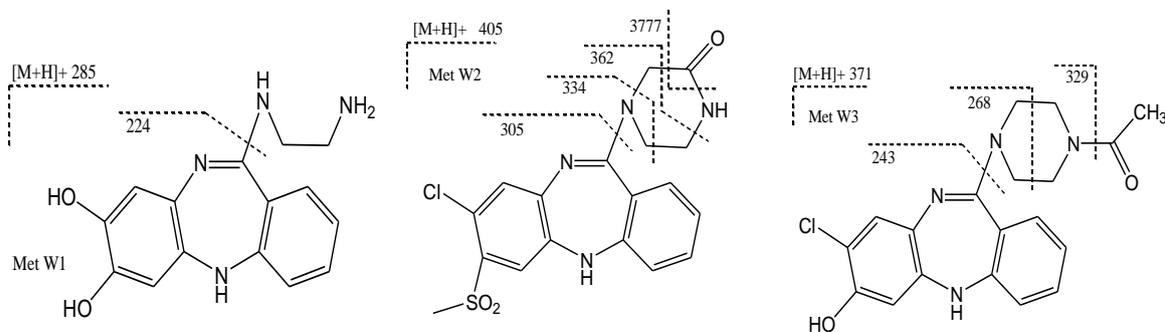


Abbildung 4.4.27: Mögliche Strukturinterpretation der Metabolite Met W1, Met W2 und Met W3

Tabelle 4.426: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met W1, Met W2 und Met W3

Metabolite	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente			
Met W1	C15 H17 N4 O2	285,1346	7,924	0,76	385	267	224	164
Met W2	C18H18ClN4O3S 7-Methylsulfonyl- piperazin-2-on-CLZ	405,0824	15,835	---	377	362	334	305
Met W3	C19H20ClN4O N-Acetyl-7-hydroxy CLZ	371,4354	15,097	4,34	329	268	243	

Mittels HPLC-DAD wurden zum Clozapin fünf Todesfälle und 19 Proben aus der Klinik untersucht. Die Analyse der Blut- und Leberproben ergab aufgrund der spektralen Ähnlichkeit mit der Ausgangssubstanz 5 Metabolisierungsprodukte, eines davon hatte eine kürzere und vier eine längere RT als das Clozapin (Tabelle 4.4.27). Da dieser Wirkstoff in der verwendeten mobilen Phase (pH 2,3) sowohl am Iminstickstoff als auch am p-ständigen Piprazinstickstoff protoniert ist, d.h. als Dikation vorliegt, besitzt er eine relativ kurze Retentionszeit.

Tabelle 4.427: Retentionszeitveränderungen durch Metabolisierung von Clozapin bei der HPLC-DAD

Metabolit	RRT	Q _{RRT}	Strukturvorschlag
CLZ	0,220	1	Clozapin
Met A	0,148	0,673	Desmethylclozapin
Met B	0,304	1,382	---
Met C	0,412	1,875	---
Met D	0,751	3,417	Clozapin N-oxid
Met E	0,936	4,265	Piperazin-2-one-CLZ

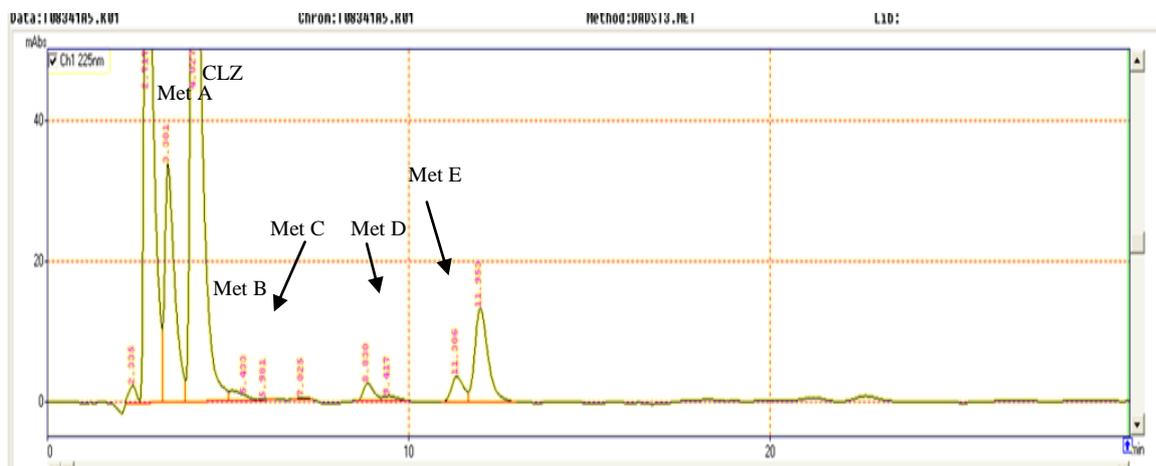


Abbildung 4.428: HPLC-Kurve eines alkalischen Blutextraktes einer Clozapin-Vergiftung

Es wurde versucht, durch Vergleich mit den LC/TOF/MS Ergebnissen, mit Hilfe der Retentionszeitveränderungen und der Ähnlichkeit der UV-Spektren mit dem des CLZ diese Metabolite zuordnen. Bei Met A mit $Q_{RRT} = 0,673$ handelt es sich um N-Desmethylclozapin, dieser Wert stimmt sehr gut mit den ermittelten Quotienten bei einer Methylabspaltung an Aminen in Modellverbindungen $Q_{C_{Met A}/C_{CLZ}} = 0,47-0,78$ überein [213].

Die längere Retentionszeit der Metabolite Met B, Met C, Met D und Met E könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Metabolisierung die Herausbildung des Dikations erschwert und damit die Retentionszeit verlängert wird. Hierfür kämen das N-Oxid (Met D) und die Piperazinonstruktur (Met E) in Frage, bei denen jeweils die Protonierung am 4-ständigen Piprazinstickstoff unterbunden ist und keine direkte Veränderung des Chromophoren erfolgt. Das N-Oxid sollte wegen der höheren Polarität die kürzere RT im Vergleich zur Säureamidstruktur aufweisen.

Der Austausch von Cl gegen OH sollte die Hydrophilie der entstehenden Verbindungen erhöhen und damit die RT verkürzen. Sowohl die OH-Gruppe als auch die S-CH₃-Gruppe am Aromaten sollten jedoch stärkere spektrale Veränderungen bewirken. Für das Met B und Met C konnten keine Strukturzuordnung getroffen werden.

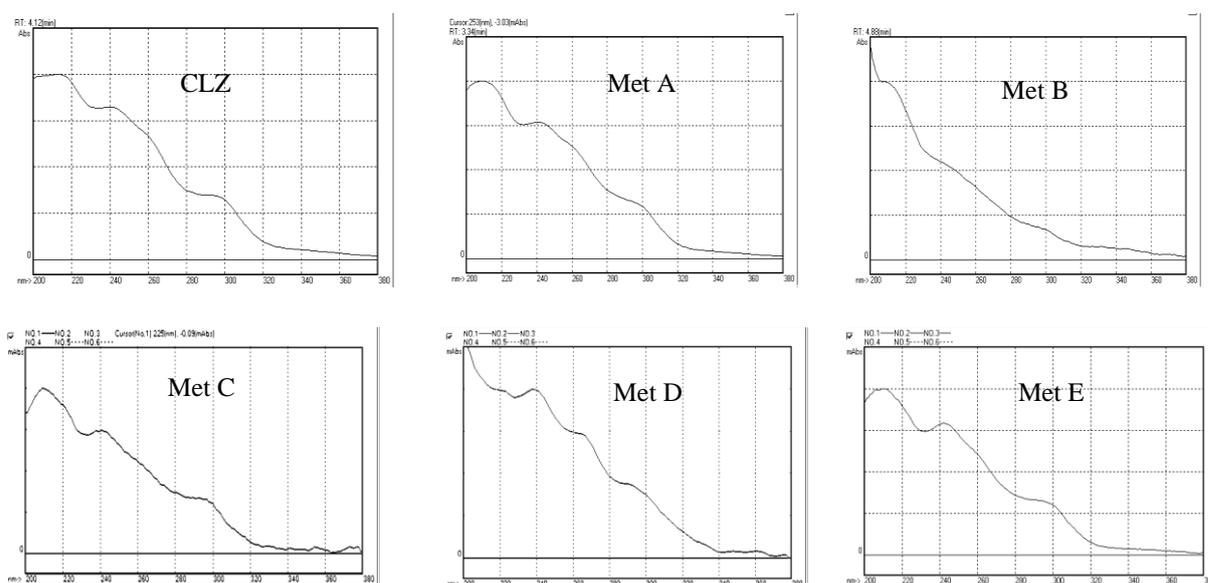


Abbildung 4.429: UV-Spektren von Clozapin und seinen im Blut nachweisbaren Metabolisierungsprodukten.

Wie in der Tabelle 4.4.29 ersichtlich ist, war der Hauptmetabolit Met A Desmethylclozapin in 11 Fällen nachweisbar, wobei die relative Konzentrationen $Q_{Met A} = C_{Met A}/C_{CLZ}$ von 0,02 bis 1,23 einen weiten Bereich überstreicht. Die höchste relative Konzentration des Metaboliten Met A war in den Fällen 1 und 7 nachweisbar, es handelt sich hierbei um eine therapeutische

Dosierung über einen längeren Zeitraum. Die andere Metabolite wurden hingegen nur in 5 oder 6 Fällen gefunden.

Tabelle 4.4.28: Blutkonzentration C in $\mu\text{g/mL}$ bei 12 Todesfällen mit positivem Clozapinbefund. Met A = Desmethylclozapin.

Fall	C _{CLZ}	C _{Met A}	C _{Met B}	C _{Met C}	C _{Met D}	C _{Met E}	Bemerkung
1	0,13	0,16	0	0	0	0	therapeutischer Bereich
2	0,71	0,28	0	0	0,05	0	therapeutischer Bereich
3	1,93	0,63	0,01	0,015	0,04	0,03	akute Intoxikation mit dem Clozapin
4	2,23	0,50	0,02	0	0	0	letal, kombinierte Intoxikation mit Clozapin und Salicylsäure
5	0,03	0	0	0	0	0	therapeutischr Dosierung
6	15,8	9,09	0,09	0	0,02	0,02	letal, Intoxikation mit Clozapin
7	0,13	0,16	0	0,01	0	0,005	therapeutischer Bereich
8	0,10	0,03	0	0	0	0	Mischintoxikation, therap, Bereich
9	4,62	1,64	0,23 _L	0,02	0,01	0,2 _L	akute Mischintoxikation CLozapin - Amitriptylin
10	1,23	0,27	0	0,014	0,01	0,01	letal, Venlafaxin-Clozapin-Chloralhydrat - Mischintoxikation
11	2,58	1,51	0,12 _L	0,04	0,09	0,03 _L	letal, kombinierte Intoxikation mit Clozapin und Diazepam
12	0,53	0,04	0	0	0	0	therapeutischer Bereich

* L Leberkonzentration

Der therapeutische Wirkstoffspiegel im Blut liegt nach Literaturangaben und eigenen zurückliegenden Untersuchungen im Bereich von 0,1 bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$ [215,216]. Die im Blut der Fällen 1, 2, 5, 7, 8 und 12 gemessene Clozapin-Konzentration und die Konzentration des pharmakologisch aktiven Metaboliten Desmethylclozapin liegen nach Vergleich mit Literaturdaten und früher bei uns analysierten Fällen im therapeutischen Bereich. Hierdurch wird die Einnahme eines clozapinhaltigen Medikamentes in therapeutischer Dosierung belegt. Der Betroffenen sollten dadurch aus toxikologischer Sicht in seiner Handlungs- und Reaktionsfähigkeit nicht beeinträchtigt gewesen sein.

Bei der Fällen 3 und 10 liegen deutlich höherer Konzentrationen als bei therapeutisch verordneter Dosierung vor, und bei den Fällen 4, 6, 9 und 11 liegen sie im Bereich der Werte, bei denen bereits letale Clozapin-Vergiftungen beschrieben werden (letale Clozapin-Konzentrationen: 1,2 – 13 $\mu\text{g/ml}$; im Mittel 5,5 $\mu\text{g/ml}$) [215,216]. Hierdurch wird die Einnahme einer deutlich größeren als der therapeutisch vorgesehenen Menge eines clozapinhaltigen Medikamentes belegt.

4.5 Diphenhydramin

Diphenhydramin (DPH) ist ein Arzneistoff aus der Klasse der Antihistaminika, der früher zur Therapie von Allergien verwendet wurde, wegen seiner stark sedativen Wirkung aber heute fast nur noch gegen Schlaflosigkeit und bei Übelkeit eingesetzt wird. Diphenhydramin hemmt als Antagonist die Wirkung von Histamin an H_1 -Rezeptoren. Auf Grund dieser Wirkung können bei einer therapeutischen Dosierung von 25 - 50 mg antiallergische, antiemetische und sedierende Effekte beobachtet werden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 5-6 Stunden.

Der Metabolismus von DPH ist seit einiger Zeit bekannt (Abbildung 4.5.1 [42,228-230]). DPH metabolisiert über einen umfangreichen oxidativen Stoffwechsel durch N-Demethylierung zum sekundären Amin (Nordiphenhydramin, Desmethyl-diphenhydramin, DM-DPH) und anschließend zum primären Amin (Dinordiphenhydramin, DDM-DPH). Beide werden im Urin ausgeschieden.

DPH, DM-DPH und DDM-DPH werden durch Desaminierung und Oxidation zur Diphenylmethoxyessigsäure (DPS) weiter umgesetzt, die mit Glycin oder Glutaminamid konjugiert, um ausgeschieden zu werden. Ein weiterer metabolischer Schritt von DPH ist die Biotransformation zum N-oxid (DPH-NO).

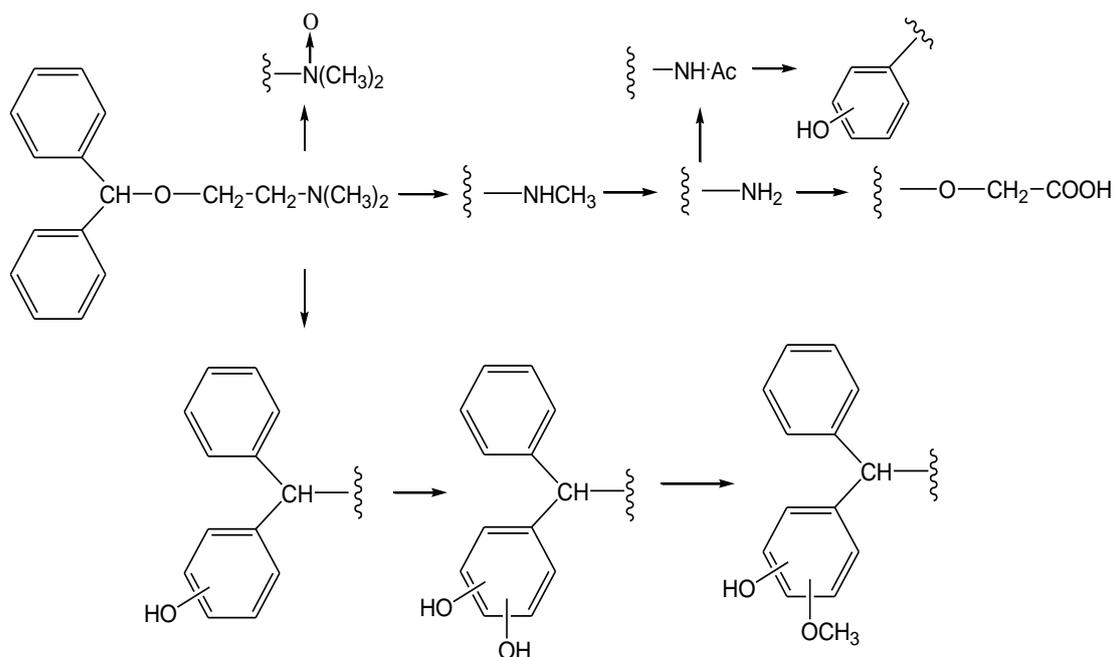


Abbildung 4.5.1: Metabolisierungsschema von Diphenhydramin

Mittels HPLC-DAD wurden von insgesamt 130 DPH-Intoxikationen (70 überlebte Vergiftungen und 60 Todesfälle) Blut- und Leberproben und mittels LC-MS-TOF 35 Blutproben untersucht.

Mit der LC-MS-TOF wurden durch die genauen Massen (Feinmassen), die Fragmentationen und die Isotopenverhältnisse neun Metaboliten neben der Muttersubstanz nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.1 und in den nachfolgenden Diagrammen zusammen gefasst.

Tabelle 4.5.1: Nachweis von Diphenhydramin und seinen Metabolite in Vergiftungsfällen durch LC-TOF-MS

Metabolit	Masse	Summenformel	Häufigkeit/ Ionisation	RT, min	Q _{RT}	Error, ppm
Diphenylhydramin (M)	255,1623143	C ₁₇ H ₂₁ NO	35 Pos	7,1	1	0
DM-DPH (M-14)	241,1466642	C ₁₆ H ₁₉ NO	30 Pos	6,97	0,9914	0
DDM-DPH (M-28)	227,1310142	C ₁₅ H ₁₇ NO	3 Pos	6,95	0,9802	-3
DPS (M-13)	242,0942943	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	8 Neg	8,18	1,1602	1
DPH-NO (M+16)	271,1572289	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	30 Pos	7,19	1,0126	1
OH-DPH (M+16)	271,1572289	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	20 Pos	6,74	0,9492	1
2OH-DPH (M+32)	287,1521435	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	9 Pos	6,8	0,9614	2
OH- OCH ₃ -DPH (M+46)	301,1677936	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	13 Pos	6,8	0,9458	2
N-Ac-DPH (M+42)	269,1415789	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	17 Pos	8,3	1,1855	2
OH- N-Ac-DPH (M+60)	285,1364935	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	12 Pos	8,7	1,2288	1

Abbildung 4.5.2 zeigt das mit dem Waters-Gerät gemessene „extracted-ion-chromatogramm“ von Diphenhydramin.

Das Spektrum F1 wurde ohne Fragmentierung mit einer Cone-Spannung von 10 V aufgenommen, während im Spektrum F2 bei einer Cone-Spannung von 50 V eine deutliche Fragmentierung sichtbar wird. Wiederum mit Hilfe der genauen Massen lassen sich die einzelnen Fragmente strukturell zuordnen, wie das Fragmentierungsschema anhand der Strukturformel in Abbildung 4.5.3 zeigt.

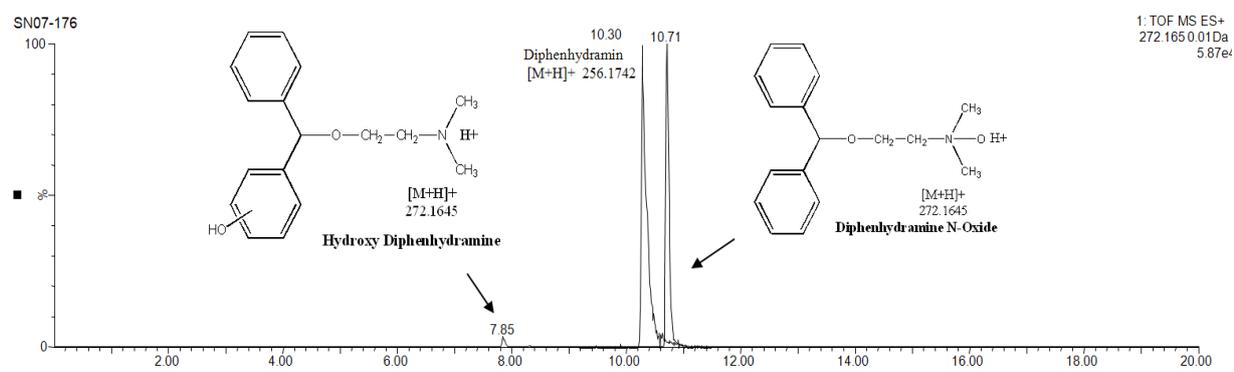


Abbildung 4.5.2: Mit dem Waters-Gerät gemessenes „extracted-ion-chromatogramm“ von Diphenhydramin sowie dem Hydroxy- und dem N-Oxid Metaboliten.

Tabelle 4.5.2: Charakteristische Fragmente von Diphenhydramin und seinen Metaboliten

Metabolit	Masse	Summenformel		charakteristische Fragmente	
Diphenylhydramin (M)	255,1623143	C ₁₇ H ₂₁ NO	256	167	
DM-DPH (M-14)	241,1466642	C ₁₆ H ₁₉ NO	242	167	256-14 (167)
DDM-DPH (M-28)	227,1310142	C ₁₅ H ₁₇ NO	228	167	256-28 (167)
DPS (M-13)	242,0942943	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	241	167	Negativer Modus 256-15 (167)
DPH-NO (M+16)	271,1572289	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	272	167	256+16 (167)
DPH-OH (M+16)	271,1572289	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	272	183	256+16 (183=167+16)
DPH-2OH (M+32)	287,1521435	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	282	199	256+32 (199=167+32)
DPH-OH-OCH ₃ (M+46)	301,1677936	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	302	213	256+46 (213=167+46)
DPH-N-Ac (M+42)	269,1415789	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	270	167	256+42 (167)
DPH-OH-N-Ac (M+60)	285,1364935	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286	183	256+60 (183=167+16)

Mittels HPLC-DAD fanden sich insgesamt 7 Metabolisierungsprodukte, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer UV-Spektren vom Diphenhydramin stammen sollten (Abbildung 4.5.5). Für die Metaboliten mit einer kürzeren Retentionszeit als Diphenhydramin (Met 1 ($Q_{\text{RRT}}=0,898$) und Met 2 ($Q_{\text{RRT}}=0,765$)) wäre aus dem Vergleich mit Demethylierungsreaktionen bei entsprechenden Modellverbindungen [213] und aus dem Vergleich mit den LC-MS-TOF Ergebnissen ein Strukturvorschlag für M1 als Desmethyldiphenhydramin DM-DPH und M2 als Didesmethyldiphenhydramin DDM-DPH möglich. Für Met 3 ($Q_{\text{RRT}}=1,147$) ergibt sich aus einem Vergleich der Retentionszeit, der Konzentrationen und der Spektren von LC-MS-TOF und HPLC-DAD die beste Übereinstimmung mit dem N-Oxid-Metaboliten, hier bewirkt eine Basizitätsminderung am Stickstoff eine Vergrößerung von RRT.

Für Met 7 erfolgte die Identifizierung des Peaks als Diphenylmethoxyessigsäure (DPS) durch den Retentionszeitvergleich mit der nach [231,232] synthetisierten Verbindung, mit $Q_{\text{RRT}}= 2,320$ weist dieser Metabolit die höchste Konzentration in den sauer extrahierten Proben auf. Das stimmt auch mit den Ergebnissen der Untersuchung mit LC-MS-TOF überein. Dieser Metabolit wurde in Negativmodus nachgewiesen. Für die Peaks Met 4, Met 5 und Met 6, die ebenfalls ein Spektrum ähnlich wie das des Diphenhydramins aufweisen, konnten ohne Daten von entsprechenden Vergleichsubstanzen keine Strukturzuordnungen getroffen werden. Der analytische Nachweis und die halbquantitative Bestimmung von Diphenhydramin und seinen Metaboliten wurde im Rahmen des toxikologischen Screenings durch HPLC-DAD [6] durchgeführt.

Bei akuten überlebten Intoxikationen wurden erhöhte Konzentrationen an Diphenhydramin in unserem Institut den letzten 15 Jahren in 68 Fällen aus der Klinik gefunden. Die jeweils in

der ersten Probe gemessenen Diphenhydramin-Konzentrationen sind in Abbildung 4.5.6 dargestellt. Es handelt sich größtenteils um Suizidversuche, teilweise in Kombination mit Alkohol und anderen Medikamenten. Die Werte erstrecken sich von 0,3 bis 8,9 µg/mL.

In 33 Fällen waren aus den ärztlichen Auftragsscheinen Symptome zu entnehmen, die ebenfalls in Abbildung 6 angegeben sind und von unauffällig und kardiopulmonal stabil über sediert und verlangsamt einerseits und Agitiertheit und Halluzinationen andererseits, bis hin zu Krämpfen, Delirium und Koma reichten und mit den Angaben aus der Literatur in Übereinstimmung waren.

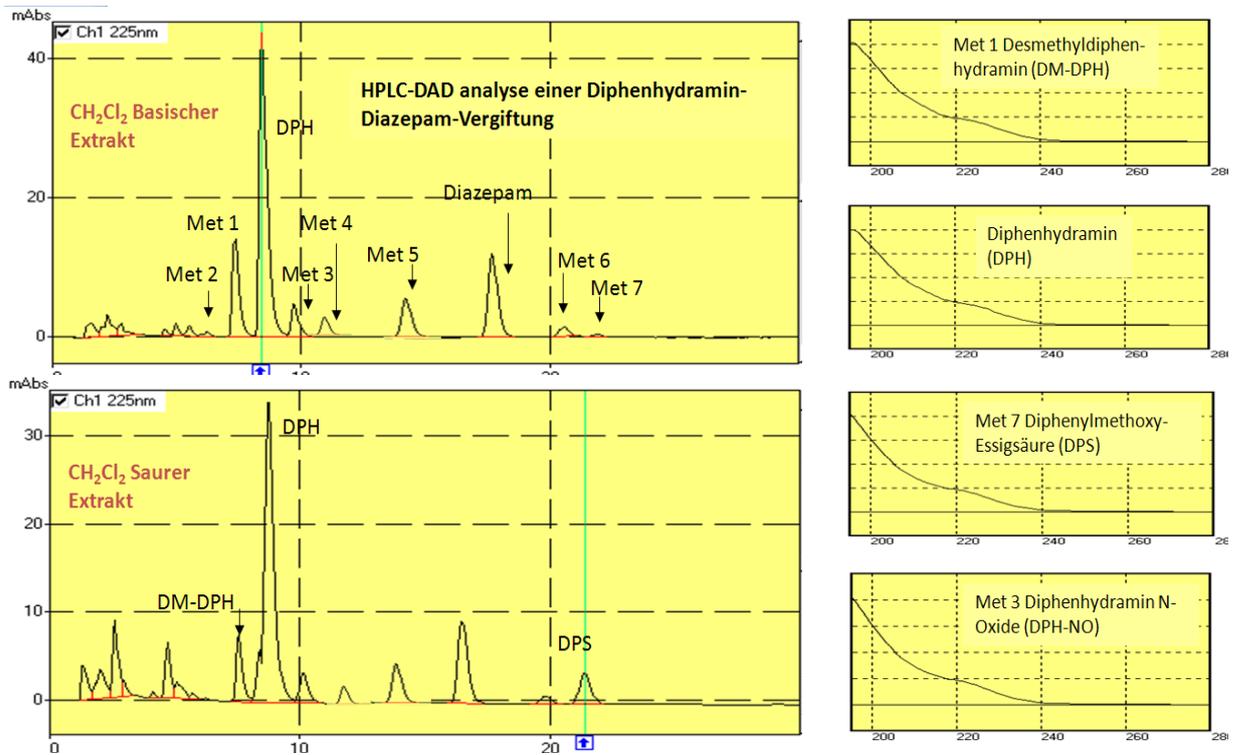


Abbildung 4.5.5: HPLC-DAD-Analyse einer akuten Diphenhydraminvergiftung

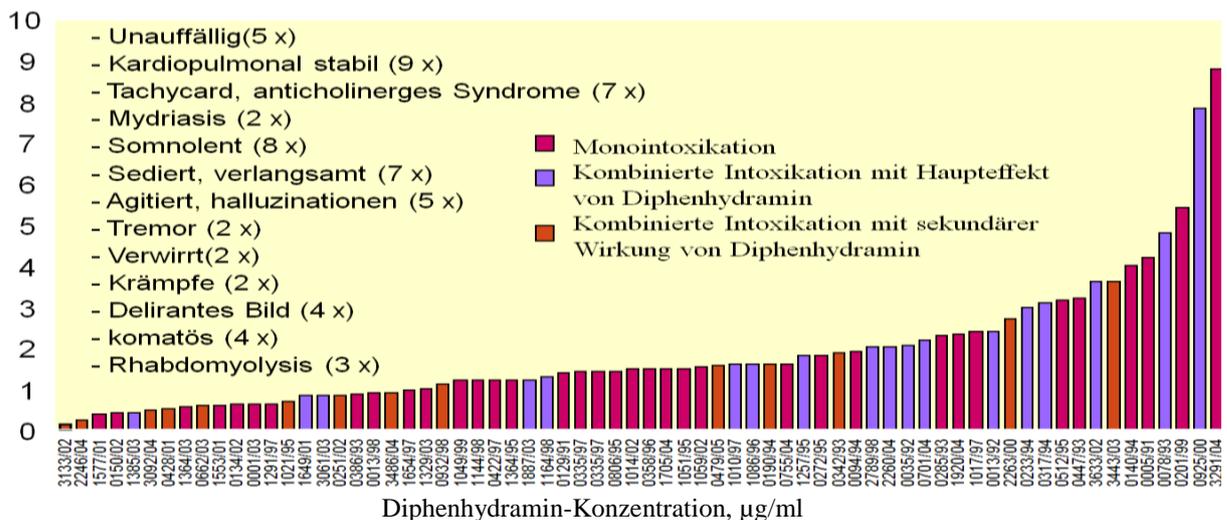


Abbildung 4.5.6: Diphenhydramin-Konzentrationen bei klinisch-toxikologischen Untersuchungen (68 Fälle) und in den Untersuchungsaufträgen angegebene Symptome (33 Fälle)

Bei etwa der Hälfte dieser Fälle wurden Verlaufskontrollen durchgeführt. Als Beispiel ist in Abbildung 4.5.7 der Verlauf für eine 19jährige Patientin angegeben, bei der außerdem 3,3% Alkohol gemessen wurden. Während Diphenhydramin schon nach 13,5 h von anfänglich 5,4 µg/mL in den ungefährlichen Bereich abgesunken war, steigt der sekundäre, unwirksame Metabolite Diphenylmethoxyessigsäure in dieser Zeit auf über 10µg/mL an und sinkt erst danach mit einer Halbwertszeit von ca. 20 h sehr langsam wieder ab.

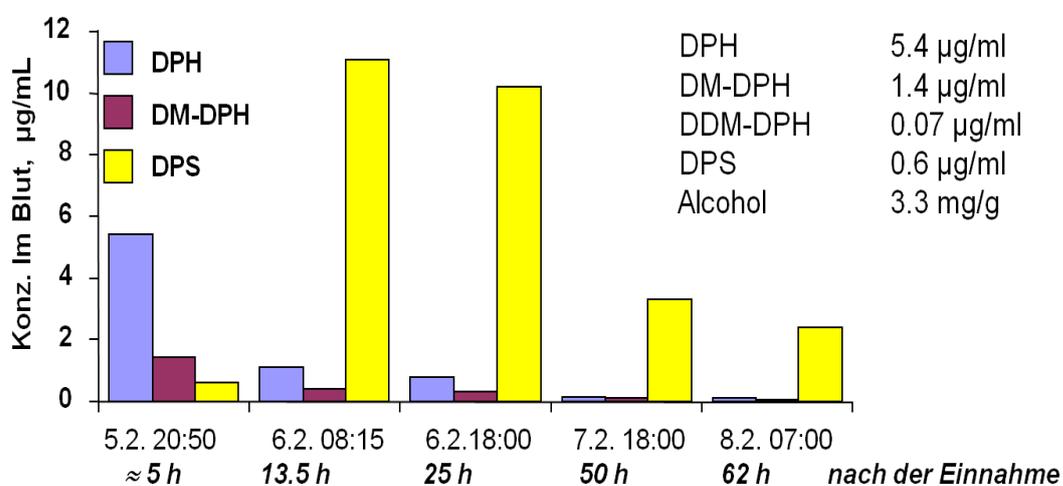


Abbildung 4.5.7: Verlauf der Konzentrationen von Diphenhydramin (DPH), Desmethyldiphenhydramin (DM-DPH) und Diphenylmethoxyessigsäure (DPS) im Fall J.G. (19 w).

Die Patientin wurde am 05. Februar gegen 19:30 Uhr verwirrt und zitternd in ihrer Wohnung auf dem Fußboden aufgefunden. In der Rettungsstelle wurden Krampfanfälle und weite, kaum lichtreaktive Pupillen festgestellt.

Die erste Blutentnahme erfolgte um 20:50 Uhr, ca 5 h nach der Einnahme. Weiterer Verlauf: 06. Feb um 18:00 sediert und beatmet, 07.Feb um 18:00 wach, ansprechbar. Außer den dargestellten Konzentrationen wurden in der ersten Probe festgestellt: Didesmethyldiphenhydramin 0,07 µg/mL, Diazepam (verabreicht) 0,6 µg/mL, Alkohol 3,3%.

Dieser sehr unterschiedliche Konzentrationsverlauf von Wirkstoff und Metabolit kann zu einer groben Abschätzung der Zeit zwischen der Einnahme des Wirkstoffs und der Blutentnahme herangezogen werden.

Die Auswertung aller Fälle, bei denen Angaben zur Zeit der Einnahme bekannt waren, ist in Abbildung 8 dargestellt. Dabei wurden insbesondere auch die Mehrfachentnahmen einbezogen. Danach kann das Konzentrationsverhältnis Diphenylmethoxyessigsäure/Diphenhydramin (DPS/DPH, oberer Teil von Abbildung 8) wie folgt bewertet werden:

DPS/DPH	0,0-0,5	0,5-1,0	>1	> 10
Zeit nach der Einnahme	<5 h	< 10 h	>10 h	>20 h

Der primäre Metabolit Desmethyldiphenhydramin (DM-DPH/DPH, unterer Teil in Abbildung 4.5.8) weist hingegen durch den First-pass Metabolismus von Anfang an eine hohe Konzentration auf und ist für solche zeitlichen Abschätzungen ungeeignet.

Diphenhydramin wurde zwischen 1992 and 2007 bei uns in 55 Todesfällen gefunden. Die festgestellten Konzentrationen sind in Abbildung 4.5.9 dargestellt, wobei reine Diphenhydraminvergiftungen, Vergiftungen mit überwiegender Diphenhydramin-wirkung, Mischintoxikationen mit verstärkender Wirkung von Diphenhydramin und Befunde bei andersartiger Todesursache unterschiedlich gekennzeichnet sind.

Man sieht, dass bei Konzentrationen oberhalb etwa 5 µg/mL überwiegend Fälle mit alleiniger oder überwiegender Wirkung von Diphenhydramin vorkommen. Dieses kann etwa als die untere letale Konzentrationsgrenze angesehen werden.

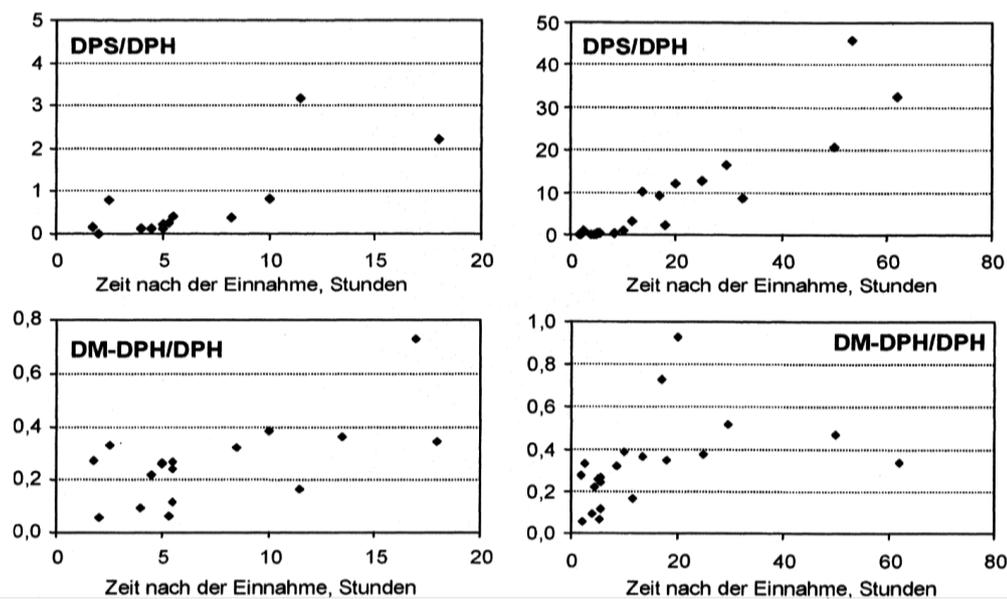


Abbildung 4.5.8: Konzentrationsverhältnisse der Metabolite Desmethyldiphenhydramin (DM-DPH) und Diphenylmethoxyessigsäure (DPS) zum Wirkstoff Diphenhydramin (DPH) in Abhängigkeit von der Zeitspanne nach der Einnahme toxischer Überdosen des Wirkstoffs. Links sind die bis 20 h gemessenen Werte mit höherer Auflösung und rechts alle Werte dargestellt.

Im folgenden sollen beispielhaft einige Fälle vorgestellt werden, um die Verschiedenartigkeit der missbräuchlichen Anwendung dieses Medikaments sichtbar zu machen. Diese Fälle ereigneten sich überwiegend bereits vor der Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit, wurden aber in diesem Rahmen aufgearbeitet. Die Fälle zeigen deutlich die Bedeutung der DPS-Konzentration für die Interpretation.

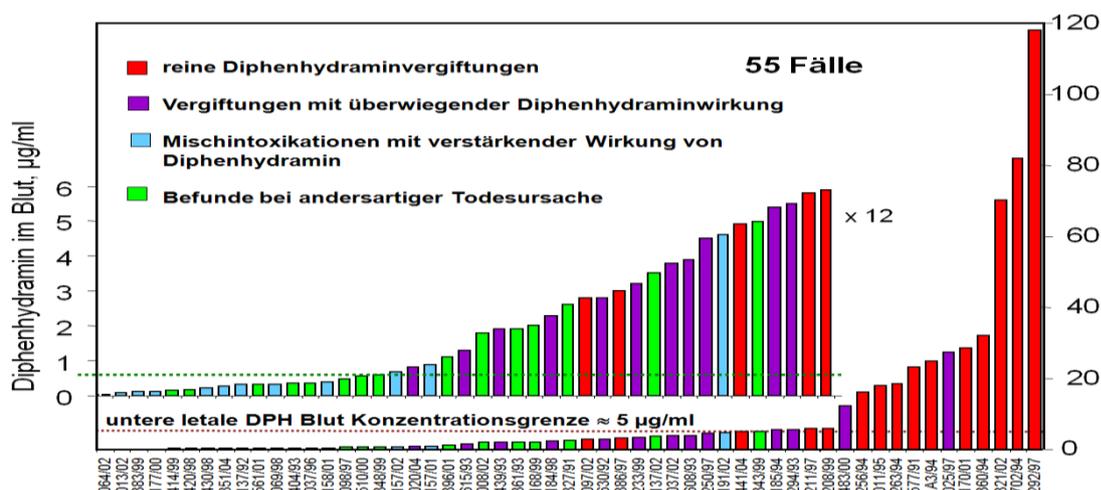


Abbildung 4.5.9: Konzentrationen an Diphenhydramin bei 55 Todesfällen und dessen Rolle bei der Todesursache.

Fall 1, D. Z., 22 w, Suizid durch hope Diphenhydramin-Überdosis

Die Betroffene wurde am 29.06.2002 um 15:45 Uhr tot in ihrer Wohnung aufgefunden. Es wurden ein Abschiedsbrief und 21 leere Blister a 10 Sedopretten mit 50 mg (10,5 g Diphenhydramin) festgestellt. Sie habe unter Depressionen gelitten and den Suizid am Abend zuvor telefonisch bei ihren Eltern angekündigt. Die Analyse lieferte insgesamt folgende Ergebnisse: Alkohol: Blut 0,8 %; Urin 1,1 %. EMIT auf Btm. im Urin: negativ

HPLC-DAD-Ergebnisse in µg/mL

Probe	DPH	DM-DPH	DPS	DPS/DPH
Venenblut	70	7,7	1,9	0,027
Herzblut	72	3,3	2,2	0,03
Liquor	19,5	1,8	0,33	0,016
Glaskfl.	15,2	2,4	0,12	0,008
Urin	90	20	0,65	0,007
Leber	240	35	----	----
Mageninhalt	2600	----	9,7	0,003

Die Diphenhydraminkonzentration im Venenblut ist mit 70 µg/mL extrem hoch. Es gibt keinen wesentlichen Unterschied zum Herzblut. Die Konzentrationsunterschiede zum Liquor und zur Glaskörperflüssigkeit lassen sich durch die Plasma-Proteinbindung erklären (75-85%). Sowohl die hohe Konzentration im Mageninhalt als auch das sehr niedrige Verhältnis DPS/DPH zeigen eine kurze Überlebenszeit an.

Fall 2: U. B., 54 w, Verwendung von Diphenhydramin als Antiemetikum bei andersartiger Medikamentvergiftung

Die Betroffene wurde am 26.03.2002 tot in der Wohnung aufgefunden. Es lagen diverse Papiere mit Abschiedsbriefcharakter und ein Mitgliedsausweis der Deutschen Gesellschaft

für Humanes Sterben vor. Depressionen und schwere Allergien waren bekannt. Als Analysenergebnisse ergaben sich:

Akohol: Blut 1,1 ‰; Urin 1,2 ‰ EMIT auf Btm. im Urin: negativ Cyanid: negativ

HPLC-DAD-Befunde in µg/mL

Probe	Chloroquin	DPH	DM-DPH	DM-DPH
Blut	14,9	0,67	0,20	< 0,05
Mageninhalt	415	32	---	---

Hier handelt es sich um eine letale Chloroquin-Intoxikation, bei der Diphenhydramin als Antiemetikum eingenommen wurde. Dieses ist eine Empfehlung in der Broschüre der „Deutschen Gesellschaft für Humanes Sterben“, wird in Kombination mit Barbital durch die Schweizer Gesellschaft „Exit International“ praktiziert und wurde auch im Fall Uwe Barschel festgestellt. Die Konzentration liegt mit 0,67 µg/mL gerade über der unteren toxischen Grenze. Das Fehlen der Diphenylmethoxyessigsäure spricht für eine sehr kurze Überlebenszeit.

Fall 3: I. M., 25 w, Brandleiche, zunächst unbekannt

Die Betroffene wurde am 03.04.1994 in stark verkohltem Zustand nur noch als Torso unter den Trümmern eines ausgebrannten Dachstuhles aufgefunden. Bei der Obduktion waren eine morphologisch fassbare Todesursache oder Zeichen äußerer Gewalt in diesem Zustand nicht mehr nachweisbar. Immerhin konnte genügend Blut für die toxikologisch-chemische Untersuchung gewonnen werden. Als Analysenbefunde ergaben sich:

Alkohol: Blut 0,0 ‰ CO-Hb: 4 %.

HPLC-DAD-Befund in µg/mL

	DPH	DM-DPH	DPS	DPS/DPH
Blut	19	n. b.	0,3	0,016

Man konnte daher davon ausgehen, dass die Frau zum Zeitpunkt des Brandes schon tot war. Ein Tötungsverbrechen war denkbar. Durch den Nachweis der letalen Diphenhydraminkonzentration ausgelöste Ermittlungen in den umliegenden Apotheken ergaben, dass eine nun vermisste 25jährige Frau am Brandtage eine größere Menge an Sedopretten gekauft hatte. Abschließend wurde von einem Suizid auf dem Dachboden ausgegangen, wobei die Betroffene den Brand z. B. durch eine Kerze selbst verursacht hat. Das Konzentrationsverhältnis DPS/DPH von 0,016 zeigt auch hier nur eine sehr kurze Überlebenszeit an.

Fall 4: M. K., 90 w, Anwendung von Diphenhydramin als K.o.-Mittel

Dieser Fall betrifft eine 90jährige Frau, die mit Zeichen der Gewalteinwirkung gegen den Hals tot auf ihrem Bett aufgefunden wurde. Es fehlten Sparbücher und Bargeld. Als Todesursache wurden Halskompression and Brustkorbtrauma bei der Obduktion festgestellt. Durch die Analyse wurde auch hier überraschend Diphenhydramin festgestellt.

Analytische Befunde

Alkohol: 0,0 ‰ EMIT auf Btm. (Nierenablaufflüssigkeit): negativ

HPLC-DAD-Befunde in ,ug/mL

Probe	Herzblut	Venenblut	Leber	Niere	Lunge	Mageninhalt	Dünndarm
DPH	42 5,0	4,6	2,5	110	495	n. n.	
DM-DPH	0,06	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
DPS	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

Die Konzentrationen in Venenblut, Leber und Niere lassen stärkere Vergiftungssymptome vermuten. Auffällig ist aber die sehr viel höhere Konzentration im Herzblut und in der Lunge. Die Ermittlungen nach Festnahmedes 35jährigen mehrfach vorbestrafte Serientäters ergaben, dass dieser der Betroffenen nach Fesselung und Knebelung eine Lösung von mitgebrachten Schlaftabletten in Wasser einflöbte. Schließlich erdrosselte er sie mit einem Halstuch. Es ist davon auszugehen, dass die Betroffene einen großen Teil der Lösung aspiriert hat, was die hohe Konzentration in der Lunge und im Herzblut erklärt. Der gleiche Täter hatte auch in einem anderen Fall von Raub, Körperverletzung und sexueller Nötigung aufgelöste Schlaftabletten verwendet.

Fall 5: J. D., 53 m, Befunde bei Todesfall unter N₂O-Inhalation

Dass die Bewertung von Herzblutkonzentrationen zu falschen Schlussfolgerungen führen kann, zeigt auch dieser Fall. Der Betroffene wurde am 02.05.2001 im Tegeler Forst mit großer Plastiktüte über dem Kopf tot aufgefunden. Mehrere Lachgas- Kartuschen und ein Öffnungsgerät lagen daneben und er hatte einen Abschiedsbrief mit der Angabe „Selbsttod mit Stickstoffoxidul, Codein + Saft“ bei sich. Die Analyse führte zu folgenden Ergebnissen:

Alkohol: Blut 0,0 ‰; Urin 0,0 ‰ EMIT: Opiate positiv

HPLC-DAD und GC-MS-Befunde in ,ug/mL

	Herzblut	Venenblut	Lunge	Urin	Mageninhalt
N ₂ O	340	n. u.	286	78	106
Codein	7,3	0,18	n. u.	0,09	n. u.
DPH	4,6	< 0,05	2,3	< 0,05	650
DPS	0,07	< 0,05	n. u.	< 0,05	0,15

Die Untersuchung des Herzblutes ergab neben der hohen Konzentration an Lachgas auch sehr hohe Konzentrationen an Codein und Diphenhydramin, die zumindest einen komatösen Zustand erklären würden, so dass der Betroffene nicht mehr in der Lage gewesen sein sollte, selbst den Beutel mit Lachgas aus den Kartuschen zu füllen. Im Venenblut lag Codein hingegen nur therapeutisch vor und Diphenhydramin konnte überhaupt nicht nachgewiesen werden. Auch dieses Ergebnis lässt sich durch eine agonale Aspiration der kurz zuvor eingenommenen und teilweise wieder erbrochenen Tablettenlösung während des Erstickungsvorganges unter der Plastiktüte erklären.

Fall 6: Y. I., 3 m, Diphenhydramin-Nachweis im Fall einer Kindesmisshandlung

Dieser Fall betrifft einen 3jährigen Jungen, der vom Lebensgefährten der Mutter über eine Zeitspanne von mindestens einem Monat in schwerster Weise misshandelt wurde und letztlich am 30.01.2002 an einem subduralen Hämatom im Unfallkrankenhaus Berlin verstarb. Die HPLC-DAD-Analyse ergab hier neben den von der Behandlung herrührenden Narkotika auch Spuren an Diphenhydramin sowie eine relativ hohe Konzentration an Diphenylmethoxyessigsäure.

HPLC-DAD-Befunde in ,ug/mL

	Midazolam	Thiopental	Pentobarbital	DPH	DPS	DPH/DPS
Herzblut	2,8	2,6	0,18	0,02	1,6	80

Dieses kann entweder durch eine einmalige bis zu mehreren Tagen zurückliegende hohe Dosis oder durch eine mehrfache Gabe mit Akkumulation des Metaboliten erklärt werden. Es bestand der Verdacht, dass das Kind durch dieses Mittel ruhig gestellt wurde. Den Ermittlungen zufolge wurde hier das Antiemetikum "Vomex" verabreicht, das ebenfalls Diphenhydramin enthält.

Insgesamt ergeben sich aus diesen Fällen und in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen anderer Autoren folgende Schlussfolgerungen: Eine Überdosis an Diphenhydramin ist mit vielfältigen toxischen Wirkungen verbunden. Die Giftigkeit ist kaum geringer als die anderer rezeptpflichtiger Hypnotika. Es wird daher in erheblichem Umfange und häufig auch mit Erfolg in suizidaler Absicht eingenommen. Das betrifft in hohem Maße jüngere Menschen. Darüber hinaus gibt es Ansätze des Missbrauchs zu kriminellen Handlungen. Die Rezeptpflicht sollte daher in Erwägung gezogen werden. Trotz der halluzinogenen Wirkung ist ein Abusus zu berauschenden Zwecken bislang allerdings nicht bekannt geworden.

4.6 Flecainid

Flecainidacetat, ein Klasse Ic (Vaughan Williams) Antiarrhythmikum, wird bei supraventricularer Tachykardie eingesetzt [233]. Da die therapeutische Serumkonzentration mit 200-1000 ng/ml eng ist, ist deren Überwachung für die Dosis-Anpassung erforderlich [234,235]. Flecainid wird nach oraler Aufnahme schnell und fast vollständig resorbiert bei minimalem First-pass-Effekt (95% Bioverfügbarkeit). Peak-Konzentrationen treten im Plasma 3 bis 4 h nach oraler Aufnahme auf. Flecainid wird über O-Desalkylierung biotransformiert.

Die wichtigsten Metabolite sind meta-O-Desalkylflecainid MODF, das eine minimale Kardioaktivität besitzt, und das meta-O-dealkylierte Lactam des Flecainids MODLF, das keine antiarrhythmische Aktivität zeigt (Abbildung 4.6.1). Letzteres wird durch α -Oxidation des Piperidinringes gebildet. Beide Metabolite und die Muttersubstanz (ca. 10% der Dosis) treten im Urin auf [236]. Weitere Metabolisierungsreaktionen sind die Desalkylierung in ortho-Position (OODF), Hydroxylierungen in der Seitenkette (FLC-OHb) und am Piperidinring (FLC-OHa), Oxidation dieser OH-Gruppen und N-Acetylierung.

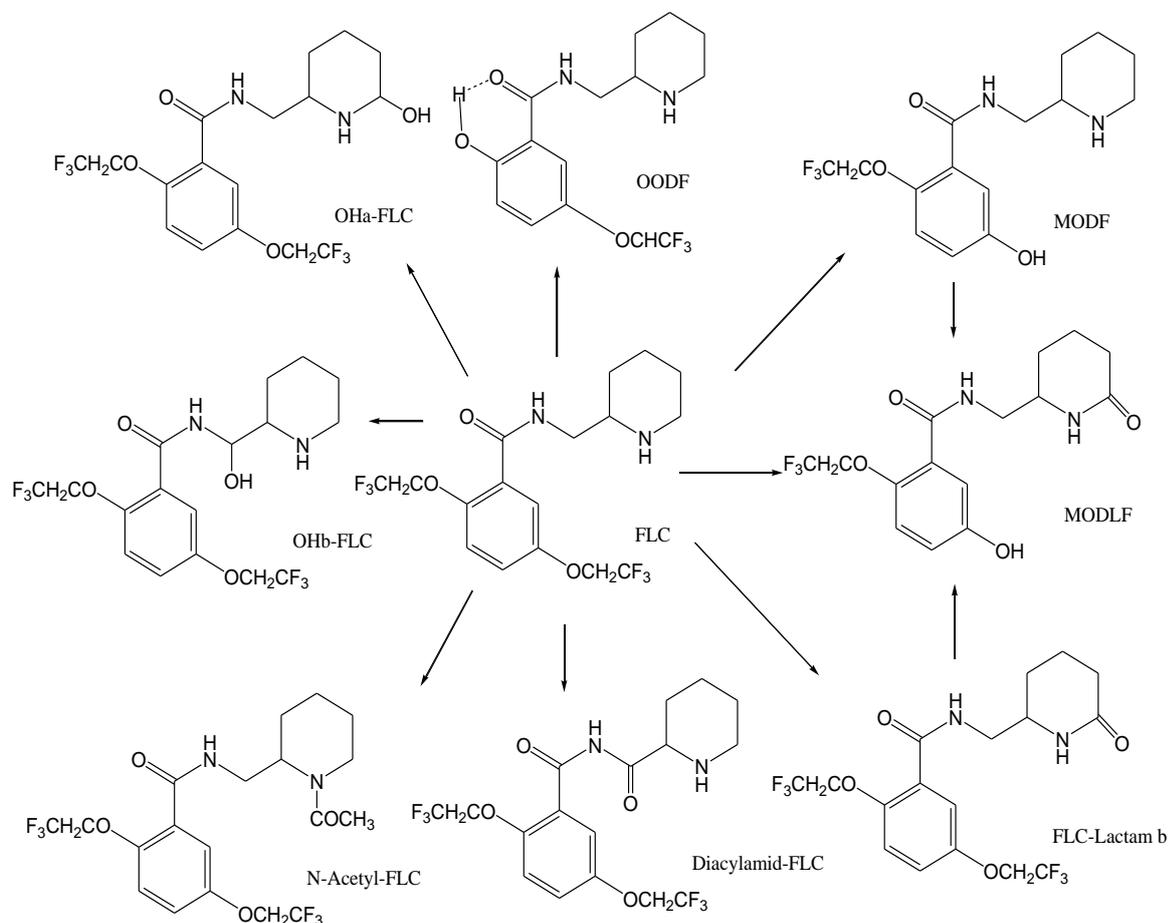


Abbildung 4.6.1: Metabolisierungsschema von Flecainid [251]

Zum Flecainid wurden 2 Todesfälle und 8 Proben aus der Klinik für diese Arbeit ausgewertet. Mit LC-TOF-MS (System Agilent und Waters) wurden neben Flecainid 8 Metabolite identifiziert (Tabelle 4.6.1 und Abbildung 4.6.1).

Die Spektren des Wirkstoffs ($[M+H]^+ = 415,1469$) sind in Abbildung 4.6.2 dargestellt. Für die Masse $[M+H]^+ = 333,14205$, welche der O-Desalkylierung entspricht, gibt es zwei Peaks. Beide Peaks besitzen mit $RT = 7,437$ min ($Q_{RT} = 0,72$) und mit $RT = 9,252$ min ($Q_{RT} = 0,90$) eine deutlich unterschiedliche Retentionszeit, haben aber gleiche MS- und MS-MS-Spektren (Abbildung 4.6.3 und 4.6.4).

Für die Zuordnung des Peaks mit $RT = 7,44$ min ist die stärkere Abnahme der Retentionszeit durch den Einfluss der freigesetzten OH-Gruppe entscheidend. Dieser findet besonders bei O-Desalkylierung in der meta-Position statt, so dass es sich hier um den Metaboliten m-O-Desalkylflecainid MODF handelt.

Bei O-Alkylabspaltung in der orto-Position kann sich hingegen eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit der metabolisch freigesetzten OH-Gruppe bilden, wodurch sich nicht die erwartete Abnahme der Retentionszeit ergibt. Der Peak mit der längeren Retentionszeit $RT = 9,25$ min entspricht daher dem Metaboliten o-O-Desalkylflecainid OODF.

Tabelle 4.6.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF Untersuchung der basischen Blutextrakte von 10 Fällen mit positiven Flecainid Befund.

Erwarteter Metabolit	Summenformel	Masse	RT min	QRT	Ppm Err.
Flecainid FLC	C17H20N2O3F6	414,13781	10,258	1,00	-4,48
MODF	C15H19N2O3F3	332,13478	7,437	0,72	-5,40
OODF	C15H19N2O3F3	332,13478	9,252	0,90	-5,44
Hydroxy-FLC a	C17H20N2O4F6	430,13273	14,937	1,46	-4,50
Hydroxy-FLC b	C17H20N2O4F6	430,13273	9,356	0,91	-4,15
Diacylamid FLC	C17H18N2O4F6	428,11708	11,431	1,11	-2,28
FLC Lactam	C17H18N2O4F6	428,11708	12,052	1,17	-2,47
MODLF	C15H17N2O4F3	346,11404	9,283	0,90	1,02
N-Acetyl-FLC	C19H22N2O4F6	456,14838	14,695	1,43	-3,64

Für die Masse $[M+H]^+ = 431,1418$, welche der Hydroxylierung $M + 16$ entspricht, gibt es ebenfalls zwei Peaks bei $RT_1 = 14,937$ min und $RT_2 = 9,356$ min mit sehr unterschiedlicher Retentionszeit. Die Spektren sind in den Abbildungen 4.6.6 und 4.6.8 dargestellt. Beide haben die gleichen MS-Spektren. In Übereinstimmung damit weist das Meabolisierungsschema (Abbildung 4.6.1) die beiden Hydroxylierungsprodukte FLC-OHa (in der Seitenkette) und FLC-OHb (am Piperidinring) auf.

Die MS-MS-Spektren unterscheiden sich hingegen deutlich. Das MS-MS-Spektrum für den Peak mit $RT = 9,356$ besitzt ein Fragment mit der Masse 414 ($431 - 17$) welches dem NH_3 -

Verlust entspricht. Das bedeutet eine Anlagerung der Hydroxygruppe an der Methylengruppe zwischen dem Piperidinring und der Benzamid-Gruppierung (FLC-OHb), was den Verlust von NH₃ erleichtert. Dagegen erscheint im MS-MS-Spektrum des Peaks bei 14,937 min ein Fragment mit der Masse 413 (431-18) welches dem H₂O Verlust entspricht. Das bedeutet eine Anlagerung der Hydroxygruppe am Piperidinring (FLC-OHa), wo der H₂O Verlust erleichtert ist (Abbildung 4.6.7).

Weitere Oxidation dieser zwei Hydroxygruppen zu den entsprechenden Carbonylgruppen ergibt die Metabolite Diacylamid-FLC und FLC-Lactam, mit der Masse [M+H]⁺ = 429,1253 und RT=11,431 min sowie RT=12,052 min. Diacylamid FLC besitzt dabei in Wirklichkeit keine Lactamstruktur. Um diese zwei Metabolite zuzuordnen ist das Fragment der Masse 411 (429-18, Abspaltung von H₂O) von Bedeutung. Bei dem Peak mit RT=11,431 min ist die Abundance dieses Fragments nur 10%, d.h. weniger Wasserverlust im Vergleich zu dem Peak mit RT=12,052 min mit 40%. Das bedeutet aus der Sicht der Stabilität der Produkte, dass es sich bei dem Peak bei RT=11,431 min um das Diacylamid FLC und bei RT=12,052 min um FLC-Lactam handelt.

Weitere Metabolite entstehen durch meta-O-Desalkylierung aus dem Lactam Metaboliten FLC-Lactam (MODLF, RT=9,283 min) und durch Acetylierung zu N-Acetylflecainid (RT=14,695 min).

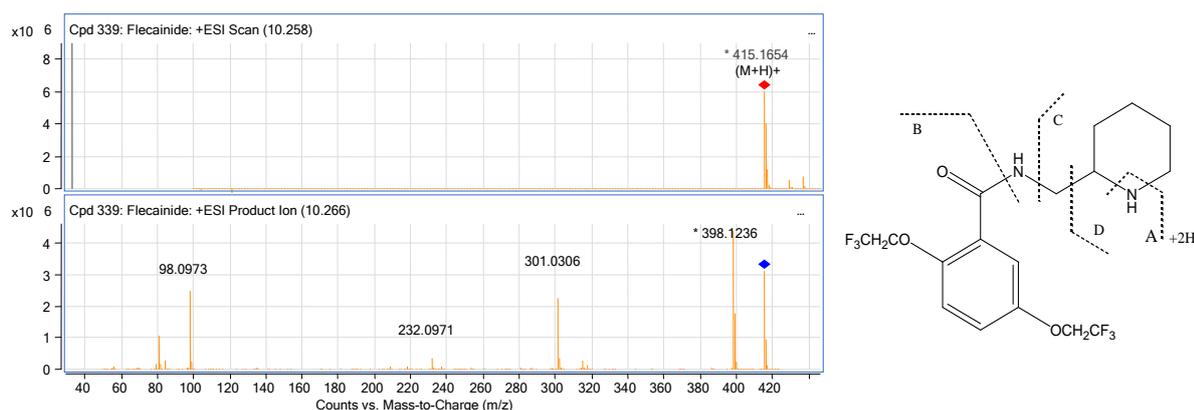


Abbildung 4.6.2: MS und MS-MS Scan Spektren von Flecainid nach Extraktion aus einer Blutprobe

Tabelle 4.6.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Flecainid

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
415,1469 (M+H) ⁺	C17 H21 F6 N2 O3	Flecainid + H	-4,48
398,1236	C17 H18 F6 N O3	415 – A (H3N=17,0265)	-12,75
301,0306	C11 H7 F6 O3	B 415 – (C6 H14 N2 = 114,1157)	-4,05
98,0973	C6 H12 N	C 415 – (C11 H9 F6 N O3 = 317,0487)	-9,07
84,0813	C5 H10 N	D 415 - (C12 H11 F6 N O3= 331,0643)	-5,90

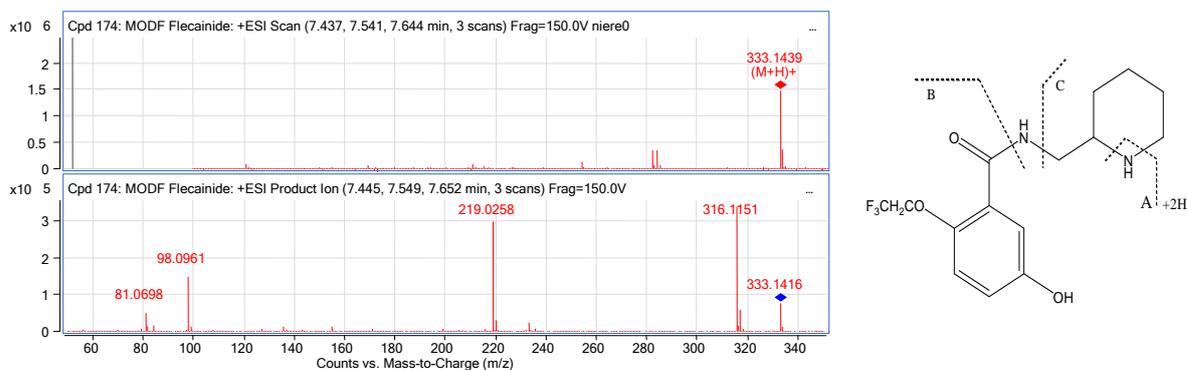


Abbildung 4.6.3: MS und MS-MS Scan Spektren und Fragmentierungsschema von m-O-Desalkylflecainid MODF im LC-TOF-MS-MS-Chromatogramm des Extrakts der Blutprobe einer Flecainidvergiftung.

Tabelle 4.6.3: Charakteristische m/z-Werte im LC-MS-MS-Spektrum von m-O-Desalkylflecainid (MODF) und mögliche Strukturinterpretation.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
333,1439 (M+H) ⁺ (415-82)	C ₁₅ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₃	MODF + H	-5,40
219,0258 (301-82)	C ₉ H ₆ F ₃ O ₃	B 333 – (C ₆ H ₁₄ N ₂ = 114,1157)	2,54
98,0961	C ₆ H ₁₂ N	C 333 – (C ₉ H ₈ F ₃ N O ₃ = 317,0487)	3,03

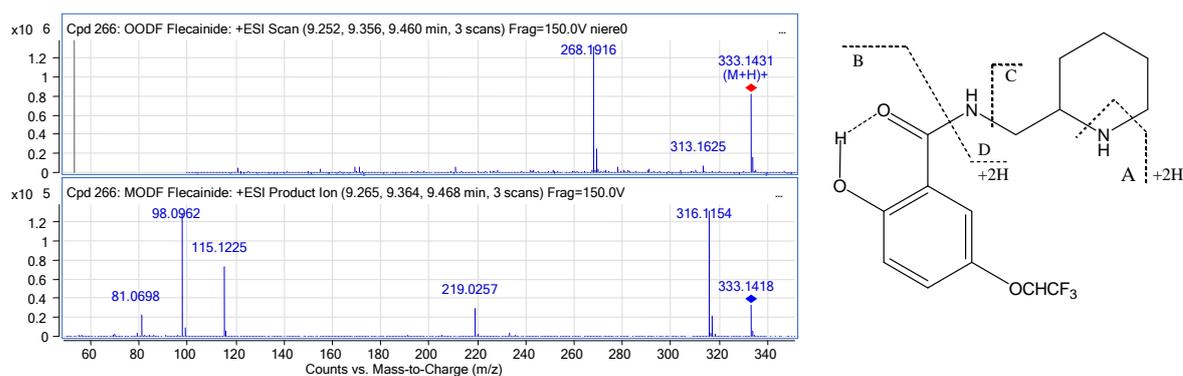


Abbildung 4.6.4: MS und MS/MS Scan Spektren von o-O-Desalkylflecainid OODF im LC-TOF-MS-MS Chromatogramm des Extrakts der Blutprobe einer Flecainidvergiftung

Tabelle 4.6.4: Charakteristische m/z-Werte von o-O-Desalkylflecainid (OODF) und mögliche Struktur-Interpretation

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
333,1431 (M+H) ⁺ (415-82)	C ₁₅ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₃	OODF + H	-5,49
316,1154 (398-82)	C ₁₅ H ₁₇ F ₃ N O ₃	333 – A (H ₃ N=17,0265)	0,47
219,0257 (301-82)	C ₉ H ₆ F ₃ O ₃	B 333 – (C ₆ H ₁₄ N ₂ = 114,1157)	2,89
115,1225	C ₆ H ₁₅ N ₂	D 333 – (C ₉ H ₅ F ₃ N O ₃ = 317,0487)	4,23
98,0961	C ₆ H ₁₂ N	C 333 – (C ₉ H ₈ F ₃ N O ₃ = 317,0487)	3,03

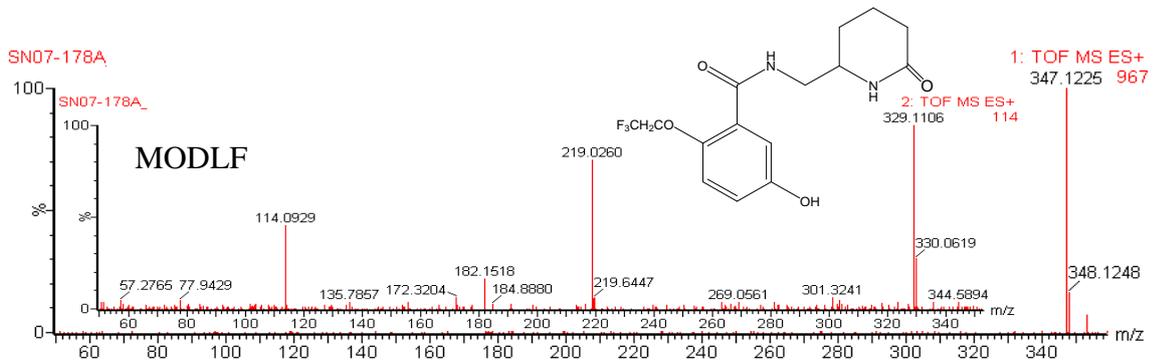


Abbildung 4.6.5: MS und MS-MS Scan Spektren von MODLF im LC-TOF-MS-MS Chromatogramm des Extrakts der Niereprobe einer Flecainidvergiftung (Waters TOF).

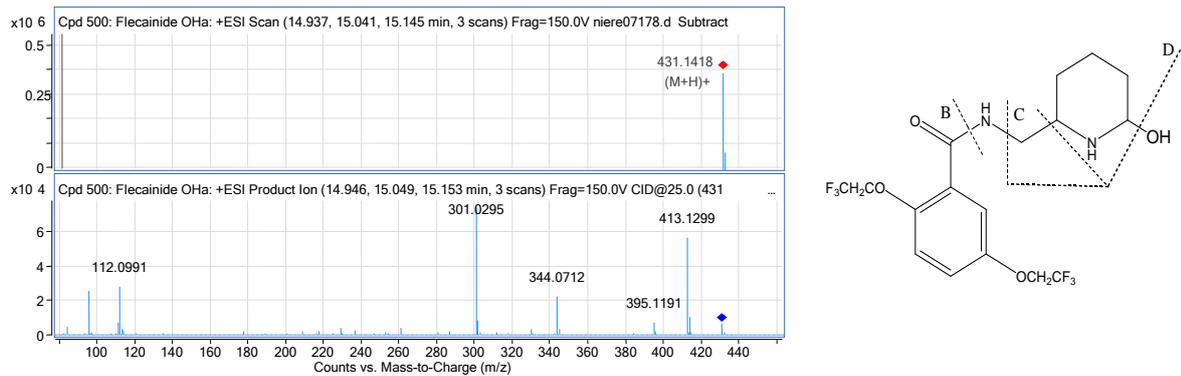


Abbildung 4.6.6: MS- und MS-MS-Scan-Spektren von Hydroxy-FLC a im LC-TOF-MS-MS Chromatogramm des Extrakts der Blutprobe einer Flecainidvergiftung.

Tabelle 4.6. 6: Charakteristische m/z-Werte (OHa-FLC) und mögliche Strukturinterpretation

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
431,1418 (M+H) ⁺ (415+16)	C17 H21 F6 N2 O4	OHa-FLC + H	-4,15
413,1299 (M+H-H ₂ O)	C17 H19 F6 N2 O3	431 - (H ₂ O=18,0106)	-1,03
395,1191 (M+H- 2(H ₂ O))	C17 H17 F6 N2 O2	431 - (H ₄ O ₂ =36,0211)	-0,49
344,0712	C13 H12 F6 N O3	431 - (C4 H9 N O = 87,0684)	1,25
301,0295	C11 H7 F6 O3	B 431 - (C6 H14 N2 O=130,1106)	-0,46
112,0991	C6 H12 N2	C11 H9 F6 O4=319,0405	3,81
96,0806	C6 H10 N	C 431 - (C11 H11 F6 N O4=335,0592)	2,13
84,0803	C5 H10 N	D 431 - (C12 H11 F6 N O=4347,0592)	1,92

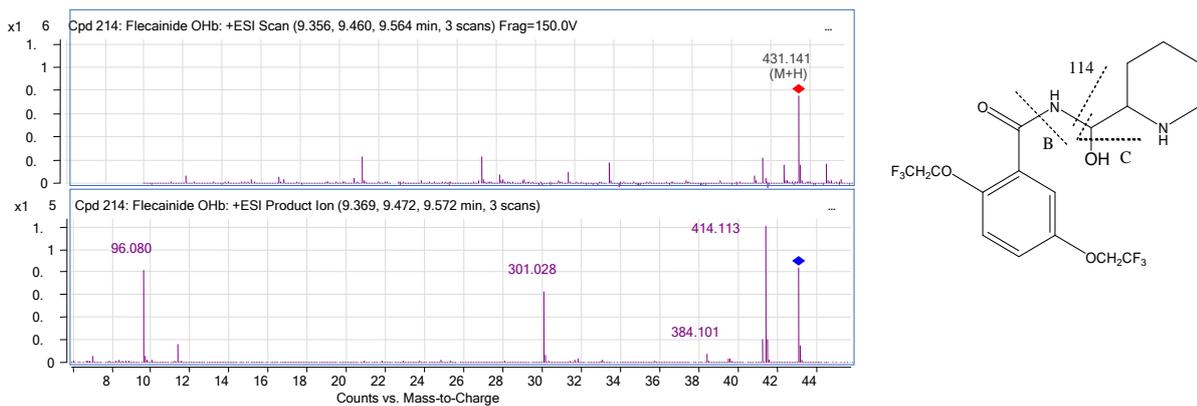


Abbildung 4.6.8: MS- und MS-MS-Scan-Spektren von Hydroxy-FLC b aus einer extrahierten Blutprobe.

Tabelle 4.6.7: Charakteristische m/z-Werte von OHb-FLC und mögliche Strukturinterpretation

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
431,1418 (M+H) ⁺ (415+16)	C17 H21 F6 N2 O4	Ohb-FLC + H	-4,15
414,1137 (M+H- NH3)	C17 H18 F6 N O4	431 – (NH3=17,0265)	-0,60
384,1014	C16 H16 F6 N O3	431 – (CH5NO = 47,0371)	3,88
301,0289	C11 H7 F6 O3	B 431 – (C6 H14 N2 O=130,1106)	1,65
114,0909	C6 H12 N O	C11 H11 F6 N O4) = 335,0592	-0,31
96,0808	C6 H10 N	C 431 – (C11 H11 F6 N O4= 335,0592)	2,13

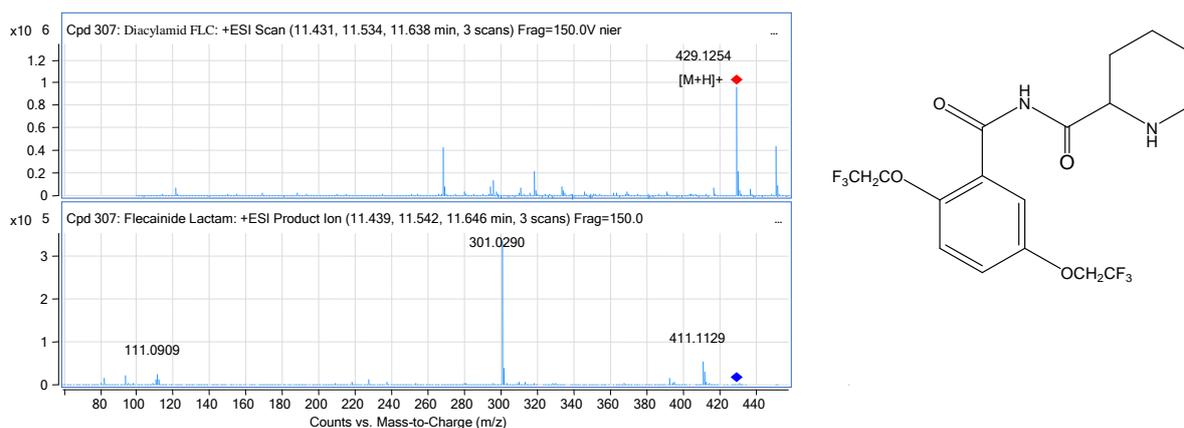


Abbildung 4.6. 9: MS- und MS-MS-Scan-Spektren von Diacylamid-FLC aus einer extrahierten Blutprobe.

Tabelle 4.6.8: Charakteristische m/z-Werte von Diacylamid-FLC) und mögliche Strukturinterpretation.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
429,1253 (M+H) ⁺ (415+14)	C17 H19 F6 N2 O4	Diacylamid-FLC + H	-2,47
411,1124 (M+H- H2O)	C17 H17 F6 N2 O3	429 – (H2O=18,0106)	2,04
301,0286	C11 H7 F6 O3	B 429 – (C6 H12 N2 O=128,095)	1,27
111,0909	C6 H11 N2	429 - (C11 H8 F6 O4) = 318,0327	6,57

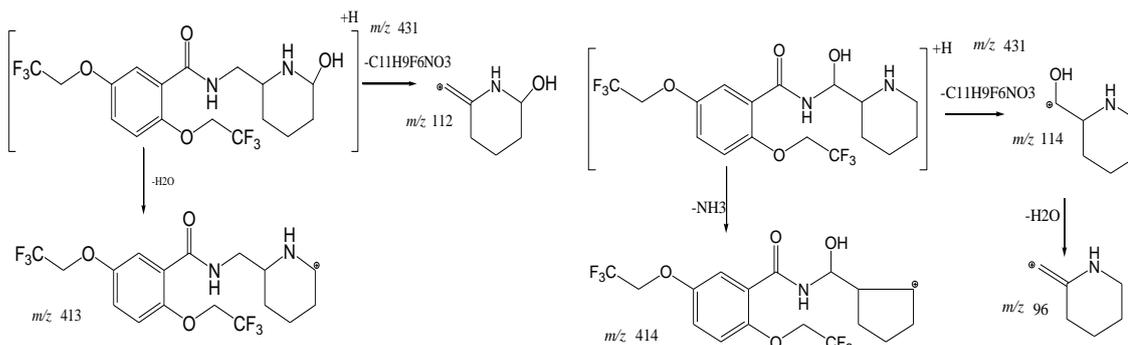


Abbildung 4.6.7: Mögliche Fragmentierung des Metaboliten FLC-OHa und FLC-OHb.

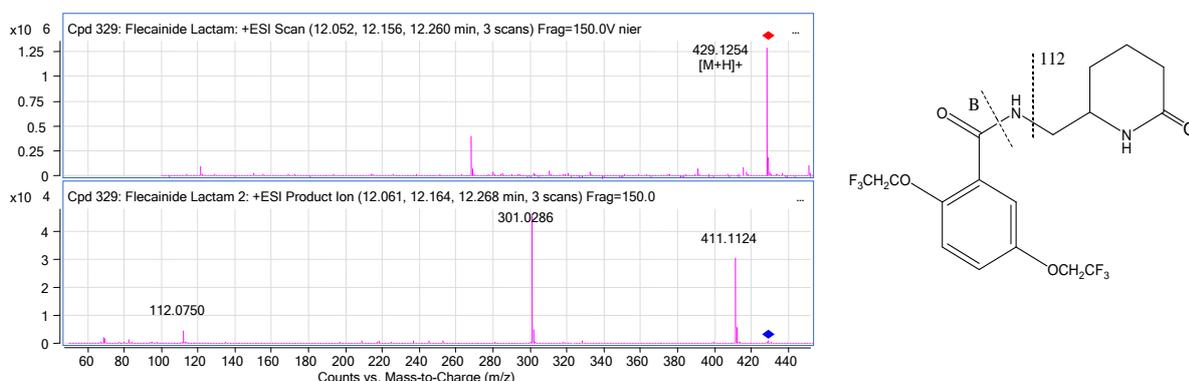


Abbildung 4.6.10: MS- und M-MS-Scan-Spektren von FLC-Lactam aus einer extrahierten Blutprobe.

Tabelle 4.6.9: Charakteristische m/z-Werte (FLC-Lactam a) und mögliche Strukturinterpretation.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
429,1253 (M+H) ⁺ (415+14)	C17 H19 F6 N2 O4	FLC-Lactam + H	-2,28
411,1124 (M+H- H2O)	C17 H17 F6 N2 O3	429 - (H2O=18,0106)	3,27
301,0286	C11 H7 F6 O3	B 429 - (C6 H12 N2 O=128,095)	2,74
112,075	C6 H10 N O	429 - (C11 H9 F6 N O3) = 335,0592	6,37

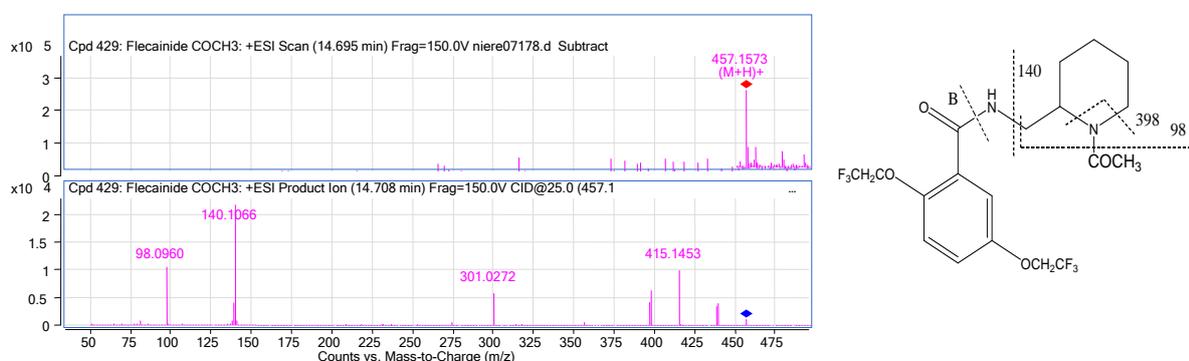


Abbildung 4.6.11: MS- und MS-MS-Scan-Spektren von N-Acetyl-FLC a aus einer extrahierten Blutprobe.

Tabelle 4.6.10: Charakteristische m/z-Werte von N-Acetyl-FLC und mögliche Strukturinterpretation

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
457,1573 (M+H) ⁺ (415+42)	C19 H22 F6 N2 O4	N-Acetyl-FLC + H	-3,64
439,1446 (M+H- H2O)	C19 H21 F6 N2 O3	457 - (H2O=18,0106)	1,04
398,1184	C17 H18 F6 N O3	457 - (C2 H5 N O =60,025)	0,31
301,0272	C11 H7 F6 O3	B 457 - (C8 H16 N2 O) = 156,1263	7,21
140,1066	C8 H14 N O	457 - (C11 H9 F6 N O3=317,0487)	2,57
98,096	C6 H12 N	457 - (C13 H11 F6 N O4=359,0592)	4,67

Mit HPLC-DAD ließen sich Flecainid und zwei Abbauprodukte nachweisen, wie in Abbildung 4.6.12 am Beispiel eines Todesfalles (46, w, Suizid) ersichtlich ist. Diese Metabolite haben eine längere Retentionszeit als das Flecainid. Die Zuordnung der Peaks als Metabolite des Flecainids erfolgte aufgrund der spektralen Ähnlichkeit mit Flecainid. Da

dieser Wirkstoff in der verwendeten mobilen Phase (pH=2,3) am Piprazinstickstoff protoniert ist, d.h. als Kation vorliegt, besitzt er eine relativ kurze Retentionszeit. Außerdem bewirkt generell auch die Carbonsäureamid-Struktur (-CO-NH-) eine Verkürzung der Retentionszeit. Die längere Retentionszeit der Metabolte könnte dadurch erklärt werden, daß durch die Metabolisierung die Protonierung erschwert und damit die Retentionszeit verlängert wird. Von den in der LC-TOF/MS Tabelle genannten Metaboliten kämen hierfür das N-Acetyl-FLC als Met 2 und das FLC-Lactam als Met1 in Frage, bei denen jeweils die Protonierung am Piprazinstickstoff verhindert ist und keine direkte Veränderung des Chromophoren erfolgt. Hierbei sollte das FLC-Lactam kürzere Retentionszeit im Vergleich zur N-Acetyl-FLC aufweisen. In der letalen Flecainid-Intoxikation wurde in diesem Fall mit 9,96 µg/mL eine wesentlich über den therapeutischen Werten (0,2 bis 1,0 µg / mL [237]) liegende Konzentration gemessen, die sich nach Vergleich mit Literaturangaben in komatös-letalen Bereich befindet (Tabelle 4.6.12).

Tabelle 4.6.12: Vergleich der Flecainid-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten und Geweben im untersuchten Fall mit tödlichen Flecainid-Vergiftungen in der Literatur.

Probematerial	Vorliegenden Fall µg/mL	Literatur					
		Romain [236]	Levine [238]	Forrest [239]	Rogers [240]	Rogers [241]	Sadler [242]
Blut	9,96	7,7	13	16,3	93,7	100	7,3
Mageninhalt	566	43 (mg)	120 (mg)		7000 (mg)		19
Leber	944	0,26	160		418,9		

Die Analyse lieferte in diesem Fall zusätzlich folgende Befunde:

Alkohol Venenblut 2,0 mg/g; Urin 2,3 mg/g.

Metoprolol Blut 2,07 µg/ml; Mageninhalt 136 µg/ml; Leber 92 µg/g

Hierdurch wird die Einnahme flecainid- und metoprololhaltiger Medikamente in hoch toxischer Dosierung belegt. Das Antiarrhythmikum Flecainid wird u.a. bei symptomatischen und behandlungsbedürftigen tachycarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen verordnet. Der β-Rezeptorenblocker Metoprolol kommt bei essentiellm Bluthochdruck und chronisch stabiler Angina pectoris zur Anwendung. Intoxikationserscheinungen nach Metoprolol-Vergiftungen treten gelegentlich erst nach ca. 12 Stunden ein. Sie zeigen sich in Form von kardiodepressiven Wirkungen mit Hemmung der Schlagfrequenz und der Kontraktionskraft des Herzens.

Bei einer guten Passage der Blut-Hirn-Schranke treten auch zentrale Wirkungen wie Sedierung mit Schläfrigkeit, Schwindel, Benommenheit in hohen Dosen auch Bewusstlosigkeit, Ataxie und Hypopnoe bzw. Erregungen mit Würgen, Erbrechen, Krämpfen und halluzinatorischer Psychose auf. Für den Zeitpunkt des Todeseintritts ließ

sich bei der Betroffenen weiterhin eine sehr starke alkoholische Beeinflussung nachweisen, wodurch es vor allem in Kombination mit Metoprolol zu einer Verstärkung der Toxizität gekommen sein kann. Der Tod der Betroffenen kann somit ursächlich durch die kombinierte Intoxikation mit Flecainid, Metoprolol unter verstärkender Wirkung von Alkohol herbeigeführt worden sein.

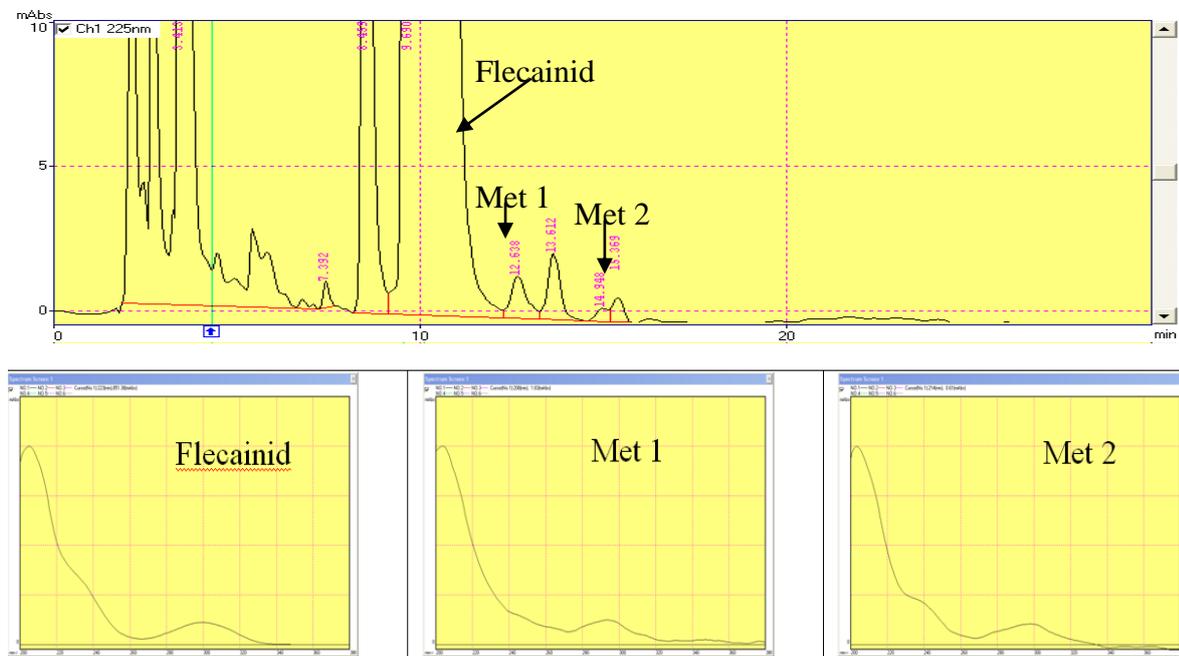


Abbildung 4.6.12: HPLC- Kurve des Extraktes der Blutprobe einer letalen Flecainid-Intoxikation und UV-Spektren von Flecainid und seinen in dieser Probe nachweisbaren Metabolisierungsprodukten.

Bei den letzten acht Jahren wurden insgesamt 89 Spiegel-Bestimmungen für das Flecainid in unserem Institut durchgeführt. In 73 Fälle liegen die Flecainid-Konzentrationen (0,02-1 µg/mL) nach Vergleich mit Literaturdaten [215,216] und früher bei uns analysierten Fällen alle im jeweiligen therapeutischen Bereich (0,2 - 1,0 µg/mL). Außerhalb dieses Bereiches wurde in 16 Fällen 1,03- 2,5 µg/mL gefunden, 3 davon über 2µg/mL (Abbildung 4.6.13).

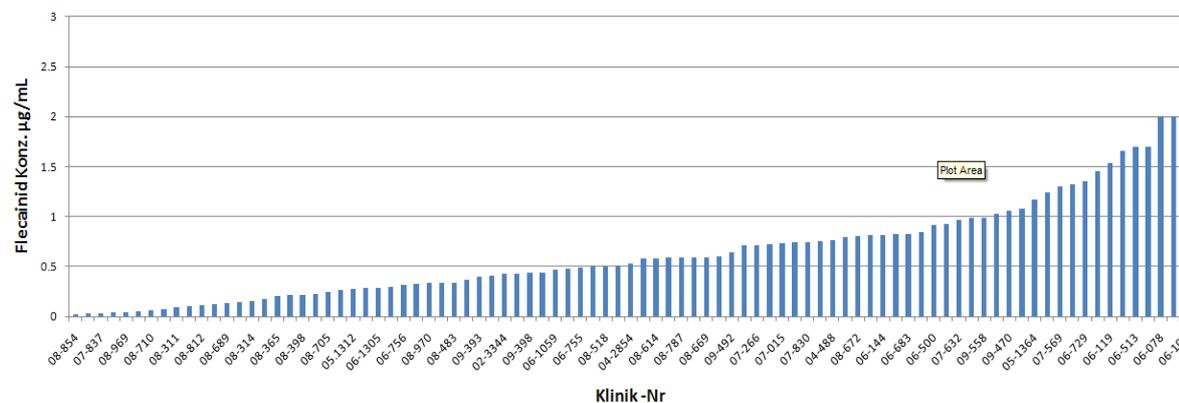


Abbildung 4.6.13: Flecainid-Konzentrationen bei klinischen Spiegel-Bestimmungen (89 Fälle).

4.7 Ketamin

Ketamin (K) ist ein intravenöses, analgetisch und dissoziatives Narkosemittel, welches bei Mensch und Tier eingesetzt wird. Es unterliegt einem umfangreichen hepatischen First-pass-Metabolismus. Dabei wird es durch N-Demethylierung zu Norketamin (NK) metabolisiert, und dieses wird danach durch Dehydrogenierung zu 5,6-Dehydronorketamin (DNK) umgewandelt. Weitere Metabolite weisen verschiedene freie und glucuronidierte Hydroxyderivate von Ketamin und Norketamin sowie 5,6-Dehydronorketamin (DNK) [243-245] auf. Das Metabolisierungs-schema befindet sich in Abbildung 4.7.1.

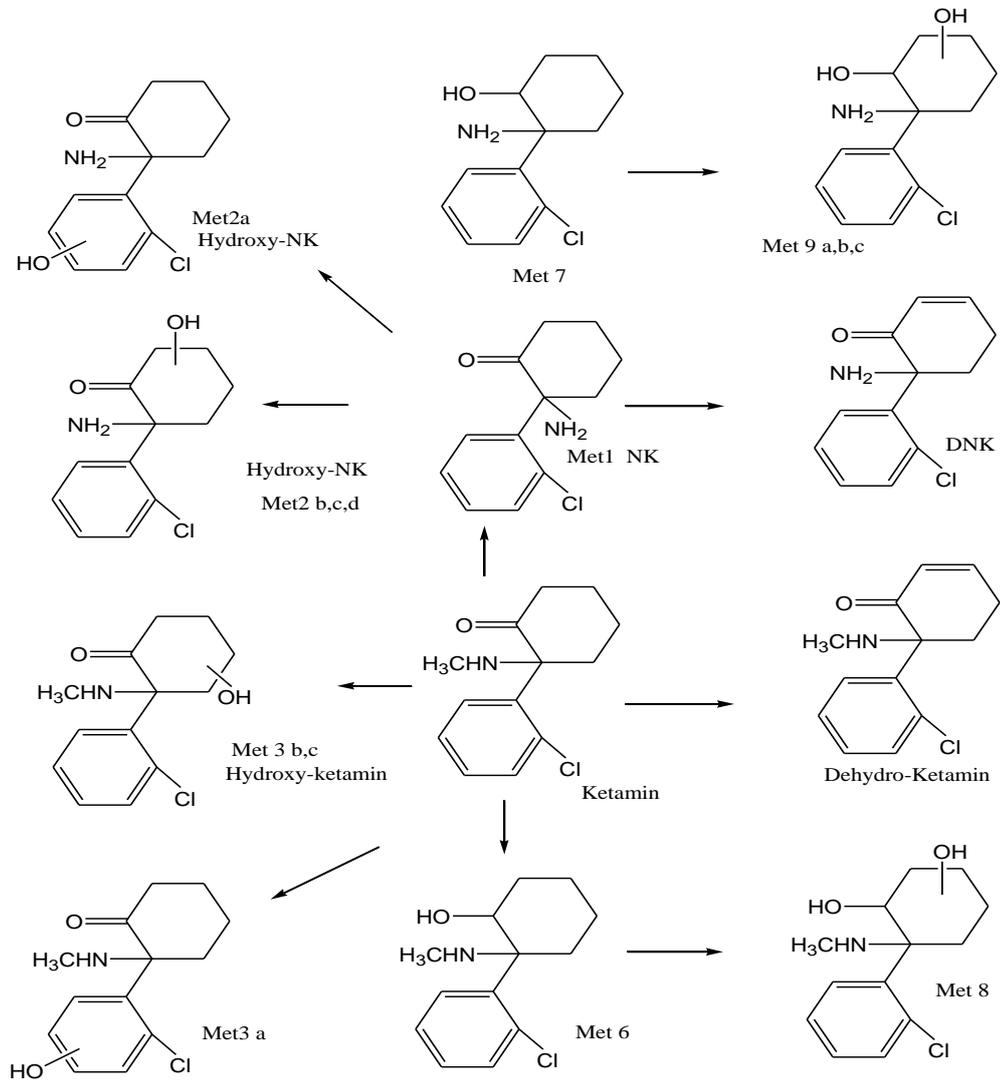


Abbildung 4.7.1: Metabolisierungsschema von Ketamin [243-245].

Zum Ketamin wurden 18 menschliche Proben – 15 von Verstorbenen aus dem Sektionsgut unseres Institutes und 3 Spiegelbestimmungen aus dem Charite Krankenhaus – untersucht. Dazu kamen weitere 160 Schweinserum Proben, die im Rahmen einer klinisch-experimentellen Untersuchung zur Ketamin-Azaperon-Allgemeinanästhesie der Schweineklinik des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in

Kooperation mit der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Charité Berlin analysiert wurden [246].

Durch die Kombination mit dem Neuroleptikum Azaperon wird die hypnotisch-analgetische Wirkung des Ketamins verstärkt und ungünstige Nebenwirkungen werden abgeschwächt.

Mittels LC-ESI-TOF-MS (Agilent und Waters) konnten im positiven Modus in den menschlichen Proben und in den Schweineproben im alkalischen Extrakt Ketamin (K) sowie folgende 9 Metabolite identifiziert werden (Tabelle. 4.7.1 und Abbildungen 4.7.3, 4.7.4, 4.7.8 und 4.7.12). Met 1 N-Desmethylketamin (NK), Hydroxyketamin Metabolite (3 Verbindungen Met 3a,b,c), Hydroxynorketamin Metabolite (4 Verbindungen Met 2a,b,c,d), Dehydroketamin Met 4 (DK), Dehydronorketamin Met5 (DNK), das durch Reduktion des Cyclohexanon-Ringes gebildete Cyclohexanol Ketamin Met 6 mit seiner Hydroxyverbindung Met 8 und Cyclohexanol-Norketamin Met 7 mit seinen drei Hydroxyverbindungen Met 9a,b,c.

Ketamin und seine Metabolite bilden teilweise die gleichen Fragment-Ionen. Eine hohe Übereinstimmung der Fragmentierung zeigt der Metabolit Desmethylketamin. Das Produktspektrum von Ketamin (Abbildung 4.7.2) zeigt einen initialen Verlust von H₂O (Fragment m/z 220, C₁₃H₁₅NCl) und einen initialen Verlust von CH₃NH₂ (Fragment m/z 207, C₁₂H₁₂OCl), (H₂O) Fragment m/z 189, gefolgt von Verlusten von CO (Fragment 179, C₁₁H₁₂Cl), C₅H₈ (Fragment 151, C₈H₇NCl), und C₆H₉N (Fragment 125, C₇H₆Cl). Die meisten der Fragmente in den Produkt-Spektren der weiteren Metabolite lassen sich leicht durch Vergleich mit dem Produkt-Spektren von Ketamin identifizieren. Zusätzliche Signale bei m/z 236, 223, 205 und 195 können zugeordnet werden.

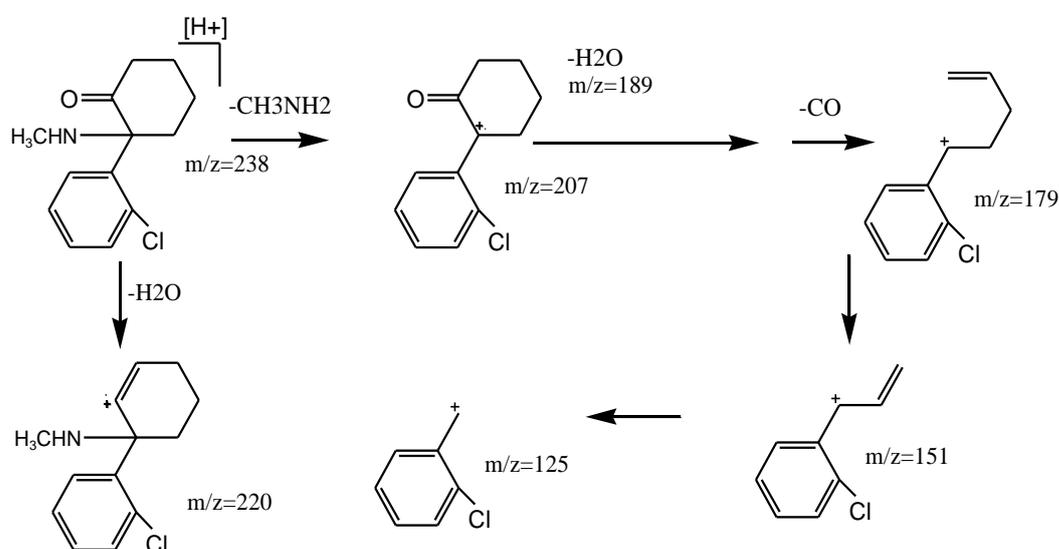


Abbildung 4.7. 2: Struktur der möglichen charakteristischen Fragmentionen von Ketamin.

Tabelle 4.7.1: Ergebnisse der LC-MS-TOF-Untersuchung des basischen Blutextraktes eines Falles mit positiven Ketamin Befund. (Agilent und Waters LC-TOF/MS), vgl. Abbildung 4.7.1.

	Erwarteter Metabolit		Summenformel	Masse	RT min	Q _{RT}	ppm Err.
	Ketamin	M	C13H16CINO	237,09204	9,175	1	2,7
Met1	Met 1 NK	M-14	C12H14CINO	223,07639	9,771	1,06	-1
Met2a	Hydroxy-NK 1	M+2	C12H14CINO2	239,07131	6,046	0,66	-5,65
Met2b	Hydroxy-NK 2	M+2	C12H14CINO2	239,07131	5,805	0,63	1,87
Met2c	Hydroxy-NK 3	M+2	C12H14CINO2	239,07131	7,436	0,81	-12,2
Met2d	Hydroxy-NK 4	M+2	C12H14CINO2	239,07131	8,856	0,97	4,87
Met3a	Hydroxy-K 1	M+16	C13H16CINO2	253,08696	6,399	0,70	-4,15
Met3b	Hydroxy-K 2	M+16	C13H16CINO2	253,08696	6,998	0,76	-2,28
Met3c	Hydroxy-K 3	M+16	C13H16CINO2	253,08696	7,342	0,80	-2,47
Met3d	Hydroxy-K 4	M+16	C13H16CINO2	253,08696	8,865	0,97	1,02
Met 4	Dehydroketamin	M-2	C13H14CINO	235,07639	10,293	1,12	0,83
Met5	Dehydronorketamin	M-16	C12H12CINO	221,0607	10,141	1,11	3,75
Met 6	Cyclohexanol-K	M+2	C13H18CINO	239,74112	8,994	0,98	-0,54
Met 7	Cyclohexanol-NK	M-12	C12H16CINO	225,09204	7,462	0,81	-3,5
Met 8	Hydroxy-Met 6	M+18	C13H18CINO2	255,1026	7,481	0,82	-0,54
Met 9a	Hydroxy-Met 7	M+4	C12H16CINO2	241,0870	4,678	0,51	2,56
Met 9b	Hydroxy Met 7	M+4	C12H16CINO2	241,0870	5,193	0,57	3,45
Met 9c	Hydroxy Met 7	M+4	C12H16CINO2	241,0870	6,073	0,66	3,08

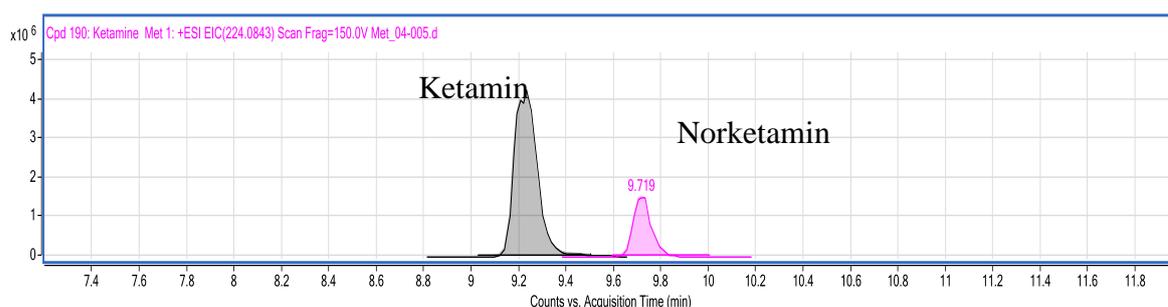


Abbildung 4.7.3: LC-EIC des alkalischen Extraktes der Blutprobe mit positivem Ketaminbefund (K und NK).

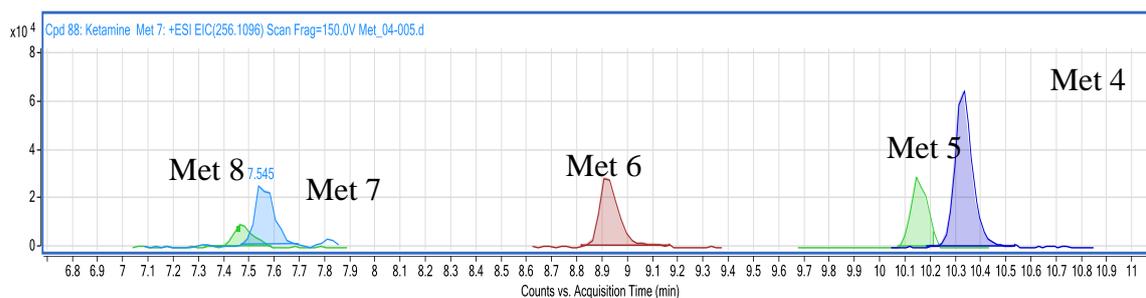


Abbildung 4.7. 4: LC-EIC des alkalischen Extraktes der Blutprobe mit positivem Ketaminbefund (Met 4,5,6,7 und 8).

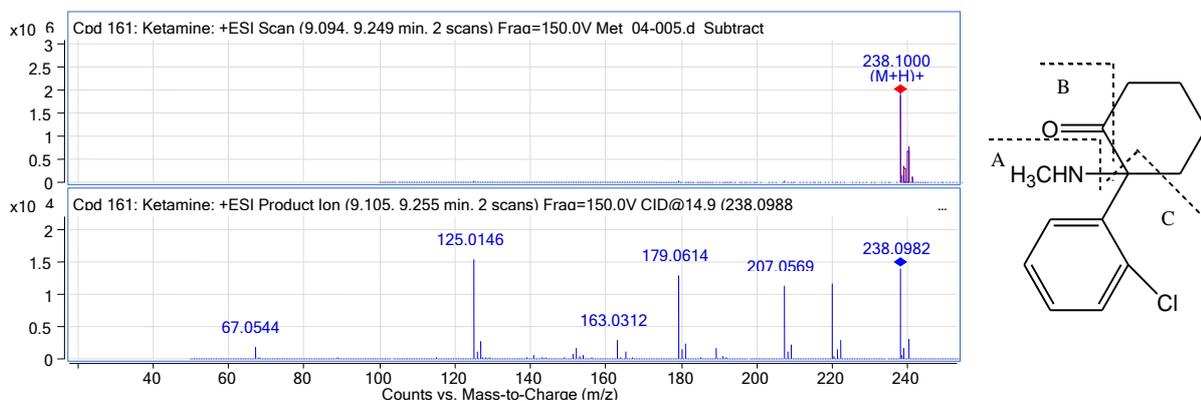


Abbildung 4.7.5: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Ketamin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Ketamin.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
238,0993 [M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ ClNO	Ketamin +H	2,7
220,0879	C ₁₃ H ₁₅ Cl N	Ketamin – (H ₂ O=18,0106)	4,02
207,0569 = D	C ₁₂ H ₁₂ Cl O	KET – A (C ₅ H ₅ N=31,0422)	0,87
189,045	C ₁₂ H ₁₀ Cl	D – (H ₂ O=18,0106)	8,18
179,0614 = E	C ₁₁ H ₁₂ Cl	KET – A – B (C ₂ H ₅ N O=49,0528)	4,71
163,0312	C ₁₀ H ₈ Cl	D – CH ₃	-1,62
152,0258	C ₈ H ₇ Cl N	D – C ₂ H ₆	2,29
125,0146	C ₇ H ₆ Cl	C	4,96
67,0544	C ₅ H ₇		-3,03

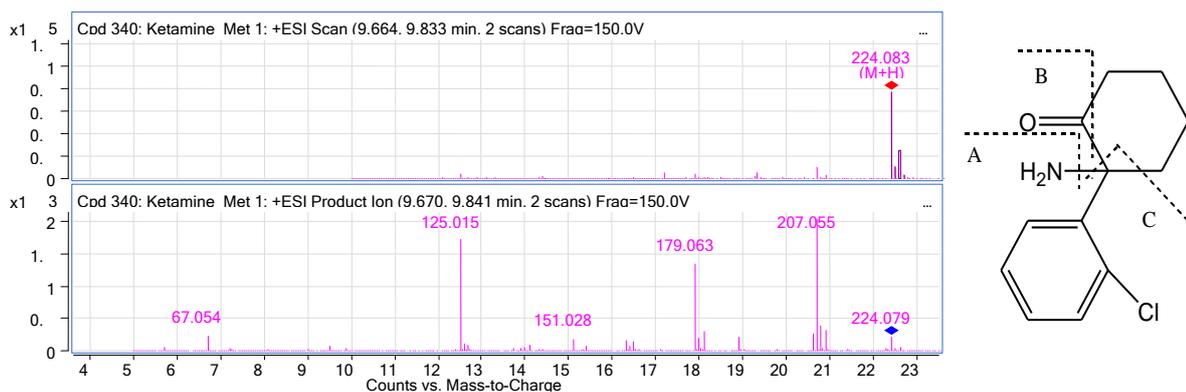


Abbildung 4.7.6: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 1 (Norketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.3: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 1.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
224,0839 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₅ ClNO	Met 1 Norketamin +H	-1
207,0559 = D	C ₁₂ H ₁₂ Cl O	NK – A (N H ₃ =17,0265)	5,84
189,0441	C ₁₂ H ₁₀ Cl	D – (H ₂ O=18,0106)	12,82
179,0631 = E	C ₁₁ H ₁₂ Cl	NK – A – B (CH ₃ NO=45,0215)	-5,26
163,0312	C ₁₀ H ₈ Cl	D – CH ₃	7,72
125,0153	C ₇ H ₆ Cl	C	-0,51
67,0544	C ₅ H ₇		-3,79

Die ESI-LC/MS Analyse von Met 3a bei 6,399 min, Met 3b bei 6,998 min, Met 3c bei 7,342 min und Met 3d bei 8,865 zeigte die Bildung protonierter Molekülonen bei m/z 254 (Abbildung 4.7.10) mit einer um 16 Einheiten höheren Masse. Basierend auf dem Molekulargewicht und den Fragmentierungsmustern der Produktionenspektren (Abbildung 4.7.11 und 4.7.12) wurden diese Metabolite als Hydroxylierungsprodukte zugeordnet.

Die Anwesenheit eines Fragment-Ions bei m/z 138 legt nahe, dass die Hydroxylierung sich am aromatischen Ring bei Met 3a und Met 3c ereignet hat, außerdem findet die Hydroxylierung bei Met 3b und Met 3d eher am aliphatischen Ring statt. Auch für das Molekülon bei m/z 240 mit einer um 2 Einheiten höheren Masse (-14 +16) wurden die Metabolite Met 2a bei 6,046 min, Met 2b mit 5,805 min, Met 2c mit 7,436 und Met 2d mit 8,856 min als Hydroxylierungsprodukte des Norketamins identifiziert (Abbildung 4.7.7). m/z = 138 könnte als diagenistische Masse für die Hydroxylierung am aromatischen Ring bei Met 2a gelten (Abbildungen 4.7.8 und 4.7.9).

Der weite Retentionszeitbereich der Metabolite ist hier dadurch erklärbar, dass bei einigen dieser Metabolite eine intramolekulare H-Brücke im hydroxylierten Produkt entstehen kann, die den Effekt der zusätzlichen OH-Gruppe auf die Retentionszeit zum Teil wieder aufhebt.

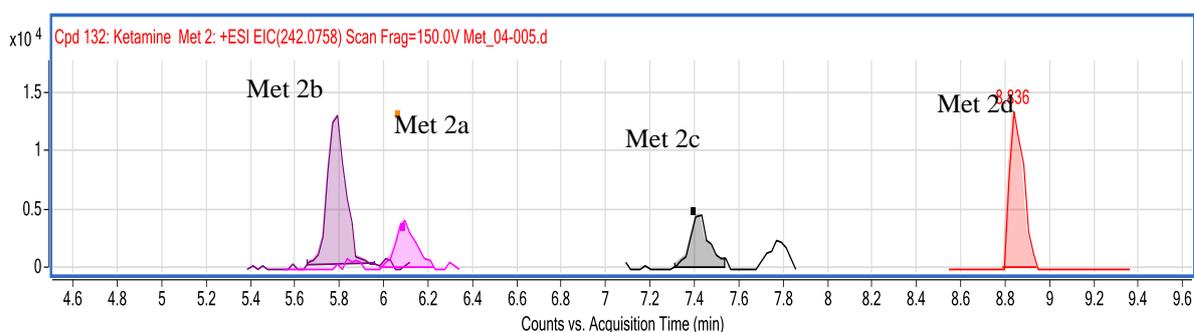


Abbildung 4.7.7: LC-EIC des alkalischen Extraktes einer Blutprobe mit positivem Ketamin-Befund. Dargestellt sind die vier Hydroxy-norketamin

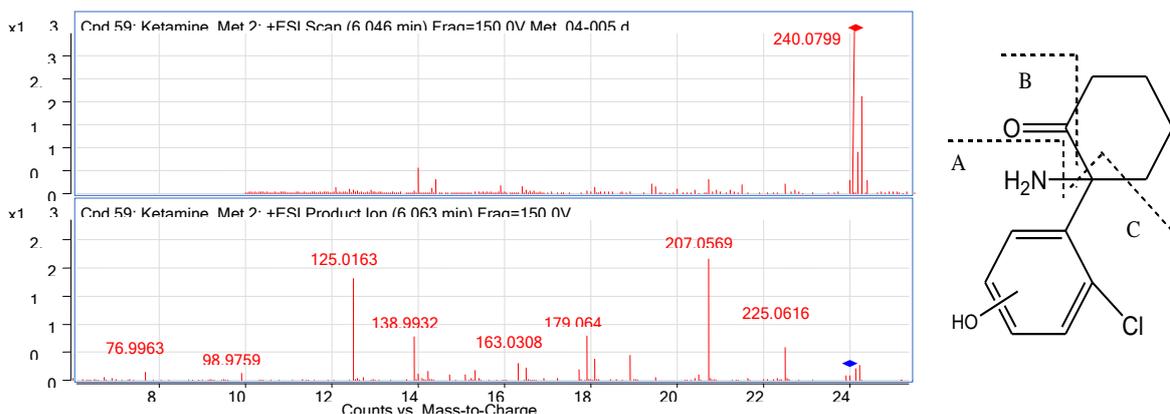


Abbildung 4.7.8: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 2a (aromatisch hydroxyliertes Norketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.4: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 2a.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
240,0799 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₂	Met2a Hydroxy-Norketamin +H	5,65
207,0569 = D	C ₁₂ H ₁₂ Cl O	Met2a - (H ₃ N O =33,0215)	0,97
189,044	C ₁₂ H ₁₀ Cl	D – (H ₂ O=18,0106)	11,37
179,0614 = E	C ₁₁ H ₁₂ Cl	Met 2a – A – B – O (C H ₃ N O ₂ = 61,0164)	-12,1
138,9932	C ₇ H ₄ ClO	C + O - 2H	9,77
125,0163	C ₇ H ₆ Cl	C	-8,45

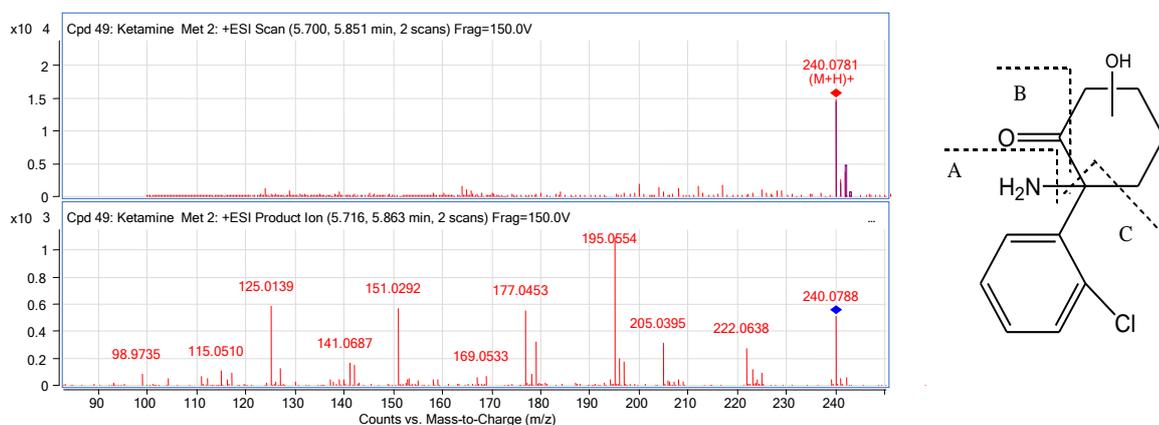


Abbildung 4.7.9: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 2b (aliphatisch hydroxyliertes Norketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.5: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 2b.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
240,0781 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₂	Met2b Hydroxy-NK +H	1,87
222,0638 = D	C ₁₂ H ₁₃ ClNO	Met 2b – H ₂ O	8,86
205,0395	C ₁₂ H ₁₀ Cl O	D – NH ₃ (H ₅ N O =35,0371)	9,08
195,0554 (177,0453+H ₂ O)	C ₁₁ H ₁₂ ClO	Met 2b – A – B (CH ₃ NO=45,0215)	8,888
125,0139	C ₇ H ₆ Cl	C	10,84

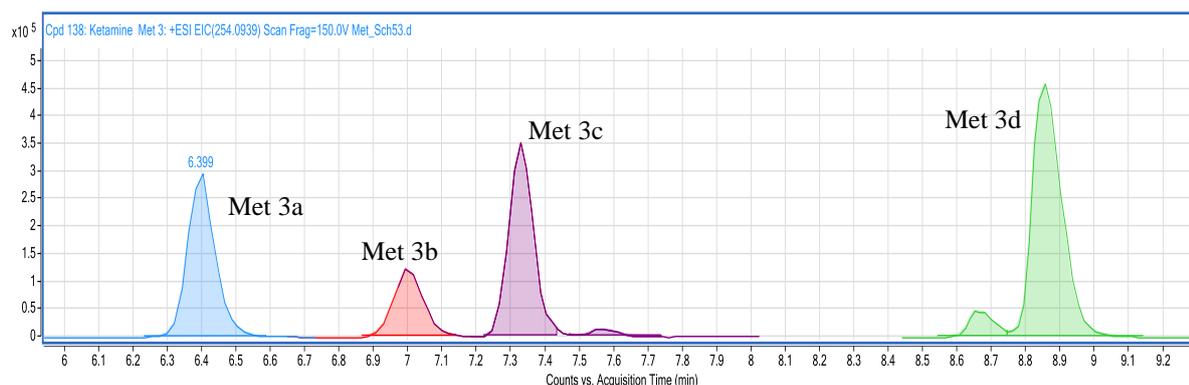


Abbildung 4.7.10: LC-EIC des alkalischen Extraktes einer Blutprobe mit positivem Ketamin-Befund. Dargestellt sind vier Hydroxy-ketamine.

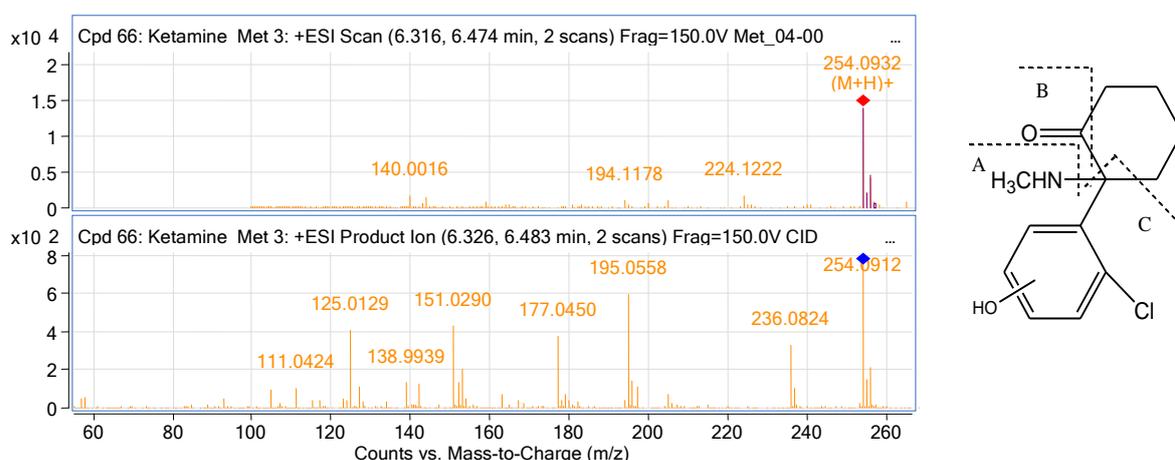


Abb. 4.7.11: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 3a (aromatisch hydroxyliertes Ketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.6: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 3a.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
254,0932 [M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ ClNO ₂	Met 3a Hydroxy-Ketamin +H	3,92
195,0554 (177,0453+H ₂ O)	C ₁₁ H ₁₂ Cl O	Met 3a – A – B (C ₂ H ₅ NO=59,0371)	6,76
138,9932	C ₇ H ₄ ClO	C + O - 2H	4,71
125,0129	C ₇ H ₆ Cl	C	19,1

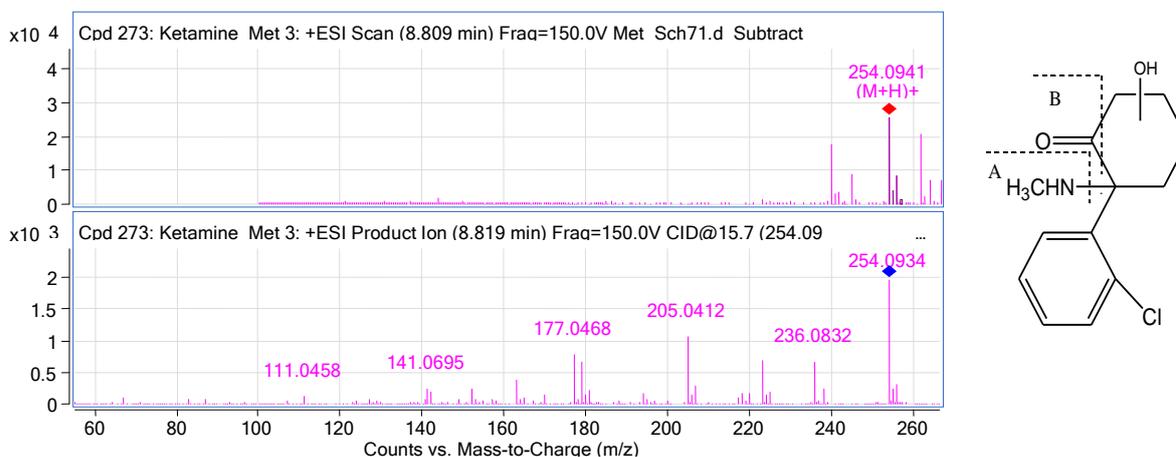


Abbildung 4.7.12: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 3b (aliphatisch hydroxyliertes Ketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.7: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 3b.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
254,0941 [M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ ClNO ₂	Met 3b Hydroxy-Ketamin +H	0,54
236,0832 = D	C ₁₃ H ₁₅ ClNO	Met 2b – H ₂ O	1,89
205,0412	C ₁₂ H ₁₀ Cl O	D – (H ₅ N C)	1,37

Als Dehydrierungsprodukte wurden Met 4 bei 10,293 min als Dehydroketamin und Met 5 bei 10,141 min als Dehydronorketamin festgestellt. (Abbildungen 4.7.13 und 4.7.14 sowie Tabellen 4.7.9 und 4.7.10).

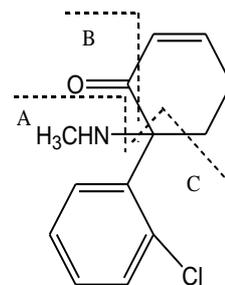
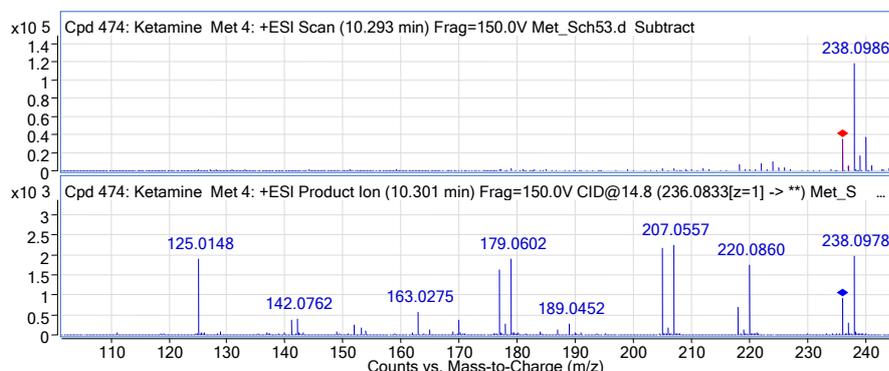


Abbildung 4.7.13: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 4 (Dehydroketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege. Überlagerung mit Ketmain.

Tabelle 4.7.8: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 4.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
236,0837 [M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₅ ClNO	Dehydroketamin +H	0,83
218,075	C ₁₃ H ₁₃ Cl N	DK – (H ₂ O=18,0106)	-8,8
205,04 = D	C ₁₂ H ₁₀ Cl O	DK – A (C H ₅ N=31,0422)	7,18
177,0442 = E	C ₁₁ H ₁₀ Cl	DK – A – B (C ₂ H ₅ N O=49,0528)	13,3
125,0148	C ₇ H ₆ Cl	C	3,81
67,0548	C ₅ H ₇		-7,86

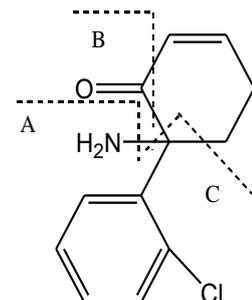
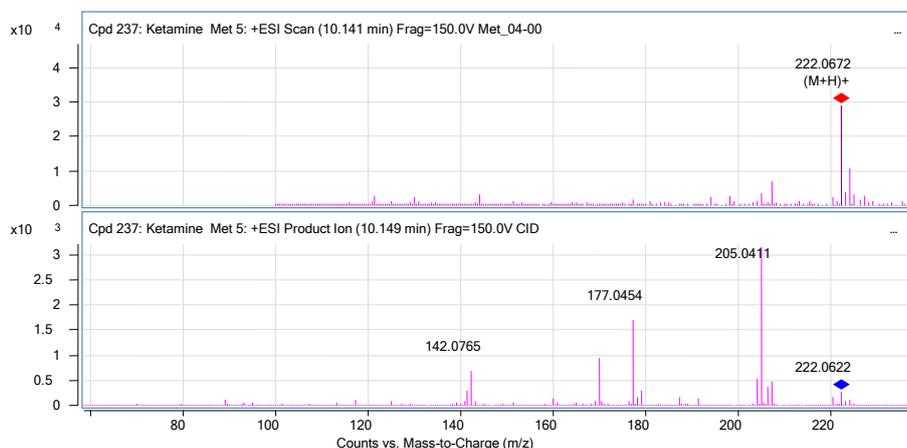


Abbildung 4.7.14: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 5 (Dehydronorketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.9: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 5.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
222,0672 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₃ ClNO	Met 5 Dehydronorketamin +H	3,75
205,0411 = (D-2)	C ₁₂ H ₁₀ Cl O	DNK – A (N H ₃ =17,0265)	2,01
177,0454 = (E-2)	C ₁₁ H ₁₀ Cl	DNK – A – B (CH ₃ NO=45,0215)	6,74
170,0722	C ₁₂ H ₁₀ O	(D – 2) – Cl (34)	2,28
142,0765	C ₁₁ H ₁₀	(D – 2) – Cl – CO	8,61

Der Peak Met6 bei 8,994 min für das Molekölion bei m/z 240 mit nur 0,5 ppm Fehler zur Summelformel $C_{13}H_{19}ClNO$ und auch mit einer um 2 Einheiten höheren Masse als Ketamin wurde als Reduktionsprodukt Cyclohexanol-Ketamin zugeordnet (Abbildung 4.7.15, Tabelle 4.7.10), das im weiteren Verlauf des Abbaus zum Met 9a,b und c hydroxyliert wird (Abbildungen 4.7.18 und 4.7.19, Tabelle 4.7.13).

Auch der Peak Met 7 bei 7,462 min für das Molekölion bei m/z 226 wurde als Reduktionsprodukt Cyclohexanol-Norketamin identifiziert (Abbildung 4.7.15, Tabelle 4.7.10), das im weiteren Verlauf des Abbaus zum Met 8 bei 7,514 min hydroxyliert wurde (Abbildung 4.7.17 und Tabelle 4.7.12).

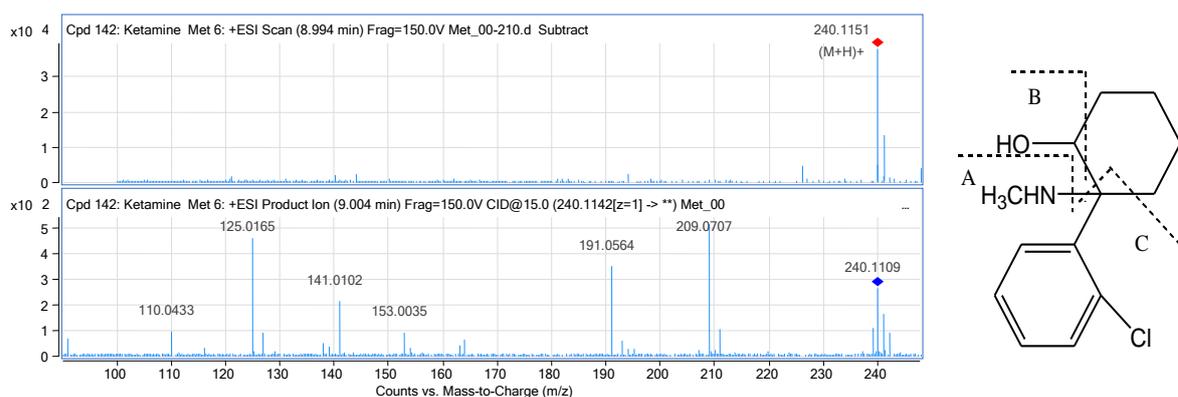


Abbildung 4.7.15: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 6 (Cyclohexanol-Ketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.10: Charakteristische m/z -Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 6.

Charakteristische m/z -Werte	Summelformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
240,1151 $[M+H]^+$	$C_{13}H_{19}ClNO$	Cyclohexanol Ketamin +H	-0,54
209,0707 = D (207+2)	$C_{12}H_{14}ClO$	Cyclohexanol KET – A (CH5 N=31,0422)	9,89
191,0564 (189+2)	$C_{12}H_{12}Cl$	D – H ₂ O	14,8
125,0165	C_7H_6Cl	C	20,5

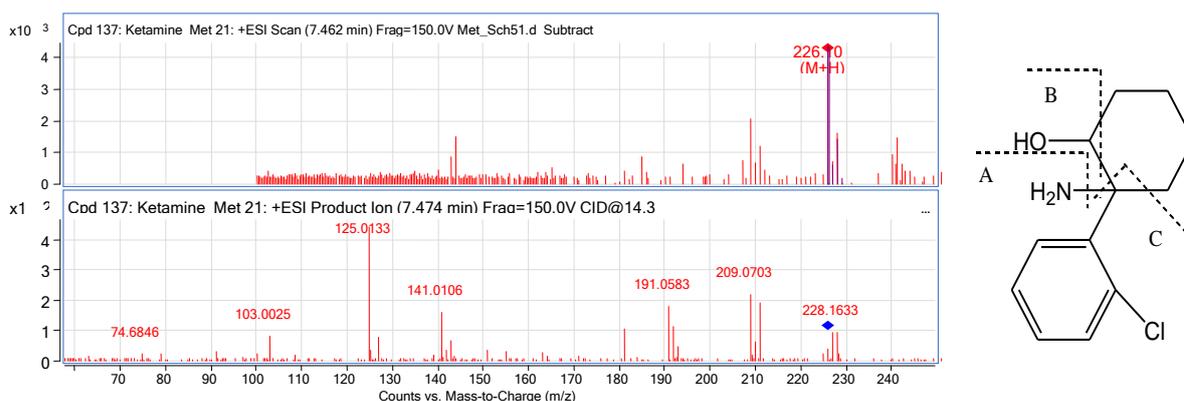


Abbildung 4.7.16: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Met 7 (Cyclohexanol-Norketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.11: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 7.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
226,1002 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₇ ClNO	Cyclohexanol NK +H	-3,5
209,0703 = D (207+2)	C ₁₂ H ₁₄ Cl O	Cyclohexanol NK – A (NH ₃)	11,8
191,0583 (189+2)	C ₁₂ H ₁₂ Cl	D – H ₂ O	20,0
125,0133	C ₇ H ₆ Cl	C	15

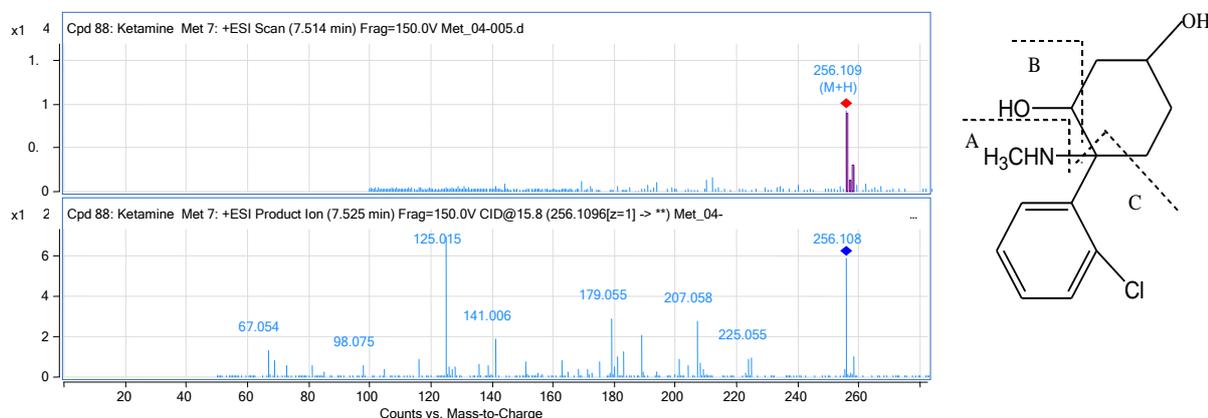


Abbildung 4.7.17: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 8 (Hydroxycyclohexanol-Ketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.7.12: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 8.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
256,1094 [M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₉ ClNO ₂	Met 8 Hydroxy Cyclohexanol Ketamin +H	-0,54
207,058 = D	C ₁₂ H ₁₂ Cl O	Met 8 – (C H ₇ N O)	-4,17
125,0155	C ₇ H ₆ Cl	C	-2,21

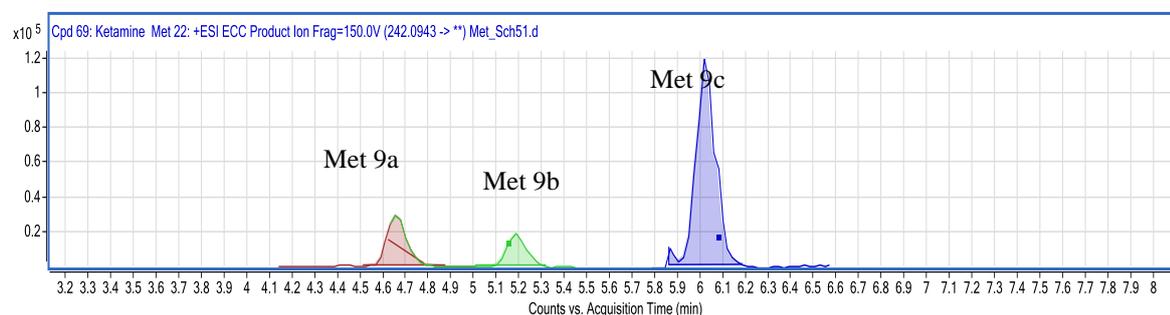


Abbildung 4.7.18: LC-EIC des alkalischen Extraktes der Blutprobe des Ketamin Befunds (Met 9 a, b and c).

Tabelle 4.7.13: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Met 9c.

Charakteristische m/z-Werte	Summformel	Mögliche Strukturinterpretation	ppm Fehler
242,9935 [M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₇ ClNO ₂	Hydroxy Cyclohexanol NK +H	3,08
207,0531 = D	C ₁₂ H ₁₂ Cl O	Met 9 – (N H ₅ O)	12,6
125,0138	C ₇ H ₆ Cl	C	11,85

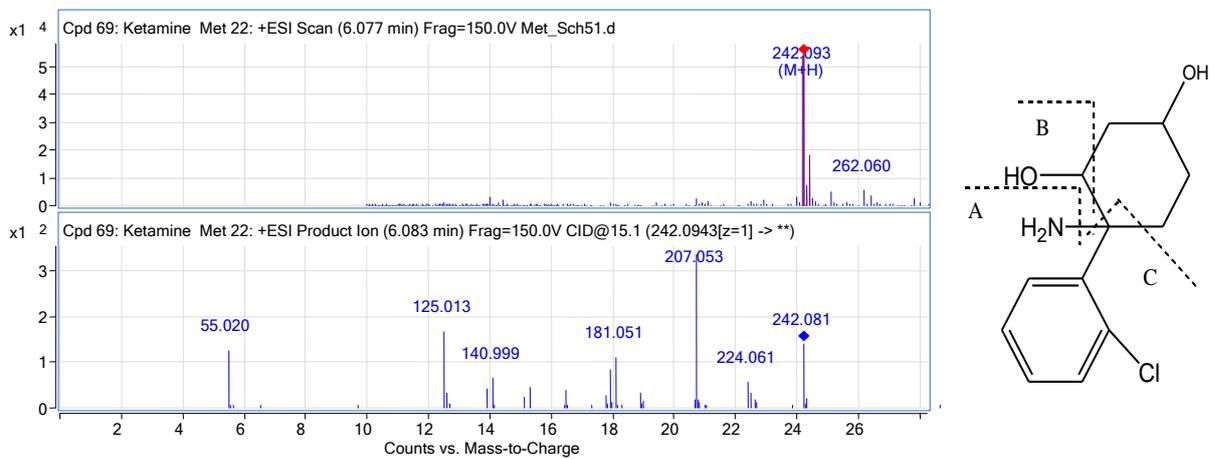


Abbildung 4.7.19: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Met 9c (Hydroxy-Cyclohexanol-Norketamin) und Interpretation der Fragmentierungswege.

Mittels HPLC-DAD wurden die Untersuchungen für die 160 Schweineserumproben (mit Laufmittel E durchgeführt, in denen 10 Metabolisierungsprodukte des Ketamins nachgewiesen wurden, die alle eine kürzere Retentionzeit hatten als das Ketamin (Abbildung 4.7.20, Tabelle 4.7.14).

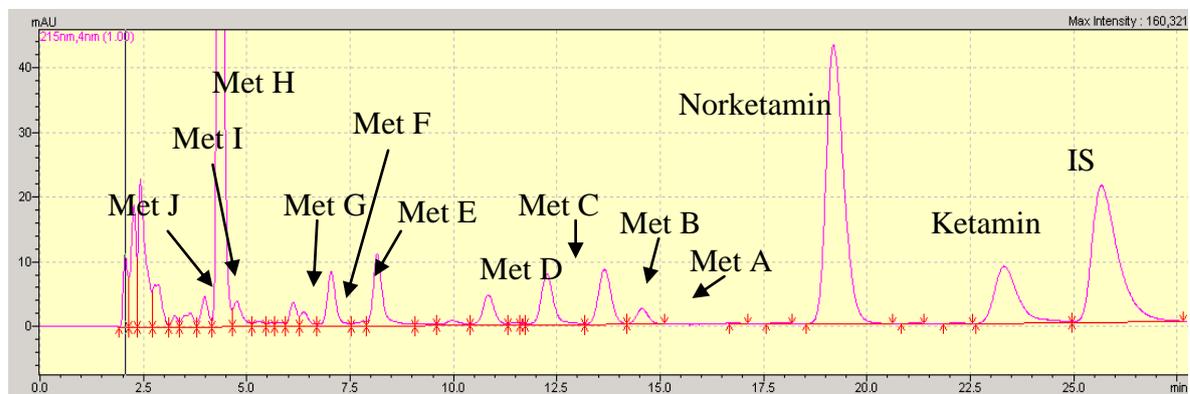


Abbildung 4.7.20: HPLC-Kurve des alkalischen Extraktes einer Serumprobe aus der Ketamin-Studie an Schweinen. IS = Dimethirimol

Alle diese Metabolite haben ein identisches UV-Spektrum mit Ketamin außer Met C welcher aber ein ähnliches UV-Spektrum hat (Abbildung 4.7.21).

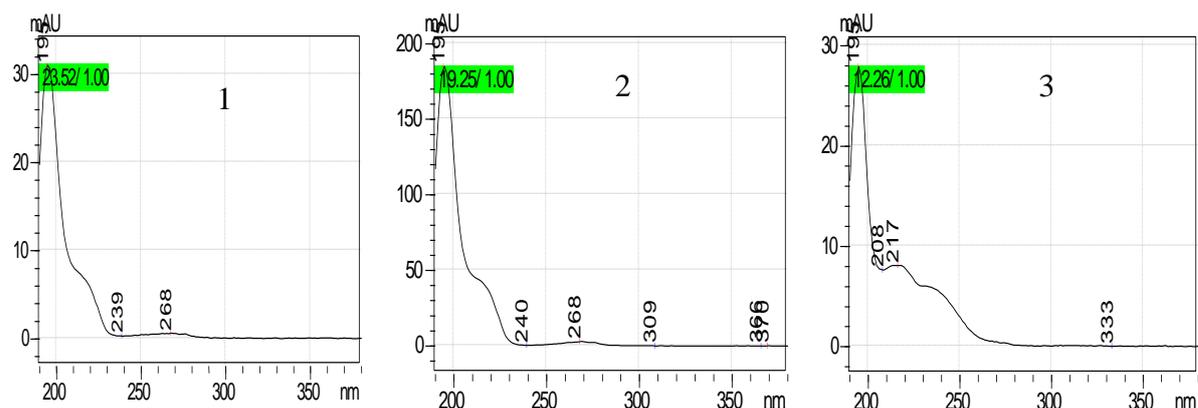


Abbildung 4.7.21: UV Spektren von Ketamin (1), Norketamin (2) und des Metaboliten Met C (3). Die Spektren der Metabolite B,D,E,F,G,H,I, J sind praktisch identisch mit dem von Norketamin (2).

Die Zuordnung zu möglichen Stoffwechselprodukten des Ketamins gestaltete sich aufgrund des Fehlens von Vergleichssubstanzen schwierig. Da das UV-Spektrum durch die o-Chlorphenyl-gruppe bestimmt wird, sollten alle Metabolite mit identischem UV-Spektrum durch Reaktion am aliphatische Teil des Moleküls entstanden sein. Das betrifft nach Vergleich mit Abbildung 4.7.1 alle Metabolite außer den aromatisch hydroxylierten Produkten und den Dehydro-metaboliten, bei denen durch die α,β -ungesättigte Doppelbindung ein zusätzlicher Chromophor entsteht.

Entscheidendes Kriterium ist die Verkürzung der Retentionszeit (Tabelle 4.7.14). Danach könnte es sich bei den Metaboliten B und D um Verbindungen mit einer Hydroxygruppe und bei den Metaboliten H-J um Produkte mit zwei Hydroxygruppen handeln. Für die Substanzen mit mittlerer Retentionszeit (Metabolite E-G) bleibt es unklar.

Der weite Retentionszeitbereich der Metaboliten kann auch dadurch erklärt werden, dass eine intramolekulare H-Brücke im hydroxylierten Produkte entstehen kann, die den Effekt der zusätzlichen OH-Gruppe zum Teil wieder aufhebt. Bekräftigt wird dieser Vorschlag durch die Ergebnisse von LC-TOF-MS. Für Met C könnte die Hydroxylierung am Benzolring erfolgt sein, so dass die gebildete Phenolstruktur einen veränderten Chromophoren aufweist.

Tabelle 4.7.14: Retentionszeiten sowie Retentionszeitenquotienten für Ketamin und 10 Metabolisierungsprodukten im Schweinserum und mögliche Zuordnung der Metabolite durch Vergleich der Retentionszeiten und mit LC-QTOF-MS

Peak	RT, min	Q _{RT}	Mögliche Zuordnung der Metabolite durch Vergleich der Retentionszeiten mit LC-QTOF-MS
Ketamin	23,52	1,00	Ketamin
Met A Norketamin	19,25	0,82	Met 1
Met B	13,64	0,58	Met 6
Met C	12,26 *	0,52	Met 3c
Met D	10,84	0,46	Met 8
Met E	7,02	0,30	Met 3b
Met F	6,39	0,27	Met 3b
Met G	6,13	0,26	Met 2a
Met H	4,75	0,20	Met 2b
Met I	4,33	0,18	Met 9c
Met J	3,67	0,16	Met 9a

Die Ketamin-Blutkonzentration (C_{KET}) der im Institut untersuchten Todesfälle, die dazu bestimmten Konzentrationen für das Norketamin (C_{NK}) und die Quotienten aus diesen Konzentrationen ($Q = C_{NK}/C_{Ket}$) sind für 14 Todesfälle in Tabelle 4.7.15 zusammengestellt.

Tabelle 4.7.15: Blutkonzentrationen bei Todesfällen mit positivem Ketaminbefund und darauf bezogene Konzentration des Norketamins mittels HPLC-DAD.

Fall	C_{KET} in $\mu\text{g/ml}$	C_{NK} in $\mu\text{g/ml}$	$Q = C_{NK}/C_{KET}$	Vorgeschichte	Bemerkung
1	1,95	0,00	0	Suizid, Fenstersturz, 20w	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich.
2	18,2	2,9	0,16	Suizid, Brandverletzungen, 69w, Blutalkohol 1,9 mg/g	Über therapeutischem Bereich, Infusion in der agonalen Phase.
3	2,6	0,00	0	Motorradunfall, 25m	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich. THC-Konzentration liegt mit 1,58 ng/ml noch deutlich über dem für eine akute Beeinflussung angenommenen unteren Grenzwert von 1,0 ng/ml. akuten Cannabiswirkung
4	5,5	0,00	0	PKW-Unfall mit schweren Brandverletzungen, 58w	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich.
5	0,99	0,00	0	Suizid, Fenstersturz, 38w	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich.
6	5,5	0,00	0	Brand, mit schweren Brandverletzungen	Notfallmedizin therapeutischen Bereich.
7	11,3	0,00	0	Herzinfarkt und Schlaganfall, 61 m	über therapeutischem Bereich, Infusion in agonalen Phase.
8	12,7	11,8	0,92	Fahrradunfall, 23w	über therapeutischem Bereich, künstlichen Koma
9	6,7	0,00	0	Hirnödem, 28w	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich.
10	19,3	0,00	0	Blutgerinnsel, operiert, 42 w	über therapeutischen Bereich, künstlichen Koma
11	37,8	0,00	0	Tablettenintoxikation, 63 w	über therapeutischem Bereich, Infusion in der agonalen Phase.
12	0,38	0,00	0	Motorradunfall, 43 m	Notfallmedizin, therapeutischer Bereich.
13	45,3	36,8	0,81	multiple Organversagen, 80w	i.V.-Narkose-Mittel Ketamin, über therapeutischen Bereich
14	66,3	19,8	0,30	Wohnungsbrand, BAK 1,8%, 56 m	Narkoseeinleitung, über therapeutischen Bereich

* bei den mit 0 bezeichneten Quotienten lag der entsprechende Metabolit unterhalb der Nachweisgrenze der Analysenmethode. m = männlich, w = weiblich.

Es handelt sich bei dem identifizierten Wirkstoff Ketamin um ein Medikament, das vorrangig in der Notfallmedizin zum Einsatz kommt. Die im Blut der Betroffenen gemessenen Wirkstoffkonzentrationen, die nach Vergleich mit Literaturdaten und früher bei uns analysierten Fällen im therapeutischen Bereich (1-6 $\mu\text{g/ml}$) liegen, wurde mit hoher

Wahrscheinlichkeit während der Reanimationsmaßnahmen verabreicht. In diesem Fall sollte es für die Todesursache ohne Bedeutung sein.

Bei den Betroffenen, bei denen die Blutkonzentration sich höher als im typischen therapeutischen Bereich befindet (mehr als 7 µg/ml), könnte diese hohe Konzentration dadurch erklärt werden, dass der Todeseintritt bei laufender Infusion erfolgte, wobei der Wirkstoff nicht mehr auf den gesamten Körper verteilt wurde. Unter Beatmung kommt es auch bei hoher Ketamindosis kaum zu negativen Einflüssen auf die Vitalfunktion, so dass eine Vergiftung mit diesem Medikament unwahrscheinlich ist. Norketamin war nur in vier Fällen nachweisbar, wobei Q_{nor} von 0 bis 0,92 beträgt.

Die teilweise hohen Norketaminkonzentrationen zeigen, dass die Gabe des Medikaments länger überlebt wurde, wobei eine fortlaufende Medikation während einer längeren Reanimationsphase erfolgt sein kann. Das Fehlen von Norketamin in Fällen mit hoher Ketaminkonzentration bedeutet, dass, die Überlebenszeit nach der Verabreichung sehr kurz war. Ein first-pass Metabolismus scheidet aus, da die Verabreichung generell durch Injektion erfolgt. Wie in der Tabelle 4.7.14 ersichtlich ist, war der Hauptmetabolit Norketamin daher nicht in allen Fällen nachweisbar.

Als Zusammenfassung der Schweinstudie [247] bezüglich der Ketamin- und Norketaminkonzentrationen zeigen Abbildungen 4.7.22 und 4.7.23 den Zeitverlauf der Ketamin-, Norketamin- und Azaperonkonzentrationen. Ketamin (Ausgangsdosis 20 mg/kg, in Halsmuskulatur injiziert) erreichte in der 10. Minute seine maximale Konzentrationen (9,5 µg/ml) im Blut. Ein weitere Peak, der nur auf Einbeziehung von Tieren mit Ketaminnachdosierung (intramuskulär 5-60 mg/kg nach 50-70 Minuten Versuchablauf) zurückzuführen ist, trat zur 60 Minute auf. Azaperon (intramuskulär Ausgangsdosis 2 mg/kg) erreichte seine maximale Konzentration (0,4 µg/ml) 30 Minuten nach Injektion. Bis zur 300. Minute fielen die Konzentration von Ketamin und Azaperon auf ein Minimum von durchschnittlich 0,5 µg/ml Ketamin bzw. 0,01 µg/ml Azaperon.

Die Norketaminkonzentrationen erreichte ihre höchsten Werte von durchschnittlich 6,0 µg/ml um die 60. Minute. Danach fiel sie vorübergehend auf durchschnittlich von 5,8 µg/ml (Ketamin-nachdosierung s. o.) vor dem endgültigen Absinken zu erreichen.

Dass bei diesen chirurgischen Eingriffen (Kastration von Jungebern) bei der gewählten Kombination von Ketamin mit Azaperon ein erhöhter Stress ausblieb, wird auch daraus geschlossen, dass der Kortisolspiegel im Referenzbereich blieb. Neben Ketamin und dessen Metaboliten wurden auch Azaperon und Kortisol in allen Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt. Die ausführliche Beschreibung der gesamten Tierversuches erfolgte in der Dissertation von U. Rintisch [247].

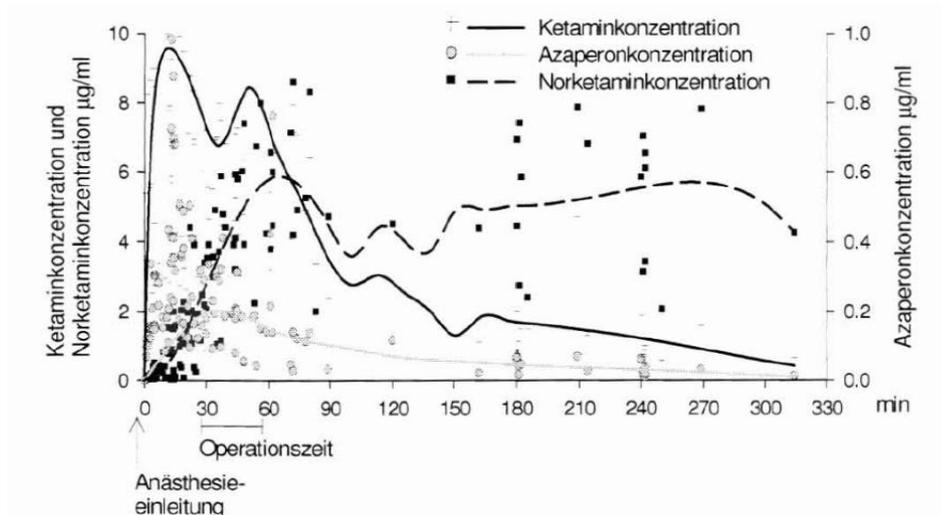


Abbildung 4.7.22: Zeitverlauf der Ketamin-, Norketamin- und Azaperonkonzentrationen (Einzelwerte und polynomiale Regression von 13 Tieren mit Ketaminnachdosierung) [247].

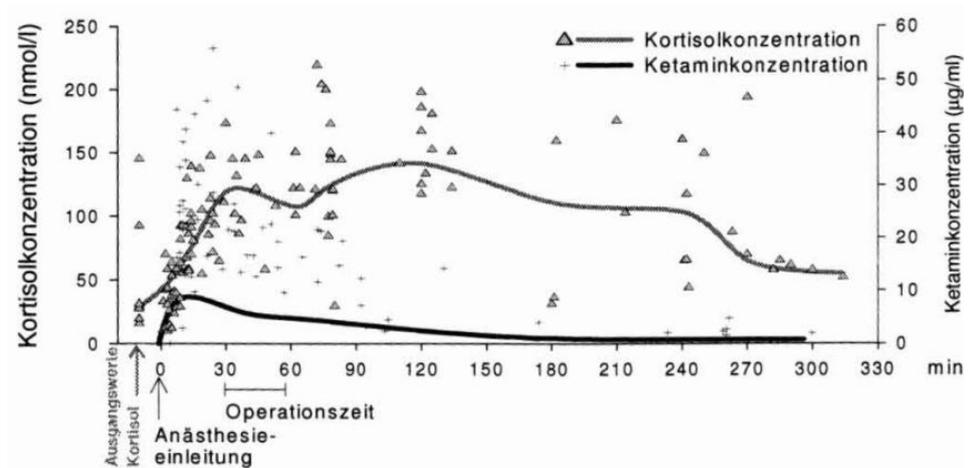


Abbildung 4.7.23: Zeitverlauf der Ketamin-, und Kortisolkonzentrationen (Einzelwerte und polynomiale Regression von 9 Tieren ohne Ketaminnachdosierung) [247].

4.8 Amitriptylin

Amitriptylin (AM) wird seit seiner Einführung in den 1960er Jahren als typisches trizyklisches Antidepressivum (TCA) sehr häufig für die Behandlung von Depressionen verwendet.

Bei der Verstoffwechslung des Amitriptylins entstehen durch Desmethylierung der aktive Metabolit Nortriptylin und das Desmethylnortriptylin. Zwei wichtige Hydroxylierungsmetabolite an der 10 Position sind das 10-Hydroxyamitriptylin und das 10-Hydroxynortriptylin. Es wurden weitere Hydroxylierungsabbauprodukte sowie auch das N-Oxid identifiziert [248-250].

Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit 20 Intoxikationsfälle mit Amitriptylin. Mittels LC-MS/TOF (Agilent und Waters) wurden 20 mögliche Metabolite festgestellt. Die in Tabelle 4.8.2 aufgeführten Massen wurden in den Blutextrakten gefunden und entsprechenden Metaboliten zugeordnet. Die Strukturformeln der vermuteten Metabolite sind in Abbildung 4.8.2 zusammengestellt.

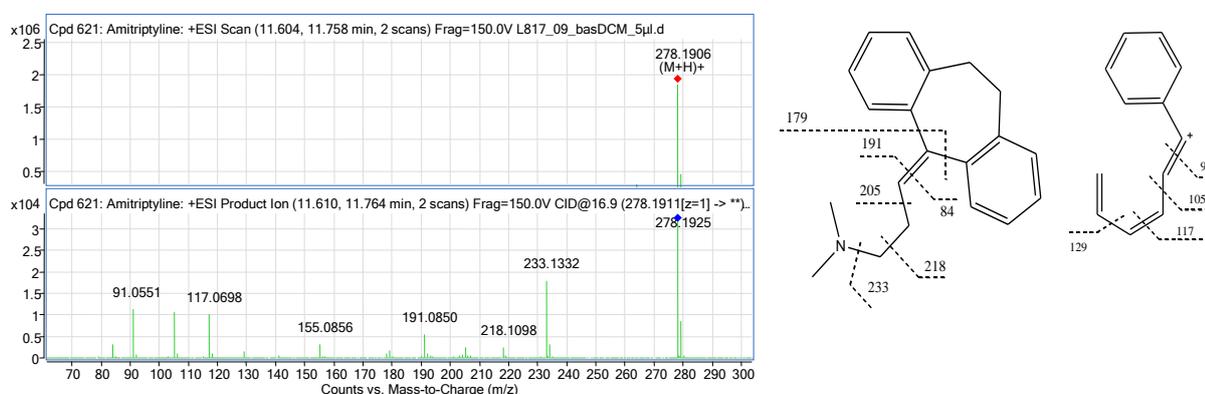


Abbildung 4.8.1: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Amitriptylin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.8.1: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Amtriptylin.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
278,1906 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ N	Amitriptylin + H	-0,91
233,1332	C ₁₈ H ₁₇	278 – (45,0578 = C ₂ H ₇ N)	-3,31
218,1098	C ₁₇ H ₁₄	278 - (60,0813 = C ₃ H ₁₀ N)	-3,65
205,1011	C ₁₆ H ₁₃	278 – (73,0891 = C ₄ H ₁₁ N)	0,78
191,085	C ₁₅ H ₁₁	278 – (87,1048 = C ₅ H ₁₃ N)	2,89
179,0859	C ₁₄ H ₁₁	278 – (99,1048 = C ₆ H ₁₃ N)	-1,92
155,0856	C ₁₂ H ₁₁	278 - (123,1048 = C ₈ H ₁₃ N)	-0,41
117,0698	C ₉ H ₉	278 – (161,1204 = C ₁₁ H ₁₅ N)	0,29
105,0701	C ₈ H ₉	278 – (173,1204 = C ₁₂ H ₁₅ N)	-1,9
91,0551	C ₇ H ₇	278 – (187,1361 = C ₁₃ H ₁₇ N)	-9,94
84,0813	C ₅ H ₁₀ N	278 – (194,1096 = C ₁₅ H ₁₄)	-6,85

Tabelle 4.8.2: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Amtriptylin-metaboliten.

Met.	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT*	ppm Err.	Fragmente							
Met A1	C20 H24 N O Hydroxy-AMT	294,1860	8,86	-2,55	276	231	216	205	191	153	84	
Met A2	C20 H24 N O HydroxyAMT	294,1862	9,73	-3,43	276	231	216	205	191	153	84	
Met A3	C20 H24 N O AMT-N-oxid	294,1868	11,79	-5,4		233	218	205	191	179	-	
Met A4	C20 H24 N O Hydroxy-AMT	294,1866	10,98	-4,57	276		216				84	
Met B1	C20 H24 N O2 Dihydroxy-AMT	310,1799	8,48	1,29	292	231	216	205	191	103	58	
Met B2	C20 H24 N O2 Dihydroxy-AMT	310,1806	9,23	-1,25		264		219	191	141	84	
Met B3	C20 H24 N O2 Hydroxy-AMT-N-oxid	310,1812	11,42	-3,3		247	215		193	178		
Met 1	C19 H22 N Desmethyl-AMT	264,1762	11,04	-5,7		233	218	205	191	179	70	
Met 1A1	C19 H22 N O Hydroxy-desmethyl-AMT	280,1715	8,23	-7	262	231	216	205	191	153	70	
Met 1A2	C19 H22 N O Hydroxy-desmethyl-AMT	280,1700	9,30	-1,35	262	231	216	205	191	153	70	
Met 1B1	C19 H22 N O2 2 x Hydroxilierung + Desmethylierung AMT	296,1639	9,14	2,15		235		193		128		
Met 3	C20 H22 N O N-Acetylierung + N-Didesmethylierung AMT	292,1714	13,17	-6,2		233	218		191	179	72	
Met 6	C21 H24 N O N-Acetylierung + N-Desmethylierung AMT	306,1868	13,32	-5,9	264	233	218		191	179	86	
Met 7	C18 H17 Dimethyl-amin-Abspaltung	233,1311	11,05	-2,75			218	205	191	179		
Met 8	C20 H22 N Dehydrogenierung AMT	276,1745	8,38	-1,78		231	216	205	191		84	
Met 8A	C20 H22 N O Hydroxylierung + Dehydrierung AMT	292,1684	9,16	3,99	247	229				178	84	
Met 9	C19 H20 N Dehydrierung + Desmethylierung AMT	262,1606	8,26	-5,95		231	216	205	191		70	
Met 9A	C19 H20 N O Hydroxylierung + Dehydrierung + Desmethylierung AMT	278,1578	8,9	-13,7	247	229		203			70	
Met 10	C20 H20 N O N-Acetylierung + N-Desmethylierung + Dehydrierung AMT	290,1548	11,06	-3,03		231	216		191		72	
		[M-H] ⁻	RT**	ppm Err.								
Met 4	C18 H15 O2	263,1070	5,41	2,5					* Agilent	** Waters		

Durch LC-TOF/MS wurden in den Blutextrakten der Amitriptylin-Vergiftungen unverändertes Amitriptylin sowie die Metabolite Met1 Desmethylamtriptylin (Nortriptylin) und Met6 als weiteres N-Acetylierungsprodukt von Met1 gefunden.

Durch weitere Desmethylierung entsteht Met2, Didesmethylamtriptylin, welches nur als N-Acetylierungsprodukt Met3 identifiziert wurde. Für die Amtriptylin-Derivate bei m/z 294 (278 +16) Met A wurden vier Peaks gefunden, von denen MetA1 und MetA2 als Hydroxylierungsprodukte an der Ethylen-Brücke im zentralen Ring, MetA4 als aromatisches Hydroxylierungsprodukt und MetA3 als N-oxid zugeordnet wurden. Bei m/z 310 (278+32, Met B) wurden 3 Peaks gefunden. MetB1 wurde als Dihydroxylierungsprodukt im Bereich zwischen Stickstoff und zentralem Ring und an der Ethylen-Brücke in zentralen Ring zugeordnet, während Met B2 als Dihydroxylierungsprodukt am aromatische Ring und am Ethylen-Brücke in zentralen Ring angesehen wird. Met B3 wurde einem Hydroxy-N-oxid zugeordnet.

Die Masse bei m/z 276 (278-2) entspricht als Met 8 einem Amitriptylin-Derivate mit einer Doppelbindung im Siebenerring, die durch Wasserelimination aus einem Hydroxylierungsprodukt entsteht. Met 7 entsteht durch Abspaltung der Dimethylaminogruppe und Met 4 ist der im Negativ-Modus nachweisbare Propionsäuremetabolit. Zusätzlich wurden Metabolite beobachtet, bei denen eine Kombination dieser Abbauewege auftritt.

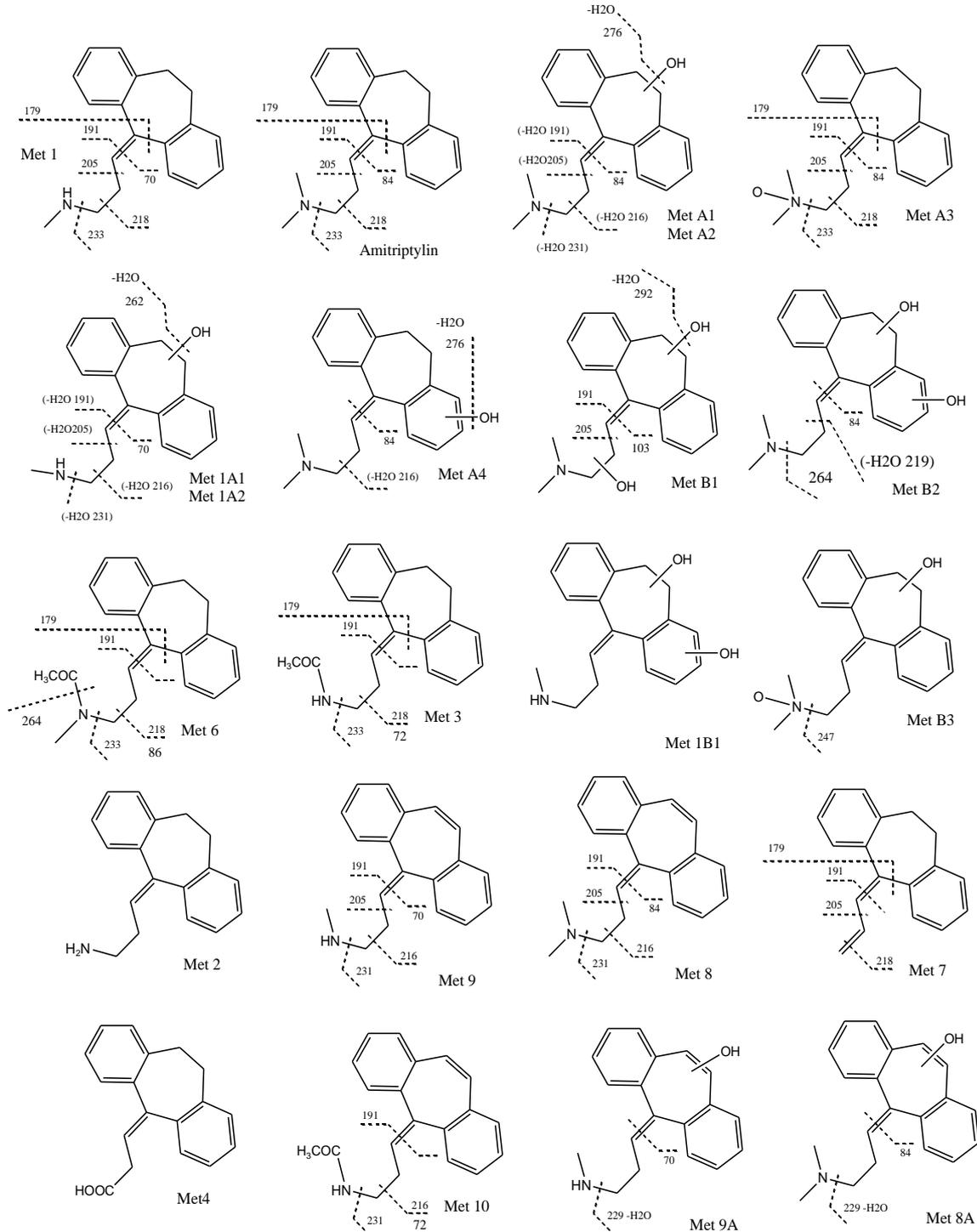


Abbildung 4.8.2: Metabolisierungsschema von Amitriptylin und mögliche Strukturinterpretation

In den 12 innerhalb dieser Arbeit ausgewerteten Amitriptylin-Fällen ließen sich durch HPLC-DAD in den Blutproben 4 Metabolite nachweisen (s. Abbildung 4.8.3). Es sollte sich hierbei in der Reihenfolge der Retention um Hydroxyamitriptylin (Met A1, RRT = 0,329), Didesmethylamitriptylin (Met 2, RRT = 0,910), Desmethylamitriptylin (Nortriptylin Met 1, RRT = 1,157) und um Amitriptylin N-oxid (Met A3, RRT = 1,654) handeln. Die Identifizierung erfolgte zum einen durch Vergleich mit vorhandenen Testsubstanzen (Met 2 und Met A3) und zum anderen mit Hilfe der LC-TOF/MS Ergebnisse und der Retentionszeitverschiebung [213].

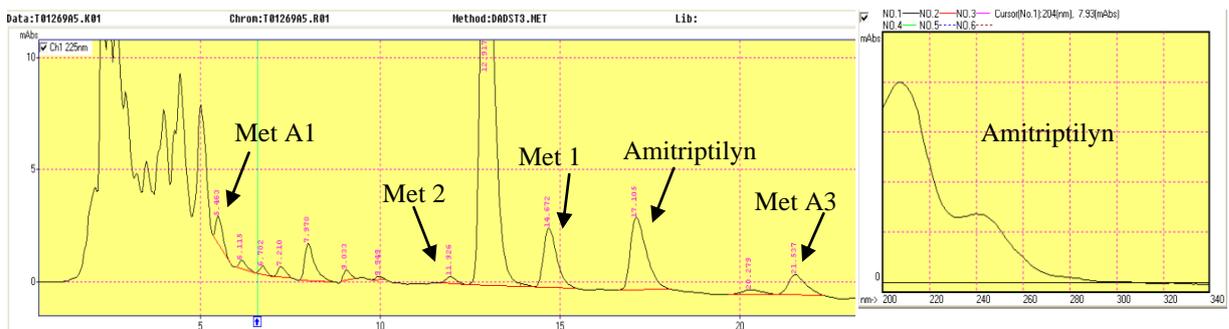


Abbildung 4.8.3: HPLC-Kurve des Blutextraktes einer Amitriptylin-Intoxikation und UV-Spektrum von Amitriptylin.

4.9 Levomepromazin

Levomepromazin LEV (Methotrimepromazin) ist ein Phenothiazin-Derivat. Es wurde als Neuroleptikum, Analgetikum und Antihistaminikum verwendet. Wie andere Phenothiazine wird es beim Menschen durch verschiedene Abbauewege metabolisiert, und 10 seiner Metaboliten sind bisher im Urin von psychiatrischen Patienten identifiziert worden [251,252].

Zwei Metabolite, *N*-Desmethyl-levomepromazin und Levomepromazin-sulfoxid, wurden ebenfalls im Plasma von psychiatrischen Patienten festgestellt. Nach oraler Verabreichung erreichen beide Metabolite in der Regel höhere Plasmakonzentrationen als Levomepromazin selbst. *O*-Desmethyllevomepromazin und zwei Monohydroxylierungsprodukte von Levomepromazin wurden als Konjugate im Urin von psychiatrischen Patienten ermittelt [252].

Zum Levomepromazin wurden zwei Todesfälle aus dem Sektionsgut unsers Institutes untersucht. Mit LC-TOF-MS (System Agilent und Waters) wurden neben Levomepromazin 19 Metabolite identifiziert (Tabelle 4.9.2 und Abbildung 4.9.2). Die Spektren des Wirkstoffs ($[M+H]^+ = 415,1469$) sind in Abbildung 4.9.1 dargestellt.

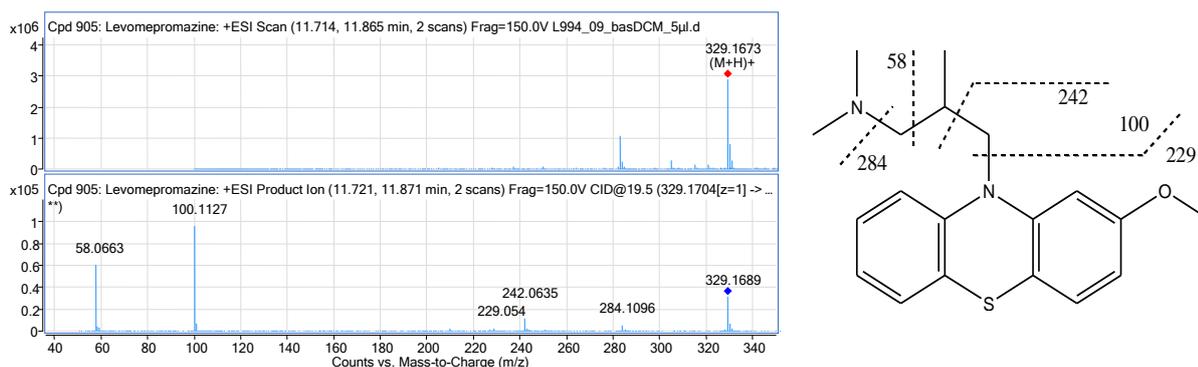


Abbildung 4.9.1: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Levomepromazin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.9.1: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Levomepromazin

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
329,1673 $[M+H]^+$	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O S	Levomepromazin + H	2,9
284,1096	C ₁₇ H ₁₈ N O S	329 – (45,0578=C ₂ H ₇ N)	2,76
242,0635	C ₁₄ H ₁₂ N O S	329 – (87,1048=C ₅ H ₁₃ N)	-0,22
229,054	C ₁₃ H ₁₁ N O S	329 – (100,1126=C ₆ H ₁₄ N)	7,05
100,1127	C ₆ H ₁₄ N	329 – (229,0561=C ₁₃ H ₁₁ N O S)	-6,43
58,0663	C ₃ H ₈ N	329 – (271,1031=C ₁₆ H ₁₇ N O S)	-21

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.9.2: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Levomepromazinmetaboliten.

Met.	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente			
Met 7A	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₂ S LEV Sulfoxid	345,163 2	9,20	-0,3	314-300	228	100	58
Met 7B	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₂ S Hydroxy-LEV	345,168 5	10,0 1	-15,7	300	258	100	58
Met 7C	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₂ S Hydroxy-LEV	345,164 7	11,0 8	-4,62	314	283	242-229	100
Met 8A	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₃ S LEV+ 2[O]	361,160 6	7,63	-7,10	344-299	258	244-100	58
Met 8B	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₃ S LEV + 2[O]	361,159 1	8,11	-2,8	344-299	244	100	58
Met 8C	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₃ S LEV + 2[O]	361,158 9	9,05	-2,6	274	210	100	58
Met 1	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O S N-Desmethyl-LEV	315,155 3	9,84	-11		228	100	58
Met 2	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O S O-Desmethyl-LEV	315,157 2	11,2 8	-14,8	284	242	229	86
Met 1A	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O ₂ S N-Desmethyl-LEV +[O]	331,149 8	7,48	-6,6	270	228	100	58
Met 1B	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S N-Acetyl N-Desmethyl-LEV	357,168 3	14,0 7	-14,47			128	86
Met 2A	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O ₂ S O-Desmethyl-LEV +[O]	331,151 4	8,35	-11,81	314-300	246	229-210	86
Met 2B	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O ₂ S O-Desmethyl-LEV +[O]	331,148 5	9,01	-3,24	314-300	245	229	86
Met 2B	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O ₂ S O-Desmethyl-LEV +[O]	331,148 5	9,01	-3,24	314-300	245	229	86
Met 3	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O S O-Desmethyl-N-desmethyl LEV	301,139 7	9,75	-9,29	270	228	215	86
Met 3A	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₂ S O-Desmethyl-N-Desmethyl LEV +[O]	317,131 2	7,64	2,02	299	228	215	86
Met 4	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O S N-Didesmethyl-LEV	301,138 8	11,2 1	-6,13	284	242	229	72
Met 4A	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ O ₂ S N-Acetyl-N-didesmethyl LEV	343,152 5	13,8 2	-14,56	327		114	72
Met 5	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O S O-Desmethyl-N-didesmethyl LEV	287,122 9	9,76	-5,79	270	215	184	72
Met 6	C ₁₃ H ₁₂ N O ₂ S N-Desalkyl-LEV +[O]	246,058 9	9,87	-2,05	229	214	202	

Die Metabolite 7B, und 7C mit um 16 Einheiten erhöhter Masse wurden als Hydroxymetabolite zugeordnet. Der Metabolit Met 7A mit ebenfalls 16 Einheiten

zusätzlicher Masse wurde wegen der kürzeren Retentionszeit als Sulfoxidmetabolit zugeordnet [213].

Die Metabolite 8A, 8B und 8C mit 32 zusätzlichen Masseinheiten und konnten mithilfe der Fragmentation strukturell nicht erklärt werden, es könnte sich um das Sulfon-Metabolit oder um Hydroxyverbindungen der Metabolite 7A, 7B und 7C handeln. Die beiden Desmethylmetabolite lassen sich durch die Masse der Fragmente 228 (N-Desmethyl) und 242 (O-Desmethyl) voneinander unterscheiden.

Weitere Metabolite mit Kombination der Desmethylierung, Hydroxylierung, N-Acetylierung und Oxidation von Thioethern wurden nachgewiesen.

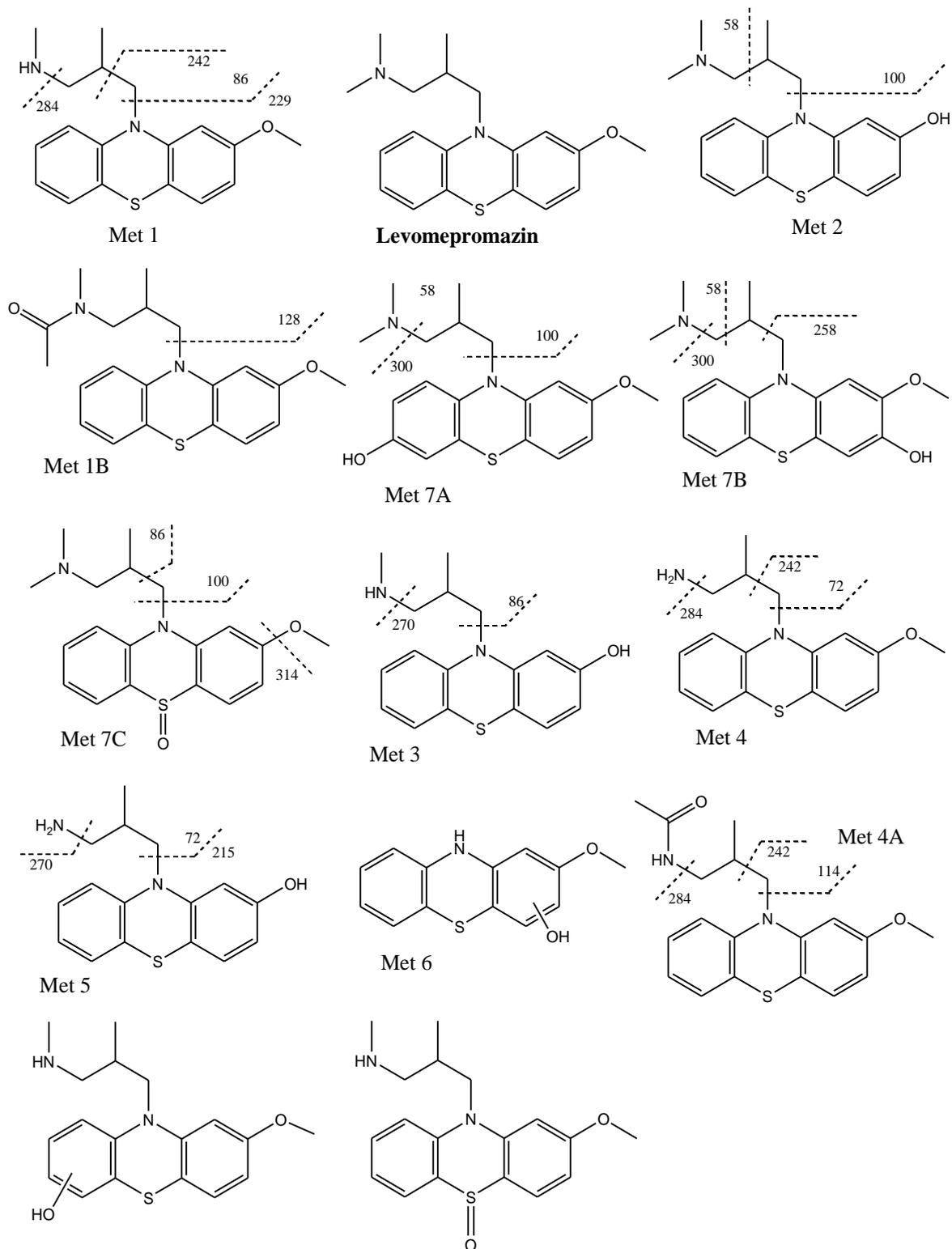


Abbildung 4.9.2: Metabolite von Levomepromazin und mögliche Strukturinterpretation.

In der HPLC-Kurve des alkalischen Blutextraktes fanden sich insgesamt 7 Metabolisierungsprodukte. Met C,D,E,F und G sollten aufgrund der Ähnlichkeit der UV-Spektren von Levomepromazin (RRT=1,34) stammen.

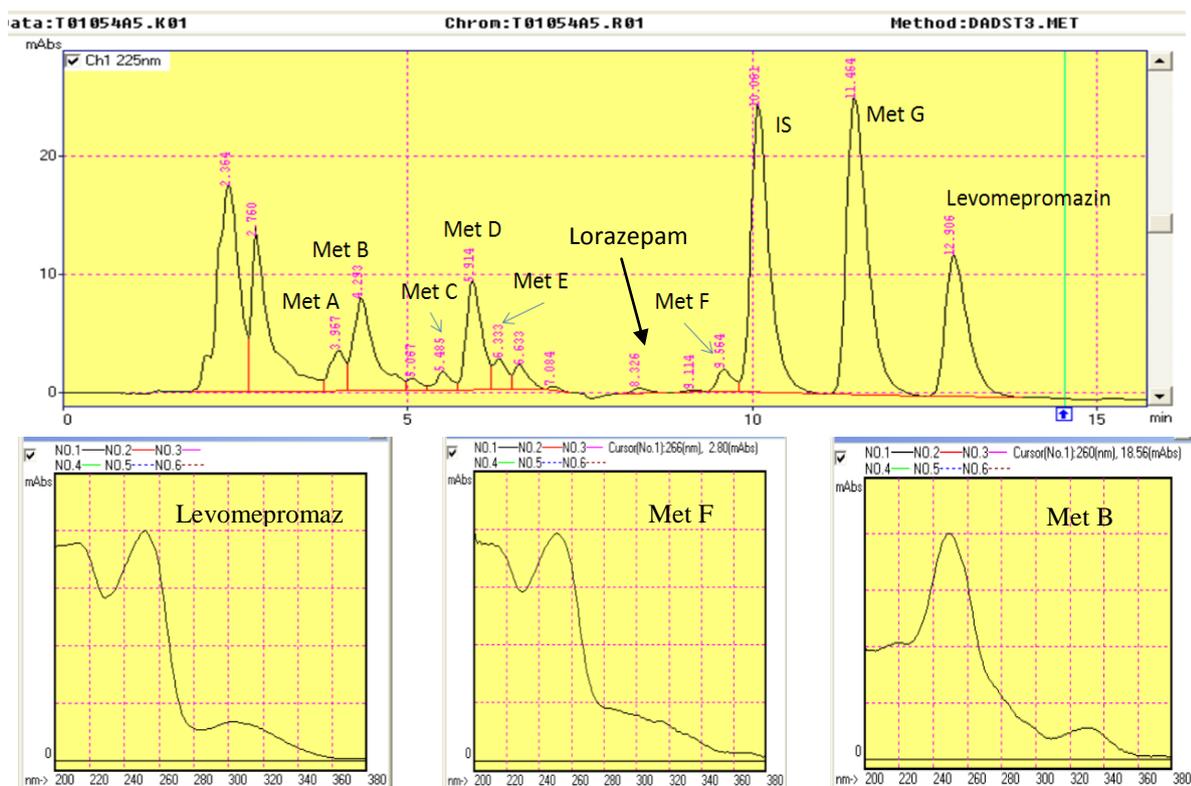


Abbildung 4.9.3: HPLC einer letale Intoxikation mit Levomepromazin (Fall1, alkalischer Blutextrakt) und UV-Spektren von Levomepromazin und den identifizierten Metaboliten.

Met A und B waren in beiden Fällen identifizierbar. Die Zuordnung der nachgewiesenen Peaks zu möglichen Abbauprodukten der LC-TOF/MS Ergebnisse gestaltete sich für die Produkte mit kürzere Retentionszeit schwierig. Met G (RRT=1,16) wird dem Desmethyllevomepromazin zugeordnet, für die Metaboliten Met C,D,E und F kämen in Frage das O-desmethyl, das N-Didesmethyl und die Kombination von Desmethylierung (unter Berücksichtigung dass die Retentionszeit-Verschiebung der O-Desmethylierung geringer ist als die der N-Desmethylierung [213]). Met A und B haben andere UV-Spektren und konnten als Levomepromazinsulfoxid für Met B und Desmethyllevomepromazinsulfoxid für Met A zugeordnet werden.

Im Fall 1 war der 68jährige Betroffene in einem ASB Pflegeheim für chronisch psychische Kranke leblos in der mit Wasser gefüllten Badewanne aufgefunden worden. Tabelle 4.9.3 zeigt die identifizierten Konzentrationen. Die im Blut des Betroffenen gemessene Levomepromazin-Konzentration liegt nach Vergleich mit Literaturdaten [215,216] und früher bei uns analysierten Fällen deutlich im toxischen Bereich. Der Betroffene kann hierdurch in seiner Handlungs- und Reaktionsfähigkeit stark beeinträchtigt gewesen sein, bzw. es kann durch die hochdosierte Einnahme dieses Neuroleptikums mit dämpfendem Effekt zur Bewusstseinsbeeinträchtigung gekommen sein, welche den Ertrinkungsvorgang begünstigt haben kann.

Tabelle 4.9.4: Konzentrationen in µg/mL bzw. µg/g von Levomepromazin und dessen Metaboliten im Fall 1.

Wirkstoff	Blut	Urin	Mageninhalt	Leber
Levomepromazin	1,08 µg/ml	----	6,9 µg/ml	2,4 µg/g
Desmethyl-Levomepromazin	1,7 µg/ml	positiv	0,64 µg/ml	5,7 µg/g
weitere Levomepromazin-Metabolite	Σ 0,98 µg/ml	positiv	4,14 µg/ml	15,2 µg/g
Lorazepam	0,005 µg/ml	-----	----	----

Aus dem Nachweis mehrerer Levomepromazin-Metabolisierungsprodukte kann abgeleitet werden, dass der Betroffene dieses Medikament schon über einen längeren Zeitraum eingenommen haben sollte. Laut Vorgeschichte gehörte ein Medikament mit diesem Wirkstoff zu seiner ständigen Medikation. Es wird vorrangig bei Psychosen des schizophrenen Formenkreises, manischer Erregung und reaktiven Psychosen mit Unruhe und Angst eingesetzt. Die Dosierung richtet sich häufig nach dem aktuellen Befinden des Patienten. Bei starken Erregungs- oder Unruhezuständen kann die Dosierung kurzzeitig erhöht werden.

Die jetzt bei dem Betroffenen gemessene toxische Levomepromazin-Konzentration kann durch die Einnahme einer erhöhten Dosis kurz vor dem Todeseintritt entstanden sein, oder es können Kumulationseffekte über einen längeren Zeitraum zu dieser hoher Blutkonzentration und damit zur stark eingeschränkten Handlungsunfähigkeit des Betroffenen geführt haben. Für diese zweite Annahme sprechen die relativ niedrige aktuelle Wirkstoffkonzentration im Mageninhalt und das Auftreten zahlreicher Metabolisierungsprodukte in ebenfalls sehr hohen Konzentrationen.

Das im Blut ebenfalls nachgewiesene Lorazepam liegt noch unterhalb des therapeutischen Bereiches. Hierdurch wird die Einnahme eines entsprechenden Medikamentes (laut Vorgeschichte Tavor) in höchstens therapeutischer Dosierung bestätigt. Tabelle 4.9.4 zeigt die quantitativen Verhältnisse von Levomepromazin zu den in den Blutproben nachgewiesenen Metaboliten für die 2 Fallbeispiele.

Tabelle 4.9.4: Levomepromazin-Konzentrationen und relative Metabolitenkonzentrationen in 2 Falluntersuchung

Fall	LEV-Konz in µg/mL	Met/LEV						
		A	B	C	D	E	F	G
1	1,08	0,18	0,61	0,08	0,53	0,13	0,11	1,57
2	0,22	-	0,68	-	-	-	-	0,08

4.10 Mirtazapin

Mirtazapin (MIR) ist eine Antidepressivum, das sich in Struktur und Wirkungsweise von anderen Verbindungen in seiner Klasse unterscheidet [253].

MIR antagonisiert sowohl präsynaptischen α_2 -Rezeptoren und postsynaptische 5-HT₂-Rezeptoren [254] als auch postsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren und führt zur erhöhten noradrenergen und serotonergen (5-HT₁)-Aktivität.

Als Phase I und II Metabolite beim Menschen wurden Mirtazapin-N-oxid, 8-Hydroxymirtazapin, N-Desmethyilmirtazapin, Mirtazapin-N-glucuronid, Mirtazapin-N-sulfat-, 8-Hydroxymirtazapin-glucuronid, 8-Hydroxy-N-desmethyilmirtazapin, 8-Hydroxy-N-des-methyilmirtazapin-glucuronid, 8-Hydroxymirtazapin-sulfat und 8-Hydroxy-N-desmethyl-mirtazapin-sulfat identifiziert. In mikrosomalen Fraktionen der menschlichen Leber wurden 8-Hydroxymirtazapin, N-Desmethyilmirtazapin und Mirtazapin-N-oxid gebildet [255-257].

In den untersuchten 6 Todesfällen ließen sich im Blut mittels LC-TOF/MS 11 Metabolisierungsprodukte nachweisen und identifizieren (Abbildungen 4.10.1 und 4.10.2 sowie Tabelle 4.10.2).

Mittels HPLC-DAD konnten nur zwei Metabolite des Mirtazapins mit ähnlichem UV-Spektrum nachgewiesen werden. Durch Vergleich der LC-TOF/MS Ergebnisse wurden Met A mit $Q_{\text{RRT}}=0,78$ als N-Desmethyl-MIR, und Met B mit $Q_{\text{RRT}} = 1,85$ als MIR Lactam identifiziert (Abbildung 4.10.3).

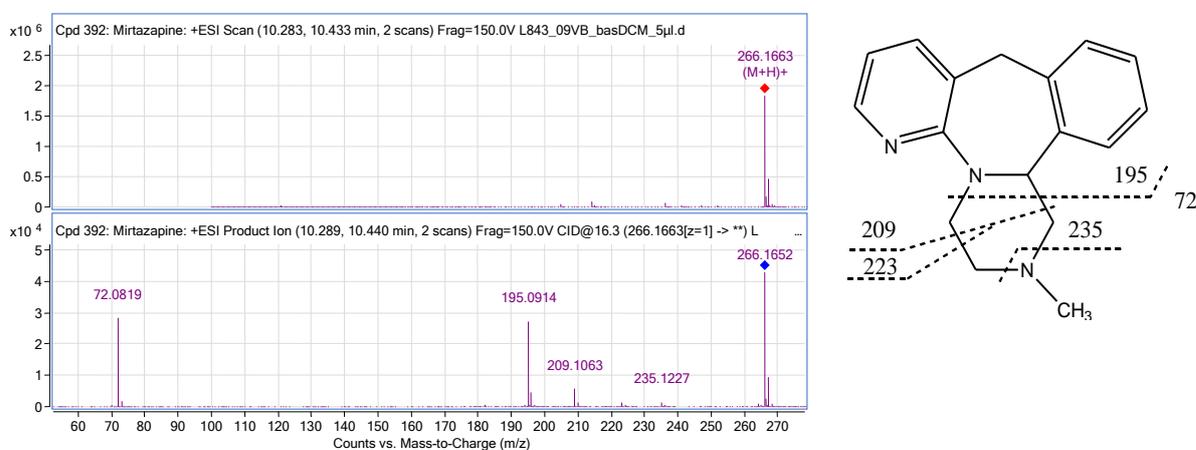


Abbildung 4.10.1: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Mirtazapin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.10.1: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Mirtazapin

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
266,1663 [M+H] ⁺	C17 H20 N3	Mirtazapin + H	-4,29
235,1227	C17 H18 N3	266 – (31,0422=C H5 N)	1,04
223,1213	C15 H15 N2	266 – (43,0422=C2 H5 N)	1,7
209,1063	C14 H13 N2	266 – (57,0578=C3 H7 N)	5,11
195,0914	C13 H11 N2	266 – (71,0735=C4 H9 N)	1,39
72,0819	C4 H10 N	266 – (194,0844=C13 H10 N2)	-15,5

Tabelle 4.10.2: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Mirtazapin metabolite.

Metabolite	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente
Met 1	C17 H20 N3 O Hydroxy-MIR	282,1603	9,01	0,7	251 211 72
Met 2	C17 H20 N3 O MIR-N-oxide	282,1604	8,01	-0,97	264 235 209 195
Met 3	C16 H18 N3 Desmethyl-MIR	252,1509	7,82	-5,07	209 195
Met 3A	C16 H18 N3 O Hydroxydesmethyilmirtazapin	268,1446	6,05	-0,68	250 237 195
Met 4	C15 H18 N3	240,1498	7,43	-1,25	209
Met 5	C17 H18 N3 O MIR-lactam	280,1449	10,64	-1,81	252 209 195
Met 5A	C17 H18 N3 O2 Hydroxy-MIR-lactam	296,1398	8,71	-1,99	278 268 237- 211 250 86
Met 5B	C16 H16 N3 O Desmethyl-MIR -lactam	266,1305	9,55	-6,57	238 195
Met 6	C18 H20 N3 O N-Acetyl-desmethyl-MIR	294,1617	10,91	-5,63	262 252 209 195
Met 6A	C18 H20 N3 O2 N-Acetyl Desmethyl-MIR-N-oxid	310,1571	12,52	-6,92	278 235 209 102
Met 7	C17 H 16 N3 O2	294,1247	12,77	-3,36	266 235 209 58

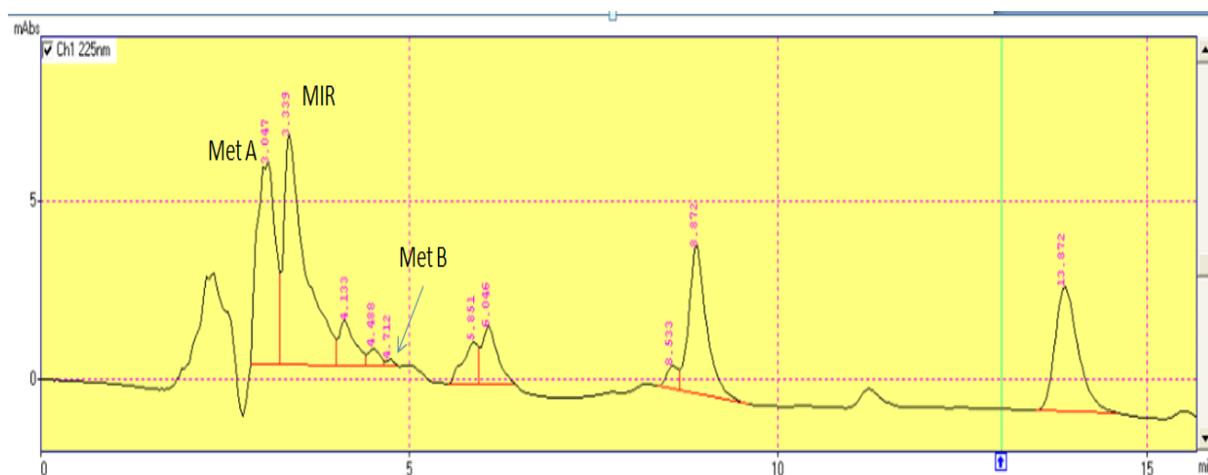


Abbildung 4.10.3: HPLC-Chromatogramm der alkalisch Blutextraktion einer MIR-Intoxikation.

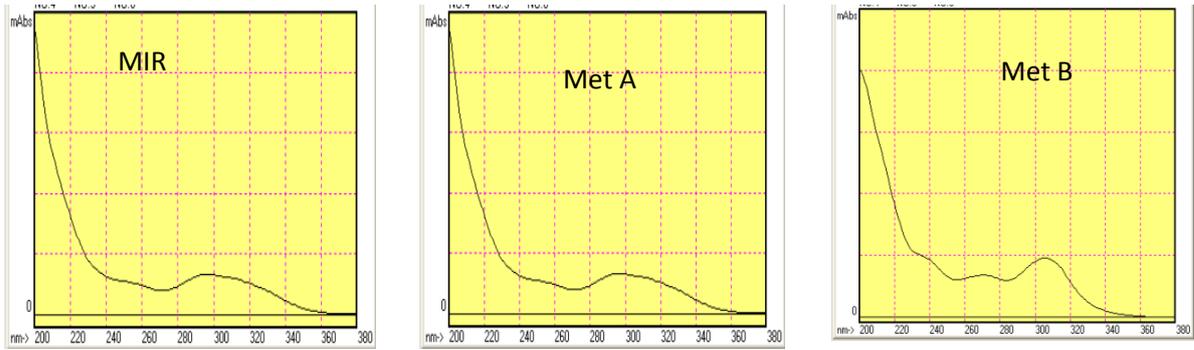


Abbildung 4.10.3: UV-Spektren der identifizierten Metaboliten des MIR.

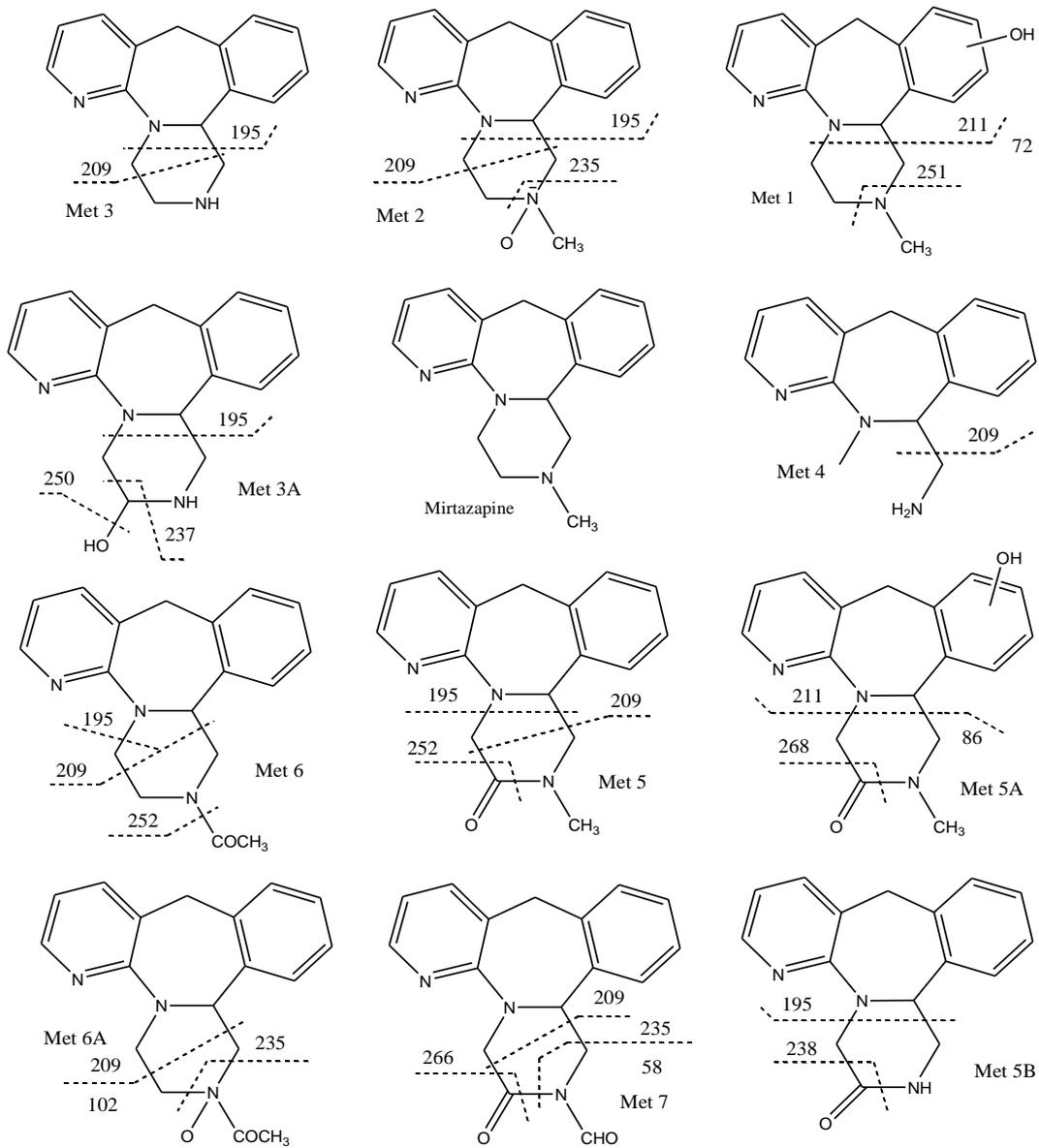


Abbildung 4.10.2: Metabolite von Mirtazapin und deren Hauptfragmentierungen.

4.11 Quetiapin

Quetiapin (QTP) wird intensiv in der Leber durch das Cytochrom P450 System metabolisiert, vor allem durch CYP3A (Abbildung 4.11.1A). Die wichtigsten Stoffwechselwege von Quetiapin sind Sulfoxidation, N- und O-Desalkylierung und in geringerem Maße 7-Hydroxylierung. Die Hauptmetaboliten im Blut sind das Sulfoxid- und der Carbonsäure-Metabolit [258-260].

Innerhalb der 11 für diese Arbeit ausgewerteten Fälle ließ sich in den Blutproben mittels LC-TOF/MS 28 Metabolisierungsprodukte des Quetiapins identifizieren (Abbildung 4.11.1A und B sowie Tabelle 4.11.1).

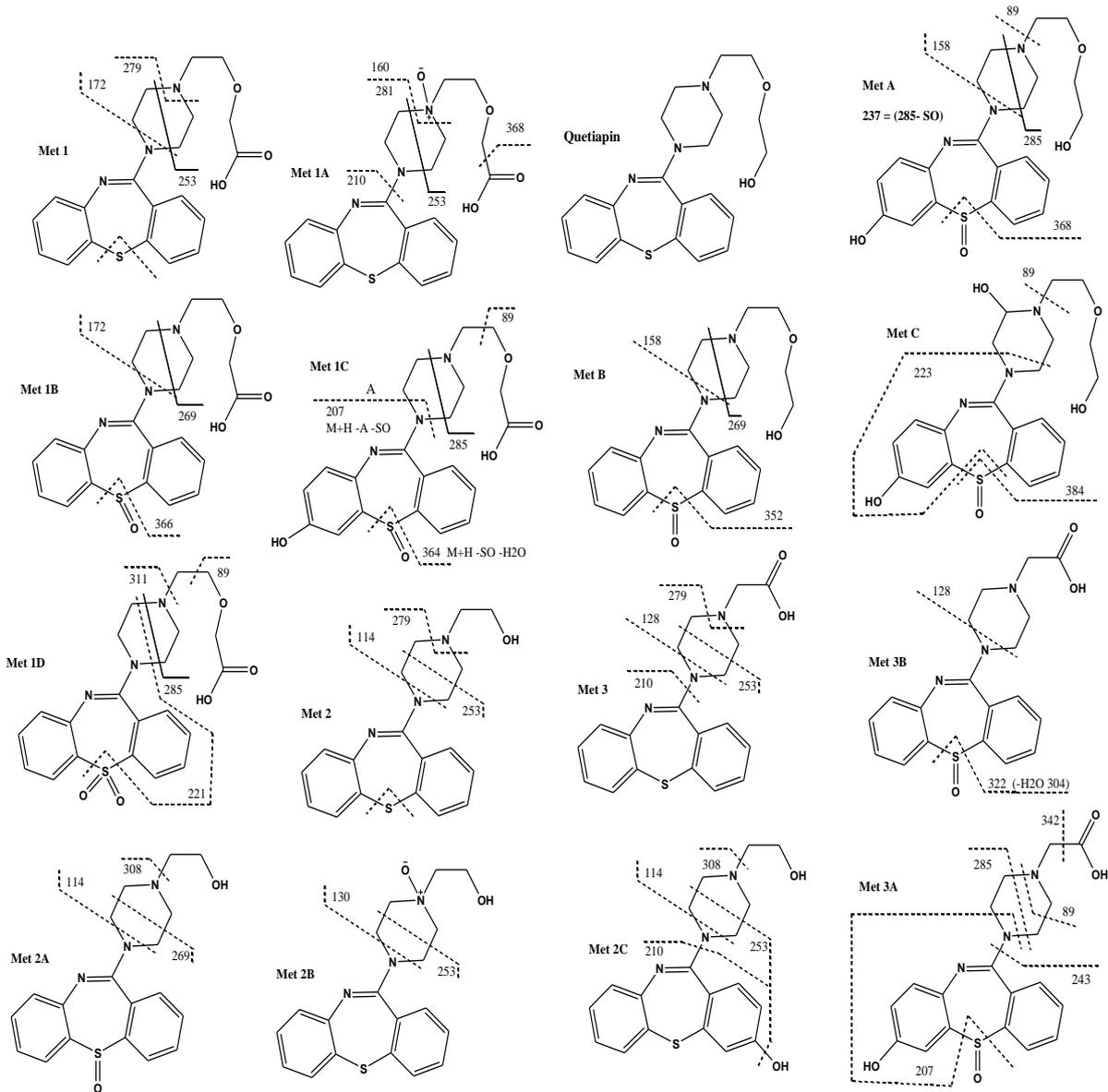


Abbildung 4.11.1a: Metabolite des Quetiapins und mögliche Strukturinterpretation

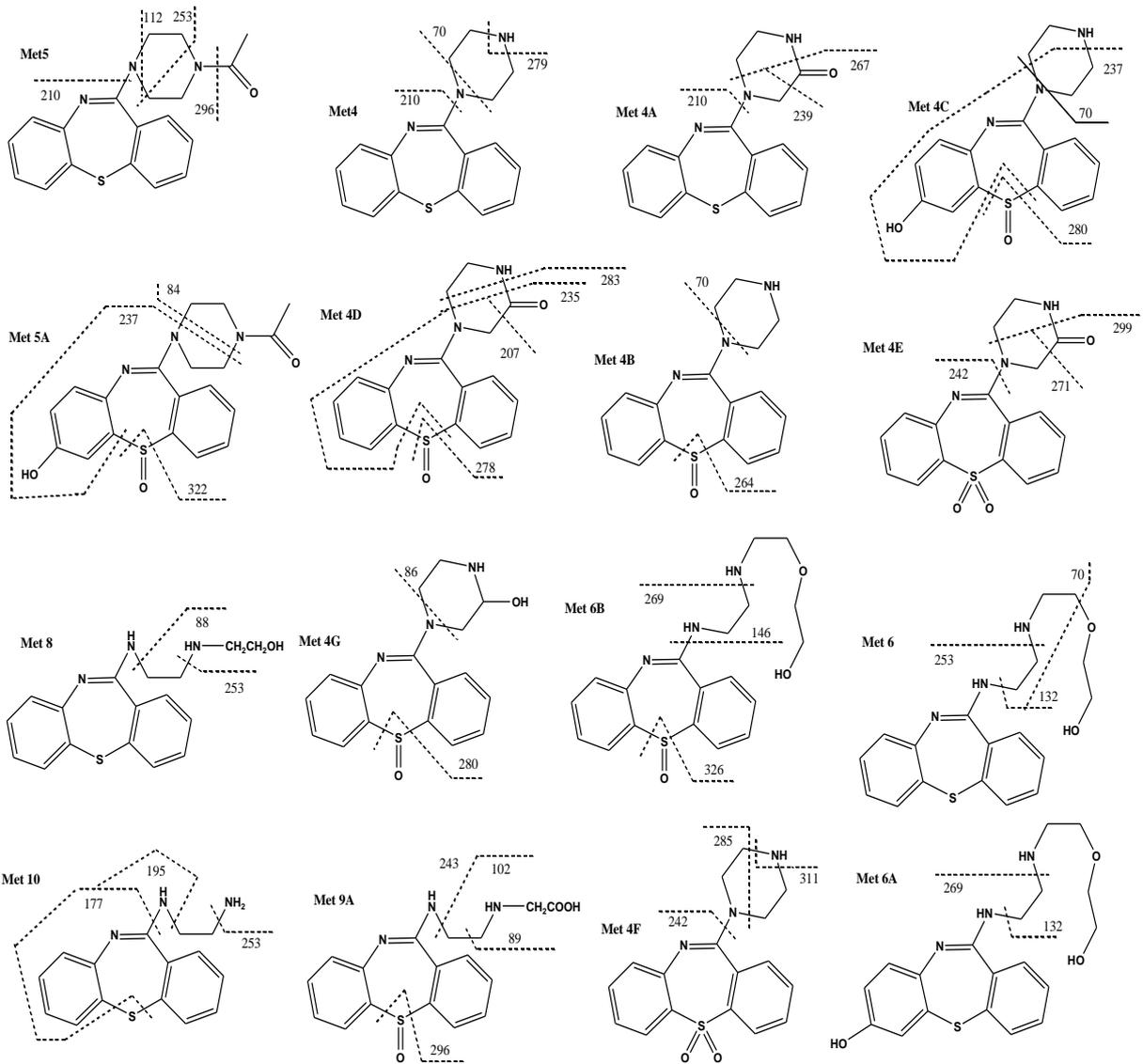


Abbildung 4.11.1b: Metabolite des Quetiapins und mögliche Strukturinterpretation

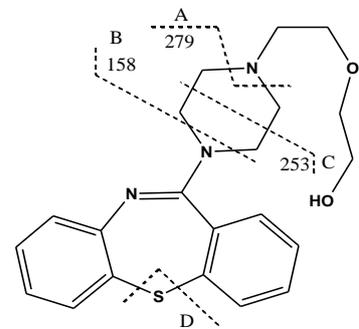
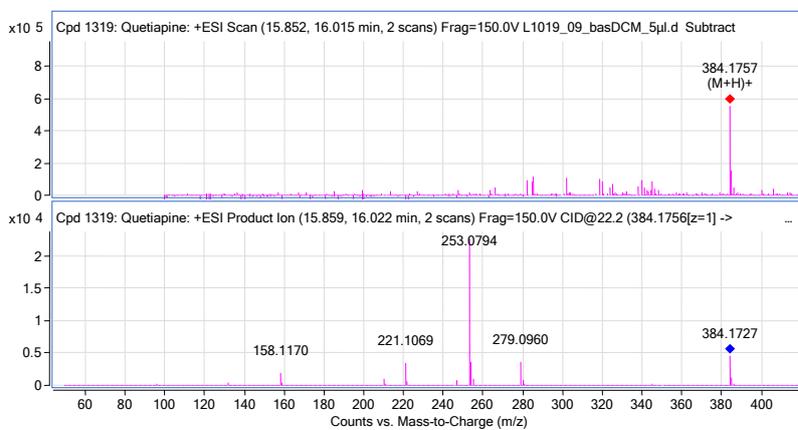


Abbildung 4.11.2: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Quetiapin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.11.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Quetiapin

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
384,1757 [M+H] ⁺	C21 H26 N3 O2 S	Quetiapin + H	-4,26
279,096	C17 H15 N2 S	384 – A (105,079=C4 H11 N O2)	-3,32
253,0794	C15 H13 N2 S	384 – C (131,0946=C6 H13 N O2)	-0,04
221,1069	C15 H13 N2	384 – C – D (163,0667=C6 H13 N O2 S)	1,88
158,117	C8 H16 N O2	384 – B (226,0565,C13 H10 N2 S)	3,4

Tabelle 4.11.1: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Quetiapin-metaboliten.

Met.	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente				
Met 1	C21 H24 N3 O3 S QTP-acid	398,1571	10,69	-9,5	279	253	221	172	
Met 1A	C21 H24 N3 O4 S QTP-acid-N-oxid	414,1498	11,45	-3,76	368	253	221 - 210	160	
Met 1B	C21 H24 N3 O4 S QTP-acid- sulfoxid	414,1515	7,95	-7,72	366	269	221	172	
Met 1C	C21 H24 N3 O5 S Hydroxy-QTP-acid- sulfoxid	430,1442	6,49	-2,81	364	285	207	89	
Met 1D	C21 H24 N3 O5 S QTP-acid- thiazepine 5,5-dioxide	430,1443	8,82	-2,81	311	285	221	89	
Met 2	C19 H22 N3 O S O-desalkyl-QTP	340,1502	11,902	-7,12	279	253	221	114	
Met 2A	C19 H22 N3 O2 S O-desalkyl QTP-sulfoxid	356,1437	8,55	-2,68	308	269	221	114	
Met 2B	C19 H22 N3 O2 S O-desalkyl-QTP N-oxid	356,1442	11,23	-4,08	279	253	221	130	
Met 2C	C19 H22 N3 O2 S Hydroxy O-desalkyl-QTP	356,1444	10,72	-5,14	308	279-253	221-210	114	
Met 3	C19 H20 N3 O2 S O-desalkyl- QTP-acid	354,1275	11,43	-1,12	279	253	221-210	128	
Met 3A	C19 H20 N3 O4 S Hydroxy O-desalkyl-QTP- acid-sulfoxid	386,1181	7,29	-3,05	342	285-243	221-207	89	
Met 3B	C19 H20 N3 O3 S O-desalkyl- QTP-acid- sulfoxid	370,1231	9,06	-3,03	322	304	221	128	
Met 5	C19 H20 N3 O S N-Acetyl-N-desaklyl QTP	338,1333	12,48	-3,74	296	253	210	112	
Met 5A	C19 H20 N3 O3 S Hydroxy N-Acetyl N-desaklyl-QTP-sulfoxid	370,1232	7,79	-3,22	322	296-237	221-195	84	
Met 4	C17 H18 N3 S N-Dealkyl-QTP	296,1233	10,09	-5,66	279	253	221-210	70	
Met 4A	C17 H16 N3 O S N-Dealkyl-QTP-lactam	310,1025	11,72	-5,89	267	239	210		
Met 4B	C17 H18 N3 O S N-Dealkyl-QTP-sulfoxid	312,1180	7,62	-5,01	264	221	195	70	
Met 4C	C17 H18 N3 O2 S Hydroxy-N-dealkyl-QTP-sulfoxid	328,1132	5,75	-5,56	280	237	211	70	
Met 4D	C17 H16 N3 O2 S N-Dealkyl-QTP-lactam - sulfoxid	326,0989	8,79	-9,71	283	278	235	207	
Met 4E	C17 H16 N3 O3 S S N-Dealkyl-QTP-lactam -thiazepine 5,5-dioxid	342,0947	9,34	-11,7	299	271	242		
Met 4F	C17 H18 N3 O2 S N-Dealkyl-QTP-thiazepine 5,5-dioxid	328,1126	8,38	-3,51	311	285-264	259		
Met 4G	C17 H18 N3 O2 S Hydroxy-N-dealkyl- QTP-sulfoxid	328,1128	8,84	-4,05	280	262	221	86	
Met 6	C19 H24 N3 O2 S	358,1603	7,16	-5,41		253	132	70	
Met 6A	C19 H24 N3 O3 S Hydroxy-Met 6	374,1543	7,05	-2,67		269	221	132	
Met 6B	C19 H24 N3 O3 S Met 6-sulfoxid	374,1538	7,42	-1,31	326	269	121	146	
Met 8	C17 H20 N3 O S	314,1327	9,27	-1,65		253	221	88	
Met 9A	C17 H18 N3 O3 S	344,1076	8,29	-3,62	296	278-243	195-102	89	
Met 10	C15 H16 N3 S	270,1070	9,52	-3,79	253	221	195	177	

Mittels HPLC-DAD konnten 13 Peaks als Metabolite des Quetiapins aufgrund derer spektralen Ähnlichkeit mit der Ausgangssubstanz festgestellt wurden (Abbildung 4.11.3). Diese konnten durch Vergleich mit den LC-TOF/Ergebnissen und unter Berücksichtigung

der Retentionszeit-veränderungen der Metaboliten anderer Substanzen und der Modellsubstanzpaaren [213] wie im Tabelle 4.11.3 zugeordnet wurden.

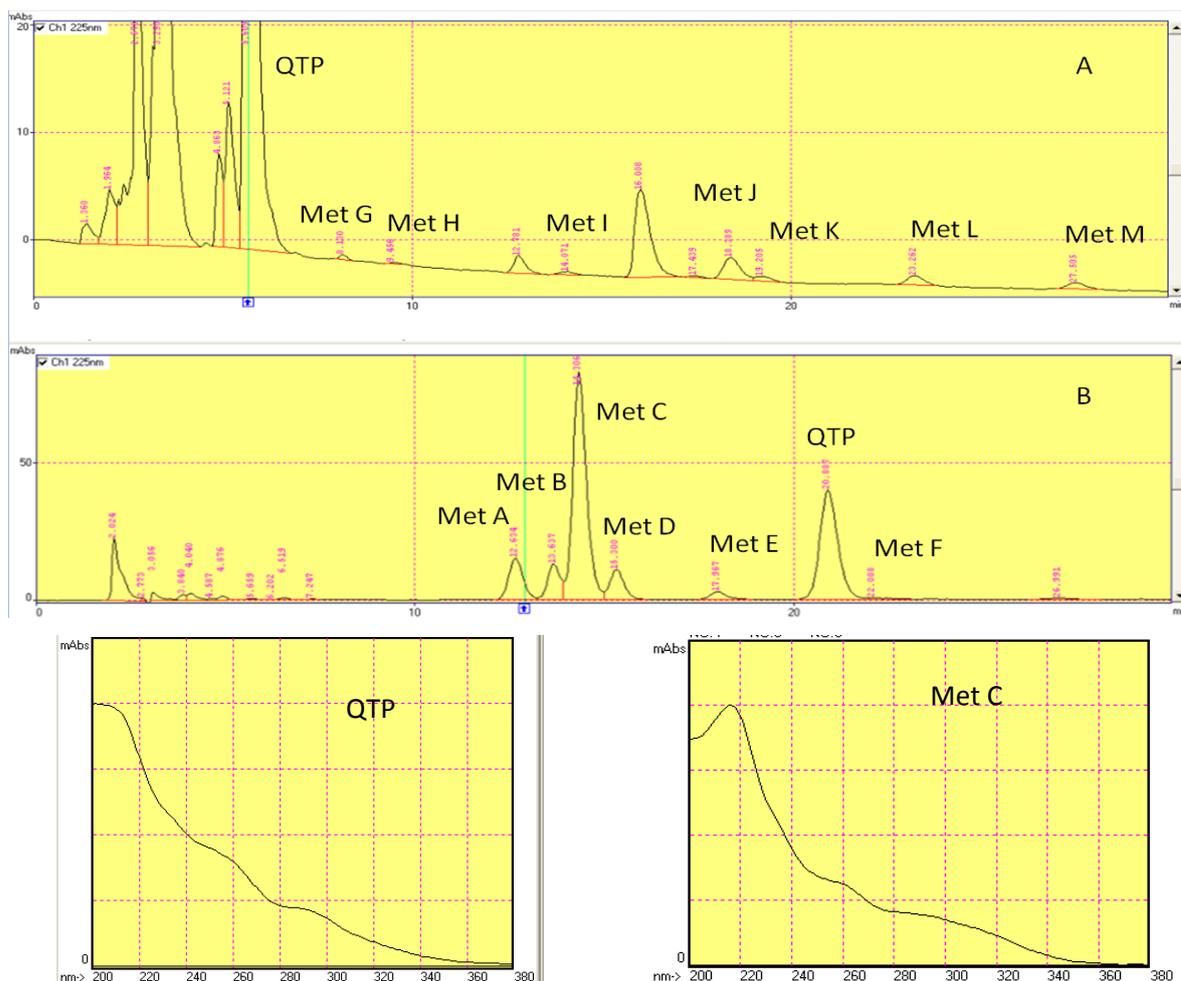


Abbildung 4.11.3: HPLC Chromatogram einer Quetiapin –Intoxikation (A Laufmittel A; B Laufmittel C) und UV-Spektren von Quetiapin und das Metabolit C.

Tabelle 4.11.3: Retentionszeiten sowie Retentionszeitquotienten für Quetiapin und seine Metabolite mittels HPLC-DAD und mögliche Zuordnung der Metabolite durch Vergleich der Retentionszeiten mit LC-QTOF-MS (vgl. Abbildung 4.11.1).

Peak	RT, min LMC	Q _{RT, LMC}	Möglicher Metabolit	Peak	RT, min LMA	Q _{RT, LMA}	Möglicher Metabolit
QTP	20,889			QTP	5,609		
Met A	12,634	0,60	Met 10	Met G	8,130	1,45	Met 4A
Met B	13,637	0,65	Met 8	Met H	9,458	1,69	--
Met C	14,306	0,68	Met 4	Met I	14,071	2,51	--
Met D	15,300	0,73	Met 2	Met J	18,389	3,28	--
Met E	17,967	0,86	Met 6	Met K	19,205	3,42	Met 3
Met F	22,088	1,06	Met 5	Met L	23,262	4,15	Met 1
				Met M	27,505	4,90	Met 1A

4.12 Saquinavir

Der HIV-Proteaseinhibitor Saquinavir bildet durch Oxidation mehrere Metabolite (Abbildung 4.12.1). HPLC-Analysen zeigten die Bildung von zwei Hauptmetaboliten und fünf Nebenmetaboliten bei Inkubation Leber- und Dünndarm-mikrosomalen Zellhomogenisaten[261]. Mittels LC-TOF/MS wurden in den untersuchten 3 Todesfällen 3 Metabolisierungsprodukte nachgewiesen. Die in Tabelle 4.12.1 aufgeführten Massen wurden in einem Blutextrakt gefunden und entsprechenden Metaboliten zugeordnet. Mittels HPLC-DAD konnte neben Saquinavir (RRT = 2,536) nur ein Saquinavir-Metabolit Met A (RRT = 0,586) nachgewiesen werden (Abbildung 4.12.3). Dieser weist mit $Q_{RRT} = 0,231$ eine wesentliche kürzere Retentionszeit auf als Saquinavir. Von den LC-TOF/MS Ergebnissen und der Ähnlichkeit der UV-Spektren mit der Ausgangssubstanz kommt hier das Hydroxysaquinavir (Met A) in Betracht.

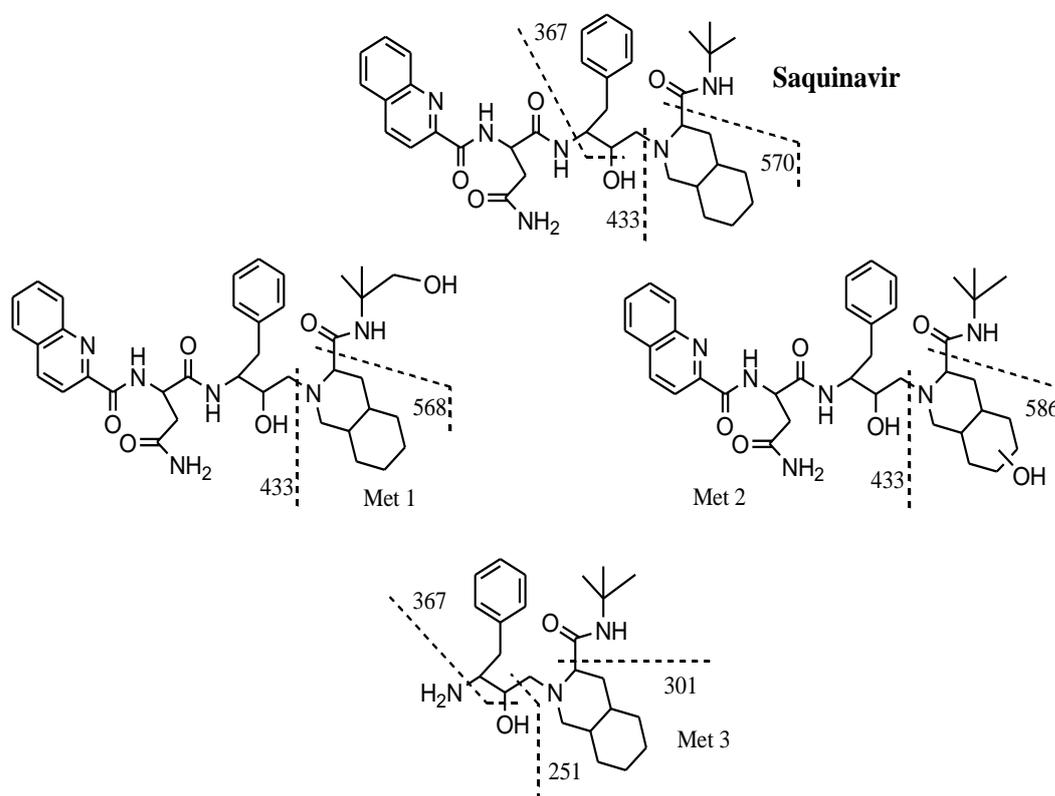


Abbildung 4.12.1: Strukturformeln und möglichen CID Fragmentierung der Saquinavir-metabolite [261].

Tabelle 4.12.1: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Saquinavir-metaboliten.

Met.	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente
Met 1	C38 H51 N6 O6 Hydroxylierung	687,3891	10,41	-3,85	669 568 433
Met 2	C38 H51 N6 O6 Hydroxylierung	687,3872	6,88	-1,14	586 433
Met 3	C24 H40 N3 O2 N-Desalkyl	402,3122	5,41	-1,6	367 301 251

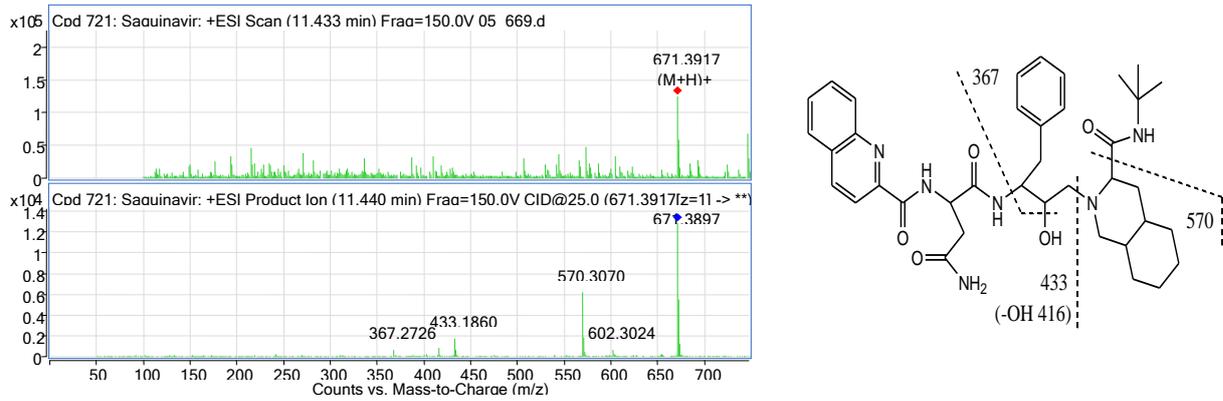


Abbildung 4.12.2: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Saquinavir und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.12.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Saquinavir.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
371,3917 [M+H] ⁺	C ₃₈ H ₅₁ N ₆ O ₅	Saquinavir + H	-0,24
570,307	C ₃₃ H ₄₀ N ₅ O ₄	371 – (101,0841=C ₅ H ₁₁ N O)	0,8
433,186	C ₂₄ H ₂₅ N ₄ O ₄	371 - (238,2045=C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O)	2,31
367,2726	C ₂₄ H ₃₅ N ₂ O	371 – (304,1172=C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O)	4,95

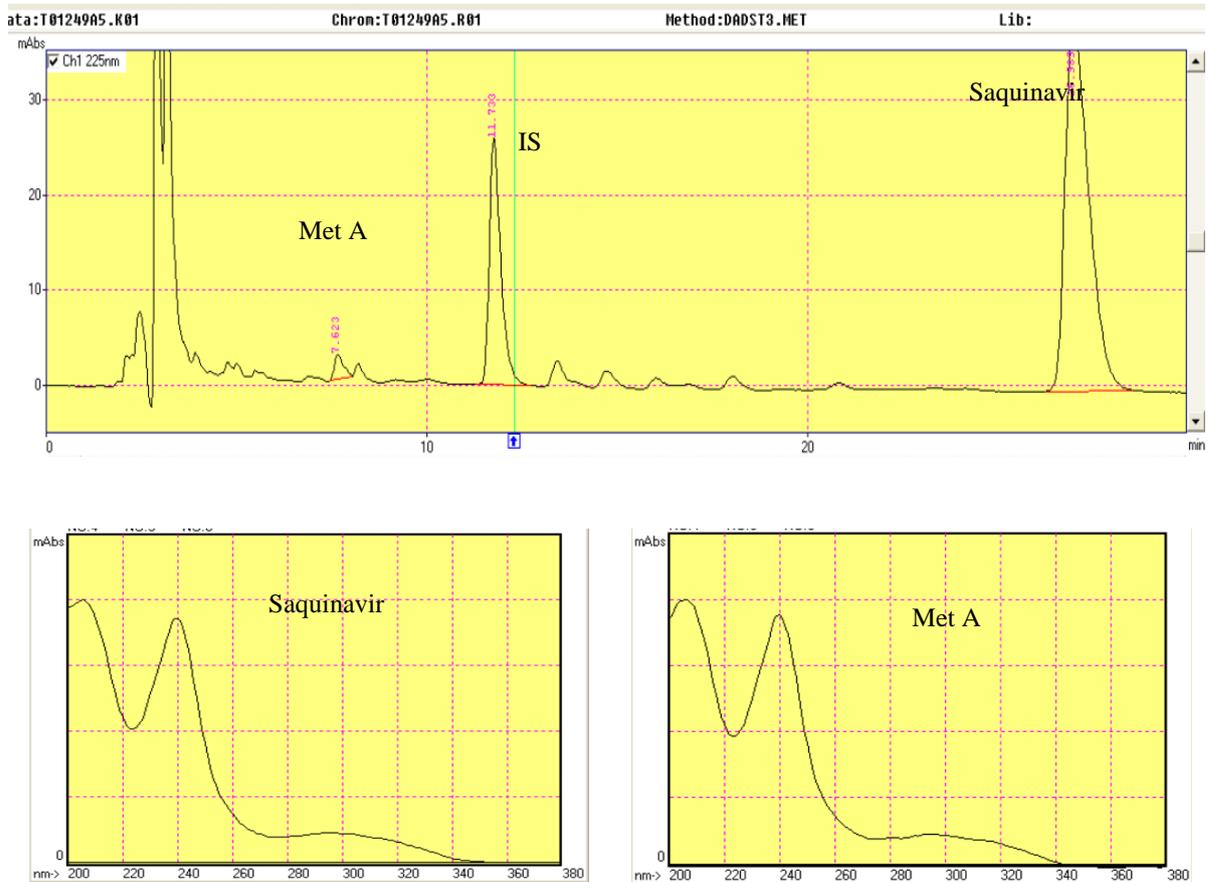


Abbildung 4.12.3: HPLC Chromatogramme des alkalischen Extraktes der Blutprobe der Saquinavir Intoxikation und UV-Spektren von Saquinavir und Met A.

4.13 Sertralin

Sertralin ist ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, der zu einer Erhöhung der Konzentration von Serotonin im synaptischen Spalt im Zentralnervensystem führt. Erster Hauptmetabolisierungsschritte ist die N-Demethylierung (Met 1), danach N-Hydroxylierung (Met 2), oxidative Desaminierung (Met 3) und Bildung Desmethyl-N-acetylsertralin (Met 4) mit anschließender Glucuronidierung [262,263]. Die vermuteten Metabolite sind in Abbildung 4.2.1 zusammengestellt.

Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit Blutproben von 7 Todesfällen mit Sertralin und 10 Patienten nach therapeutischer Gabe dieses Medikamentes. Mittels LC-TOF/MS konnten Sertralin sowie 4 Metabolite im Blutextrakt identifiziert werden (Tabelle 4.13.1).

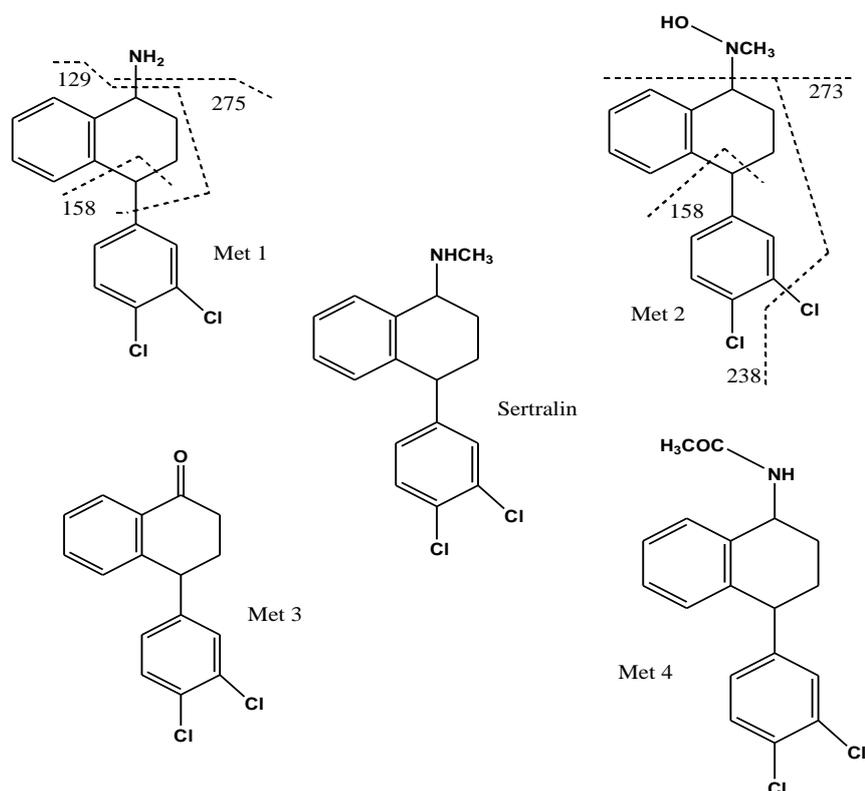


Abbildung 4.13.1: Strukturformeln und möglichen CID Fragmentierung der Sertralinmetabolite [262,263].

Tabelle 4.13.1: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Sertralinmetaboliten.

Metabolite	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente			
Met 1	C ₁₆ H ₁₆ NCl ₂ Desmethylsertraline	292,0668	12,03	-4,76	275	158	129	91
Met 2	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ OCl ₂ Sertralinehydroxylamin	322,0763	9,15	-1,28	273	238-	158	126
Met 3	C ₁₆ H ₁₃ OCl ₂ Sertraline-Keton	291,0335	14,85	1,8	--	--	--	--
Met 4	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ OCl ₂ N-Acetyl-desmethylsertraline	334,0762	14,05	1,7	--	--	--	--

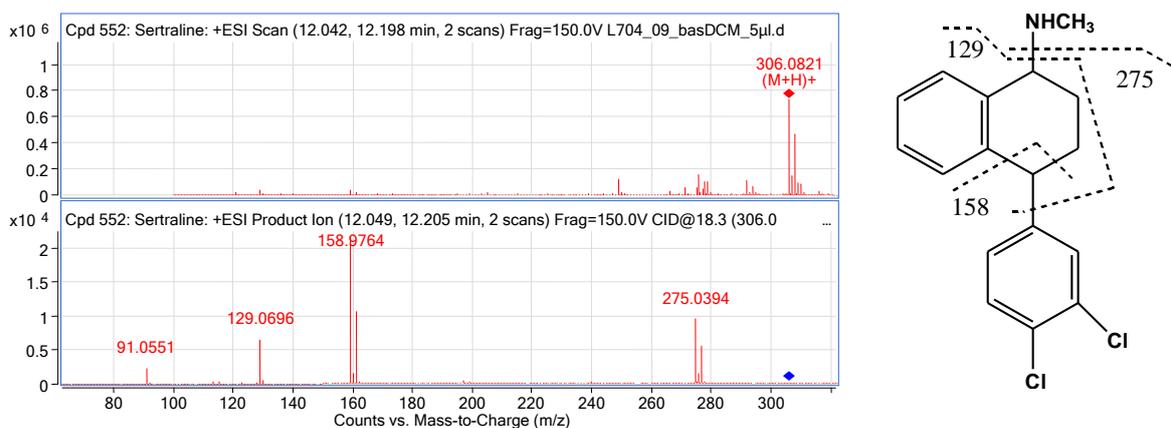


Abbildung 4.13.2: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Sertralin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.13.2: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Sertralin.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
306,0821 [M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₈ N Cl ₂	Sertralin + H	-3,42
275,0394	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂	306 – (31,0422=C H ₅ N)	-1,9
158,9764	C ₇ H ₅ Cl ₂	306 - (147,1048=C ₁₀ H ₁₃ N)	-0,58
129,0696	C ₁₀ H ₉	306 – (177,0112=C ₇ H ₉ Cl ₂ N)	2,32
91,0551	C ₇ H ₇	306 – (215,0269=C ₁₀ H ₁₁ Cl ₂ N)	-9,76

Mittels HPLC-DAD wurde 5 Metabolisierungsprodukte neben Sertralin (RRT = 1,690) gefunden (Abbildung 4.13.3), in 4 Fälle wurde nur ein Sertralin Metabolit Met D (Desmethylsertralin) festgestellt, während in drei Blutproben Met A und in zwei Fällen die Metabolite Met B, Met C und Met E nachweisbar waren. Die Zuordnung der Peaks als Metabolite des Sertralins erfolgte aufgrund der spektralen Ähnlichkeit, des Vergleiches mit den LC-TOF/MS Ergebnissen und der Retentionsszeitverschiebungen. Tabelle 4.13.3 zeigt die mögliche Metabolitenzuordnung.

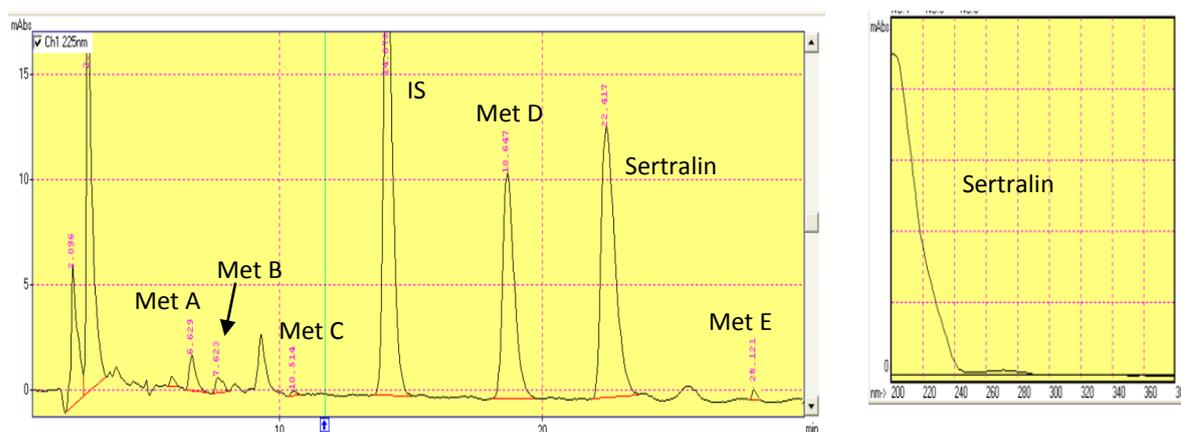


Abbildung 4.13.3: HPLC-Chromatogramme der alkalischen Extraktes der Blutprobe einer Sertralinintoxikation und UV-Spektrum von Sertralin.

Tabelle 4.13.3: Retentionszeiten von Sertralinmetaboliten und mögliche Strukturklärung.

Metabolite	RRT	Q _{RRT}	Mögliche Strukturklärung
Met A	0,383	0,228	Desmethyl-Sertralinhydroxylamin
Met B	0,465	0,275	Sertralinhydroxylamin
Met C	0,705	0,417	--
Met D	1,378	0,815	Desmethylsertalin
Met E	2,162	1,279	Sertralin-Keton

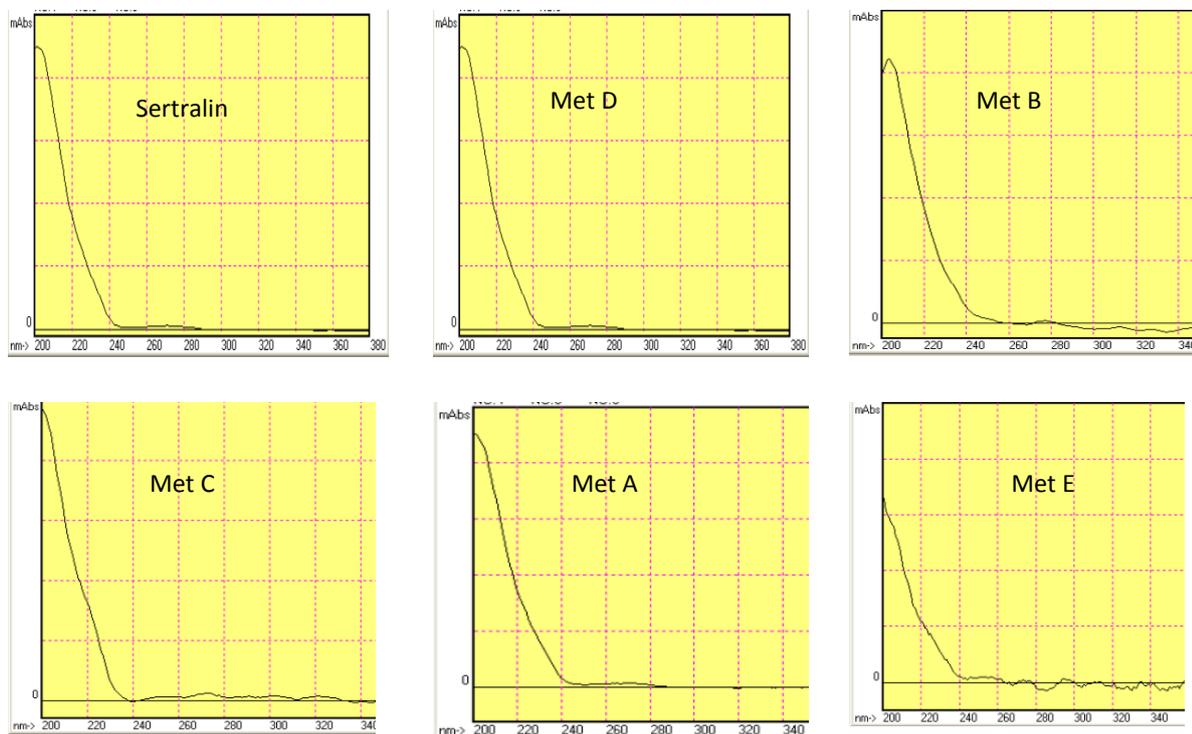


Abbildung 4.13.4: UV-Spektren von Sertralin und seinen Metaboliten.

4.14 Venlafaxin

Venlafaxin ist ein bicyclisches Antidepressivum mit Phenethylaminstruktur. Es hat ein neuropharmakologisches Profil, welches sich von den früheren Antidepressiva einschließlich der tricyclischen Verbindungen unterscheidet [264,265]. Es vermittelt antidepressive Wirkung durch Hemmung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin und besitzt nicht die Nebenwirkungen von trizyklischen Antidepressiva [266-269]. Die Metabolisierungswege sind in Abbildung 4.14.1 dargestellt. Venlafaxin wird desalkyliert, als Hauptmetabolite entstehen das aktiv *O*-Desmethylvenlafaxin, *N*-Desmethylvenlafaxin und das *N,O*-Didesmethylvenlafaxin. Zusätzlich wurden Hydroxylierungsprodukte identifiziert [270,271].

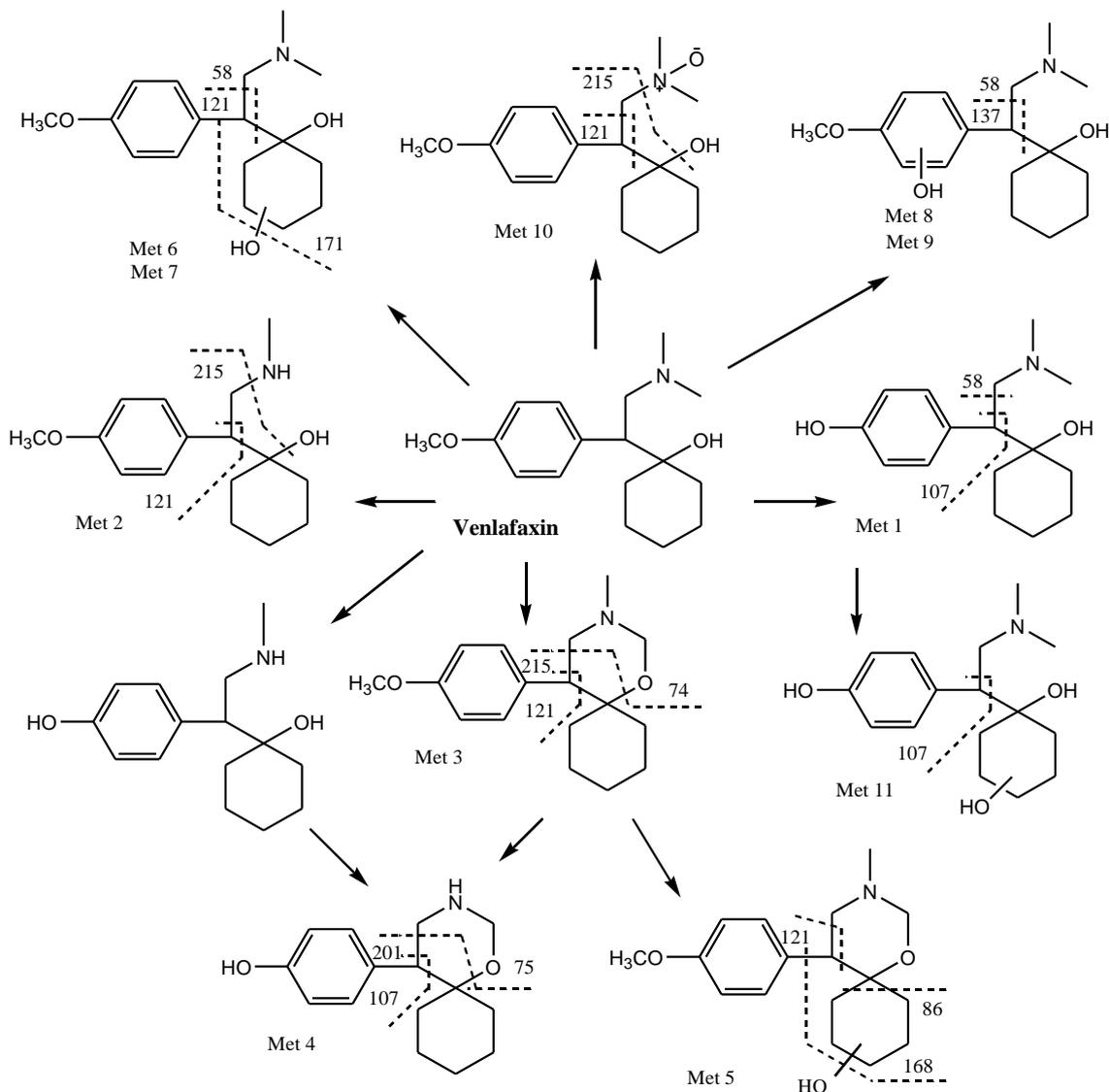


Abbildung 4.14.1: Metabolisierungsschema des Venlafaxins und mögliche Interpretation der Fragmentierungswege.

Zum Venlafaxin wurden 5 Todesfälle untersucht. Durch LC-TOF/MS wurden 11 Metabolite identifiziert (Tabelle 4.14.1 und Abbildung 4.14.1), *O*-Desmethylvenlafaxin, *N*-Desmethylvenlafaxin, Venlafaxin-*N*-oxid und Hydroxylierungsprodukte.

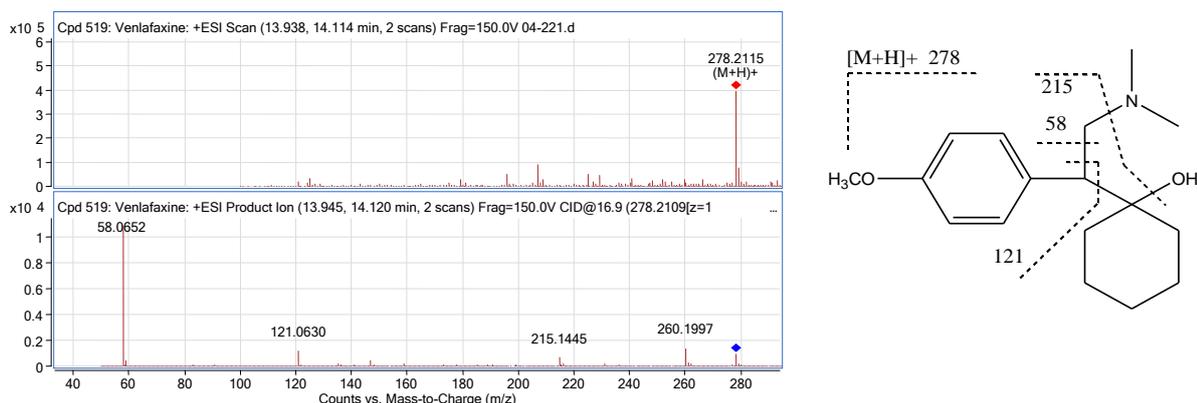


Abbildung 4.14.2: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahierten Venlafaxin und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.14.1: Charakteristische *m/z*-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Venlafaxin-metaboliten.

Metabolite	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente		
Met 1	C ₁₆ H ₂₆ NO ₂ <i>O</i> - Desmethylvenlafaxin	264,1964	11,60	-2,73	133	107	58
Met 2	C ₁₆ H ₂₆ NO ₂ <i>N</i> - Desmethylvenlafaxin	264,1955	13,35	1,33	215	147	121
Met 3	C ₁₇ H ₂₅ NO ₂ Met 3	276,1935	18,13	18,13	246	215	121
Met 4	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂ <i>O</i> -Desmethyl-Met 3	262,1794	15,59	3,32	244	201	107
Met 5	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃ Hydroxy-Met 3	292,1905	15,67	0,81	246	168	121
Met 6	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ Hydroxyvenlafaxin 1	294,2049	9,23	5,07	198	171	121
Met 7	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ Hydroxyvenlafaxin 2	294,2055	11,05	3,05	213	171	121
Met 8	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ Hydroxyvenlafaxin 3	294,2065	11,38	-0,57	213	137	58
Met 9	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ Hydroxyvenlafaxin 4	294,2063	12,21	0,33	231	137	58
Met 10	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ Venlafaxin- <i>N</i> -oxid	294,2047	14,21	5,89	215		121
Met 11	C ₁₆ H ₂₅ NO ₃ Hydroxy- <i>O</i> - desmethyl-venlafaxin	280,1897	11,74	3,64	219	147	107

Tabelle 4.14.2: Charakteristische *m/z*-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Venlafaxin

Charakteristische <i>m/z</i> -Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
278,2115 [M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₈ N O ₂	Venlafaxin + H	-0,21
260,1997	C ₁₇ H ₂₆ N O	278 – H ₂ O (18,0106)	4,6
215,1445	C ₁₅ H ₁₉ O	278 - (63,0684 = C ₂ H ₉ N O)	-6,95
121,063	C ₈ H ₉ O	278 – (157,1467 = C ₉ H ₁₉ N O)	14,7
58,0652	C ₃ H ₈ N	278 – (220,1463 = C ₁₄ H ₂₀ O ₂)	-1,53

Mittels HPLC-DAD konnten neben Venlafaxin (RRT = 0,300) 3 Metabolite nachgewiesen (Abbildung 4.13.3). In 5 Fällen wurde der Metabolit Met B (Desmethylvenlafaxin) gefunden, während in zwei Blutproben Met A und in einem Fall der Metabolit Met C nachweisbar waren. Die Zuordnung der Peaks als Metabolite des Venlafaxins erfolgte aufgrund der spektralen Ähnlichkeit mit dem Sertralin, des Vergleichs mit den LC-TOF/MS

Ergebnissen und der Retentionszeitverschiebung. Tabelle 4.14.3 zeigt die mögliche Metaboliten Zuordnung.

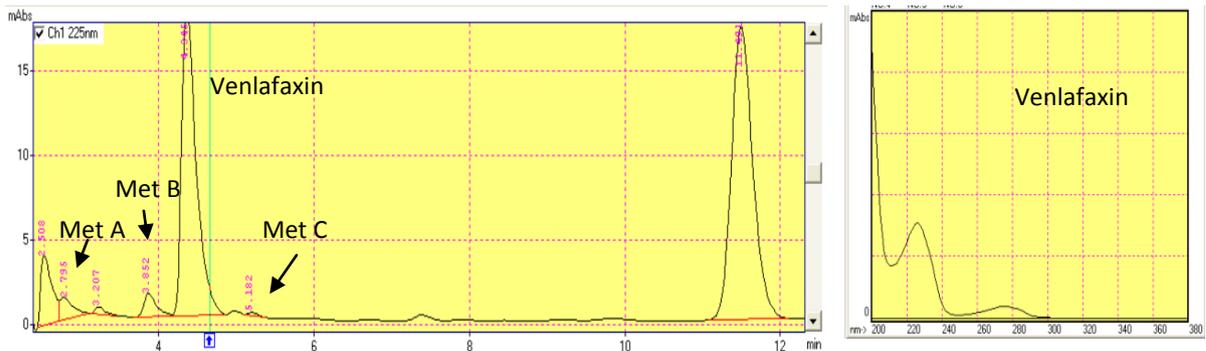


Abbildung 4.14.3: HPLC-Chromatogramm des alkalischen Extraktes der Blutprobe einer Venlafaxin-Intoxikation und UV-Spektrum von Venlafaxin.

Tabelle 4.14.3: Retentionszeiten von Sertralinmetaboliten und mögliche Strukturklärung.

Metabolite	RRT	Q _{RRT}	Mögliche Strukturklärung
Met A	0,111	0,372	Hydroxyvenlavaxin
Met B	0,219	0,732	Desmethylvenlafaxin
Met C	0,355	1,185	Venlafaxin-N-oxid

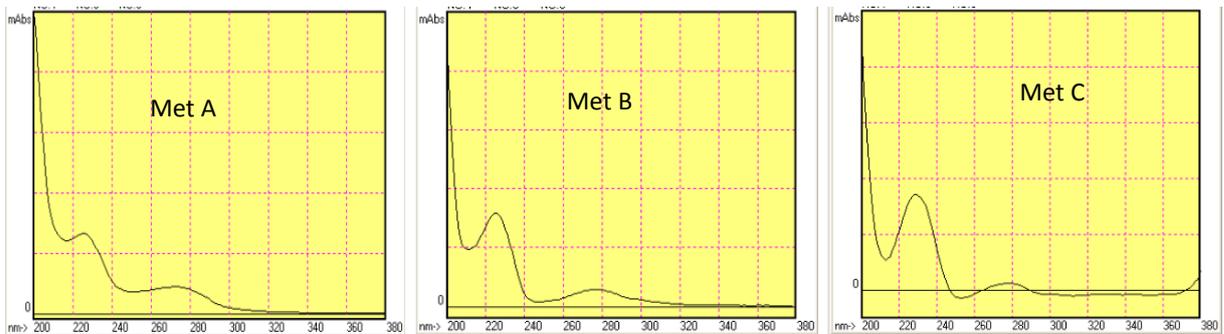


Abbildung 4.14.4: UV Spektren der als Venlafaxin-Metabolite identifizierten Peaks.

4.15 Verapamil

Verapamil ist ein bekannter Kalziumkanalblocker mit antianginösen blutdrucksenkenden und antiarrhythmischen Eigenschaften [272]. Verapamil wird bei der ersten Leberpassage erheblich metabolisiert [273]. Der Metabolismus von Verapamil führt im Allgemeinen zur pharmakologischen Inaktivierung, was häufige Dosierung dieses Medikaments erfordert. Diese Verbindung wird hauptsächlich durch N-Desmethylierung, O-Desmethylierung und N-Desalkylierung metabolisiert. Der N-desmethylierten Metabolit (Norverapamil) ist ebenfalls pharmakologisch aktive (etwa 20% der Aktivität von Verapamil).

Für Verapamil wurden 36 Todesfälle und 9 Fälle aus der Klinik in dieser Arbeit ausgewertet. Mittels LC-TOF/MS wurden 16 Metaboliten gefunden. In den Tabellen 4.15.1 und 4.15.2 wurden die Metabolite mit möglicher Fragmentationserklärung gezeigt und in der Abbildung 4.15.1 dargestellt.

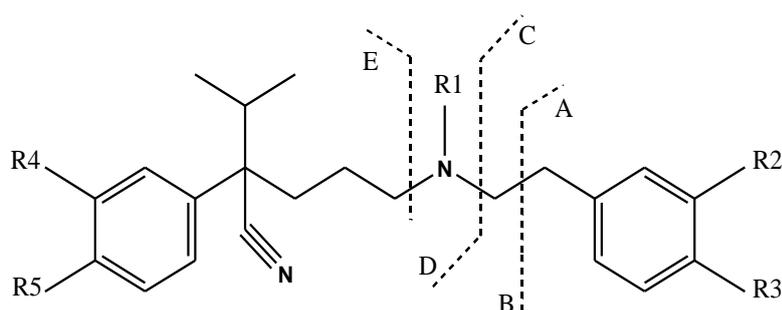


Abbildung 4.15.2: Fragmentationsschema des Verapamil.

Tabelle 4.15.1: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Verapamil-Metaboliten.

Met	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	R1	R2	R3	R4	R5	Charakteristische m/z- Werte Abb. 4.15.2					
										B	D	E	C	A	
Met 1	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₄	441,2782	10,09	-7,6	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		289		260	165	150
Met 2	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₄	441,2750	11,05	-0,56	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH		289		246	165	150
Met 3	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₄	441,2747	10,7	0,3	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃		303		260	151	
Met 4	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₄	427,2576	9,34	3,69	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH		275		246	165	150
Met 5	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₄	427,2574	9,92	4,16	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃		289			151	
Met 6	C ₂₇ H ₃₉ N ₂ O ₅	471,2836	11,27	4,05	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃			291	260	181	151
Met 7	C ₂₇ H ₃₉ N ₂ O ₅	471,2814	9,64	8,33	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		319			165	150
Met 8	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₅	457,2698	9,83	-0,27	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃				260	181	
Met 9	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₅	457,2703	8,32	-1,28	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃			(399-247)		165	150
Met 10	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₅	443,2526	7,48	3,3	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃			(385-275)		151	
Met 11	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₅	443,2538	6,8	0,6	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH			(233)		165	150
Met 12	C ₂₄ H ₃₃ N ₂ O ₄	413,2427	8,61	1,97	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH		275		246	151	

Tabelle 4.15.2: Charakteristische m/z-Werte und Fragmente von aus Blut extrahierten Verapamilmetaboliten.

Metabolite	Summenformel + H	[M+H] ⁺	RT	ppm Err.	Fragmente	
Met 13	C ₁₇ H ₂₇ N ₂ O ₂	291,2076	8,7	-3,06	260	218
Met 14	C ₁₆ H ₂₅ N ₂ O ₂	277,1914	8,51	-1,08	260	234
Met 15	C ₁₆ H ₂₅ N ₂ O ₂	277,1906	7,48	1,82	246	234
Met 16	C ₁₉ H ₂₉ N ₂ O ₃	333,2148	10,37	7,44	291	260 218

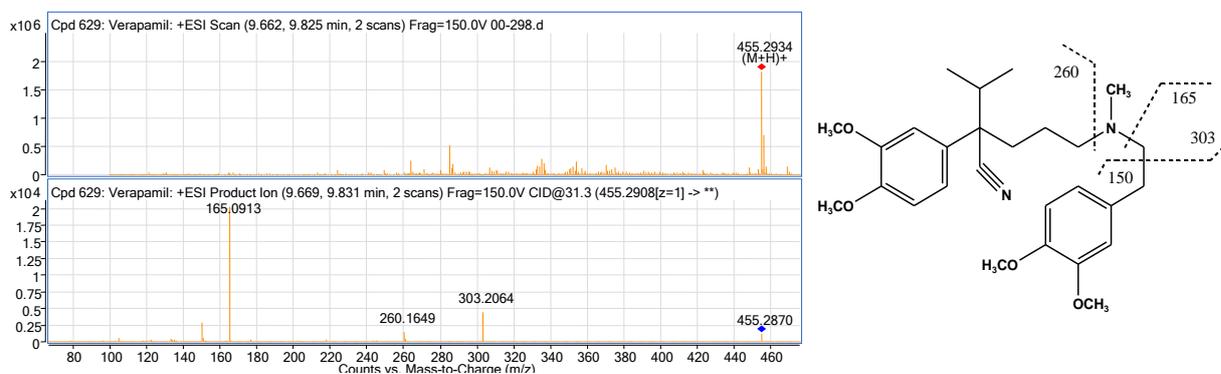


Abbildung 4.15.3: MS- und MS/MS-Spektrum von aus Blut extrahiertem Verapamil und Interpretation der Fragmentierungswege.

Tabelle 4.15.3: Charakteristische m/z-Werte und mögliche Strukturinterpretation von Verapamil.

Charakteristische m/z-Werte	Summenformel	Mögliche Strukturinterpretation	Fehler, ppm
455,2934 [M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₉ N ₂ O ₄	Verapamil + H	-6,4
303,2064	C ₁₈ H ₂₇ N ₂ O ₂	455 – (152,0797=C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₄)	0,86
260,1649	C ₁₈ H ₂₇ N ₂ O ₂	455 – (195,1259=C ₁₁ H ₁₇ N O ₂)	1,6
165,0913	C ₁₀ H ₁₃ O ₂	455 – (290,1994=C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₂)	-1,82
150,0665	C ₉ H ₁₀ O ₂	455 – (305,2229=C ₁₈ H ₂₉ N ₂ O ₂)	6,85

Mittels HPLC-DAD konnten neben Verapamil (RRT = 1,313) 10 Metabolitenpeaks Met A bis Mit J aufgrund der spektralen Ähnlichkeit mit Verapamil nachgewiesen werden (Abbildung 4.15.4). Die in Tabelle 4.15.4 vorgenommene Zuordnung der Metabolite erfolgte darüber hinaus durch Vergleich mit den LC-TOF/MS Ergebnissen, Auswertung der Retentionszeitverschiebungen, und durch Vergleich mit HPLC-Untersuchungen in der Literatur [274-279].

Tabelle 4.14.3: Retentionszeiten von Verapamilmetaboliten und mögliche Strukturklärung.

Met	RRT	Q _{RRT}	Mögliche Strukturklärung	Met	RRT	Q _{RRT}	Mögliche Strukturklärung
Met A	0,221	0,167	Met 14	Met F	0,774	0,589	N-Desmethylierung+ O-Desmethylierung
Met B	0,271	0,206	Met 13	Met G	0,824	0,627	O-Desmethylierung
Met C	0,309	0,235	Hydroxylierug + O-Desmethylierung	Met H	0,874	0,666	O-Desmethylierung
Met D	0,384	0,292	Hydroxylierug + N-Desmethylierung	Met I	1,214	0,925	Met 1
Met E	0,720	0,549	N-Desmethylierung+ O-Desmethylierung	Met J	1,632	1,243	Met 17

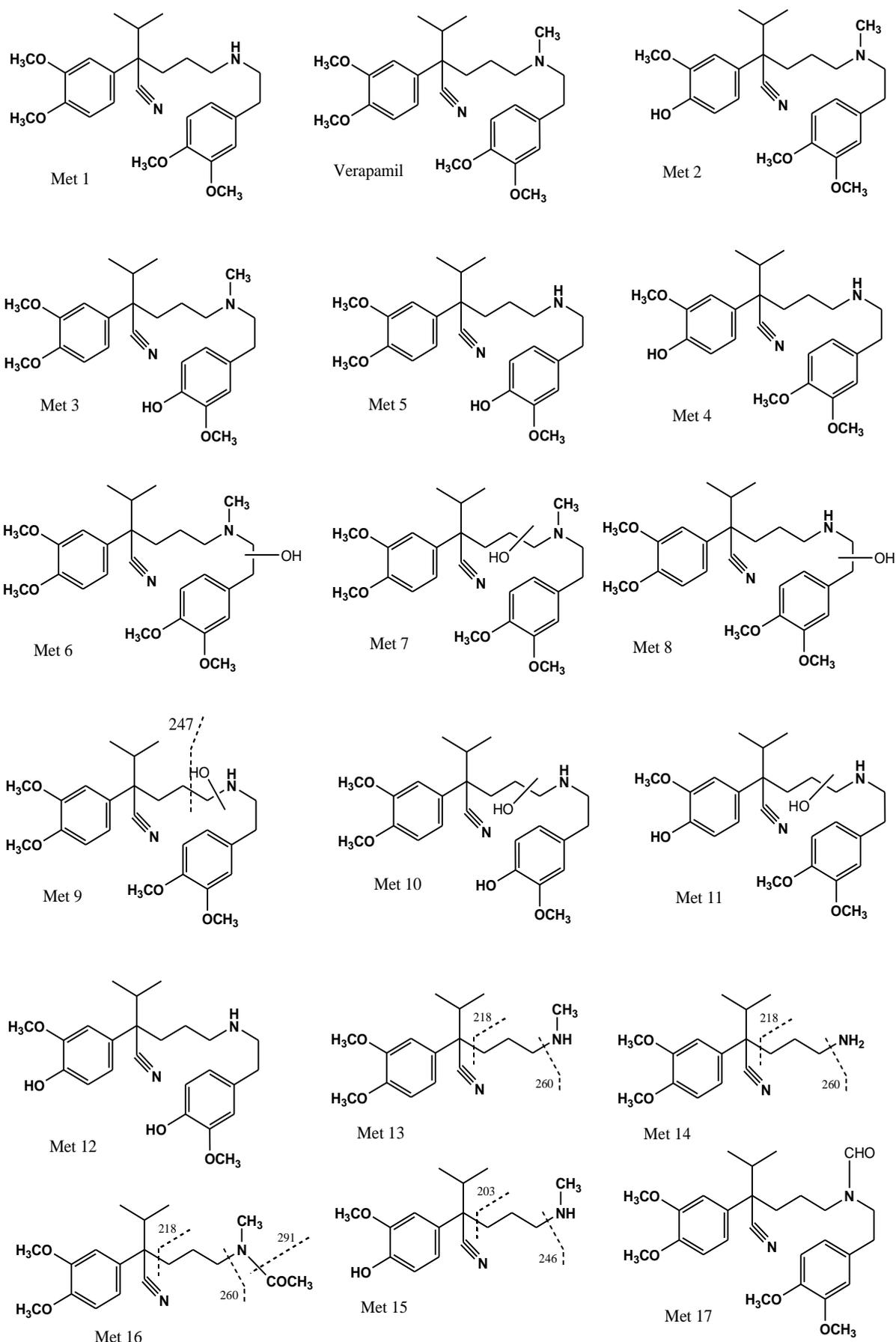


Abbildung 4.15.1: Metabolisierungsschema von Verapamil

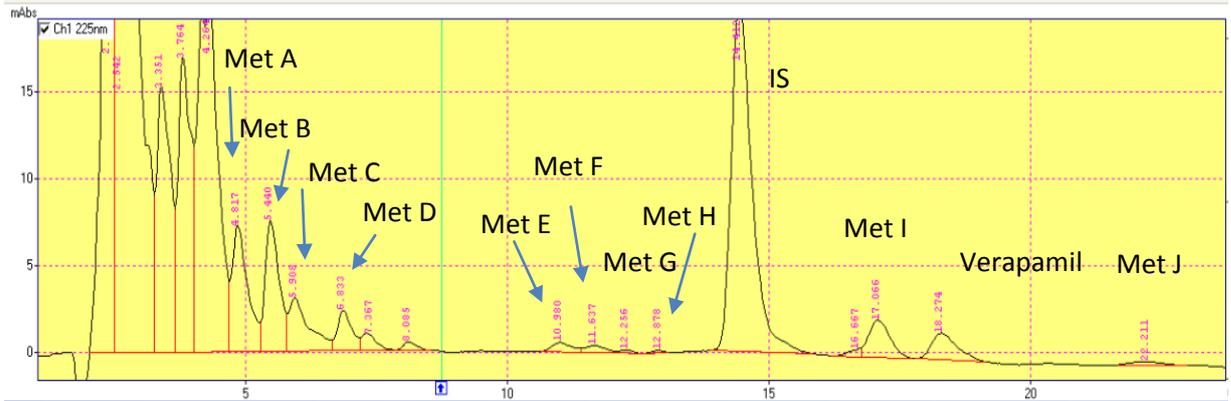


Abbildung 4.15.4: HPLC-Chromatogramm des Blutextraktes einer Verapamil-Intoxikation.

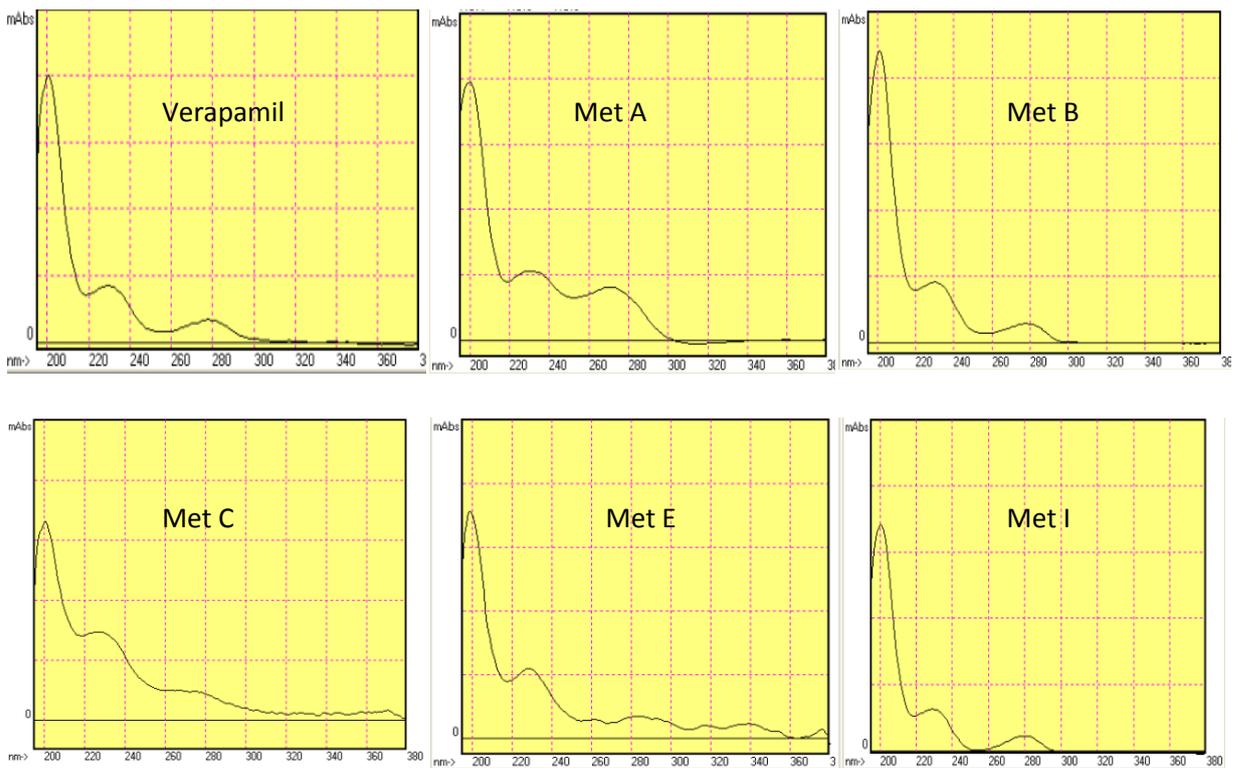


Abbildung 4.15.5: UV Spektren von Verapamil und seinen Metaboliten.

4.16 Charakterisierung von Metaboliten im Überblick

Die Identifizierung von Metabolitenstrukturen mit LC/MS und LC/MS/MS-Techniken sind ein wirksamer Ansatz aufgrund ihrer Fähigkeit Spuren aus komplexen Proben von Blut, Urin, und Organproben zu analysieren [280].

Der Schlüssel zur Strukturidentifizierung beruht auf der Tatsache, dass Metabolite in der Regel die Kernstruktur der Muttersubstanz behalten. Daher wurde angenommen, dass die Muttersubstanz und ihre Metabolite ähnliche Fragmentierungen besitzen und Massenspektren produzieren, die wichtige Substrukturen anzeigen. Dieses Kapitel beschreibt einige wichtige Biotransformationsprozesse mit konkreten Beispielen für die Erkennung und Charakterisierung der Metaboliten in biologischen Matrices mittels LC-TOF/MS im Vergleich zu den HPLC-DAD Ergebnissen.

4.16.1 Desalkylierung

Desalkylierung führt immer zu einer Verringerung des Molekulargewichts des verabreichten Medikaments. Die desalkylierten Biotransformationsprodukte sind stärker hydrophil was in einer Abnahme der Retentionszeit an RP-Phasen zum Ausdruck kommt. Im folgenden werden ausgewählte Wirkstoffe diskutiert, die einer N- und/oder O-Desalkylierung unterliegen.

Die sehr häufig vorkommende N- oder O-Desmethylierung führt zu einer negativen Massenverschiebung $[M+H]^+$ Ions der Metabolite um $\Delta m/z = -14,0156$. Die Strukturaufklärung mittels der durch LC-TOF-MS/MS gemessenen CID-Fragmentationenspektren kann in Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Verbindung einfach oder kompliziert sein und zwischen den möglichen Stellen der N- oder O-Desmethylierung unterscheiden.

Die Retentionszeitveränderungen bei der HPLC-DAD Methode für die in dieser Arbeit ausgewerteten Desalkylierung-Metabolite stimmten mit den von Herre [213] untersuchten Modell-Verbindungen überein und waren für die N-Desmethylierung (Amine) $Q_{RTT} = 0,47-0,78$, z. B. Amitriptilin zu Nortriptilin, für die N-Desemthylierung (Amide) $Q_{RTT} = 0,50-0,76$, z. B. Diazepam zu Nordiazepam, und für die O-Desalkylierung $Q_{RRT} = 0,24-0,57$ z. B. Venlafaxin zu O-Desmethylvenlafaxin. Mittels HPLC-DAD Methode konnten die Desmethylierungmetabolite durch die Ähnlichkeit des UV-Spektren im Vergleich mit der Muttersubstanz identifiziert wurden.

Als Beispiel soll Venlafaxin (VEN) etwas näher behandelt werden. Dieser Wirkstoff wird oxidativ unter N- und O-Desmethylierung abgebaut (Abbildung 4.15.1). Beide führen zu Metaboliten mit identischer elementarer Zusammensetzung der protonierten Molekülonen

$[M+H]^+$, in diesem Fall $m/z = 264,1964$, also um 14 Einheiten niedriger als das molekulare Ion von VEN ($m/z 278,2115$). Die vorgeschlagene Fragmentierung von Venlafaxin wurde im Abschnitt 4.14 behandelt (Abbildung 4.14.2, Tabelle 4.14.2).

Aus einer sorgfältigen Interpretation des LC-MS/MS Spektrums (Tabelle 4.14.1) geht hervor, dass Met 1 von der O-Desmethylierung und Met 2 von N-Desmethylierung resultiert (Abbildung 4.14.1). Hier weist die O-Desmethylierung mit $Q_{RT} = 0,82$ eine stärkere RT-Verschiebung als die N-Desmethylierung mit $Q_{RT}=0,94$ auf. Dementsprechend konnten bei den HPLC-DAD Ergebnissen der Peak Met B ($Q_{RRT}=0,732$) als N-Desmethylvenlafaxin und der Peak Met A ($Q_{RRT}=0,372$) als O-Desmethylvenlafaxin, jedoch auch als N-Didesmethyl VEN zugeordnet wurden (Abbildung 4.14.3).

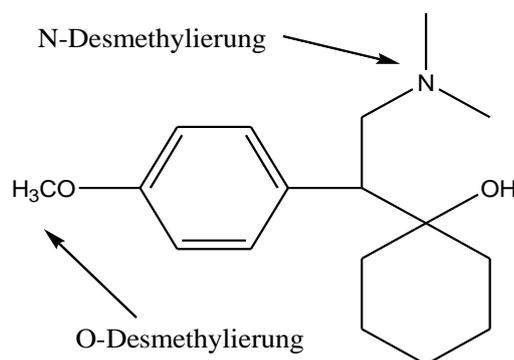


Abbildung 4.16.1: Desmethylierungsstellen des Venlafaxins

Die Didesmethylierung ergibt unabhängig davon, ob der Prozess das gleiche Heteroatom (Dimethylamino-) oder Heteroatome an zwei verschiedenen Stellen (O- und N-Methyl) betrifft, eine negative Verschiebung der LC-TOF/MS gemessenen Masse des Metaboliten um $-28,0312$. Da im Vergleich zu der Muttersubstanz z.B. Citalopram (CIT) zu N,N-Didesmethyl-CIT (siehe Abschnitt 4.3), Verapamil (VER) zu N,O-Didesmethyl-VER (siehe Abschnitt 4.15).

In gleicher Weise ergibt auch die LC-TOF/MS-Messung bei einer einzigen Desethylierung unabhängig vom Heteroatom eine negative Verschiebung um $-28,0312$ Da, z. B. für Amiodaron (Abbildung 4.16.2).

Dagegen ergibt eine Herausspaltung einer $-CH_2-CH_2-$ Gruppe aus einem Ring mit zwei Heteroatomen (z. B. Piperazin- oder Morpholin-Ring, meist zwei Stickstoffe, aber möglich aus Kombinationen von N-, O- und S-) einen Verlust von nur 26 Da von der mit LC-TOF/MS-gemessenen Masse der Muttersubstanz, z.B. für Met 6 ($[M+H]^+ = 358,1603$,

RT=7,16) des Quetiapins ($[M+H]^+ = 384,1757$, RT=15,92 min) (siehe Abschnitt 4.11, Abbildung 4.11.1B und Tabelle 4.11.1).

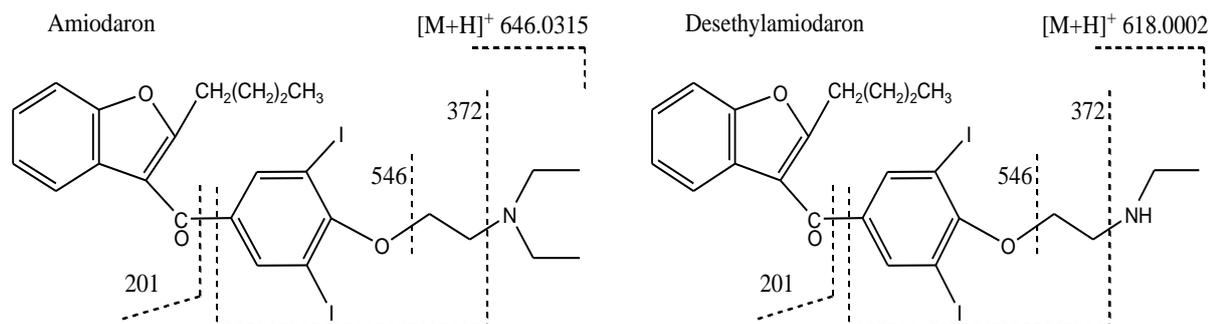


Abbildung 4.16.2: Fragmentierungsschema von Amiodaron (RT= 20,402 min) und seines Metaboliten Desethylamiodaron (RT= 19,302 min). Im Vergleich dazu wurde bei den HPLC-DAD Ergebnissen neben Amiodaron (RRT=0,952) ein Peak (RRT=0,650) mit identischem Spektrum, als N-Desethylamiodaron zugeordnet.

Desalkylierungen können auch die Abspaltung einer größeren strukturellen Einheit beinhalten und entweder ein einziges Heteroatom (O- oder N-) oder zwei Heteroatome betreffen. Das ist zum Beispiel der Fall bei dem Metaboliten Met 3 des Saquinavirs (siehe Abschnitt 4.12, Abbildung 4.12.1, Tabelle 4.12.1).

4.16.2 Oxidative Desaminierung

Neben den Cytochrom P450-Enzymen katalysieren auch die in der Leber vorhandenen Monoaminoxidasen (MAOs) die oxidative Desaminierung von vielen Medikamenten und Xenobiotika. Ähnlich wie die oxidative N-Desalkylierung, beinhaltet auch die oxidative Desaminierung zunächst die Spaltung einer C-N-Bindung. Die dabei entstehende Hydroxyverbindung wird jedoch häufig weiteroxidiert.

Als Beispiel bildet das Sertralin ($[M+H]^+ = 306,0821$, RT=12,12 min) nach oxidativer Desaminierung den Metaboliten Sertralin-Keton ($[M+H]^+ = 291,0335$, RT=14,85) (siehe Abschnitt 4.13, Abbildung 4.13.1 und Tabelle 4.13.1).

Als andere Beispiele sind Citalopram (Abschnitt 4.3) und Diphenhydramin (Abschnitt 4.5) zu nennen, die beide ein säure-Derivat bilden. Diese haben beide schlechte Ionausbeuten im positiven ESI Modus. Sie wurden deshalb im negativen ESI Modus gemessen und zeigten ein $[M-H]^-$ Molekülion. Die Q_{RRT} -Werte der Wirkstoffpaare nehmen nach der oxidativen Desaminierung zu (Tabelle 4.16.1). Durch HPLC-DAD konnten diese Metabolite aufgrund der Spektrenähnlichkeit und der Retentionszeitveränderungen zugeordnet werden.

Tabelle 4.16.1: Retentionszeitveränderungen durch Desaminierung am Beispiel von Citalopram, Diphenhydramin und Sertralin.

Ausgangsverbindung A	Metabolit M	RT _A		RT _M		Q _{RT}	
		HPLC	LC	HPLC	LC	HPLC	LC
Citalopram	CIT	7,78	7,11	20,79	8,01	2,67	1,12
	Propionsäure						
Diphenhydramin	DPS	7,98	7,1	21,25	8,18	2,66	1,16
Sertralin	Sertralin-Keton	22,42	12,12	28,12	14,85	1,25	1,22

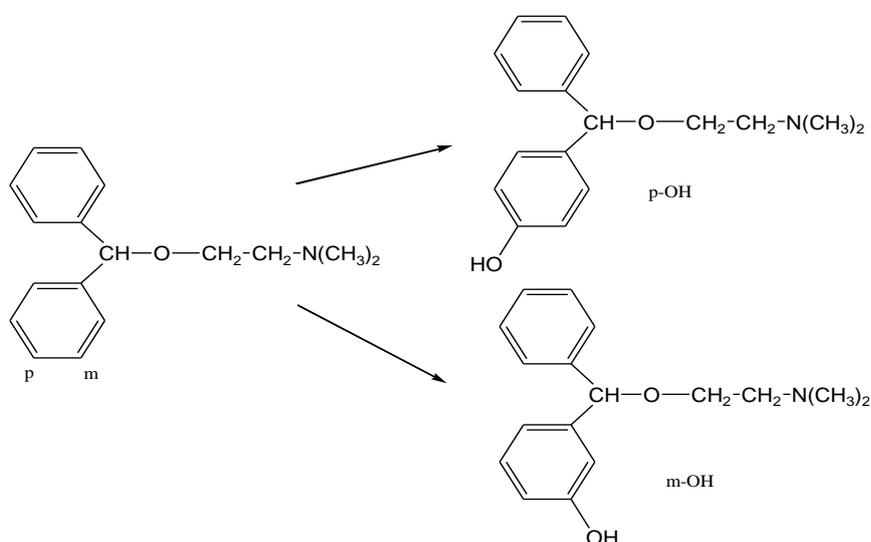
4.16.3 Oxidation am Kohlenstoff

4.16.3.1 Hydroxylierung

Hydroxylierung kann an einem aromatischen oder einem aliphatischen Kohlenstoffatom auftreten. Die Fragmentierung bei LC-TOF/MS oder LC-TOF/MS/MS Spektren werden oft verwendet, um zwischen diesen beiden Arten zu unterscheiden.

Hydroxylierungen werden hauptsächlich durch das Cytochrom P450 (CYP450)-System katalysiert. Der Mangel an Substratspezifität dieser Systeme kann zur Hydroxylierung an mehreren Stellen führen, wobei die Produkte das gleiche Molekulargewicht haben. Alle Monohydroxylierungsreaktionen führen zu einer Verschiebung der mit LC-TOF/MS detektiert Masse um +15,9949 (+16) Da gegenüber der Muttersubstanz.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie allein ist es zum Beispiel im Falle von Diphenhydramin sehr schwierig, zwischen der p-OH und m-OH-Verbindung zu unterscheiden (Abbildung 4.16.3), dieses würde NMR und / oder Vergleich mit Referenz-Standards erfordern.

**Abbildung 4.16.3:** Zwei mögliche aromatische Hydroxylierungspositionen des Diphenhydramins.

Midazolam MDZ wird in erster Linie zu 1-OH-MDZ, zu einem kleineren Teil zu 4-OH-MDZ sowie auch zu 1,4-Dihydroxy-MDZ metabolisiert. Unter ESI LC-TOF/MS-Bedingungen protonierte Moleküle für MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ und 1,4-Dihydroxy-MDZ wurden m/z 326,0860, 342,0809, 342,0809 und 358,0759 erkannt. Die CID Fragmentationen entsprechend dem Verlust eines Wassermoleküls wurden für 1-OH-MDZ und nicht für 4-OH-MDZ beobachtet. Beim 1-OH-MDZ steht ein Wasserstoffatom aus dem chlorhaltigen Ring für die Wasser-Eliminierung zur Verfügung, um einen stabilen Fünfring zu bilden (Abbildung 4.16.4), während ein solches stabiles Produkt nicht von 4-OH-MDZ gebildet werden kann.

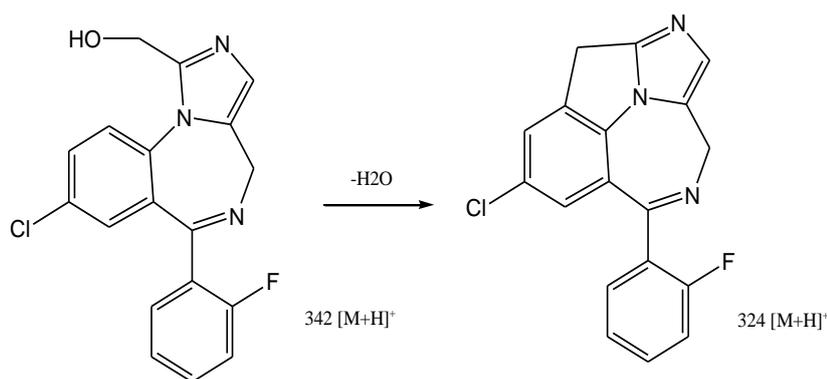


Abbildung 4.16.4: Erklärung für den Wasserverlust bei 1-OH-MDZ

Basierend auf der Beobachtung des $[M + H - H_2O]^+$ Ions und dem Vergleich der MS/MS-Spektren von MDZ und MDZ+16 (Abbildung 4.16.5) lassen sich 1-OH-MDZ und 4-OH-MDZ unterscheiden. Die Wasser-Verlust von letzterem ist wegen des fehlenden α -Wasserstoffatoms nicht möglich.

Mittels HPLC-DAD konnten die Hydroxylierungs-Metabolite am aromatischen Kohlenstoff nur mit Hilfe einer Referenzsubstanz identifiziert werden, weil das zu einer Chromophorenänderung führt, wie z. B. beim Lidocain. Die Hydroxylierung an einem aliphatischen Kohlenstoff hat hingegen keinen Einfluss auf den Chromophoren und kann daher durch die spektrale Ähnlichkeit und die Retentionszeitveränderung vermutet werden wie z. B. beim Midazolam.

Abbildung 4.16.6 zeigt die UV-Spektren von Lidocain ($RRT=0,178$), und dessen Metaboliten 3-Hydroxylidocain ($RRT=0,087$), sowie von Midazolam ($RRT=0,447$) und dessen Metaboliten 1-OH-MDZ. Die Retentionszeitveränderungen durch die Hydroxylierung beträgt für die aliphatische Hydroxylierung $Q_{RRT}= 0,16-0,83$ und für die aromatische Hydroxylierung $Q_{RRT}=0,29-0,65$.

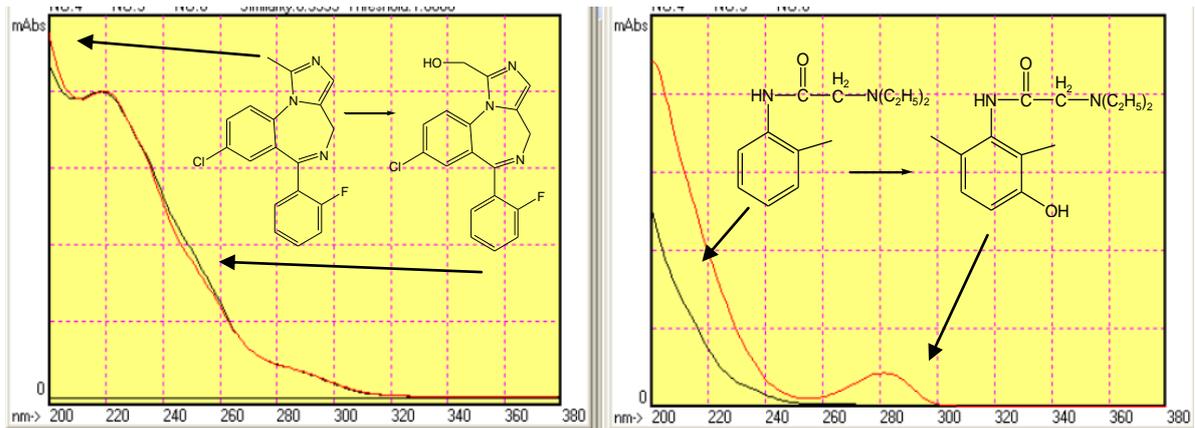


Abbildung 4.16.6: UV-Spektren von Midazolam (MDZ), 1-OH-MDZ, Lidocain und 3-Hydroxy-Lidocain

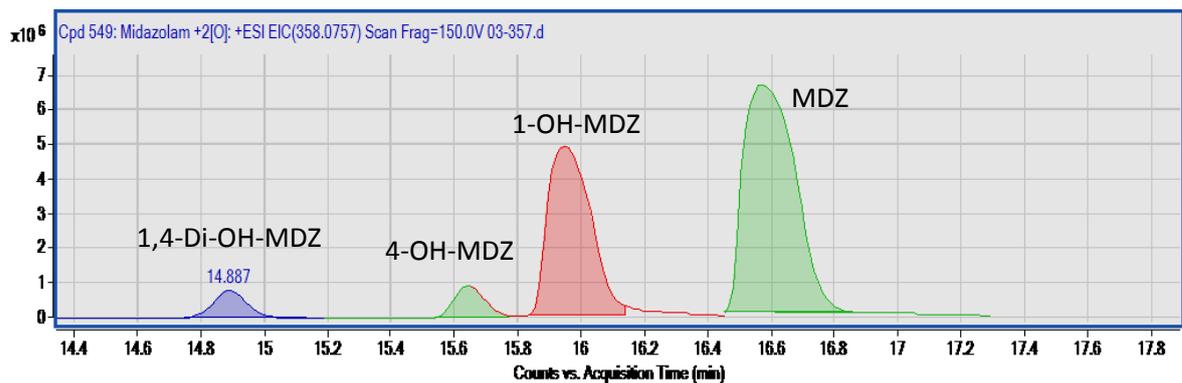


Abbildung 4.16.5: LC-Chromatogramm von Midazolam und seinen Hydroxylierungs-Metaboliten.

14.16.3.2 Epoxidierung:

Epoxidierung resultiert aus der metabolischen Übertragung eines Sauerstoffatoms auf eine C=C-Doppelbindung. Wie bei der Hydroxylierung resultiert eine Zunahme des Molekulargewichts um +15,9949 (+16) Da gegenüber der der Muttersubstanz.

Die Epoxid-Metabolite sind in der Regel instabil und können zur Bildung von Glutathion-Konjugate führen. Als Beispiel mit einem stabilen Epoxid ist das des Carbamazepin (CBZ) zu nennen. Neben dem Hauptmetaboliten 10,11-Epoxycarbamazepin, entstehen die Hydroxymetabolite 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ mit identischen Molekulargewichten ($m/z = 252,08988$).

Wie in der Abbildung 4.16.7 anhand des Fragmentierungsschemas unter ESI LC-TOF/MS Bedingungen dargestellt ist, besitzen sowohl CBZ-Epoxid und die beiden OH-CBZ das Fragment-Ion $m/z = 210$. Das Fragment-Ion $m/z = 180$ wird hingegen nur von CBZ-Epoxid gebildet und nicht von den Hydroxy-Metaboliten.

Ergebnisse und Diskussion

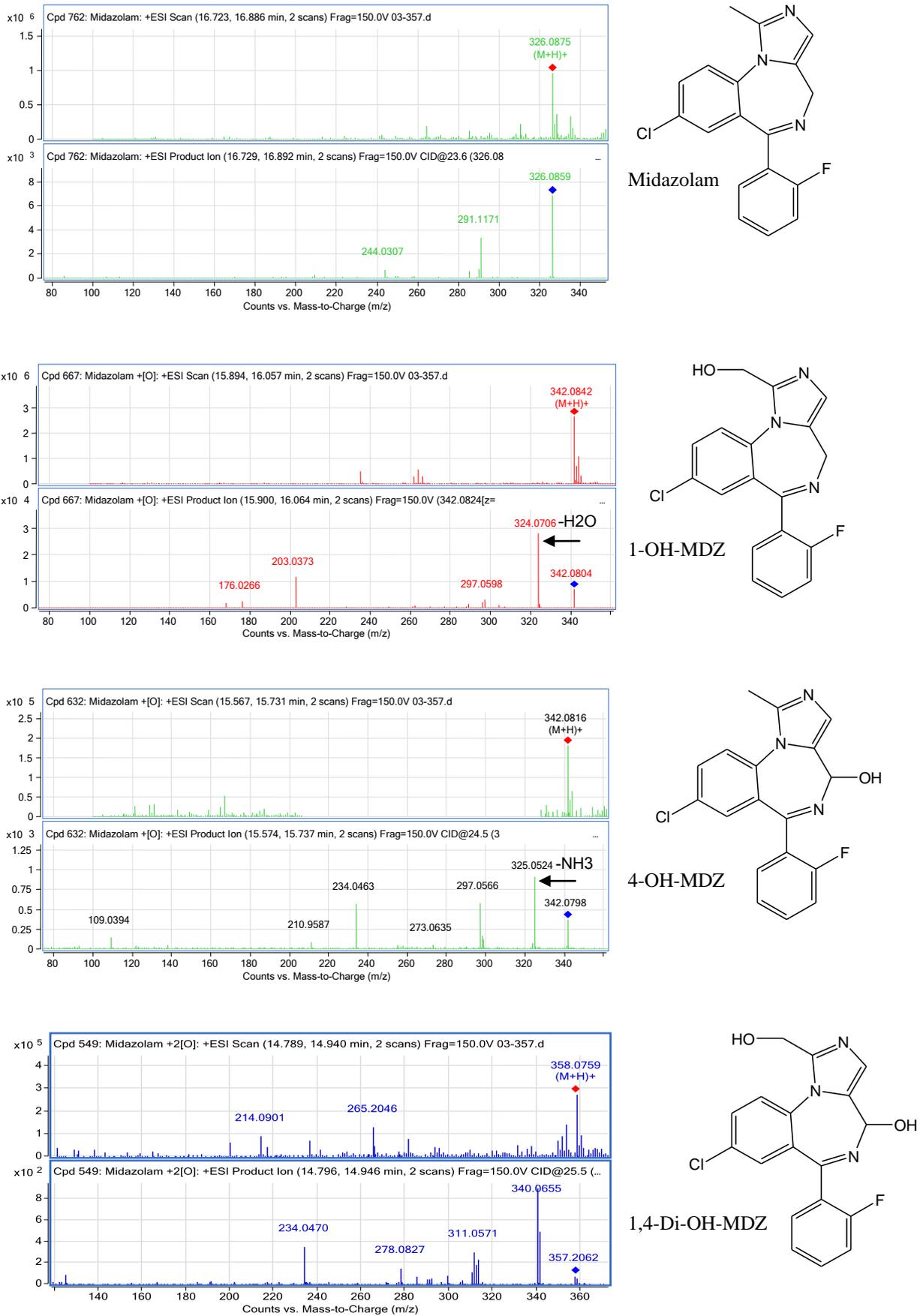


Abbildung 4.16.5: MS/MS-pektren von Midazolam und seinen Hydroxylierungs-Metaboliten.

Die Epoxidierung ist mit einer Chromophorenveränderung verbunden. Deshalb ist ein Vergleich mit Referenzsubstanz notwendig, um den Epoxid-Metabolite durch HPLC-DAD zu nachweisen. Abbildung 4.16.8 zeigt die UV-Spektren von CBZ und CBZ-Epoxid. Die Retentionszeit von CBZ-Epoxid mit RRT=0,279 ist im Vergleich zu CBZ mit RRT= 0,531 deutlich kürzer.

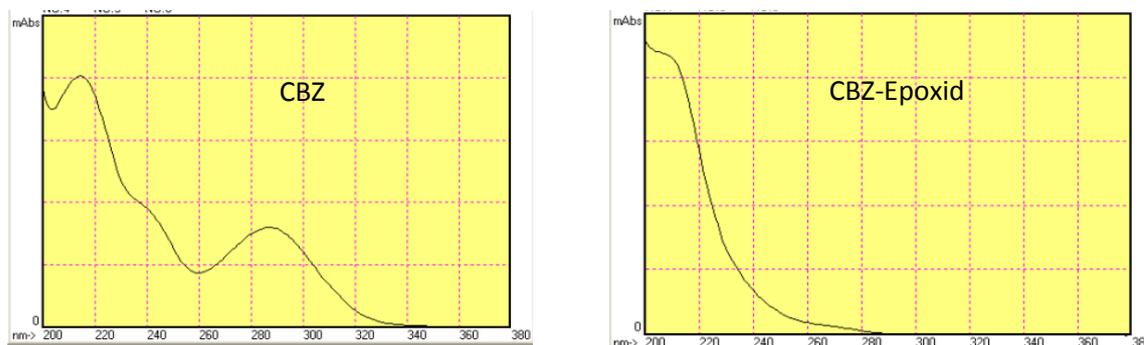


Abbildung 4.16.8: UV-Spektren von CBZ und CBZ-Epoxid

4.16.4 Oxidation am Stickstoff

Die Oxidation von Stickstoff und anderen Heteroatomen wird in erster Linie durch Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert. FMOs katalysieren seltener Oxidationen an Stickstoff-Atomen. Tertiäre Amine bilden durch die Oxidation N-oxid-Metabolite, während primäre und sekundäre Amine Hydroxylamine bilden (oder N-oxid mit Dehydrierung).

N-Oxidation bei tertiären und aromatischen Aminen führt zu einem Anstieg des Molekulargewichts um +15,9949 (+16) Da. Sekundäre Amine können auch ein N-oxid bilden gefolgt von einer Oxidation (-2H) unter Einbeziehung des α -Kohlenstoffatoms, das führt zu einem Massenanstieg von 14 Da. Abbildung 4.5.4 (Abschnitt 4.5) zeigt das Diphenhydramin-N-oxid Spektrum im Vergleich zu Hydroxydiphenhydramin als Beispiel für die Unterscheidung der +16 Oxidationsmetabolite.

Unter LC-APCI-MS Bedingungen (APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) aber nicht unter MS/MS-Bedingungen, bilden die N-oxide durch In-Source Zersetzung diagnostische $[M + H - O]^+$ Ionen, während die Metaboliten der aliphatischen und aromatischen Oxidation von Kohlenstoff diese diagnostische Fragment-Ionen nicht bilden. Wenn in der Ionenquelle vor oder nach der Ionisation erhebliche thermische Energie auf den Metaboliten übertragen wird, können N-oxide auch einer Desoxygenierung unter LC-ESI-MS Bedingungen unterliegen [281]. Die Abbildungen 4.4.2 und 4.4.4 (Abschnitt 4.4) zeigen die Spektren von Clozapin ($m/z = 327$) und Clozapin-N-oxid ($m/z=343$), die unter ESI LC-TOF/MS/MS Bedingungen die Fragmentionen 296 und 227 bilden.

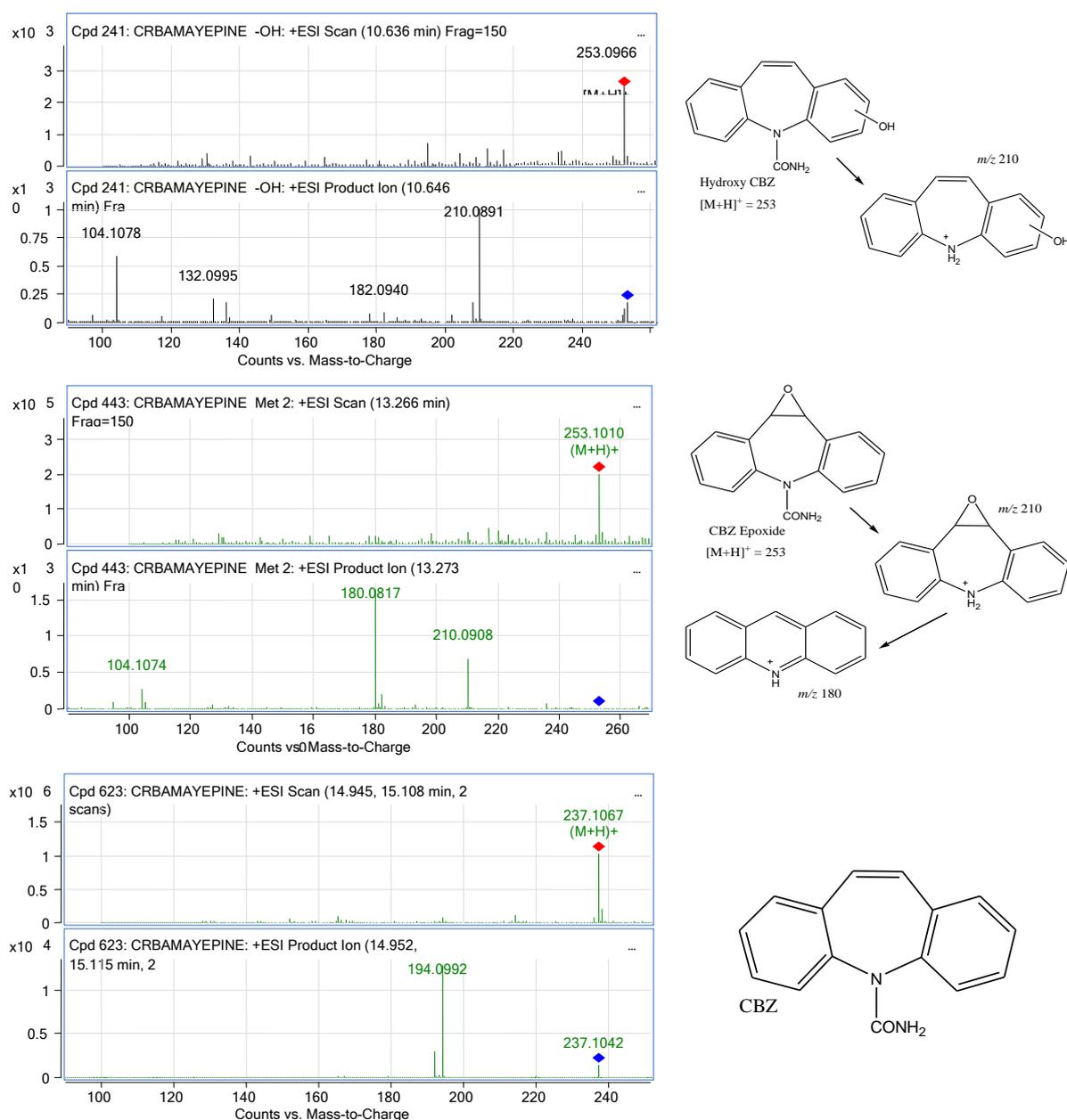


Abbildung 4.16.7: MS/MS Spektren von CBZ, CBZ-Epoxid und Hydroxy-CBZ und mögliche Fragmentierungsschema.

Die Beobachtung der Fragment-Ionen mit m/z 227 lässt vermuten, dass der Metabolit nicht an der tricyclischen Ringeinheit fragmentiert wurde. Das Fragment-Ion bei m/z 296 weist darauf hin, dass dieser Metabolit ein N-oxid sein könnte, oder eine N-CH₃-Einheit, die zu N-CH₂OH biotransformiert wurde. Somit können die LC-ESI-MS und LC-ESI-MS/MS Spektren keine eindeutigen Beweise über die Stelle der N-Oxidation bieten. Allerdings kann die Verfügbarkeit von Referenzstandards die Identifizierung der Metaboliten sichern. Kratzsch [282] berichtete für die LC-APCI-MS-Spektren von CLZ und CLZ-N-oxid, dass die Fragmentionen $[M + H - O]^+$ für CLZ-N-oxid bei m/z 327 für die Unterscheidung des N-oxids vom hydroxylierten Metaboliten geeignet ist.

Die N-Oxidation führt zur Retentionszeitverlängerung, was zur Unterscheidung zwischen Hydroxylierung und N-Oxidbildung benutzt werden kann, wenn es nicht durch die Fragmentation möglich ist.

Im Gegensatz zur N-Oxidation an der aromatische Aminogruppe sollte die N-Oxidation von tertiären aliphatischen Aminen keine UV spektralen Veränderung bewirken. Beispiele sind Citalopram-N-oxid (Abbildung 4.3.19) und das Diphenhydramin-N-oxid (Abbildung 4.5.5).

Ähnlich wie bei der N-Oxidation und bei der Hydroxylierung, haben auch die Hydroxylamin- Metaboliten einer Erhöhung des Molekulargewichts um +15,9949 (+16) Da. Die Unterscheidung der Hydroxylamine von anderen monooxydierten Metaboliten ist auch nicht einfach. Neben der Fragmentierung durch LC-TOF/MS oder der spektralen Ähnlichkeit spielt die Retentionszeitverkürzung eine große Rolle. Ein Beispiel ist das Sertralinhydroxylamin (Abbildungen 14.13.1 und 14.13.3 sowie Tabellen 14.13.1 und 4.13.3).

4.16.5 Oxidation am Schwefel

Als Metabolite der Oxidation am Schwefelatom entstehen das Sulfoxid und das Sulfon [283]. Unter ESI-LC-TOF/MS Bedingungen ließen sich für Quetiapin (QTP) neben dem Desalkylmetaboliten Met 4 das Desalkyl-QTP-sulfoxid Met 4B und das Desalkyl-QTP-sulfon Met 4F nachweisen. Die Fragment-Ionen bei m/z 264, die durch Verlust der SO-Einheit vom Met 4B und Verlust der SO₂-Einheit vom Met 4F entstehen, gelten dabei als Beweise für die Mono- und Di-Oxidation des Schwefels. Dagegen gilt das Fragment-Ion m/z 280 im MS/MS Spektrum von Met 4G und Met 4C als Beweis für die Hydroxylierung des Metaboliten Met 4B (Abbildung 4.16.9). Tabelle 4.11.1 zeigt die charakteristischen m/z -Werte, die Fragmente und die Retentionszeit der Metabolite.

Die S-Oxidation führt zur UV-spektralen Veränderung, deshalb ist der Vergleich mit einer Referenzsubstanz notwendig um die Metaboliten-Identifizierung durch die HPLC-DAD zu ermöglichen. Als Beispiel zeigt die Abbildung 4.16.10 das Chromatogramm einer Promazin-Intoxikation und UV-Spektren des Promazins und des Promazin-sulfoxids, welches als Referenzsubstanz verfügbar war.

Sulfoxide anderer Phenothiazine besitzen allerdings ähnliche sehr typische UV-Spektren so dass sie gegebenenfalls auch ohne Referenzsubstanz erkannt werden können.

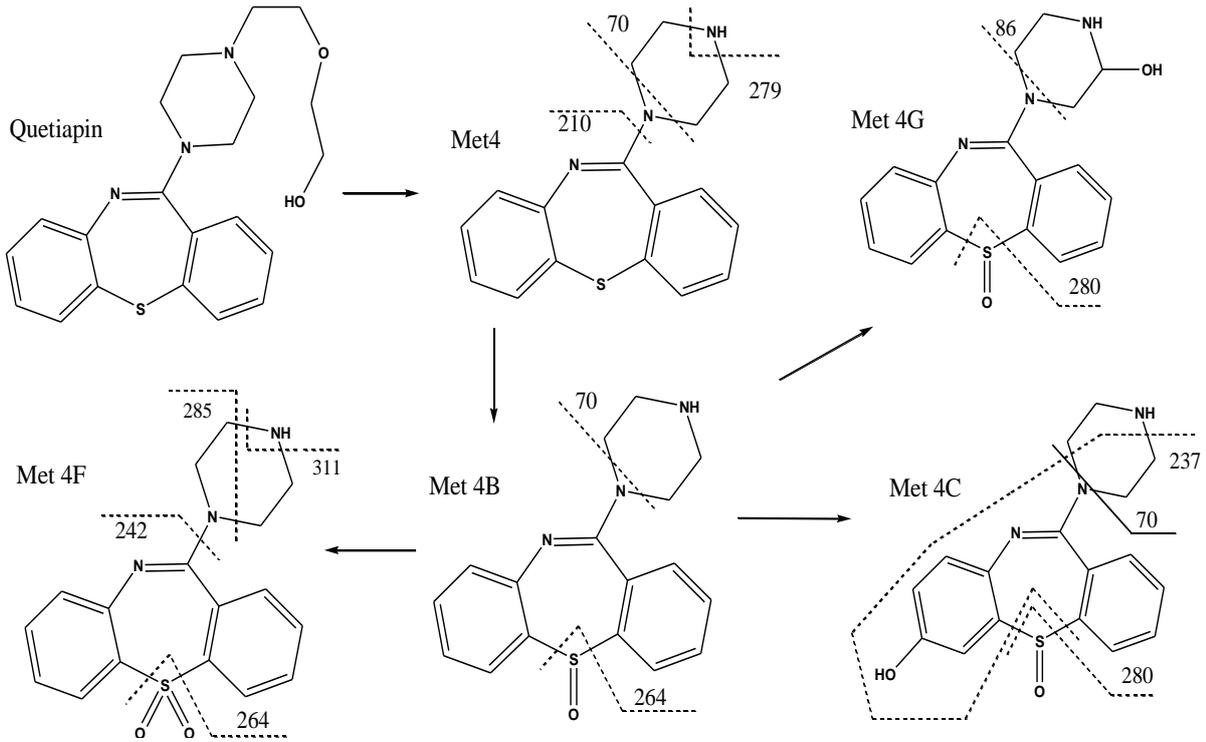


Abbildung 4.16.9: Mögliche Fragmentierung der Quetiapinmetabolite

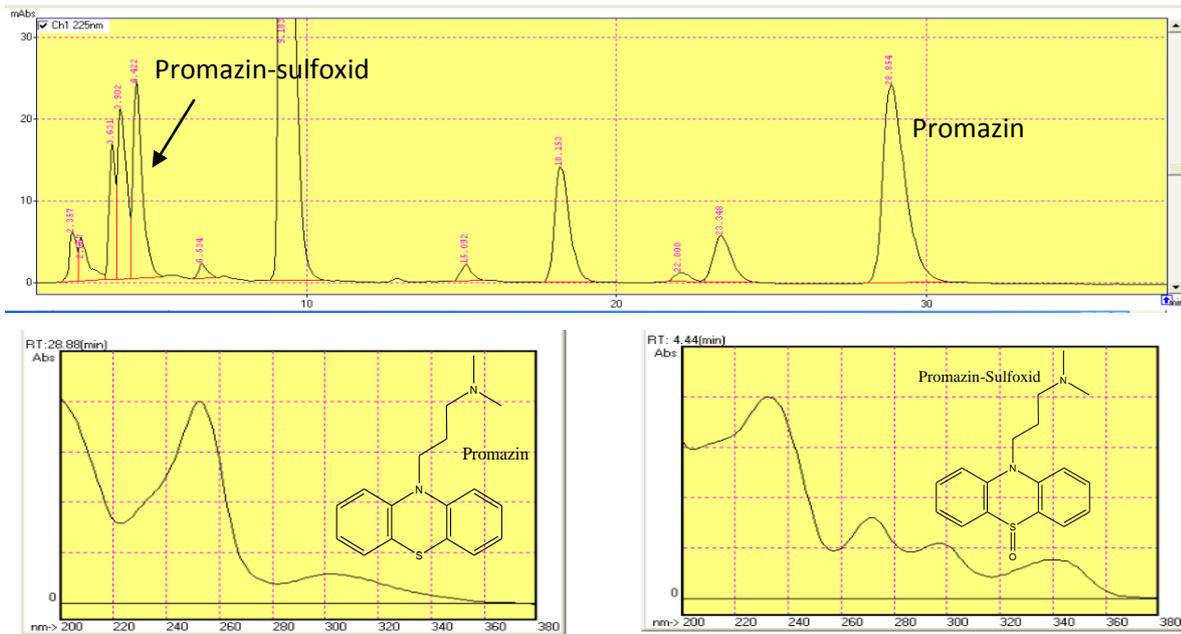


Abbildung 4.16.9: Chromatogramm einer Leberextraction einer Promazin-Intoxikation und UV-Spektren des Promazin und des Promazin-sulfoxid (Laufmittel C).

Die S-Oxidation führt zur Retentionszeitverkürzung. Mittels LC-Agilent Methode beträgt Q_{RT} für die Monooxidation 0,755 und für die Dioxidation 0,830, während Q_{RRT} mittels HPLC-DAD Methode für die Monooxidation 0,08 und für die Dioxidation 0,12 beträgt.

4.16.6 Dehalogenierung

Oxidative Dehalogenierung ist die Entfernung von Halogenatomen wie Fluor, Chlor und Brom bei gleichzeitiger Addition einer OH-Gruppe. Dabei erfolgt eine Molekulargewichtsverschiebung von 2, 18 und 62 Da. Unter LC-TOF/MS-Bedingungen wird die Abwesenheit der Isotopenmuster von $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ und $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ in den Massenspektren als Beweis für die Dehalogenierung beobachtet (Abbildung 4.16.10). Dagegen verläuft die oxidative Defluorierung ohne Veränderung des Isotopenmusters. Die oxidative Dehalogenierung führt zu Retentionszeitverkürzung im Bereich von $Q_{\text{RRT}}=0,11-0,95$. Als Beispiel zeigen die Abbildungen 4.4.2 und 4.4.6 die Massenspektren von Clozapin CLZ und 8-Hydroxy-CLZ.

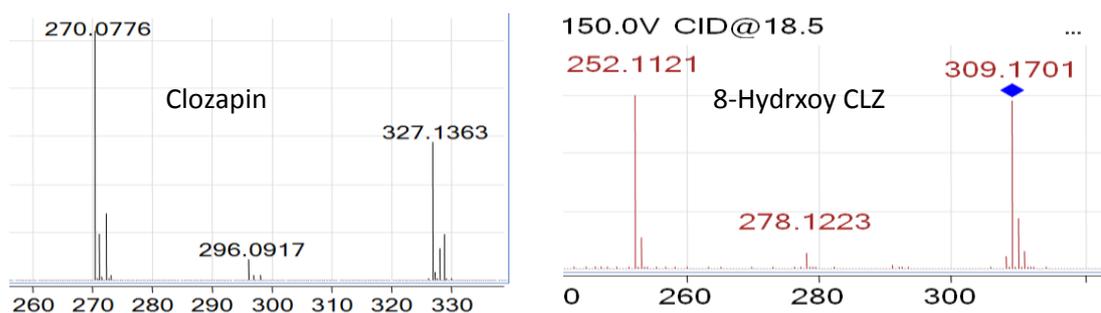


Abbildung 4.16.10: Die Abwesenheit der $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ Isotopenmuster im 8-Hydroxy-CLZ-MS/MS-Spektrum im Vergleich zum CLZ-MS/MS Spektrum.

5. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Blutproben von Todesfällen mit bekannter vorheriger Einnahme von Medikamenten in therapeutischen, toxischen oder letalen Dosen mit Hilfe der HPLC mit Photodiodenarraydetektor und mit Flüssigchromatographie gekoppelt mit Flugzeit-Massenspektrometrie auf die Anwesenheit von Wirkstoffmetaboliten untersucht. Dabei wurden 47 Wirkstoffe in je 2 bis über 100 Proben analysiert und ausgewertet. Von diesen wurden 6 Wirkstoffe ausführlich beschrieben und für 9 weitere wurde eine gekürzte Zusammenfassung der Ergebnisse gegeben. Insgesamt können aus den in dieser Studie erhaltenen Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Der Nachweis von Metaboliten ist in der forensisch- und klinisch-toxikologischen Analyse von sehr großer Bedeutung. Metabolite erleichtern die Substanzidentifizierung, da sie ein überzeugender Beweis für die Aufnahme der Muttersubstanz sind. Konzentrationen von Muttersubstanz und deren aktiven Metaboliten helfen bei der Einschätzung der Schwere von Intoxikationen.

Weiterhin kann die Feststellung der relativen Konzentration der Metabolite zur Muttersubstanz bei der Ermittlung des Aufnahmezeitpunkts der Muttersubstanz helfen, wie z. B. im Falle des Diphenhydramins. In anderen Fällen kann das Metabolit/Wirkstoff-Verhältnis zur Unterscheidung von oraler und parenteraler Aufnahme dienen, da bei letzterer der first-pass-Metabolismus fehlt. Andererseits sind einige Metabolite auch selbst als Medikamente erhältlich, weshalb ihr Nachweis nicht unbedingt die Anwesenheit der entsprechenden Muttersubstanz beweist. Für die Identifizierung von Metaboliten standen im Gegensatz zu den Wirkstoffen in der Regel keine Referenzsubstanzen zur Verfügung. Es zeigte sich aber, dass die Detektion und die Charakterisierung von Metaboliten in der Mehrzahl der Fälle effektiv durch die Anwendung der grundlegenden Prinzipien der biochemischen Stoffwechselreaktionen und mit empfindlichen und selektiven analytischen Technik erreicht werden kann.

- Die Nachweisbarkeit der Metaboliten hängt von der Art der Probe und der Probenvorbereitung ab. In dieser Arbeit beschränkt sich die Probenvorbereitung hauptsächlich auf die basische und saure Extraktion von Blutproben mit Methylenchlorid. Blutproben spielen einerseits in der toxikologischen Analyse die größte Rolle, sind aber andererseits ärmer an Metaboliten als Urinproben. Weiterhin konnten Metabolite mit hoher Hydrophilie wie Glucuronide und Sulfate durch Extraktion mit Methylenchlorid nicht erfasst werden.

- Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Diodenarraydetektor (HPLC-DAD) und mit Elektrospray-Ionisations - Flugzeitmassenspektrometrie (LC-ESI-TOF/MS) sind analytische Techniken, die sich ideal für die Metaboliten-Charakterisierung ohne Referenz-Standards eignen.

Bei der HPLC-DAD besitzen Metabolite häufig identische oder sehr ähnliche UV-Spektren wie die Muttersubstanzen und eine Zuordnung zu einer bestimmten Struktur kann durch die Veränderung der Retentionszeit wahrscheinlich gemacht werden. Als großer Vorteil erwies sich die Abschätzung von Konzentrationen aus der Peakfläche, wenn Muttersubstanz und Metabolit den gleichen Chromophoren aufweisen. Frühere Ergebnisse zu dieser Anwendung der HPLC-DAD konnten in den vorliegenden Untersuchung an neuen Wirkstoffen bestätigt und erweitert werden.

- Die Vorteile der LC-ESI-TOF/MS bestehen vor allem in der hohen Massengenauigkeit von < 5 ppm und dem hohem Auflösungsvermögen, die zusammen mit dem Isotopenmuster die Summenformeln von Wirkstoffen und Metaboliten liefert. Metabolite können durch definierte, für die jeweilige Biotransformation typische exakte Massendifferenzen zur Muttersubstanz erkannt und durch die Extraktion der entsprechenden Ionenchromatogramme nachgewiesen werden.

Die höhere Empfindlichkeit ermöglicht dabei auch die Charakterisierung von Nebenmetaboliten, die nicht mit anderen Ionisationstechniken oder mit HPLC-DAD ermittelt werden konnten. Ein weiterer Vorteil besteht in der kompletten Erfassung aller Daten ohne Beschränkung oder vorherige Festlegung auf bestimmte Substanzen. Daher kann nach der Messung in einem Analysenfile einer Probe eine umfassende Suche nach beliebigen Metaboliten durchgeführt werden.

- Die Bestimmung der Art eines Metaboliten aus der Summenformel (z. B. eines Hydroxylierungsproduktes) ist nicht immer ausreichend, da Isomere durch Reaktion an verschiedenen Positionen des Moleküls möglich sind.

Mittels einstufiger LC-TOF/MS Instrumente (Waters LCT-PremierTM-XE und Agilent 6210 ESI-MS-TOF Gerät) konnten zusätzliche strukturelle Informationen erhalten werden. Das war möglich, wenn in der Ionenquelle dieser einstufigen Instrumente durch Erhöhung der Spannung zwischen der Kapillar-Öffnung und dem Skimmerkegel im Bereich höheren Druckes eine Fragmentierung der protonierten Molekülonen durch Kollisions-induzierte Dissoziation bewirkt wird (in-source CID). Dieses erfordert jedoch wegen der Unfähigkeit der einstufigen Instrumente, eine isolierte Vorläufermasse für diese Fragmentierung zu wählen, eine vollständige Trennung der Metabolite in der LC.

Darüber hinaus begrenzen Streuverluste und ineffiziente Dissoziation im Hochdruck-Bereich der ESI-Quelle die analytischen Empfindlichkeit dieser Technik.

Im Gegensatz dazu sind MS-MS-Verfahren wie LC-QTOF/MS (Agilent 6530 ESI-QTOF-MS) ideal zur Strukturaufklärung von Metaboliten, weil der Metabolit durch den vorgeschalteten Quadrupol vor der Fragmentierung sauber von anderen Bestandteilen abgetrennt wird und die Full-Scan-Produkt-Ionen-Spektren bei hoher Auflösung erhalten werden.

- Die Retentionszeit (RT) erwies sich als ein sehr nützliches Kriterium zur Identifizierung von Metaboliten, auch bei LC-TOF-MS-Experimenten. RT der Metaboliten können unter standardisierten Bedingungen aus Routineproben erfasst und gemeinsam mit der spektralen Daten später in Datenbanken eingesetzt werden.
- Die Möglichkeit der Erkennung der Metaboliten ohne Referenz-Verbindungen ist ein großer Vorteil der LC-TOF-MS- und LC-QTOF-MS-Techniken. Daher sollte die Suche nach Metaboliten in den entsprechenden Analysenfiles mithilfe speziell entwickelter Software-Tools ein fester Bestandteil bei der Auswertung in der Systematischen Toxikologischen Analyse sein. Die Prüfung der Anwendbarkeit solcher Spezialsoftware wie „MassHunter Metabolite ID“ oder „Metabolynx“ zur Identifizierung von den Abbauprodukte im Blut erwies sich im Rahmen dieser Arbeit als erfolgreich.
- Die Zahl der Metabolite zu den einzelnen Wirkstoffen, die durch LC-MS-TOF nachgewiesen wurde, war allgemein deutlich höher als die der durch HPLC-DAD gefundenen. Der Grund hierfür ist vor allem die geringe Konzentration dieser Metabolite, die nur noch durch die höhere Empfindlichkeit der MS-Detektion erfasst wurde. Weitere Ursachen sind ungeeignete chromatographischen Eigenschaften oder fehlende UV-Absorption der Metabolite.
- Ergebnisse der Identifizierung von Metaboliten mittels LC-TOF-MS konnten häufig auch für die eindeutige Peakzuordnung in den HPLC-DAD-Chromatogrammen genutzt werden.

Hierdurch konnte das Routineverfahren der HPLC-DAD zur systematischen toxikologischen Analyse weiter auf Metabolite ausgedehnt werden. Diese Übertragung von LC-TOF-MS-Ergebnissen auf die HPLC-DAD wird aber dadurch erschwert, dass die Anforderungen beider Techniken, optische Transparenz für die DAD-Messungen und die hohe ESI Ausbeute für die TOF/MS-Messungen, nicht von der gleichen mobilen Phase erfüllt werden und dass jede der beiden Messungen unter ihren jeweiligen optimalen Bedingungen durchgeführt werden muss.

- Insgesamt ergab sich, dass die kombinierte Anwendung von HPLC-DAD und LC-TOF-MS in der toxikologischen Analyse einen vorteilhaften Weg zur eindeutigen Identifizierung und Bewertung von Metaboliten darstellt.

6. Zusammenfassung

Metabolite spielen bei der analytischen Aufklärung und der Interpretation von Medikamentvergiftungen eine große Rolle. Daher wurde in dieser Dissertation unter dem besonderen methodischen Aspekt der HPLC mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) und der Flüssigchromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-TOF-MS) systematisch untersucht, in welchem Maße eine Identifizierung von Metaboliten in der Praxis der systematischen toxikologischen Analyse von Todesfällen möglich ist.

Im theoretischen Teil der Arbeit wurden zunächst die Grundlagen der Metabolisierung von Wirkstoffen im menschlichen Organismus dargestellt, die physikalisch-chemischen Prinzipien der angewendeten Methoden auch unter dem speziellen Aspekt des Nachweises von Metaboliten behandelt und die Fachliteratur zum Thema zusammengefasst, wobei der Schwerpunkt auf der relativ neuen LC-TOF-MS-Methode lag.

Als wesentliches Probenmaterial wurde in dieser Arbeit Blut herangezogen, das allgemein die größte Bedeutung in der toxikologischen Analyse besitzt und durch Extraktion mit Dichlormethan im basischen und sauren Bereich aufgearbeitet wurde. Hierdurch wurden stark hydrophile Metabolite wie Glucuronide nicht erfasst. In wenigen Fällen wurden auch Urin und Leberproben analysiert. Für die HPLC-DAD-Messungen wurden Anlagen der Firma Shimadzu verwendet. Die Detektion erfolgte zwischen 195-380 nm mit einem Acetonitril/Phosphatpuffergemisch (pH=2,3) an RP8-Säulen.

Es wurden zwei verschiedene LC-TOF-MS Geräte der Firmen Agilent und Waters mit einer Massengenauigkeit < 5 ppm verwendet. Für ergänzende Untersuchungen stand ein LC-QTOF-MS-Instrument der Firma Agilent zur Verfügung. Die Chromatographie erfolgte an einem Gradienten mit Fließmittel aus Methanol und wässriger Ameisensäure an einer C18 Säule. Die in-source ESI-CID Spektren wurden bei zwei unterschiedlichen Kollisionsenergien aufgenommen. Mit niedriger Energie wurden Spektren ohne Fragmentierung erhalten und mit hoher Energie mit Fragmentierung. Das Q-TOF/MS Instrument ermöglichte die Messungen der Massenspektren im MS sowie im MS-MS Modus.

Insgesamt wurden Proben von 430 Todessfällen mit 47 Wirkstoffen analysiert, wobei diese Wirkstoffe mit einer Häufigkeit zwischen 1 und 90 in den Fällen vorkamen. Durch HPLC-DAD wurden von insgesamt 141 Metaboliten die UV-Spektren gemessen und die korrigierten relativen Retentionszeiten sowie die auf die Muttersubstanz bezogenen Retentionszeiten (Q_{RRT} -Werte) der Metabolite bestimmt. Durch LC-TOF/MS wurden

insgesamt für 406 Metabolite die MS- und die MS-MS-Spektren gemessen und die relative Retentionszeit bestimmt.

Von den 47 Wirkstoffen wurden in der schriftlichen Arbeit die Ergebnisse für die sechs Substanzen Amprenavir, Citalopram, Clozapin, Diphenhydramin, Flecainid und Ketamin ausführlich dargestellt. Ausgehend von den aus der Literatur bekannten Metabolisierungsschemata wurden zunächst die Ionenchromatogramme der Metabolite in den LC-TOF-MS- (bzw. den LC-QTOF-MS)-Files gesucht und mit Hilfe der exakten Massendifferenz konkreten Metabolisierungsprozessen (Desalkylierungen, Hydroxylierungen usw.) zugeordnet. Eine genauere Strukturzuordnung, insbesondere die Unterscheidung isomerer Metabolite wurde auf der Basis der Fragmentspektren versucht, die durch kollisionsinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle (in-source CID) bei einstufigen Geräten oder in der Kollisionzelle des Q-TOF-Instrumentes erfolgte. Eine entscheidende Hilfe war dabei die Interpretation des Fragmentierungsverhalten der Metabolite im Vergleich zur Muttersubstanz. Alle Metabolite wurden durch Massenspektrum und Fragmentierungsschemata eindeutig beschrieben.

Als Kriterien der Zuordnung von chromatographischen Peaks zu bestimmten Metaboliten wurden das regelmäßige Auftreten bei Vergiftungen mit dem Ausgangswirkstoff, die charakteristische aus der Strukturänderung resultierende Retentionzeitverschiebungen gegenüber dem Ausgangswirkstoff, die mit LC-TOF/MS bestimmten akkuraten Molmassen mit der Massengenauigkeit des Precursors $<5\text{ppm}$ und die Übereinstimmung des Isotopenverhältnisses von $>90\%$ sowie die Zuordnung der Hauptfragmente des MS-MS-Experiments herangezogen.

Bei HPLC-DAD wurden die Identität oder die Ähnlichkeit der UV-Spektren mit dem Muttersubstanz, die relative Retentionszeit RT und der Retentionszeitquotient Q_{RRT} von Metabolit und Wirkstoff benutzt. Für die Zuordnung der Metabolite im HPLC-DAD-Chromatogramm wurde zusätzlich ein Vergleich mit dem LC-TOF-MS-Ergebnissen vorgenommen.

Bei den beispielhaft beschriebenen Vergiftungsfällen zu diesen sechs Wirkstoffen, besonders ausführlich für Diphenhydramin, wurde eine halbquantitative Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen vorgenommen und das Konzentrationsverhältnisses $C_{\text{Met}}/C_{\text{Wirkst}}$ berechnet. Dieses Verhältnis wurde mit Angaben aus der Vorgeschichte und zum Zeitverlauf der Intoxikationen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die auf den Ausgangswirkstoff bezogene Metabolitenkonzentration unter bestimmten Bedingungen eine Abschätzung der Überlebenszeit nach der Giftaufnahme gestattet.

Für acht weitere Wirkstoffe (Amitriptylin, Levomeprazin, Mirtazapin, Quetiapin, Saquinavir, Sertralin, Venlafaxin, Verapamil) konnte im Rahmen dieser Arbeit lediglich ein kurzer Überblick über die festgestellten Metabolite ohne ausführliche Interpretation der Spektren gegeben werden. Schließlich wurden in einem zusammenfassenden Abschnitt auf der Basis der bei einzelnen Wirkstoffen festgestellten Ergebnisse die Kriterien für die Erkennung und Charakterisierung der Metaboliten mittels LC-TOF/MS im Vergleich zu den HPLC-DAD Ergebnissen für Desalkylierungen, oxidative Desaminierungen, Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Oxidationen am Stickstoff und Schwefel sowie Dehalogenierungen diskutiert.

Insgesamt führten die Untersuchungen zu dem Schluss, dass LC-TOF-MS und HPLC-DAD, insbesondere auch in Kombination, geeignete Methoden darstellen, die eine sichere Zuordnung von Metaboliten in der systematischen toxikologischen Analyse auch ohne Referenzsubstanzen gestatten. Die in den Fallproben mit beiden Methoden gemessenen und strukturell zugeordneten Spektren können in einer Datenbank als Vergleich für die Peakidentifikation in der Routine der toxikologischen Analyse dienen.

6. Summary

Metabolites play an important role in the analytical investigation and in the interpretation of drug poisonings. Hence, it was systematically examined in this thesis under the special methodological aspect of HPLC with photodiode array detector (HPLC-DAD) and liquid chromatography with time of flight mass spectrometry (LC-TOF-MS) to which extent an identification of metabolites in the practice of systematic toxicological analysis of deaths is possible.

In the theoretical chapter of the work, the basics of drugs metabolism in human organism were shown, the physical and chemical principles of the methods used under the special aspect of the detection of metabolites were discussed and the literature on the topic was summarized, focusing on the relatively new LC-TOF-MS method.

Blood was used as an essential sample material in this work, since it has generally the greatest importance in toxicological analysis. The blood samples were extracted with dichlormethane at alkaline and acidic pH. In this way, strongly hydrophilic metabolites such as glucuronides were not detected. In few cases, urine and liver samples were also analyzed. For the HPLC-DAD measurements, instruments of the company Shimadzu were used. The detection was between 195-380 nm with an acetonitrile/phosphate buffer mixture (pH=2.3) and with RP8 columns.

Two different LC-TOF-MS equipments were used from Agilent and Waters, both with a mass accuracy <5 ppm. An LC-QTOF-MS instrument from Agilent was available for complementary tests. The chromatography was performed on a C18 column using a gradient elution with a mobile phase consisting of methanol and aqueous formic acid. The ESI in-source CID spectra were recorded at two different collision energies. Low-energy spectra were obtained without fragmentation and high energy spectra with fragmentation. The instrument Q-TOF/MS allowed the measurements of the mass spectra in MS and MS-MS mode.

Altogether, samples from 430 death cases with 47 substances were analyzed, with a frequency of these substances in the cases between 1 and 90. The UV spectra of 141 metabolites were measured by HPLC-DAD, and the corrected relative retention times RRT as well as the retention times referred to the parent compounds (Q_{RRT} values) of these metabolites were determined. The MS and MS-MS spectra for a total of 406 metabolites were measured by LC-TOF/MS, and the relative retention times were also determined.

From the 47 substances, the results for the six substances amprenavir, citalopram, clozapine, diphenhydramine, flecainide and ketamine were described in detail in the written thesis. Based on the biotransformation reactions known from literature, at first the ion-chromatograms of the metabolites were searched in the LC-TOF-MS files or the LC-QTOF-MS files, and were assigned to concrete biotransformation processes (dealkylation, hydroxylation, etc.) by aid the exact mass differences. A more precise structural identification, in particular the distinction of isomeric metabolites, was tried on the base of the fragment spectra which were generated by collision-induced dissociation in the ion source (in-source CID) of the single-stage instruments or in the collision cell of the Q-TOF instrument. In addition, crucial information was obtained from the interpretation of the fragmentation of the metabolites in comparison to parent substances. All metabolites were clearly characterized by mass spectrum and fragmentation schemes.

The criteria of the attribution of chromatographic peaks to specific metabolites were the regular appearance in poisoning cases with the parent substance, the characteristic range of the retention time shifts resulting from the structural changes compared with the parent substance, accurate molecular masses of precursors with the mass accuracy <5 ppm which were measured by LC-TOF/MS, the agreement of the isotope ratio of $> 90\%$ as well as the interpretation of the main fragments of the MS-MS experiments.

The attribution of the metabolites in HPLC-DAD chromatogram was supported by the identity or similarity of the UV spectra of the parent compound, the relative retention time

RT and the retention time ratio Q_{RRT} of metabolite and parent substance. In addition, a comparison with the LC-TOF-MS results was carried out.

In the exemplarily described poisoning cases to these six substances, especially detailed for diphenhydramine, a semi-quantitative determination of the metabolite concentrations was carried out and the concentration ratio $C_{\text{Metabolite}}/C_{\text{parent}}$ was calculated. This ratio was compared with data from the case history and with the time course of the intoxication. It could be shown that the metabolite concentration related to the parent substance under certain conditions permits an evaluation of the survival time after intake of the poison.

For further eight substances (amitriptyline, levomeprazine, mirtazapine, quetiapine, saquinavir, sertraline, venlafaxine and verapamil) only a short overview about the identified metabolites could be given in this written thesis without detailed interpretation of the spectra. Finally, in a summarizing chapter, the criteria for identification and characterization of metabolites by LC-TOF/MS compared to HPLC-DAD were discussed for desalkylation, oxidative desamination, hydroxylation, epoxidation, oxidation at nitrogen and sulfur, as well as dehalogenation on the basis of the results obtained for the investigated drugs.

Altogether, the investigations led to the conclusion that LC-TOF-MS and HPLC-DAD, especially in combination, represent suitable methods that permit a sure identification of metabolites in systematic toxicological analysis without reference substances. The structurally attributed spectra, which were measured with both methods in the samples of the cases, can serve in a database for the peak identification in the routine of the toxicological analysis.

7. Literaturverzeichnis

1. Nelson S.D., Metabolic activation and drug toxicity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 25 (1982), 753-761.
2. deZeeuw R. A., Recent developments in analytical toxicology: for better or for worse, *Toxicology Letters*, 102-103 (1998), 103-108.
3. Pichard L., Gillet G., Fabre I., Dallet-Beluche I., Bonfils C., Thenot JP., Maurel P., Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem, *Drug Metabolism and Disposition*, 18 (1990), 711-719.
4. Aginsky V.N., Writing media and documents, in *Handbook of Analytical Separations Forensic Science (Second Edition) Vol. 6*, ed. Bogusz M.J., Elsevier Amstrdam (2008), 923-927.
5. Maurer H.H., Forensic screening with GC-MS, in *Handbook of Analytical Separations Forensic Science (Second Edition) Vol. 6*, ed. Bogusz M.J., Elsevier Amstrdam (2008), 425-427.
6. Pragst F., Herzler M., Erxleben BT., Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(11) (2004), 1325-40.
7. Plumb R.S., Johnson K.A., Rainville P., Smith B.W., Wilson I.D., Castro-Perez J.M., Nicholson J.K., UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 20 Issue 13 (2006), 1989-1994.
8. Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): a novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, *Analytica Chimica Acta*, 586 (2007), 13-21.
9. Anon. The API Book. Sciex, Mississauga, ON, Canada, 1990.
10. Garcia D.M., Huang S.K., Stansbury W.F., Characterization of the atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry interface, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 7 (1996), 59-65.
11. Purves R.W., Li L., Development and characterization of an electrospray ionization ion trap/linear time-of-flight mass spectrometer, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 8 (1997), 1085-1093.
12. Michael S.M., Chien B.M., Lubman D.M., An ion trap storage/time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 63 (1992), 4277-4284.
13. Ionescu C., Caira M.R., drug metabolism in context, in *Drug Metabolism Current Concepts*, Springer (2008), 1-3.
14. Gibson G.G., Skett P., *Introduction to Drug Metabolism*. London: Blackie Academic & Professional, An Imprint of Chapman & Hall, (1994). 1-2.
15. Correia M.A., Drug Biotransformation, in *Basic & Clinical Pharmacology*, 8th, ed. Katzung G.B., New York: Lange Medical Books/Mc Graw Hill Medical Publishing Division (2001), 51-63.
16. Walle T., Conradi E.C., Walle U.K., Fagan T.C., Gaffney T.E., 4-Hydroxypropranolol and its glucuronide after single and long-term doses of propranolol, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 27 (1980), 22-31.
17. Mabic S., Castagnoli Jr.N., Castagnoli Jr.N., Oxidative Metabolic Bioactivation of Xenobiotics, in *Handbook of Drug Metabolism*, ed. Woolf TF, New York: Marcel Dekker Inc, (1999), 49-79.
18. Testa B., Xenobiotic Metabolism: The Biochemical View, in *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics: Biochemistry of Redox Reactions*, ed. Testa B., Caldwell J., London: Academic Press Ltd.(Harcourt Brace and Company, Publishers, (1994), 15-40.
19. Gibson G.G., Skett P., Enzymology and molecular mechanisms of drug metabolism reactions, in *Introduction to Drug Metabolism*, London, Blackie Academic & Professional, An imprint of Chapman&Hall, (1994), 35-76.
20. Gibson G.G., Skett P., Pharmacological and toxicological aspects of drug metabolism. In: *Introduction to Drug Metabolism*, London, Blackie Academic&Professional, an imprint of Chapman&Hall (1994), 157-179
21. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F.P., Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes in human, Cytochrome P450 involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (1994), 270:414.
22. Evans W.E., Relling M.V., Pharmacogenomics: translating function genomics into rational therapeutics, *Science*, 286 (1999), 487-491.
23. Bertilsson G., Heidrich J., Svensson K., Asman M., Jendeberg L., Sydow - Backman M., Ohlsson R., Postlind H., Blomquist P., Berkenstam A., Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95 (1998), 12208-12213.

24. Siest G., Jeannesson E., Visvikis - Siest S., Enzymes and pharmacogenetics of cardiovascular drugs, *Clinica Chimica Acta*, 381(2007), 26-31.
25. Guengerich F.P., Human cytochrome P450 enzymes. in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 3rd ed., ed. Ortiz de Montellano PR., New York: Kluwer/Plenum, (2005),377-530.
26. Nakamura K., Goto F., Ray W.A., McAllister C.B., Jacqz E., Wilkinson G.R., Branch R.A., Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 38 (1987), 402-408.
27. Jollow D.J., Mitchell J.R., Potter W.Z., Davis D.C., Gillette J.R., Brodie B.B., Acetaminophen induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187(1) (1973), 195-202.
28. Potter W.Z., Davis D.C., Mitchell J.R., Jollow D.J., Gillette J.R., Brodie BB., Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187(1) (1973), 203-210.
29. Gibbs J.R., Singleton A., Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond, *PLoS Genetics*, 2 (10) (2006), e150.
30. Ionescu C., Caira M.R., Pathway of biotransformation – Phase II reactions, in *Drug Metabolism Current Concepts*, Springer (2008), 129-130.
31. Taylor J.B., Kennewell P.D., Drug metabolism, in *Modern Medicinal Chemistry*, London: Ellis Harwood Ltd (1993), 110.
32. Zubay G.L., Parson W.W., Vance D.E., Principles of Biochemistry, Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers (1995),287-289, 301, 418.
33. Burchell B., Transformation Reactions: Glucuronidation, in. *Handbook of Drug Metabolism*, ed. Woolf T.F., New York: Marcel Dekker Inc. (1999), 53-173.
34. Dalgaard L., Larsen C., Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acyl- and N-glucuronides, *Xenobiotica*, 29(10) (1999), 1033-41.
35. Demorest D.M., Fetzer J.C., Lurie I.S., Carr S.M., Chatson K.B., "Library Search Using an HPLC Diode-Array Detector", *LCGC magazine*, 5 (1987), 128.
36. Bogusz M., Erkens M., Reversed phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use, *Journal of Chromatography A*, 674 (1994), 97.
37. Politi L., Groppi A., Poletini A., Montagna M., A rapid screening procedure for drugs and poisons in gastric contents by direct injection-HPLC analysis. *Forensic Science International*, 141 (2004), 115.
38. Herzler M., Über die Aussagesicherheit der Substanzidentifizierung mittels HPLC-DAD in der Systematischen Toxikologischen Analyse unter Verwendung einer selbsterstellten UV-Spektrenbibliothek mit 2682 Einträgen, Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin (2002), 108-111.
39. Turcant A., Premel-Cabic A., Cailleux A., Allain P., Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches, *Clinical Chemistry*, 37 (7) (1991), 1210-1215.
40. Pragst F., Herzler M., Herre S., Erxleben B.-T., Rothe M. UV Spectra of toxic compounds Volume 2, (2007).
41. Pragst F., Maurer H.H., Hallbach J., Staerk U., Kuelpmann W.R., Degel F., Gibitz H.J., Klinisch-toxikologische Analytik-Verfahren, Befunde, interpretation, ed. Kuelpmann W.R.,Wiley-VCH, Weinheim, (2002), 49.
42. Herre S.and Pragst F., Shift of the high-performance liquid chromatographic retention times of metabolites in relation to the original drug on an RP8 column with acidic mobile phase. *Journal of Chromatography B*, 692 (1997), 111.
43. Pragst F., High performance liquid chromatography in forensic toxicological analysis, in *Forensic Science Handbook of Analytical Separations Vol 6*, ed. Bogusz M.J., (2008), 463-470.
44. Aced G., Möckel H.J., *Liquidchromatographie; Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC*, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim Weinheim - New York - Basel-Cambridge, (1991).
45. Engelhardt H., *Practice of high performance liquid chromatography*, Springer-Verlag Berlin, (1986).
46. Eppert G., *Einführung in die schnelle Flüssigkeitschromatographie*, Akademie-Verlag Berlin, (1988).
47. Gottwald W., *RP-HPLC für Anwender*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, (1993).
48. Kaiser R.E., Oerlich E., *Optimization in HPLC*, Dr. A. Hüthig Verlag, Heidelberg-Basel-New York, (1981).
49. Krauss G.-J., Krauss G., *Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Serva Praxishefte Bd. 2; Serva Feinbiochemica GmbH SONDZEICHEN 38 f "Symbol" Co. Heidelberg - New York (1987).

50. Meyer V., Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Verlag Moritz Diesterweg; Otto Salle Verlag, Frankfurt(a.M.) - Berlin - München; Verlag Sauerländer, Arau - Frankfurt(a.M.) -Salzburg, (1979).
51. Pragst F., Herre S., Bakdash A., Poisonings with diphenhydramine - a survey of 68 clinical and 55 death cases, *Forensic Science International*, 161 (2006), 189.
52. Wells D.A., High throughput bioanalytical sample preparation. Methods and automation strategies, Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, (2003).
53. Weinmann W., Svoboda M., Fast screening for drugs of abuse by solid extraction combined with flow-injection ionspray tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, 22 (1998), 319.
54. Polson C., Sarkar P., Incedon B., Raguvaran V., Grant R., Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in LC.MS.MS, *Journal of Chromatography B*, 785 (2003), 263.
55. Gergov M., Forensic screening with liquid chromatography-mass spectrometry , in *Handbook of Analytical Separations Forensic Science (Second Edition) Vol. 6*, ed. Bogusz M.J., Elsevier Amstrdam (2008), 493-494.
56. Korfmacher W.A., Cox K.A., Bryant M.S., Veals J., Ng K., Lin C.-c., Watkins R., HPLC-API/MS/MS: a powerful tool for integrating drug metabolism into the drug discovery process, *Drug Discovery Today*, 2 (1997), 532.
57. Korfmacher W.A., Cox K.A., Ng K.J., Veals J., Hsieh Y., Wainhaus S., Broske L., Prelusky D., Nomeir A., White R.E., Cassette-accelerated rapid rat screen: a systematic procedure for the dosing and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometric analysis of new chemical entities as part of new drug discovery, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(5) (2001), 335.
58. Shou W.Z., Bu H.Z., Addison T., Jiang X., Naidong W., Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the determination of ribavirin in human plasma and serum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2) (2002), 83.
59. Eerkes A., Shou W.Z., Naidong W., Liquid/liquid extraction using 96-well plate format in conjunction with hydrophilic interaction liquid chromatography– tandem mass spectrometry method for the analysis of fluconazole in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(5) (2003), 917.
60. Chen, Y.L., Felder L., Jiang X., Naidong W., Determination of ketoconazole in human plasma by highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 774(1) (2002), 67.
61. Brignol, N., McMahon L.M., Luo S., Tse F.L., High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD 001) and cyclosporin a (CsA) in whole blood, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(12) (2008), 898.
62. Steinborner S., Henion J., LLE in the 96-well plate format with SRM LC.MS quantitative determination of methotrexate and its major metabolite in human plasma, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2340.
63. Naidong W., Shou W.Z., Addison T., Maleki S., Jiang X.W., Liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalysis using normal-phase columns with aqueous/organic mobile phases—a novel approach of eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well SPE, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(20) (2002), 1965.
64. Chen Y.L., Hanson G.D., Jiang X., Naidong W., Simultaneous determination of hydrocodone and hydromorphone in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 769(1) (2002), 55.
65. Shou, W.Z., Pelzer M., Addison T., Jiang X., Naidong W., An automatic 96-well solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27(1-2) (2002), 143.
66. Shou, W.Z., Jiang X., Beato B.D., Naidong W., A highly automated 96-well solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of fentanyl in human plasma, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(7)(2001), 466.
67. Schuster A., Burzawa S., Jemal M., Loizillon E., Couerbe P., Whigan D., Quantitative determination of the HIV protease inhibitor atazanavir (BMS-232632) in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry following automated solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 788(2)(2003), 377.

68. Yang L., Clement R.P., Kantesaria B., Reyderman L., Beaudry F., Grandmaison C., Di Donato L., Masse R., Rudewicz P.J., Validation of a sensitive and automated 96-well solid-phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of desloratadine and 3-hydroxydesloratadine in human plasma, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 792(2)(2003), 229.
69. Ayrton J., Dear G. J., Leavens W. J., Mallett D. N., Plumb R. S., The use of turbulent flow chromatography/mass spectrometry for the rapid, direct analysis of a novel pharmaceutical compound in plasma, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997), 1953-1958.
70. Alnouti Y., Srinivasan K., Waddell D., Bi H., Kavetskaia O., Gusev A. I., Development and application of a new on-line SPE system combined with LC–MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma, *Journal of Chromatography A*, 1080 (2005), 99-106.
71. Kuhlbeck D. L., Eichold T. H., Hoke S. H., Baker T. R., Mensen R., Wehmeyer K. R., On-line solid phase extraction using the Prospekt-2 coupled with a liquid chromatography/tandem mass spectrometer for the determination of dextromethorphan, dextrorphan and guaifenesin in human plasma, *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)*, 11 (2005), 199-208.
72. Koal T., Sibum M., Koster E., Resch K., Kaefer V., Direct and fast determination of antiretroviral drugs by automated online solid-phase extraction-liquid chromatography- tandem mass spectrometry in human plasma, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (2006), 299-305.
73. Xu R.N., Fan L., Rieser M.J., El-Shourbagy T.A., Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2007), 342-355.
74. Smalley J., Marino A.M., Xin B., Olah T., Balimane P.V., Development of a quantitative LC-MS/MS analytical method coupled with turbulent flow chromatography for digoxin for the in vitro P-gp inhibition assay, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854 (2007), 260-267.
75. van Deemter J.J., Zuiderweg F.J., Klinkenberg A., Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science*, 5 (1956), 271-289.
76. Churchwell M.I., Twaddle N.C., Meeker L.R., Doerge D.R., Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 825 (2005), 134-143.
77. Johnson K.A., Plumb R., Investigating the human metabolism of acetaminophen using UPLC and exact mass oa-TOF MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (2005), 805-810.
78. Kamel A., Prakash C., High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology, *Current Drug Metabolism*, 7 (2006), 837-852.
79. Mensch J., Noppe M., Adriaensen J., Melis A., Mackie C., Augustijns P., Brewster M.E., Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early drug discovery, *Journal of Chromatography B*, 847 (2007), 182-187.
80. Pedraglio S., Rozio M.G., Misiano P., Reali V., Dondio G., Bigogno C., New perspectives in bioanalytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UPLC-MS/MS in in vitro metabolism and pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2007), 665-673.
81. Plumb R., Mazzeo J.R., Grumbach E.S., Rainville P., Jones M., Wheat T., Neue U.D., Smith B., Johnson K.A., The application of small porous particles, high temperatures, and high pressures to generate very high resolution LC and LC/MS separations, *Journal of Separation Science*, 30 (2007), 1158-1166.
82. Goodwin L., White S.A., Spooner N., Evaluation of ultra-performance liquid chromatography in the bioanalysis of small molecule drug candidates in plasma, *Journal of Chromatographic Science*, 45 (2007), 298-304.
83. Castro-Perez J.M., Applications of Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Reactive Metabolite Screening, in *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, ed. Ramanathan R., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009), 160-162.
84. Plumb R., Castro-Perez J., Granger J., Beattie I., Joncour K., Wright A., Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 18 (19) (2004), 2331-7.
85. Castro-Perez J., Plumb R., Granger J.H., Beattie I., Joncour K., Wright A., Increasing throughput and information content for in vitro drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, a;19 (2005), 843-848.

86. Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics*, 49 (1968), 2240.
87. Lee H., Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS), *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28 (2005), 1161-1202.
88. Horning E.C., Carroll D.I., Dzidic I., Haegele K.D., Horning M.G., Stillwell R.N., Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatography effluent stream, *Journal of Chromatographic Science*, 12(11) (1974), 725-9.
89. Robb D.B., Covey T.R., Bruins A.P., Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1;72(15) (2000), 3653-9.
90. Zeleny J., The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces, *Physical Review*, 3 (1914), 69.
91. Zeleny J., Instability of Electrified Liquid Surfaces, *Physical Review*, 10 (1917), 1.
92. Zeleny J., Electrical Discharges from Pointed Conductors, *Physical Review*, 16 (1920), 102.
93. Macky W.A., Some Investigations on the Deformation and Breaking of Water Drops in Strong Electric Fields, *Proceedings of the Royal Society A*, 133 (1931), 565.
94. Taylor J., Disintegration of Water Drops in an Electric Field, *Proceedings of the Royal Society*, 280 (1964), 383.
95. Burayev T.K., IP Vereshchagin. Physical processes during electrostatic atomization, *Fluid Mechanics-Soviet Research*, 2 (1972), 56.
96. Kozhenkov V.I., Fuks N.A., Electrohydrodynamic Atomisation of Liquids, *Russian Chemical Reviews*, 45 (1976), 1179.
97. Yamashita M., Fenn J.B., Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme, *The Journal of Physical Chemistry*, 92 (1984), 4451-9.
98. Van Berkel J.G., Glish G.L., McLuckey J.A., Electrospray ionization combined with ion trap mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 62 (1990), 1284-1295.
99. Boyle J.G., Whitehouse C.M., An ion-storage time-of-flight mass spectrometer for analysis of electrospray ions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5 (1991), 400-405.
100. Dawson J.H.J., Guilhaus M., Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3 (1989), 155-159.
101. Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Laiko V.V., 12 Int Mass Spectrom Conference, Amsterdam, August, Extended Abstracts, (1991), 153.
102. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science*, 246(1989), 64-71.
103. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Electrospray Ionization-Principles and Practice, *Mass Spectrometry Reviews*, 9 (1990), 37.
104. Kebarle P., Tang L., From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase - the Mechanism of ESI-MS, *Analytical Chemistry*, 65 (1993), 972A-986A.
105. Cole R.B., Some Tenets Pertaining to ESI MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 35(2000), 763-772.
106. Gomez A., Tang K., Charge and Fission of Droplets in Electrostatic Sprays, *Physics of Fluids*, 6 (1994), 404-414.
107. Mack L.L., Kralik P., Rheude A., Dole M., Molecular Beams of Macroions. II, *Journal of Chemical Physics*, 52 (1970), 4977-4986.
108. Iribarne J.V., Thomson B.A., On the Evaporation of Small Ions From Charged Droplets, *Journal of Chemical Physics*, 64 (1976), 2287-2294.
109. Thomson B.A., Iribarne J.V., Field- Induced Ion Evaporation From Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure, *Journal of Chemical Physics*, 71(1979), 4451-4463.
110. Labowsky M., Fenn J.B., de la Mora J.F., A Continuum Model for Ion Evaporation From a Drop: Effect of Curvature and Charge on Ion Solvation Energy, *Analytica Chimica Acta*, 406 (2000), 105-118.
111. Winger B.E., Light-Wahl K.J., Ogorzalek Loo, R.R., Udseth H.R., Smith R.D., Observation and Implications of High Mass-to-Charge Ratio Ions From ESI-MS, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 4 (1993), 536-545.
112. Felitsyn N., Peschke M., Kebarle P., Origin and Number of Charges Observed on Multiply-Protonated Native Proteins Produced by ESI, *International Journal of Mass Spectrometry*, 219 (2002), 39-62.
113. Levsen K., Schwarz H., Gas-Phase Chemistry of Collisionally Activated Ions, *Mass Spectrometry Reviews*, 2(1983), 77-148.
114. Raffaelli A., Atmospheric pressure ionization (ESI and APCI) theory and application, in *Selected Topics in Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences*, eds. Caprioli R.M., Malorni A., Sindona G., Kluwer Academic Publishers: Amsterdam, (1997), 17-31.
115. McLuckey S.A., Principles of Collisional Activation in Analytical MS, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 3 (1992), 599-614.

116. Shukla A.K., Futrell J.H., Tandem Mass Spectrometry: Dissociation of Ions by Collisional Activation, *Journal of Mass Spectrometry*, 35(2000), 1069-1090.
117. McLafferty F.W., Bente, P.F.I., Kornfeld R., Tsai S.-C., Howe I., Collisional Activation Spectra of Organic Ions, *Journal of the American Chemical Society*, 95(1973), 2120-2129.
118. Levsen K., Schwarz H., Collisional Activation MS - a New Probe for Structure Determination of Ions in the Gaseous Phase, *Angewandte Chemie*, 88 (1976), 589-601.
119. Guevremont R., Boyd R.K., Are Derrick Shifts Real? An Investigation by Tandem MS, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(1988), 1-5.
120. Harrison A.G., Energy-resolved mass spectrometry: A comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13(1999), 1663.
121. Ikegawa S., Okuyama H., Ohashi J., Murao N., Goto J., Separation and detection of bile acid 24-glucuronides in human urine by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Sciences*, 15(1999), 625-631.
122. Weinmann W., Wiedemann A., Eppinger B., Renz M., Svoboda M., Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 10 (1999), 1028-1037.
123. Drahos L., Heeren R.M.A., Collette C., De Pauw E., Vékey K., Thermal energy distribution observed in electrospray ionization, *Journal of Mass Spectrometry*, 34 (1999), 1373-1379.
124. Cody R.B., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: History, Theory, and Instrumentation*, in *Applied Electrospray Mass Spectrometry*, ed. Birendra N., Pramanik A.K., Ganguly, Michael L. Gross, Marcel Dekker, New York, (2002), 38-40.
125. Stefansson M., Sjöberg P.J.R., Markides K.E., Regulation of multimer formation in electrospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 68 (1996), 1792-1797.
126. Wang G., Cole R.B., Solution, gas-phase, and instrumental parameter influences on charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ed. Cole R.B., New York: Wiley (1997), Chap 4.
127. Loo J.A., Edmonds C.G., Udseth H.R., Smith R.D., Effect of reducing disulfide containing proteins on electrospray ionization mass spectra, *Analytical Chemistry*, 62 (1990), 693-698.
128. Kaltashov I.A., Fenselau C.C., A direct comparison of first and second gas-phase basicities of the octapeptide RPPGFSPF, *Journal of the American Chemical Society*, 117 (1995), 9906-9910.
129. Griffey R.H., Sasmor H., Greig M.J., Oligonucleotide charge states in negative ionization electrospray mass spectrometry are a function of solution ammonium ion concentration, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 8 (1997), 155-160.
130. Schnier P.D., Gross D.S., Williams E.R., On the maximum charge state and proton transfer reactivity of peptide and protein ions formed by electrospray ionization, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 6 (1995), 1086-1097.
131. Ojanperä I., Pelander A., Ojanperä S., *Comprehensive Toxicological and Forensic Drug Screening by LC/TOF-MS*, in *Liquid Chromatography Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, ed. Ferrer I., Thurman E.M., Wiley New Jersey (2009), 173.
132. Stephens W. E., A pulsed mass spectrometer with time dispersion, *Physical Review*, 69 (1946), 691.
133. Dass C., *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York, 2001.
134. Cotter R. J., Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, *Analytical Chemistry*, 64 (1992), 1027A-1039A.
135. Guilhaus M., Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry: Physical and instrumental concepts, *Journal of Mass Spectrometry*, 30 (1995), 1519-1532.
136. Cotter R. J., The new time-of-flight mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 71 (1999), 445A-451A.
137. Wiley W.C., McLaren I.H., Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution, *Review of Scientific Instruments*, 26 (1955), 1150-1157.
138. Brown R.S., Lenon J.J., Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, 67 (1995), 1998-2003.
139. Whittall R.M., Russon L.M., Weinberger S.R., Li L., Functional wave timelag focusing matrix-assisted laser desorption/ionization in a linear time-of-flight mass spectrometer: improved mass accuracy, *Analytical Chemistry*, 69 (1997), 2147-2153.
140. Vestal M.L., Juhasz P., Martin S.A., Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9 (1995), 1044-1050.
141. Mamyrin B.A., Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 131 (1994), 1-19.
142. Cornish T.J., Cotter R.J., High-order kinetic energy focusing in an end cap reflectron time-of-flight mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, 69 (1997), 4615-4618.

143. Zhang J., Enke C.G., Simple cylindrical ion mirror with three elements, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 11 (2000), 759–764.
144. Chernushevich I. V., Ens W., Standing K.G., Orthogonal injection TOFMS for analyzing biomolecules, *Analytical Chemistry*, 71 (1999), 452A–461A.
145. Krutchinsky A.N., Chernushevich I.V., Spicer V.L., Ens W., Standing K.G., Collision damping interface for an electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 9 (1998), 569–579.
146. Chapman J.R., *Practical Organic Mass Spectrometry*, 2nd Ed., Wiley (1993), London.
147. de Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Wiley (1996), London.
148. Mansoori B.A., Dyer E.W., Lock C.M., Bateman K., Boyd R.K., Thomson B.A., Analytical performance of a high-pressure RF-only quadrupole collision cell with a axial field applied by using conical rods, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 9 (1998), 775.
149. de Hoffmann E., Stroobant V., *Mass Analysers*, in *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Third Edition, Wiley. West Sussex (2007), 167-170.
150. Morris H.R., Paxton T., Dell A., Langhorne J., Berg M., Bordoli R.S., Hoyes J., Bateman R.H., High-sensitivity CID-MS/MS on a novel Q.oaTOF-MS, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10 (1996), 889.
151. Shevchenko A., Chernushevich I., Ens W., Standing K.G., Thomson B., Wilm M., Mann M., Rapid .de novo. peptide sequencing by a combination of nano-ESI, isotopic labeling and a Q.TOF-MS, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997) ,1015.
152. Chernushevich I.V., Loboda A.V., Thomson B.A., An introduction to quadrupole. time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 36 (2001), 849.
153. Keough T., Lacey M.P., Ketcha M.M., Bateman R.H., Green M.R., Oa single-pass TOF-MS for determination of the exact masses of product ions formed in MS/MS experiments, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997), 1702.
154. Morris H.R., Paxton T., Panico M., McDowell R., Dell A., A novel geometry MS, the Q.TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing, *Journal of Protein Chemistry*, 16 (1997), 469.
155. Fjeldsted J.C., *Accurate Mass Measurements with Orthogonal Axis Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, in *Liquid Chromatography Time-Of-Flight Mmass Spectrometry*, ed. Ferrer I., Thurman E.M., Wiley New Jersey (2009), 13-15.
156. Pelander A., Ojanperä I., Laks S., Rasanen I., Vuori E., Toxicological screening with formula - based metabolite identification by liquid chromatography/time-of- flight mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 75 (2003), 5710 – 5718.
157. Ojanperä S., Pelander M., Pelzing I., Krebs E., Vouri I., Ojanperä I., Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography / time of flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006), 1161-1167.
158. Pelander A., Ristimaa J., Rasanen I., Vuori E., Ojanperä I., Screening for basic drugs in hair of drug addicts by liquid chromatography / time of flight mass spectrometry, *Therapeutic Drug Monitoring*, 30 (2008), 717-724.
159. Decaestecker T.N., Vande Castele S.R., Wallemacq P.E., Van Peteghem C.H., Defore D.L., Van Bocxlaer J.F., Information-dependent acquisition-mediated LC-MS/MS screening procedure with semiquantitative potential, *Analytical Chemistry*, 76(21) (2004), 6365-73.
160. Poletti A., Gottardo R., Pascali J.P., Tagliaro F., Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 80(8) (2008), 3050-7.
161. Lee H.K., Ho C.S., Iu Y.P., Lai P.S., Shek C.C., Lo Y.C., Klinke H.B., Wood M., Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 649(1)(2009), 80-90.
162. Kolomonen M., Leinonen A., Pelander A., Ojanpera I., A general method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 585 (2007), 94-102.
163. Gergov M., Boucher B., Ojanperä I., Vuori E., Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 (2001), 521-526 .
164. Ojanperä I., Pelander A., Laks S., Gergov M., Vuori E., Witt M., Application of accurate mass measurement to urine drug screening, *Journal of Analytical Toxicology*, 29 (2005), 34.
165. Maurer H.H., Pflieger K., Weber A.A., *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*, VCH, Weinheim , Germany, (1992), 423-562.
166. ElSohly M.A., Gul W., P. Murphy T.P., Avula B., Khan I.A., LC–(TOF) MS Analysis of Benzodiazepines in Urine from Alleged Victims of Drug-Facilitated Sexual Assault, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 31 (2007).

167. Maurer H.H., Pflieger K., Weber A.A., Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites Wiley-VCH, Weinheim (2007).
168. United States National Library of medicine, National Institutes of Health, National Center of Biotechnology Information. Pubchem Compound. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed December 2007).
169. Hayashida M., Takino M., Terada M., Kurisaki E., Kudo K., Ohno Y., Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening, *Legal Medicine*, 11 (2009), 423-425.
170. Laks S., Pelander A., Vuori E., Ali - Tolppa E., Sippola E., Ojanperä I., Analysis of street drugs in seized material without primary reference standards, *Analytical Chemistry*, 76 (2004), 7375-7379.
171. Quintela O., Andrenyak D.M., Hoggan A.M., Crouch D.J., A validated method for the detection of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples by liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, 31 (2007), 157-164 .
172. Gottardo R., Fanigliulo A., Bortolotti F., De Paoli G., Pascali J.P., Tagliaro F., Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1159 (2007), 190-197.
173. Evans D.C., Watt A.P., Nicoll-Griffith D.A., Baillie T.A., Drug-protein adducts: An industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development, *Chemical Research in Toxicology*, 17 (2004), 3-16.
174. Ekins S., Ring B.J., Grace J., McRobie-Belle D.J., Wrighton S.A., Present and future in vitro approaches for drug metabolism, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44 (2000), 313-324.
175. S in C.H., Lee E.D., Lee M.L., Atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry with a supersonic ion beam, *Analytical Chemistry*, 63 (1991), 2897.
176. Hop C.E., Yu X., Xu X., Singh R., Wong B.K., Elucidation of fragmentation mechanisms involving transfer of three hydrogen atoms using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer, *Journal of Mass Spectrometry*, 36 (2001), 575.
177. Eckers C., Haskins N., Langridge J., The use of liquid chromatography combined with a quadrupole time of flight analyzer for the identification of trace impurities in drug substance, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997), 1916.
178. Ferrer I., Thurman E.M., Preface, in *Liquid Chromatography Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, ed. Ferrer I., Thurman E.M., Wiley New Jersey (2009), VIII.
179. Johnson K., Shah A., Jaw S., Baxter J., Prakash C., Metabolism, pharmacokinetics, and excretion of a highly selective NMDA receptor antagonist, traxoprodil, in human cytochrome P450 2D6 extensive and poor metabolizers, *Drug Metabolism and Disposition*, 31(2003), 76-87.
180. Dalvie D.K., O'Donnell J.P., Characterization of polar urinary metabolites by ionspray tandem mass spectrometry following dansylation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(1998), 419-422.
181. Wienkers L.C., Steenwyk R.C., Mizensak S.A., Pearson P.G., In vitro metabolism of tirilazad mesylate in male and female rats, *Drug Metabolism and Disposition*, 23(1995),383-392.
182. Wienkers L.C., Steenwyk R.C., Sanders P.E., Pearson P.G., Biotransformation of tirilazad in human: 1. cytochrome P450 3A-mediated hydroxylation of tirilazad mesylate in human liver microsomes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1996), 982-990.
183. Liu D.Q., Hop C.E.C.A., Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (2005), 1-18.
184. Nassar A-E. F., Online hydrogen-deuterium exchange and a tandem-quadrupole time-of-flight mass spectrometer coupled with liquid chromatography for metabolite identification in drug metabolism, *Journal of Chromatographic Science*, 41 (2003), 398-404.
185. Wienkers L.C., Steenwyk R.C., Hauer M.J., Fleishaker J.C, Pearson P.G., Biotransformation of Tirilazad in Human: 3. Tirilazad A-Ring Reduction by Human Liver Microsomal 5 α -Reductase Type 1 and Type 2, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(1998), 583-590.
186. Thurman E.M., Ferrer I., Zweigenbaum J.A., Garcia - Reyes J.F., Woodman M., Fernandez - Alba A.R., Discovering metabolites of post harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time - of - flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry , *Journal of Chromatography A*, 1082 (2005), 71-80.
187. Kawanishi H., Toyo oka T., Ito K., Maeda M., Hamada T., Fukushima T., Kato M., Inagaki S., Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra - performance liquid chromatography with time-of- flight mass spectrometry , *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006), 148-156.

188. Xia Y., Wang P., Bartlett M.G., Solomon H.M., Busch K.L., An LC - MS - MS method for the comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium , *Analytical Chemistry*, 72 (2000),764-771.
189. Ibañez M., Sancho J.V., Pozo O.J., Hernandez F., Use of liquid chromatography quadrupole time -of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study , *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (2006), 448 – 457.
190. Kauppila T.J., Talaty N., Kuuranne T., Kotiaho T., Kostianen R., Cooks R.G., Rapid analysis of metabolites and drugs of abuse from urine samples by desorption electrospray ionization – mass spectrometry, *Analyst*, 132 (2007), 868-875.
191. Kauppila T.J., Wiseman J.M., Ketola R.A., Kotiaho T., Cooks R.G.,Kostiainen R., Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006), 387-392.
192. Hopfgartner G., Husser C., Zell M., High-throughput quantification of drugs and their metabolites in biosamples by LC-MS/MS and CE-MS/MS: possibilities and limitations, *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(1) (2002), 134.
193. Xia Y.Q., Hop C.E., Liu D.Q., Vincent S.H., Chiu S.H., Parallel extraction columns and parallel analytical columns coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for on-line simultaneous quantification of a drug candidate and its six metabolites in dog plasma, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(22) (2001), 2135.
194. Liu D.Q., Pereira T., Interference of a carbamoyl glucuronide metabolite in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(2) (2002), 142.
195. Nassar A.E., Adams P.E., Metabolite characterization in drug discovery utilizing robotic liquid-handling, quadrupole time-of-flight mass spectrometry and in-silico prediction, *Current Drug Metabolism*, 4(4) (2003), 259.
196. Xu, R. et al. A fully automated system for metabolic stability and metabolite ID measurements, in 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, Canada, ASMS (2003).
197. Wilson A.G., White A.C., Mueller, R.A., Role of predictive metabolism and toxicity modeling in drug discovery—a summary of some recent advancements, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 6(2003), 123.
198. Lewis D.F., Modelling human cytochromes P450 for evaluation drug metabolism: an update, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 16(2000), 307.
199. Borodina Yu., Sady M., Filimonov D., Blinova V., Dmitriev A., Poroikov V., Predicting biotransformation potential from molecular structure, *Journal of chemical information and computer sciences*, 43(5) (2003), 1636-46.
200. Anari M.R., Baillie T.A., Bridging cheminformatic metabolite prediction and tandem mass spectrometry , *Drug Discovery Today*, 10(2005), 711-717.
201. Nassar A-E.F., Talaat R.E., Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development , *Drug Discovery Today*, 9 (2004), 317-327.
202. Pragst F., Erxleben B.-T., Herre S., Aberger K., HPLC in der systematischen toxikologischen Analyse, *GIT Spezial Chromatographie*, 2 (1994), 92-96.
203. Pragst F., Herzler M., Herre S., Use of high performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD) in clinical toxicology, *Clinical Biochemistry and Metabolism*, 1 (2000), 13-16.
204. Studenberg S., Dahl R., Woolley J., Pharmacokinetics, excretion, and mass balance studies in dogs with 14C-141W94 (VX-478), an HIV-1 protease inhibitor [abstract 327]. Paper presented at the 7th North American ISSX Meeting, San Diego, California, October 20-24, (1996).
205. Studenberg S., Dahl R., Bowers G., Correa I, Castellino S, Chapman D, et al: The disposition of [14C]-amprenavir in rats [abstract 4201]. Paper presented at the AAPS Annual Meeting and Exposition, San Francisco, November 15-19, (1998).
206. Singh R., Chang S.Y., Taylor L.C.E., In vitro metabolism of a potent HIV-protease inhibitor (141W94) using rat, monkey and human liver S9, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10 (1996), 1019–1026.
207. Oyehaug E., Ostensen E.T., Salvesen B., High-performance liquid chromatographic determination of citalopram and four of its metabolites in plasma and urine samples from psychiatric patients, *Journal of Chromatography*, 308 (1984), 199-208.
208. Baumann P., Larsen F., The pharmacokinetics of citalopram, *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy*, 6 (1995), 287–295.
209. Rochat B., Kosel M., Boss G., Testa B., Gillet M., Baumann P., Stereoselective biotransformation of the selective serotonin reuptake inhibitor, citalopram, and its demethylated metabolites by monoamine oxidases in human liver, *Biochemical Pharmacology*, 56(1998), 15-23.

210. Kosel M., Gnerre C., Voirol P., Amey M., Rochat B., Bouras C., Testa B., Baumann P., In vitro biotransformation of the selective serotonin reuptake inhibitor, citalopram, its enantiomers and demethylated metabolites by monoamine oxidase in rat and human brain preparations, *Molecular Psychiatry*, 7 (2002), 181-188.
211. Rao R.N., Raju A.N., Narsimha R., Isolation and characterization of degradation products of citalopram and process-related impurities using RP-HPLC, *Journal of Separation Science*, 31 (2008), 1729-1738.
212. Smyth W.F., Leslie J.C., McClean S., Hannigan B., McKenna H.P., Doherty B., Joyce C., O'Kane E., The Characterisation of Selected Antidepressant Drugs using Electrospray Ionisation with Ion Trap Mass Spectrometry and with Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry and their Determination by HPLC-ESI- MS2, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006), 1637-1642.
213. Herre S., Untersuchung zur Rolle der Wirkstoffmetabolite in der HPLC-Analyse und bewertung von Medikamentvergiftungen, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin, (1996).
214. Müller C., Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS, Dissertation an der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, (2004).
215. Schulz M., Schmoldt A., Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie*, 58(7) (2003), 447-74.
216. Regenthal R., Krueger M., Koepfel C., Preiss R., Drug levels: Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs, *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 15 (1999), 529-544.
217. Bezchlibnyk-Butler K., Alecsic I., Kennedy S.H., Citalopram—a review of pharmacological and clinical effects, *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 25 (2000), 241-254.
218. DeVane CL., Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19 (1999), 443-466.
219. Overo K.F., Kinetics of citalopram in man; plasma levels in patients, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 6 (1982), 311-318.
220. Schmutz J., Eichenberger E., Clozapine, in *Chronicles in Drug Discovery*, Vol I, John Wiley, New York, (1982), 39-59.
221. Fischer V., Vogels B., Maurer G., Tynes R.E., The antipsychotic clozapine is metabolized by the polymorphic human microsomal and recombinant cytochrome P450 2D6, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 260 (1992), 1355-1360
222. Tugnait M., Hawes E.M., McKay G., Rettie A.E., Haining R.L., Midha K.K., N-Oxygenation of clozapine by flavin-containing monooxygenase, *Drug Metabolism and Disposition*, 16 (1997), 524-527.
223. Fang J., Coutts R.T., McKenna K.F., Baker G.B., Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 358 (1998), 592-599
224. Stock B., Spittler G., Heipertz R., Austausch aromatisch gebundenen Halogens gegen OH- und SCH3- bei der Metabolisierung des Clozapins im menschlichen Körper, *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 27 (1977), 982-990.
225. Dain J.G., Nicoletti J., Ballard F., Biotransformation of clozapine in humans, *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (1997), 603-609.
226. Zhang G.Q., McKay G., Hubbard J.W., Midha K.K., Application of electrospray mass spectrometry in the identification of intact glucuronide and sulphate conjugates of clozapine in rat, *Xenobiotica*, 26 (1996), 541-550.
227. Luo H., Hawes E.M., McKay G., Midha K.K., Synthesis and characterization of quaternary ammonium-linked glucuronide metabolites of drugs with an aliphatic tertiary amine group, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(1992), 1079-1083.
228. Baselt R.C., Cravey R.H., *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 4th Ed., Chemical Toxicology Institute, Foster City, CA (1995), 264-267.
229. Glazko A.J., Dill W.A., Young R.M., Smith T.C., Ogilvie R. I., Metabolic disposition of diphenhydramine, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 16 (1974), 1066-1076.
230. Chang, T., Okerholm, R. A., Glazko, A. J., Identification of diphenhydramine (Benadryl) metabolites in human subjects, *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, 9 (1974), 391-404.
231. R. Dahlbom L.E., O' sterberg, Diphenylmethoxyacetic acid and some related compounds, *Acta Chemica Scandinavica*, 2 (1948), 856-858.
232. Djerassi C., Scholz C.R., 2-(Benzhydryloxymethyl)imidazoline, A new Histamine Antagonist, *The Journal of Organic Chemistry*, 13 (6) (1948), 830-833.
233. Kreeger R.W., Hammill S.C., New antiarrhythmic drugs: tocainide, mexiletine, flecainide, encainide, and amiodarone, *Mayo Clinic Proceedings*, 62 (1987) 1033-1050.

234. Conard G.J., Cronheim G.E., Klempt H.W., Relationship between plasma concentrations and suppression of ventricular extrasystoles by flecainide acetate (R-818), a new antiarrhythmic, in patients, *Arzneimittelforschung*, 32 (1982), 155-159.
235. Crozier I.G., Ikram H., Kenealy M., Levy L., Flecainide acetate for conversion of acute supraventricular tachycardia to sinus rhythm, *American Journal of Cardiology*, 59 (1987), 607-609.
236. Romain N., Giroud C., Michaud K., Augsburg M., Mangin P., Fatal flecainide intoxication, *Forensic Science International*, 106 (1999), 115-123.
237. Campbell T.J., Sodium channel blockers, in *Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, ed. Singh B.N., Dzau V.J., Vanhoutte P.M., Woosley R.L. (1994), 652.
238. Levine B., Chute D., Caplan Y.H., Flecainide intoxication, *Journal of Analytical Toxicology*, 14 (1990), 335-336.
239. Forrest A.R.W., Marsh I., Galloway J.H., A rapidly fatal overdose with flecainide, *Journal of Analytical Toxicology*, 15 (1991), 41-43.
240. Rogers C., Anderson D.T., Ribe J.K., Sathyavagiswaran L., Fatal flecainide intoxication, *Journal of Analytical Toxicology*, 17 (1993), 434-435.
241. Sadler D.W., Quigley C., Unsuspected self-poisoning with flecainide and alcohol, *Journal of Forensic Sciences*, 40 (1995), 903-905.
242. O'Sullivan J.J., McCarthy P.T., Wren C., Differences in amiodarone, digoxin, flecainide and sotalol concentrations between antemortem serum and femoral postmortem blood, *Human & Experimental Toxicology*, 14 (1995), 605-608.
243. Baselt R.C., Cravey R.H., *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 4th Edn., Chemical Toxicology Institute, Foster City, CA (1995), 412-414.
244. Kharasch E.D., Labroo R., Metabolism of ketamine stereoisomers by human liver microsomes, *Anesthesiology*, 77 (1992), 1201-1207.
245. Chang T., Glazko A.J., in: *Biodisposition of General Anesthetics*, International Anesthesiology Clinics, Little, Brown and Co., Boston (1974), 157.
246. Rintisch U., Baars J., Lahrmann K.H., Quantitative assessment of ketamine-azaperone anaesthesia in pigs by nociceptive RIII-reflex, 20th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, oral Proc. (2008), 238.
247. Rintisch U., Analgesiamonitoring bei Ketamin-Azaperon-Allgemeinanästhesie der Schweine unter besonderer Berücksichtigung des Nozizeptiven Flexorreflexes (bzw. RIII-Reflex), Freie Universität Berlin. (2010).
248. Bickel M.H., Brodie B.B., Structure and antidepressant activity of imipramine analogues *International Journal of Neuropharmacology* Volume 3, Issue 6, (1964), 611-621.
249. Kraak J.C., Bijster P., Determination of amitriptyline and some of its metabolites in blood by high-pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 1,143(5) (1977), 499-512.
250. Eschenhof E., Rieder J., Studies on the fate of the antidepressant amitriptyline in the organism of the rat and man, *Arzneimittelforschung*, 19(6) (1969), 957-66.
251. Dahl S.G., Garle M., Identification of nonpolar methotrimeprazine metabolites in plasma and urine by GLC-mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16 (1977), 190.
252. Johnsen H., Dahl S.G., Identification of O-demethylated and ring-hydroxylated metabolites of methotrimeprazine (levomepromazine) in man, *Drug Metabolism and Disposition*, 10 (1982), 63-67.
253. Shader R.I., Fogelman S.M., Greenblatt D.J., Newer antidepressants: Hypotheses and evidence, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 17 (1997), 1-3.
254. de Boer T., The pharmacologic profile of mirtazapine, *Journal of Clinical Psychiatry*, 57 (Suppl 4) (1996), 19-25.
255. Kelder J., Funke C., De Boer T., Delbressine L., Leysen D., Nickolson V., A comparison of the physicochemical and biological properties of mirtazapine and mianserin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49 (1997), 403-411.
256. Delbressine L.P.C., Moonen M.E.G., Kaspersen F.M., Wagenaars G.N., Jacobs P.L., Timmer C.J., Paanakker J.E., van Hal H.J.M., Voortman G., Pharmacokinetics and biotransformation of mirtazapine in human volunteers, *Clinical Drug Investigation*, 15 (1998), 45-55.
257. Dahl M.L., Voortman G., Alm C., Elwin C.E., Delbressine L., Vos R., Bogaards J.J.P., Bertilsson L., Moonen M.E.G., Kaspersen F.M., In vitro and in vivo studies on the disposition of mirtazapine in humans, *Clinical Drug Investigation*, 13 (1997), 37-46.
258. Grimm S.W., Stams K.R., Bui K., In vitro prediction of potential metabolic drug interactions for Seroquel, *Schizophrenia Research*, 24 (1997), 198.
259. Grimm S.W., Richtand N.M., Winter H.R., Stams K.R., Reece S.B., Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61 (2006), 58-69.
260. DeVane C.L., Nemeroff C.B., Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic, *Clinical Pharmacokinetics*, 40 (2001), 509-522.

261. Fitzsimmons M.E., Collins J.M., Selective Biotransformation of the Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Saquinavir by Human Small-Intestinal Cytochrome P4503A4, *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (2) (1997), 256-266.
262. Scott O.R., Loretta M.C., Larry M.T., Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 33 (2) (2005), 262-70.
263. Tremaine L.M., Welch W.M., Ronfeld R.A., Metabolism and disposition of the 5-hydroxytryptamine uptake blocker sertraline in the rat and dog, *Drug Metabolism and Disposition*, 17 (5) (1989), 542-550.
264. Muth E.A., Haskins J.T., Moyer J.A., Husbands G.E.M., Nielsen S.T., Sigg E.B., Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative, *Biochemical Pharmacology*, 35 (1986), 4493-4497.
265. Muth E.A., Moyer J.A., Haskins J.T., Andree T.H., Husbands G.E.M., Biochemical, neurophysiological, and behavioral effects of Wy-45,233 and other identified metabolites of the antidepressant venlafaxine, *Drug Development Research*, 23 (1991), 191-199.
266. Rudorfer M.V., Potter W.Z., Antidepressants: A comparative review of the clinical pharmacology and therapeutic use of the 'newer' versus the 'older' drugs, *Drugs*, 37 (5) (1989), 713.
267. Haskins J.T., Moyer J.A., Muth E.A., Sigg E.B., Inhibition of noradrenergic neuronal activity by the novel bicyclic compounds, Wy- 45,030 and Wy-45,881, *Society for Neuroscience, Abstr.* 10 (1984), 262.
268. Sisenwine S.F., Politowski J., Birk K., White G., Dyroff M., A prefatory investigation of the metabolic disposition of Wy-45,030 in man, *Acta pharmacologica et toxicologica*, 59(Suppl. 5) (1986), 312.
269. Haskins J.T., Moyer J.A., Muth E.A., Nielson S.T., Sigg E.B., DMI, WY-45,030, WY-45,881 and ciramadol inhibit locus coeruleus neuronal activity, *European Journal of Pharmacology*, 115 (1985), 139.
270. Hicks D.R., Wolaniuk D., Russell A., Cavanaugh N., Kraml M., A high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of Venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in biological fluids, *Therapeutic Drug Monitoring*, 16 (1) (1994), 100.
271. Howell S.R., Husbands G.E.M., Scatina J.A., Sisenwine S.F., Metabolic disposition of 14C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man, *Drug Metabolism Division, Wyeth-Ayerst Research, CN 8000, Princeton, NJ 08543-8000, USA.* 1992.
272. Brogden R.N., Benfield P., Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease, *Drugs*, 51 (1996), 792-819.
273. McAllister Jr R.G., Schloemer G.L., Hamann S.R., Kinetics and dynamics of calcium entry antagonists in systemic hypertension, *American Journal of Cardiology*, 57 (1986), 16D-21D.
274. Flanagan J.R., Johnston A., Holt D.W., Frese J.H., Rohland L., Schulz M., Schmoldt A., Intoxikation and Gallopamil, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 113 (1988), 770-772.
275. Hynning P.-A. Anderson P., Bondesson U., Boreus O.L., Liquid chromatographic quantification compared with gaschromatographic-mass-spectrometric determination of verapamil and norverapamil in plasma, *Clinical Chemistry*, 34 (1988), 2502-2503.
276. Lim C.K., Rideout J.M., Sheldon J.W.S., Determination of verapamil and norverapamil in serum by high-performance liquid chromatography, *Journal of Liquid Chromatography*, 6 (5) (1983), 887-893.
277. Neugebauer G., Comparative cardiovascular actions of verapamil and its major metabolites in the anaesthetised dog, *Cardiovascular Research*, 12 (1978), 247-254.
278. Rosseel M.T., Belpaire F.M., Determination of the calcium entry blocker verapamil in plasma by capillary gas chromatography with on-column injection, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 11 (1988), 103-106.
279. Weller J.P., Wolf M., Eine tödliche Verapamil-Vergiftung, *Beiträge zur gerichtlichen Medizin*, 44 (1986), 271 - 275.
280. Perchalski R.J., Yost R.A., Wilder B.J., Structural Elucidation of Drug Metabolites by Triple-Quadrupole Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, (1982), 1466-1471.
281. Tong W., Chowdhury S.K., Chen J.C., Zhong R., Alton K.B., Patrick J.E., Fragmentation of A⁺-oxides (deoxygenation) in atmospheric pressure ionization: investigation of the activation process, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 (2001), 2085-2090.
282. Kratzsch C., Peters F.T., Kraemer T., Weber A.A., Maur H.H., Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by Hquid chromatography/mass spectrometrywith atmospheric pressure chemical ionization, *Journal of Mass Spectrometry*, 38 (2003), 283-295.
283. Ziegler D.M., Flavin-containing monooxygenase catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metabolism Reviews*, 25 (1988), 1-32.

8. Publikationsverzeichnis

Publikationen

Pragst F., Bakdash A.:

UV-Spektren der Designerdrogen 4-Brom-2,5-dimethoxybenzylpiperazin, 2C-B-Fly und Bromo-Dragonfly.

Toxichem+Krimtech (2007) 74 (3): 147.

Bakdash A., Burger P., Goecke T.W., Fasching P.A., Reulbach U., Bleich S., Hastedt M., Rothe M., Beckmann M.W., Pragst F., Kornhuber J.:

Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study.

Analytical and bioanalytical chemistry 2010;396(7):2469-77.

Pragst F., Herre S., Bakdash A.:

Poisonings with diphenhydramine--a survey of 68 clinical and 55 death cases.

Forensic science international 2006;161(2-3):189-97.

Bakdash A., Nadulski T., Herre S., Pragst F.:

Probleme beim analytischen Nachweis des Alkoholentwöhnungsmittels Disulfiram in Blut- und Haarproben.

Toxichem+Krimtech (2008) 75 (2): 68.

Bakdash A., Ganswindt M., Herre S., Nadulski T., Pragst F.:

Lethal Poisoning with p-Nitroaniline.

Toxichem+Krimtech (2006) 73 (2): 61.

Pragst F., Broecker S., Bakdash A., Herre S., Tsokos M.:

Combined use of LC-QTOF-MS and HPLC-DAD in systematic toxicological analysis.

eingereicht bei Forensic Science International.

Vorträge

Bakdash A., Broecker S., von Meyer A., Hallbach J., Pragst F.:

Metabolitennachweis mit TOF und Q-TOF.

Minisymposium der Arbeitsgruppe Klinische Toxikologie der DGKL: UPDATE Klinische Toxikologie 2010 – Klinik und Labor 28-29.10.2010.

Bakdash A., Ganswindt M., Herre S., Nadulski T., Pragst F.:

Letale Vergiftung mit p-Nitroanilin.

15. Frühjahrstagung der Region Nord der DGRM, 09.-10.06.2006.

Bakdash A., von Meyer A., Hallbach J., Herre S., Pragst F.:

Identification of metabolites by LC-MS-TOF demonstrated at the example of Diphenhydramine and Misuse of a Freely Available Hypnotic Poisonings with Diphenhydramine.

4th Conference of Pharmaceutical Sciences, University of Aleppo, 13.–15. April 2010, Aleppo (Syrien)

Bakdash A., Von Meyer A., Pragst F., Hallbach J.:

Identifizierung von Metaboliten ausgewählter psychoaktiver Wirkstoffe in der systematischen toxikologischen Analyse durch LC-TOF-MS. Detection of metabolites of selected psychoactive drugs in systematic toxicological analysis by LC-TOF-MS.

XVI. GTFCH-SYMPOSIUM, 01. - 04. April 2009 in Mosbach (Baden)

Poster

Von Meyer A., Bakdash A., Hallbach J., Pragst F.:

Identification of metabolites by LC-MS-TOF demonstrated at the example of diphenhydramine.

Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) 16th annual meeting, The International Association of Forensic Scientists (TIAFT) 46th international meeting, Society of Hair Testing (SoHT) annual meeting, Schoelcher, Martinique, French West Indies, 2.-8. June, 2008.

Bakdash A., Burger P., Goecke T.W., Fasching P.A., Reulbach U., Bleich S., Hastedt M., Rothe M., Beckmann M.W., Pragst F., Kornhuber J.:

Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study.

47. Jahrestagung der „The International Association of Forensic Toxicologists“ (TIAFT) Genf 23.–27. August 2009.

Bakdash A., Herzler M., Herre S., Erxleben B.-T., Rothe M., Pragst F.:

The HPLC-DAD Data Base ,UV Spectra of Pharmaceutical and Toxic Compounds.

2nd Conference of Pharmaceutical Sciences, University of Aleppo, 5.–7.11. 2008, Aleppo (Syrien)

Bakdash A., Ganswindt M., Herre S., Nadulski T., Pragst F.:

Letale Vergiftung mit p-Nitroanilin.

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Freie Universität Berlin, 14.07.2006

9. Lebenslauf

Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten