
Verfahrensentwicklung zur Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-Massenspektrometrie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Markus Persike
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2010)
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. M. Karas
Prof. Dr. J. Klein

Datum der Disputation:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2006 bis April 2010 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas angefertigt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Karas für das interessante und vielseitige Thema und die gewährte akademische Freiheit danken. Die hervorragenden experimentellen Arbeitsbedingungen und die hilfreichen Diskussionen, aber auch die Möglichkeit, zahlreiche nationale und internationale Tagungen zu besuchen, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Jochen Klein für die Unterstützung und Betreuung der Kooperation, die wissenschaftlichen Diskussionen, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Martina Zimmermann für die intensive Zusammenarbeit und kritische Korrektur meiner Arbeit ganz herzlich danken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Karas, namentlich Anne Arnold, Tabiwang Arrey, Dr. Ute Bahr, Dr. Sabrina Baltruschat, Dominic Bäumlisberger, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Walter Eckhard, Daniel Hierl, Dr. Tri Hoang, Thorsten Jaskolla, Stavroula Markoutsas, Dr. Björn Meyer, Benjamin Müller, Andreas Münch, Dimitrios Papatotiriou, Benjamin Rietschel, Marion Rohmer, Malte Schürken, Dorota Urbanek und Markus Weidlich bedanken. Danke auch für viel Spaß, nicht nur während der Arbeit und den Tagungen, sondern auch in der teilweise knappen Freizeit.

Besonderer Dank auch an meine Kollegen Sabrina, Sandra, Dominic, Marion und Benjamin aus dem Zweitsemesterpraktikum, ohne die die Studentenbetreuung nur halb so erfrischend gewesen wäre.

Ganz herzlich danken möchte ich Melanie Mongili für die ständige Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge, sowie die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich bei all meinen Entscheidungen immer voll unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Stand der Wissenschaft	3
2.1 Massenspektrometrie	3
2.1.1 Ionisierungstechniken.....	4
2.1.2 Massenanalysatoren	6
2.2 Präparationstechniken für MALDI.....	10
2.2.1 <i>Dried Droplet</i> Präparation.....	10
2.2.2 Dünnschichtpräparation	11
2.3 MALDI-MS im niedrigen Massenbereich	12
2.4 Acetylcholin und Cholin	16
2.4.1 Allgemeines.....	16
2.4.2 Mikrodialyse	19
2.4.3 Analytik.....	21
2.5 Melamin.....	23
2.5.1 Allgemeines.....	23
2.5.2 Toxizität.....	25
2.5.3 Analytik.....	28
2.6 Energy Drinks	34
2.6.1 Allgemeines.....	34
2.6.2 Analytik.....	35
3 Ergebnisse und Diskussion	37
3.1 Vorbemerkung.....	37
3.2 Einsatz verschiedener Matrices und Präparationstechniken	38
3.2.1 <i>Dried Droplet</i> Präparation.....	38
3.2.2 Optimierung der Probenpräparation	46
3.2.3 Dünnschichtpräparation	49
3.2.4 Einfluss verschiedener Zusätze und Salze.....	56
3.3 Screening verschiedener Arzneistoffe	62

Inhaltsverzeichnis

3.4	Entwicklung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-MS	68
3.4.1	Validierung der entwickelten MALDI-MS Methoden	69
3.4.2	Probleme bei der Entwicklung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-MS.....	74
3.5	Bestimmung von Phenothiazinen	75
3.5.1	Quantifizierung der Phenothiazine mit variabler IS-Konzentration	76
3.5.2	Quantifizierung der Phenothiazine mit konstanter IS-Konzentration	79
3.5.3	Quantifizierung der Phenothiazine in menschlichem Plasma	81
3.6	Bestimmung verschiedener Arzneistoffe	84
3.6.1	Quantifizierung verschiedener Arzneistoffen mit variabler IS-Konzentration	85
3.6.2	Quantifizierung verschiedener Arzneistoffe mit konstanter IS-Konzentration	86
3.7	Bestimmung des Wirkstoffgehalts einer Tablette	90
3.8	Bestimmung von Acetylcholin und Cholin in Mikrodialyseproben	93
3.8.1	Methodenentwicklung in künstlicher Hirnflüssigkeit.....	93
3.8.2	Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration	95
3.8.3	Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration	98
3.8.4	Quantifizierung von <i>in-vivo</i> Mäusehirnmikrodialysaten.....	101
3.9	Bestimmung von Melamin in Milchprodukten	114
3.9.1	Methodenentwicklung.....	114
3.9.2	Quantifizierung von Melamin in Milchpulver und Milch.....	117
3.10	Bestimmung von Koffein und Vitaminen in <i>Energy Drinks</i>	121
4	Zusammenfassung	130
5	Ausblick	132
6	Material und Methoden	133
6.1	Chemikalien.....	133
6.2	Geräte	135
6.3	Etablierung einer Standardpräparation für kleine Moleküle	138
6.3.1	Auswahl der Matrix für kleine Moleküle	138
6.3.2	Einfluss von Zusätzen	138
6.4	Screening verschiedener Arzneistoffe	139

Inhaltsverzeichnis

6.5	Bestimmung von Phenothiazine	140
6.5.1	Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration	141
6.5.2	Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration	143
6.5.3	Quantifizierung der Phenothiazine in menschlichem Plasma	145
6.6	Bestimmung verschiedener Arzneistoffe	147
6.6.1	Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration	147
6.6.2	Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration	148
6.7	Bestimmung des Wirkstoffgehalts einer Tablette	149
6.8	Bestimmung von Acetylcholin und Cholin in Mikrodialyseproben	150
6.8.1	Methodenentwicklung in künstlicher Hirnflüssigkeit.....	150
6.8.2	Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration	151
6.8.3	Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration	151
6.8.4	Messung von <i>in-vivo</i> Mäusehirndialysaten.....	152
6.9	Bestimmung von Melamin in Milchprodukten	155
6.9.1	Methodenentwicklung.....	155
6.9.2	Quantifizierung von Melamin in Milchpulver und Milch.....	156
6.10	Bestimmung von Koffein und Vitaminen in <i>Energy Drinks</i>	157
7	Literatur	159
8	Anhang	185
	Eidesstattliche Versicherung	200

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Komponenten eines Massenspektrometers.....	3
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses.....	5
Abbildung 2.3	Schematische Funktionsweise eines TOF-Massenanalysators	7
Abbildung 2.4	Struktur von Acetylcholin und Cholin	16
Abbildung 2.5	Synaptische Übertragung durch Acetylcholin	17
Abbildung 2.6	Schematische Darstellung einer Mikrodialysesonde.....	20
Abbildung 2.7	Struktur von Melamin und seinen Derivaten	23
Abbildung 2.8	Struktur des Melamin-Cyanursäure Komplex	26
Abbildung 3.1	Struktur von Prazosin, Lidocain und Levomepromazin.....	38
Abbildung 3.2	Spektrum einer Standard-DDP-Präparation mit CHCA.....	39
Abbildung 3.3	Fotographien DHB-Matrix	41
Abbildung 3.4	Fotographien CHCA-Matrix.....	42
Abbildung 3.5	Spektrum von Lidocain, Levomepromazin und Prazosin mit DHB.	43
Abbildung 3.6	Spektrum der optimierten DDP-Methode	47
Abbildung 3.7	Vergleich DDP-Techniken mit CHCA als Matrix	48
Abbildung 3.8	Fotos der TLP mit CHCA und Nitrozellulose.....	50
Abbildung 3.9	Spektrum der drei Analyten mittels TLP (oben) bzw. DDP (unten)	51
Abbildung 3.10	Vergleich verschiedener Präparationstechniken und Lösungsmittel.....	54
Abbildung 3.11	Spektrum TLP mit Zugabe von 1 mM NaCl bzw. NH ₄ Ac	57
Abbildung 3.12	Spektrum von 10 Phenothiazinen mit und ohne Salzverunreinigung	58
Abbildung 3.13	Spektrum mit CTAB als Ionensuppressor	60
Abbildung 3.14	Ausschnitt aus dem Screening kleiner Moleküle.....	64
Abbildung 3.15	Strukturen der verwendeten Phenothiazine	75
Abbildung 3.16	Spektrum der verwendeten 10 Phenothiazine	77
Abbildung 3.17	Strukturen der verwendeten, verschiedenen Arzneistoffe.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.18	Linearität und Präzision von Verapamil mit Trimethoprim als IS (50 fmol/μl)	87
Abbildung 3.19	Spektrum einer Probe mit 25 fmol/μl ACh.....	94
Abbildung 3.20	Einfluss der Konzentration auf die relative Standardabweichung am Beispiel von ACh in aCSF	99
Abbildung 3.21	Spektrum einer <i>in-vivo</i> Mikrodialyseprobe	103
Abbildung 3.22	Gehalt ACh und Ch der Mikrodialyseproben von Maus A1 und A2	104
Abbildung 3.23	Gehalt ACh und Ch der Mikrodialyseproben von Maus B.....	108
Abbildung 3.24	Gehalt ACh und Ch der Mikrodialyseproben von Maus C.....	111
Abbildung 3.25	Struktur von Melamin und Atrazin.....	114
Abbildung 3.26	Linearität Melamin in Wasser.....	115
Abbildung 3.27	Spektrum von Melamin (25nM) in Wasser	116
Abbildung 3.28	Spektrum von 12,5 ppm Melamin in Milchpulver	118
Abbildung 3.29	Spektrum einer 1:10 Verdünnung des <i>Energy Drinks</i> „Red Bull“.....	122
Abbildung 3.30	Standard Addition von Koffein zu dem <i>Energy Drink</i> „Red Bull“.....	123
Abbildung 6.1	Geräteparameter Voyager™-DE STR	136
Abbildung 6.2	Pipettierschema der Verdünnungsreihe mit variabler IS-Konzentration.....	142
Abbildung 6.3	Pipettierschema der Verdünnungsreihe mit konstanter IS-Konzentration.....	144
Abbildung 6.4	Aufarbeitung des mit Melamin versetzten Milchpulvers	156
Abbildung 8.1	Spektrum der hochmolekularen Matrix F20TPP	185
Abbildung 8.2	Spektrum von Cl-CCA mit den drei Modellanalyten	185
Abbildung 8.3	Fotographien Sprayversuche TLP	186

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Übersicht häufig verwendeter MALDI-Matrizes.....	5
Tabelle 3.1	Matrixsignale für CHCA	40
Tabelle 3.2	Vergleich DDP mit TLP	53
Tabelle 3.3	Screening niedermolekularer Analyten mit einer Konzentration von je 1 pmol/µl.....	66
Tabelle 3.4	Validierungsparameter nach ICH Q2 (R1)	69
Tabelle 3.5	Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der gemessenen Phenothiazine mit Levomepromazin als IS (variable IS-Konzentration)	78
Tabelle 3.6	Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der gemessenen Phenothiazine mit Levomepromazin als IS mit konstanter Konzentration von 50 fmol/µl.....	80
Tabelle 3.7	Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der in menschliches Plasma gespickten Phenothiazine mit Levomepromazin als IS (100 fmol/µl)	82
Tabelle 3.8	Auswirkung der Anzahl aufsummierter Laserschüsse	86
Tabelle 3.9	Ergebnisse für die Mischung verschiedener Arzneistoffe mit Trimethoprim als IS (50 fmol/µl).....	88
Tabelle 3.10	Berechnete Verteilungskoeffizienten und Molekulargewicht	89
Tabelle 3.11	Quantifizierung einer Prazosin Tablette mit verschiedenen IS.....	91
Tabelle 3.12	Auswertung ACh und Ch mit einem IS.....	96
Tabelle 3.13	Auswertung ACh und Ch mit zwei IS	97
Tabelle 3.14	Präzision, Richtigkeit und Linearität von Ch und ACh in aCSF	98
Tabelle 3.15	Wiederfindungsrate der Mikrodialysesonden	102
Tabelle 3.16	Ergebnisse Mikrodialyseproben Maus A1	105
Tabelle 3.17	Ergebnisse Mikrodialyseproben Maus A2.....	107
Tabelle 3.18	Messergebnisse der Mikrodialyseproben von Maus B.....	110
Tabelle 3.19	Bestimmung von Melamin in Wasser.....	116
Tabelle 3.20	Bestimmung von Melamin in Milchpulver.....	119
Tabelle 3.21	Bestimmung von Melamin in Milch	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.22	Bestimmung von Koffein in verschiedenen <i>Energy Drinks</i> mittels Standard-Additionverfahren.....	124
Tabelle 3.23	Bestimmung des Koffeingehalts verschiedener Energy Drinks mittels Kalibriergerade	125
Tabelle 3.24	Bestimmung von Niacin und Pyridoxin in <i>Energy Drinks</i>	127
Tabelle 6.1	Übersicht der verwendeten Chemikalien	134
Tabelle 6.2	Geräte und Hersteller.....	135
Tabelle 6.3	Übersicht analysierte Arzneistoffe	139
Tabelle 6.4	Auftrageschema Standard-Additionsverfahren	154
Tabelle 6.5	Zugabe Koffeinlösung für das Standard-Additionsverfahren.....	158
Tabelle 8.1	Bestimmungsgrenze, Präzision, \bar{U} und Linearität der gemessenen Phenothiazine	187
Tabelle 8.2	Auswertung der Präzision und Linearität aus der Quantifizierung unterschiedlicher Arzneistoffe mit variabler IS-Konzentration	192
Tabelle 8.3	Auswirkung der Anzahl Laserschüsse auf Linearität und relative Standardabweichung.....	193
Tabelle 8.4	Auswertung ACh und Ch mit nur einem IS mit variabler Konzentration.....	193
Tabelle 8.5	Auswertung ACh und Ch mit nur einem IS mit konstanter Konzentration.....	194
Tabelle 8.6	Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit variabler Konzentration unter Verwendung von CHCA.....	194
Tabelle 8.7	Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit variabler Konzentration unter Verwendung von Cl-CCA.....	195
Tabelle 8.8	Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit konstanter Konzentration unter Verwendung von CHCA.....	195
Tabelle 8.9	Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit konstanter Konzentration unter Verwendung von Cl-CCA.....	196

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ACh	Acetylcholin
ACN	Acetonitril
aCSF	Künstliche Hirnflüssigkeit (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
AMCh	Acetyl- β -methylcholin
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CE	Kapillarzonenelektrophorese
Ch	Cholin
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
CID	Stoßaktivierter Zerfall (<i>Collision-Induced Dissociation</i>)
Cl-CCA	4-Chlor- α -cyanozimtsäure
CNS	Zentrales Nervensystem
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DAD	<i>Dioden Array</i> Detektor
DAPCI	<i>Desorption atmospheric pressure chemical ionisation</i>
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DDP	<i>Dried-Droplet</i> -Präparation
DE	verzögerte Extraktion (<i>delayed extraction</i>)
DESI	<i>Desorption</i> Elektrospray Ionisation
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
EC	elektrochemische Detektion
EESI	<i>Extractive</i> Elektrospray Ionisation
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELA	<i>Enzyme-linked Immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Abkürzungsverzeichnis

GC	Gaschromatographie
G-Protein	Guaninnucleotidbindendes Protein
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IS	Interner Standard
LC	Flüssigchromatographie
Log D	Verteilungskoeffizient bei bestimmtem pH -Wert
Log P	Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometer
MTBE	Methyltertbutylether
MW	Molekulargewicht
n.d.	Nicht detektierbar
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
p.a.	Pro analysi
PI-PLC	Phosphatidylinositspezifische Phospholipase
QqQ	<i>Triple Quadrupol</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
RP	Umkehrphase
RSD	Relative Standardabweichung
SA	Sinapinsäure
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i>
SPE	Festphasenextraktion
TDI	<i>Tolerable-Daily-Intake</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THFA	<i>Tridecafluoroheptanoic acid</i>
TOF	Flugzeitanalysator (<i>Time of flight</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPLC	<i>Ultra Pressure</i> Flüssigchromatographie
VK	Variationskoeffizient
σ	Standardabweichung

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Entwicklung der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) revolutionierte die massenspektrometrische Bioanalytik. Diese neue, weiche Ionisierungstechnik ermöglicht es, selbst große Biopolymere intakt zu ionisieren und sensitiv zu analysieren. Dabei findet MALDI vor allem bei der Analytik großer Moleküle wie Proteine, Peptide, Oligonucleotide und Oligosaccharide Anwendung. Die moderne Bioanalytik ist heutzutage ohne diese Technik kaum denkbar. Jedoch wird MALDI bei der Untersuchung kleiner Moleküle (molare Masse < 1000 g/mol) kaum verwendet. Hier hat sich eine weitere weiche Ionisationstechnik, die Elektrospray Ionisation (ESI) in Kombination mit einer vorgeschalteten Flüssigchromatographie (LC) durchgesetzt.

Die Beliebtheit von ESI für die Analytik kleiner Moleküle resultiert aufgrund einiger Einschränkungen der MALDI-Technik. Die Verwendung der MALDI-Matrix, im Überschuss zugegeben, verursacht einen intensiven Signalhintergrund im relevanten niedrigen Massenbereich. Eine weitere Einschränkung bei MALDI ist die relativ schlechte Reproduzierbarkeit der Messung aufgrund der nicht homogenen Matrix-Kristallisation und Co-Kristallisation des Analyten mit der Matrix. Dies führt zu einer hohen Fluktuation der Signalintensitäten, was eine valide Quantifizierung der Analyten erschwert.

Neben den genannten Nachteilen weist MALDI auch einige Vorteile auf. So besitzt MALDI eine höhere Salz- und Puffertoleranz. Dies erlaubt nicht nur die Anwendung alternativer LC-Methoden, welche aufgrund des Salz- oder Puffergehalts nicht ESI kompatibel sind, sondern es ist auch möglich, auf die LC-Trennung komplett zu verzichten. Daher kann mit MALDI ein sehr hoher Probendurchsatz realisiert werden, was ein weiterer wichtiger Vorteil gegenüber ESI-Methoden ist. Da bei MALDI die Messung *offline* erfolgt, ist diese nicht von der chromatographischen Zeitskala beschränkt. Dies ermöglicht eine längere Messung, die insbesondere bei komplexen Proben von Vorteil sein kann. Zudem ist es möglich, die Proben zu einem späteren Zeitpunkt oder mit anderen Einstellungen erneut zu messen. Als weitere Vorteile sind die unkomplizierten Spektren (MALDI erzeugt meist nur einfach geladene Ionen), die sehr hohe absolute Empfindlichkeit, die relativ einfach aufgebauten Geräte und die geringe Menge an benötigter Probe zu nennen.

Einleitung und Zielsetzung

Aufgrund dieser Vorteile wurden schon zahlreiche Anstrengungen unternommen, MALDI bei der Analytik kleiner Moleküle einzusetzen. Neben der qualitativen Analyse konnte sogar die für kleine Moleküle so bedeutende quantitative Bestimmung mittels MALDI-MS durchgeführt werden. Jedoch basieren diese Versuche auf der Verwendung exotischer Matrices, dem Einsatz spezieller Geräte, der Verwendung besonderer Probenpräparationen oder der Benutzung verschiedener Zusätze. Zudem sind die vorgestellten Methoden häufig nur für bestimmte Analyten geeignet und nicht universell anwendbar.

Ziel der Arbeit war es daher, ein allgemein anwendbares Verfahren für die Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-MS zu entwickeln. Dazu sollten weder besondere Matrices noch zeitaufwändige Probenpräparationen benötigt werden. Die Methode sollte zudem an gängigen MALDI-TOF Geräten sensitive Analysen unterschiedlichster Analyten ermöglichen und für eine valide Quantifizierung geeignet sein.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines allgemeinen Protokolls für die Messung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS.

Im zweiten und umfangreicheren Teil der Arbeit wurde dieses Protokoll zur Quantifizierung verschiedener kleiner Analyte eingesetzt. Dazu wurde mit verschiedenen Analyten aus unterschiedlichen Probenmatrices getestet, ob MALDI-TOF-MS für eine allgemein anwendbare Identifizierung und Quantifizierung kleiner Moleküle geeignet ist. Um den MALDI-Vorteil der schnellen Analytik zu erhalten, wurde die Probenaufarbeitung so einfach wie möglich durchgeführt und gleichzeitig auf den Einsatz einer LC verzichtet.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie hat sich in der Analytik zu einer der bedeutendsten Analysetechniken entwickelt. So ist mit ihr nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung unterschiedlichster organischer und anorganischer Substanzen, sondern auch Strukturaufklärung möglich. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Auftrennung ionisierter Substanzen in der Gasphase anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z). Die mittlere freie Weglänge der gebildeten Ionen muss ausreichend groß sein um Stöße mit Molekülen wie z.B. N_2 in der Luft zu vermeiden. Daher ist ein ausreichend starkes Vakuum für den Betrieb eines MS-Gerätes notwendig. Ein Massenspektrometer besteht aus den drei Hauptkomponenten Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Abbildung 2.1 gibt eine Übersicht häufig verwendeter Komponenten eines Massenspektrometers.

Ionenquelle

- Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)
- Elektrospray Ionisation (ESI)
- Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)
- Elektronenstoßionisation (EI)
- Induktiv-gekoppeltes Plasma (ICP)

Massenanalysator

- Flugzeitmassenanalysator (TOF)
- Quadrupol
- Ionenfallen (IT)
 - Lineare Ionenfalle
 - Quadrupol Ionenfalle
 - Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz (FT-ICR)
 - Orbitrap

Detektor

- Mikrokanalplatte (MCP)
- Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)

Abbildung 2.1 Komponenten eines Massenspektrometers

Die Vielzahl verschiedener Komponenten spiegelt sich in den zahlreichen unterschiedlichen Geräten wieder, da auch Kombinationen mehrerer Massenanalysatoren möglich sind.

2.1.1 Ionisierungstechniken

Um das m/z Verhältnis einer Substanz zu bestimmen, muss diese zuerst ionisiert werden. Die Ionisierung findet in der Ionenquelle statt und kann auf verschiedene Weise erfolgen. Allgemein kann zwischen „harten“ und „weichen“ Techniken unterschieden werden. Bei harter Ionisation, wie z.B. Elektronenstoßionisation kommt es aufgrund der hohen zugeführten Energie bereits während der Ionisierung zu einer Fragmentierung des Analyten. Die erhaltenen Spektren besitzen einen hohen Informationsgehalt, sind aber häufig sehr schwer interpretierbar. Anders bei den vor ungefähr 20 Jahren vorgestellten weichen Ionisationstechniken Elektrospray Ionisation (ESI) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) [YAMASHITA und FENN 1984; KARAS *et al.* 1985; KARAS *et al.* 1987; KARAS und HILLENKAMP 1988; FENN *et al.* 1989]. Diese „weichen“ Techniken ermöglichen es, selbst hochmolekulare Analyten wie Proteine intakt in die Gasphase zu überführen. Die Entwicklung dieser Techniken war damit maßgeblich für den Boom der Massenspektrometrie verantwortlich. Die moderne Analytik, insbesondere die Bioanalytik ist ohne den Einsatz dieser beiden Techniken nicht mehr denkbar.

Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Bei MALDI wird eine Analytlösung zusammen mit der Matrixlösung auf einem Probenhalter aufgetragen. Die niedermolekulare Matrixlösung sollte dabei eine deutlich höhere Konzentration als die Analytlösung aufweisen. Sobald das Lösungsmittel verdunstet, kristallisiert die Matrix und die Analytmoleküle werden in die Matrixkristalle eingebaut [STRUPAT *et al.* 1991]. Die getrocknete Probe wird anschließend im Hochvakuum der Ionenquelle mit kurzen Laserimpulsen (10^6 - 10^7 W/cm³, Dauer < 10 ns) beschossen. Als Laser werden dabei hauptsächlich Nd:YAG Laser mit einer durch Frequenzverdreifung erzeugten

Emissionswellenlänge von 355 nm oder N₂-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 337 nm verwendet.

Seit der Entwicklung von MALDI wurden zahlreiche Matrixsubstanzen vorgestellt. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht verschiedener häufig verwendeter Matrizes.

Matrix	Abkürzung	Literatur
4-Hydroxy-2,3-Methoxyzimtsäure	SA	[BEAVIS <i>et al.</i> 1989]
α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	CHCA	[BEAVIS <i>et al.</i> 1992]
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB	[STRUPAT <i>et al.</i> 1991]
2,4,6-Trihydroxyacetophenon	THAP	[PIELES <i>et al.</i> 1993]
3-Hydroxypicolinsäure	3-HPA	[WU <i>et al.</i> 1993]

Tabelle 2.1 Übersicht häufig verwendeter MALDI-Matrizes

Durch die eingebrachte Laserenergie kommt es zu einem explosionsartigen Übergang der oberen Molekülschichten in die Gasphase. Hierbei werden sowohl Matrix als auch Analytmoleküle desorbiert [DREISEWERD 2003]. Je nach eingesetzter Matrix beginnt ab einer bestimmten Strahlungsstärke die Bildung der Ionen, wobei bei zu starker Strahlungsstärke die Qualität der Spektren sinkt [STRUPAT *et al.* 1991]. Abbildung 2.2 gibt eine schematische graphische Darstellung des MALDI-Prozesses wieder.

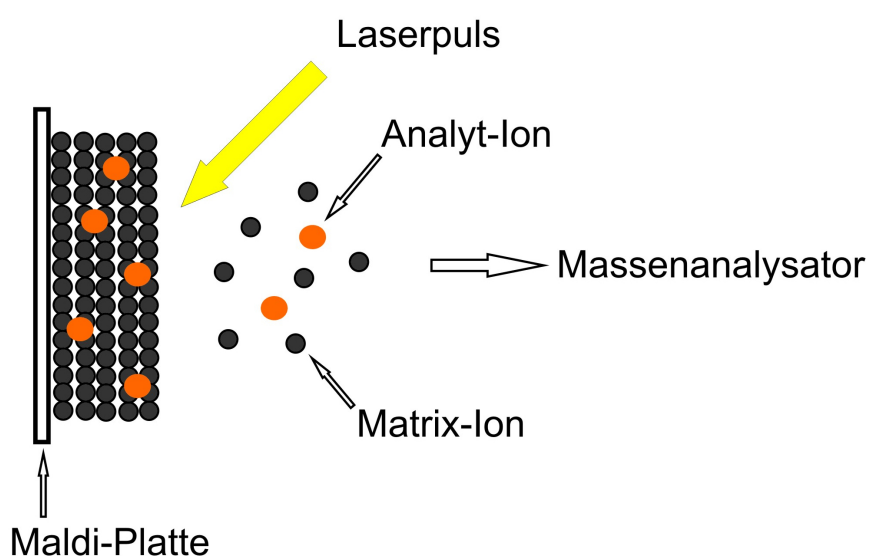


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses

Wie kürzlich von JASKOLLA und KARAS [2010] gezeigt, erfolgt die Ionisierung bei MALDI vermutlich auf unterschiedliche Art und Weise, abhängig von der Art des Analyten. Dabei wurde sowohl das postulierte Modell der Gasphasen-Ionisation als auch das „*Lucky Survivor*“ Modell bestätigt. Bei neutralen Analyten erfolgt die Ionisierung in der Gasphase wie von ZENOBI und KNOCHENMUSS [1998] und KNOCHENMUSS *et al.* [2000] postuliert.

Im Gegensatz dazu liegen bei dem „*Lucky Survivor*“ Modell bereits präformierte Ionen vor. Die Freisetzung der Ionen erfolgt durch Clusterzerfall mit unvollständiger Neutralisation der präformierten Analyte [KARAS *et al.* 2000; KARAS und KRUGER 2003]. Es konnte experimentell bestätigt werden, dass Analyte mit basischer Funktion nach dem „*Lucky Survivor*“ Modell ionisiert werden [JASKOLLA und KARAS 2010].

2.1.2 Massenanalysatoren

Die in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden im Massenanalysator anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) aufgetrennt. Zahlreiche Massenanalysatoren sind heutzutage verfügbar, wobei MALDI-Geräte meist einen Flugzeitmassenanalysator (TOF) verwenden. Die Vorteile eines TOF liegen in dem nahezu unbegrenzt messbaren Massenbereich, den relativ geringen Kosten und der hohen Empfindlichkeit [EDMONDSON und RUSSELL 1996].

Beim TOF wird nach Beschleunigung der Ionen im Hochspannungsfeld die unterschiedliche Flugzeit der Ionen in einer feldfreien Driftstrecke gemessen. Aus dieser Flugzeit kann nun das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ionen bestimmt werden. Die Ionen werden in der Ionenquelle mittels eines Potentialgefälles beschleunigt. Die dabei aufgenommene kinetische Energie E_{kin} kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$E_{kin} = e * z * U = \frac{1}{2} * m * v^2$$

m = Masse; v = Geschwindigkeit

e = Elementarladung; z = Ladung

U = Beschleunigungsspannung

Aufgrund unterschiedlicher Masse besitzen die Ionen unterschiedliche Geschwindigkeiten. In der nun folgenden feldfreien Driftstrecke, dem sogenannten Flugrohr, kommt es aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit zu einer räumlichen Trennung der Ionen.

Abbildung 2.3 zeigt die schematische Funktionsweise eines TOF Analysators.

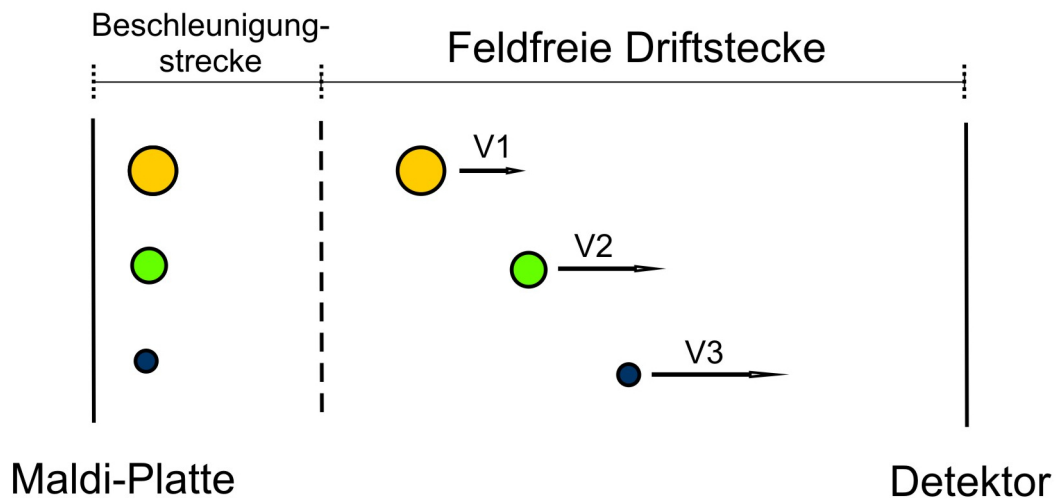


Abbildung 2.3 Schematische Funktionsweise eines TOF-Massenanalysators

Aus der exakten Messung der Flugzeit der Ionen kann nun das Masse-zu-Ladungsverhältnis berechnet werden. Die Flugzeit der Ionen in der feldfreien Strecke berechnet sich wie folgt:

$$t = \sqrt{\frac{D^2}{2 * e * v}} * \sqrt{\frac{m}{z}}$$

D = Driftstrecke

Durch Einsetzen von $v = \frac{D}{t}$ und umformen nach m/z ergibt sich daraus:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 * e * v}{D^2} * t^2$$

Für eine exakte Bestimmung muss nun noch die Flugzeit in der Beschleunigungsstrecke berücksichtigt werden. Die Umwandlung der Messzeit in eine m/z Skala erfolgt dabei in der Praxis häufig mit Hilfe von zwei oder mehreren Ionen bekannter Masse. Folgende quadratische Gleichung mit den Kalibrierkonstanten a und b kann angewendet werden:

$$\frac{m}{z} = a * t^2 + b$$

Die MALDI-TOF-MS Geräte wurden im Laufe der Zeit ständig weiterentwickelt und verbessert. So konnte die Auflösung der Geräte deutlich verbessert werden.

Die Auflösung R in der Flugzeit-Massenspektrometrie wird meist durch die Breite des Peaks bei halber Peakhöhe definiert (FWHM – *full width at half maximum*). Es gilt:

$$R = \frac{m}{\Delta m_{1/2}}$$

Ursache für eine geringe Auflösung sind Unterschiede in der Geschwindigkeits-Raum- und Zeitverteilung von Ionen mit identischem m/z Verhältnis [BEAVIS und CHAIT 1991; PAN und COTTER 1992; ZHOU *et al.* 1992]. Unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten, verursacht durch den Desorptions-/Ionisationsprozess der Ionen bewirken eine Verbreiterung der Signale, da diese zu verschiedenen Zeiten am Detektor auftreffen. Werden Ionen mit identischem m/z Verhältnis zu einem späteren Zeitpunkt oder einem anderen Ort (mit damit verbundener unterschiedlicher Wegstrecke) gebildet erfolgt ebenso eine Verschlechterung der Auflösung.

Eine Möglichkeit diese zu verbessern ist der Einsatz eines Reflektors [MAMYRIN *et al.* 1973]. Der Ionenreflektor bremst die Ionen durch ein elektrisches Feld selber Polarität ab und beschleunigt sie wieder in umgekehrter Richtung. Ionen mit dem identischen m/z Verhältnis, aber höherer kinetischer Energie dringen tiefer in den Reflektor ein als langsamere Ionen und legen so einen weiteren Weg zurück. Bei richtiger Justierung der Reflektorspannung erreichen beide Ionenpakete den Detektor zur gleichen Zeit. Durch den Reflektor wird außerdem die Driftstrecke verlängert, was eine bessere Massenauflösung ermöglicht. Unterschiedliche Raum-

und Zeitverteilung der Ionen können durch einen Reflektor jedoch nicht behoben werden. Hier erreicht die verzögerte Extraktion (DE), eine Weiterentwicklung der gepulsten Extraktion, eine Verbesserung der Auflösung [WILEY und MCLAREN 1955; BROWN und LENNON 1995; VESTAL *et al.* 1995; WHITTAL und LI 1995]. Bei der DE wird die Beschleunigungsspannung erst einige Zeit nach dem Laserschuss angelegt (abhängig vom Massenbereich: 10-500 ns). Schnellere Ionen haben bis zum Einschalten der Beschleunigungsspannung schon einen weiteren Weg zurückgelegt und erfahren deshalb eine etwas kürzere Beschleunigung als die anfänglich langsameren Ionen. Außerdem finden in der Ionenquelle bei Einsatz der DE weniger Kollisionen statt.

Die Kombination des Reflektors in Verbindung mit der DE verbessert die Auflösung erheblich. Zugleich ist es möglich durch Kalibrierung mit internen Standards, eine sehr hohe Massengenauigkeit (~5-20 ppm) zu erreichen.

2.2 Präparationstechniken für MALDI

Die Probenpräparation spielt bei MALDI eine wichtige Rolle und wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. So haben nicht nur das verwendete Lösungsmittel, die Matrix, Trocknungsgeschwindigkeit, Zusätze oder Verunreinigungen Einfluss auf die Kristallisation, sondern auch die Präparationstechnik und sogar Temperatur und Luftfeuchte sowie die Beschaffenheit des Proben Tellers. Als Lösemittel für Peptide und Proteine kommen häufig Acetonitril/Wasser Gemische oder Alkohol/Wasser Gemische unterschiedlicher Konzentration mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) zum Einsatz. Ein molares Verhältnis Analyt-zu-Matrix zwischen 1:1000 und 1:100000 wird empfohlen, da ansonsten Unterdrückungseffekte auftreten können [CHAN *et al.* 1992; PERERA *et al.* 1995].

2.2.1 *Dried Droplet* Präparation

Die einfachste Präparationstechnik stellt die sogenannte „*Dried Droplet*“ Präparation (DDP) dar. Bei dieser Technik wird die Probe mit der Matrix direkt auf dem Proben teller gemischt und anschließend getrocknet. Üblicherweise werden je 1 µl Probe und Matrix verwendet, jedoch können hier auch andere Volumina eingesetzt werden. Während das Lösungsmittel verdunstet bilden sich die ersten Matrixkristalle und die Analytmoleküle werden in die Kristalle eingebaut. Aufgrund inhomogener Kristallisation und Co-Kristallisation der Matrix und des Analyten und damit verbunden inhomogener Verteilung der Analyten kann es bei der anschließenden Messung zu Veränderungen der Signalintensitäten kommen [HILLENKAMP und KARAS 2007]. Dieses sogenannte „*Hot-Spot*“ Phänomen stellt für die Identifizierung kein wirkliches Problem dar. Es kann sogar von Vorteil sein, da es durch die „*Hot-Spots*“ zu einer Anreicherung des Analyten kommt. Das Problem besteht eher darin, dass die *Hot Spots* nicht vorhergesagt werden können und die Reproduzierbarkeit der Messung darunter leidet.

BEAVIS und CHAIT [1990] konnten die Reproduzierbarkeit ihrer Methode erhöhen, indem sie die Matrix mit der Probe bereits vor dem Auftragen auf den Proben teller mischten. Die Trocknung der Probe erfolgt normalerweise an der Raumluft, aber auch eine schnellere Trocknung mittels Luft oder Stickstoffstrom, oder Trocknung im

Vakuum ist möglich [LING *et al.* 1998]. Die DDP-Technik ist schnell durchführbar, benötigt keine besondere Vorbereitung und wird deshalb häufig verwendet.

2.2.2 Dünnschichtpräparation

Eine weitere Präparationstechnik ist die Dünnschichtpräparation (TLP), bei der zuerst eine dünne Matrixschicht auf der Probenplatte aufgetragen wird [VORM *et al.* 1994]. Dies erfolgt meistens mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel (z.B. Aceton), um eine schnelle Trocknung zu erreichen. Es ist aber auch möglich die dünne Schicht durch schnelles Drehen (*spin-coating*) oder Spraytechniken herzustellen [PERERA *et al.* 1995; AXELSSON *et al.* 1997]. Auf diese dünne Kristallschicht wird dann die wässrige Probe aufgetragen. Die TLP erzielt dabei teils deutlich bessere Sensitivität als die DDP, da die Analyten an der Oberfläche konzentriert sind. Jedoch darf die Probe nicht die komplette Matrixschicht lösen, da sonst der positive Effekt verloren geht. Es wurden verschiedene Varianten der TLP vorgestellt, wie z.B. Zugabe von Matrix zu der Analytlösung oder die Verwendung mehrerer Schichten [EDMONDSON und RUSSELL 1996; DAI *et al.* 1999]. Die Kombination der Dünnschichtpräparation mit Nitrozellulose ermöglicht eine schnelle und sensitive Detektion verschiedener Peptide [MILIOTIS *et al.* 2002]. Durch Verwendung dieser Präparation fand neben einer Suppression der Matrixsignale auch eine Aufkonzentrierung der Probe auf dem Probenhalter statt [DONEGAN *et al.* 2004]. Diese Anreicherung ist erwünscht, da hierdurch eine sensitivere Analytik möglich ist. Die Aufkonzentrierung wird meist durch Verwendung einer hydrophoben Oberfläche erreicht, weil hierdurch die Spotgröße verringert wird. Gleichzeitig kann auf die hydrophobe Oberfläche mehr Probe aufgetragen werden, weil durch die Hydrophobizität ein Verlaufen des Spots verhindert wird. Verschiedene hydrophobe Oberflächen wie z.B. Teflon [HUNG *et al.* 1999], Folien [YAN *et al.* 2000], Imprägnierspray [OWEN *et al.* 2003] oder Paraffin [HUNG *et al.* 1998] wurden vorgestellt. Inzwischen sind auch kommerziell angebotene Probenhalter (Anchor Chip, Focus Chip) von verschiedenen Herstellern in Verwendung [SCHUERENBERG *et al.* 2000; GOBOM *et al.* 2001]. Allerdings ist bei allen Verfahren die Reinheit der Probe der limitierende Faktor, da auch Verunreinigungen und Salze aufkonzentriert werden. Zudem funktioniert die Fokussierung nur bei hohem Wasseranteil der Probe.

2.3 MALDI-MS im niedrigen Massenbereich

Die Entwicklung von MALDI und ESI revolutionierte die massenspektrometrische Analytik von instabilen und nicht flüchtigen Molekülen. Beide Methoden werden häufig für die Analyse großer biologischer Moleküle wie Peptide und Proteine eingesetzt. Bei der Analytik organischer Moleküle mit geringem Molekulargewicht ($MW < 1000 \text{ g/mol}$) trifft dies jedoch nicht zu. Hier wird, insbesondere bei einer quantitativen Bestimmung fast ausschließlich ESI oder die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) in Verbindung mit Flüssigchromatographie (LC) und Tandem-Massenspektrometrie (LC/ESI/APCI-MS/MS) verwendet.

Die Beliebtheit dieser Methoden bei der Untersuchung von kleinen Molekülen resultiert aufgrund einiger Einschränkungen der MALDI-Technik. Der Einsatz der MALDI-Matrix, im Überschuss zugegeben, verursacht einen intensiven Signalhintergrund im relevanten niedrigen Massenbereich bis 800 Da. Eine weitere Einschränkung bei MALDI ist die relativ schlechte Reproduzierbarkeit der Messungen, die auf der nicht homogenen Matrix-Kristallisation und Co-Kristallisation von Analyt mit Matrix beruht. Als Folge dessen zeigen Einzelschussspektren bei MALDI teilweise eine hohe Fluktuation der Signalintensitäten [COHEN und GUSEV 2002].

Es wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um diese Probleme zu minimieren oder gar ganz zu beheben. Ein möglicher Ansatz wurde von HATSIS *et al.* [2003] vorgestellt. Dabei wurde die MALDI Ionenquelle nicht mit dem üblichen TOF-Analysator, sondern mit einem Triple Quadrupol (QqQ) Massenanalysator, der häufig auch bei ESI verwendet wird, verbunden. Dieser besitzt zwar geringere Auflösung und Massengenauigkeit, kann aber bei Verwendung des *single reaction monitoring* (SRM) meist eindeutig zwischen Analyt und Matrixsignal unterscheiden. Zahlreiche Publikationen zeigen die Anwendbarkeit und Möglichkeiten dieses Systems für die Analytik kleiner Moleküle [GOBEY *et al.* 2005; SLENO und VOLMER 2005a, b; WAGNER *et al.* 2008]. Inzwischen ist dieser Gerätetyp als *FlashQuant™ workstation* kommerziell erhältlich.

Eine andere Möglichkeit zeigen GUO *et al.* [2002], SU *et al.* [2005] und GRANT und HELLEUR [2007, 2008]. Sie verwendeten Tenside, um damit die Matrix Signale im niedrigen Massenbereich zu unterdrücken. Auch die Mischung zweier Matrices kann

den Matrixhintergrund minimieren. GUO und HE [2007] verwendeten eine Mischung von CHCA mit 9-Aminoacridin, um verschiedene kleine Moleküle zu analysieren. Eine weitere Möglichkeit, den Matrixhintergrund in niedrigen Massenbereich zu beseitigen, ist die Verwendung einer hochmolekularen Matrix [AYORINDE *et al.* 1999; AYORINDE *et al.* 2000; AYORINDE *et al.* 2003; VAN KAMPEN *et al.* 2006]. VAN KAMPEN *et al.* [2006] verwendeten meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin mit einem Molekulargewicht von 974 g/mol, um verschiedene pharmazeutische Wirkstoffe zu analysieren.

Der störende Matrixhintergrund kann auch durch den Einsatz von nicht organischen Matrices wie Metalloxide, Graphit- oder Silikon-Pulver unterbunden werden [SUNNER *et al.* 1995; KRAFT *et al.* 1998; WEN *et al.* 2007; CASTRO *et al.* 2008]. Selbst matrixfreie Ansätze, wie z.B. Laser Desorption Ionisation (LDI) von Silikon Substraten, auf Kohlenstoff basierenden Polymeren und von Nanostrukturen wurden vorgestellt [WEI *et al.* 1999; XU *et al.* 2003; PETERSON *et al.* 2004; PETERSON 2007; WOO *et al.* 2008]. Allerdings finden diese Techniken kaum Anwendung und die analytische Leistungsfähigkeit und Vorteile müssen sich erst gegen die heutige MALDI-Technik bewähren [KOVARIK *et al.* 2007].

Für die Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-MS wird häufig CHCA eingesetzt. Dies liegt an der relativ homogenen Kristallisation mit recht kleinen Kristallen und führt zu geringerer Fluktuation bei den Signalintensitäten und damit verbunden höherer Präzision im Vergleich mit anderen Matrices [LIDGARD und DUNCAN 1995; COHEN und GUSEV 2002; ALTERMAN *et al.* 2004; CUI *et al.* 2004; SLENO und VOLMER 2005a]. Das molare Verhältnis von Analyt-zu-Matrix sollte für kleine Moleküle höher gewählt werden wie für große Analyten [DUNCAN *et al.* 1993]. Dies ist jedoch bei geringer Analytkonzentration nur schwer realisierbar.

Die Probenpräparation hat auch bei der Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI einen großen Einfluss auf das erzielte Ergebnis. Die verschiedenen Präparationstechniken wurden in Abschnitt 2.2 erläutert. Die inhomogene Kristallisation und Co-Kristallisation der Matrix und des Analyten verursacht vor allem bei der Quantifizierung Probleme, da hierdurch die Präzision teilweise erheblich leidet. Deswegen wurden verschiedene Probenpräparationsprotokolle, wie z.B. Kristallisation in Vakuum [LING *et al.* 1998], schnelle Trocknung [NICOLA *et al.* 1995]

oder Spraytechniken [AXELSSON *et al.* 1997] vorgestellt, die die Präzision der Messung erhöhen sollten. Auch die Mischung mehrerer Matrizes und die TLP sollten die Inhomogenität reduzieren und dadurch die Reproduzierbarkeit vergrößern [GUSEV *et al.* 1995; MILIOTIS *et al.* 2002]. Ein weiterer Ansatz, um inhomogene Kristallisation zu vermeiden, ist der Einsatz von flüssiger ionischer Matrix [THOLEY und HEINZLE 2006].

Trotz der zahlreichen Anstrengungen sind Schwankungen der Intensität aber immer noch vorhanden. Daher ist bei der quantitativen Analytik mittels MALDI die Verwendung eines internen Standards (IS) zwingend notwendig [DUNCAN *et al.* 1993; COHEN und GUSEV 2002; DUNCAN *et al.* 2008]. So kann ohne IS die relative Standardabweichung (RSD) leicht über 50% ansteigen [HATSIS *et al.* 2003]. Gewöhnlich stellt ein isotope markierter IS die beste Option dar, da hier die Desorption und das Verhalten in der Gasphase nahezu identisch zu dem Analyten ist [WILKINSON *et al.* 1997; KANG *et al.* 2001]. Isotope markierte IS sind jedoch teuer und zudem teilweise gar nicht erhältlich. Falls kein isotope markierter IS verfügbar ist, kann auch ein strukturell ähnlicher IS verwendet werden. SLENO und VOLMER [2005a, 2006] zeigten, dass dies möglich sei, solange der Verteilungskoeffizient $\log D$ des Analyten ähnlich zu dem Verteilungskoeffizienten des IS ist. Andernfalls variiert der Einbau des Analyten und des IS mit der Matrix zu stark, was sich in höherer Standardabweichung widerspiegelt.

Eine frühere Einschränkung bei der Messung kleiner Moleküle wiesen ältere MALDI Instrumente auf. Hier führte die geringe Auflösung und Sensitivität zu Problemen und auch die Verbindung mit LC stellte anfangs eine Schwierigkeit dar.

Die neueren Generationen der MALDI-Instrumente mit DE und Verwendung eines Reflektors weisen jedoch eine exzellente Auflösung, Massengenauigkeit und Sensitivität auf. Auch die Verbindung der LC mit MALDI durch den Einsatz automatischer MALDI-Spotter ist heutzutage Routine und wird im Proteomicsbereich bereit standardmäßig eingesetzt.

Neben den eben genannten Nachteilen weist MALDI auch einige wichtige Vorteile auf. Ein Vorteil von MALDI stellt die relativ hohe Salz- und Puffertoleranz dar [COHEN und GUSEV 2002]. Dies erlaubt nicht nur die Anwendung alternativer LC-Methoden, welche aufgrund des Salz- oder Puffergehalts nicht ESI kompatibel sind, sondern es

ist auch möglich, auf die LC-Trennung komplett zu verzichten [LERICHE *et al.* 2001]. Ohne die zeitaufwändige LC-Trennung kann daher mit MALDI ein sehr hoher Probendurchsatz realisiert werden. Dieser hohe Probendurchsatz, der vielleicht bedeutendste Vorteil gegenüber ESI-Methoden, kann selbst von modernsten *Ultra-Pressure* Flüssigchromatographen (UPLC) mit extrem kurzen Laufzeiten nicht annäherungsweise erreicht werden. So konnten WAGNER *et al.* [2008] 96 Proben in weniger als 10 Minuten mittels MALDI-MS quantifizieren und RATHORE *et al.* [2008] benötigten für ein Enzyminhibitor-Screening lediglich 1,75 min für 384 Proben. Durch die zeitliche Trennung der Chromatographie von der Massenspektrometrie wird die Messzeit im MS nicht mehr von der chromatographischen Zeitskala beschränkt. Dies stellt insbesondere bei komplexen Proben einen Vorteil dar, da nun die Probe deutlich länger analysiert werden kann. Dies ist möglich, da MALDI während einer normalen Analyse nur einen geringen Teil der Probe verbraucht. Die Aufnahme von 3000-4000 Laserschüssen mit einem MALDI-QqQ-MS System verbrauchte nur ~4% der Probe [SLENO und VOLMER 2005a].

Zudem ermöglicht die *offline* Messung, dass Proben zu einem späteren Zeitpunkt oder mit anderen Einstellungen erneut gemessen werden können. So zeigte die wiederholte Messung nach einem Monat Lagerung in einem geschlossenen Behältnis keine Auswirkung auf die Signalintensitäten eines tryptischen Verdau [DEKKER *et al.* 2007]. Da die MALDI-Matrizes photoaktiv sind, sollte die Lagerung lichtgeschützt erfolgen [VAN KAMPEN *et al.* 2010].

Als weitere Vorteile sind die unkomplizierten Spektren (MALDI erzeugt meist nur einfach geladene Ionen), die sehr hohe absolute Empfindlichkeit und die relativ einfach aufgebauten Geräte zu nennen [KELLER und LI 2001; COHEN und GUSEV 2002]. So berechneten SLENO und VOLMER [2005a], dass bei ihrer Nachweisgrenze von Ramipril (0,5 nM) pro Laserschuss lediglich 6,5 zmol der Substanz gemessen wurden. Ein direkter Vergleich der Analytsignale in Verhältnis zum Probenverbrauch zwischen MALDI-QqQ-MS und LC-ESI-QqQ-MS zeigte, dass MALDI-MS ungefähr 100 mal effizienter ist als ESI-MS [GOBEY *et al.* 2005]. Hier muss allerdings beachtet werden, dass bei MALDI-MS weniger Probe benötigt wird und auch während der Analyse weniger Probe verbraucht wird als bei ESI-MS. Ist ausreichend Probe vorhanden erreichte MALDI-MS bei einer pharmakokinetischen Studie ungefähr die gleichen Nachweisgrenzen wie mittels LC-ESI-MS ermittelt [VOLMER *et al.* 2007].

2.4 Acetylcholin und Cholin

2.4.1 Allgemeines

Die quartäre Ammoniumverbindung Acetylcholin (ACh) zählt neben anderen Stoffklassen zu den Neurotransmittern. Diese vermitteln die Erregungsübertragung an Synapsen sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) als auch im vegetativen (autonomen) Nervensystem, wobei ACh eine bedeutende Rolle spielt [WEBSTER 2001; HALBACH und DERMIETZEL 2002]. Synapsen, an denen ACh wirkt, werden als cholinerg bezeichnet. Dazu zählen präganglionär-sympathische und -parasympathische Neuronen, postganglionär-parasympathische Neurone und postganglionär-sympathische Neuronen zu den Schweißdrüsen. Cholinerg sind zudem präganglionäre autonome Neurone und die neuromuskulären Synapsen, deren Aktivierung über Motoneuronen aus dem Vorderhorn des Rückenmarks erfolgt. Weiterhin erfolgt auch an zahlreichen Synapsen des Darmnervensystems die Erregungsübertragung mittels Acetylcholin. Die Strukturen von ACh und Cholin (Ch) sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

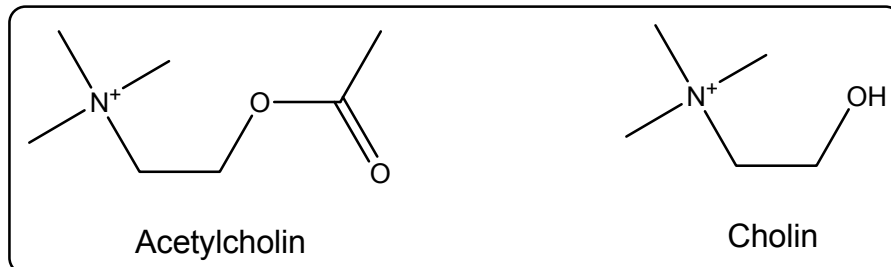


Abbildung 2.4 Struktur von Acetylcholin und Cholin

Allen Neurotransmittern gemeinsam ist die präsynaptische Synthese, die Speicherung in Vesikeln, die Freisetzung durch Aktionspotentiale, die Bindung an Rezeptoren und die schnelle Eliminierung nach der Übertragung.

Acetylcholin wird im Cytoplasma der Nervenendigungen unter Katalyse der Cholinacetyltransferase aus Ch und Acetyl-Coenzym A gebildet [OKUDA *et al.* 2000]. Dabei bestimmt die Verfügbarkeit von Ch die Geschwindigkeit der Synthese, da diese aus dem Extrazellulärraum mit Hilfe eines Na⁺ abhängigen Carriers ins Axoninnere transportiert werden muss [SUSZKIW und PILAR 1976].

Nach Diffusion durch den synaptischen Spalt bindet ACh an zwei Gruppen von Rezeptoren. Die Nicotinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) aus fünf Peptidketten, die sich für Na⁺- und K⁺-Ionen öffnen und somit die Membran depolarisieren. Ihrer Funktion entsprechend werden sie nochmals in neuronale und muskuläre Nicotin-Rezeptoren unterteilt. Im Gegensatz zu dem schnellen ionotropen Nicotinrezeptor ist der Muskarinrezeptor, ein G-Proteingekoppelter Rezeptor (heptahelikaler Rezeptor), relativ langsam. Nach Aktivierung durch den Transmitter geben diese Rezeptoren die Information über ein guaninnucleotidbindendes Protein (G-Protein) an einen Effektor, der ein Enzym oder Ionenkanal sein kann, weiter.

Muskarinrezeptoren werden in fünf Subtypen (M₁ bis M₅) unterteilt und kommen u.a. in Plasmamembranen von Neuronen vor. M₁-, M₃- und M₅-Rezeptoren aktivieren über das G-Protein des Typs G_q die phosphatidylinositspezifische Phospholipase C (PI-PLC), was die Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol veranlasst. M₂- und M₄-Rezeptoren hemmen über G-Proteine des Typs G_i die Adenylylcyclase (AC) oder öffnen K⁺-Kanäle.

Die Inaktivierung von freigesetztem ACh erfolgt hauptsächlich über sehr schnellen enzymatischen Abbau durch die Acetylcholinesterase (AChE). Dieses Enzym gehört zu den schnellsten Enzymen und kann pro Sekunde rund 10000 Moleküle ACh spalten. Durch die Spaltung entstandenes Ch kann dann erneut in die Nervenendigungen aufgenommen werden. Aber auch enzymatischer Abbau oder der Einbau in Phospholipide, welche dann wiederum als Quelle für Cholin dienen, ist möglich [AMENTA und TAYEBATI 2008].

Im Gehirn spielt ACh eine Rolle bei Lernprozessen, Schlafregulierung und der Ausbildung des Gedächtnisses [WESSLER *et al.* 1998]. Zuständig dafür sind cholinerge Fasersysteme mit Galanin als Cotransmitter, welche vom Nucleus basalis Meynert zur Großhirnrinde sowie von der Formatio septalis medialis zum Hippocampus ziehen [FORTH *et al.* 2001]. Aber auch Krankheiten wie Schizophrenie, Tourette-Syndrom, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer werden, wenigstens teilweise von cholinergen Fehlfunktionen verursacht [WHITE und CUMMINGS 1996; FELICIAN und SANDSON 1999].

Die kognitiven Defizite bei der Alzheimer Krankheit werden mit einer Fehlfunktion des cholinergen Systems infolge einer Degeneration cholinergischer Nervenzellen im basalen Vorderhirn verbunden [FRANCIS *et al.* 1999; GIL-BEA *et al.* 2005]. Neben dem Verlust der Nervenzellen wurden auch reduzierte ACh und Ch Gehalte, sowie geringere Mengen der Proteine (z.B. *high affinity cholin uptake*, Acetylcholinesterase und Cholinacetyltransferase) gefunden, die diesen Effekt verursachen [HENKE und LANG 1983; ZUBENKO 1997; AULD *et al.* 2002]. So lagen in Gehirnen von *Amyloid Precursor Protein* transgenen Mäusen (APPsw) signifikant reduzierte ACh Konzentrationen vor [KARASHI *et al.* 2004].

Daher ist es von großer Bedeutung eine genaue Bestimmung der ACh-Konzentration im Gehirn durchführen zu können.

2.4.2 Mikrodialyse

Zur Probengewinnung ist die Mikrodialyse eine wichtige Methode in den Neurowissenschaften geworden [NIROGI *et al.* 2010]. Mittels Mikrodialyse können *in-vitro* Experimente aber auch *in-vivo* Probennahme von Stoffen, Metaboliten und endogenen Substanzen in verschiedenen Körperflüssigkeiten durchgeführt werden. So ist die Mikrodialyse eine häufig verwendete Methode, um extrazelluläre Gehalte von Neurotransmittern in *in-vivo* Experimenten zu untersuchen [WESTERINK 2000; VAN DER ZEYDEN *et al.* 2008; ZIELKE *et al.* 2009].

Bei der Mikrodialyse werden neben einer Spritzenpumpe ein Fraktionssammler und die Mikrodialysesonde benötigt. Diese besteht aus einer semipermeablen Membran und wird in die gewünschte Hirnregion des Versuchstieres implantiert. Abbildung 2.6 zeigt den schematischen Aufbau einer Mikrodialysesonde.

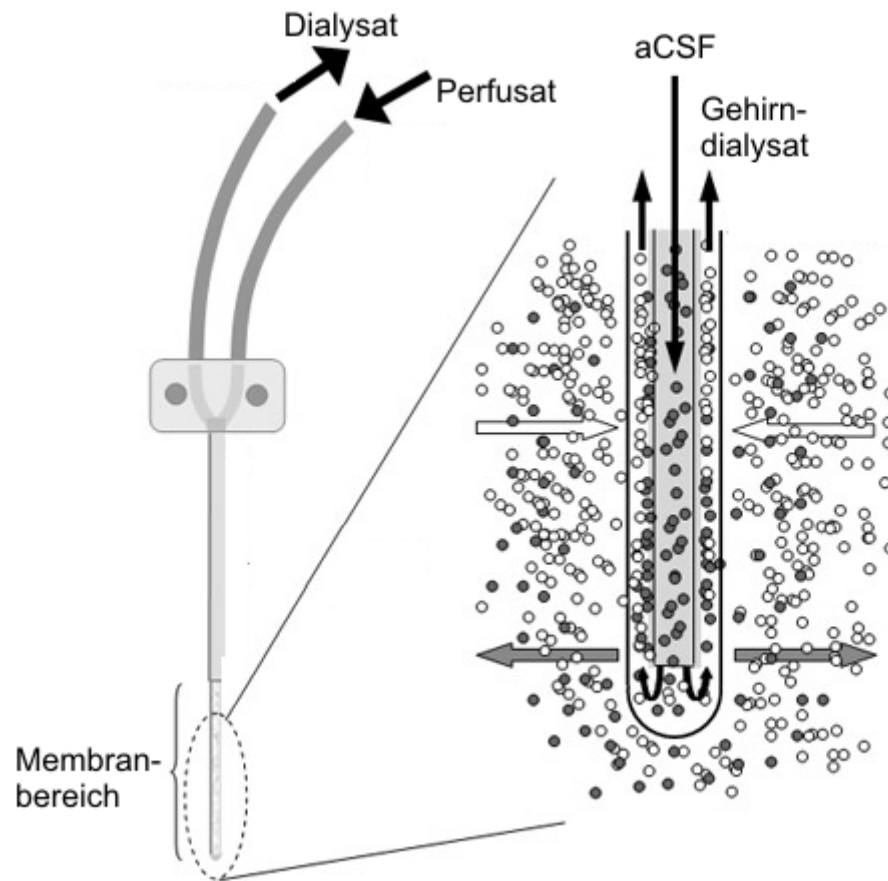


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung einer Mikro dialysesonde
(aus CHAURASIA *et al.*[2007])

Durch die Sonde wird langsam ($1-2 \mu\text{l}/\text{min}$) künstliche Hirnflüssigkeit (aCSF) gepumpt, wobei durch passive Diffusion ein Austausch der niedermolekularen Stoffe erfolgt. Höhermolekulare Stoffe werden durch die Porengröße der Membran an der Diffusion in das Dialysat gehindert. Die so gewonnene Probe wird mittels Fraktionssammler gesammelt und kann anschließend analysiert werden.

2.4.3 Analytik

Die Beurteilung der ACh-Freisetzung mithilfe der Mikrodialyse hat viel zum Verständnis der Physiologie, Pharmakologie und der Aufgabe des cholinergen Systems beigetragen [DAY *et al.* 2001]. Dazu wird jedoch eine sehr leistungsfähige Analytik benötigt. Die ACh-Konzentration im cholinergen System ist normalerweise sehr gering und liegt im niedrigen nanomolaren Bereich, während die Ch-Konzentration in niedrigen mikromolaren Bereich vorliegt [MASSOULIE *et al.* 1993; TAYLOR und RADIC 1994; HUANG *et al.* 1995; ZACKHEIM und ABERCROMBIE 2003]. Dieser Konzentrationsunterschied beruht u.a. auf der hohen AChE Aktivität, welche im synaptischen Spalt eine sehr schnelle enzymatische Hydrolyse von ACh zu Ch verursacht. Die genauen Konzentrationen hängen im Einzelfall natürlich auch von Faktoren wie der verwendeten OP-Technik und dem dialysierten Hirnbereich ab. Aufgrund der sehr niedrigen ACh-Konzentration z.B. im Striatum ist die Verwendung von AChE Inhibitoren wie Neostigmin oder Physostigmin in der Dialyseflüssigkeit eine gebräuchliche Methode, um den ACh Gehalt zu erhöhen [HENN *et al.* 1998; DAY *et al.* 2001; ERB *et al.* 2001]. Ungeachtet dessen wird eine sehr sensitive und selektive analytische Methode benötigt, um ACh und Ch im cholinergen System zu detektieren und quantifizieren.

Da in der zur Dialyse verwendeten künstlichen Hirnflüssigkeit ein hoher Salzgehalt (> 150 mM) vorliegt und das kationische ACh und Ch sehr ähnliche Eigenschaften wie die Salze besitzen, ist eine anspruchsvolle Chromatographie notwendig. Die Analyten ACh und Ch in den Dialysaten werden häufig mittels LC in Verbindung mit elektrochemischer Detektion (EC) bestimmt [HUANG *et al.* 1995; KEHR *et al.* 1998; LIU *et al.* 2004]. Dabei wird nach der Säulentrennung ein Enzymreaktor benötigt, welcher AChE und Cholinoxidase enthält. Dieser Enzymreaktor wandelt ACh und Ch in elektrochemisch detektierbares Wasserstoffperoxid um [HUANG *et al.* 1995]. Die Nachweisgrenzen der LC/EC Analysenmethode liegen für ACh zwischen 2 und 50 fmol (Stoffmenge auf der Säule) [DE BOER *et al.* 1990; HUANG *et al.* 1995; TSAI *et al.* 1996; ICHIKAWA und MELTZER 2000].

Eine weitere, häufig benutzte Methode zur Analyse von Mikrodialysaten ist die LC verbunden mit einem Massenspektrometer, bei dem nun keine

Nachsäulenderivatisierung mehr benötigt wird. Die Ionisation wird normalerweise mittels ESI [ZHU *et al.* 2000] oder APCI [KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007] durchgeführt. Im Vergleich zu den klassischen LC/EC Systemen weisen die LC/MS Methoden eine bessere Nachweisgrenze verbunden mit einer höheren Selektivität auf. Daher beruhen auch die in letzter Zeit veröffentlichten Methoden zur Bestimmung von ACh normalerweise auf MS [ZHU *et al.* 2000; HOWS *et al.* 2002; UUTELA *et al.* 2005; LACROIX *et al.* 2006; KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007; ZHANG *et al.* 2007].

Dabei werden verschiedene Säulenmaterialien wie C18, SCX, HILIC oder Kombinationen aus diesen Materialien zur chromatographischen Trennung verwendet. Die absoluten Nachweisgrenzen der MS-Methoden liegen zwischen 0,2 und 1,4 fmol [ZHU *et al.* 2000; HOWS *et al.* 2002; UUTELA *et al.* 2005; LACROIX *et al.* 2006; KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007].

Die auf LC basierenden Analysemethoden weisen aber verschiedene Probleme auf. Die für die LC benötigten Volumina benötigen eine lange Probennahmezeit von bis zu 20 Minuten, was eine relativ schlechte zeitliche Auflösung der *in-vivo* Analysen verursacht. Ein weiteres Problem ist die relativ lange Analysenzeit um eine einzelne Probe zu bestimmen. Dies ermöglicht lediglich einen geringen Probendurchsatz [ZHU *et al.* 2000]. Kürzlich wurden einige Verbesserungen vorgestellt, um diese Probleme zu minimieren. So konnten KESKI-RAHKONEN *et al.* (2007) mittels RP-C18 Säule gekoppelt an eine APCI Quelle die Laufzeit ihrer LC-Trennung auf 3 min verringern. Jedoch wurde weiterhin ein Injektionsvolumen von 15 µl benötigt, was eine relativ schlechte zeitliche Auflösung von *in-vivo* Proben mit sich brachte. Im Gegensatz dazu verwendeten SHACKMAN *et al.* [2007] eine *online*-Kapillar-LC/MS, welche die zeitliche Auflösung auf bis zu 2,4 min verbessern konnte. Allerdings ist auch diese Methode nicht ideal, da sich das lebende Tier sehr nahe an dem sehr lauten LC/MS Gerät befindet. Inwieweit diese Lärmbelastung die Messung beeinflusst ist unklar.

2.5 Melamin

2.5.1 Allgemeines

In den letzten Jahren hat das unscheinbare Molekül Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin) aus der Gruppe der Triazine zweifelhafte Berühmtheit erlangt. Die organische Base, die industriell aus Harnstoff erzeugt wird, stellt ein Zwischenprodukt bei der Herstellung von Aminoplasten dar. Anwendungsbereiche findet Melamin als Melaminharz in der Holzwerkstoffindustrie. Dort wird es unter anderem als Leimstoff für Spanplatten oder zur Oberflächenbeschichtung eingesetzt. Weitere Anwendungen sind z.B. Melaminschaum als nichtbrennbares Dämm- und Polstermaterial, aber auch Haushaltswaren oder Textilien können Melamin enthalten. Melamin kann durch Hydrolyse zu Ammelin, Ammelid und Cyanursäure umgewandelt werden. Die Struktur von Melamin und seiner Derivate ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

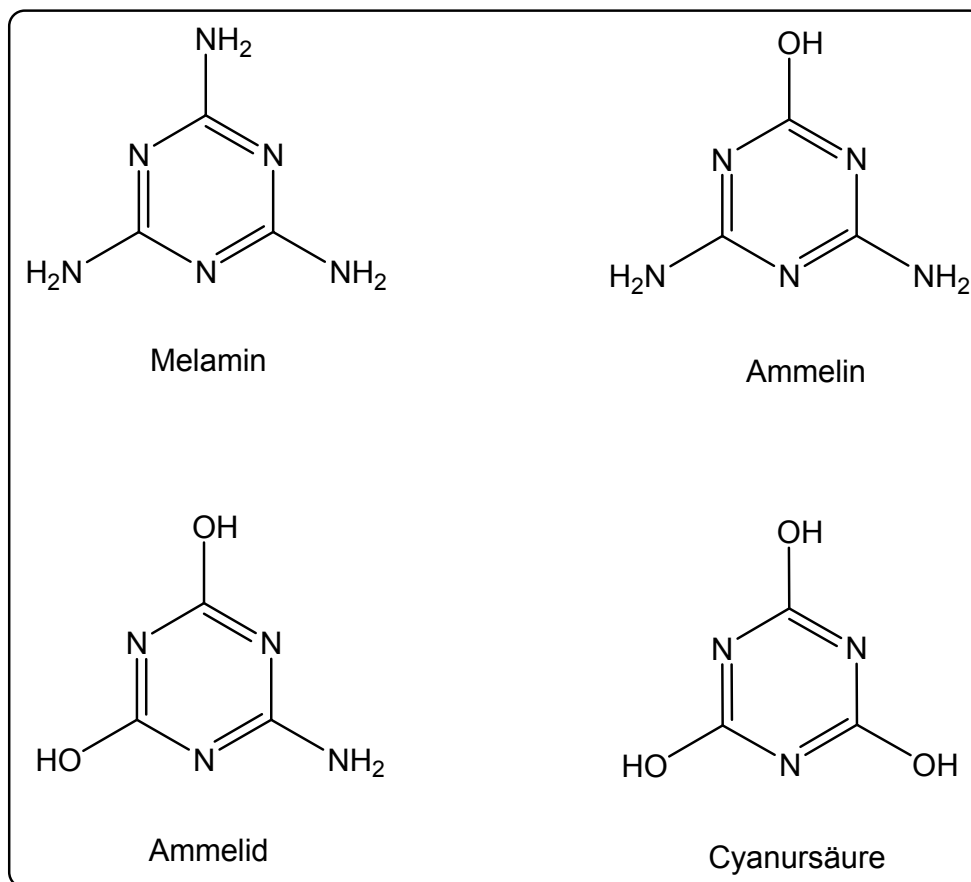


Abbildung 2.7 Struktur von Melamin und seinen Derivaten

Melamin kristallisiert als farblose, monokline Prismen und weist sowohl in Wasser als auch in organischen Lösemitteln eine geringe Löslichkeit auf [CHAPMAN *et al.* 1943]. Vor einigen Jahren wurde Melamin für den Tod von mehreren tausend Haustieren in Korea und den USA verantwortlich gemacht [BROWN *et al.* 2007]. Vor diesen Ereignissen galt Melamin eigentlich als relativ ungiftig.

Die volle Aufmerksamkeit der Weltöffentlichkeit erlangte Melamin jedoch erst 2008 durch die Verwendung von kontaminiertem Milchpulver in China. Dort wurden durch mit Melamin kontaminierte Milchprodukte mindestens 294000 Kinder gesundheitlich geschädigt, wobei 6 Kinder starben [INGELFINGER 2008]. Die Dunkelziffer dürfte aber deutlich höher liegen. Dies löste eine globale Krise aus, bei der z.B. die Europäische Union im September 2008 ein Importverbot für Milchprodukte aus China verhängte und die Vereinten Nationen einen weltweiten Alarm auslösten. Über 60 Länder reagierten, um die Ausbreitung der kontaminierten Produkte zu begrenzen [BHALLA *et al.* 2009].

Diese Krise veranlasste auch zahlreiche Forscher weltweit sich mit diesem Problem zu beschäftigen. So wurden neben vielen Analysemethoden und toxikologischen Studien auch Diskussionen über die globale Lebensmittelsicherheit geführt. Es wurde in 22 verschiedenen chinesischen Milchpulvermarken Melamin nachgewiesen, wobei 13 Chargen deutlich erhöhte Werte aufwiesen. Die höchste Melaminkonzentration in Milchpulver wurde mit 2563 ppm bestimmt [XIN und STONE 2008]. Bei solch hoher Konzentration ist eine mutwillige Fälschung wahrscheinlich. Dabei wird ausgenutzt, dass der Proteingehalt von Lebensmitteln häufig mit dem einfachen, aber unspezifischen Kjeldahl-Nachweis durchgeführt wird. Beim Kjeldahl-Verfahren wird der organische Stickstoffgehalt der Probe quantifiziert. Da Melamin, ausgehend von Molekulargewicht ~ 67% Stickstoff enthält, kann so durch Zugabe von Melamin sehr einfach der Stickstoffgehalt eines Lebens- oder Futtermittels erhöht werden und somit ein erhöhter Proteingehalt vorgetäuscht werden. Wenn z.B. 1 Liter Milch mit 1 g Melamin versetzt wird, steigt der angebliche Proteingehalt um 0,4% an [HAU *et al.* 2009]. Dadurch kann eine vorausgehende Verdünnung bzw. Streckung des Produkts vertuscht und gleichzeitig die Gewinnspanne maximiert werden. Aber nicht nur durch das mutwillige Fälschen von Lebens- und Futtermitteln kann Melamin im Produkt vorkommen.

Vielmehr ist es auch möglich, dass sich Melamin und seine Derivate durch thermische Zersetzung [REDEMANN und LUCAS 1940; DEBOWSKI und WILDE 1993], Hydrolyse [JUTZI *et al.* 1982; FENG *et al.* 1995; PICHON *et al.* 1995], Biodegradation [MYSKOW *et al.* 1983; ROOT und DAUTERMAN 1996; SANCHO *et al.* 2005; EL-SAYED *et al.* 2006] oder Photolyse [OSTROGOVICH *et al.* 1968; BEHKI und KHAN 1986; PELIZZETTI *et al.* 1990; ROOT und DAUTERMAN 1996; SANCHO *et al.* 2005] aus verschiedenen Stoffen wie Melaminharz, Dünger, Herbiziden und Insektiziden bilden kann. So kann Cyromazin, ein häufig verwendetes Insektizid, durch Photokatalyse zu Melamin umgewandelt werden [DEBOWSKI und WILDE 1993; PUSCHNER *et al.* 2007].

Eine weitere Möglichkeit, wie Melamin in ein Lebens- oder Futtermittel gelangen kann, ist die Migration aus melaminhaltigen Gegenständen, welche in direktem Kontakt mit dem Lebensmittel stehen. Dies kann sowohl bei der Herstellung als auch bei der Verarbeitung und Lagerung des Lebensmittels auftreten. Allerdings wurde die durch Migration verursachte Kontamination von der *World Health Organization* (WHO) als eher gering eingestuft [WHO 2008].

Einen zusätzlichen Weg für die Melaminkontamination von Milch zeigten kürzlich CRUYWAGEN *et al.* [2009]. Sie wiesen nach, dass Kühe, welche melaminhaltiges Tierfutter zu fressen bekamen, auch melaminhaltige Milch gaben. Dabei wurden bis zu 2% Melamin wieder mit der Milch ausgeschieden.

2.5.2 Toxizität

Die Toxizität von Melamin kann in akute und chronische Toxizität unterschieden werden. Dabei stellt die Schädigung der Niere die bekannteste Wirkung dar.

Der LD₅₀ Wert für Melamin ist mit 3,16 g/kg Körpergewicht für Ratten jedoch relativ hoch [MELNICK *et al.* 1984]. Direkter Hautkontakt von Melamin führt zu

Hautirritationen, Inhalation verursacht Irritationen der Atemwege. Die orale Aufnahme kann zu Schäden des Verdauungsystems führen [JEONG *et al.* 2006].

Bei hohen oralen Dosen kommt es zur Bildung von Nierensteinen, Crystalluria und akuten Nierenversagen [OGASAWARA *et al.* 1995]. Die häufigste chronische Nierenschädigung ist das Auftreten von Nierensteinen. Tierstudien machten deutlich, dass es durch die Aufnahme von Melamin zu einem verstärkten Auftreten von

Nierensteinen kommen kann. Die Steine bestehen aus einer Kombination von Melamin und Harnsäure oder Melamin in einer Matrix aus Protein, Harnsäure und Phosphat [OGASAWARA *et al.* 1995; WHO 2008]. Eine Analyse der Nierensteine der betroffenen Kinder in China zeigte eine Zusammensetzung der Steine aus Melamin und Harnsäure [HAU *et al.* 2009].

Anders als bei Schwermetallen findet bei Melamin in Tieren aber keine Anreicherung statt. Weitere Tierstudien ergaben, dass Melamin im Körper nicht metabolisiert und durch den Urin wieder sehr schnell ausgeschieden wird. Nach 2,7 bis 4,04 h war die Hälfte des Melamins im Körper ausgeschieden [MAST *et al.* 1983; BAYNES *et al.* 2008]. Trotz dieser eher geringen Toxizität kam es 2004 und 2007 zu massivem Haustiersterben [BROWN *et al.* 2007]. Ursache war eine erhöhte Toxizität beim gleichzeitigen Auftreten von Melamin und Cyanursäure [BURNS 2007]. Die erhöhte Toxizität liegt vermutlich an der Bildung des schwerlöslichen Melamincyanurat Komplex (M:C) in der Niere. Abbildung 2.8 zeigt die Struktur des M:C Komplexes.

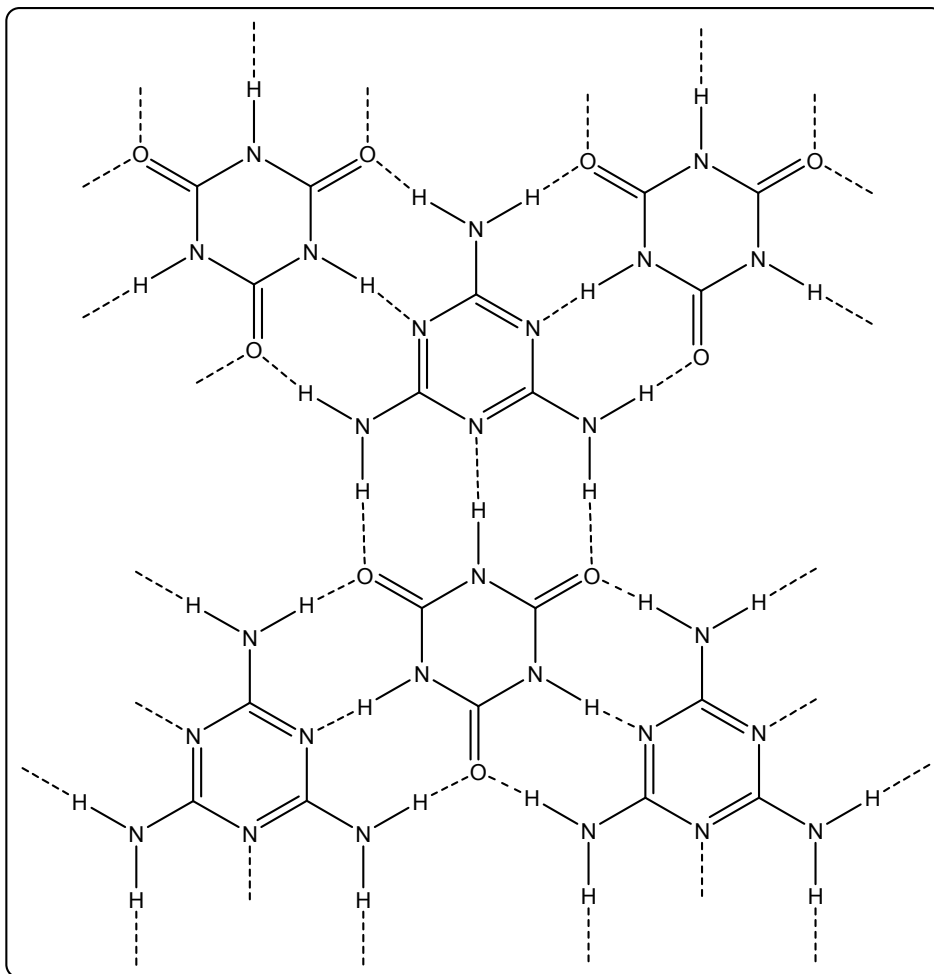


Abbildung 2.8 Struktur des Melamin-Cyanursäure Komplex

So enthielt das für das Haustiersterben verantwortliche Tierfutter eine Reihe verschiedener Triazine, unter anderem auch Melamin und Cyanursäure [BROWN *et al.* 2007; PUSCHNER *et al.* 2007; CIANCIOLO *et al.* 2008].

Eine kleine Studie an Katzen, deren Futter Melamin und/oder Cyanursäure enthielt, zeigte, dass Nierenschäden und Nierensteine nur bei der Kombination beider Stoffe auftraten [PUSCHNER *et al.* 2007].

Diese Ergebnisse wurden von DOBSON *et al.* [2008] bestätigt. Sie verwendeten Ratten und gaben den Tieren Melamin und seine Derivate alleine und in Kombination zu fressen. Die Mischungen verursachten signifikante Nierenschäden und Nierensteine. Analysen bestätigten die Anwesenheit von Melamin und Cyanursäure in der Niere. Die Nierensteine der Tiere bestanden aus M:C Kristallen.

Da M:C eine sehr geringe Löslichkeit aufweist, wird vermutet, dass dies zur Bildung der Kristalle in der Niere führt. Allerdings ist noch unklar, warum sich die Kristalle in den Nierenkanälchen bilden und so zu einer schrittweisen Blockade und Degeneration führen [DOBSON *et al.* 2008]. Die Bildung der Nierensteine aus Melamin und Cyanursäure wurden auch in Schweinen und Fischen nachgewiesen [REIMSCHUESSEL *et al.* 2008].

Noch ist unklar, warum die Proben neben Melamin auch Cyanursäure enthielten. Möglich ist eine Verunreinigung des Melamin durch Cyanursäure, welches als Nebenprodukt bei der Herstellung entsteht [WHO 2008]. Aber auch verschiedene Mikroorganismen können Melamin zu seinen Derivaten umwandeln, und dadurch die toxische Wirkung erhöhen [FENG *et al.* 1995]. Dabei hängt die Toxizität von der Größe der Tiere ab. Katzen waren stärker betroffen als Hunde und kleine Hunde stärker als große Hunde [DOBSON *et al.* 2008; REIMSCHUESSEL *et al.* 2008]. Zudem zeigten die Studien, dass männliche Tiere stärker als weibliche Tiere betroffen waren. Aufgrund dieser Daten wurden von den verschiedenen Behörden unterschiedliche Grenzwerte ermittelt. Der *no observed effect level* (NOEL) von Melamin in Nagetieren beträgt 63 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Da der *tolerable daily intake* (TDI) normalerweise 1% des NOEL beträgt ergibt sich daher ein TDI von 0,63 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Dieser Wert wird auch von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) angegeben [FDA 2008a, b]. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hält eine tägliche Aufnahme für Melamin und seine Strukturanaloga von <0,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag für unbedenklich [EFSA

2008a]. Nachdem kleine Kinder unter 3 Jahren jedoch empfindlicher auf Melamin reagierten, wurde ein zusätzlicher Sicherheitsfaktor für kleine Kinder eingeführt. Der TDI wurde vom *Centre of Food Safety* Hongkong auf 0,32 mg/kg Körpergewicht pro Tag reduziert [CENTRE FOR FOOD SAFETY und HONG KONG SPECIAL ADMINISTRATIVE REGION 2008; HAU *et al.* 2009].

Die EFSA und die amerikanische FDA beschlossen, dass der Melamingehalt in Lebensmitteln, die nicht für Babys und Kleinkinder bestimmt sind, 2,5 mg/kg (2,5 ppm) nicht überschreiten darf. Bei Produkten für Säuglinge und Kinder beträgt der Grenzwert 1 ppm. Hongkong und China bestimmten dieselben Grenzwerte für Melamin in Babynahrung und anderen Lebensmittel.

Ausgehend von NOEL der EFSA bedeutet dies für einen 70 kg schweren Menschen eine maximale tägliche Aufnahme von 35 mg Melamin ohne negative Folgen. Bei einem Grenzwert von 2,5 mg/kg müsste folglich ein Verzehr von 14 kg kontaminierten Lebensmitteln oder von 17,5 Litern Milch erfolgen, um die tägliche noch akzeptierte Menge an Melamin zu erreichen [EFSA 2008b; FDA 2008b, a].

Ob eine krebserzeugende Wirkung von Melamin beim Menschen vorliegt, ist noch nicht ausreichend untersucht. Aufgrund unzureichender Daten stuft deshalb die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) Melamin in die dritte Kategorie der krebserzeugenden Stoffe ein [IARC 1986; BfR 2008a]. Diese Kategorie steht für eine mögliche krebserzeugende Wirkung, allerdings reichen die Daten nicht für eine eindeutige Einteilung in Kategorie 1 oder 2 aus.

2.5.3 Analytik

Wegen dieser globalen Lebensmittelkrise wurden zahlreiche Methoden für die Analytik von Melamin und seiner verwandten Stoffe entwickelt. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Probenmaterials ist immer eine mehr oder weniger aufwendige Probenvorbereitung notwendig. Dabei wird häufig nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine Reinigung der Probe mit Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) oder Festphasen Extraktion (SPE) durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Bestimmung von Melamin verwendet als Probenmaterial Milch und

Milchpulver. Daher wird die Analytik von Melamin in Milchpulver und Milch separat weiter unten aufgeführt.

Die Mehrzahl der vorgestellten Methoden basieren auf LC-Systemen. Aber auch andere Techniken wie Gaschromatographie (GC), Kapillarzonenelektrophorese (CE) oder neuere Entwicklungen wie *Surface-enhanced* Ramanspektroskopie (SERS), *Desorption Electrospray-Ionization* (DESI), *Direct Analysis in Real Time* (DART), *Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (DAPCI) und *Extractive Electrospray-Ionization* (EESI) können verwendet werden. Außerdem sind auch Immuno-Assays zum Nachweis von Melamin entwickelt worden.

Die auf LC-Systemen basierenden Methoden verwenden unterschiedliche Säulenmaterialien und Detektoren. Dabei wurde meist ein UV- oder Massenspektrometer als Detektor eingesetzt. So analysierten [YANG *et al.* 2008] mithilfe einer C8 Säule Melamin in Weizenkleber. Die Nachweisgrenze mittels UV-Detektion lag bei 65 mg/L. Aber auch C18 Säulen kombiniert mit UV-Detektion wurden verwendet. Dabei lag die Nachweisgrenze bei 0,5 mg/kg [GONG *et al.* 2008]. Eine einfache LC-Methode mit *Dioden-Array-Detektor* (DAD) wurde zur Analyse von Melamin und seinen Derivaten in Getreideflocken entwickelt [EHLING *et al.* 2007]. Die Bestimmungsgrenze lag für Melamin, Ammelin und Ammelid bei ~ 5 mg/kg, für Cyanursäure bei ~ 90 mg/kg.

Eine weitere LC-Methode zur Bestimmung der vier Analyten wurde von [MUNIZ-VALENCIA *et al.* 2008] vorgestellt. Sie benutzten eine Luna-CN-Säule und verwendeten ebenfalls einen DAD und konnten so Melamin und seine Derivate in Reisproteinkonzentraten bestimmen. Auch die Kationenaustausch-Chromatographie kann zur Analyse von Melamin und seinen Derivaten benutzt werden [ONO *et al.* 1998].

Bei Verwendung eines UV-Detektors sind eine besondere Probenvorbereitung und eine gute chromatographische Trennung notwendig. Da die UV-Spektren der Analyten im Bereich 220 - 250 nm aufgenommen werden, kann dies zu Schwierigkeiten bei der Quantifizierung aufgrund von Matrixeffekten führen. Diesen Nachteil besitzen LC-MS basierte Methoden nicht, weil hier bei Verwendung von MS/MS eine hohe Selektivität gewährleistet wird [DESMARCHELIER *et al.* 2009]. Zudem

erreichen auf MS basierte Methoden meist eine bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenze. FILIGENZI *et al.* [2007] verwendeten LC-ESI/MS/MS zur Analyse von Melamin in Schweinefleisch. Die Trennung fand an einer Phenyl-Säule statt und es wurde eine berechnete Nachweisgrenze von 1,7 ng/g erreicht.

Für die gleichzeitige Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in nur einem LC Lauf war die Verwendung einer hydrophilen Interaktionschromatographie Säule (HILIC) sehr hilfreich. Die Verwendung von zwitterionischen HILIC Säulen ermöglichte eine Analyse polarer Substanzen auf Normalphasen-LC mit einer mobilen Phase, die normalerweise für unpolare Analysen verwendet wird [HEMSTROM und IRGUM 2006]. Je nach mobiler Phase kann die Säule in RP-, HILIC- oder Ionenaustausch-Modus verwendet werden. Die HILIC Säule war anderen Säulenmaterialien bei der Analytik von Cyanursäure überlegen [HELLER und NOCHETTO 2008]. Die entwickelte LC-MS/MS Methode ermöglichte so die gleichzeitige Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Tierfutter. Die Bestimmungsgrenze lag jeweils bei 0,5 µg/g [HELLER und NOCHETTO 2008]. Eine weitere LC-ESI/MS/MS Methode unter Verwendung einer HILIC Säule zur Analyse von Melamin wurde von ANDERSEN *et al.* [2008] vorgestellt. So war es möglich, Melamin mit einer Quantifizierungsgrenze von 10 ng/g in Wels nachzuweisen. Für die Bestimmung von Cyanursäure in Wels wurde eine weitere Methode vorgestellt [KARBIWNYK *et al.* 2009]. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag mit 7,4 µg/g aber deutlich höher als für Melamin. Auch die Hersteller von Massenspektrometern entwickelten Nachweismethoden für die Bestimmung von Melamin und seiner Derivaten, welche allesamt auf LC-MS/MS Methoden beruhen [WANG *et al.* 2007; SEQUANT 2008; TAYLOR *et al.* 2008; VARELIS *et al.* 2008; BRUKER 2009]. Um die störenden Einflüsse der Probenmatrix bei der Ionisierung des Analyten zu minimieren, wurde isotopenmarkiertes Melamin und Cyanursäure als interner Standard verwendet [VARELIS und JESKELIS 2008]. Die Nachweisgrenze dieser LC-MS basierten Methode lag für Melamin und Cyanursäure bei 10 µg/kg.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse von Melamin stellt die Kapillarzonen-elektrophorese (CE) dar. Die Vorteile der CE gegenüber der LC liegen bei geringerem Lösungsmittelverbrauch, geringerem benötigten Probenvolumina, guter Sensitivität und hoher Trennleistung [VON BROCKE *et al.* 2001]. So wurden verschiedene Methoden zur Analyse von Melamin mittels CE-MS vorgestellt [NIELEN

und VAN DE VEN 1996; COOK *et al.* 2005]. Eine weitere CE-MS Methode stellten VO *et al.* [2008] vor. Sie verwendeten eine Ionenfallen-MS oder eine q-TOF-MS zur Analyse von Melamin-Formaldehyd Kondensaten.

CAMPBELL *et al.* [2007] verwendeten MALDI-MS mit Sinapinsäure oder CHCA zur Identifizierung von Melamin und seinen Derivaten. Allerdings war hier keine Quantifizierung möglich und es wurden lediglich hochkonzentrierte Standardlösungen (10 µg/ml) gemessen. MALDI-MS wurde aber auch für die Untersuchung von Melamincyanurat in Harn und Harnsteinen verwendet [TANG *et al.* 2009]. Dabei konnten Harnsteine von Patienten auf Ihren Melamingehalt hin analysiert werden. Die Vorteile liegen in einer einfachen Probenvorbereitung und einem hohen Probendurchsatz.

Auch GC-MS Methoden wurden zur Analyse von Melamin entwickelt. Bei Verwendung von GC müssen die Analyten vorher allerdings derivatisiert werden. Die von der FDA entwickelte GC-MS/MS Methode hat eine Bestimmungsgrenze von 10 µg/g. Damit war möglich, Melamin und seine Derivate in proteinhaltigen Proben, Haustierfutter und Tierfuttermittel gleichzeitig zu bestimmen [LITZAU *et al.* 2008]. TOTH und BARDALAYE [1987] verwendeten Kapillar-GC-MS, um Cyromazin und seinen Metaboliten Melamin zu detektieren.

Ein neuer Ansatz für die Analytik von Melamin und Cyanursäure stellt die Verwendung von SERS dar. Die Nachweisgrenze dieser Methode für Melamin beträgt 33 ng/ml. Dabei ist diese Methode geeignet, sehr schnell den Melamingehalt in einer flüssigen Probe zu bestimmen [LIN *et al.* 2008].

Eine andere Möglichkeit zum schnellen Screening von Melaminproben stellen kommerziell erhältliche Immuno-Assay wie z.B. *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA)- oder *Enzyme-linked Immunoassay* (ELA) Kits dar. Beim ELISA Kit wird das Melamin in den Proben zusammen mit Melamin-HRP-Konjugat an den Melamin Antikörper gebunden. Durch Waschen wird ungebundenes Melamin und Melamin-HRP-Konjugat entfernt. Nach Zugabe eines passenden klaren Substrats wird jedes gebundene Enzyme-Konjugat blau gefärbt. Anhand der Färbung kann nun die Melaminkonzentration bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen immunologischer Verfahren liegen zwischen 9 und 20 ng/ml [GARBER 2008; KIM *et al.* 2008].

Analytik von Melamin in Milchpulver und Milch

Auch hier wurden etliche Methoden mit unterschiedlicher Probenvorbereitung und verschiedenen Analysetechniken vorgestellt, wobei erneut die LC die größte Anwendung findet. So konnte mittels LC-Trennung mit anschließender UV-Detektion Melamin in Milchprodukten nachgewiesen werden. Das errechnete Detektionslimit für Standardlösungen lag bei 15 ng/ml [DIONEX 2009]. Eine weitere LC-DAD Methode mit einer Bestimmungsgrenze von 1 mg/kg in Milchpulver wurde von HE *et al.* [2008] vorgestellt. Auch die CE wurde zusammen mit einer UV-Detektion zur Analyse von Melamin in Milchpulver eingesetzt. Die Bestimmungsgrenze lag dabei bei 0,5 mg/kg. Durch Verwendung eines ESI-q-TOF-MS Gerätes konnte die Bestimmungsgrenze auf 0,25 mg/kg gesenkt werden [KLAMPFL *et al.* 2009].

Die FDA veröffentlichte 2008 eine auf LC-MS/MS basierende Methode zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Milchpulver. Durch Verwendung einer HILIC-Säule in Kombination mit ESI-MS/MS wurde für beide Analyten eine Bestimmungsgrenze von 0,25 µg/g erzielt. [SMOKER und KRYNITSKY 2008; TURNIPSEED *et al.* 2008]. DESMARCHELIER *et al.* [2009] verwendeten ebenfalls eine HILIC-Säule in Ihrem LC-ESI-MS/MS-System und erzielten Bestimmungsgrenzen von 0,05 und 0,1 mg/kg für Melamin und Cyanursäure in Milch und Milchpulver. Weitere LC-MS Methoden zur Bestimmung von Melamin in Milch und Milchpulver wurden von YAN *et al.* [2008] und QINGQING *et al.* [2009] vorgestellt. Aber auch eine Ionenpaar-LC-ESI-MS/MS Methode ist zur Analyse von Melamin in Milchprodukten geeignet. IBANEZ *et al.* [2009] verwendeten *Tridecafluoroheptanoic-acid* (THFA) als Ionenpaarreagenz für Melamin und erzielten damit Nachweisgrenzen von 0,01 bis 0,1 mg/kg.

Schließlich wurden auch noch von Geräteherstellern Methoden zur Quantifizierung von Melamin in Milchprodukten vorgestellt [MI *et al.* 2008; SHIA und DIEHL 2008]. Aber auch neuere Ionisationsmethoden können für die Melaminanalytik verwendet werden. HUANG *et al.* [2009] stellte eine schnelle Methode zur Bestimmung von Melamin in Milchpulver und Milch vor. Sie verwendeten eine Ionisation durch *low-temperature plasma* verbunden mit einem Tandem-Massenspektrometer. Dadurch wurde eine Nachweisgrenze von 6 ng/g für Milchpulver und 15 ng/ml für Milch

erreicht. YANG *et al.* [2009] verwendeten DAPCI und DESI für die Detektion von Melamin in Milchprodukten. Für diese schnellen Screeningmethoden war keine Probenvorbereitung notwendig. Die Nachweisgrenze in Milchpulver betrug $1,6 \cdot 10^{-11}$ g/mm² (entspricht ~ 0,1 ppm). Auch weitere neue Ionisationmethoden wie die Ultraschall-unterstützte EESI und DART-MS können als Screeningmethoden zur Detektion von Melamin verwendet werden [VAIL *et al.* 2007; ZHU *et al.* 2009]. Diese neuen und schnellen Techniken ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, da keine oder nur geringe Probenvorbereitung notwendig ist. Es ist jedoch noch keine valide Quantifizierung möglich.

2.6 Energy Drinks

2.6.1 Allgemeines

In den letzten Jahren ist die Popularität der sogenannten „*Energy Drinks*“ stetig gestiegen. Vor allem junge Menschen, wie Schüler und Studenten sowie aktive Personen konsumieren diese Getränkeart, die laut Hersteller eine belebende und leistungssteigernde Eigenschaft besitzt. Dabei wurden 2004 über 2,4 Millionen Liter konsumiert, was einen Anstieg des Verbrauchs um 17% bedeutet [ARANDA und MORLOCK 2006]. Seit "Red Bull" als Pionier unter den *Energy Drinks* 1994 den deutschen Markt durch geschicktes Marketing eroberte, werden immer neue Produkte mit immer kuriosesten Namen entwickelt. Die Zusammensetzung dieser Getränke beruht meist auf wasserlöslichen Vitaminen, Kohlenhydraten, Taurin und Koffein. Neben diesen Inhaltsstoffen enthalten die *Energy Drinks* noch Farbstoffe, Aromen und Säureregulatoren. Dabei schwanken die Gehalte der einzelnen Inhaltsstoffe von Produkt zu Produkt leicht.

Das zugesetzte Koffein ist für seine stimulierende Wirkung auf das zentrale Nervensystem (CNS) bekannt und gilt als die weltweit am häufigsten konsumierte pharmakologisch aktive Substanz. Der Gehalt der in Deutschland verfügbaren *Energy Drinks* entspricht mit ~20-35 mg/100 ml ungefähr einem Filterkaffee, liegt allerdings höher als der Koffeingehalt von Cola-Getränken (~10 mg/100 ml) [BALTES 2007]. Der Inhaltsstoff Taurin ist an einer Reihe physiologischer Prozesse wie der Bildung von Gallensäurenkonjugaten, der Beeinflussung der Signalübertragung und bei der Entwicklung des Zentralnervensystems und der Herzfunktion beteiligt. Jedoch kann der Körper Taurin aus Cystein selbst herstellen, was eine Zufuhr durch Lebensmittel nicht notwendig macht. Die in *Energy Drinks* enthaltenen Vitamine dienen als Co-Enzyme im Körper und der verwendete Zucker ist Energielieferant und für den süßen Geschmack verantwortlich.

Mehrere Studien über den Effekt von *Energy Drinks* auf das CNS zeigten eine Verbesserung von z.B. Reaktionszeit, Konzentrationsfähigkeit und Gedächtnis [SEIDL *et al.* 2000; ALFORD *et al.* 2001; RAO *et al.* 2005]. Aber auch eine Verminderung von Schläfrigkeit und durch Schlaf verursachte Verkehrsunfälle wurde festgestellt

[REYNER und HORNE 2002]. BICHLER *et al.* [2006] zeigten, dass die Kombination von Koffein und Taurin keinen Effekt auf das Kurzzeitgedächtnis hat, jedoch Änderungen in Herzfrequenz und Blutdruck verursacht. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) rät Kindern, Schwangeren, Stillenden, Personen mit Herz- oder Blutdruckproblemen sowie Koffein-empfindlichen Personen vom Konsum von *Energy Drinks*, insbesondere in größeren Mengen ab. Außerdem können unerwünschte Wirkungen (Herzrhythmusstörungen, Krampfanfälle, Nierenversagen) im Zusammenhang mit ausgiebiger sportlicher Betätigung oder mit dem Genuss von alkoholischen Getränken auftreten [BfR 2008b].

2.6.2 Analytik

Es wurden zahlreiche Methoden zur Analytik der B-Vitamine aus unterschiedlichen Matrices entwickelt. Dabei wird meist eine LC-Methode mit UV/VIS-, [MARKOPOULOU *et al.* 2002; WOOLLARD und INDYK 2002; CHATZIMICHALAKIS *et al.* 2004; EKINCI und KADAKAL 2005; HEUDI *et al.* 2005], Fluoreszenz- [PRESOTO *et al.* 2004; GATTI und GIOIA 2005], Massenspektrometrie- [CHEN und LING 2002; MIDTTUN *et al.* 2005] oder FTIR-Detektion [LI und BROWN 2003] verwendet.

Die Koffeinbestimmung wird auch hauptsächlich mittels LC durchgeführt. Hier werden ebenso meist UV/VIS- [BISPO *et al.* 2002; THOMAS *et al.* 2004; ARESTA *et al.* 2005; PENA *et al.* 2005] oder Massenspektrometrie-Detektoren [ZHU *et al.* 2004; MARCHEI *et al.* 2005] verwendet. Aber auch Dünnschichtchromatographie (DC) kann zur Analyse von Vitaminen oder Coffein verwendet werden [ABOURASHED und MOSSA 2004; PONDER *et al.* 2004].

Eine DC-Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Inhaltsstoffen in *Energy Drinks* wurden von ARANDA und MORLOCK [2006] vorgestellt. Dabei wurden Nicotinamid und Coffein mittels UV-Absorption, Riboflavin und Pyridoxin mittels Fluoreszenz sowie Taurin nach Derivatisierung mittels VIS-Absorption bestimmt. Die Methode ermöglicht einen höheren Probendurchsatz als die LC, da mehrere Proben gleichzeitig analysiert werden können. Allerdings sind verschiedene Detektionsmethoden und sogar eine Derivatisierung notwendig. Zudem werden DC-Methoden meist nur zur Identifizierung und nicht zur Quantifizierung eingesetzt.

Auch MALDI-MS kann zur Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen verwendet werden. CHEN und LING [2002] untersuchten 17 verschiedene Porphyrin Matrizes auf ihre Verwendbarkeit zur Detektion von wasserlöslichen Vitaminen. Dabei konnten die meisten Matrizes für die Identifizierung in Standardlösungen verwendet werden. Eine Quantifizierung wurde allerdings nicht durchgeführt.

Eine auf MALDI-MS basierende Methode zur Quantifizierung von Vitaminen und Coffein in *Energy Drinks* wurde kürzlich vorgestellt [GRANT und HELLEUR 2008]. Dabei wurde das Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Matrix-Ionensuppressor zusammen mit CHCA als MALDI-Matrix eingesetzt. Das Tensids im Verhältnis 1:500 zur Matrix verminderte Matrixsignale und verbesserte zudem die Linearität und Reproduzierbarkeit. Trotz der Verbesserung durch das verwendete Tensid lag die Linearität R^2 nur zwischen 0,983 und 0,991. Die relative Standardabweichung lag zwischen 9,7 und 18,1%. Da jedoch nur 25 Laserschüsse manuell aufsummiert wurden ist die Angabe der Reproduzierbarkeit der Methode kritisch zu beurteilen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vorbemerkung

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines allgemeinen Protokolls für die Messung kleiner Moleküle (< 800 Da) mittels MALDI-TOF-MS. Aus denen in Abschnitt 2.3 ausführlich erläuterten Problemen findet MALDI bei der Analytik kleiner Moleküle trotz zahlreicher Bemühungen kaum Anwendung. Es wurde auf die Problematik der Messung kleiner Moleküle mittels MALDI eingegangen und versucht diese zu lösen.

Gleichzeitig wurde eine Optimierung für die Messung im kleinen Massenbereich durchgeführt. Dabei wurde untersucht, inwieweit bestehende Protokolle, wie z.B. Probenpräparation, Einsatz verschiedener Matrices und Detergenzien für die Messung im niedrigen Massenbereich geeignet sind.

Nach der Entwicklung einer optimierten Methode wurde diese für den zweiten Teil der Arbeit verwendet. Dieser umfangreiche Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Validierung einer allgemeinen Quantifizierungsmethode für kleine Moleküle mittels MALDI-TOF-MS. Dabei wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Analyten in verschiedenen Probenmatrices verwendet. Ein weiteres Ziel war dabei, eine Verbesserung gegenüber bestehenden Methoden aus der Literatur zu erreichen. Um den MALDI Vorteil der schnellen Analytik zu erhalten, wurde die Probenaufarbeitung so einfach wie möglich durchgeführt und gleichzeitig auf den Einsatz der LC verzichtet.

3.2 Einsatz verschiedener Matrices und Präparationstechniken

Zur Etablierung einer Standardmethodik für kleine Moleküle war es notwendig, zuerst eine geeignete Matrix mit einer geeigneten Probenpräparation zu finden. Also wurde ausgehend von den Proteomics-Methoden versucht, eine Optimierung durchzuführen. Als Modelanalyten dienten die drei pharmazeutischen Substanzen Prazosin ($M+H^+$: 384 Da), Levomepromazin ($M+H^+$: 329 Da) und Lidocain ($M+H^+$: 235 Da). Die Analyten ionisieren mit MALDI relativ gut, fragmentieren nicht und besitzen eine niedrige, mittlere und höhere Molekülmasse. So wird ein relativ breites Massenfenster abgedeckt. Zudem weisen sie keine besondere Toxizität auf. Die Struktur der drei Analyten ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

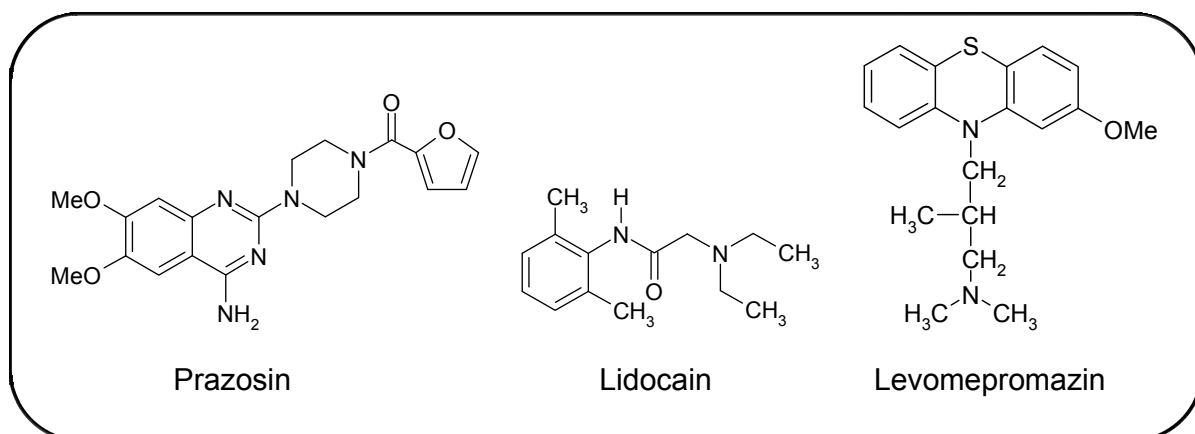


Abbildung 3.1 Struktur von Prazosin, Lidocain und Levomepromazin

3.2.1 Dried Droplet Präparation

Die *Dried Droplet* Präparation (DDP) stellt eine sehr häufig verwendete Präparation für MALDI-MS dar. Dabei wird die Probe mit der Matrix gemischt und nach dem Trocknen gemessen. Begonnen wurde mit einer Standardpräparation für den Proteomics Bereich. Dazu wurden die verschiedenen Matrices in 33% ACN + 0,1% TFA gelöst und mittels DDP gespottet.

Anders als von BEAVIS und CHAIT [1990] berichtet, gab es keinen messbaren Unterschied, ob die Matrix mit der Probe vor dem Auftragen, oder erst auf dem Probensteller gemischt wurde. Aus diesem Grund wurde die Probe auch erst auf der Platte mit der Matrix gemischt, da dadurch sowohl weniger Probe- als auch weniger Matrixlösung benötigt wurde. Für die Qualität der Messung machte es auch keinen Unterschied, ob erst Matrix und dann Probe oder umgekehrt auf die Platte aufgetragen wurde. Zuerst wurden die drei am häufigsten verwendeten Matrices CHCA, SA und DHB untersucht. Dabei wird CHCA für die Verwendung von kleinen Molekülen am häufigsten in der Literatur empfohlen [COHEN und GUSEV 2002; SLENO und VOLMER 2005a; GRANT und HELLEUR 2008]. Daher wurde auch mit dieser Matrix begonnen. Abbildung 3.2 zeigt die Mischung der drei Arzneistoffe mit einer Konzentration von jeweils 10^{-7} M (100 fmol/ μ l). Die Matrix CHCA war in 33% ACN + 0,1% TFA gelöst und hatte eine Konzentration von 4,7 mg/ml. Es wurde 1 μ l Probe und 1 μ l Matrix aufgetragen und an der Luft getrocknet. Die anschließende Messung fand am Voyager STR statt.

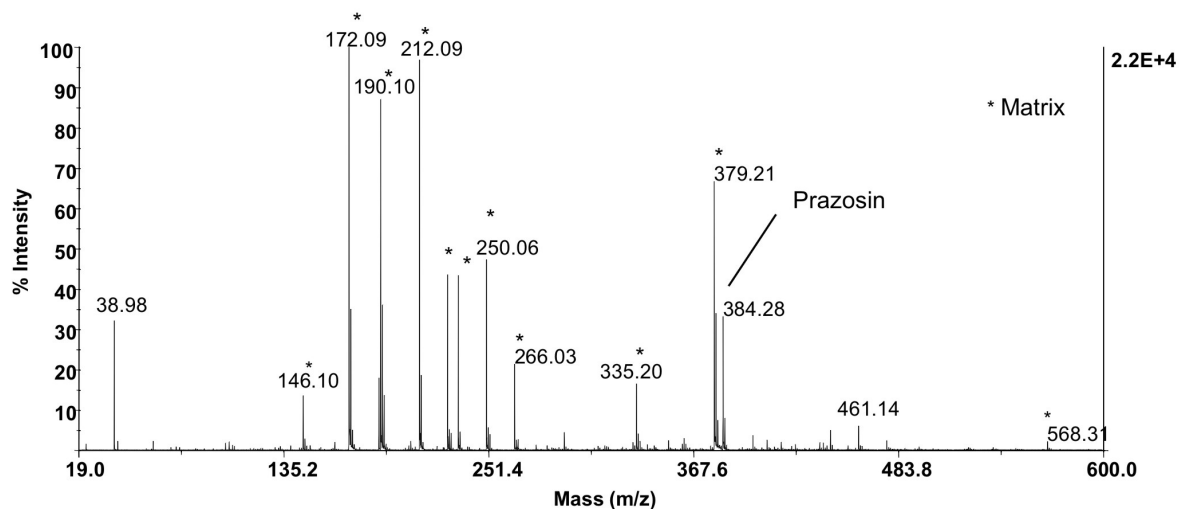


Abbildung 3.2 Spektrum einer Standard-DDP-Präparation mit CHCA

Die Probe enthält die Analyten Prazosin, Levomepromazin und Lidocain mit je 100 fmol/ μ l. Mit * markierte Signale sind Matrixsignale

Auffällig sind die sehr intensiven Matrixsignale, die im Spektrum mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über die häufigsten und intensivsten Matrixsignale von CHCA.

m/z	Matrixsignal	m/z	Matrixsignal
146	$[M-CO_2+H]^+$	250	$[M-H+Na+K]^+$
172	$[M-H_2O+H]^+$	266	$[M-H+2K]^+$
190	$[M+H]^+$	335	$[2M-CO_2+H]^+$
212	$[M+Na]^+$	361	$[2M-H_2O+H]^+$
228	$[M+K]^+$	379	$[2M+H]^+$
234	$[M-H+2Na]^+$	568	$[3M+H]^+$

Tabelle 3.1 Matrixsignale für CHCA

Neben den zahlreichen Matrixsignalen ist aber auch das Signal für den Analyten Prazosin mit einer m/z 384 deutlich erkennbar. Die anderen beiden Analyten sind zwar detektierbar, haben jedoch eine sehr geringe Intensität. Wurde die Konzentration auf 10 fmol/ μ l verringert, war bei dieser Präparation nur noch der Analyt Prazosin detektierbar.

Großen Einfluss auf die Messung kleiner Moleküle hat die Größe der Kristalle, die sich beim Trocknen der Matrix bilden. Dies kann anschaulich anhand von DHB gezeigt werden. Wird diese Matrix langsam getrocknet bilden sich größere Kristalle mit dem für DHB charakteristischen Kristallkranz am Rand des Spots. Bei der schnelleren Trocknung, z.B. unter einem Luftstrom, im Vakuum oder durch die Verwendung eines hohen organischen Lösemittelanteils verringerte sich die Trocknungszeit und damit auch die Kristallgröße. Dies ergibt eine homogenere Kristallisation mit kleinerem Kristallkranz. Die Unterschiede in der Kristallgröße bei DHB werden anhand der folgenden Photographien in Abbildung 3.3 deutlich. Dabei stellt das linke Bild eine langsam getrocknete DHB-Matrix dar, während beim rechten Bild durch die Verwendung von Vakuum eine schnell getrocknete DHB-Matrix generiert wurde.

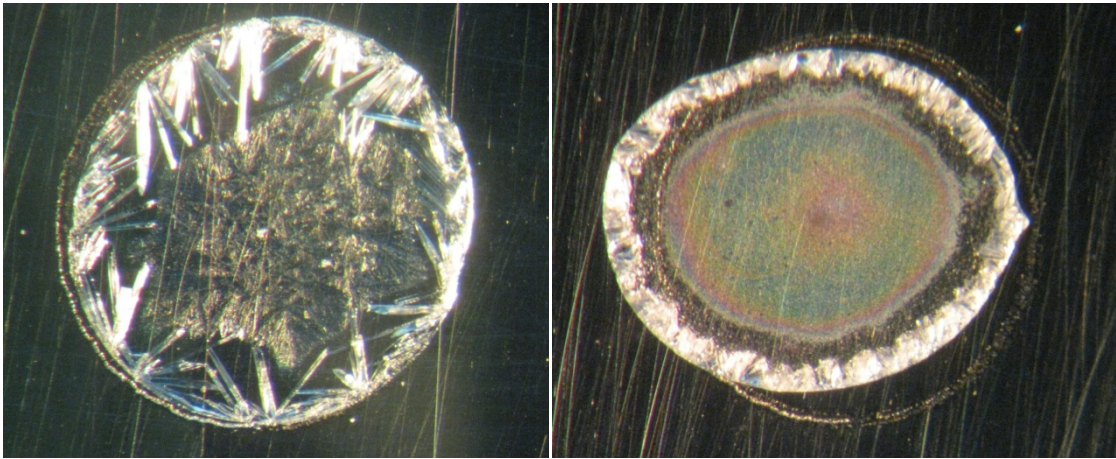


Abbildung 3.3 Fotografien DHB-Matrix

Foto links: DHB Matrix (10 mg/ml in Wasser) langsam an der Luft getrocknet. Foto rechts: DHB Matrix (10 mg/ml in Wasser) durch Vakuum schneller getrocknet.

Am Rand sind die größeren Kristalle sichtbar, während in der Mitte ein Bereich mit kleinen Kristallen vorherrscht. Dabei tritt häufig eine inhomogene Verteilung der Analyten auf [DOKTYCZ *et al.* 1991; DAI *et al.* 1996; YALCIN *et al.* 1998]. Dies stellt insbesondere für die spätere Quantifizierung ein Problem dar. Bei homogener Präparation sollte jedoch auch eine gleichmäßigere Verteilung der Analyten erfolgen. Dies ist bei kurzer Trocknungszeit und der Bildung kleinerer Kristalle meist gegeben. Gut zu erkennen ist dieser Trend auch in Abbildung 3.4 bei der Matrix CHCA. Auf dem linken Bild wurde die Matrix langsam getrocknet. Generell kristallisiert CHCA bereits bei langsamer Trocknung mit „relativ“ kleinen Kristallen aus, diese sind jedoch meist nicht homogen verteilt.

Die rechte Fotografie zeigt die gleiche Matrix, bei der die Kristallisation durch die Verwendung von 80% ACN und Trocknen durch einen Luftstrom schneller und viel homogener erfolgte.

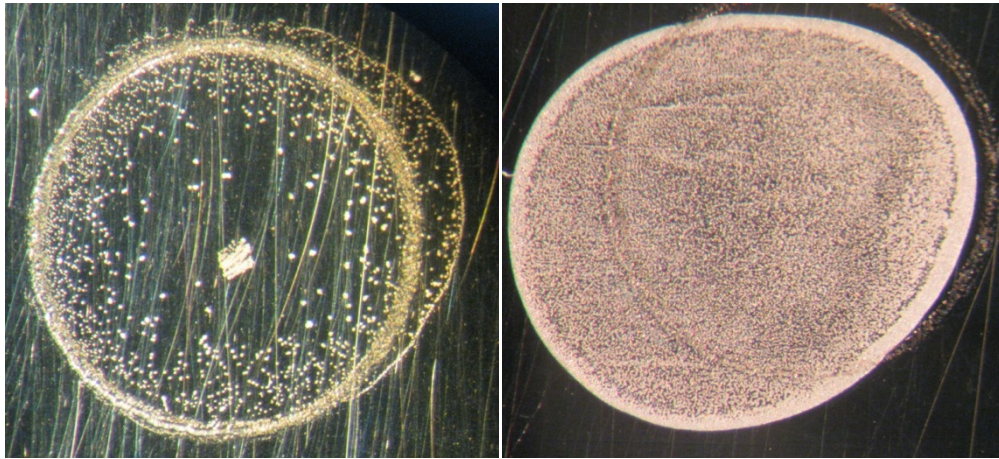


Abbildung 3.4 Fotographien CHCA-Matrix

Foto links: CHCA-Matrix (3 mg/ml in 33% ACN) langsam an der Luft getrocknet. Foto rechts: CHCA-Matrix (3 mg/ml in 80% ACN) durch Luftstrom und hohen organischen Lösungsmittelanteil schneller getrocknet.

Wie die Trocknungszeit und damit verbunden die Kristallgröße die Messung mittels MALDI-MS beeinflusst ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Der Proben spot für das obere Spektrum wurde langsam an der Luft getrocknet. Als Matrix diente DHB mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Wasser. Beim unteren Spektrum war die Matrix (10 mg/ml) in 100% Aceton gelöst. Dadurch erfolgte die Trocknung des Proben spots schneller. Die Analyten hatten eine Konzentration von je 1 pmol/ μ l und waren in 33% ACN + 0,1% TFA bzw. 100% Aceton gelöst.

Ergebnisse und Diskussion

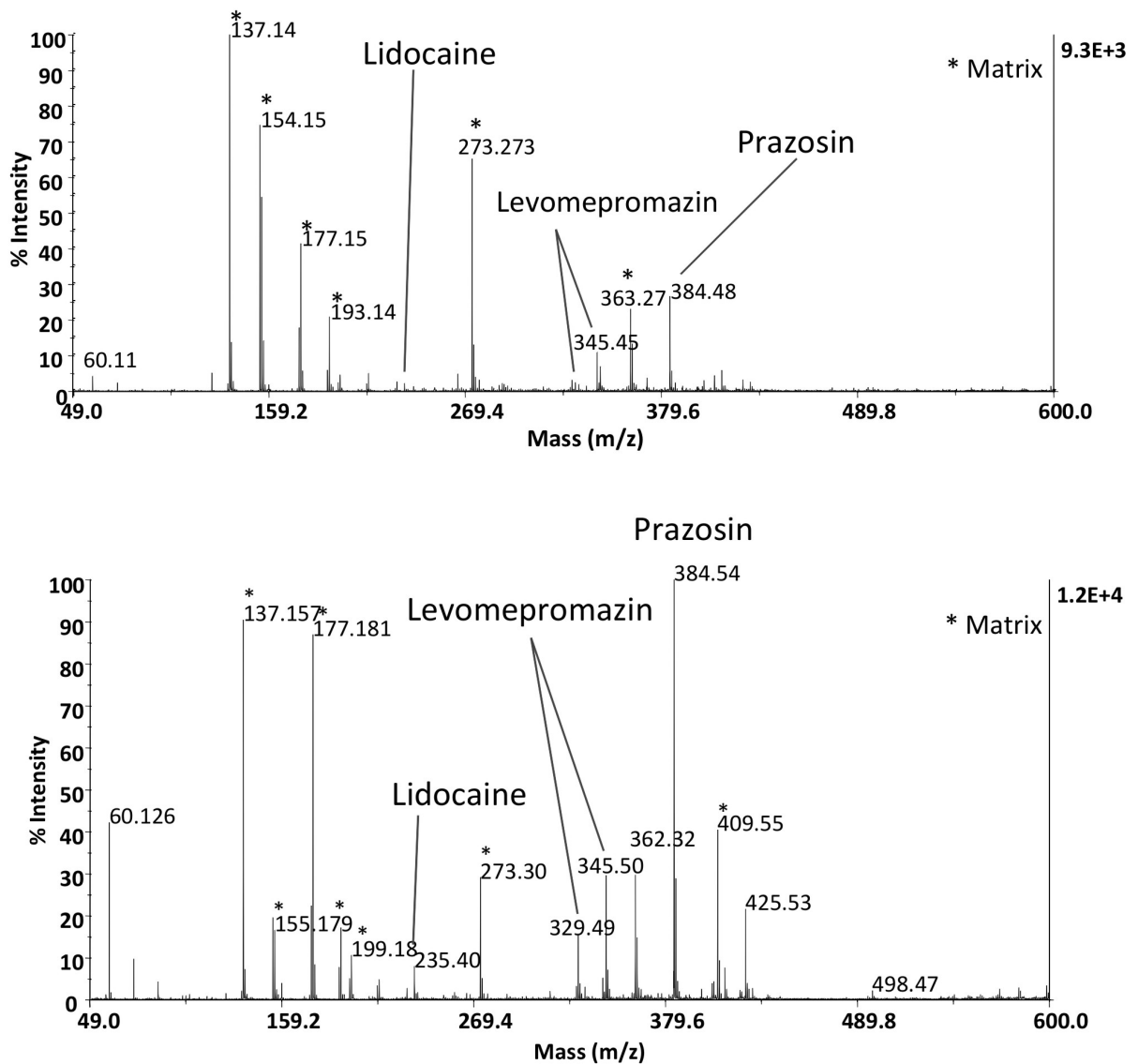


Abbildung 3.5 Spektrum von Lidocain, Levomepromazin und Prazosin mit DHB.

Der Probenspot für das obere Spektrum wurde langsam getrocknet. Beim unteren Spektrum wurde eine schnelle Trocknung der Probe durch Verwendung von 100% Aceton erreicht. Die Konzentration der Analyten betrug jeweils 1 pmol/ μ l.

Durch die schnellere Trocknung waren die gebildeten Kristalle deutlich kleiner, was im Spektrum eine höhere Intensität der Analyten bewirkte.

Der Analyt Levomepromazin ist dabei sowohl bei m/z 329 als auch m/z 345 detektierbar. Hierbei handelt es sich um eine Oxidierung am Schwefelatom, welche aufgrund der hohen Elektronendichte leicht auftreten kann [EGER *et al.* 2006]. Die Oxidierung des Levomepromazin wurde anhand der akkuraten Masse und durch MS/MS Analysen bestätigt.

Die drei getesteten Matrizes zeigten bei schneller Trocknung vergleichbare Ergebnisse für die drei Modelanalyten. Daher können die Matrizes allesamt für die Analytik kleiner Moleküle verwendet werden. Dies hat den Vorteil, dass nun problemlos auf eine andere Matrix gewechselt werden kann, wenn das Analytsignal dieselbe Masse wie ein Matrixsignal aufweist. Auch bei unbekanntem Proben ist es sinnvoll, mit mehreren Matrizes zu messen, um anschließend die gesuchten Analyten leichter identifizieren zu können. Bei sehr niedriger Analytkonzentration erzielte CHCA gegenüber den anderen beiden Matrizes etwas bessere Ergebnisse hinsichtlich der Nachweisgrenze. Allerdings ist für eine sensitive Messung die Probenpräparation viel wichtiger als die Wahl der Matrix. So zeigte sich, dass eine möglichst schnelle Trocknung und damit verbunden kleine, homogen verteilte Kristalle für die Analytik kleiner Moleküle von Vorteil ist.

Aufgrund der etwas höheren Signalintensitäten bei niedriger Konzentration und der Eigenschaft von CHCA bei schneller Trocknung kleine Kristalle homogen über den gesamten Spot zu bilden, wurde diese Matrix analog zu der Literatur als Standardmatrix für kleine Moleküle verwendet [LIDGARD und DUNCAN 1995; COHEN und GUSEV 2002; ALTERMAN *et al.* 2004; CUI *et al.* 2004; SLENO und VOLMER 2005a].

VAN KAMPEN *et al.* [2006] verwendeten eine hochmolekulare Matrix (Meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin, MW: 974 g/mol) zur Analytik eines HIV-Protease-Inhibitors. Die Matrix weist keine Signale im niedrigen Massenbereich auf. Die Verwendung dieser Matrix ergab bei den Modellanalyten jedoch nur sehr schlechte Ergebnisse, da diese nur in sehr hoher Konzentration sichtbar waren. Die Nachweisgrenze war um den Faktor 100-1000 schlechter als mit der Standardpräparation und den Standardmatrizes. Wahrscheinlich ist eine Kationisierung des Analyten, wie z.B. im Falle des HIV-Protease-Inhibitors Lopinavir

für eine sensitive Messung notwendig [VAN KAMPEN *et al.* 2006]. Da die verwendenden Arzneistoffe jedoch keine Kationen mit Alkalimetallen bilden, ist diese Matrix wohl nur für spezielle Analyten geeignet und nicht für eine allgemeine Standardanwendung verwendbar. Ein Massenspektrum der hochmolekularen Matrix mit den drei Modelanalyten ist im Anhang unter Abbildung 8.1 dargestellt.

Auch die kürzlich von JASKOLLA *et al.* [2008] vorgestellte neue Matrix 4-Chlor- α -cyanozimtsäure (Cl-CCA) wurde auf die Verwendbarkeit bei kleinen Molekülen getestet. Es zeigte sich gegenüber CHCA jedoch keine signifikante Verbesserung bei den Modellanalyten. Vielmehr wies die Matrix deutlich mehr störende Signale im niedrigen Massenbereich auf. Zudem war aufgrund der geringen Absorption bei 355 nm Wellenlänge die Messung nur bei 337 nm Laserwellenlänge am langsameren und nur schlecht automatisierbarem Voyager STR möglich. Vermutlich spielt diese neue Matrix ihre, im Proteomics-Bereich gezeigte Überlegenheit gegenüber CHCA nur bei Analyten mit geringer Basizität aus. Ein Spektrum der drei Modellanalyten mit Cl-CCA ist im Anhang unter Abbildung 8.2 dargestellt.

3.2.2 Optimierung der Probenpräparation

Nachdem CHCA als geeignete Matrix ermittelt wurde, musste nun die Standard-DDP-Methode für die Analytik kleiner Moleküle optimiert werden. Dabei wurden erneut die drei in Abbildung 3.1 gezeigten Modelanalyten verwendet. Es wurde sowohl die Matrixkonzentration als auch die Zusammensetzung des Lösungsmittels variiert.

Im Vergleich zu der Standard-DDP-Methode, bei der zwischen 3 und 5 mg CHCA pro ml verwendet wird, zeigte sich für die Analytik kleiner Moleküle eine Konzentration von 1 mg/ml als ausreichend. Je höher die Matrixkonzentration desto intensiver waren auch die Matrixsignale. Der Rückschluss, dass weniger Matrix weniger Matrixsignale bedeutet, ist jedoch nur bis zu einer bestimmten Grenze anwendbar. Bei zu niedriger Konzentration der Matrix trat keine homogene Verteilung der Kristalle über den Probenspot auf. Natürlich spielte auch die Art und Beschaffenheit der Probe eine bedeutende Rolle bei der Wahl der geeigneten Konzentration an Matrix. Deshalb ist auch nicht eine Konzentration auf alle Proben anwendbar. Im Allgemeinen ist aber gegenüber den Proteomics-Anwendungen eine Reduzierung der Matrixkonzentration hilfreich. Gute Ergebnisse für die Analytik kleiner Moleküle wurden mit einer CHCA-Konzentration zwischen 0,5 und 2 mg/ml erzielt. Eine schnelle Trocknung zeigte bessere Ergebnisse und zugleich eine homogenere Kristallverteilung. Prinzipiell kann die schnelle Trocknung auch durch Vakuumtrocknung erfolgen, allerdings ist die Verwendung eines höheren organischen Anteils im Lösungsmittel der Probe und Matrix leichter und schneller zu handhaben. Der höhere organische Anteil verringert die Trocknungszeit, allerdings sinkt auch die Oberflächenspannung der Lösung, was ein Zerfließen des Spots auf dem Probenteller bewirkt. Dies ist zu vermeiden, da dadurch die Oberfläche des Spots vergrößert wird, und zudem die Gefahr besteht, dass Proben ineinander fließen und sich mischen. Die Erhöhung des Lösemittelanteils auf 80% ACN stellte sich als optimal heraus. Hier ist mittels Luftstrom eine schnelle Trocknung möglich und gleichzeitig trat kein Zerfließen des Spots auf dem Probenteller auf. Das Lösungsmittel der Probe spielte natürlich bei der schnellen Trocknung auch eine Rolle, allerdings konnte dieser Einfluss minimiert werden. Dazu musste lediglich die

Probe zuerst aufgetragen und komplett getrocknet werden. Erst danach wurde die Matrixlösung aufgebracht und, nachdem alle Kristalle gelöst waren schnell getrocknet. Diese Vorgehensweise ist bei sehr wasserhaltigen Proben ratsam, da ansonsten eine schnelle Trocknung mittels Luftstrom nicht erzielt werden kann. Abbildung 3.6 zeigt ein Spektrum der optimierten Probenpräparation mit den drei Modelanalyten mit der Konzentration von je 100 fmol/ μ l.

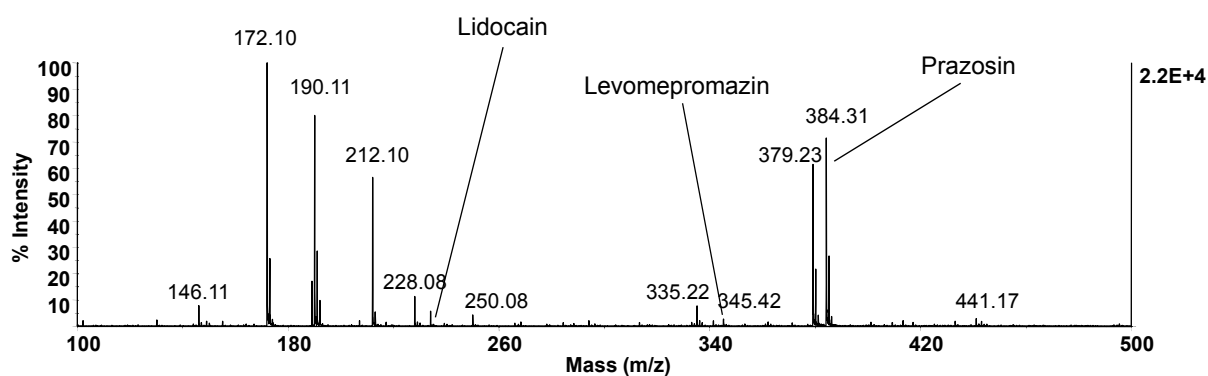


Abbildung 3.6 Spektrum der optimierten DDP-Methode

Die drei Analyten lagen jeweils mit einer Konzentration von 100 fmol/ μ l vor.

Der Analyt Prazosin ist mit einem S/N Wert von 3550 sehr deutlich erkennbar. Die beiden anderen Analyten haben ein S/N Verhältnis von 126 für Levomepromazin bzw. 50 für Lidocain.

Im Vergleich zu der Standard-Präparation (siehe Abbildung 3.2) waren deutlich weniger Matrixsignale vorhanden. Dies ist für eine Identifizierung unbekannter Analyten hilfreich, da weniger störende Signale vorhanden sind. Dabei lag der Hauptvorteil dieser optimierten Methode aber auch in einer homogenen Probenverteilung, welche geringere Standardabweichungen bei der Aufnahme von Summenspektren ermöglichte. Ein Vergleich der Standardpräparation mit der für kleine Moleküle optimierten Methode ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

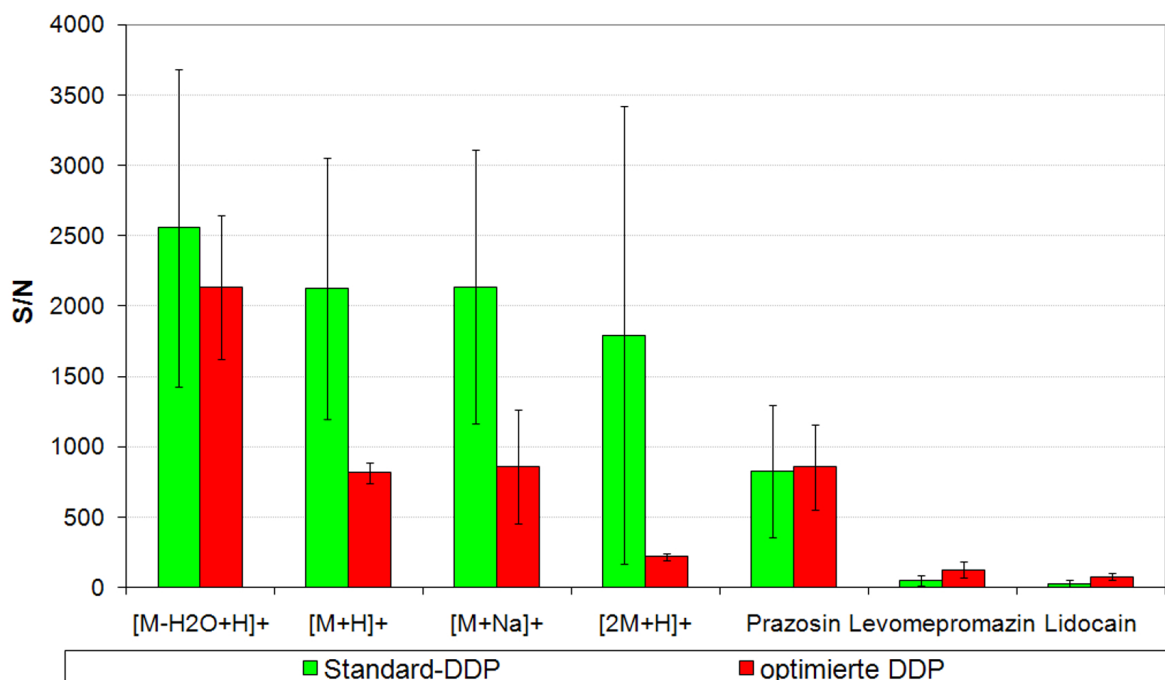


Abbildung 3.7 Vergleich DDP-Techniken mit CHCA als Matrix

Die drei Analyten hatten eine Konzentration von je 100 fmol/ μ l.

Abbildung 3.7 zeigt die S/N Werte der intensiven Matrixsignale, sowie die S/N Verhältnisse der Analyten bei Verwendung der Standard-DDP im Vergleich zu der optimierten DDP. Die Standard-DDP in 33% ACN wies deutlich höhere S/N Werte für die Matrixsignale auf (grüne Balken). Die großen Fehlerbalken dieser Dreifachbestimmung zeigen die inhomogene Probenverteilung der Standardpräparation, welche zu stark schwankenden S/N Werten führte und für eine reproduzierbare Quantifizierung ein Problem darstellte. Im Vergleich dazu wies die optimierte DDP geringere Standardabweichungen für alle Messwerte bei gleichzeitig geringeren Matrixintensitäten auf. Außerdem wiesen die Analyten Levomepromazin und Lidocain einen etwas höheren S/N Wert auf.

Aufgrund der besseren Homogenität bei gleichzeitig geringeren Matrixintensitäten, sowie der erhöhten S/N Werte für die Analyten stellt diese Methode eine Verbesserung bei der Analytik kleiner Moleküle dar. Die Handhabung ist denkbar einfach und die Messung ist aufgrund der höheren Homogenität der Spots leicht automatisierbar. Gleichzeitig sind keine speziellen Zusätze zu Matrixlösung notwendig.

3.2.3 Dünnschichtpräparation

PRESTON *et al.* [1993] verwendeten Nitrozellulose bei der Analyse verschiedener Peptide und erzielten dabei Verbesserungen bei Reproduzierbarkeit und Präzision. Bessere Spothomogenität wurde auch von VORM *et al.* [1994] mittels einer schnell getrockneten Dünnschichtpräparation erreicht. Damit waren auch noch sehr geringe Mengen Peptide messbar. Es zeigte sich, dass eine Kombination dieser beiden Methoden auch für die Analytik kleiner Moleküle geeignet ist.

Die Verwendung der Dünnschichtpräparation mit Nitrozellulose zeigte deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Nachweisgrenze, sowohl gegenüber der Standard-DDP als auch gegenüber der optimierten DDP. Dabei wurden bei der Verwendung von 1 mg CHCA und 0,5 mg Nitrozellulose (gelöst in Aceton mit 0,01% TFA) die besten Ergebnisse erzielt. Durch die Verwendung von Aceton trocknete die Matrix sehr schnell und bildete eine dünne Schicht bestehend aus Matrix und Nitrozellulose. PRESTON *et al.* [1993] zeigten, dass die Nitrozellulose das Kristallwachstum beeinflusste und gleichzeitig die Bildung von kationisierten Matrixsignalen verringerte. Der Analyt wurde auf die dünne Schicht aus Matrix und Nitrozellulose aufgetragen. Dabei ist ein hoher Anteil an Wasser zwingend notwendig. Die Probe löste etwas Matrix von der Dünnschichtpräparation, zog sich auf der hydrophoben Nitrozelluloseschicht zusammen und kristallisierte erneut aus. Dieser „Spot im Spot“ ist auf den folgenden Photographien dargestellt.

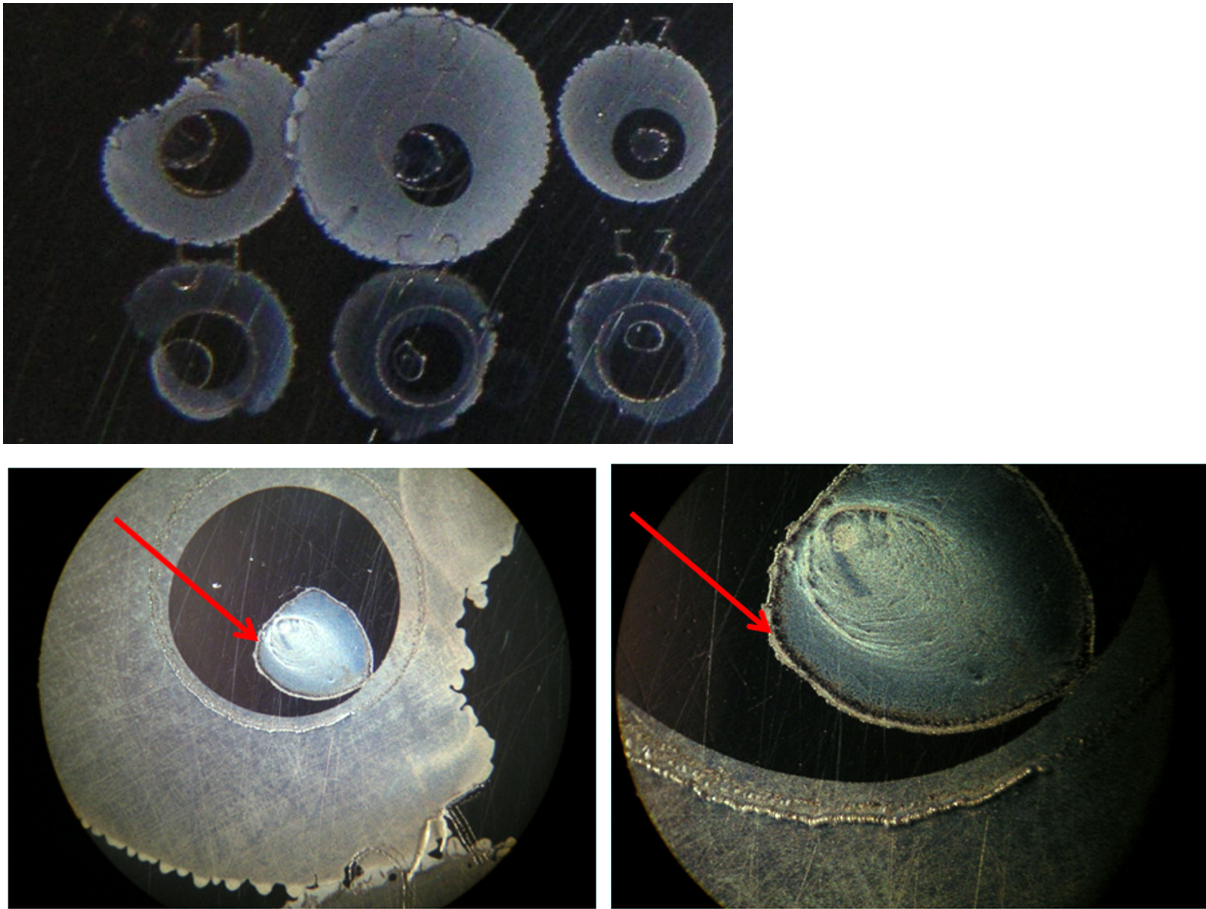


Abbildung 3.8 Fotos der TLP mit CHCA und Nitrozellulose

Die besten Messergebnisse wurden in dem äußeren Bereich des inneren Rings erzielt (durch roten Pfeil markiert). Hier bildeten sich sehr viele Kristalle in einem relativ kleinen Bereich aus. Abbildung 3.9 zeigt im oberen Spektrum die Dünnschichtpräparation mit den drei Modelanalyten. Diese hatten eine Konzentration von je 100 fmol/ μ l und waren in 10% ACN gelöst. Das untere Spektrum zeigt die drei Analyten mit derselben Konzentration mittels Standard-DDP gespottet.

Ergebnisse und Diskussion

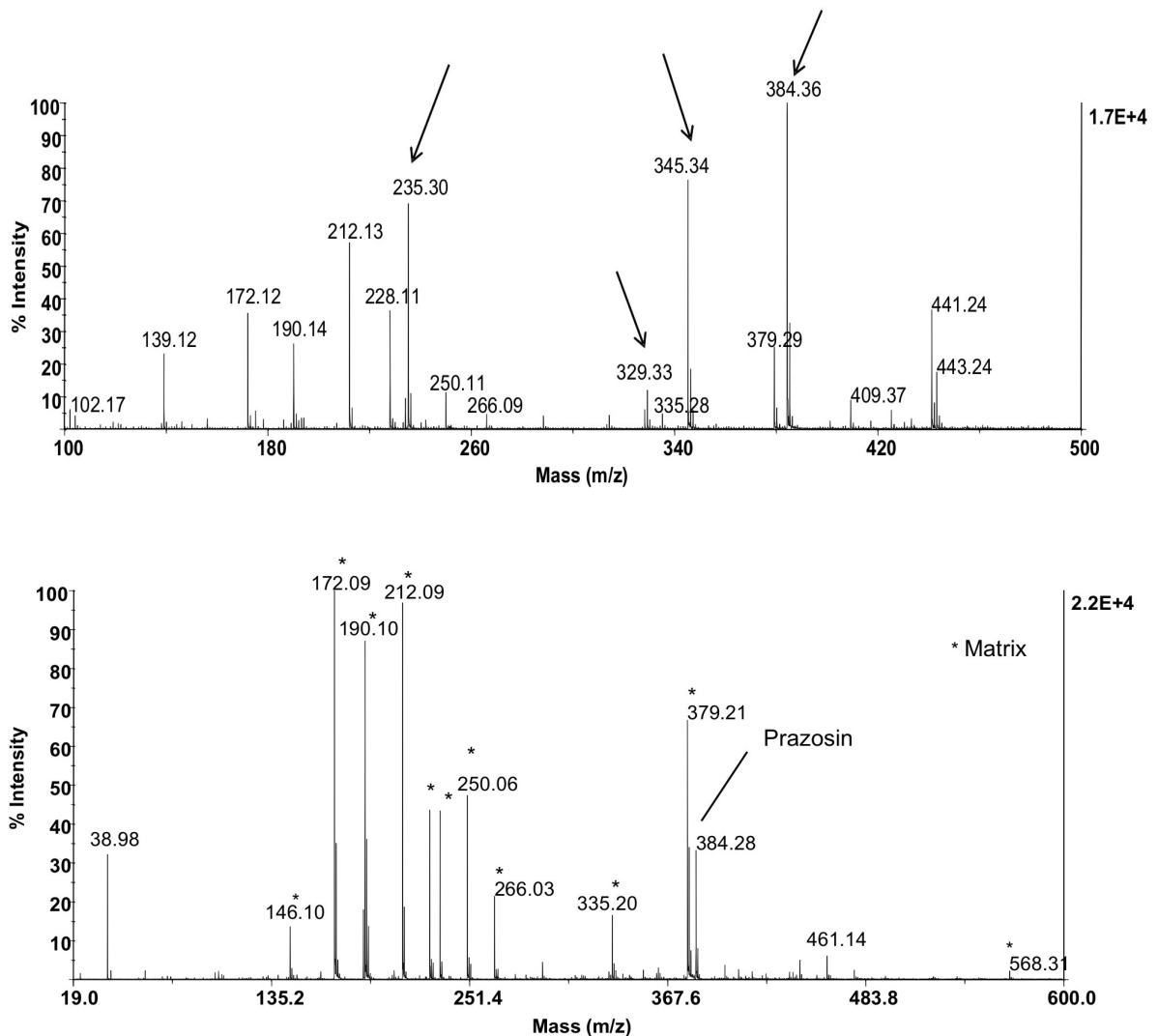


Abbildung 3.9 Spektrum der drei Analyten mittels TLP (oben) bzw. DDP (unten)

TLP mit 1 mg CHCA + 0,5 mg Nitrozellulose + 0,01% TFA in Aceton. Proben mit je 100 fmol/ μ l in 10% ACN gelöst
Zum Vergleich unten ein Spektrum mittels Standard-DDP. Die Analyten lagen auch hier mit einer Konzentration von je 100 fmol/ μ l vor.

Die Verbesserung gegenüber der Standard-DDP (unteres Spektrum Abbildung 3.9) ist deutlich sichtbar. Die Analyten stellten die intensivsten Signale dar, während gleichzeitig die Matrixsignale supprimiert wurden. Durch das „Zusammenziehen“ des Analyttropfens während des Trocknens kam es zu einer Aufkonzentrierung der

Analyten. Die von PRESTON *et al.* [1993] festgestellte Verringerung kationisierten Matrixsignalen konnte allerdings nicht beobachtet werden. Vielmehr kam es zu einer Suppression aller Matrixsignale. Verantwortlich für die Suppression der Matrixsignale ist vermutlich ein günstigeres Verhältnis zwischen Matrix und Analyt [CHAN *et al.* 1992; PERERA *et al.* 1995; KNOCHENMUSS R 1996]. Dies lag vor, da nur ein geringer Anteil an Matrix gelöst wurde und somit ein geringerer Überschuss an Matrix vorhanden war. Versuche noch weniger Matrix zu verwenden, um die Matrixsignale noch weiter zu unterdrücken, schlugen jedoch fehl.

Das Lösungsmittel für die Probelösung war bei dieser Präparationstechnik von großer Bedeutung. Bei einem zu hohen Anteil an organischem Lösemittel wurde die komplette Matrix gelöst und der Effekt des Zusammenziehens war nicht mehr gegeben. Der Analyt war über den gesamten Spot verteilt und folglich war kein Unterschied zur DDP erkennbar. Die besten Ergebnisse wurden mit 10% ACN erzielt. Ab ~ 30% ACN löste der Analyt die komplette Dünnschichtpräparation und der positive Effekt ging verloren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von DONEGAN *et al.* [2004], welche 70% bzw. 80% ACN als Lösemittel für die Analyten verwendeten.

Im Vergleich zu der Standard-DDP mit 33% ACN und der optimierten DDP mit 80% ACN erreichte die Dünnschichtpräparation mit Nitrozellulose die höchsten S/N Verhältnisse für die Analyten. Tabelle 3.2 zeigt die S/N Verhältnisse der Analyten bei 100 fmol/ μ l und 10 fmol/ μ l.

	Standard-DDP	Optimierte DDP	TLP mit Nitrozellulose
100 fmol/μl	<i>S/N</i>	<i>S/N</i>	<i>S/N</i>
Prazosin	1590	3550	3100
Levomepromazin	108	126	2350
Lidocain	30	50	2041
<hr/>			
10 fmol/μl	<i>S/N</i>	<i>S/N</i>	<i>S/N</i>
Prazosin	192	480	280
Levomepromazin	n.d.	25	100
Lidocain	n.d.	n.d.	90

Tabelle 3.2 Vergleich DDP mit TLP

Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit der Standard-DDP erzielt. Hier konnte bei einer Analytkonzentration von 10 fmol/μl lediglich der Arzneistoff Prazosin detektiert werden. Etwas bessere Ergebnisse erzielte die optimierte DDP mit 80% ACN. Bei beiden Analytkonzentrationen wurden bessere S/N Verhältnisse als mittels Standard-DDP erreicht. Die TLP war allerdings den DDP-Techniken vor allem bei 100 fmol/μl weit überlegen. Hier konnten alle drei Analyten mit sehr hohen S/N Werten detektiert werden. Auch bei 10 fmol/μl Analytkonzentration war es möglich, alle drei Analyten zu bestimmen. Lidocain konnte bei einer Konzentration von 10 fmol/μl nur mittels TLP detektiert werden. Bei beiden DDP-Techniken war kein Signal vorhanden. Neben der Anreicherung der Analyten ist ein weiterer positiver Effekt der TLP ihre Eigenschaft Matrixsignale zu unterdrücken. Dies ermöglicht eine bessere Identifizierung bei unbekanntem Proben. Diese Fähigkeit der Matrixsuppression ist in Abbildung 3.10 graphisch dargestellt. Hier wurden neben den Analytsignalen auch wieder die intensiven Matrixsignale ausgewertet.

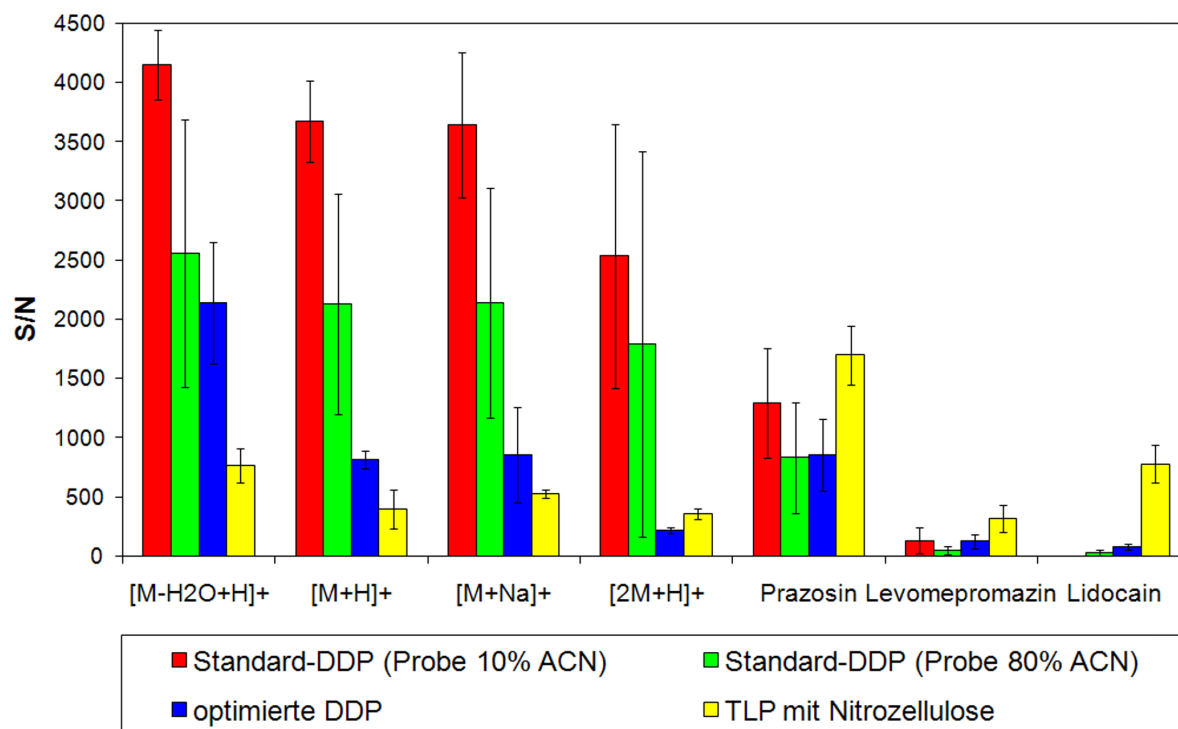


Abbildung 3.10 Vergleich verschiedener Präparationstechniken und Lösungsmittel

Die höchsten Matrixsignale wurden bei Verwendung der Standard-DDP erzielt (rote Balken). Durch Verwendung von 80% ACN in der Probe und der dadurch verbundenen etwas schnelleren Trocknung konnte die Intensität der Matrixsignale etwas verringert werden. Allerdings spielte dies für die S/N Verhältnisse der Analyten keine Rolle. Die großen Fehlerbalken bei der Standardpräparation verdeutlichen nochmals die inhomogene Probenpräparation, welche in stark schwankenden S/N Werten resultierte. Anders die optimierte DDP mit nur 1 mg CHCA in 80% ACN. Die Fehlerbalken waren, wie die S/N Werte der Matrix, kleiner. Gleichzeitig war Lidocain mit höheren S/N Werten messbar. Bei den beiden weiteren Analyten war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Bei der TLP traten gegenüber den DDP-Methoden deutliche Verbesserungen auf. Zum einen wurden deutlich höhere S/N Werte für die Analyten erzielt. Gleichzeitig waren die Matrixsignale niedriger. Diese deutlichen Vorteile sprechen für die Verwendung der TLP bei der Analytik kleiner Moleküle.

Allerdings hat diese Methode auch einige Nachteile, wie z.B. die Einschränkung beim Lösungsmittel für die Analyten. Hier muss mindestens ein Wasseranteil von 70% vorliegen, da ansonsten die dünne Schicht komplett gelöst wird. Ein weiterer Nachteil gegenüber der DDP ist die schwierigere Handhabung, bei der mehr Erfahrung benötigt wird. So war es manchmal notwendig, die Probe mehrmals zu spotten um eine Anreicherung der Analyten zu erreichen. Auch gelang es trotz intensiver Bemühungen nicht, eine homogene Verteilung der TLP über den gesamten Probenteller zu erzielen. Dabei wurden verschiedene Sprühsysteme wie Airbrush oder die Spray-Funktion des Sunchrom MALDI-Spotters getestet. Die aufgetragenen Schichten sahen zwar recht homogen aus, allerdings bildete sich nicht der gewünschte innere Ring. Fotos der homogenen TLP Schichten sind im Anhang unter Abbildung 8.3 zu finden. Beim Eintauchen in Matrixlösung, beim Verstreichen und bei der Verteilung mittels Rotation an der Speedvac bildeten sich keine homogenen Schichten aus.

Die besten Ergebnisse mit der TLP wurden erzielt, indem 1 µl der gelösten Matrix/Nitrozellulosemischung auf die Platte gespottet und getrocknet wurde. Anschließend wurde die wässrige Probe aufgetragen. Anhand der sich nun ausbildenden Kristallisation war sofort erkennbar, ob eine gute Messung möglich war.

Neben diesen Schwierigkeiten bei der Präparation ist auch eine automatische Messung nur schwer realisierbar. Zum einen wird eine automatische Spoterkennung mittels Kamera benötigt. Des Weiteren muss diese Kamera auch so gute Bilder liefern, dass der innere Kreis von der Steuerungssoftware automatisch erkannt wird. Zudem muss die Programmierung der Spoterkennung verändert werden, da nur der äußere Rand des inneren Kreises gemessen werden soll. Auch das Auskristallisieren des inneren Kreises schwankt zum Teil deutlich. So ist sowohl die Lage als auch die Größe des inneren Spots verschieden. Dies ist an den Fotos in Abbildung 3.8 ersichtlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die TLP im qualitativen Bereich eine deutliche Verbesserung gegenüber der DDP darstellt. Im quantitativen Bereich ist eine Quantifizierung mit automatischen Messungen momentan jedoch nicht realisierbar.

3.2.4 Einfluss verschiedener Zusätze und Salze

Der Einfluss verschiedener Zusätze, Salze und Detergenzien bei der Analyse kleiner Moleküle wurde untersucht. Dabei wurden verschiedene Ziele verfolgt. Zum einen sollte der Einfluss von Verunreinigungen auf die Präparation und anschließende Messung geprüft werden, zum anderen wurde versucht, die Präparation und die Messung durch Zusätze zu verbessern.

Ein Vorteil von MALDI ist die hohe Toleranz gegenüber Salzen und Verunreinigungen [COHEN und GUSEV 2002]. So kann während des Kristallisierens der Probe mit Matrix eine Aufreinigung stattfinden [STRUPAT *et al.* 1991].

Mehrere Studien untersuchten den Einfluss verschiedener Salze und Puffer auf die Messung von Biopolymeren wie Proteine, Peptide und DNA mittels MALDI-MS [MOCK *et al.* 1992; SHALER *et al.* 1996; YAO *et al.* 1998; AMINI *et al.* 2000; BAJUK *et al.* 2001]. Inwieweit sich Salze und Verunreinigungen auf den niedrigen Massenbereich auswirken ist jedoch wenig erforscht und beschrieben. Allgemein gilt, dass der Einfluss sowohl von der Menge und Art der Verunreinigung als auch von dem Analyten und der verwendeten Matrix abhängt. Die Toleranzgrenze für Alkalimetallsalze lag bei Peptiden und Proteinen bei ~ 1 M, bei DNA lediglich bei ~ 0,01 M [SHALER *et al.* 1996].

Daher wurde der Einfluss von Salzen und Verunreinigungen auf die Messung kleiner Moleküle getestet. Zuerst wurde mit Natriumchlorid und Ammoniumacetat, später mit einer Salzmischung aus vier verschiedenen Salzen der Einfluss auf die MALDI-Messung überprüft. Dabei wurde neben der optimierten DDP auch die TLP mit Nitrozellulose getestet. Abbildung 3.11 zeigt ein Spektrum der drei Modellanalyten mit Zugabe von 1 mM NaCl bzw. 1 mM Ammoniumacetat (NH₄Ac). Die Probe wurde mit der entwickelten TLP mit Nitrozellulose gespottet.

Weder die Zugabe von 1 mM NaCl oder 1 mM NH₄Ac störte die Messung. Nach Zugabe von NaCl waren die mit Natrium kationisierten Matrixsignale m/z 212 und 234 sehr dominant. Dies störte jedoch nicht die Messung der drei Analyten. Auch bei Zugabe von Ammoniumacetat waren keine negativen Auswirkungen auf die Messung erkennbar.

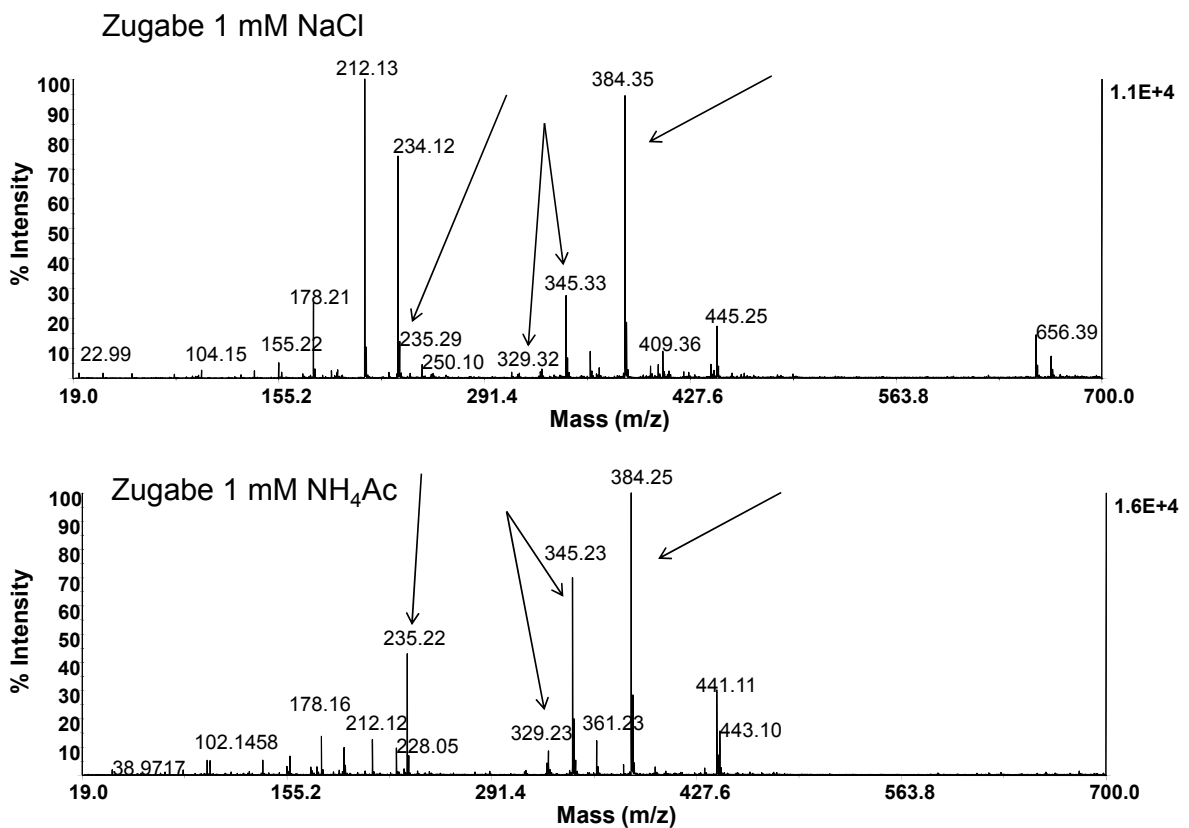


Abbildung 3.11 Spektrum TLP mit Zugabe von 1 mM NaCl bzw. NH₄Ac
 Die Analyten hatten eine Konzentration von je 100 fmol/μl

Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 10 mM brachte eine leichte Verschlechterung der Ergebnisse. Durch die hohe Salzkonzentration begann sich eine Salzschrift auf dem Probenspot zu bilden. Diese bewirkte eine Verringerung der Signalintensitäten. Durch die notwendige Erhöhung der Laserintensität stiegen auch die Intensitäten der Matrixsignale an.

Für einen weiteren Versuch wurde eine Mischung aus vier Salzen (NaCl, KCl, MgCl₂ und CaCl₂) mit insgesamt ~150 mM verwendet (Herstellung der Salzlösung siehe 6.8.1). Als Probe wurde diesmal eine Mischung aus 10 Phenothiazinen (Promethazin, Chlorprothixen, Chlorpromazin, Levomepromazin, Perazin, Triflupromazin, Thioridazin, Trifluoperazin, Flupentixol und Fluphenazin; siehe Abschnitt 6.5) verwendet, welche mit der optimierten DDP aufgetragen um am AB 4800 automatisch gemessen wurden. Bei dieser hohen Salzkonzentration kam es zu einer deutlichen Suppression der Analyten. Abbildung 3.12 zeigt zwei Spektren

Ergebnisse und Diskussion

der 10 Analyten mit einer Konzentration von je 1 pmol/ μ l. Beim oberen Spektrum wurde die Salzmischung zugegeben, während beim unteren Spektrum keine Salze zugesetzt wurden.

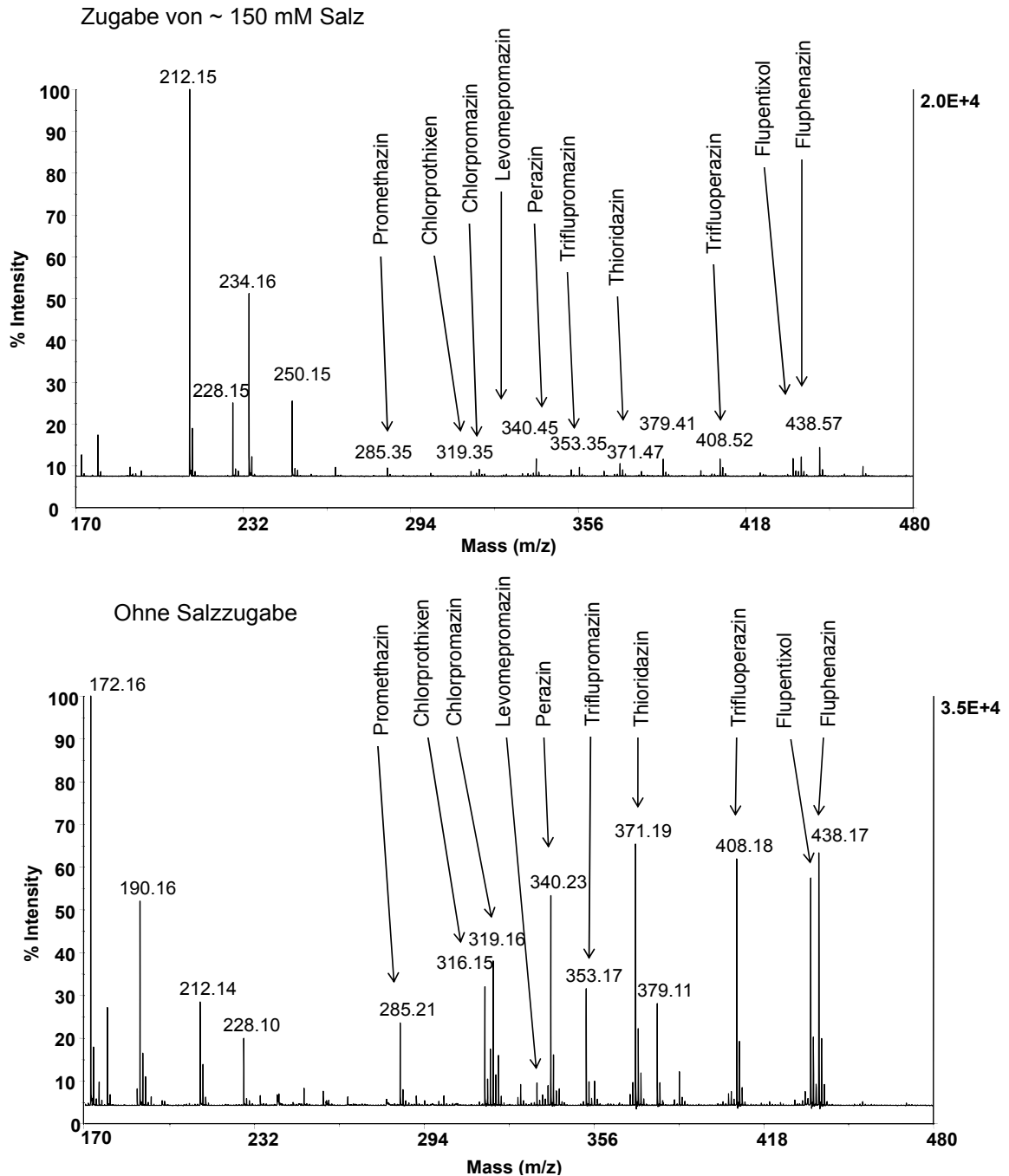


Abbildung 3.12 Spektrum von 10 Phenothiazinen mit und ohne Salzverunreinigung

Die Konzentration der Analyten betrug je 1 pmol/ μ l. Beim oberen Spektrum wurde der Probe eine Salzlösung mit ~150 mM zugegeben.

Bei der salzhaltigen Probe erfolgte eine Suppression der Analytsignale. Es waren zwar alle Phenothiazine detektierbar, aber im Vergleich zu der salzfreien Probe waren deutliche Unterschiede in der Intensität erkennbar. Um die Auswirkung bei niedriger Analytkonzentration zu überprüfen, wurde die Mischung der Arzneistoffe nun mit je 100 fmol/ μ l gemessen. Bei der salzfreien Probe wurden alle Analyten eindeutig identifiziert. Die salzhaltige Probe zeigt erneut eine Suppression der Analytsignale. Allerdings waren auch hier noch 8 der 10 Analyten detektierbar. Die S/N Verhältnisse der salzigen Probe waren ungefähr eine Zehnerpotenz schlechter als die der salzfreien Probe. Dies kann, gerade bei niedriger Analytkonzentration und „dreckigen“ Proben zu Problemen bei der Identifizierung führen. Allerdings kann hier durch eine geeignete Probenvorbereitung wie z.B. mittels SPE oder Flüssig/Flüssig Extraktion die Verunreinigung entfernt und die Analyten gleichzeitig angereichert werden. Bei mittleren bis höheren Analytkonzentrationen ist eine Entsalzung jedoch meist nicht notwendig, da auch noch stark salzhaltige Proben ohne Entsalzung messbar waren.

Bisher wurde der Einfluss von „unerwünschten“ Stoffen auf die Messung von kleinen Molekülen geprüft. Es werden jedoch häufig auch Methoden vorgestellt, bei denen absichtlich Stoffe zugesetzt wurden, um die Messung positiv zu beeinflussen [PIELES *et al.* 1993; GUO *et al.* 2002; SMIRNOV *et al.* 2004; GRANT und HELLEUR 2007, 2008]. Um das Problem der Matrixsignale im niedrigen Massenbereich zu beheben, wurden sogenannte „Ionensuppressoren“ eingesetzt, welche die Matrixsignale unterdrücken sollen. Ein in der Literatur verwendeter Ionensuppressor ist Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) [GUO *et al.* 2002; GRANT und HELLEUR 2007, 2008]. Das Tensid wurde bei der Analyse verschiedener kleiner Moleküle verwendet. Der positive Effekt der Matrixsuppression stellte sich jedoch als wenig hilfreich heraus. So unterdrückte der Suppressor nicht nur die Matrixsignale, sondern sämtliche Signale, und somit auch die Analytsignale. Bei hoher Analytkonzentration war dies nicht weiter tragisch, da die Analyten meist noch detektierbar waren. Allerdings war dann der Einsatz von CTAB auch nicht hilfreich, da die Analyten ohnehin bei hoher Konzentration sehr intensive Signale zeigten und dadurch einfach zu identifizieren waren. Der große Nachteil von CTAB trat jedoch bei niedriger Analytkonzentration auf. Ein Spektrum der drei Modellanalyten mit einer

Konzentration von 50 fmol/μl und dem Zusatz des Ionensuppressors CTAB ist in Abbildung 3.13 dargestellt und verdeutlicht diesen Nachteil.

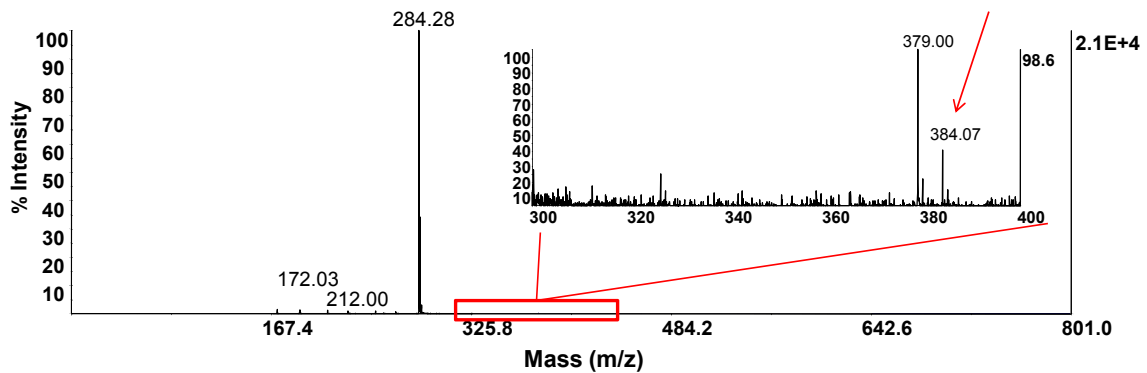


Abbildung 3.13 Spektrum mit CTAB als Ionensuppressor

Die drei Modelanalyten hatten eine Konzentration von 50 fmol/μl

Neben dem intensiven CTAB Signal waren kaum noch weitere Signale sichtbar. Nur der Analyt Prazosin war mit einem S/N Wert von 34 gerade noch detektierbar. Das innere Fenster stellt den vergrößerten Bereich zwischen m/z 300 - 400 dar. Die beiden anderen Analyten waren nicht detektierbar. Anders bei der optimierten DDP ohne CTAB. Hier waren alle drei Analyten mit S/N Werten zwischen 50 und 500 detektierbar. Daher ist der Einsatz dieses Ionensuppressors, anders als in der Literatur beschrieben, sowohl für geringe als auch für hohe Analytkonzentration nicht sinnvoll.

Als weiterer Ionensuppressor bei der Analyse kleiner Moleküle mittels MALDI wurde kürzlich Cyclodextrin vorgestellt [YAMAGUCHI *et al.* 2008]. Das getestete α -Cyclodextrin verhinderte jedoch nur die Bildung von kationisierten Matrixsignalen. Die protonierte Form $[M+H]^+$ und die fragmentierten Matrixsignale waren weiterhin deutlich sichtbar. Cyclodextrin verringerte zwar die Anzahl der Matrixsignale, allerdings ergaben sich Probleme bei der Probenpräparation. Die teilweise „lackartige“ Kristallisation verursachte eine nicht reproduzierbare Probenpräparation, in der teilweise Hot-Spots generiert wurden, aber auch teilweise überhaupt keine

Messung möglich war. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und der nur geringen Vorteile durch die Suppression der kationisierten Matrixsignale wurde diese Technik nicht weiter verfolgt.

Bei den MALDI-Messungen trat teilweise ein intensives, zuerst nicht identifiziertes Signal bei m/z 441 und 443 auf, welches die übrigen Matrixsignale teilweise unterdrückte. Dieses Matrixsignal wurde anhand der akkuraten Masse, des charakteristischen Isotopenmusters und Aufstockversuchen mit Kupfersalzen als $2 M+Cu$ identifiziert. So entstand die Idee, durch Zugabe von Kupfersalzen die anderen Matrixsignale zu unterdrücken. Leider war die Suppression auch bei sehr hohen Kupferkonzentration nicht vollständig, so dass auch weiterhin Matrixsignale im niedrigen Massenbereich auftraten. Auch bei anderen Metallsalzen war keine vollständige Suppression festzustellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass aufgrund der höheren Salztoleranz von MALDI-MS die Analyse kleiner Moleküle auch mit verunreinigten Proben möglich ist. Selbst die Messung einer stark salzhaltigen Probe war ohne Entsalzung direkt möglich. Dadurch verkürzte sich die notwendige Probenvorbereitung deutlich. Die auftretende Ionensuppression bei salzhaltigen Proben kann bei geringer Analytkonzentration allerdings zu Problemen bei der Detektion führen. Hier ist es jedoch jederzeit möglich, eine übliche Probenvorbereitung durchzuführen um „saubere“ Proben zu erhalten.

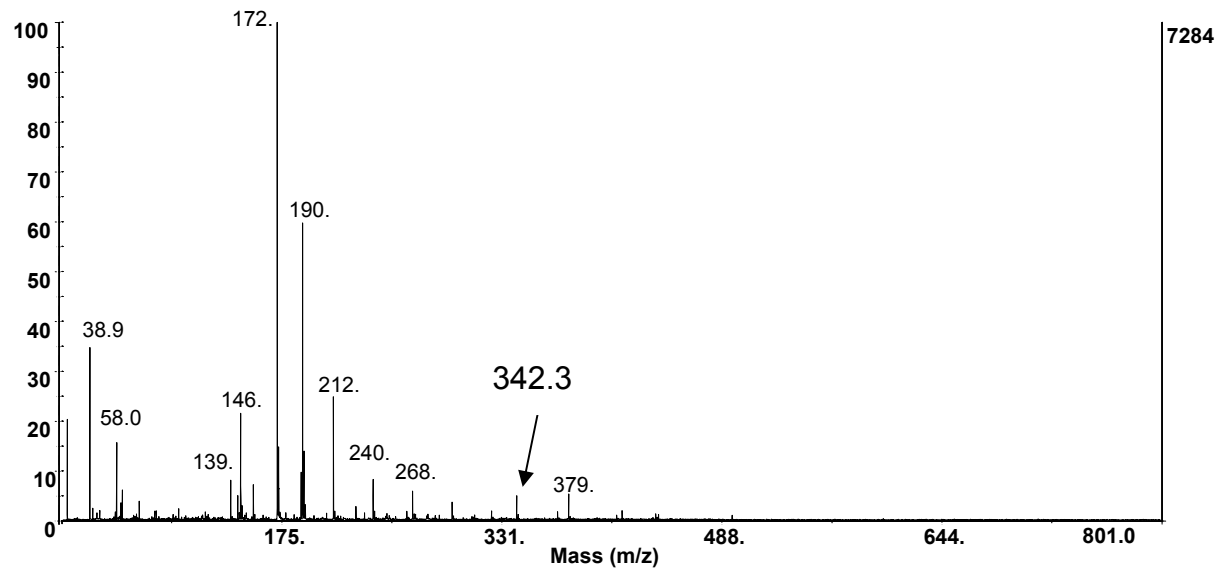
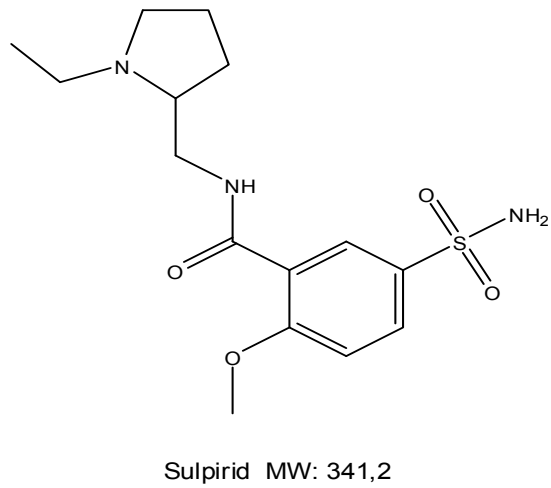
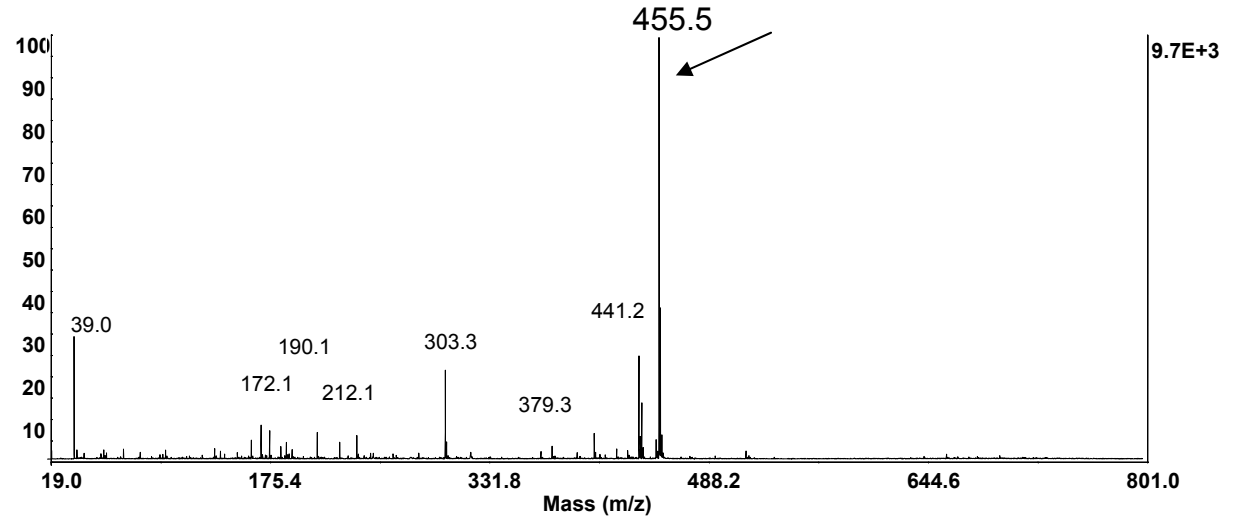
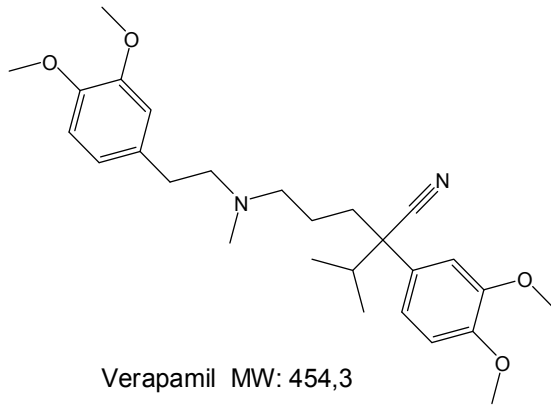
Als grobe Faustregel gilt: „Eine Lösung, die in die LC-MS injiziert wird, kann mittels MALDI-MS direkt gemessen werden.“ Die Zugabe von Salzen und Detergenzien zu der Probe oder Matrix bewirkte keine Verbesserung der Ergebnisse. Vielmehr verschlechterten die getesteten Substanzen teilweise sogar das Messergebnis.

3.3 Screening verschiedener Arzneistoffe

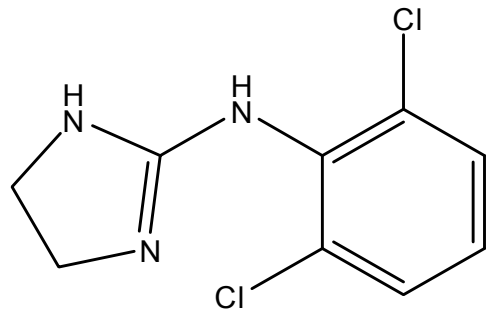
Nach der Optimierung der Probenpräparation wurde ein generelles Screening unterschiedlicher Arzneistoffe und kleiner Moleküle durchgeführt. Da die Messung nur im positiven Modus durchgeführt wurde, fand eine grobe Vorauswahl statt, bei der saure Arzneistoffe nicht berücksichtigt wurden. Es wurden sowohl die im Arbeitskreis vorhandenen Arzneistoffe, als auch im Pharmazeutischen Institut verfügbare Stoffe analysiert. Insgesamt wurden 71 Stoffe gemessen. Die verwendete Konzentration lag dabei immer bei 1 pmol/ μ l. Als Probenpräparation wurde die entwickelte TLP verwendet. Das Screening sollte einen groben Überblick darüber geben, welche der verfügbaren Arzneistoffe mit MALDI-MS messbar sind.

Nach Auswertung des Screenings konnten die kleinen Moleküle in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Dabei wurden die Analyten nicht in Substanzklassen oder Wirkprofile, sondern anhand ihrer Messergebnisse eingeteilt. Die vier Stufen wurden von nicht (-) - über mäßig (+) – über gut (++) – bis sehr gut (+++) detektierbar gewählt. Beispielhaft werden in Abbildung 3.14 vier Spektren unterschiedlicher Analyten dargestellt. Das komplette Screening mit Strukturen der Analyten befindet sich auf der CD im Verzeichnis Anhang/Screening.

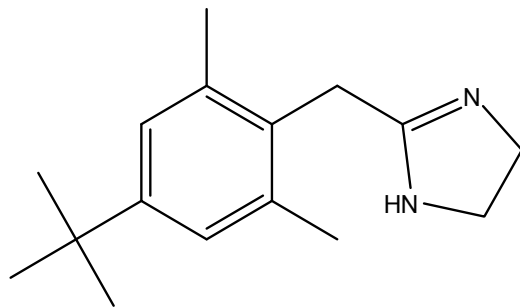
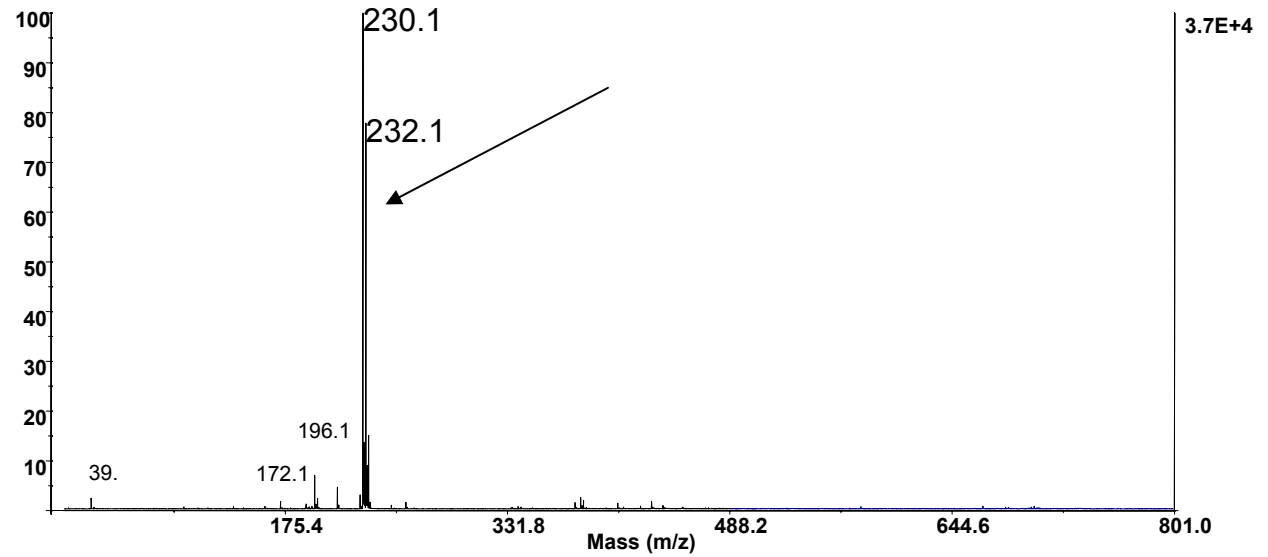
Ergebnisse und Diskussion



Ergebnisse und Diskussion



Clonidin MW: 229,1



Xylometazolin MW: 244,2

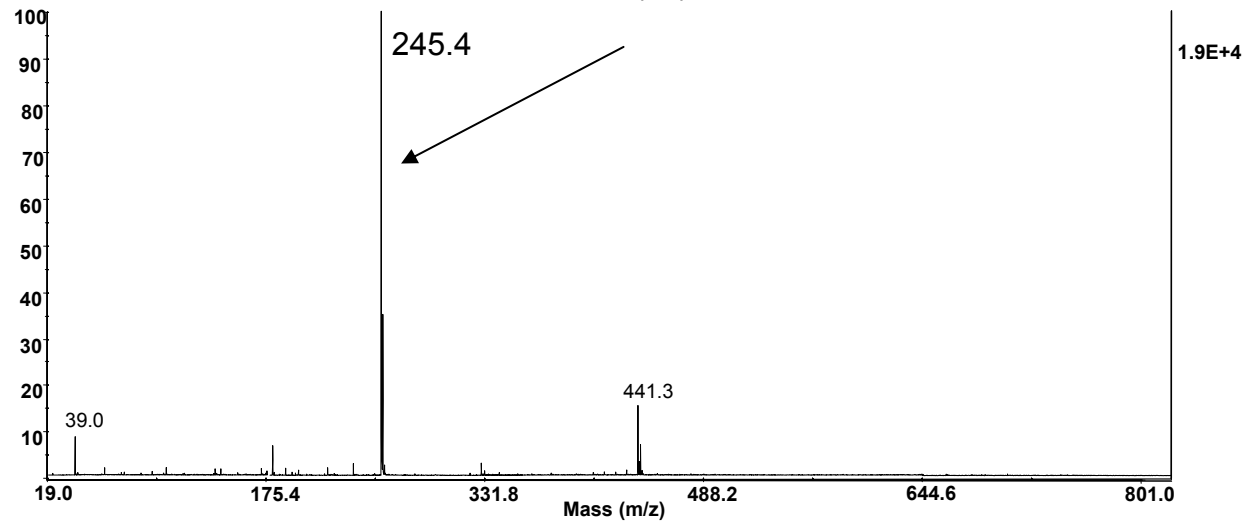


Abbildung 3.14 Ausschnitt aus dem Screening kleiner Moleküle

Ein kompletter Überblick über das Ergebnis des Screenings ist in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Name	MW	Messergebnis
Acetylcystein	163,0	-
Aciclovir	225,1	+++
Allopurinol	136,0	+
Amitriptylin	277,2	++
Amitriptylinoxid	293,2	+
Ampicillin	349,1	-
Antipyrin	188,1	+
Atenolol	266,2	+++
Benperidol	381,2	+++
Benserazid	257,1	+++
Benzocain	165,1	+
Bufexamac	223,1	+
Captopril	217,1	-
Cephaclor	367,0	+
Chinin	324,2	+++
Chloramphenicol	322,0	-
Chlorpromazin	318,0	+++
Cimetidin	252,1	+++
Ciprofloxacin	331,1	++
Clindamycin	424,2	+++
Clioquinol	304,9	+
Clonidin	229,0	+++
Cloroquin	319,2	+++
Koffein	194,1	++
Doxepin	279,2	+++
Etilefrin	181,1	+++
Flunarizin	404,2	+
Fluphenazin	437,2	+++
Fluvoxamin	318,2	++
Furosemid	330,0	+
Haloperidol	375,2	++
Imipramin	280,2	++
Isoniazid	137,1	+++
Lidocain	234,2	+++
Levodopa	197,1	-
Levomepromazin	328,4	+++
Loperamid	476,2	+++
Maprotilin	277,2	++
Melperon	263,2	+++
Metoclopramid	299,1	+++

Name	MW	Messergebnis
Metoprolol	267,2	+++
Metronidazol	171,1	++
Miconazol	414,0	+++
Minanserin	264,2	+++
Minocyclin	457,2	+
Mirtazopin	265,2	++
Moclobemid	268,1	+++
Nicotinamid	122,1	++
Nortriptylin	263,2	+++
Penicillin G	334,1	-
Pernazin	339,2	+++
Phenazon	188,1	++
Prazosin	383,4	+++
Procain	236,2	+++
Promethazin	284,1	+++
Propranolol	259,2	++
Propyphenanzon	230,1	+++
Sotalol	272,1	++
Sulfamethoxazol	253,1	+
Sulfasalazin	398,1	++
Sulpirid	341,1	+
Theophylin	180,1	++
Thiamazol	114,0	+
Thiamin	266,1	++
Tolbutamid	270,1	+
Trapanal	242,1	+
Trimethoprim	290,1	+++
Trimipramin	294,2	+
Verapamil	454,3	+++
Xylometazolin	244,2	+++
Yohimbin	354,2	+++

Tabelle 3.3 Screening niedermolekularer Analyten mit eine Konzentration von je 1 pmol/ μ l

Erklärung Messergebnis: (+++: sehr gut messbar, ++ gut messbar, + mäßig messbar, - nicht/kaum messbar)

Nach einem Blick auf die Struktur des Analyten kann teilweise schon ein Ergebnis vorhergesagt werden. Basische Stickstoffatome können leicht protoniert und somit ionisiert werden. Liegen allerdings Amide vor ist die Basizität des Stickstoffatoms aufgrund der -I- und -M-Effekte der Keto- oder Säuregruppen stark verringert, so

dass eine Protonierung nicht oder nur kaum erfolgt. Sämtliche untersuchten, nicht oder kaum messbaren Analyten wiesen diese strukturellen Eigenschaften auf. Neben der Basizität des Analyten spielen jedoch auch weitere, nicht vorhersehbare Faktoren wie die Kristallisation und Co-Kristallisation eine wichtige Rolle bei der MALDI-Messung. Auch ob das Molekül bei der Messung intakt oder bereits fragmentiert wird, kann nicht so einfach vorhergesagt werden. Für spätere Arbeiten, z.B. bei der Entwicklung neuer Matrices oder effektiveren Probenpräparation kann die Tabelle hilfreich sein. So können gezielt Analyten, die nicht oder nur sehr schlecht mittels CHCA protoniert werden, untersucht werden.

Für die folgende Quantifizierung wurden Arzneistoffe mit gutem oder sehr gutem Messergebnis ausgewählt, welche keine oder nur kaum Fragmentierung aufwiesen. Diese Stoffe dienen als Modelanalyten für die Entwicklung einer allgemeinen Methode zur Quantifizierung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS.

3.4 Entwicklung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-MS

Die Quantifizierung mit MALDI stellt gegenüber der Identifizierung eine deutlich höhere Herausforderung dar [DUNCAN *et al.* 2008]. Insbesondere die Fluktuation der Signalintensitäten verursacht Probleme bei der korrekten und gleichzeitig reproduzierbaren Quantifizierung (siehe Abschnitt 2.3).

Nach der Optimierung der Probenpräparation sollte nun eine Quantifizierungsmethode zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS entwickelt werden. Diese möglichst unkomplizierte Quantifizierungsmethode sollte weder teures Zusatzequipment wie z.B. spezielle Geräte oder besonders teure Chemikalien noch besondere Probenvorbereitung oder Präparationstechniken benötigen. Die Methode sollte zudem robust und präzise sein und musste gleichzeitig gegenüber gängigen Analysenmethoden konkurrenzfähig sein. Insbesondere sollte die MALDI-MS Methode ähnliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wie die im kleinen Massenbereich häufig verwendeten ESI-MS oder APCI-MS Methoden erreichen.

Ob die entwickelten Quantifizierungsmethoden korrekte und gleichzeitig reproduzierbare Daten liefern, wurde im Rahmen der Validierung durch Einhaltung charakteristischer Kenngrößen ermittelt. Nachfolgend wird nur kurz und stichpunktartig auf die wichtigsten Parameter eingegangen, da eine ausführlichere Behandlung den Rahmen der Arbeit sprengen würde.

3.4.1 Validierung der entwickelten MALDI-MS Methoden

Unter Methodvalidierung versteht man in der Analytik den dokumentierten Nachweis, dass eine bestimmte Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen erfüllt [KROMIDAS 2007].

Da die Validierung, insbesondere auch in der pharmazeutischen Chemie, ein bedeutendes Werkzeug der Qualitätssicherung darstellt, beschäftigen sich verschiedene Richtlinien wie DIN EN ISO/IEC 17025, ICH Q2 (R1) oder USP Chapter 1225 mit der Methodvalidierung. Aber auch in der Literatur wird auf die Problematik der Validierung näher eingegangen [KARNES *et al.* 1991; CAUSON 1997; SHAH *et al.* 2000; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* 2001; KROMIDAS 2007].

Die Validierungsparameter gemäß der ICH Richtlinie Q2 (R1) (CPMP/ICH/381/95) sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Richtlinien sind aber keine starren Vorgaben, sondern die analytische Fragestellung bestimmt die Art und den Umfang der Validierungsschritte.

aus ICH Richtlinie ICH Q2 (R1)	Identität	Test auf Verunreinigungen Quantität	Limit	Gehalt
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision	-	+	-	+
Spezifität	+	+	+	+
Nachweisgrenze	-	-	+	Ë
Bestimmungsgrenze	-	+	-	Ë
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

Tabelle 3.4 Validierungsparameter nach ICH Q2 (R1)

Erklärung: (+) Merkmal wird in der Regel bewertet

(-) Merkmal wird in der Regel nicht bewertet

Da es in der Literatur für die Parameter verschiedene Bestimmungsmöglichkeiten, Berechnungsformeln und Grenzen gibt, werden nachfolgend die einzelnen erklärt und gleichzeitig beschrieben, wie sie im Rahmen der Arbeit bestimmt wurden.

Validierungsparameter

- **Richtigkeit** (*accuracy*): Sie gibt den Abstand des gemessenen Mittelwerts vom „wahren“ Wert an. Im Rahmen der Arbeit drückt die Richtigkeit der Methode die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen Wert und dem Nominalwert aus und wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Richtigkeit} = \frac{\text{gemessene Konzentration Probe} - \text{Konz. Standardprobe}}{\text{Konz. Standardprobe}} * 100$$

In der Arbeit wurde die Richtigkeit als % Fehler angegeben. Die Grenzwerte für noch akzeptable Werte waren $\leq \pm 15\%$ Fehler bzw. im Bereich der Bestimmungsgrenzen $\leq \pm 20\%$ Fehler. Diese doch recht strengen Vorgaben stammen von der FDA und gelten für Präzision und Richtigkeit bei der bioanalytischen Methodvalidierung in der Industrie [U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* 2001]. Häufig wird anstelle von Richtigkeit auch der Begriff Genauigkeit verwendet. Dieser ist jedoch kein eigenständiger Prüfpunkt, sondern der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision.

- **Präzision** (*precision*): Sie ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander. Die Streuung der Analysenergebnisse beruht auf zufälligen Fehlern der Methode. Um die Präzision auswerten zu können, wurde bei den Proben immer mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Präzision der entwickelten Methoden wurde mittels relativer Standardabweichung (RSD) angegeben. Diese lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$\text{RSD} = \frac{\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}}{\bar{x}} * 100$$

Die Grenzwerte für noch akzeptable Präzision lagen, analog zur Richtigkeit, bei $\leq \pm 15\%$ RSD bzw. im Bereich der Bestimmungsgrenzen bei $\leq \pm 20\%$ RSD.

- **Spezifität** (*specificity*): Die Fähigkeit, die Substanz ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen.
- **Selektivität** (*selectivity*) : Die Fähigkeit, alle Analyten nebeneinander ohne gegenseitige Störung zu bestimmen. Obwohl auf den Einsatz der Chromatographie verzichtet wurde ist die Spezifität und Selektivität bei MALDI-TOF-MS gegeben. Diese wird durch die hohe Auflösung und akkurat bestimmbare Masse erreicht. So war die Massengenauigkeit nach interner Kalibrierung auf die Matrixsignale sehr gut und lag unter 20 ppm Fehler, wobei häufig Werte unter 10 ppm erreicht wurden. Zudem war es möglich eine MS/MS Analyse zur weiteren Absicherung durchzuführen.
- **Nachweisgrenze** (LOD): Sie ist die kleinste nachweisbare Menge, die gemessen, jedoch nicht quantifiziert werden kann. Es besteht die Möglichkeit einer rechnerischen oder einer experimentellen Bestimmung des LOD. Dabei gibt es auch noch eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung des LOD. Eine einfache und häufig in der Literatur zu findende Methode ist die Berechnung mittels S/N-Verhältnis: Dabei muss das Analytsignal mindestens 3 fach intensiver als das Grundrauschen sein ($S/N = 3$).
Eine andere Methode verwendet die Intensität des Blindwert einer Leerprobe und addiert 3 mal die Standardabweichung (σ) dazu: $LOD = y_{\text{blank}} + 3 * \sigma$ [GIBBONS 1994].
Eine weitere Methode verwendet die Steigung der Regressionsgeraden und die Standardabweichung der Signale. Die Nachweisgrenze wird nach folgender Formel bestimmt:

$$LOD = \frac{3,3 * \sigma}{S}$$

Letztendlich gibt auch die deutsche Industrienorm DIN 32645 mehrere Möglichkeiten die Nachweisgrenze zu bestimmen [DEUTSCHE NORM 2008]. Durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden kommt es leider auch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Diese Problem wurde auch schon von GEISS und EINAX [2001] diskutiert, die mit identischen Analyseergebnissen durch Verwendung unterschiedlicher Berechnungsmethoden teils deutlich

verschiedene Resultate erzielen. Die Nachweisgrenze ist jedoch keine feste Größe, sondern kann sich leicht durch z.B. nicht optimale Geräteparameter, veränderte Probenmatrix oder andere Lösungsmittel/Lösungsmittelreinheit verändern. Leider wird die Nachweisgrenze häufig als Hauptkriterium einer Methode angesehen und verursacht deswegen einen regelrechten Wettkampf nach noch empfindlicheren Methoden. Diesem Wettbewerb kann sich auch MALDI-MS nicht entziehen und man erwartet mit LC-MS vergleichbare Nachweisgrenzen zu erzielen. Da in der Literatur sehr häufig die Berechnung der Nachweisgrenze nach $S/N = 3$ erfolgt, wurde diese Methode auch in dieser Arbeit verwendet. Nur so ist ein direkter Vergleich der Nachweisgrenzen unterschiedlicher Methoden gegeben.

- **Bestimmungsgrenze (LOQ):** Sie ist die kleinste quantifizierbare Menge. Entsprechend der Nachweisgrenze gibt es analog auch für die Bestimmungsgrenze die gleichen Berechnungsansätze. Hier beträgt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis typischerweise 9-10. Bei Verwendung des Blindwerts wird die LOQ folgendermaßen bestimmt: $LOQ = y_{\text{blank}} + 6 * \sigma$ [GIBBONS 1994]. Wird die Steigung der Regressionsgeraden zur Bestimmung der LOQ verwendet, ändert sich lediglich der Faktor 3,3 auf 10. Auch hier gibt die DIN 32645 mehrere Möglichkeiten zur Bestimmung der LOQ [DEUTSCHE NORM 2008]. Im Rahmen der Arbeit wurde die LOQ jedoch nicht rechnerisch, sondern experimentell bestimmt. Dabei wurde die von der FDA geforderte 15% / 20% Regel verwendet [U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* 2001]. Bei der Validierung der hier dargestellten Methoden wurde die Bestimmungsgrenze definiert als niedrigster Wert, der mit der geforderten Präzision und Richtigkeit ($\leq \pm 20\%$) ermittelt werden konnte.
- **Linearität (*linearity*):** Sie gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen Messgröße und Konzentration wieder. Für die Herstellung einer Regressionsgeraden aus Standardproben wurden mindestens 5 Messwerte verwendet. Dabei wurde auf der y-Achse das Verhältnis aus Intensität des Analyten geteilt durch die Intensität des internen Standards aufgetragen. Auf die x-Achse wurde der Gehalt der Probe aufgetragen. Zur Beurteilung der Linearität

diente der Korrelationskoeffizient R^2 . Dieser ist das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r , welcher ein dimensionsloser Index und ein Maß dafür ist, inwieweit ein Variablenpaar x und y miteinander verknüpft ist. Die Berechnung erfolgte mittels Microsoft Excel 2003 und 2007.

- **Arbeitsbereich** (*range*): Bereich zwischen der unteren und oberen Konzentration des Analyten, welcher noch ein akzeptables Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität aufweist.
- **Robustheit**: Die Robustheit ist ein Maß dafür, wie störanfällig die Methode gegenüber variierenden Bedingungen ist, und spiegelt damit die Zuverlässigkeit im Routinebetrieb wieder. Dabei werden neben Änderungen der Temperatur oder der Lösungsmittel auch Stabilität der Analyten oder Störungen durch Verunreinigungen in der Probe berücksichtigt. MALDI-MS zeigte eine hohe Robustheit, da es möglich war, verunreinigte Probe direkt zu messen. Daher konnte auf den Einsatz einer LC verzichtet werden, was bei der Messung verunreinigter Proben mittels ESI-MS oder APCI-MS nicht denkbar wäre. Die Robustheit der Methoden wurde zudem durch die Verwendung unterschiedlicher Proben und Probenmatrizes sowie aufgrund häufiger Wiederholungen der Messreihen an unterschiedlichen Tagen, Geräten und Personen bestätigt.

Die ermittelten Validierungsdaten werden in den jeweiligen Abschnitten gezeigt und diskutiert.

3.4.2 Probleme bei der Entwicklung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-MS

Für die Quantifizierung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS müssen die vorher genannten Validierungsparameter erfüllt sein. Aufgrund der starken Schwankungen der Signalintensitäten, nicht nur von *spot-to-spot* sondern sogar von *shot-to-shot* war eine Quantifizierung mit ausreichender Präzision und Richtigkeit die größte Schwierigkeit. Selbst bei Verwendung der homogeneren optimierten DDP Methode kam es zu Schwankungen bei den Analytintensitäten. Dies stellte insbesondere bei sehr geringen Konzentrationen ein Problem dar. Wenn jedoch eine höhere Anzahl Laserschüsse aufsummiert wurde und gleichzeitig ein großer Bereich des Spots gemessen wurde, sollte dieses Problem erheblich minimiert werden. Der Effekt, verursacht durch die höhere Anzahl aufsummierter Spektren wird in Abschnitt 3.6 näher betrachtet.

Um reproduzierbare Werte zu erhalten, war jedoch der Einsatz eines internen Standards (IS) zwingend notwendig. Dabei stellen isotoopenmarkierte Standards die beste Wahl dar. Allerdings sind diese teuer und teilweise nicht verfügbar. Daher wurden bei den Quantifizierungsmethoden neben isotoopenmarkierten Standards auch andere Stoffe als IS verwendet. Die Kombination der optimierten homogeneren DDP, das aufsummieren ausreichender Einzelschussspektren, sowie der Einsatz eines IS verbesserten die Reproduzierbarkeit und die Richtigkeit der Messung erheblich.

3.5 Bestimmung von Phenothiazinen

Die Entwicklung einer allgemeinen Quantifizierungsmethode für kleine Moleküle mittels MALDI-TOF-MS wurde bei der Gruppe der Phenothiazine begonnen. Die Strukturen der verwendeten Phenothiazine sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

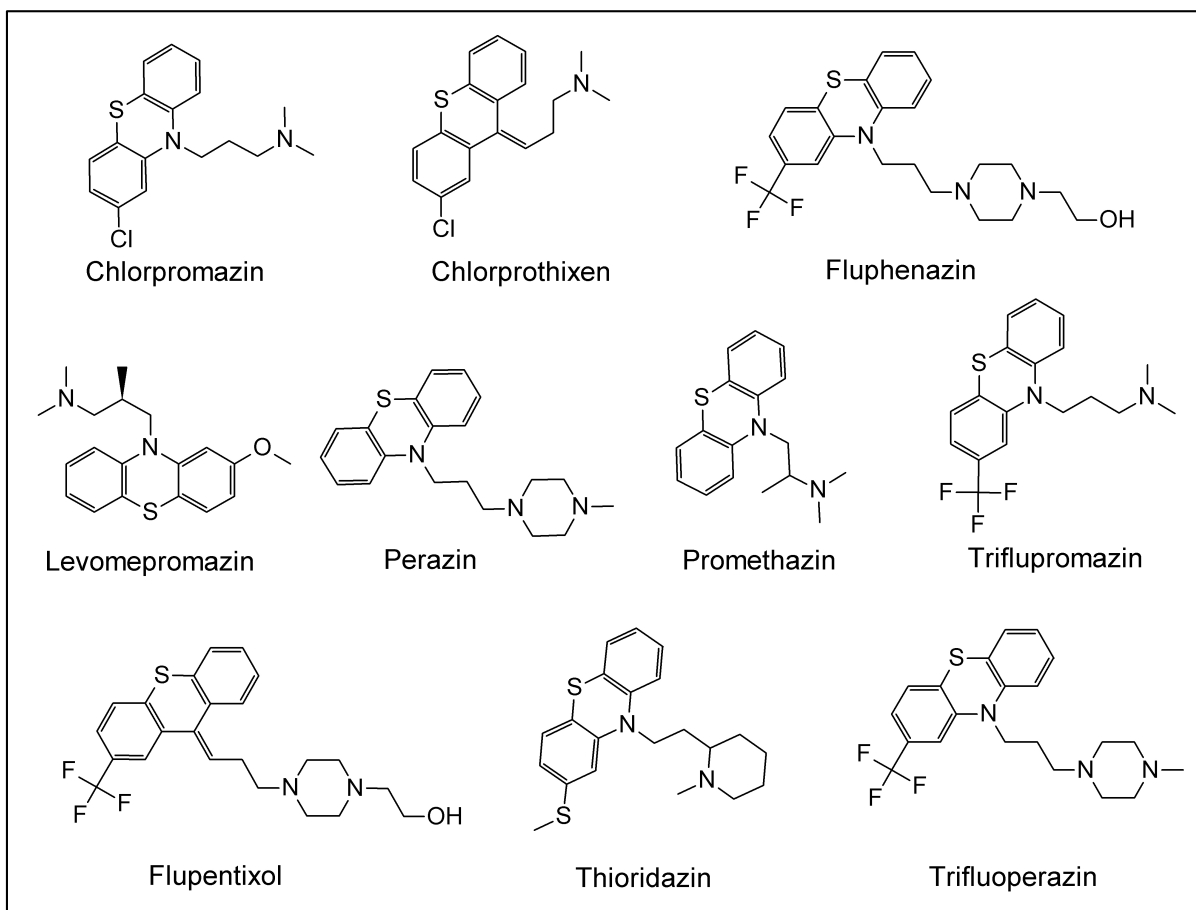


Abbildung 3.15 Strukturen der verwendeten Phenothiazine

Diese Substanzklasse zeigte im Screening eine gute Ionisierbarkeit, ohne dabei Fragmente zu bilden. Die Analyten deckten dabei den Massenbereich von 280 bis 440 Da ab. Gleichzeitig traten keine Überschneidungen mit Matrixsignalen der verwendeten CHCA auf.

Die bedeutende Substanzklasse der Phenothiazine wird zur Therapie von psychischen Erkrankungen [DAHL 1981; BALDESSARINI 1985], aber auch wegen ihrer antihistamin- und antiemetischen Wirkung eingesetzt [BALDESSARINI 1985; HAYEN und KARST 2003]. Aufgrund der Bedeutung der Phenothiazine wurden zahlreiche analytische Methoden vorgestellt. Dabei wurden u.a. Techniken wie LC, GC und Kapillarelektrophorese mit unterschiedlichen Detektionssystemen wie UV, Fluoreszenz oder Massenspektrometrie verwendet [ISHIKAWA *et al.* 1990; HATTORI *et al.* 1992; BERGER und WILSON 1994; CEPAS *et al.* 1994; LAASSIS *et al.* 1994; SHIMADA *et al.* 1994; PETIT *et al.* 1998; SAUVAGE *et al.* 1998; GHOUS und TOWNSHEND 1999; SENO *et al.* 1999; DIEHL und KARST 2000; BASAVAIAH und MANJUNATHA SWAMY 2001; NASCENTES *et al.* 2002; TANAKA *et al.* 2007]. Aufgrund dieser zahlreichen Techniken kann die entwickelte MALDI-MS Methode gut mit diesen etablierten Verfahren verglichen werden.

3.5.1 Quantifizierung der Phenothiazine mit variabler IS-Konzentration

Zuerst wurde ein geeigneter IS ermittelt, der die simultane Quantifizierung aller verwendeter Phenothiazine ermöglicht. Dabei wurde bewusst auf einen isotopenmarkierten Analyten verzichtet. Dieser ist zwar bestens als IS geeignet, jedoch häufig teuer und teilweise nicht verfügbar. Die Verwendung eines, dem Analyten gegenüber ähnlichen Stoffs sollte ausreichend hohe Reproduzierbarkeit erreichen. Der IS wurde zuerst in derselben Konzentration wie die Analyten eingesetzt. Dadurch wurden Pipettierfehler während der Aufarbeitung minimiert und gleichzeitig wurden Suppressionseffekte aufgrund unterschiedlicher Konzentration verhindert. Dies ist natürlich für reale Proben nur anwendbar, wenn deren Konzentration bereits bekannt ist und nur überprüft werden soll, wie es z.B. in der Qualitätskontrolle notwendig ist.

Bei der Auswertung wurden verschiedene Softwaretools wie Basisliniensubtraktion, Rauschunterdrückung oder Rauschentfernung getestet. Zudem erfolgte die Auswertung sowohl über die Signalhöhe als auch über die Signalfäche. Dabei zeigte sich, dass bei niedriger Analytkonzentration und damit verbundener geringer Signalintensität und -fläche die Auswertung mittels Signalhöhe reproduzierbarere

Ergebnisse erzielte. Dies lag an der automatischen Integration der Peaks durch die Auswertesoftware (4000 Series Explorer und Data Explorer®), die insbesondere bei geringer Signalintensität sehr unterschiedliche Peakflächen definierte. Die beste Präzision wurde bei Verwendung der monoisotopischen Signalhöhe ohne Basisliniensubtraktion oder Rauschunterdrückung erzielt und wurde daher für alle Quantifizierungsmethoden verwendet. Ähnliche Ergebnisse bei den Auswertungsparametern erzielte VAN KAMPEN *et al.* [2006], allerdings war hier die Verwendung von Signalflächen besser geeignet als die Signalhöhe. Ein MALDI-Spektrum der Mischung aller verwendeter Phenothiazine mit einer Konzentration von je 250 fmol/μl ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

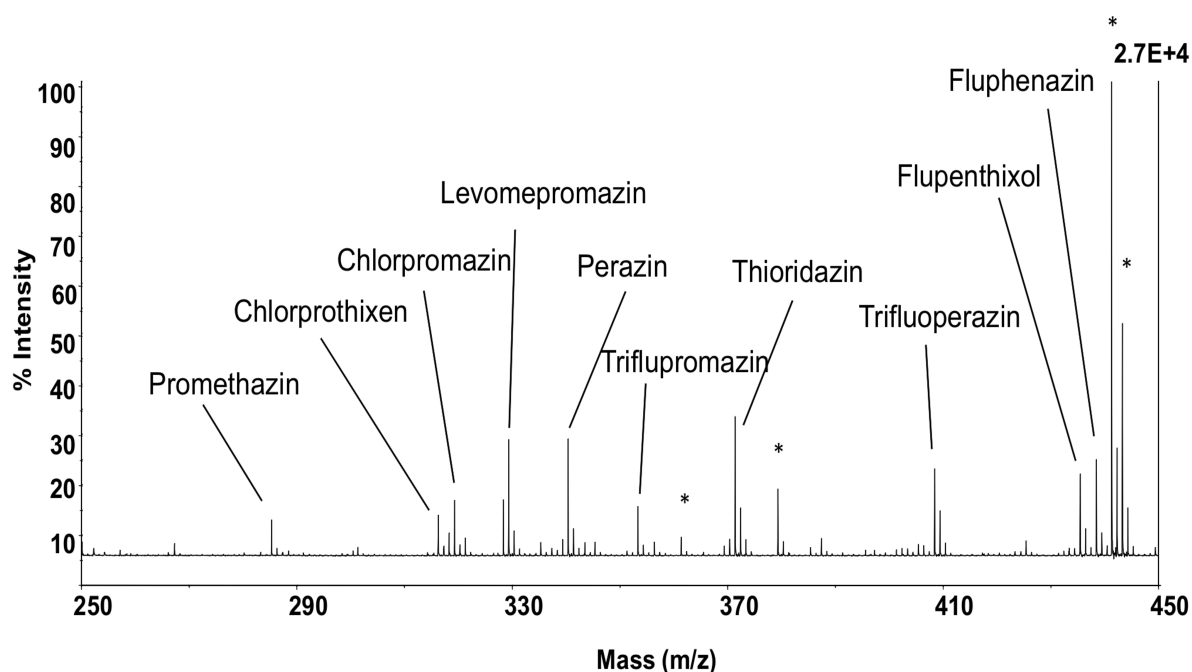


Abbildung 3.16 Spektrum der verwendeten 10 Phenothiazine

mit einer Konzentration von je 250 fmol/μl (mit * markierte Signale sind Matrix Signale)

Trotz der geringen Konzentration sind alle zehn Arzneistoffe im Spektrum deutlich zu erkennen und liegen in protonierter Form $[\text{Analyt}+\text{H}]^+$ vor. Kationisierte Analytmoleküle waren nicht detektierbar. Es traten kaum Matrixsignale im relevanten Massenbereich auf. Die Intensitäten der Matrixsignale sind mit Ausnahme der Signale bei m/z 379 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 441 und 443 $[2\text{M}+\text{Cu}]^+$ sehr gering und nicht störend.

Durch die hohe Massengenauigkeit des TOF-MS war eine eindeutige Identifizierung der Analyten möglich. Falls notwendig kann jedoch mittels MS/MS die Identität des Analyten abgesichert werden.

Es zeigte sich, dass prinzipiell fast jeder Analyt als IS für die Quantifizierung der übrigen neun Arzneistoffe geeignet war. Einzig Triflupromazin war aufgrund schlechter Präzision nicht geeignet. Mit Promethazin und Perazin als IS wurde eine 5 fach höhere Bestimmungsgrenze ermittelt. Alle anderen Phenothiazine erzielten gute Präzision und Genauigkeit mit guter Linearität im gemessenen Konzentrationsbereich zwischen 2 pmol/µl bis 10 fmol/µl.

Eine Zusammenfassung wichtiger analytischer Parameter wie LOQ, Präzision und Richtigkeit, sowie Linearität mit Levomepromazin als IS ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

variable Konz. IS	LOQ [ng/ml]	Ø% RSD	Ø% Fehler	R²
Promethazin	1,4	5,4	6,4	0,9996
Chlorprothixen	1,6	6,1	4,9	0,9930
Chlorpromazin	1,6	6,2	5,9	0,9975
Perazin	1,7	6,3	9,9	0,9979
Trifluopromazin	1,8	8,4	6,1	0,9977
Thioridazin	1,9	7,2	6,7	0,9989
Trifluoperazin	4,1	8,6	10,4	0,9964
Flupentixol	4,4	9,2	10,3	0,9938
Fluphenazin	4,4	9,3	11,0	0,9957

Tabelle 3.5 Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der gemessenen Phenothiazine mit Levomepromazin als IS (variable IS-Konzentration)

Als weiterer Schwierigkeitsgrad bei der Quantifizierung muss nun die Messung mit konstanter IS-Konzentration bewältigt werden.

3.5.2 Quantifizierung der Phenothiazine mit konstanter IS-Konzentration

Gewöhnlich wird der Probe der IS mit konstanter Konzentration zugegeben, da die Konzentration des Analyten unbekannt ist. Hier können insbesondere bei hohen Konzentrationsunterschieden zwischen IS und Analyt aufgrund der Ionensuppression Probleme auftreten. Vor allem wenn ein Stoff in sehr hoher Konzentration vorliegt bzw. sehr gut ionisiert wird, unterdrückt er alle anderen Signale. Dies spiegelt sich dann in höherer Standardabweichung, höherem Fehler und zusätzlich in höheren Bestimmungsgrenzen wieder.

Zur Bestimmung der Phenothiazine wurde Levomepromazin als IS mit konstanter IS-Konzentration von 50 fmol/ μ l verwendet. Durch die Verwendung einer relativ niedrigen Konzentration für den IS konnten auch geringe Konzentrationen an Analyt ohne Ionensuppression gemessen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Resultaten von GUSEV *et al.* [1996] und SLENO und VOLMER [2006], welche die Konzentration des IS nahe des höchsten Standards der Kalibrierkurve wählten. Dies führte bei den Phenothiazinen zu höheren Nachweisgrenzen aufgrund Ionensuppression.

Es zeigte sich, dass mit einem molarem Verhältnis von Analyt zu IS zwischen 0,1 bis 20 gut quantifiziert werden konnte. Dies bedeutet in Zahlen, dass bei Verwendung des IS mit z.B. 100 fmol/ μ l im Bereich 10-2000 fmol/ μ l gut quantifiziert werden konnte. Teilweise konnte auch mit höherem Unterschied quantifiziert werden. Diese Ergebnisse entsprechen im Ansatz denen von KANG *et al.* [2000]. Diese erzielten bei der Quantifizierung von Phenylethylamin bessere Präzision, wenn der IS im molaren Verhältnis zwischen 0,2 und 5 gegenüber dem Analyten vorlag. Der dabei erzielte dynamische Bereich konnte also nahezu verzehnfacht werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung mit Levomepromazin als IS sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

	LOQ [ng/ml]	Ø% RSD	Ø% Fehler	R ²
Promethazin	1,4	5,3	4,7	0,9984
Chlorprothixen	1,6	5,0	6,7	0,9902
Chlorpromazin	1,6	4,4	6,1	0,9922
Perazin	1,7	6,0	7,2	0,9988
Trifluopromazin	1,8	6,0	6,5	0,9942
Thioridazin	1,9	6,3	8,2	0,9968
Trifluoperazin	2,0	8,9	11,0	0,9889
Flupentixol	2,2	9,1	9,9	0,9903
Fluphenazin	2,2	8,2	10,5	0,9946

Tabelle 3.6 Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der gemessenen Phenothiazine mit Levomepromazin als IS mit konstanter Konzentration von 50 fmol/µl

Die gleichzeitige Quantifizierung der neun Phenothiazine erzielte eine gute Linearität (R² zwischen 0,989 und 0,999), Präzision (ØRSD zwischen 4,4 und 9,1%) und Richtigkeit (ØFehler zwischen 4,7 und 11,0%). Diese Werte entsprechen den Vorgaben der FDA für bioanalytische Methoden in der Industrie [U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* 2001].

Ein typischer Trend, dass mit sinkender Analytkonzentration die RSD und der Fehler steigt, ist auch bei MALDI-MS zu beobachten. Dieser Trend wurde auch bei steigenden Konzentrationen beobachtet. So lag der Fehler z.B. bei 5 pmol/µl über den geforderten 20% und daher konnte diese Konzentration nicht mehr ausreichend genau bestimmt werden. Der Arbeitsbereich der Methode lag zwischen 5 fmol/µl bis 2 pmol/µl.

Die simultane Quantifizierung der verwendeten Phenothiazine konnte sowohl mit variabler als auch mit konstanter IS-Konzentration erfolgreich durchgeführt werden. Weder die „inhomogene“ Kristallisierung, noch Matrixsignale störten die Quantifizierung der Arzneistoffe. Durch Aufsummieren von mindestens 2000 Laserschüssen wurden die Kriterien der FDA von ±15/20% für Präzision und Richtigkeit erfüllt. Beim verwendeten AB 4800, welches mit einem 200 Hz Laser

ausgestattet ist, dauerte eine Messung folglich ~ 10 Sekunden und ist damit um ein vielfaches schneller als vergleichbare LC-MS Methoden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch MALDI-TOF-MS gut im niedrigen Massenbereich eingesetzt werden kann. Dabei war neben der Identifizierung der Analyten über die genaue Masse auch der wichtigere Aspekt der Quantifizierung einfach und schnell durchführbar. Sowohl Linearität als auch Richtigkeit und Präzision der entwickelten Methode waren innerhalb der geforderten Richtlinien. Durch den Einsatz eines IS in Kombination mit der optimierten Präparation und ausreichend aufsummierten Einzelschussspektren waren Probleme mit der Reproduzierbarkeit aufgrund „inhomogener“ Kristallisation nicht gegeben. In weiteren Versuchen musste nun die Anwendbarkeit auf reale Proben untersucht werden.

3.5.3 Quantifizierung der Phenothiazine in menschlichem Plasma

Um eine reale Probe zu simulieren wurde humanes Plasma mit den Phenothiazinen versetzt, aufgereinigt und gemessen. Für die Probenvorbereitung wurden eine Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) im Vergleich zu einer Proteinfällungsmethode (PP) verwendet (siehe Methodenteil 6.5.3). Dabei stellte sich heraus, dass nur die LLE ausreichend „saubere“ Proben für eine direkte Messung mit MALDI erzeugte. Nach Proteinfällung kam es erst nach Verdünnung der Probe bzw. Waschen des Probenspots zu einer Kristallisation. Da durch das Waschen eventuell Probe verloren geht und dadurch neben der Reproduzierbarkeit auch die Sensitivität der Methode leidet, wurde die LLE zur Aufreinigung verwendet. Diese Ergebnisse wurden von KOVARIK, *et al.* [2007] und WAGNER *et al.* [2008] bestätigt. So entfernt PP nur die Plasmaproteine während die LLE zu sauberen Extrakten führt [HOPFGARTNER und BOURGOGNE 2003].

Nach durchgeführter LLE konnten alle getesteten Phenothiazine in menschlichem Plasma gleichzeitig mit guter Linearität (R^2 zwischen 0,988 und 1,000), Präzision (\emptyset RSD zwischen 4,1 und 10,5%) und Richtigkeit (\emptyset Fehler zwischen 5,9 – 11,8%) quantifiziert werden. Dabei lag die Bestimmungsgrenze zwischen 1 - 5 ng/ml und damit nur geringfügig höher als bei Standardproben. In Tabelle 3.7 sind die

Ergebnisse der neun verschiedenen in Human Plasma gespikten Phenothiazine aufgeführt. Dabei diente Levomepromazin mit konstanter finaler Konzentration von 100 fmol/μl als IS.

	LOQ [ng/ml]	Ø% RSD	Ø % Fehler	R ²
Promethazin	2,9	5,3	6,6	0,999
Chlorprothixen	3,2	10,4	11,5	0,991
Chlorpromazin	3,2	10,5	8,8	0,988
Perazin	3,4	8,8	6,6	1,000
Trifluopromazin	3,5	9,1	11,8	0,996
Thioridazin	3,7	9,7	5,9	0,996
Trifluoperazin	4,1	4,1	7,9	0,992
Flupentixol	4,4	5,9	6,3	0,999
Fluphenazin	4,4	4,9	6,7	0,996

Tabelle 3.7 Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Linearität der in menschliches Plasma gespikten Phenothiazine mit Levomepromazin als IS (100 fmol/μl)

Die erzielten Ergebnisse für die Bestimmung der Phenothiazine sind mit anderen in der Literatur veröffentlichten Methoden zur Bestimmung dieser Stoffe vergleichbar oder besser. DIEHL und KARST [2000] verwendeten eine oxidative Derivatisierung nach erfolgter LC-Trennung für die Bestimmung der Phenothiazine in Standardlösungen. Mittels Fluoreszenzdetektion der derivatisierten Phenothiazine erzielten sie je nach Analyt ein absolutes Detektionslimit zwischen 80-6000 fmol. HAYEN und KARST [2003] quantifizierten verschiedene Phenothiazine in Standardlösungen mittels LC/ESI-MS, LC/APCI-MS und LC/Elektrochemie/Fluoreszenzdetektion. Die Bestimmungsgrenze von LC/ESI-MS oder LC/APCI-MS lag dabei zwischen 150-1000 fmol auf der Säule. Mittels elektrochemischer Derivatisierung konnte die Bestimmungsgrenze auf 20-100 fmol auf der Säule verbessert werden [HAYEN und KARST 2003]. Trotz der elektrochemischen Derivatisierung waren die Bestimmungsgrenzen deutlich höher

als die mit MALDI erzielten Werte, sowohl für Standardlösungen (5 fmol/ μ l) als auch für die Plasmaproben (10 fmol/ μ l).

Ein weiteres LC basiertes Verfahren wurde von TANAKA *et al.* [2007] etabliert. Dabei erreichten sie mit einer LC-Laufzeit von ~70 Minuten eine gleichzeitige Quantifizierung von 12 Phenothiazinen mit einer absoluten Nachweisgrenze von 560-640 fmol. Für die mittels Flüssigextraktion aufgearbeiteten Serumproben wurde allerdings keine MS- sondern eine UV-Detektion verwendet, die bekannterweise höhere Nachweisgrenzen besitzt.

Eine weitere Methode wurde kürzlich von SARACINO *et al.* [2008] vorgestellt. Sie verwendeten nach Festphasenextraktion eine LC mit coulometrischer Detektion zur Bestimmung von vier Phenothiazinen in menschlichem Plasma. Die berechnete Bestimmungsgrenze (S/N = 10) auf der Säule lag zwischen 23 und 76 fmol und war damit immer noch um den Faktor 2-8 höher als die hier ermittelten Werte mit MALDI. Dabei ist die benötigte Messzeit aller Methoden mit im Schnitt 30-60 min um ein vielfaches höher als die bei MALDI-TOF-MS benötigte Analysenzeit.

Die gleichzeitige Quantifizierung der Mischung verschiedener Phenothiazine in menschlichem Plasma mittels MALDI-TOF-MS beweist die Anwendbarkeit dieser Methode auch für reale Proben. Es wurde dieselbe Probenvorbereitung verwendet, welche auch beim Einsatz einer LC-Methode notwendig ist. Dabei zeigte sich, dass MALDI auch ohne flüssigchromatographische Reinigung und Trennung der Analyten mittels LC hervorragende Ergebnisse liefert. Diese direkte und dabei trotzdem sehr sensitive Messung ohne LC ermöglicht es, einen sehr viel höheren Probendurchsatz zu erreichen.

3.6 Bestimmung verschiedener Arzneistoffe

Nachdem die Quantifizierung der Phenothiazine in Standardlösungen und Plasmaproben erfolgreich durchgeführt wurde, wurde in den folgenden Experimenten eine Gruppe chemisch und pharmazeutisch nicht verwandter Arzneistoffe bestimmt. Die Strukturen der verwendeten Stoffe sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

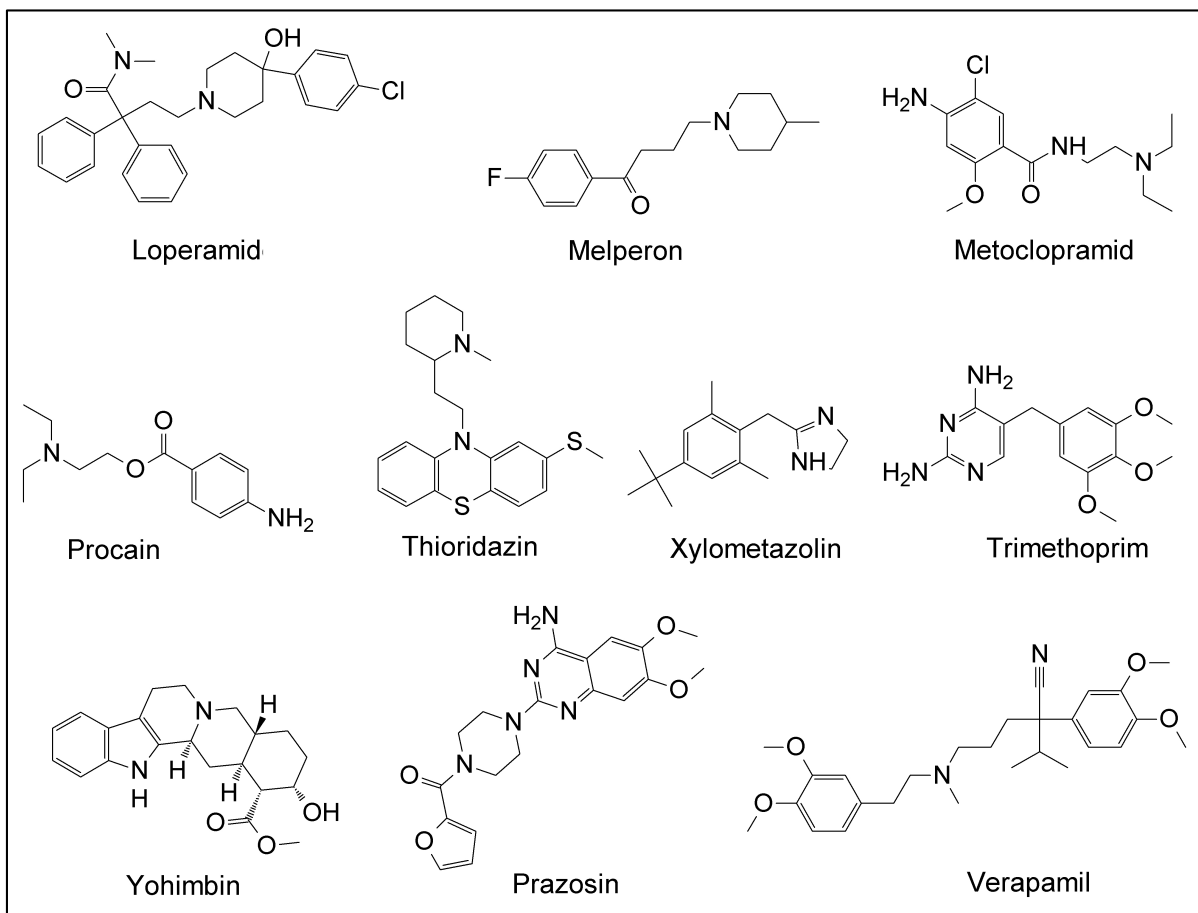


Abbildung 3.17 Strukturen der verwendeten, verschiedenen Arzneistoffe

Wieder wurde auf den Einsatz eines isopenmarkierten internen Standards bewusst verzichtet. Auch der Einsatz eines chemisch eng verwandten Stoffes war durch die unterschiedlichen Strukturen der Analyten nicht möglich. GUSEV *et al.* [1996] zeigten, dass für eine Quantifizierung mittels MALDI ein konstant molares Verhältnis von Analyt und IS gegenüber der Matrix von Vorteil ist. Dies ist jedoch für Proben mit unbekannter Konzentrationen nur schwer praktikabel.

SLENO und VOLMER [2006] wiesen darauf hin, dass für eine Quantifizierung mittels MALDI-MS der Analyt und IS ähnliche Molekulargewichte (MW) und ähnliche Verteilungskoeffizienten ($\log D$) benötigt.

3.6.1 Quantifizierung verschiedener Arzneistoffen mit variabler IS-Konzentration

Trotz der erwähnten Vorgaben hinsichtlich Molekulargewicht und Verteilungskoeffizienten wurde die Mischung der zehn Arzneistoffe im Konzentrationsbereich zwischen 2 pmol/ μ l – 1 fmol/ μ l gemessen. Dabei wurde jeder Stoff als IS mit konstantem Verhältnis Analyt/IS verwendet.

Es lag die Vermutung nahe, dass die Verwendung eines strukturell nicht verwandten IS mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Verteilungskoeffizient zu Problemen bei der Co-Kristallisation und damit zu höheren RSD Werten führt. Dies konnte jedoch nur bedingt bestätigt werden, da viele Stoffe trotz ihrer Unterschiede durchaus als IS geeignet waren. Zwar waren teilweise etwas höhere RSD-Werte und zu geringe Linearitäten zu beobachten, allerdings betraf dies meist bestimmte Konzentrationen oder einzelne Stoffe. So konnte z.B. mit Thioridazin als IS keine Quantifizierung durchgeführt werden, da sowohl hohe RSD als auch schlechte Linearität vorlag. Mit Verapamil als IS war die Präzision meist gut, jedoch die Linearität teilweise zu gering. Trimethoprim als IS erzielte die besten Ergebnisse und wurde daher für die wichtigere Messung mit konstanter Konzentration verwendet. Eine Übersicht der Ergebnisse mit variabler IS-Konzentration ist in den Tabellen 7.2 im Anhang dargestellt.

3.6.2 Quantifizierung verschiedener Arzneistoffe mit konstanter IS-Konzentration

Für die Messung mit konstanter IS-Konzentration wurde mit 50 fmol/ μ l erneut eine relativ niedrige Konzentration für den IS gewählt. Parallel wurde hier noch der Einfluss der Anzahl aufsummierter Laserschüsse untersucht. Da eine möglichst schnelle Methode entwickelt werden sollte, sollten so wenige Laserschüsse wie möglich aufsummiert werden. Dabei war es natürlich zwingend notwendig, weiterhin reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Es zeigte sich, dass es notwendig war mindestens 1000 Laserschüsse aufzusummieren. Selbst dann kam es teilweise zu Ausreißerwerten. Zusätzlich wurden noch 2000- und 5000 Laserschüsse aufsummiert und die erzielten Ergebnisse verglichen. Die Linearität bei der Messung von Metoclopramid und die durchschnittliche Standardabweichung bei unterschiedlicher Anzahl an Laserschüssen ist in Tabelle 3.8 dargestellt.

Anzahl Laserschüsse	Linearität [R^2]	$\bar{\sigma}$ RSD [%]
1000	0.994	9.4
2000	0.996	8.2
5000	0.996	5.3

Tabelle 3.8 **Auswirkung der Anzahl aufsummierter Laserschüsse**
auf Linearität und relative Standardabweichung

Auf den ersten Blick sind nur geringe Unterschiede erkennbar und alle drei Messungen zeigen gute Ergebnisse. Die Linearität und durchschnittliche RSD ist bei 2000 und 5000 Laserschüssen etwas besser. Allerdings traten bei 1000 aufsummierten Einzelschussspektren teilweise RSD-Werte von 15-20% auf. Dies kann bei der Quantifizierung aufgrund der $\pm 15/20\%$ Regel zu Problemen führen, weil somit eine reproduzierbare Bestimmung nicht mehr gewährleistet werden kann. Anders bei 5000 summierten Schüssen, bei dem die höchste RSD 9,1% betrug. Bei 2000 aufsummierten Laserschüssen war die RSD zwar etwas schlechter als bei 5000 Schuss, allerdings waren alle RSD-Werte unter 15%. Daher wurden bei den späteren

Quantifizierungen, falls nicht anders erwähnt, immer 2000 Laserschüsse aufsummiert. Die genauen Ergebnisse sind in der Anlage unter Tabelle 8.3 zu finden.

Der Einsatz von Trimethoprim als IS mit konstanter Konzentration für diese Gruppe nicht verwandter Arzneistoffe erzielte gute Linearität (R^2 zwischen 0,987 und 0,999), Präzision (σ RSD zwischen 6,6 und 11,0%) und Übereinstimmung (σ Fehler zwischen 5,2 und 12,3%). Die Linearität ist am Beispiel Verapamil in Abbildung 3.18 dargestellt.

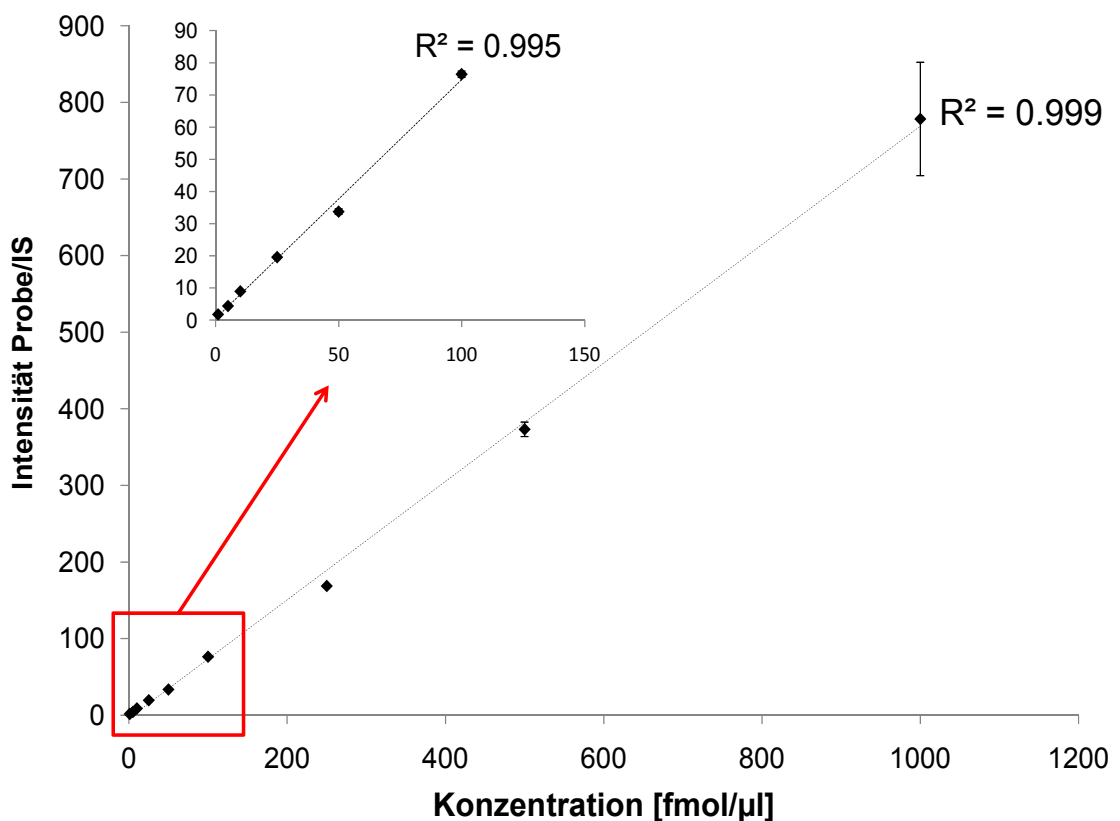


Abbildung 3.18 Linearität und Präzision von Verapamil mit Trimethoprim als IS (50 fmol/µl)

Die Fehlerbalken bei den niedrigeren Konzentrationen sind aufgrund sehr guter Präzision kaum zu erkennen. Auch die Linearität im Arbeitsbereich von 1 pmol/µl bis 5 fmol/µl war mit R^2 : 0,999 exzellent. Selbst im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 100 fmol/µl bis 5 fmol/µl war die Linearität mit R^2 : 0,995 immer noch gut. Das Quantifizierungslimit der verwendeten Arzneistoffe lag im Bereich 1-5 ng/ml. Der

Arbeitsbereich lag für Procain und Yohimbin im Bereich 5 – 2000 fmol/μl, für die anderen Analyten im Bereich 5-10 fmol/μl bis 1000 fmol/μl. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für diese Mischung mit Trimethoprim als IS ist in Tabelle 3.9 aufgeführt.

	LOQ [ng/ml]	Ø% RSD	Ø% Fehler	R²
Procain	1,2	8,3	7,4	0,994
Xylometazolin	2,5	11,0	10,1	0,987
Melperon	1,3	6,9	5,2	0,999
Metoclopramid	3,0	8,0	6,9	0,998
Yohimbin	1,8	7,6	7,2	0,994
Thioridazin	3,7	6,7	9,8	0,987
Prazosin	3,8	8,0	12,3	0,988
Verapamil	2,2	7,0	5,8	0,997
Loperamid	4,8	6,6	10,3	0,997

Tabelle 3.9 Ergebnisse für die Mischung verschiedener Arzneistoffe mit Trimethoprim als IS (50 fmol/μl)

Auch bei einer Gruppe unterschiedlicher Substanzen war es möglich, mit nur einem IS alle Analyten gleichzeitig zu quantifizieren. Anders als von SLENO und VOLMER [2006] scheint der Verteilungskoeffizient log D bei dieser Methode keine Auswirkung auf die Eignung eines Stoffes als IS zu haben. Der verwendete IS hatte im Vergleich zu den Analyten einen unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten und ein anderes Molekulargewicht. Tabelle 3.10 zeigt die Verteilungskoeffizienten log D der untersuchten Arzneistoffe.

Nichtverwandte Arzneistoffe	MW	log D	Phenothiazine	MW	log D
Procain	236	-3,03	Promethazin	284	3,39
Xylometazolin	244	-0,55	Chlorpromazin	318	0,57
Melperon	263	-0,46	Chlorprothixen	315	0,48
Metoclopramid	299	-1,5	Perazin	339	-3,62
Yohimbin	354	-1,42	Triflupromazin	352	0,53
Thioridazin	370	1,4	Thioridazin	370	1,4
Prazosin	383	-1,42	Trifluoperazin	407	3,31
Verapamil	454	0,04	Flupentixol	434	-1,6
Loperamid	476	0,08	Fluphenazin	437	1,05
IS-Trimethoprim	290	-2,63	IS- Levomepromazin	328	0,92

Tabelle 3.10 Berechnete Verteilungskoeffizienten und Molekulargewicht

Der Unterschied der Verteilungskoeffizienten log D der Analyten ist ziemlich groß und lässt keinerlei Zusammenhang in Bezug auf den Wert des IS schließen. So waren die erzielten Ergebnisse von Procain (log D -3,03) und Verapamil (log D 0,04) bei der Verwendung von Trimethoprim als IS (log D -2,63) vergleichbar. Trotz des viel größeren Unterschieds zum log D Wert des IS erzielte Verapamil sogar eine geringfügig bessere Genauigkeit und Linearität als Procain.

Auch bei der Quantifizierung der Phenothiazine spielt der Verteilungskoeffizient log D keine Rolle. Obwohl diese Substanzklasse strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, sind die Verteilungskoeffizienten und die Molekularmassen verschieden. Wahrscheinlich bewirkt die für kleine Moleküle optimierte Probenpräparation eine homogenere Kristallschicht. In Verbindung mit einer ausreichenden Anzahl von aufsummierten Einzelschussspektren minimiert dies die Varianz der Intensitäten und kann so die Unterschiede zu den Ergebnissen von SLENO und VOLMER [2006] erklären.

Nichtsdestotrotz stellt ein isotoopenmarkierter IS die beste Wahl dar. Ist dieser nicht verfügbar, ist eine Quantifizierung auch mit einem strukturell verwandten Stoff als IS möglich. Zudem kann auch ein strukturell nicht verwandter Stoff verwendet werden. Eine generelle Einteilung in geeignete und nicht geeignete IS aufgrund des log D Werts war dabei nicht möglich. Eine experimentelle Untersuchung ist stets notwendig und die Verwendung des log D Wertes stellt allenfalls einen Ausgangspunkt dar.

3.7 Bestimmung des Wirkstoffgehalts einer Tablette

Zur weiteren Absicherung der Quantifizierungsmethode wurde der Wirkstoff einer handelsüblichen Tablette untersucht. Dabei war nur wenig Probenvorbereitung notwendig. Die Tablette wurde lediglich gelöst, mit 80% ACN verdünnt und anschließend direkt gemessen. Erneut wurden verschiedene IS getestet und die Bedeutung des Verteilungskoeffizienten $\log D$ als wichtiges Auswahlkriterium für die Wahl des IS geprüft. Als IS wurden Levomepromazin ($\log D$ 0,92), Trimethoprim ($\log D$ -2,63) und Yohimbin ($\log D$ -1,42) verwendet. Diese Stoffe wurden gewählt, weil die Werte niedriger, höher und gleich dem Verteilungskoeffizienten des Analyten Prazosin ($\log D$ -1,42) sind. Erneut war die Verwendung des $\log D$ Werts keine Hilfe. Yohimbin mit dem gleichen Verteilungskoeffizienten führte zu den schlechtesten Ergebnissen und war für die valide Quantifizierung der Tablette nicht geeignet. Mit den zwei anderen IS war jedoch eine Quantifizierung möglich. Dabei waren wieder 2000 aufsummierte Laserschüsse ausreichend, um die FDA Kriterien für Richtigkeit und Präzision zu erfüllen. Levomepromazin als IS erzielte geringfügig bessere Ergebnisse als Trimethoprim. Der Wirkstoff der Tablette konnte im Konzentrationsbereich zwischen 1,9 ng/ml (5 fmol/ μ l) – 768 ng/ml (2 pmol/ μ l) mit guter Linearität (R^2 : 0,996), Präzision und Richtigkeit bestimmt werden. Der Einsatz von Trimethoprim als IS führte zu etwas besserer Linearität (R^2 : 0,9995), aber der Arbeitsbereich der Methode war kleiner (5 fmol/ μ l – 1 pmol/ μ l). Auch die Präzision war etwas schlechter. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die gemessene Tablette mit unterschiedlichen IS ist in Tabelle 3.11 dargestellt.

Prazosin Tablette	Konz. [fmol/ μ l]	% RSD	% Fehler	R ²
IS Trimethoprim	2000	3,9	-26,7	0,9995
	1000	5,4	14,9	
	500	2,2	12,5	
	250	4,5	8,9	
	100	11,4	-7,6	
	50	11,3	-15,8	
	25	15,2	8,5	
	10	7,5	-5,3	
	5	4,3	19,3	
	1	n.d.	n.d.	
IS Levomepromazin	2000	14,3	5,4	0,996
	1000	8,4	17,5	
	500	10,5	13,9	
	250	19,2	14,1	
	100	10,3	4,6	
	50	13,9	-11,7	
	25	7,7	5,0	
	10	2,8	-18,9	
	5	13,5	-20,0	
	1	173,2	-24,0	

Tabelle 3.11 Quantifizierung einer Prazosin Tablette mit verschiedenen IS

Der analysierte Gehalt der Tablette wurde mit der Herstellerangabe verglichen. Bei Verwendung von Levomepromazin als IS wurde ein Gehalt von $1,01 \pm 0,14$ mg Prazosin pro Tablette gefunden. Mit Trimethoprim als IS wurde $1,04 \pm 0,12$ mg Prazosin pro Tablette bestimmt. Der ermittelte Gehalt des Wirkstoffs war in beiden Fällen mit der Herstellerangabe 1,0 mg Prazosin pro Tablette äquivalent und ergab einen Fehler von 1% bzw. 4%. Diese Ergebnisse zeigen, dass Wirkstoffe einer Tablette schnell und direkt ohne Aufarbeitung mittels MALDI-TOF-MS bestimmt werden können. Die Salze und weiteren Tablettenhilfsstoffe stören die MALDI

Ergebnisse und Diskussion

Messung nicht. Diese Methode stellt daher eine interessante Option für die Qualitätskontrolle und Routineanalytik dar, da neben der Identifizierung des Wirkstoffs auch eine sehr schnelle Quantifizierung möglich war. Der Einsatz einer LC war erneut nicht notwendig.

3.8 Bestimmung von Acetylcholin und Cholin in Mikrodialyseproben

Ausgehend von einer Zusammenarbeit mit Dr. Martina Zimmermann aus dem Arbeitskreis von Professor Klein (Fachbereich 14, Pharmakologie, Goethe Universität Frankfurt) ergab sich die Herausforderung, eine alternative Methode zur Bestimmung der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und Cholin (Ch) in Dialyseproben zu entwickeln. Diese Aufgabe stellte hohe analytische Anforderungen, da die Probe mit einem hohen Salzgehalt verunreinigt war und zugleich die Analyten nur in geringer Konzentration vorlagen.

Zuerst musste überprüft werden, inwieweit die, zur Dialyse verwendete künstliche Hirnflüssigkeit (aCSF) die Messung mit MALDI-MS beeinflusst und ob die erzielten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für *in-vivo* Mikrodialyseproben ausreichen. Nach dieser Methodenentwicklung mit Standardlösungen wurden mehrere CD1 Mäuse vorbereitet und Mikrodialyse Proben aus dem extrazellulären Raum des Striatum gewonnen. Da für die MALDI Analyse nur sehr wenig Probe (1 µl) benötigt wird, wurde untersucht, ob die zeitliche Auflösung der Mikrodialyse verbessert werden kann.

3.8.1 Methodenentwicklung in künstlicher Hirnflüssigkeit

Für die Methodenentwicklung musste zuerst überprüft werden, inwieweit die verwendete aCSF die Messung mittels MALDI-MS beeinflusste. Dabei stellte die hohe Konzentration an Salzen (~ 150 mM) der aCSF augenscheinlich ein Problem dar. Aufgrund des starken Salzcharakters von Ch und ACh ist eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Analyten bzw. eine Abtrennung der Salze der Extraktionslösung nur schwer möglich. Versuche mit Festphasenaufreinigungen schlugen alle fehl. Bei RP C18 Material bestand zu wenig Retention und der Analyt wurde nicht gebunden. Bei Verwendung von Kationenaustauschern war dieser sofort mit Salzen gesättigt. Auch bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen bestand aufgrund der Ähnlichkeit der Analyten gegenüber den Salzen wenig Hoffnung auf Erfolg.

Es zeigte sich jedoch, dass trotz des hohen Salzgehalts eine direkte und sensitive Messung mittels MALDI-MS möglich war. Auch die Matrixsignale und Salzaddukte der Matrix störten die Messung nicht. Aufgrund der hohen Auflösung war es möglich, das Matrixsignal $[M+H-CO_2]^+$ bei m/z 146,06 klar vom Analytsignal des ACh bei m/z 146,12 zu trennen. Abbildung 3.19 zeigt ein typisches Spektrum mit Ch und ACh und den zugehörigen IS in aCSF.

Ä

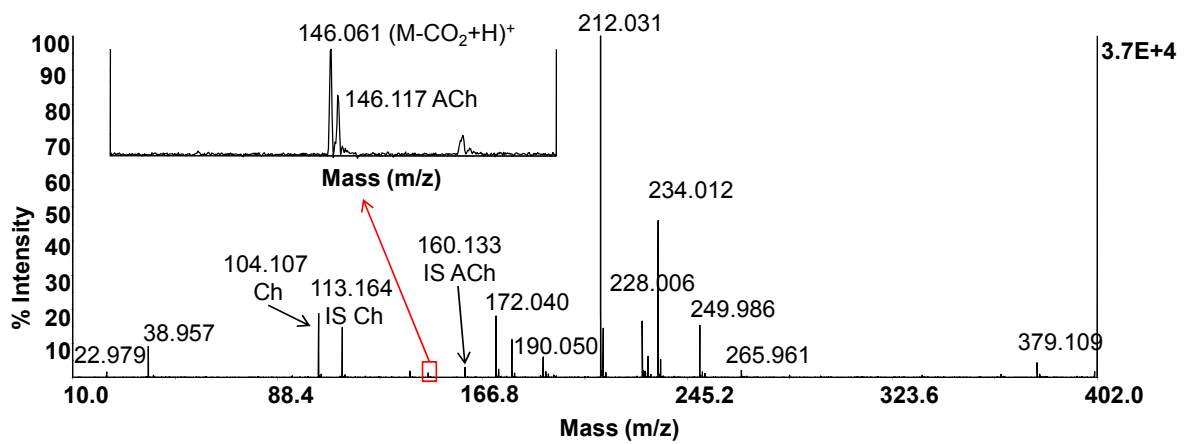


Abbildung 3.19 Spektrum einer Probe mit 25 fmol/µl ACh

100 fmol/µl acetyl-β-methylcholin (IS ACh), 2,5 pmol/µl Ch und 2,5 pmol/µl Cholin-D₉ in künstlicher Hirnflüssigkeit. Die Vergrößerung zeigt die noch Basislinien-getrennten Signale der Matrix $(M-CO_2+H)^+$ von ACh.

Aufgrund der hohen Salzkonzentration waren die kationisierten Matrixsignale sehr dominant vertreten, störten aber nicht die Detektion der Analyten. Hier zeigt sich der Vorteil der hohen Auflösung eines modernen TOF-Analysators. Durch interne Kalibrierung mit Matrixsignalen wird zudem eine hohe Massengenauigkeit erreicht, welche wiederum eine hohe Signifikanz gewährleistet. In Abbildung 3.19 beträgt z.B. die Massenabweichung von ACh weniger als 5 ppm. Bei solch hoher Massengenauigkeit und gleichzeitig geringer Masse ist eine eindeutige Identifizierung möglich. Neben der Identifizierung der Neurotransmitter war jedoch die Quantifizierung die Hauptaufgabe. Aufgrund der 100% wässrigen Probelösung war eine für die Quantifizierung kleiner Moleküle notwendige, schnelle Trocknung

des Probenspots schwierig. Die langsame Trocknung und der hohe Salzanteil trugen zu einer nichthomogenen Kristallisation mit großen Kristallen bei, was zu hohen Standardabweichungen führte. Daher wurde das Protokoll verändert und zuerst die Probe gespottet und getrocknet. Anschließend wurde die Matrixlösung (80% ACN mit 0,01% TFA v/v) auf den trockenen Probenspot aufgetragen. Nachdem die Probe komplett gelöst war, wurde der Spot unter einen Luftstrom schnell getrocknet. Diese nun schnelle Trocknung erzielte eine homogenere Matrix/Analyt Co-Kristallisation mit gleichzeitig kleinerer Kristallgröße. Es wurden 2000 Laserschüsse aufsummiert, wobei mit der hohen Zahl an Laserschüssen in Kombination mit der optimierten, homogenen Probenpräparation deutlich geringere Standardabweichungen erzielt wurden.

Zur Überprüfung, ob MALDI-MS zur Quantifizierung der Neurotransmitter ACh und Ch in künstlicher Hirnflüssigkeit geeignet ist, wurden Verdünnungsreihen der Analyten in aCSF gemessen. Um reale Proben zu simulieren, war die Konzentration an Ch stets 100-fach höher als die ACh-Konzentration.

3.8.2 Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration

Die Messungen fanden sowohl am AB 4800 als auch am Voyager STR statt, wobei nicht nur die Messung sondern auch die spätere Auswertung der zahlreichen Spektren am AB 4800 automatisierbar und damit deutlich komfortabler und weniger zeitaufwändig war. Die Messungen am Voyager STR wurden von Linda Müller im Rahmen ihrer Bachelor Arbeit durchgeführt. Zuerst wurde Acetyl- β -methylcholin (AMCh) als einziger IS mit variabler Konzentration verwendet und lag in derselben Konzentration wie ACh vor. Es stellte sich heraus, dass durch den hohen Konzentrationsunterschied des IS zu Ch, keine Quantifizierung von Ch aufgrund zu hoher RSD-Werte möglich war. Tabelle 3.12 zeigt die Auswertung einer Messreihe mit AMCh als IS, der in derselben Konzentration wie ACh vorlag. Anders als für ACh, bei dem gute Präzision erreicht wurde, liegt bei Ch eine zu hohe Standardabweichung vor. Eine Erhöhung der Konzentration des IS auf das Niveau von Ch brachte wiederum dieselben Probleme für ACh. Bei Verwendung einer

konstanten Konzentration an IS konnte zudem für Ch keine ausreichend gute Linearität erreicht werden.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [fmol/μL]
	Ch	ACh	
500	31,37	3,82	5000
100	52,77	2,95	1000
50	33,61	10,60	500
25	30,88	4,62	250
10	35,33	14,98	100
5	29,32	12,52	50
2,5	29,79	27,51	25
1	1,34	21,85	10

Tabelle 3.12 Auswertung ACh und Ch mit einem IS

AMCh wurde als IS mit variabler Konzentration verwendet. Messung fand am Voyager STR statt.

Abhilfe für diese Problematik brachte der Einsatz eines zweiten IS. Dazu wurde ein isotopenmarkierten IS gewählt, um ihn mit dem strukturell ähnlichem IS AMCh zu vergleichen. Zuerst wurden beide IS wieder mit variabler Konzentration verwendet. Die erzielten Ergebnisse waren sowohl am Voyager STR als auch am AB 4800 vielversprechend. In Tabelle 3.13 sind die am AB 4800 gemessenen Verdünnungsreihen mit relativer Standardabweichung, Richtigkeit und Linearität aufgeführt. Die Daten des Voyager STR sind im Anhang unter Tabelle 8.6 und 8.7 zu finden.

Cholin			Acetylcholin		
Konz. [pmol/μl]	% RSD	% Fehler	Konz. [fmol/μl]	% RSD	% Fehler
250	0,31	4,14	2500	1,76	-1,64
100	1,14	1,90	1000	1,55	0,98
50	0,64	8,70	500	7,79	-9,56
25	3,45	9,08	250	7,85	-5,85
10	3,72	5,00	100	3,20	-2,27
5	0,71	-2,24	50	1,50	-8,19
2,5	2,10	4,75	25	1,27	-7,16
1	1,01	0,88	10	0,41	-11,83
0,5	3,59	0,51	5	4,86	-8,26
0,1	3,01	3,00	1	n.d.	n.d.
Linearität (R ²)		1,0000	Linearität (R ²)		0,9990

Tabelle 3.13 Auswertung ACh und Ch mit zwei IS

Die IS lagen mit derselben Konzentration wie die Analyten vor

Ch konnte über die ganze Verdünnungsreihe mit exzellenter Linearität $R^2: 1,000$, Präzision und Richtigkeit gemessen werden. Auch ACh wurde mit sehr guter Linearität, Präzision und Richtigkeit bestimmt. Bei $1 \text{ fmol}/\mu\text{l}$ war der IS jedoch nicht mehr detektierbar, folglich war auch ACh nicht quantifizierbar, aber noch detektierbar. Diese Werte zeigen, dass trotz des hohen Salzgehalts der künstlichen Hirnflüssigkeit eine direkte und sensitive Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS möglich war. Die geringe Standardabweichung von Ch bei dem Einsatz des isotonenmarkierten IS zeigt, dass auch MALDI-TOF-MS sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielen kann. Es war nur ein geringer Unterschied zwischen beiden IS feststellbar. Die Präzision und Linearität war in beiden Fällen sehr gut, jedoch für Ch etwas besser. Die geringfügig besseren Ergebnisse für Ch können aber auch an der höheren Konzentration liegen, da hier inhomogene Probenpräparationen weniger stark ins Gewicht fallen. Falls isotonenmarkierte Standards verfügbar sind, sind diese allen anderen Standards vorzuziehen. Ihr Einsatz ist aber nicht zwingend notwendig, und auch mit anderen IS können reproduzierbare Daten erhalten werden.

3.8.3 Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration

Nach der erfolgreichen Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration wurde nun mit konstanter Konzentration quantifiziert. Dabei wurde erneut neben dem AB 4800 auch am Voyager STR gemessen. Der Einsatz von nur einem IS zur Quantifizierung beider Analyten schlug aufgrund zu hoher Konzentrationsunterschiede fehl (siehe 3.8.2). Daher wurden auch hier zwei separate interne Standards verwendet. AMCh wurde mit 100 fmol/ μ l als IS für ACh eingesetzt. Ch-D₉ wurde mit 2,5 pmol/ μ l als IS für Ch verwendet. Sowohl Ch als auch ACh konnten mit dieser Methode erfolgreich quantifiziert werden. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse, gemessen am AB 4800 ist in Tabelle 3.14 dargestellt.

Cholin			Acetylcholin		
Konz. [pmol/ μ l]	% RSD	% Fehler	Konz. [fmol/ μ l]	% RSD	% Fehler
250	9,82	-4,26	2500	1,39	66,62
100	5,18	-33,83	1000	9,55	-4,05
50	10,16	-18,02	500	1,53	2,55
25	2,25	-18,41	250	4,78	6,65
10	1,95	-12,99	100	8,99	-4,86
5	0,74	0,65	50	6,13	-4,86
2,5	0,72	1,89	25	5,01	14,50
1	3,93	-12,27	10	7,02	6,06
0,5	1,01	-4,40	5	15,67	-1,27
0,1	8,11	15,62	1	18,32	10,75
0,05	8,49	68,91	0,5	50,97	941,15
Linearität (R ²)		0,9995	Linearität (R ²)		0,9996

Tabelle 3.14 Präzision, Richtigkeit und Linearität von Ch und ACh in aCSF

AMCh wurde mit 100 fmol/ μ l, Ch-D₉ mit 2,5 pmol/ μ l als IS eingesetzt.

Cholin wies dabei im Quantifizierungsbereich von 0,1 bis 50 pmol/ μ l eine exzellente Linearität von R²: 0,9995 auf und konnte mit guter Präzision und \bar{u} quantifiziert werden. Bei höherer Konzentration lag jedoch der Fehler über den

geforderten 20% und diese Konzentration war damit nicht mehr valide quantifizierbar. Auch Acetylcholin wies eine exzellente Linearität von $R^2: 0,9996$ im Arbeitsbereich auf. Selbst im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 5 und 50 fmol/ μl war die Linearität mit $R^2: 0,9977$ noch gut. ACh konnte im Bereich 1 bis 1000 fmol/ μl mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze wurde nach GIBBSON [1994] ($LOD = y_{\text{blank}} + 3 * \sigma$) und mittels Signal/Rausch Verhältnis 3:1 ermittelt und betrug für ACh in beiden Fällen 0,3 fmol/ μl . Ch konnte bis zu einer Nachweisgrenze von 20 fmol/ μl detektiert werden. Ein häufig zu beobachtender Trend analytischer Methoden nahe der Nachweisgrenze ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

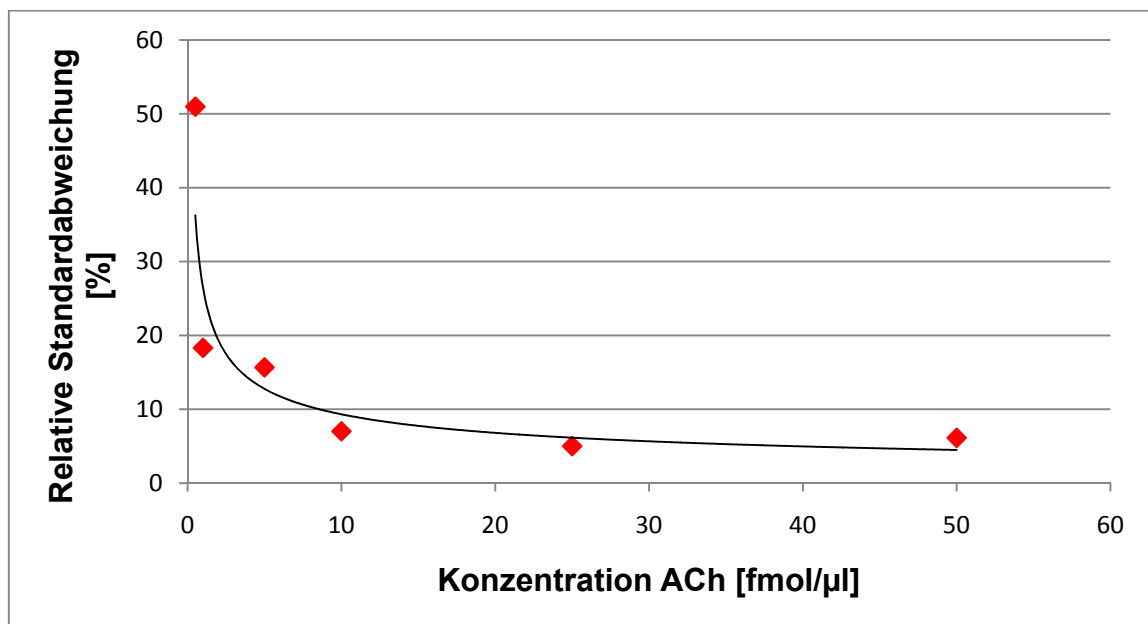


Abbildung 3.20 Einfluss der Konzentration auf die relative Standardabweichung am Beispiel von ACh in aCSF

Es zeigt sich deutlich, dass mit sinkender Konzentration die Standardabweichung immer weiter zunimmt. Die Messergebnisse für ACh und Ch am Voyager STR sind mit denen am AB 4800 vergleichbar. Auch hier war die Linearität gut. Aufgrund der manuellen Messung und der geringeren Zahl aufsummierter Laserschüsse (1000 Schuss) war die Standardabweichung jedoch teilweise höher. Auch war das ältere Gerät im Bezug auf die Empfindlichkeit schlechter als das neuere AB 4800. So lag die Bestimmungsgrenze mit CHCA für Ch bei 0,5 pmol/ μl und für ACh bei 25 fmol/ μl .

Die Ergebnisse der CI-CCA Matrix am Voyager STR waren besser. So konnte Ch im Bereich 100 pmol/ μ l bis 50 fmol/ μ l und ACh im Bereich 2,5 pmol/ μ l bis 5 fmol/ μ l bestimmt werden. Die Linearität war mit R^2 : 0,9934 für Ch und R^2 : 0,9935 noch ausreichend gut. Die ausführlichen Ergebnisse, gemessen am Voyager STR sind im Anhang unter Tabelle 8.8 und 8.9 aufgelistet.

Im direkten Vergleich zum AB 4800 mit CHCA war jedoch sowohl die Bestimmungsgrenze als auch die Linearität schlechter. Leider war eine sensitive Messung mit der CI-CCA am AB 4800 aufgrund der höheren Laserwellenlänge des Geräts (355 nm) nicht möglich. Durch die im Vergleich zu CHCA geringere Absorption bei dieser Wellenlänge ist eine höhere Laserintensität notwendig. Diese verursachte eine höhere Fragmentierung der Matrix verbunden mit einem höheren Rauschen und machte eine sensitive Messung unmöglich.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die exzellente Linearität, Präzision und Genauigkeit dieser Methode und erneut die allgemeine Fähigkeit von MALDI-TOF-MS kleine Moleküle zu identifizieren und quantifizieren. Dabei ist diese Methode den bereits veröffentlichten Analysenmethoden ebenbürtig, wenn nicht sogar deutlich überlegen. So lagen die absolute Nachweisgrenzen der traditionellen LC/EC zwischen 2 und 50 fmol auf der Säule und damit deutlich höher als die Nachweisgrenze der MALDI-TOF Methode [DE BOER *et al.* 1990; HUANG *et al.* 1995; TSAI *et al.* 1996; ICHIKAWA und MELTZER 2000]. Die neueren und empfindlicheren LC/MS Systeme erreichten ähnliche Nachweisgrenzen, die zwischen 0,2 und 1,4 fmol auf der Säule lagen [ZHU *et al.* 2000; HOWS *et al.* 2002; UUTELA *et al.* 2005; LACROIX *et al.* 2006; KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007]. Jedoch haben LC-basierte Systeme gegenüber der entwickelten MALDI-Methode zwei entscheidende Nachteile. Selbst schnelle LC-Systeme, wie von KESKI-RAHKONEN *et al.* [2007] mit Laufzeiten von 3 min vorgestellt, erreichen auch nicht annähernd den Probendurchsatz, der mit MALDI realisierbar ist (~10 Sekunden/Probe).

Ein weiterer Vorteil, der für MALDI-MS allerdings häufig auch einen Nachteil darstellen kann, ist die benötigte Probenmenge. Sie ist für MALDI sehr gering, da meist nur 1 μ l Probe auf die Platte gespottet wird. Wenn genug Probe vorhanden ist, stellt dies einen Nachteil gegenüber LC-Systemen dar, weil hier meist deutlich höhere Volumina und damit verbunden höhere Stoffmengen eingespritzt werden,

wobei selbst niedrige Konzentrationen noch messbar sind. Bei Mikrodialyseproben ist der Fall jedoch anders, weil bedingt durch die geringe Fließgeschwindigkeit während der Dialyse nur sehr geringe Probenvolumina zu Verfügung stehen. Dies wirkt sich in schlechterer zeitlicher Auflösung aus, da pro Messung meist 10 bis 20 min Probe gesammelt werden müssen. Zudem ist keine Aussage über die Präzision möglich, da nur eine Einfachbestimmung erfolgen kann.

Eine Möglichkeit, die temporale Auflösung zu verbessern, wurde von SHACKMAN *et al.* [2007] vorgestellt. Durch Verwendung einer *online* Kapillar-LC/MS erreichten sie eine zeitliche Auflösung von 2,4 Minuten. Wenn Mikrodialyseproben jedoch *online* gemessen werden, bedeutet dies, dass sich das lebende Tier sehr nahe am lauten LC/MS Instrument befindet. Inwieweit das Tier und damit die Ergebnisse durch den Lärm beeinflusst werden ist unklar. Es zeigte sich jedoch bei den Probennahmen mit dem MALDI-Spotter, dass die Tiere empfindlich auf ungewohnte Geräusche reagierten.

3.8.4 Quantifizierung von *in-vivo* Mäusehirnmikrodialysaten

Nach der erfolgreichen Quantifizierung der Standardlösungen war der nächste Schritt, die neu entwickelte MALDI-TOF-MS Methode auf *in-vivo* Mikrodialyse Proben zu übertragen. Dazu wurden im AK Klein vier CD1-Mäuse operativ präpariert, um mittels Mikrodialyse-Sonden entsprechende Proben aus dem extrazellulären Raum des Striatum zu gewinnen (siehe Methodenteil 6.8.4).

Um zu überprüfen, ob störende Substanzen aus dem extrazellulären Raum die Bestimmung der *in-vivo* Proben behindern, wurde neben einer Quantifizierung mittels Kalibriergerade auch das Standard-Additionsverfahren angewendet.

Im letzten Experiment wurde ein MALDI-Spotter direkt mit dem Ausgangsschlauch der Dialysesonde verbunden, um die zeitliche Auflösung der Mikrodialyse zu verbessern.

Es wurde eine *in-vitro* Wiederfindung von ACh und Ch in der Mikrodialysesonde durchgeführt. Diese lag für ACh bei $32,6\% \pm 1,2\%$ und für Ch bei $34,6\% \pm 2,6\%$.

Tabelle 3.15 zeigt die ermittelten Konzentrationen an Ch und ACh für die Bestimmung der *in-vitro* Wiederfindungsrate der Mikrodialyse-sonde.

	Konz. Ch [fmol/ μ l]	Konz. ACh [fmol/ μ l]
Probe 1	320,39	302,68
Probe 2	349,63	329,43
Probe 3	387,96	334,76
Probe 4	352,67	324,83
Probe 5	350,86	337,44
Probe 6	315,77	328,28
Mittelwert	346,21	326,24

Tabelle 3.15 Wiederfindungsrate der Mikrodialyse-sonden

Die im weiteren Verlauf der Arbeit genannten Konzentrationen für ACh und Ch sind die gemessenen Konzentrationen ohne Berücksichtigung der Wiederfindung der Mikrodialyse-sonden.

3.8.4.1 Quantifizierung von ACh und Ch in *in-vivo* Mikrodialyseproben mittels Kalibriergerade

Um sicherzustellen, dass wirklich die Analyten ACh und Ch vorlagen und analysiert wurden, wurde zusätzlich zur Identifizierung mit Hilfe der akkuraten Masse ein MS/MS Experiment durchgeführt. Dabei wies das mutmaßliche ACh-Signal m/z 146 folgende Fragmente auf: m/z 146 \rightarrow 87 (100%) und m/z 146 \rightarrow 60 (20%). Folgende Massenübergänge wurden für das mutmaßliche Ch-Signal detektiert: m/z 104 \rightarrow 60 (100%), m/z 104 \rightarrow 45 (35%), m/z 104 \rightarrow 58 (30%) und m/z 104 \rightarrow 104 (20%). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von analysierten Standardlösungen überein und sind zudem mit Ergebnissen von ESI und APCI Methoden in der Literatur konform [HOWS *et al.* 2002; UUTELA *et al.* 2005; KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007; CHOUDHARY *et al.* 2008]. Die Kombination der akkuraten Masse und der MS/MS Daten beweist, dass ACh und Ch in den *in-vivo* Experimenten analysiert wurde. Abbildung 3.21 zeigt ein Spektrum einer *in-vivo* Mikrodialyse Probe aus dem rechten Striatum einer CD1 Maus mit zugesetzten IS.

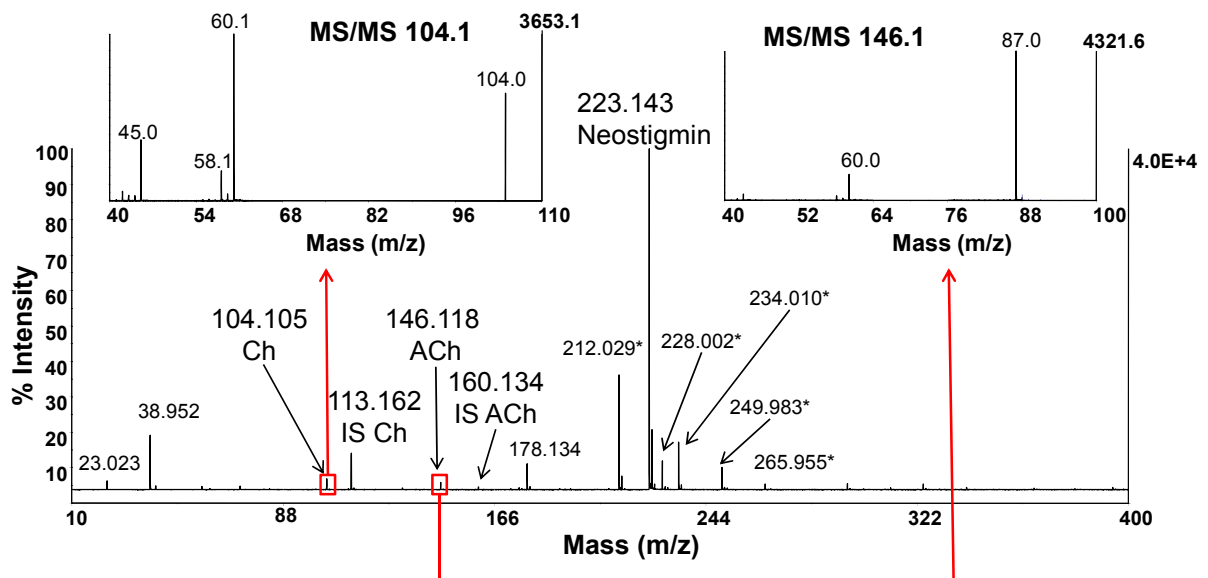


Abbildung 3.21 Spektrum einer *in-vivo* Mikrodialyseprobe

gesammelt aus dem rechten Striatum einer CD1 Maus. Die Fenster zeigen die MS/MS Daten für Ch und ACh. Die typischen MALDI-Matrix-Signale sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die inneren Fenster zeigen die MS/MS Daten für Ch und ACh. Der zugesetzte AChE-Inhibitor Neostigmin ist deutlich zu erkennen. Das Spektrum zeigt zudem, dass in den *in-vivo* Proben keine störenden Signale auftreten.

Um einen Anstieg an ACh zu simulieren, wurde nach 90 Minuten der muskarische Antagonist Scopolamin der Dialyseflüssigkeit für 90 Minuten zugesetzt. Dieses Standardverfahren wird häufig genutzt, um einen großen und signifikanten Anstieg der ACh-Konzentration im striatalen System zu erzielen [HARTMANN *et al.* 2008]. Die mit Hilfe eines Fraktionssammlers alle 30 min (Maus A1) bzw. 15 min (Maus A2) gesammelten Proben wurden jeweils dreimal gemessen und mit Hilfe einer Kalibriergeraden mit guter Linearität und Präzision (R^2 : 0,9995; ØRSD : 7%) quantifiziert. Der ACh-Gehalt (rote Linie) sowie der Ch-Gehalt (blaue Linie) der gemessenen Dialysate sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

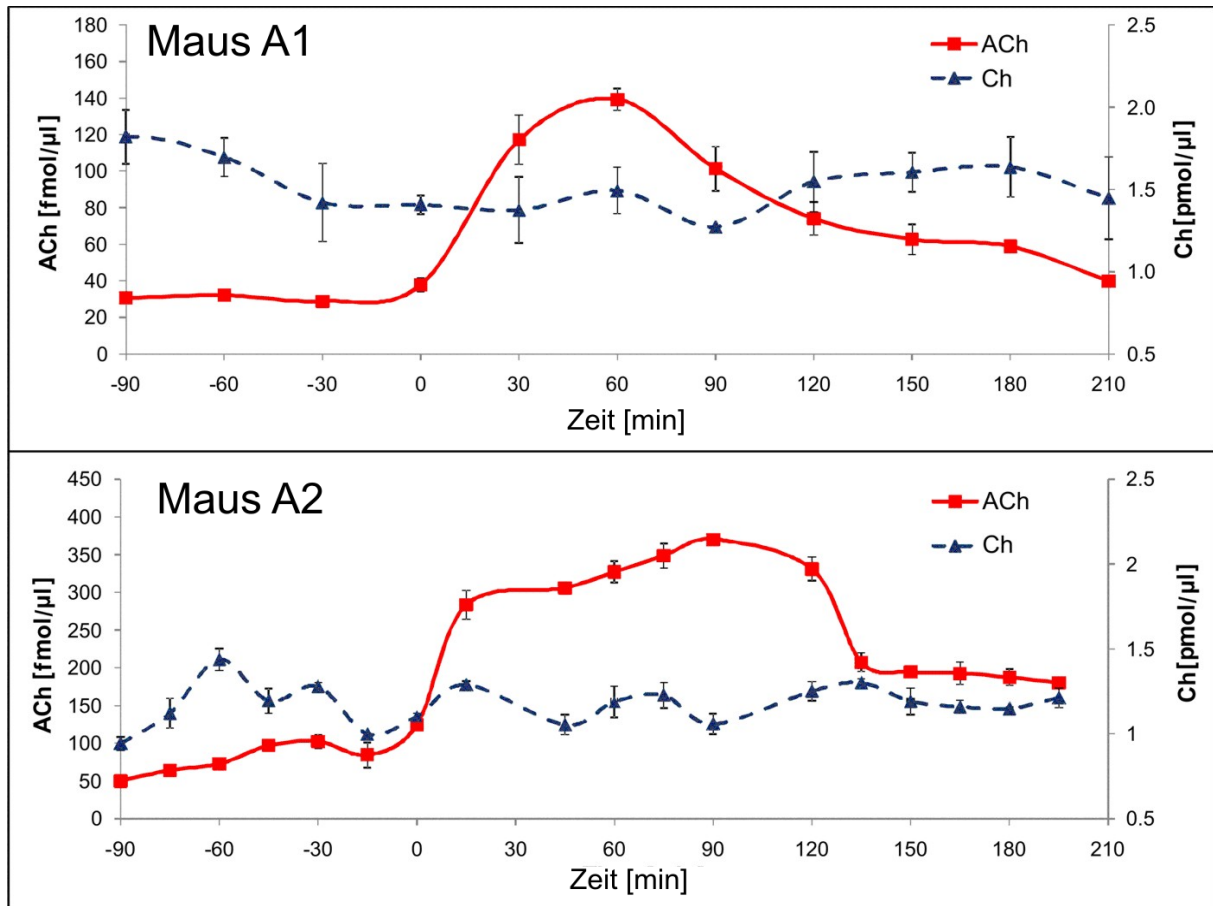


Abbildung 3.22 Gehalt ACh und Ch der Mikrodialyseproben von Maus A1 und A2

Auf der y-Achse sind sowohl die Konzentration von ACh als auch von Ch dargestellt. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf der Dialyse dar, wobei als Beginn (Zeit = 0 min) der Anstieg der ACh-Kurve verwendet wird. Durch Verwendung des AChE-Inhibitors Neostigmin im aCSF erreichte die Basislinienkonzentration für Maus A1 ~ 30 fmol/µL. Es war auch möglich ACh in Mausstriatum ohne Zugabe von Neostigmin zu detektieren, allerdings lagen die Konzentrationen unter 1 fmol/µl und somit unterhalb der Quantifizierungsgrenze.

Nach Zugabe des muskarischen Antagonisten Scopolamin zur künstlichen Hirnflüssigkeit stieg die ACh Konzentration um den Faktor 4 bis 5 an. Nachdem nach 90 Minuten wieder die ursprüngliche Dialyselösung ohne Scopolamin verwendet wurde, sank die ACh Konzentration wieder langsam Richtung Basislinie. Der Cholingehalt oszillierte während des gesamten Experiments in der Nähe der Basislinie. Eine Änderung der Cholingehalte aufgrund gesteigener ACh-

Konzentrationen ist nicht zwangsläufig zu erwarten. Cholin ist nicht nur ein Produkt der enzymatischen ACh-Spaltung, sondern auch an verschiedenen Prozessen wie z.B. am Metabolismus der Phosphatidylcholone beteiligt, die ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen sind [KLEIN 2000; LÖFFELHOLZ und KLEIN 2006].

Die Konzentration und Präzision der gemessenen Mikrodialyseproben von Maus A1 ist in Tabelle 3.16 aufgelistet.

Maus A1				
Zeit [min]	Cholin		Acetylcholin	
	Konz. [pmol/ μ l]	% RSD	Konz. [fmol/ μ l]	% RSD
-120	1,60	14,31	31,45	8,20
-90	1,82	8,70	30,68	6,62
-60	1,70	6,62	32,09	6,48
-30	1,42	16,05	28,85	6,28
0	1,41	3,87	37,74	10,77
30	1,37	13,95	117,13	12,75
60	1,49	9,10	139,20	4,83
90	1,27	0,32	101,32	13,25
120	1,55	11,26	73,99	13,70
150	1,60	7,08	62,66	14,68
180	1,64	10,67	58,79	1,85
210	1,45	16,56	39,84	6,78

Tabelle 3.16 Ergebnisse Mikrodialyseproben Maus A1

Alle gemessenen Proben haben eine relative Standardabweichung unter 20%, und liegen im Mittel für Ch bei 9,9% und für ACh bei 8,8%. Allerdings ist die Präzision schlechter als bei den gemessenen Standardlösungen (siehe Tabelle 3.14). Der Anstieg der %RSD kann verschiedene Ursachen haben. Am wahrscheinlichsten ist ein höherer Pipettierfehler verursacht durch geringere Volumina. Bei den Standardlösungen wurden 50 μ l Standardlösung mit 50 μ l IS gemischt und anschließend 1 μ l dieser Mischung aufgetragen. Bei den *in-vivo* Proben war nur wenig Probe verfügbar, und daher wurde 1 μ l Probe auf die MALDI Platte

aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde 1 μl IS auf die getrocknete Probe pipettiert. Aufgrund der geringeren verwendeten Volumina ergibt dieses Verfahren insgesamt eine geringere Präzision, jedoch war die Präzision für beide Analyten noch ausreichend. Eine weitere Ursache für die schlechtere Präzision besteht möglicherweise darin, dass während der Dialyse Stoffe eluiert werden, welche die homogene Verteilung bzw. Ionisierung der Analyten behindern. Aus diesem Grund wurde ein Standard-Additionsverfahren durchgeführt, deren Ergebnisse später gezeigt werden.

Der untere Teil der Abbildung 3.22 zeigt die Daten von Maus A2 mit einer zeitlichen Auflösung von 15 min. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für die Mikrodialysate von Maus A1 wurde beobachtet. Der ACh-Gehalt stieg nach Zugabe von Scopolamin zur Dialyselösung um den Faktor 4 an. Allerdings lagen die absoluten Werte höher, was möglicherweise in interindividuellen Schwankungen begründet liegt. Diese Schwankungen wurden schon häufig in Mikrodialyse-Studien dokumentiert [HARTMANN *et al.* 2004]. Bei Maus A2 lag die Basislinienkonzentration an ACh zwischen 60 und 90 fmol/ μl und stieg nach Zugabe von Scopolamin auf ~ 370 fmol/ μl an. Nachdem wieder die herkömmliche Dialyseflüssigkeit ohne Scopolamin verwendet wurde, sanken die ACh-Konzentrationen ab. Der Cholingehalt lag erneut während des gesamten Experiments in der Nähe der Basislinie und zeigte keine signifikante Änderung. Die Präzision für dieses Tier war, mit einem Mittelwert für die relative Standardabweichung von 4,1% für Ch und 5,8% für ACh besser. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der gemessenen Mikrodialyseproben von Maus A2 ist in Tabelle 3.17 aufgeführt.

Maus A2				
Zeit [min]	Cholin		Acetylcholin	
	Konz. [pmol/ μ l]	% RSD	Konz. [fmol/ μ l]	% RSD
-90,00	0,94	4,13	49,97	7,50
-75,00	1,12	7,92	64,25	0,71
-60,00	1,44	4,46	72,86	7,96
-45,00	1,19	6,00	96,81	6,56
-30,00	1,28	1,80	102,44	8,83
-15,00	1,00	0,36	84,47	9,75
0,00	1,10	1,67	124,28	6,19
15,00	1,29	1,68	283,31	6,81
45,00	1,05	5,61	305,75	2,63
60,00	1,19	7,68	327,16	4,28
75,00	1,23	6,08	348,47	4,61
90,00	1,06	5,65	370,01	1,81
120,00	1,25	4,56	330,98	4,71
135,00	1,30	1,80	207,40	5,89
150,00	1,19	6,51	194,34	1,24
165,00	1,16	3,25	192,56	7,62
180,00	1,15	0,62	187,49	5,88
195,00	1,21	4,76	180,00	2,00

Tabelle 3.17 Ergebnisse Mikrodialyseproben Maus A2

3.8.4.2 Quantifizierung von ACh und Ch in *in-vivo* Mikrodialyseproben mittels Standard-Additionsverfahren

Um die Ergebnisse der Quantifizierung mittels Kalibriergerade zu validieren und um zu überprüfen, ob störende Substanzen aus dem Extrazellularraum eluiert werden, wurden Dialyseproben einer zweiten Maus verwendet. Dabei wurden die Proben mittels Standard-Additionsverfahren und mittels Kalibriergerade quantifiziert und die Ergebnisse verglichen. Hier konnte keine Dreifachbestimmung durchgeführt werden, da das Standard-Additionsverfahren relativ viel Probe benötigt und dieselbe Probe auch mittels Kalibriergerade gemessen werden musste. Daher ist in den folgenden Ergebnissen auch keine Präzision aufgeführt. Dies sollte aber kein Problem

darstellen, da die Standardlösungen, sowie die Mikrodialyseproben von Maus A1 und A2 deutlich die gute Präzision der MALDI-TOF Methode zeigen.

Bei Maus B wurden erneut ähnliche Werte wie für die Mäuse A gefunden. Abbildung 3.23 zeigt sowohl die mit Hilfe des Standard-Additionsverfahren ermittelten Gehalte, als auch die mittels Kalibriergerade bestimmten Konzentrationen für ACh und Ch. Die gestrichelten Linien zeigen die Daten des Standard-Additionsverfahrens, die durchgezogenen Linien zeigen die Ergebnisse, welche mit Hilfe der Kalibriergerade ermittelt wurden.

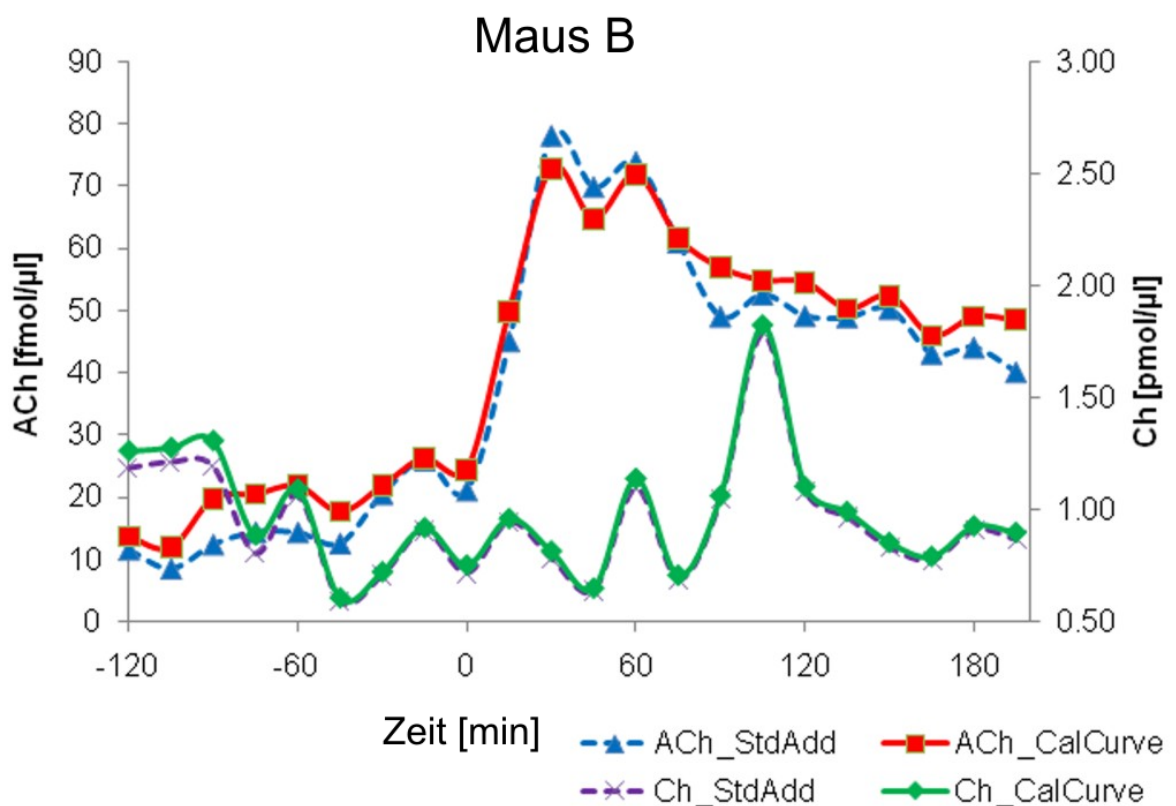


Abbildung 3.23 Gehalt ACh und Ch der Mikrodialyseproben von Maus B. Vergleich zwischen Standard-Additionsverfahren und Quantifizierung mittels Kalibriergerade

Der Kurvenverlauf von Maus B zeigt nach Zugabe von Scopolamin wieder einen Anstieg der ACh Konzentration um den Faktor 4-5. Die Absolutwerte liegen niedriger als bei den Mäusen A1 und A2, was wiederum in interindividuellen Schwankungen begründet sein kann. Die Basislinienkonzentration von ACh liegt zwischen 10 und

20 fmol/ μ l und steigt nach Zugabe von Scopolamin zur Perfusionsflüssigkeit auf \sim 75 fmol/ μ l an. Nachdem nach 90 Minuten wieder die ursprüngliche Dialyselösung ohne Scopolamin verwendet wurde, sank die ACh-Konzentration wieder langsam. Der Cholingehalt lag erneut während des gesamten Experiments in der Nähe der Basislinie und zeigte mit Ausnahme der hohen Konzentration bei 105 min keine signifikante Änderung. Der gegenüber der durchschnittlichen Ch-Konzentration deutlich höhere Ch-Gehalt bei 105 min lässt die Vermutung entstehen, dass hier ein Ausreißerwert vorliegt. Nichtsdestotrotz zeigt die Abbildung 3.23 deutlich die sehr ähnlichen Werte der verschiedenen Quantifizierungsmethoden, sowohl für ACh als auch für Ch. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass kein störender Matrixhintergrund in den Dialyseproben die MALDI-Messungen behindert.

Eine Zusammenfassung der Messergebnisse von Maus B ist in Tabelle 3.18 aufgeführt.

Maus B				
Zeit [min]	Kalibriergerade		Standard-Additionsverfahren	
	Cholin Konz. [pmol/ μ l]	Acetylcholin Konz. [fmol/ μ l]	Cholin Konz. [pmol/ μ l]	Acetylcholin Konz. [fmol/ μ l]
-120	1,19	13,72	1,26	8,87
-105	1,21	11,99	1,28	8,58
-90	1,19	19,88	1,31	12,46
-75	0,81	20,58	0,89	14,46
-60	1,06	21,92	1,09	14,42
-45	0,59	17,79	0,61	12,64
-30	0,71	21,93	0,72	20,60
-15	0,91	26,38	0,92	23,45
0	0,72	24,51	0,75	21,16
15	0,95	49,95	0,96	45,17
30	0,78	72,85	0,82	78,21
45	0,64	64,79	0,65	69,99
60	1,10	71,83	1,14	74,03
75	0,69	61,67	0,71	61,07
90	1,05	56,92	1,06	49,15
105	1,79	54,90	1,82	52,70
120	1,09	54,60	1,10	49,23
135	0,97	50,33	0,99	49,01
150	0,83	52,42	0,85	50,38
165	0,78	46,03	0,79	43,18
180	0,91	49,06	0,93	44,19
195	0,87	48,52	0,90	40,21

Tabelle 3.18 Messergebnisse der Mikrodialyseproben von Maus B.

Vergleich des Standard-Additionsverfahrens mit der Quantifizierung mittels Kalibriergerade

Aufgrund der sehr ähnlichen Ergebnisse des Standard-Additionsverfahrens und der Quantifizierung mittels Kalibriergerade sind beide Verfahren zur direkten Quantifizierung von ACh und Ch in Mikrodialyseproben geeignet. Da keine störenden Komponenten die Messung mittels MALDI-TOF-MS behindern, ist die Quantifizierung mittels Kalibriergerade die bessere Wahl, weil diese Methode schneller ist und weniger Probenvolumina benötigt.

3.8.4.3 Verbesserung der zeitlichen Auflösung der Mikro dialyse

Um die temporale Auflösung der Mikro dialyse zu verbessern, wurde anstelle des Fraktionssammlers ein MALDI-Spotter verwendet. Der Ausgang der Mikro dialysesonde konnte dadurch direkt mit dem Spotter verbunden werden, welcher wiederum die Probe automatisch auf die MALDI-Platte pipettierte. Hierdurch war eine deutliche Verbesserung der temporalen Auflösung möglich. Abbildung 3.24 zeigt die Veränderung der Mikro dialysatkonzentration von ACh (rote Linie) und Ch (blaue Linie) im rechten Striatum einer CD1 Maus. Erneut wurde Scopolamin verwendet, um die Freisetzung von ACh zu steigern.

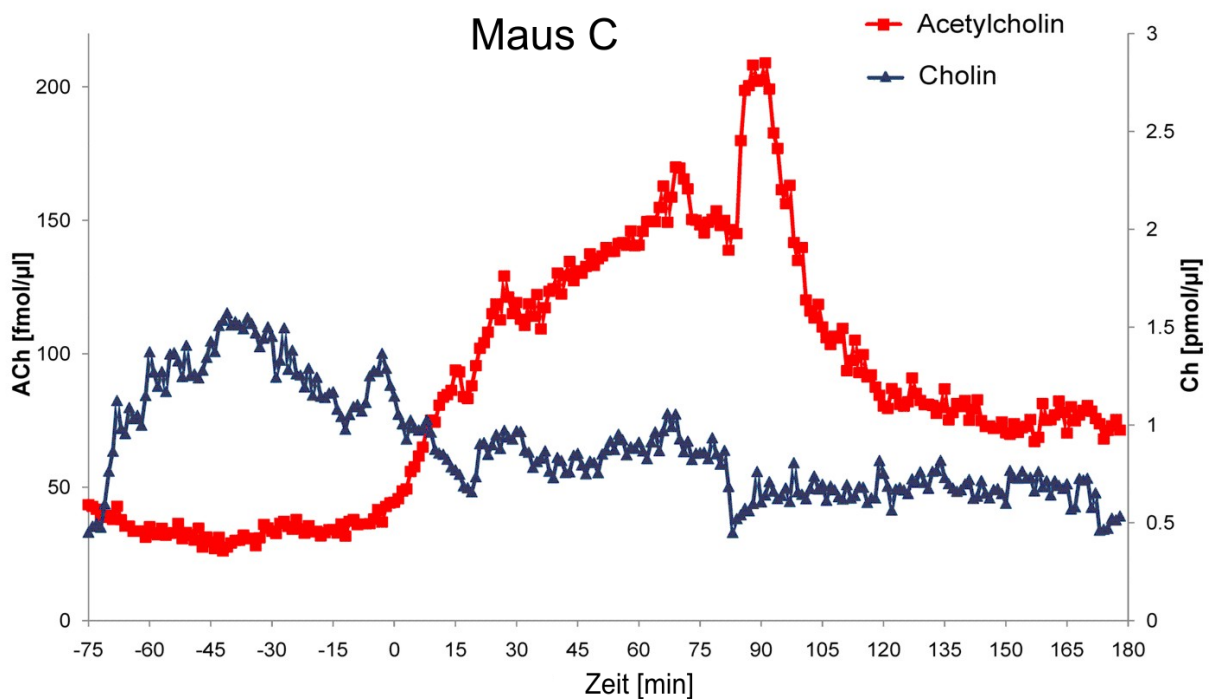


Abbildung 3.24 Gehalt ACh und Ch der Mikro dialyseproben von Maus C mit einer temporalen Auflösung von 1 min.

Der Kurvenverlauf entspricht erneut den Daten, die bei den anderen Mäusen bestimmt wurden. Wieder stieg nach Zugabe von Scopolamin der ACh-Gehalt um den Faktor 5 an und sank, nachdem auf die ursprüngliche Dialyseflüssigkeit ohne Scopolamin zurückgewechselt wurde. Die ersten 75 Datenpunkte stellen die ACh-Basislinie dar, die aufgrund der Verwendung von Neostigmin bei ~ 35 fmol/µl liegt.

Nach Zugabe von Scopolamin zur Dialyseflüssigkeit stieg die ACh-Konzentration auf ~ 200 fmol/ μ l an und sank dann wieder ab. Bei Ch war erneut keine signifikante Änderung feststellbar. Die anfänglich höheren Konzentrationen sanken nach Zugabe von Scopolamin etwas ab, stiegen jedoch nicht wieder an. Bemerkenswert ist jedoch, dass sowohl für ACh als auch für Ch keine Schwankungen von einem Datenpunkt zum nächsten vorliegen, was die gute Präzision der Methode bestätigt. Der Kurvenverlauf verdeutlicht die verbesserte zeitliche Auflösung dieser *in-vivo*-Messung. Somit ist die von NIROGI *et al.* [2010] geforderte höhere zeitliche Auflösung, die zur Klärung schneller Signalübertragung im Gehirn notwendig ist erfüllt. Zusätzlich wurde auch noch der Anteil an Neostigmin in den Mikrodialysatproben überprüft. Durch die Verwendung von Acetyl- β -methylcholin als IS konnte bestimmt werden, dass der Anteil an Neostigmin in den Proben nahezu konstant blieb. Es trat während des gesamten Experiments lediglich eine Fluktuation von $\sim 10\%$ auf. Eine absolute Quantifizierung war jedoch nicht möglich, da keine geeignete Kalibriergerade zur Verfügung stand.

Die durchgeführten Studien zeigen, dass die Quantifizierung von ACh und Ch in Mikrodialyseproben auch mit MALDI-TOF-MS möglich ist. Dabei waren keine speziellen Geräte oder eine Probenvorbereitung notwendig. Trotz des hohen Salzgehalts der Extraktionslösung (~ 150 mM) war eine direkte Messung der Mikrodialyseproben möglich. Daher stellt MALDI-TOF-MS eine hervorragende Alternative gegenüber den etablierten LC/EC oder LC/MS-Methoden dar.

Die entwickelte Methode erzielte exzellente Linearität, Präzision und ~~Überspannung~~ Überspannung . Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze lag bei 0,3 und 1 fmol/ μ l für ACh und 20 bzw. 50 fmol/ μ l für Ch. Diese Werte sind vergleichbar oder besser als in der Literatur beschriebene Ergebnisse [DE BOER *et al.* 1990; HUANG *et al.* 1995; TSAI *et al.* 1996; ICHIKAWA und MELTZER 2000; ZHU *et al.* 2000; HOWS *et al.* 2002; UUTELA *et al.* 2005; LACROIX *et al.* 2006; KESKI-RAHKONEN *et al.* 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass keine störenden Komponenten aus den *in-vivo* Proben die Messung mittels MALDI-TOF-MS behindern. Dabei bietet die Methode gegenüber den LC basierten Methoden einige Vorteile. Erstens ermöglicht die MALDI-TOF-MS einen deutlich höheren Probendurchsatz, da die Messzeit nur ca. 10 Sekunden pro Probe beträgt. Des Weiteren konnte durch den Einsatz des MALDI-Spotters die temporale

Auflösung deutlich verbessert werden, weil nur 1 µl Probe benötigt wird, was sich in einer zeitlichen Auflösung von 1 min widerspiegelt. Zudem ist es denkbar, durch Verringerung der Flussrate eine Verbesserung der Wiederfindung zu erzielen [NIROGI *et al.* 2010]. Die damit verbundene schlechtere zeitliche Auflösung wäre der Auflösung der LC basierten Systeme aber weiterhin überlegen.

Auch diese Serie von Experimenten zeigt, dass MALDI-TOF-MS erfolgreich für die Identifizierung und Quantifizierung kleiner Moleküle verwendet werden kann.

3.9 Bestimmung von Melamin in Milchprodukten

Aufgrund des Melamin-Skandals 2008 wurden zahlreiche Methoden für die Analytik von Melamin und seiner verwandten Stoffe entwickelt. Dabei wurden insbesondere LC/MS Methoden vorgestellt [siehe Abschnitt 2.5.3]. Aber auch MALDI-MS wurde zur Identifizierung von Melamin verwendet [CAMPBELL *et al.* 2007]. Allerdings war hier keine Quantifizierung möglich und es wurden lediglich hochkonzentrierte Standardlösungen (10 µg/ml) gemessen.

Ziel dieser Studie war es daher, eine schnelle MALDI-MS Methode zu entwickeln, die neben der Identifizierung auch eine Quantifizierung von Melamin ermöglicht und dabei auch die erforderliche Sensitivität aufweist.

3.9.1 Methodenentwicklung

Zuerst wurde überprüft, ob eine Quantifizierung von Melamin in Wasser mittels MALDI-TOF-MS möglich ist. Als interner Standard wurde mit Atrazin (6-Chlor-*N*-ethyl-*N'*-isopropyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin) ein strukturell ähnlicher Stoff verwendet. Atrazin ist ein weltweit sehr häufig verwendetes Herbizid, wobei der Einsatz in Europa jedoch inzwischen verboten ist.

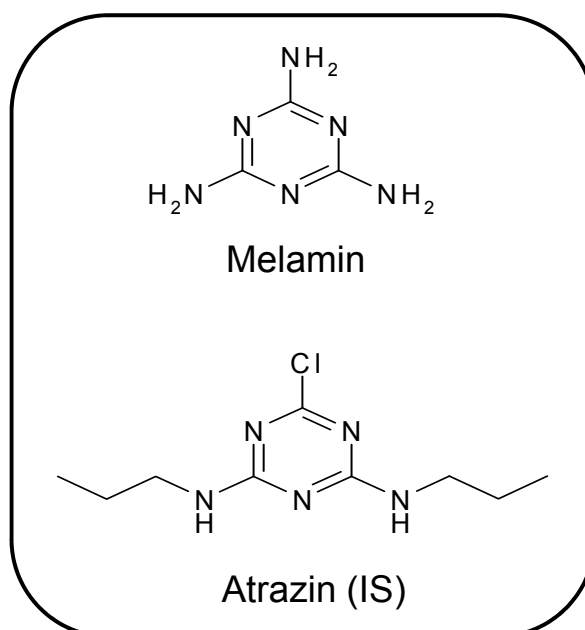


Abbildung 3.25 Struktur von Melamin und Atrazin

Es wurde eine Verdünnungsreihe von 5000 bis 0,1 nM mittels MALDI-TOF analysiert, wobei der IS eine konstante Konzentration von 200 nM aufwies. Damit war es möglich, Melamin im Bereich 5000 bis 5 nM zu quantifizieren. Dabei zeigte die Methode eine exzellente Linearität (R^2 : 0,9996), die auch noch nahe der Quantifizierungsgrenze (R^2 : 0,9992) bestand. Abbildung 3.26 zeigt die gute Linearität und Präzision der Methode.

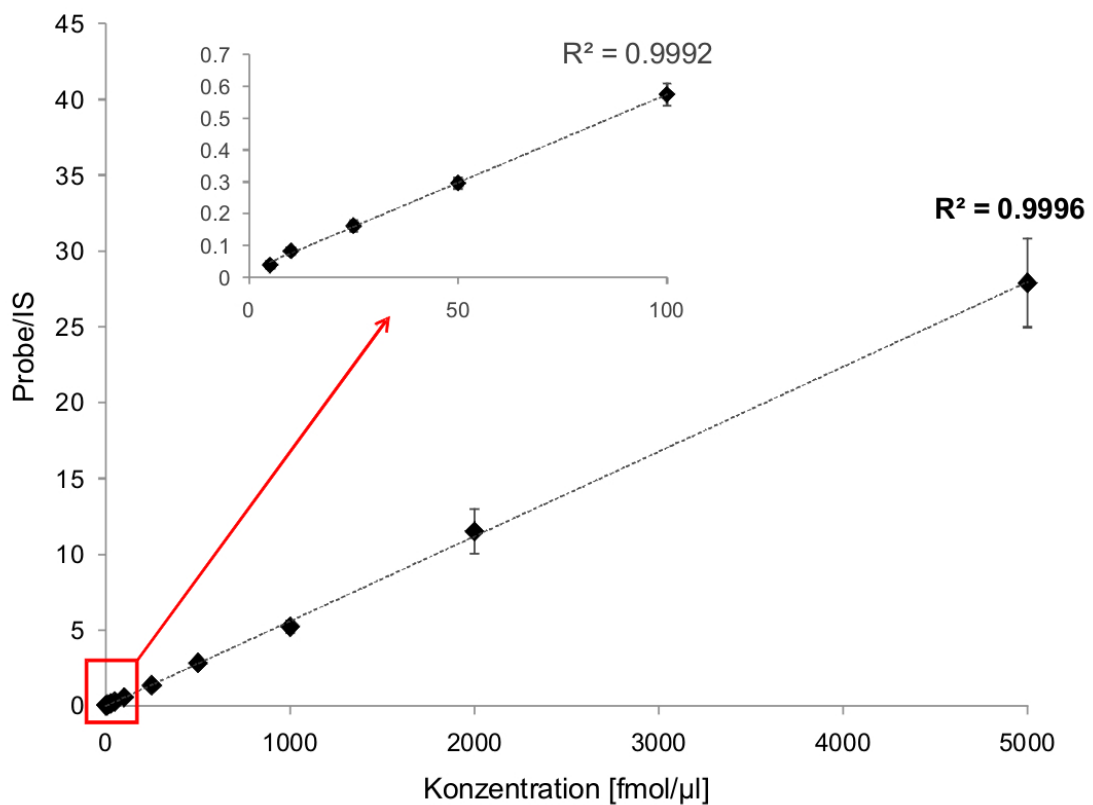


Abbildung 3.26 Linearität Melamin in Wasser

Neben guter Linearität und Präzision zeigte die Methode auch ausreichend gute Richtigkeit. Der LOQ betrug für Melamin in Wasser 5 nM. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 nM. Die genauen Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 3.19 aufgelistet.

Konzentration [nM]	% RSD	% Fehler	R ²
5000	19,24	3,42	0,9996
2000	14,45	9,44	
1000	13,96	-7,73	
500	6,87	-8,88	
250	6,15	-17,37	
100	12,98	-14,1	
50	9,66	-12,98	
25	7,45	-14,96	
10	14,23	4,53	
5	15,88	3,29	

Tabelle 3.19 Bestimmung von Melamin in Wasser

Die Signale für Melamin (m/z 127) und Atrazin (m/z 216) waren deutlich zu erkennen. Abbildung 3.27 zeigt ein Massenspektrum von Melamin mit einer Konzentration von 25 nM in Wasser. Die Vergrößerung zeigt deutlich das Signal für Melamin. Die Massengenauigkeit für Melamin nach interner Kalibrierung an den Matrixsignalen lag bei < 10 ppm. Somit konnte über die akkurate Masse Melamin eindeutig identifiziert werden.

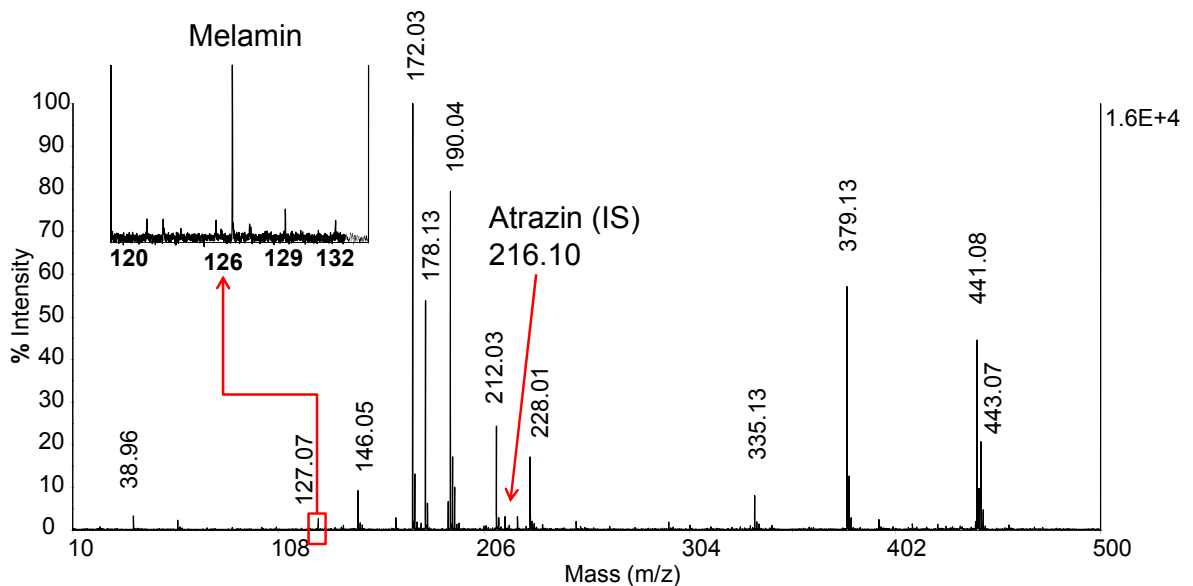


Abbildung 3.27 Spektrum von Melamin (25nM) in Wasser

Anders als bei den Ergebnissen von CAMPBELL et al. [2007] bildete sich kein Komplex aus Melamin und CHCA (m/z 316). Dieser wurde auch nicht bei der höchsten Konzentration (5 μM) gebildet. Allerdings ist diese höchste Konzentration immer noch deutlich niedriger als die von CAMPBELL et al. [2007] gemessene Konzentration mit $\sim 80 \mu\text{M}$. Vermutlich ist dies die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse. Leider geben CAMPBELL et al. [2007] keine Nachweisgrenzen für Ihre Methode an, allerdings sind die von ihnen verwendeten Konzentrationen für eine reale Anwendung viel zu hoch. Anders die hier entwickelte Quantifizierungsmethode, die Melamin selbst in sehr niedriger Konzentration noch eindeutig bestimmen kann. Dabei war Atrazin als IS gut geeignet, so dass die Verwendung von isotoopenmarkiertem Melamin als IS nicht notwendig war.

Nach der erfolgreichen Methodenentwicklung musste die Bestimmung von Melamin anschließend auf reale Proben umgesetzt werden.

3.9.2 Quantifizierung von Melamin in Milchpulver und Milch

Für die Messung realer Proben wurde mit Melamin versetztes Milchpulver und Milch verwendet. Ziel war es die erforderlichen Grenzwerte von 2,5 bzw. 1 ppm zu erreichen. Die Probenvorbereitung erfolgte nach einem einfachen, leicht modifizierten Protokoll der FDA (siehe Abschnitt 6.9.2) [TURNIPSEED *et al.* 2008]. Durch die verwendete 2,5%ige Ameisensäure kommt es zu einer Säurefällung der Milchproteine. Nach Zentrifugieren wird ein Teil des Überstands mit 80% ACN verdünnt und gespottet. Diese einfache Aufreinigung und Verdünnung der Probe war ausreichend, um eine MALDI-Messung durchzuführen. Abbildung 3.28 zeigt ein Massenspektrum von aufgearbeitetem Milchpulver mit 12,5 ppm Melamin. Atrazin diente wieder als IS und wurde der aufgearbeiteten Probe mit 200 fmol/ μl zugesetzt.

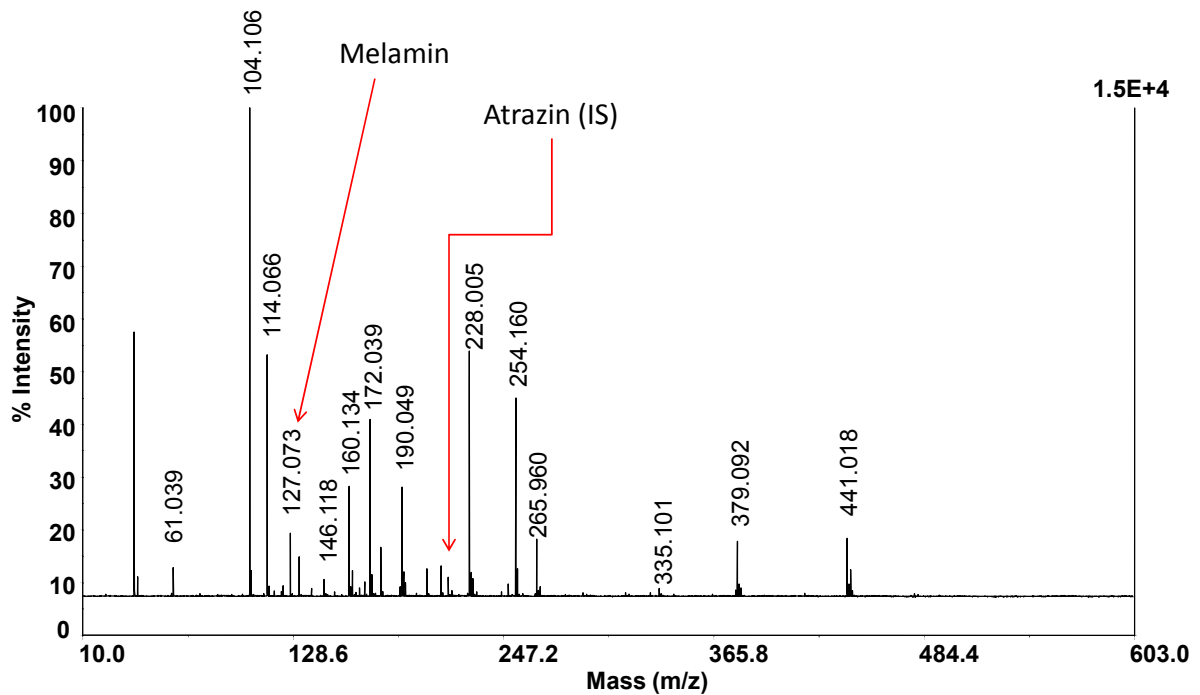


Abbildung 3.28 Spektrum von 12,5 ppm Melamin in Milchpulver

Im Vergleich zu der „sauberen“ Standardprobe (siehe Abbildung 3.27) ist deutlich sichtbar, dass die Probe noch etliche Milchhaltsstoffe enthält. So stellt z.B. das größte Signal bei m/z 104.106 Cholin dar. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da keine aufwändige Aufreinigung der Probe erfolgte. Im Gegensatz zu den menschlichen Plasma-Proben reichte bei Milch und Milchpulver die PP aus, um ausreichend „saubere“ Proben zu erhalten. Natürlich sind aufwändigere Probenvorbereitungen wie SPE oder Flüssig-Flüssig Extraktion jederzeit möglich. Damit werden auch vermutlich bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht, aber sie vergrößern auch den benötigten Zeitaufwand und verringern so den Probendurchsatz. Da der gesuchte Analyt Melamin und der IS deutlich erkennbar und detektierbar waren, wurde die Aufarbeitung nicht weiter verbessert, denn das vorrangige Ziel war eine schnelle und genaue Bestimmung von Melamin. Die Ergebnisse der Quantifizierung von Melamin in Milchpulver sind in Tabelle 3.20 dargestellt.

Melamin in Milchpulver			
Konzentration Melamin [ppm]	% RSD	% Fehler	R ²
50	5,79	13,15	0,995
25	11,17	11,35	
12,5	7,12	18,45	
2,5	5,44	13,00	
1,25	2,93	8,84	
0,25	4,00	-18,94	

Tabelle 3.20 Bestimmung von Melamin in Milchpulver

Die Quantifizierung war im Arbeitsbereich von 50 bis 0,25 ppm möglich. Der erforderliche Grenzwert von 1 bzw. 2,5 ppm für Melamin wurde somit erreicht. Die Linearität und Präzision der Methode war gut, die Übereinstimmung noch akzeptabel. Hier könnte die Verwendung von isotope-markierten Melamin als IS Abhilfe schaffen. Allerdings war der Fehler noch < 20% und somit noch akzeptabel.

Im Rahmen dieses Versuchs wurde neben Milchpulver auch mit Melamin verunreinigte Milch untersucht. Es wurde dieselbe Aufarbeitung wie bei Milchpulver verwendet. Bei Milch war eine Quantifizierung im Messbereich von 25 bis 0,625 ppm möglich. Somit wurde auch bei Milch der erforderliche Grenzwert von 1 ppm erreicht. Die Linearität, Präzision und Übereinstimmung war gut. Die kleinste gemessene Konzentration 0,125 ppm konnte allerdings nicht mehr valide quantifiziert werden, da hier ein zu hoher Fehler auftrat. Sämtliche Daten der Quantifizierung von Melamin in Milch sind in Tabelle 3.21 aufgeführt.

Melamin in Milch			
Konzentration Melamin [ppm]	% RSD	% Fehler	R ²
25	10,74	-6,78	0,998
12,5	7,77	-13,42	
6,25	2,67	-17,06	
2,5	4,32	-6,67	
0,625	8,68	-4,80	
0,125	5,85	32,58	

Tabelle 3.21 Bestimmung von Melamin in Milch

Auch bei realen Proben war Atrazin als IS geeignet. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass somit auch die schnelle Bestimmung von Pestiziden ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet für MALDI-TOF-MS wäre. Hierzu wurden allerdings noch keinerlei Analysen durchgeführt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Methode möglich war, erstmals mit Melamin versetztes Milchpulver und Milch zu bestimmen. Dabei wurden die erforderlichen Grenzwerte von 1 bzw. 2,5 ppm erreicht. Durch den Einsatz von MALDI, in Kombination mit der sehr einfachen Probenvorbereitung ist ein sehr hoher Probendurchsatz möglich. Diese Methode stellt daher eine Alternative zu bereits vorgestellten LC/MS-Methoden dar, mit dem Vorteil einer deutlich kürzeren Analysenzeit.

3.10 Bestimmung von Koffein und Vitaminen in *Energy Drinks*

Als letzter Anwendungsbereich für die Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-MS diente die Quantifizierung verschiedener Inhaltsstoffe in *Energy Drinks*. Diese Stoffe werden häufig mittels verschiedener separater LC-Analysen bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.2), was einen hohen Zeit- und Geräteaufwand benötigt. Ziel war daher, eine Methode zur gleichzeitigen Identifizierung und Quantifizierung von Koffein und Vitaminen in *Energy Drinks* zu entwickeln. Zuerst wurde überprüft, ob bei handelsüblichen *Energy Drinks* eine Probenvorbereitung notwendig ist, oder ob eine direkte Messung erfolgen kann. Dazu wurde der *Energy Drink* „Red Bull“ pur und in folgenden Verdünnungen gemessen: 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000.

Nur bei der unverdünnten Probe war keine Messung möglich, da hier der hohe Zuckergehalt eine Co-Kristallisation mit der Matrix verhinderte. Bei der 1:10-Verdünnung dauerte die Trocknung sehr lange, da sich durch den Zucker eine hochviskose Flüssigkeit bildete, welche im Vakuum getrocknet werden musste. Die weiteren Verdünnungen zeigten diesen Nachteil nicht mehr.

Abbildung 3.29 zeigt ein Spektrum einer 1:10 Verdünnung des *Energy Drink* „Red Bull“ mit CHCA als Matrix.

Ergebnisse und Diskussion

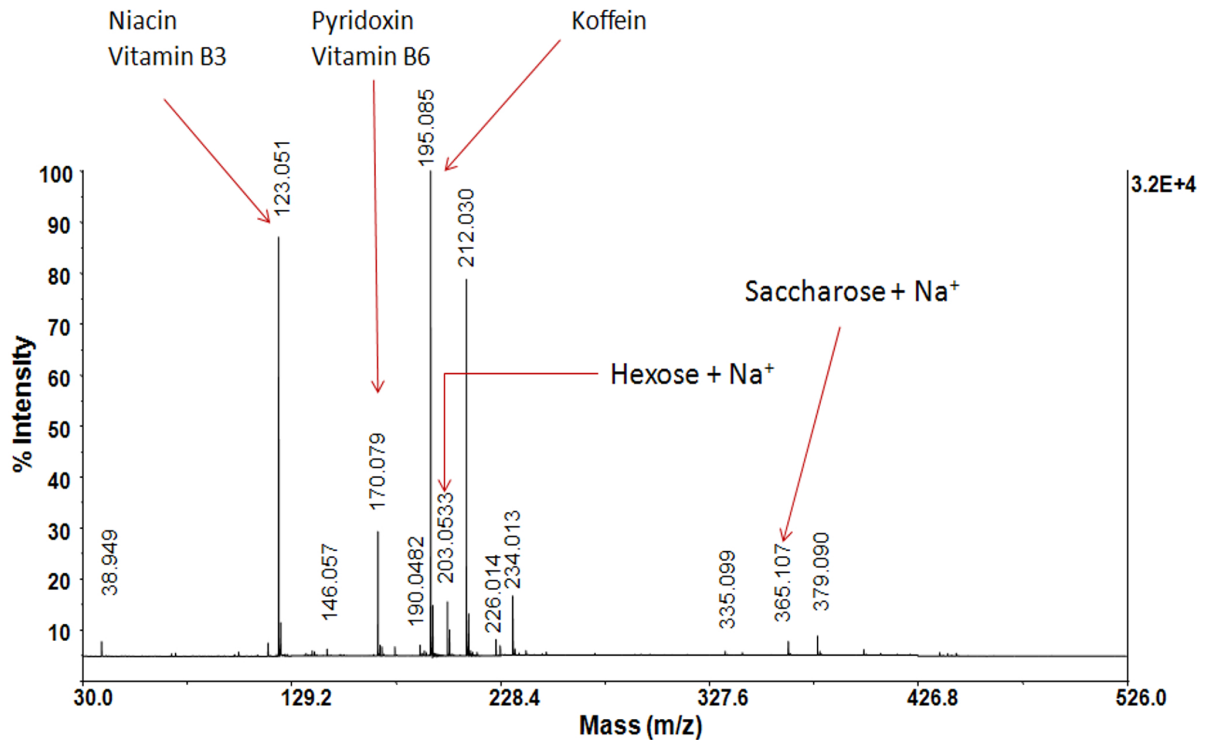


Abbildung 3.29 Spektrum einer 1:10 Verdünnung des *Energy Drinks* „Red Bull“

Die Vitamine Niacin (B₃) und Pyridoxin (B₆) sowie der Inhaltsstoff Koffein sind deutlich sichtbar. Als weitere Inhaltsstoffe waren kationisierte Zucker erkennbar. Die Matrix lag überwiegend ebenfalls kationisiert vor.

Es zeigte sich, dass keine Probenvorbereitung notwendig ist, und auf den Einsatz einer LC verzichtet werden konnte. Davon ausgehend wurde nun versucht Koffein zu quantifizieren. Dabei wurde zuerst mit Hilfe des Standard-Additionsverfahrens überprüft, ob die anderen Inhaltsstoffe des Softdrinks eine Quantifizierung stören.

Das Standard-Additionsverfahren wurde an den drei verfügbaren *Energy Drinks* „Red Bull“, „Rhino“ und „Magic Man“ durchgeführt. Dabei diente Theophyllin mit einer konstanten Konzentration von jeweils 1 pmol/μl als IS. Abbildung 3.30 stellt die graphische Auswertung des Standard-Additionsverfahrens am Beispiel „Red Bull“ dar. Die Linearität für alle drei gemessenen Verdünnungen war sehr gut. Auch die Präzision der Methode war hoch. So sind die Fehlerbalken in der Grafik so klein, dass sie kaum zu erkennen sind. Auch die ermittelten Konzentrationen stimmten sehr

gut mit den Herstellerangaben überein. So ergab sich für die Verdünnung 1:100 eine Abweichung von 0,2%, die 1:1000 Verdünnung ergab eine Abweichung von 3,8% und schließlich die 1:10000 Verdünnung eine Abweichung von 2,7% von dem laut Hersteller enthaltenem Koffein.

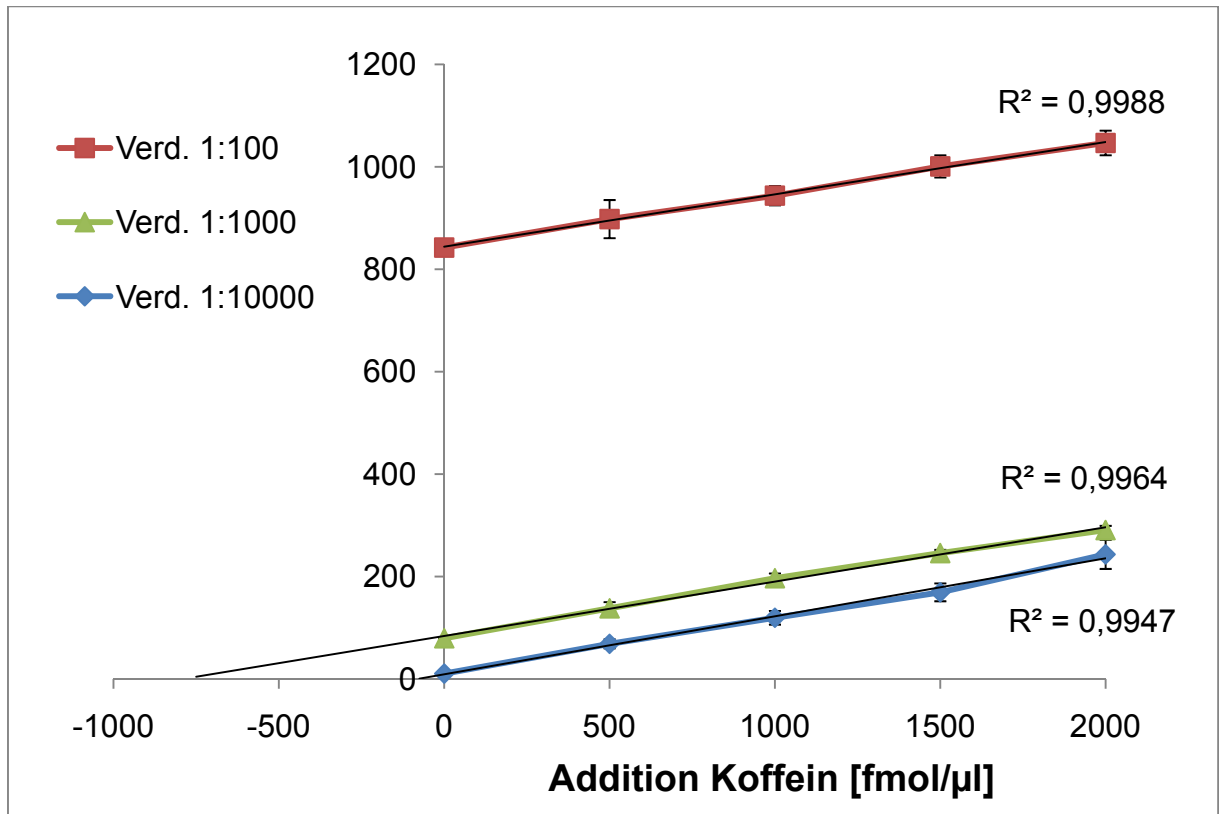


Abbildung 3.30 Standard Addition von Koffein zu dem *Energy Drink* „Red Bull“

Eine genaue Übersicht der ermittelten Koffeingehalte, der Präzision der Methode und die Abweichung zur Herstellerangabe sind in Tabelle 3.22 abgebildet.

Koffeingehalt in <i>Energy Drinks</i> mittels Standard-Addition				
Red Bull	Konzentration [ng/ml]	% RSD	Herstellerangabe [ng/ml]	% Abweichung
Probe 1/100	3206,56	2,4	3200	0,2
Probe 1/1000	307,96	4,0	320	-3,8
Probe 1/10000	31,14	9,5	32	-2,7
Rhino				
Probe 1/100	3122,73	3,0	3150	-0,9
Probe 1/1000	300,27	5,5	315	-4,7
Probe 1/10000	31,81	5,0	31,5	1,0
Magic Man				
Probe 1/100	2288,17	1,2	2400	-4,7
Probe 1/1000	224,28	5,4	240	-6,6
Probe 1/10000	24,29	10,1	24	1,2

Tabelle 3.22 Bestimmung von Koffein in verschiedenen *Energy Drinks* mittels Standard-Additionsverfahrens

Hier zeigte sich nochmals deutlich, wie genau diese direkte Methode ist. Auch die Präzision war sehr gut. Dabei war erneut zu beobachten, dass mit steigender Verdünnung die Präzision sank.

Da keine Probenvorbereitung notwendig war und die Messung im Gerät auch nur ca. 10 sec pro Probenspot benötigte, ist erneut ein sehr hoher Probendurchsatz möglich. Diese Methode kann daher für die Qualitätskontrolle großer Getränkehersteller oder Auftragslabore eine mögliche alternative Analytik zu der gängigen LC-Methode mit UV-VIS-Detektion darstellen.

Allerdings benötigte die Auftragung der Proben mittels Standard-Additionsverfahren etwas länger, da jede Probe 5x gespottet werden musste und zusätzlich auch noch die Addition der Standardlösung erfolgen musste.

Zur Verringerung der benötigten Vorbereitungszeit wurde daher als weiterer Schritt überprüft, ob auch eine Quantifizierung mittels Kalibriergerade möglich ist. Die Kalibriergerade wurde in Wasser hergestellt und wies eine sehr gute Linearität (R^2 : 0,9999) und Präzision (\emptyset RSD: 2,87%) auf. Anders als in der Arbeit von [GRANT und HELLEUR [2008] wurde auf den Zusatz von Zucker zur Kalibriergeraden verzichtet, da eine möglichst allgemeine Methode entwickelt werden sollte und die Zuckerkonzentrationen der verschiedenen Getränke schwanken.

Zudem liegen in den verdünnten Proben nur geringe Zuckermengen vor. Der Koffein-Gehalt der verschiedenen *Energy Drinks* wurde nun mit Hilfe der Kalibriergeraden ermittelt. Tabelle 3.23 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der Koffeingehalte verschiedener *Energy Drinks* mit Hilfe einer Kalibriergeraden.

Koffeingehalt in <i>Energy Drinks</i> mittels Kalibriergerade				
	Konzentration [ng/ml]	% RSD	Herstellerangabe [ng/ml]	% Abweichung
Red Bull				
Probe 1/100	3149,31	1,31	3200	-1,6
Probe 1/1000	269,21	1,09	320	-15,9
Probe 1/10000	31,69	1,49	32	-1,0
Rhino				
Probe 1/100	1867,15	1,92	3150	-40,7
Probe 1/1000	182,11	0,81	315	-42,2
Probe 1/10000	17,34	1,89	31,5	-45,0
Magic Man				
Probe 1/100	2567,62	1,89	2400	7,0
Probe 1/1000	246,67	1,98	240	2,8
Probe 1/10000	23,29	10,69	24	-3,0

Tabelle 3.23 Bestimmung des Koffeingehalts verschiedener *Energy Drinks* mittels Kalibriergerade

Sowohl für „Red Bull“, als auch für den *Energy Drink* „Magic Man“ war eine genaue Bestimmung des Koffeingehalts möglich. Die Präzision der Methode war erneut sehr gut (RSD meist < 2%) und auch die Abweichung war meist < 10%. Eine Ausnahme in dieser Gruppe bildete jedoch der *Energy Drink* „Rhino“, bei dem keine genaue Quantifizierung möglich war. Hier ergab sich eine Abweichung von ~ -40% gegenüber der Herstellerangabe. Mit Hilfe des Standard-Additionverfahrens wurde die Herstellerangabe aber zuvor bestätigt, so dass ein Fehler seitens des Getränkeherstellers auszuschließen war. Hier verhinderte anscheinend eine Substanz in der Probenmatrix des Getränks eine genaue Quantifizierung. Die Suppression durch die Probenmatrix trat auch bei höherer Verdünnung ähnlich stark auf. Da Rhino im Vergleich zu den anderen *Energy Drinks* keine auffällig unterschiedlichen Signale im Massenspektrum aufwies, kann daraus geschlossen

werden, dass die Suppression durch eine nicht oder kaum protonierbare Substanz erfolgte.

Die angegebenen Inhaltsstoffe der *Energy Drinks* stimmen zwar weitestgehend überein, jedoch werden von den Firmen nur allgemeine Aussagen wie „Produkt enthält Aroma und Farbstoff“ gemacht. Um welche genau es sich dabei handelt wird nicht angegeben und ist wahrscheinlich auch ein streng gehütetes Firmengeheimnis.

Störungen durch die Probenmatrix ist eigentlich eher ein Phänomen das bei LC-MS-Methoden zu großen Problemen führen kann [KEBARLE und TANG 1993; SRINIVAS 2009; VAN EECKHAUT *et al.* 2009]. Dieser nichtvorhersehbare Effekt wird häufig während der Ionisation bei Atmosphärendruck beobachtet und tritt auf, wenn störende Substanzen gleichzeitig mit dem Analyt von der LC eluieren. [KING *et al.* 2000; DAMS *et al.* 2003; HELLER 2007]. Der Matrixeffekt kann nicht nur eine Unterdrückung, sondern auch eine Steigerung des Analytsignals bewirken und deswegen zu falschen Ergebnissen führen. Zahlreiche Untersuchungen widmen sich diesem Problem und versuchen Lösungen anzubieten. Die beiden am häufigsten verwendeten Methoden um das Matrixproblem bei LC-MS Anwendungen zu beheben sind die *post-column infusion*- und die *post-extraction spike* Methode [BONFIGLIO *et al.* 1999; MATUSZEWSKI *et al.* 2003; MATUSZEWSKI 2006]. Bei beiden Verfahren wird ein Standard verwendet, auf den die Probenmatrix denselben Effekt wie auf den Analyten ausüben soll. Durch diesen internen Standard kann die Unterdrückung/Steigerung des Signals rechnerisch kompensiert werden. Nach einem ähnlichen Prinzip funktioniert das Standard-Additionsverfahren, eine in der analytischen Chemie häufig verwendete Methode bei Matrixeffekten [DEUTSCHE NORM 1998]. Mittels des Standard-Additionsverfahrens konnte auch der korrekte Koffeingehalt des *Energy Drinks* „Rhino“ bestimmt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sowohl für „Red Bull“ als auch für „Magic Man“ möglich war, den Koffeingehalt des Getränks genau zu bestimmen. Für den *Energy Drink* „Rhino“ musste zur genauen Quantifizierung des Koffeingehalts das Standard-Additionsverfahren verwendet werden, da hier durch Matrixsuppression eine genaue Bestimmung nicht möglich war.

Im Rahmen dieser Methode wurde auch überprüft, inwieweit die anderen detektierbaren Inhaltsstoffe mit der Koffein-Kalibriergerade quantifiziert werden können. Es wurde bereits in Kapitel 3.6 gezeigt, dass chemisch und strukturell nicht verwandte Stoffe mit einem IS quantifiziert werden können. Daher wurde überprüft, ob dies auch für Niacin und Pyridoxin möglich ist. Tabelle 3.24 zeigt, dass sowohl Niacin als auch Pyridoxin mit der Koffein-Kalibriergeraden und Theophyllin als IS quantifiziert werden konnten.

Niacin			
Red Bull	Konzentration [ng/ml]	Herstellerangabe [ng/ml]	% Abweichung
Probe 1/100	835,41	800	4,4
Probe 1/1000	82,59	80	3,2
Probe 1/10000	7,94	8	-0,8
Rhino			
Probe 1/100	626,77	792	-20,9
Probe 1/1000	66,12	79,2	-16,5
Probe 1/10000	5,89	7,9	-25,4
Magic Man			
Probe 1/100	621,28	600	3,5
Probe 1/1000	54,20	60	-9,7
Probe 1/10000	6,38	6	6,4

Pyridoxin			
Red Bull	Konzentration [ng/ml]	Herstellerangabe [ng/ml]	% Abweichung
Probe 1/100	161,78	200	-19,1
Probe 1/1000	17,57	20	-12,2
Probe 1/10000	n.d.		
Rhino			
Probe 1/100	179,66	200	-10,2
Probe 1/1000	16,17	20	-19,1
Probe 1/10000	n.d.		
Magic Man			
Probe 1/100	56,33	66	-14,6
Probe 1/1000	n.d.	6,6	
Probe 1/10000	n.d.		

Tabelle 3.24 Bestimmung von Niacin und Pyridoxin in *Energy Drinks*

Es traten erneut Probleme mit dem Getränk „Rhino“ auf. So lagen die bestimmten Konzentrationen ~ 20% unterhalb den Herstellerangaben. Mögliche Ursache ist vermutlich erneut die störende Matrix des Getränks. Der Niacingehalt der *Energy Drinks* „Red Bull“ und „Magic Man“ konnte genau bestimmt werden. Bei Pyridoxin war bei zu starker Verdünnung der Probe kein Signal mehr detektierbar. Zudem wurde Pyridoxin durchweg etwas zu niedrig quantifiziert. So lag die Abweichung von der Herstellerangabe zwischen -10% bis -20%. Allerdings ist Vitamin B₆ lichtempfindlich und baut sich im Licht ab. Das Getränk „Rhino“ und „Magic Man“ ist in durchsichtigen Plastikflaschen im Handel erhältlich, so dass kein Schutz vor Licht vorlag. Außerdem standen die Proben einige Tage nicht lichtgeschützt im Labor, was die etwas zu gering bestimmten Gehalte plausibel erklären könnte.

Gegenüber gängigen LC-Methoden hat diese MALDI-TOF-MS Methode einige Vorteile. Da keine LC benötigt wird, ist ein sehr viel höherer Probandurchsatz möglich. Zudem werden bei den LC-Methoden die Analyten einzeln erfasst und somit muss für die Koffein- und Vitaminbestimmung jeweils ein separater LC-Lauf durchgeführt werden.

Eine Multimethode, die gleichzeitig die Vitamine und Koffein bestimmen kann, wurde von ARANDA und MORLOCK [2006] vorgestellt. Allerdings wurden in dieser DC-Methode Detektionsmethoden wie UV/VIS und Fluoreszenz-Detektion verwendet, was eine Derivatisierung notwendig macht. Zudem erreicht eine DC-Methode nur einen geringeren Probandurchsatz in Vergleich zu MALDI und ist auch weniger spezifisch. Deshalb ist bei DC-Methoden eine Absicherung der Ergebnisse mit weiteren Analysen ratsam.

Eine ähnliche, auch auf MALDI-TOF-MS basierte Methode wurde kürzlich von GRANT und HELLEUR [2008] vorgestellt. Allerdings konnten diese nur mit Hilfe des Tensids CTAB als Matrix-Ionensuppressor eine Quantifizierung durchführen. Das Tensid ist allerdings überhaupt nicht notwendig, sondern verringert sogar die Nachweisgrenzen der Analyten (siehe Abschnitt 3.2.4). Bei hoher Konzentration der Analyten sind die Analytsignale eindeutig von den Matrixsignalen unterscheidbar (siehe Abbildung 3.29). Der RSD der Methode von GRANT und HELLEUR [2008] ist mit < 20% angegeben. Da jedoch nur 25 Laserschüsse manuell aufsummiert wurden, stellt dieses Ergebnis keine reproduzierbare Standardabweichung dar. Wie in dieser Arbeit

gezeigt, ist die hohe Anzahl aufsummierter Spektren für eine gute Reproduzierbarkeit unerlässlich. Auch die Linearität R^2 ist mit Werten zwischen 0,983 und 0,991 nur bedingt für eine eindeutige Quantifizierung geeignet. Es liegen keine Ergebnisse zur Richtigkeit der Methode vor. Die MALDI-Ergebnisse werden lediglich mit LC-UV Ergebnissen verglichen und weichen bis zu 30% von diesen ab.

Im direkten Vergleich ist die Reproduzierbarkeit und Linearität der entwickelten MALDI-TOF-MS Methode der von GRANT und HELLEUR [2008] vorgestellten Methode überlegen. Zudem war es, anders als bei GRANT und HELLEUR [2008], möglich, mit nur einer Kalibriergerade die Vitamine und Koffein gleichzeitig zu quantifizieren. Der Einsatz von CTAB als Ionensuppressor brachte keinerlei Vorteile und ist für eine sichere und eindeutige Quantifizierung mit MALDI-TOF-MS nicht notwendig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es möglich war, Koffein, Nicotinamid und Pyridoxin in *Energy Drinks* mit nur einer Kalibriergerade und mit nur einer Messung zu quantifizieren. Dazu war keinerlei Probenvorbereitung notwendig. Die Probe muss lediglich verdünnt und gespottet werden. Bei einer durchschnittlichen Messzeit von ~ 10 sec pro Probe ist daher ein sehr hoher Probendurchsatz möglich. Es ist auch denkbar, dass die Inhaltsstoffe weiterer koffeinhaltiger Getränke und Softdrinks mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Methode erfolgreich und schnell quantifizierbar sind. Falls bei der Quantifizierung Suppression durch die Probenmatrix auftritt, kann dieses Problem durch Verwendung des Standard-Additionsverfahrens schnell behoben werden. Diese Methode stellt also ein weiteres Anwendungsgebiet der Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS dar.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine allgemein anwendbare Methode zur Identifizierung und Quantifizierung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS entwickelt. Dabei wurden zahlreiche Analyten, wie unterschiedliche Arzneistoffe, Neurotransmitter und Lebensmittelinhaltsstoffe in verschiedenen Probenmatrizes analysiert.

Bei den verwendeten Matrizes wurden mit α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) die besten Ergebnisse erzielt. Es zeigte sich jedoch, dass die Probenpräparation wichtiger war als die Wahl der Matrix, da auch mit anderen Matrizes bei optimierter Probenpräparation sensitive Messungen im niedrigen Massenbereich möglich waren. Insbesondere eine schnelle Trocknung des Probenspots, und damit verbunden die Bildung kleiner Kristalle, ist für die Analytik kleiner Moleküle hilfreich. Bei gleichzeitiger Verwendung geringer Matrixkonzentrationen und geringer Laserintensität konnte so der störende Matrixhintergrund minimiert werden. Eine noch stärkere Suppression der Matrixsignale bei gleichzeitiger Anreicherung der Analyten auf dem Probenspot konnte durch eine Dünnschichtpräparation (TLP) mit CHCA und Nitrozellulose erreicht werden. Allerdings war die TLP für eine automatische Quantifizierung kleiner Moleküle nur bedingt geeignet.

Die für kleine Moleküle so wichtige Quantifizierung war durch Verwendung einer optimierten schnell trocknenden *Dried Droplet* Präparation (DDP) möglich. Die Kombination dieser optimierten DDP mit ausreichend aufsummierten Einzelschussspektren bei gleichzeitiger Verwendung eines internen Standards (IS) ermöglichte eine valide Quantifizierung mit guter Präzision, Linearität und Richtigkeit. Dabei erfüllten die quantifizierten Analyten die Vorgaben der FDA für Präzision und Richtigkeit.

Diese Quantifizierungsmethode wurde an Mischungen unterschiedlicher Arzneistoffe, sowohl in Standardlösungen als auch in humanem Plasma, erfolgreich durchgeführt. Dabei genügte ein einziger interner Standard, um alle Arzneistoffe der Mischung schnell und sensitiv zu bestimmen (Bestimmungsgrenze 1-5 ng/ml). Weiterhin war es

möglich, den Wirkstoff einer pharmazeutischen Tablette ohne aufwändige Probenvorbereitung schnell und genau zu bestimmen.

Dass MALDI über eine hohe Salztoleranz verfügt, wurde bei der Bestimmung von Acetylcholin (ACh) und Cholin (Ch) in Mikrodialysaten bestätigt. Trotz des hohen Salzgehalts der Proben (~150 mM) war eine direkte Messung ohne vorherige Aufarbeitung möglich. Dabei lag die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für ACh bei 0,3 bzw. 1 fmol/ μ l und für Ch bei 20 bzw. 100 fmol/ μ l.

Nach den Standardlösungen wurden *in-vivo* Mikrodialysate aus dem rechten Striatum verschiedener CD1-Mäuse quantifiziert. Durch Verbindung der Dialysesonde mit einem MALDI-Spotter konnte außerdem die zeitliche Auflösung der Dialyse deutlich verbessert werden.

Ein weiterer Anwendungsbereich stellte die Bestimmung von Melamin in Milch und Milchpulver dar. Nach einfacher Probenvorbereitung war es möglich, Melamin mit einer Bestimmungsgrenze von 0,25 ppm in Milchpulver bzw. 0,625 ppm in Milch direkt und schnell zu quantifizieren. Damit wurden die geforderten Grenzwerte von 1 ppm für Babynahrung bzw. 2,5 ppm für übrige Lebensmittel leicht erreicht.

Als letzte Methode wurden verschiedene Inhaltsstoffe in *Energy Drinks* bestimmt. Bei Verwendung von V@[] @||ã als IS konnte so neben Koffein auch Niacin und Pyridoxin erfolgreich und ohne Probenvorbereitung schnell quantifiziert werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass MALDI auch für die Analytik kleiner Moleküle gut geeignet ist. Neben der Identifizierung der Analyten war auch die Quantifizierung mit guter Linearität, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit möglich. Dabei konnten mit der Standardmatrix CHCA verschiedenste niedermolekulare Analyten in unterschiedlichsten Probenmatrizes bestimmt werden. Im direkten Vergleich war die Sensitivität der vorgestellten MALDI-Methoden mindestens vergleichbar, wenn nicht gar besser als bestehende LC-MS-Methoden. Da auf den Einsatz einer LC verzichtet werden kann, ermöglicht MALDI einen sehr viel höheren Probendurchsatz. Zudem war keine spezielle Matrix, besondere Geräte oder zeitaufwändige Probenvorbereitung und Präparation notwendig.

5 Ausblick

Die Arbeit zeigt, dass von den Anwendern bisher deutlich unterschätzte Potential von MALDI-MS auch im niedrigen Massenbereich. Insbesondere bei nur leicht verunreinigten Proben kann MALDI seine Vorteile wie einfache Probenvorbereitung und hohen Probendurchsatz zeigen.

In Anbetracht der erzielten Ergebnisse sind aber auch noch weitere Untersuchungen unerlässlich. So ist mittels CHCA meist keine sensitive Analytik bei sauren oder neutralen Analyten möglich. Dieses Problem könnte durch die Verwendung anderer Matrices oder besonderer Zusätze behoben werden, benötigt jedoch noch weitere Studien. Auch die Auswirkung verschiedener Probenmatrices auf die Messung, insbesondere die Quantifizierung kleiner Moleküle, ist bisher wenig untersucht worden.

Des Weiteren wäre es interessant zu prüfen, ob durch eine Spoterkennung die Dünnschichtpräparation automatisch im relevanten Bereich gemessen werden kann. Damit wäre eine noch sensitivere Bestimmung der Analyten möglich.

Auch die Kombination von MALDI mit LC wäre für die Bestimmung kleiner Moleküle denkbar, wird jedoch kaum eingesetzt. Dies wäre für komplexe Proben wie z.B. in der Pestizidanalytik hilfreich, da hier die Probe auf weit über 150 Pestizide getestet werden muss.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien

Im Rahmen der Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-MS wurden verschiedene Lösungsmittel und Zusätze auf ihre Anwendbarkeit getestet. Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Lösungsmittel, MALDI-Matrizes und Chemikalien.

Name	Reinheit	Hersteller
Aceton	LC grade	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	LC-MS grade	
Ameisensäure	≥ 98%	
Ammoniumhydroxid-Lösung	Ultra	
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	p.a.	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Essigsäure	p.a.	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	LC grade	
Ethylacetat		
Isopropanol		
KCl	p.a.	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Methanol	LC-MS grade	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Methyltertbutylether	LC grade	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milli Q Wasser		Millipore, Bedford, USA
NaCl	p.a.	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Neostigminbromid		ACROS Organics, Geel, Belgien
Pro-Celloidine (Nitrozellulose)		Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Name		Hersteller
Scopolamin HCl		TCI, Tokyo, Japan
Trifluoressigsäure		Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
MALDI-Matrizes		Hersteller
α -Cyano-4-hydroxizimtsäure		Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland
2,5 -Dihydroxybenzoesäure		
4-Chlor- α -cyanozimtsäure		Eigensynthese von Thorsten Jaskolla, AK Karas
Mesotetrakis (pentafluorophenyl)porphyrin		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Sinapinsäure		Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland

Tabelle 6.1 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Alle für die Arbeit benötigten Chemikalien entsprachen, falls nicht anders erwähnt, mindestens dem Reinheitsgrad „pro analysi“ bzw. „LC grade“. Es wurde grundsätzlich Milli Q Wasser aus der Milli Q Anlage (Millipore, Bedford, USA) verwendet.

Die für die Analysen verwendeten Analyten und internen Standardsubstanzen sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

6.2 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen der Arbeit eingesetzt:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kolbenhubpipetten		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Analysenschüttler	Thermomix comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C	Deutschland
Vakuumzentrifuge	Speedvac SC 110	Savant, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 100 SH	Bandelin, Berlin, Deutschland
Analysenwaage	AT 261 DeltaRange®	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland

Tabelle 6.2 Geräte und Hersteller

Massenspektrometer

Die massenspektrometrischen Analysen wurde an verschiedenen Massenspektrometern durchgeführt. Die Geräteparameter wurden dabei für die Messung kleiner Moleküle optimiert, um eine hohe Sensitivität und Auflösung zu erreichen.

- (1) **Voyager™-DE STR** BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Einen Großteil der Messungen zur Optimierung der Probenpräparation, sowie die Untersuchung verschiedener Matrices und Detergenzien wurde an diesem Gerät durchgeführt. Änderungen gegenüber den „Standard-Proteomics“

Geräteeinstellungen sind neben dem anderen Massenbereich und dem ausgeschaltetem Low Mass Gate die auf 25 ns reduzierte Delay Time.

Abbildung 6.1 zeigt die für die Messung kleiner Moleküle optimierten Geräteparameter.

```

Voyager Instrument Control Panel - Instrument Configuration

MODE
Operation Mode: Reflector           Extraction: Delayed
Polarity: Positive                 Laser: Internal / Optimized
Mirror to Accelerating Voltage Ratio: 1.12
Timed Ion Selector: Off

SPECTROMETER
Accelerating Voltage: 20000        Grid Voltage: 70%
Guide Wire Voltage: 0.050%       Delay Time: 25 nsec
Mass Range: 10 to 800 Da         Low Mass Gate: Off
Laser Power: 285                 Shots / Spectrum: 250

DIGITIZER
Bin Size: 0.5 nsec                Input Bandwidth: 500 MHz
Vertical Scale: 200 mV            Vertical Offset: 0.0%

CALIBRATION
Source: [Default]
Matrix: a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Initial Velocity: 300 m/sec
    
```

Abbildung 6.1 Geräteparameter Voyager™-DE STR

Die benötigte Laserenergie musste je nach Art und Beschaffenheit der Probe (Salzgehalt, Verunreinigungen, Detergenzien etc.) nachjustiert werden. Als Probenteller wurde ein Voyager-Standard 100 *well plate* (*stainless steel*) verwendet. Die Spektren wurden im niedrigen Bereich $m/z < 800$ im positiven Reflektor-Modus manuell gemessen.

(2) 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, MDS SCIEX, USA)

Ein Großteil der Arbeit, insbesondere die Quantifizierung wurde am AB 4800 durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über einen 200 Hz (Nd:YAG) Laser mit der Wellenlänge 355 nm. Auch hier wurden die Geräteparameter für die Messung kleiner Moleküle optimiert. Die benötigte Laserenergie musste wie beim Voyager STR je nach Art und Beschaffenheit der Probe (Salzgehalt, Verunreinigungen, Detergenzien etc.) nachjustiert werden. Als Probenteller wurde eine 384 Opti-TOF™-*stainless steel*

MALDI-Platte verwendet. Die Spektren wurden im niedrigen Bereich $m/z < 800$ im positiven Reflektor-Modus automatisch gemessen. Dabei wurden nur Spektren aufsummiert die ein Signal-zu-Rausch Verhältnis über 200 aufwiesen (sowohl für Matrix- als auch für Analytsignale). Dies verhindert ein aufsummieren von leeren Spektren.

Die Auswertung erfolgte immer an Hand der Signalhöhe der monoisotopischen Analytsignale $[\text{Analyt}+\text{H}]^+$ mittels der Steuerungssoftware des Gerätes (4000 Series Explorer V3.5.3) bzw. der Auswertesoftware DataExplorer® Version 4.8 (beide Applied Biosystems, USA). Die anschließende Auswertung der Intensitäten erfolgte mit Microsoft® Excel® 2003 Sp2 und Microsoft® Excel® 2007 SP1.

MS/MS Experimente wurden mit einer Kollisionsenergie von 2 kV mit Luft als Kollisionsgas bei einem Druck von 10^{-6} Torr durchgeführt. Es wurden für jede Precursormasse an 50 verschiedenen Stellen des Spots insgesamt 2000 Laserschüsse aufsummiert.

Aufgrund der automatischen Messung und der komfortableren Auswertung der Spektren war ein deutlich höherer Probendurchsatz als mit dem Voyager STR möglich. Für die Quantifizierung stellte dieses Gerät eine deutliche Verbesserung gegenüber dem Voyager STR dar.

6.3 Etablierung einer Standardpräparation für kleine Moleküle

Ziel war es, eine universell einsetzbare Standardpräparation für kleine Moleküle zu entwickeln. Dazu wurden Standardpräparationen und Matrizes aus dem Proteomics-Bereich, sowie im Arbeitskreis bekannte Präparationstechniken auf eine Anwendbarkeit für kleine Moleküle überprüft. Anschließend wurden verschiedene Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedene Matrizes mit unterschiedlichen Matrixkonzentrationen getestet und die Präparation für die Messung kleiner Moleküle optimiert. Auch die Probenpräparationstechniken wurden variiert und optimiert.

6.3.1 Auswahl der Matrix für kleine Moleküle

Die in Tabelle 6.1 genannten Matrizes wurden auf Ihre Anwendbarkeit für kleine Moleküle getestet. Dazu wurden die verschiedenen Matrizes mit unterschiedlichen Präparationstechniken wie Dried Droplet-, Dünnschicht- oder Sandwich-Präparationen auf den Probenteller aufgetragen. Dabei wurden neben der Konzentration auch die Lösemittelanteile variiert, sowie die Trocknungsart verändert.

6.3.2 Einfluss von Zusätzen

Um Verbesserungen der Messergebnisse zu erzielen, wurde der Matrix oder den Analytlösungen verschiedene Zusätze zugegeben. Dabei wurde insbesondere auf Suppression der Matrixsignale und des Rauschens, sowie auf eine Erhöhung der Signalintensitäten der Analyten geachtet. Folgende Zusätze wurden verwendet:

- Nitrocellulose
- Verschiedene Tenside
- α -Cyclodextrin
- Verschiedene Salze wie NaCl, Ammoniumacetat, Kaliumchlorid, Kupferchlorid etc.

6.4 Screening verschiedener Arzneistoffe

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene, am Pharmazeutischen Institut verfügbare Arzneistoffe und kleine Moleküle mittels MALDI-MS gemessen.

Tabelle 6.3 gibt einen Überblick über die analysierten Arzneistoffe und kleinen Moleküle.

Name	Name	Name	Name
Acetylcystein	Clindamycin	Melperon	Sotalol
Aciclovir	Clioquinol	Metoclopramid	Sulfamethoxazol
Allopurinol	Clonidin	Metoprolol	Sulfasalazin
Amitriptylin	Cloroquin	Metronidazol	Sulpirid
Amitriptylinoxid	Coffein	Miconazol	Theobromin
Ampicillin	Doxepin	Minanserin	Theophylin
Antipyrin	Etilefrin	Minocyclin	Thiamazol
Atenolol	Flunarizin	Mirtazopin	Thiamin
Benperidol	Fluphenazin	Moclobemid	Tolbutamid
Benserazid	Fluvoxamin	Nicotinamid	Trapanal
Benzocain	Furosemid	Nortriptylin	Trimethoprim
Bufexamac	Haloperidol	Penicillin G	Trimipramin
Captopril	Imipramin	Pernazin	Verapamil
Cephaclor	Isoniazid	Phenazon	Xylometazolin
Chinin	Lidocain	Prazosin	Yohimbin
Chloramphenicol	Levodopa	Procain	
Chlorpromazin	Levomepromazin	Promethazin	
Cimetidin	Loperamid	Propranolol	
Ciprofloxacin	Maprotilin	Propyphenanzon	

Tabelle 6.3 Übersicht analysierte Arzneistoffe

6.5 Bestimmung von Phenothiazine

Es wurde überprüft, ob MALDI-TOF-MS prinzipiell zur Quantifizierung kleiner Moleküle geeignet ist. Dabei wurde zuerst die Arzneistoffgruppe der Phenothiazine zur Quantifizierung verwendet.

Bei der Bestimmung der Phenothiazine wurden neben den in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 genannten Chemikalien und Geräten zusätzlich folgende Chemikalien verwendet:

Name	Hersteller
Chlorpromazin HCl	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Chlorprothixen HCl	
Flupentixol 2*HCl	
Fluphenazin 2*HCl	
humanes Plasma	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mom USA
Levomepromazin HCl	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
Perazin HCl	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Promethazin HCl	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
Thioridazin HCl	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Trifluoperazin 2*HCl	
Triflupromazin HCl	

Berechnung der log D Werte

Um eventuelle Vorhersagen für die Eignung eines Stoffs als IS treffen zu können, wurde von den verwendeten Analyten der log D Wert berechnet. Dazu wurde eine Testversion des PrologD-Moduls der Pallas Software (CompuDrug, Sedona, AZ, USA) benutzt. Als Parameter wurden pH 2 und *ionic strength* 0,01 M verwendet.

6.5.1 Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration

Zuerst musste ein geeigneter interner Standard für die Quantifizierung gefunden werden. Dazu wurden alle in der Analysenmischung enthaltenen Phenothiazine auf ihre Verwendbarkeit als IS geprüft.

Durchführung

Es wurde von jedem Arzneistoff eine Stammlösung der Konzentration 10^{-2} M in 50% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt.

Aus diesen Stammlösungen wurde eine Mischung aller Analyten mit der Konzentration 10^{-4} M unter Verwendung von 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt. Dieses Lösungsmittel wurde auch für alle weiteren Verdünnungen benutzt. Daraus wurden dann folgende Konzentrationen hergestellt: 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 fmol/ μ l.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe mit variabler Konzentration für den IS (IS hat die gleiche Konzentration wie der Analyt) wird anhand Abbildung 6.2 verdeutlicht.

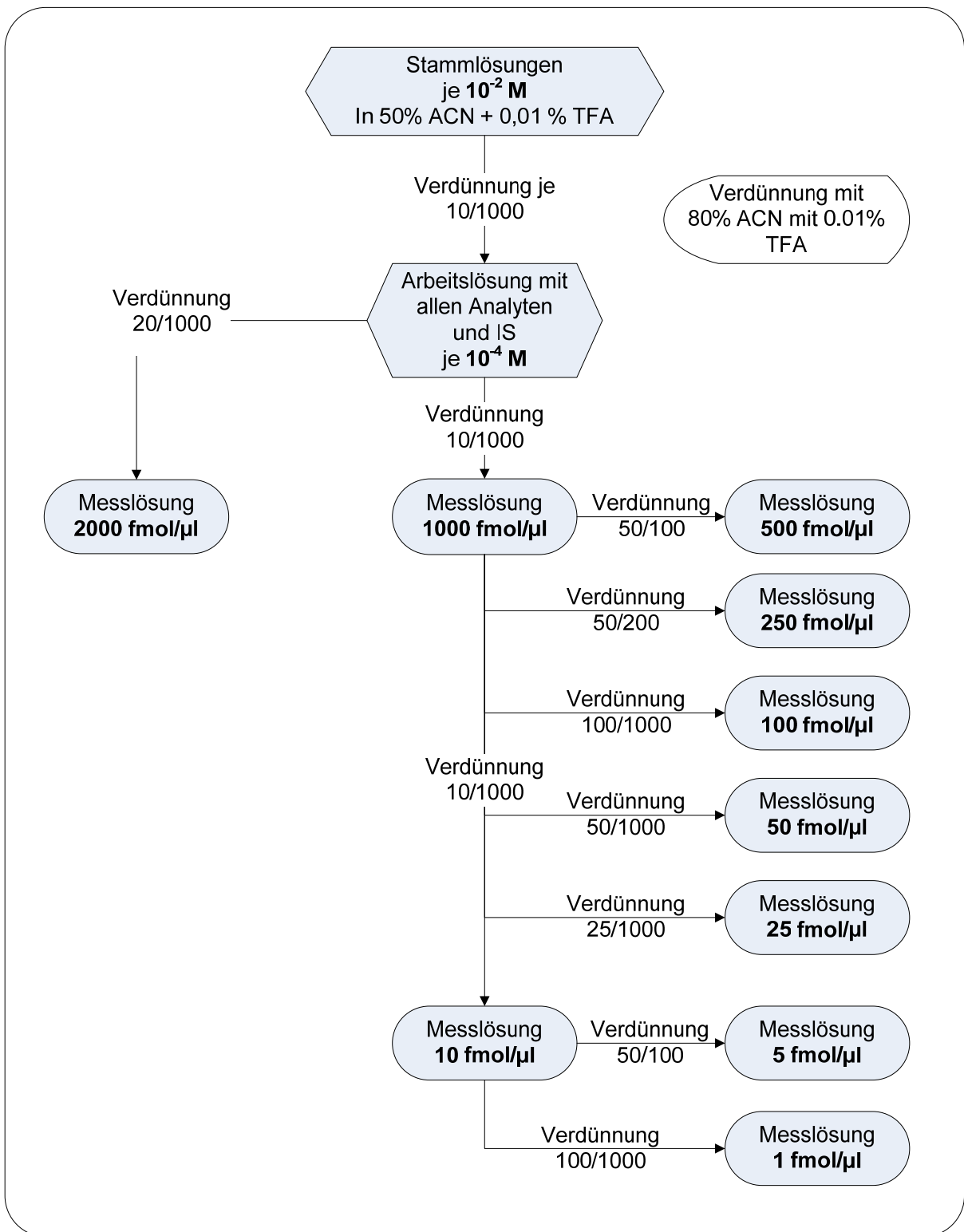


Abbildung 6.2 Pipettierschema der Verdünnungsreihe mit variabler IS-Konzentration

MALDI-Matrix

Als MALDI-Matrix wurde 1 mg/ml CHCA in 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA gelöst.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der für kleine Moleküle optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 µl Matrix und 1 µl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde nach dem gleichen Schema wie die Messlösungen hergestellt, 3-mal gespottet und automatisch gemessen.

6.5.2 Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration

Der in Abschnitt 6.5.1 am besten geeignete IS wurde mit konstanter Konzentration (50 fmol/µl) verwendet.

Durchführung

Auch hier wurde aus den Analyten jeweils eine Stammlösung der Konzentration 10^{-2} M in 50% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt.

Anschließend wurde 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA zur weiteren Verdünnung verwendet. Es wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 fmol/µl.

Da der IS jedoch mit konstanter Konzentration von 50 fmol/µl verwendet wurde, war ein weiteres Verdünnungsschema notwendig. Dieses Schema ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

Material und Methoden

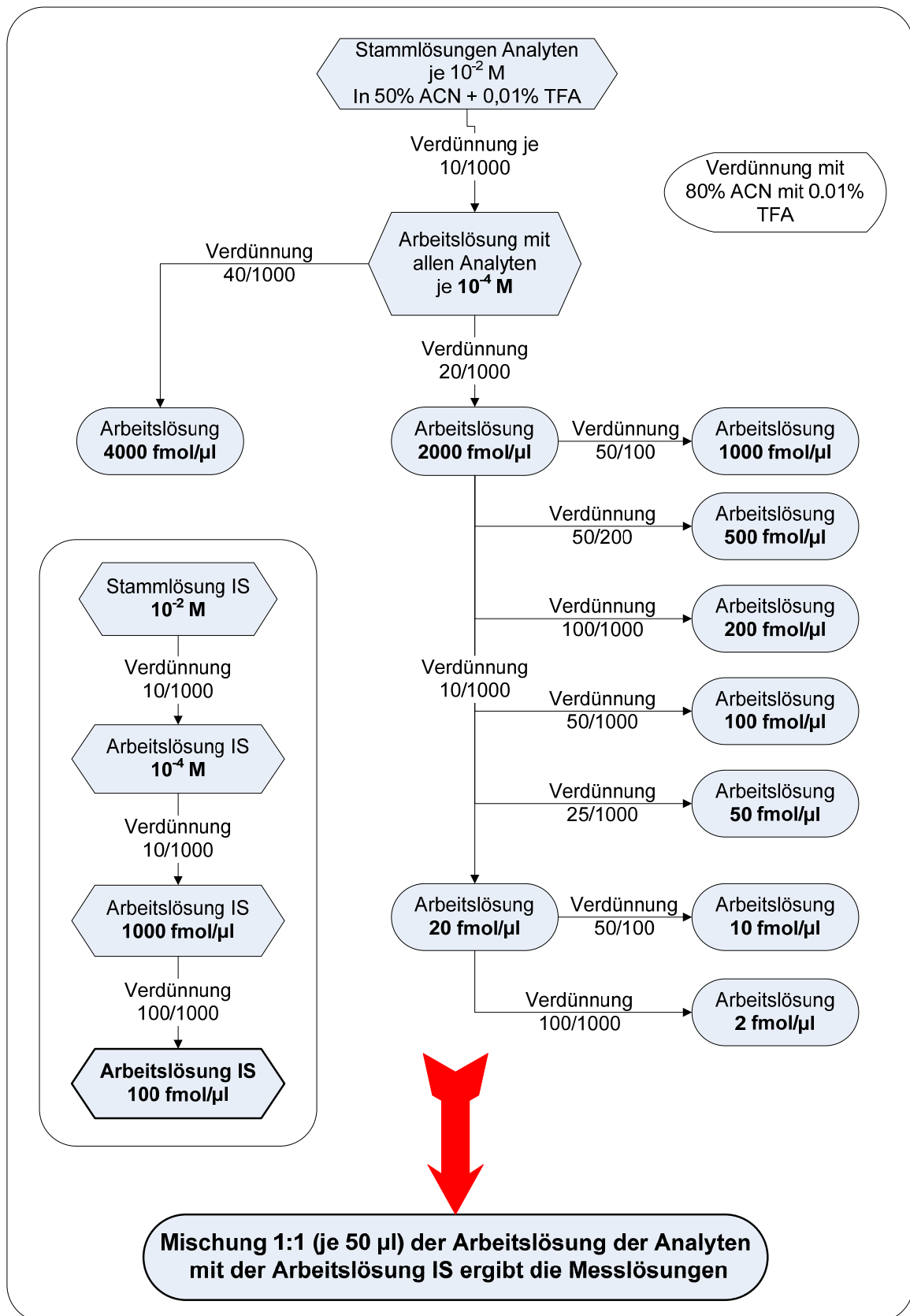


Abbildung 6.3 Pipettierschema der Verdünnungsreihe mit konstanter IS-Konzentration

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 µl Matrix und 1 µl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde nach dem gleichen Schema wie die Messlösungen hergestellt, 3-mal gespottet und automatisch gemessen.

6.5.3 Quantifizierung der Phenothiazine in menschlichem Plasma

Um reale Proben zu simulieren wurde menschliches Plasma mit den Phenothiazinen versetzt. Nach einer Aufreinigung wurden die Proben mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

Herstellung der gespikten Human-Plasma-Proben

Es wurde eine Stammlösung der verwendeten Phenothiazinen mit der Konzentration 10^{-4} M in 10% ACN (v/v) mit 0,1% TFA hergestellt. 40 µl dieser Stammlösung wurden in 960 µl humanes Plasma pipettiert. Ausgehend von dieser Probe der Konzentration von 4000 fmol/µl wurden die weiteren Plasmaproben hergestellt. Durch Verdünnung mit humanem Plasma wurden folgende Arzneistoffkonzentrationen hergestellt: 2, 10, 20, 50, 100, 200, 1000, 2000 und 4000 fmol/µl.

Probenvorbereitung

Flüssig-Flüssig Extraktion

200 µl der gespikten Plasma Probe wurden mit 10 µl IS (Levomepromazin 500 fmol/µl) und 10 µl 1 M NH₃ Lösung versetzt. Anschließend wurde die Probe 5 min gründlich durchmischt. Nach Zugabe von 500 µl Methyl-tert-butylether (MTBE) und 500 µl Ethylacetat wurde erneut 15 min gründlich gemischt und anschließend 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Zur einfacheren Abtrennung des Überstands wurde

die Probe im Gefrierschrank eingefroren. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Trockene an der Vakuumzentrifuge eingengt. Der Extrakt wurde anschließend in 50 µl 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA gelöst und gespottet.

Proteinfällung mit organischem Lösemittel

200 µl der gespikten Plasma Probe wurden mit 10 µl IS (Levomepromazin 500 fmol/µl) versetzt und 5 min gründlich durchmischt. Zur Proteinausfällung wurden 400 µl ACN/MeOH (1:1, v/v) zugegeben und erneut 15 min gründlich durchmischt. Die Probe musste nun 10 min bei 14000 g zentrifugiert werden. Zum einfacheren Abtrennung des Überstands wurde die Probe im Gefrierschrank eingefroren. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Trockene an der Vakuumzentrifuge eingengt. Der Extrakt wurde anschließend in 50 µl 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA gelöst und gespottet.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 µl Matrix und 1 µl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde nach dem gleichen Schema wie die Messlösungen hergestellt, 3-mal gespottet und automatisch gemessen.

6.6 Bestimmung verschiedener Arzneistoffe

Die Anwendbarkeit von MALDI-MS im Bereich kleiner Moleküle wurde anhand weiterer Arzneistoffe geprüft. Dazu wurde eine Mischung unterschiedlicher chemischer und pharmazeutischer Arzneistoffe verwendet und quantifiziert. Neben den in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 genannten Chemikalien und Geräten wurden zusätzlich folgende weitere Chemikalien verwendet:

Name	Hersteller
Loperamid HCl	Alle verwendeten Analyten von Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Melperon	
Metoclopramid HCl	
Prazosin HCl	
Procain HCl	
Thioridazin HCl	
Trimethoprim	
Verapamil HCl	
Xylometazolin HCl	
Yohimbin	
Prazosin-ratiopharm® 1 mg Tabletten	Hirsch Apotheke, Frankfurt, Deutschland

6.6.1 Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration

Zuerst musste, wie in Kapitel 6.5.1, ein geeigneter IS gefunden werden. Dazu wurden alle in der Analysenmischung enthaltenen Arzneistoffe auf ihre Verwendbarkeit als IS geprüft.

Durchführung

Es wurde von jedem Arzneistoff eine Stammlösung der Konzentration 10^{-2} M in 50% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurde eine Mischung aller Analyten mit der Konzentration 10^{-4} M hergestellt. Anschließend

wurde, wie im Schema Abbildung 6.2 gezeigt, eine Verdünnungsreihe mit folgende Konzentrationen hergestellt: 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 fmol/μl.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 μl Matrix und 1 μl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde nach dem gleichen Schema wie die Messlösungen hergestellt, 3-mal gespottet und automatisch gemessen.

6.6.2 Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration

Der in Abschnitt 6.6.1 am besten geeignete IS wurde mit konstanter Konzentration (50 fmol/μl) verwendet.

Durchführung

Auch hier wurde aus den Analyten jeweils eine Stammlösung der Konzentration 10^{-2} M in 50% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt. Die Verdünnungsreihe bestand aus folgenden Konzentrationen: 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 fmol/μl, und wurde analog dem Pipettierschema in Abbildung 6.3 angesetzt.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 μl Matrix und 1 μl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde nach dem gleichen Schema wie die Messlösungen hergestellt, 3-mal gespottet und automatisch gemessen.

6.7 Bestimmung des Wirkstoffgehalts einer Tablette

Es wurde der Wirkstoffgehalt einer handelsüblichen Tablette analysiert.

Durchführung

Die Prazosin-Tablette wurde in 5 ml 50% ACN (v/v) mit 0,01% TFA gelöst (15 min im Ultraschallbad). Nach Zentrifugieren (5 min bei 14000 g) wurde der Überstand ohne weitere Aufreinigung für die Bestimmung verwendet.

Folgende Verdünnungsreihe wurde hergestellt: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2000 fmol/ μ l.

Als IS wurden Trimethoprim, Levomepromazin und Yohimbin mit jeweils 50 fmol/ μ l eingesetzt.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 μ l Matrix und 1 μ l Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung benötigte Kalibriergerade wurde aus einer Prazosin Stammlösung der Konzentration 10^{-2} M hergestellt. Dabei wurden folgenden Konzentrationen gemessen: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2000 fmol/ μ l.

Als IS wurden wiederum Trimethoprim, Levomepromazin und Yohimbin mit jeweils 50 fmol/ μ l eingesetzt.

6.8 Bestimmung von Acetylcholin und Cholin in Mikrodialyseproben

Bei der Bestimmung des Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und seiner Vorstufe Cholin (Ch) wurden neben den in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 genannten Chemikalien und Geräten zusätzlich folgende Chemikalien verwendet:

Chemikalien

Name	Reinheit	Hersteller
Acetylcholinchlorid	≥ 99%	Sigma-Aldrich INC., St. Louis, USA
Cholinchlorid	≥ 99%	
Acetyl-β-methylcholinchlorid	Min. 98%	
Cholin-d ₉ -chlorid	98% atom% D	ISOTECH™, Ohio, USA
Scopolaminhydrobromid		TCl, Tokyo, Japan
Neostigminbromid		ACROS Organics, Geel, Belgien

6.8.1 Methodenentwicklung in künstlicher Hirnflüssigkeit

Zur Methodenentwicklung wurden die Analyten ACh und Ch in künstlicher Hirnflüssigkeit (aCSF) gelöst und in unterschiedlicher Konzentration bestimmt. Als Lösungsmittel für die Proben wurde immer aCSF verwendet. Die beiden IS Acetyl-β-methylcholin (AMCh) und Cholin-d₉ wurde zuerst mit variabler Konzentration (dieselbe Konzentration wie der Analyt) verwendet. Anschließend wurden der IS jeder Probe in konstanter Konzentration zugegeben. Die Konzentration an Ch war stets 100-fach höher als die Konzentration von ACh um das Verhältnis in realen Proben zu simulieren. Die Lösungen wurden frisch angesetzt, da ACh in Lösung nicht über einen längeren Zeitraum stabil vorliegt.

Herstellung der künstlichen Hirnflüssigkeit (aCSF)

Das aCSF simuliert das Hirnwasser und wird zur Extraktion bei der Mikrodialyse eingesetzt. Es stellt eine wässrige Lösung mit folgenden Salzkonzentrationen dar:

NaCl	147 mM
KCl	2,7 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,2 mM

MALDI-Matrix

Es wurde neben CHCA auch Cl-CCA als MALDI-Matrix verwendet. Beide Substanzen wurden in 80% ACN mit 0,01% TFA gelöst und auf eine Konzentration von 1,5 mg/ml für CHCA und 2 mg/ml für Cl-CCA eingestellt. Am AB 4800 wurde nur CHCA gemessen, am Voyager STR beide Matrizes.

6.8.2 Quantifizierung mit variabler IS-Konzentration

Die Verdünnungsreihe wurde analog dem Pipettierschema aus Abbildung 6.2 hergestellt.

Es wurden folgende ACh-Konzentrationen hergestellt und analysiert: 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2500 fmol/μl. Die Konzentrationen für Ch waren stets 100-fach höher.

6.8.3 Quantifizierung mit konstanter IS-Konzentration

Die Verdünnungsreihe wurde analog dem Pipettierschema aus Abbildung 6.3 hergestellt. Dabei wurden erneut folgende ACh-Konzentrationen hergestellt und analysiert: 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2500 fmol/μl. Als IS diente Acetyl-β-methylcholin und Cholin-d₉ mit einer konstanten Konzentration von 100 fmol/μl bzw. 2,5 pmol/μl.

MALDI-MS Messung

Die Messung erfolgte am Voyager STR und am AB 4800 mit der für kleine Moleküle optimierten Methode. Am AB 4800 wurde automatisch gemessen und insgesamt 2000 Laserschüsse an 50 verschiedenen Stellen aufsummiert. Dabei wurden nur Spektren aufsummiert, die ein Signal-zu-Rausch Verhältnis über 200 aufwiesen (sowohl für Matrixsignale als auch für Analytsignale). Die Laserenergie wurde manuell angepasst, um die stark salzhaltige Probe optimal zu messen.

Am Voyager STR wurde manuell gemessen, wobei insgesamt 1000 Laserschüsse aufsummiert wurden.

6.8.4 Messung von *in-vivo* Mäusehirndialysaten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung des Neurotransmitter ACh und seines Vorläufers Ch bei vier CD1 Mäusen im rechten Striatum untersucht.

Probennahme

Die Probennahme der Mäusehirndialysate wurde von Dr. Martina Zimmermann aus dem Arbeitskreis Prof. Klein (Fachbereich 14, Pharmakologie, Goethe Universität Frankfurt) durchgeführt.

Die CD1 Mäuse wurden mit Isofluran (4% zu Beginn, dann 1,5%) in synthetischer Luft anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Eine I-förmige konzentrische Dialysesonde mit einer Austauschlänge von 2 mm wurde, wie bei ERB et al. [2001] und KOPF et al. [2001] beschrieben hergestellt, und in das rechte Striatum implantiert. Dabei wurden folgenden Koordinaten (vom Bregma) verwendet: AP: -0,5 mm, L: -2,2 mm und DV: -3,8 mm. Nach der Operation konnten sich die Tiere über Nacht erholen. Das Experiment wurde am nächsten Tag mit frei beweglichen Tieren durchgeführt. Die Mikrodialysesonde wurde mit aCSF, welches mit dem AChE Inhibitor Neostigmin (1 μ M) versetzt war, mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 μ l/min durchspült. Die Dialysate wurden in Zeitintervallen von 30 min (Maus A1), 15 min (Maus A2 und B) und 1 min (Maus C) automatisch gesammelt. Um ausreichend Proben für die Basislinienbestimmung zu erhalten, wurde zuerst 90 min gesammelt. Danach wurde auf eine weitere künstliche

Hirnflüssigkeit umgeschaltet. Diese enthielt neben Neostigmin zusätzlich noch Scopolamin mit einer Konzentration von 100 nM. Nach weiteren 90 min wurde wieder zur ursprünglichen aCSF Lösung ohne Scopolamin zurückgewechselt. Anschließend wurden für weitere 3 h Proben gesammelt. Die Proben von Maus A und B wurden sofort nach der Probennahme mit dem Fraktionssammler (Biorad, München, Deutschland) auf Eis gekühlt und bis zur Messung bei -20°C im Gefrierschrank eingefroren. Die Proben der Maus C wurden direkt mit Hilfe eines MALDI-Spotters (SunCollect, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) auf die MALDI Platte aufgetragen. Am folgenden Tag wurden die Tiere getötet und die Gehirne untersucht, um zu überprüfen ob die Mikrodialysesonde an der richtigen Stelle implantiert war. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den genehmigten Richtlinien des Regierungspräsidiums Darmstadt, Deutschland durchgeführt.

Wiederfindungsrate der Mikrodialysesonden

Es wurde eine aCSF Lösung mit jeweils 1 µM ACh und Ch hergestellt. Die Sonde wurde bei Raumtemperatur in diese mittels Magnetrührer durchmischte Lösung getaucht. Die Dialysesonde wurde mit aCSF mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 µl/min durchspült. Die Proben wurden in 15 min Intervallen für insgesamt 2 h gesammelt, auf Eis gekühlt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Kalibriergerade

Die zur Quantifizierung nötige Kalibriergerade wurde aus den Stammlösungen der Analyten und IS hergestellt. Dabei wurden folgende Konzentrationen an ACh gemessen: 0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 fmol/µl. Ch lag jeweils mit einer 100-fach höheren Konzentration vor. Der IS hatte eine finale Konzentration von 50 fmol/µl für AMCh und 5 pmol/µl für Ch-d₉.

Standard-Additionsverfahrens

Die Mikrodialyseproben wurden zusätzlich mit dem Standard-Additionsverfahren quantifiziert. Dazu wurde jede Probe zuerst 4-mal gespottet. Anschließend wurde der Standard und der IS aufgetragen. Tabelle 6.4 erläutert das Auftrageschema für das Standard-Additionsverfahren.

	Zugabe von			
	ACh [fmol]	AMCh [fmol]	Ch [pmol]	Ch-d ₉ [pmol]
Spot 1	0	50	0	5
Spot 2	50	50	5	5
Spot 3	100	100	10	10
Spot 4	150	150	15	15

Tabelle 6.4 Auftrageschema Standard-Additionsverfahren

MALDI-MS Messung

Die MALDI-Matrix CHCA wurde in einer Konzentration von 1,5 mg/ml in 80% ACN (v/v) mit 0,01% TFA hergestellt. Jede Probe wurde mit einer optimierten *Dried Droplet* Präparation (1µl Probe, 1µl Matrix) auf eine 384 Opti-TOF™-*stainless steel* MALDI-Platte aufgetragen.

Die Spektren wurden im Bereich 10 bis 600 m/z im positiven Reflektor-Modus automatisch gemessen. Es wurden insgesamt 2000 Laserschüsse an 50 verschiedenen Stellen aufsummiert. Dabei wurden nur Spektren aufsummiert, die ein Signal zu Rausch-Verhältnis über 200 aufwiesen (sowohl für Matrixsignale als auch für Analytsignale). Die Laserenergie wurde manuell angepasst, um die stark salzhaltige Probe optimal zu messen. Die MS/MS Experimente wurden mit einer Kollisionsenergie von 2 kV mit Luft als Kollisionsgas bei einem Druck von 10⁻⁶ Torr durchgeführt. Es wurden für jede Precursormasse an 50 verschiedenen Stellen des Spots insgesamt 2000 Laserschüsse aufsummiert.

6.9 Bestimmung von Melamin in Milchprodukten

Ein weiterer Anwendungsbereich der MALDI-MS stellt die Analytik von Melamin in Milchprodukten dar. Neben den in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 genannten Chemikalien und Geräten wurden zusätzlich folgende Chemikalien verwendet:

Name	Hersteller
Melamin	
Atrazin (6-Chlor- <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -isopropyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Milchpulver	Gabler Saliter GmbH & Co.KG, Obergünzburg, Deutschland
Haltbare Landmilch (min. 3,8% Fett)	Landliebe Molkereiprodukte GmbH, Heilbronn, Deutschland

6.9.1 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung zur Bestimmung von Melamin wurde mit Standardlösungen in Wasser durchgeführt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von Melamin mit den Konzentrationen 5000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5 und 0,1 fmol/μl hergestellt. Der IS Atrazin hatte jeweils eine Endkonzentration von 200 fmol/μl.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 μl Matrix und 1 μl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert. Es wurden insgesamt 2000 Laserschüsse an 50 verschiedenen Stellen aufsummiert.

6.9.2 Quantifizierung von Melamin in Milchpulver und Milch

Um Melamin in Milchpulver zu bestimmen, wurde handelsübliches Milchpulver mit Melamin versetzt. Die Aufarbeitung der Proben fand in Anlehnung an ein Protokoll der FDA statt [TURNIPSEED *et al.* 2008]. Abbildung 6.4 zeigt ein Schema dieser Aufreinigung.

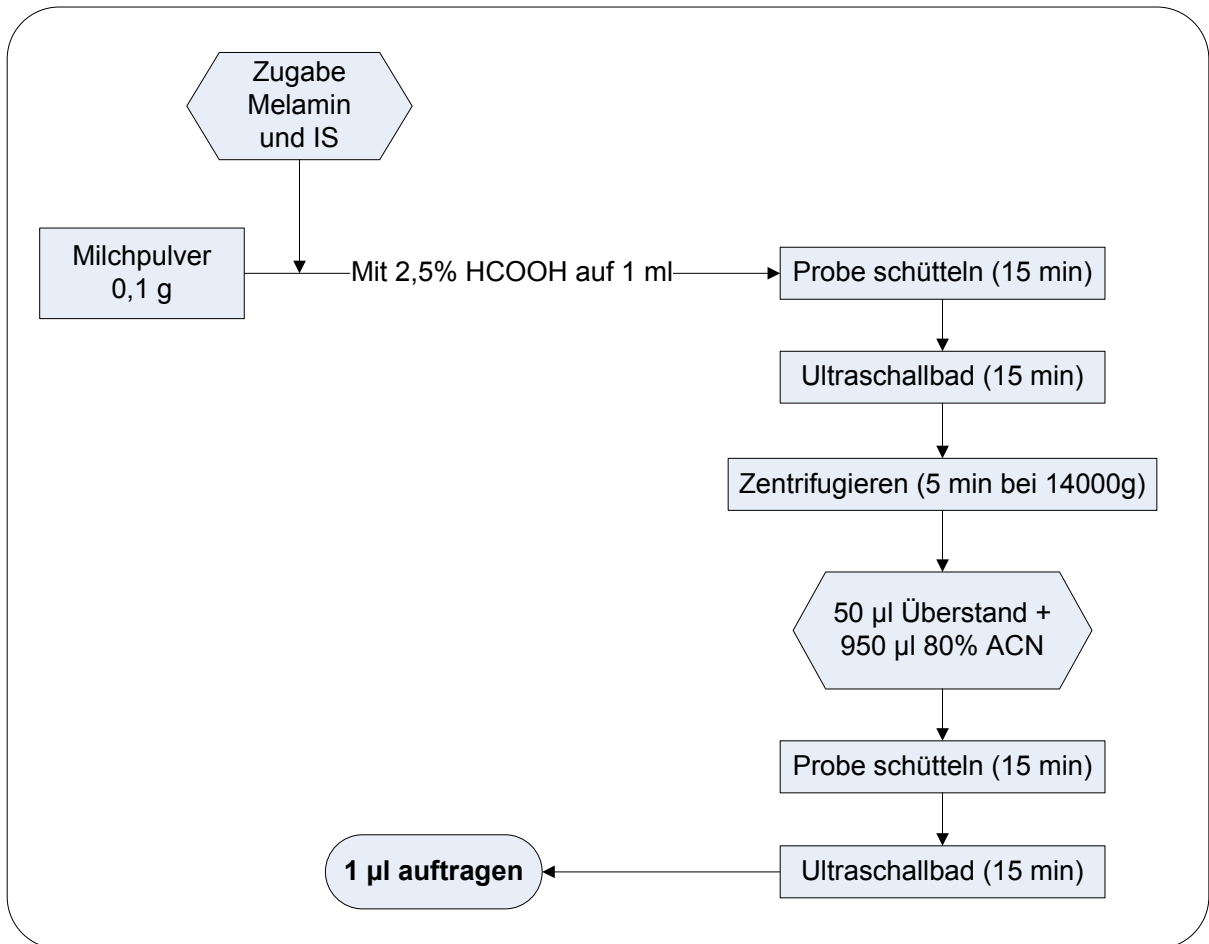


Abbildung 6.4 Aufarbeitung des mit Melamin versetzten Milchpulvers

Die Aufreinigung bei gespikter Milch fand analog statt. Hierbei wurde anstelle von 0,1 g Milchpulver 200 µl haltbare handelsübliche Milch mit 3,8 % Fettanteil verwendet. Folgende Endkonzentrationen für Melamin wurden gemessen: 2000, 1000, 500, 100, 50, 10 fmol/µl und ein Blankwert (nur Milchpulver + IS) sowie ein Kontrollwert (nur Milchpulver ohne Melamin und ohne IS). Der IS Atrazin hatte jeweils eine Endkonzentration von 200 fmol/µl.

Messung

Die fertigen Messlösungen wurden mit der optimierten DDP Methode 3-mal gespottet (je 1 µl Matrix und 1 µl Probe) und anschließend automatisch am AB 4800 analysiert. Es wurden insgesamt 2000 Laserschüsse an 50 verschiedenen Stellen aufsummiert.

6.10 Bestimmung von Koffein und Vitaminen in *Energy Drinks*

Bei der Bestimmung von Koffein und Vitaminen in *Energy Drinks* wurden neben den in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 genannten Chemikalien und Geräten zusätzlich folgende Chemikalien und Getränke verwendet.

Name	Hersteller
Koffein	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Vitamin B ₁₂	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Red Bull	Red Bull GmbH, Fuschl, Österreich
Magic Man	Gedima Erfrischungsgetränke GmbH, Hückelhoven, Deutschland
Rhino	Rhino's energy GmbH, München, Deutschland

Durchführung

Die verfügbaren *Energy Drinks* wurden direkt ohne jegliche Probenvorbereitung verwendet. Es fand lediglich eine Verdünnung mit Wasser (1:100, 1:1000 und 1:10000) statt.

Die Quantifizierung von Koffein in *Energy Drinks* wurde zuerst mit Hilfe des Standard-Additionsverfahrens durchgeführt. Anschließend wurde eine Bestimmung mittels Kalibriergerade durchgeführt. Als interner Standard wurde Theobromin mit einer Endkonzentration von 1 pmol/µl verwendet.

Standard-Additionsverfahren

Die verdünnten *Energy Drink* Proben wurden 1:1 mit IS gemischt und jeweils 5-mal gespottet. Um das Standard-Additionsverfahren durchzuführen, wurde Spot 2 bis 5 jeweils mit 1 μl Koffeinelösung unterschiedlicher Konzentration versetzt.

Tabelle 6.5 zeigt die aufgetragenen Koffeinstoffmengen.

	Zugabe Koffein [fmol]
Spot 1	0
Spot 2	500
Spot 3	1000
Spot 4	1500
Spot 5	2000

Tabelle 6.5 Zugabe Koffeinelösung für das Standard-Additionsverfahren

Zuletzt wurde die Matrixlösung auf den getrockneten Spot aufgetragen und, nachdem alles gelöst war, mit Hilfe eines kontinuierlichen Luftstromes schnell getrocknet.

Quantifizierung mittels Kalibriergerade

Zur Bestimmung des Koffeingehalts wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 50, 25, 1, 0,5 und 0,25 pmol/ μl Koffein.

Als IS wurde $V@[\] @||\tilde{a}$ mit einer Endkonzentration von 1 pmol/ μl verwendet.

Messung

Die Messung fand am AB 4800 mit den für kleine Moleküle optimierten Parametern statt. Es wurden insgesamt 2000 Laserschüsse an 50 verschiedenen Stellen aufsummiert.

7 Literatur

- Abourashed, E. A. und Mossa, J. S. (2004): **HPTLC determination of caffeine in stimulant herbal products and power drinks.** *J Pharm Biomed Anal* **36**;(3) 617-620.
- Alford, C., Cox, H. und Wescott, R. (2001): **The effects of red bull energy drink on human performance and mood.** *Amino Acids* **21**;(2) 139-150.
- Alterman, M. A., Gogichayeva, N. V. und Kornilayev, B. A. (2004): **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based amino acid analysis.** *Anal Biochem* **335**;(2) 184-191.
- Amenta, F. und Tayebati, S. K. (2008): **Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction.** *Curr Med Chem* **15**;(5) 488-498.
- Amini, A., Dormady, S. J., Riggs, L. und Regnier, F. E. (2000): **The impact of buffers and surfactants from micellar electrokinetic chromatography on matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry of peptides. Effect of buffer type and concentration on mass determination by MALDI-time-of-flight mass spectrometry.** *J Chromatogr A* **894**;(1-2) 345-355.
- Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Clark, S. B., Madson, M. R., Giesecker, C. M., Miller, R. A., Rummel, N. G. und Reimschuessel, R. (2008): **Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry.** *J Agric Food Chem* **56**;(12) 4340-4347.
- Aranda, M. und Morlock, G. (2006): **Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry.** *J Chromatogr A* **1131**;(1-2) 253-260.
- Aresta, A., Palmisano, F. und Zambonin, C. G. (2005): **Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography.** *J Pharm Biomed Anal* **39**;(3-4) 643-647.
- Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S. und Quirion, R. (2002): **Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies.** *Prog Neurobiol* **68**;(3) 209-245.
- Axelsson, J., Hoberg, A. M., Waterson, C., Myatt, P., Shield, G. L., Varney, J., Haddleton, D. M. und Derrick, P. J. (1997): **Improved reproducibility and increased signal intensity in matrix-assisted laser desorption/ionization**

- as a result of electrospray sample preparation.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**;(2) 209-213.
- Ayorinde, F. O., Bezabeh, D. Z. und Delves, I. G. (2003): **Preliminary investigation of the simultaneous detection of sugars, ascorbic acid, citric acid, and sodium benzoate in non-alcoholic beverages by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**;(15) 1735-1742.
- Ayorinde, F. O., Garvin, K. und Saeed, K. (2000): **Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**;(7) 608-615.
- Ayorinde, F. O., Hambright, P., Porter, T. N. und Keith, Q. L., Jr. (1999): **Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**;(24) 2474-2479.
- Bajuk, A., Gluch, K. und Michalak, L. (2001): **Effect of impurities on the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of insulin.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**;(24) 2383-2386.
- Baldessarini, R. J. (1985). **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** A. G. Gilman, Goodman, L. S., Rall, T. W. und Murad, F. Macmillan: New York. **7th ed.:** 391,423,426.
- Baltes, W. (2007). **Lebensmittelchemie.** Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, **6:** 400.
- Basavaiah, K. und Manjunatha Swamy, J. (2001): **Titrimetric micro-determination of therapeutically active phenothiazines using periodate.** *Farmaco* **56**;(11) 867-875.
- Baynes, R. E., Smith, G., Mason, S. E., Barrett, E., Barlow, B. M. und Riviere, J. E. (2008): **Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration.** *Food Chem Toxicol* **46**;(3) 1196-1200.
- Beavis, R. C. und Chait, B. T. (1990): **High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry.** *Anal Chem* **62**;(17) 1836-1840.
- Beavis, R. C. und Chait, B. T. (1991): **Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption.** *Chemical Physics Letters* **181**;(5) 479-484.
- Beavis, R. C., Chait, B. T. und Fales, H. M. (1989): **Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**;(12) 432-435.

- Beavis, R. C., Chaudhary, T. und Chait, B. T. (1992): **alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry**. *Organic Mass Spectrometry* **27**;(2) 156-158.
- Behki, R. M. und Khan, S. U. (1986): **Degradation of atrazine by Pseudomonas: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites**. *J. Agric. Food Chem.* **34**;(4) 746-749.
- Berger, T. A. und Wilson, W. H. (1994): **Separation of drugs by packed column supercritical fluid chromatography. 1. Phenothiazine antipsychotics**. *J Pharm Sci* **83**;(3) 281-286.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. (2008a). **"Mit Melamin belastete Weichkaramellen „White Rabbit Creamy Candies“ aus China sind nicht sicher.**" available at: www.bfr.bund.de/cm/208/mit_melamin_belastete_weichkaramellen_white_rabbit_creamy_candies_aus_china_sind_nicht_sicher.pdf; Accessed: 15.01.2010.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. (2008b). **" Neue Humandaten zur Bewertung von Energydrinks- Information Nr. 016/2008 "** available at: www.bfr.bund.de/.../neue_humandaten_zur_bewertung_von_energydrinks.pdf ; Accessed: 15.01.2010.
- Bhalla, V., Grimm, P. C., Chertow, G. M. und Pao, A. C. (2009): **Melamine nephrotoxicity: an emerging epidemic in an era of globalization**. *Kidney Int* **75**;(8) 774-779.
- Bichler, A., Swenson, A. und Harris, M. A. (2006): **A combination of caffeine and taurine has no effect on short term memory but induces changes in heart rate and mean arterial blood pressure**. *Amino Acids* **31**;(4) 471-476.
- Bispo, M. S., Veloso, M. C., Pinheiro, H. L., De Oliveira, R. F., Reis, J. O. und De Andrade, J. B. (2002): **Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography**. *J Chromatogr Sci* **40**;(1) 45-48.
- Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V. und Merkle, K. (1999): **The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds**. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**;(12) 1175-1185.
- Brown, C.A., Jeong, K. S., Poppenga, R. H., Puschner, B., Miller, D. M., Ellis, A. E., Kang, K. I., Sum, S., Cistola, A. M. und Brown, S. A. (2007): **Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007**. *J Vet Diagn Invest* **19**;(5) 525-531.
- Brown, R. S. und Lennon, J. J. (1995): **Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser**

- desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer.** *Anal Chem* **67**;(13) 1998-2003.
- Bruker (2009): **Melamine and Cyanuric Acid Detection in 5 Minutes using LCMS.** *Bruker, Application Note LCMS-49.*
- Burns, K. (2007): **Researchers examine contaminants in food, deaths of pets.** *J Am Vet Med Assoc* **231**;(11) 1636-1638.
- Campbell, J. A., Wunschel, D. S. und Petersen, C. E. (2007): **Analysis of Melamin, Cyanuric Acid, Ammelide, and Ammeline Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI/TOFMS).** *Analytical Letters* **40**;(16) 3107-31118.
- Castro, A. L., Madeira, P. J., Nunes, M. R., Costa, F. M. und Florencio, M. H. (2008): **Titanium dioxide anatase as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**;(23) 3761-3766.
- Causon, R. (1997): **Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **689**;(1) 175-180.
- Centre for Food Safety, CFS und Hong Kong Special Administrative Region. (2008). **"Risk Assessment in Food Safety - Melamine in Food."** available at: http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_02_15.html; Accessed: 15.01.2010.
- Cepas, J., Silva, M. und Perez-Bendito, D. (1994): **Improved Peroxyoxalate Chemiluminescence-Based Determinations by Use of Continuous Reagent Addition To Remove Background Emission.** *Anal Chem* **66**;(22) 4079-4084.
- Chan, T-W. D., Colburn, A. W., Derrick, P. J., Gardiner, D. J. und Bowden, M. (1992): **Suppression of matrix ions in ultraviolet laser desorption: Scanning electron microscopy and raman spectroscopy of the solid samples.** *Organic Mass Spectrometry* **27**;(3) 188-194.
- Chapman, R. P., Averell, P. R. und Harris, R. R. (1943): **Solubility of Melamine in Water.** *Ind Eng Chem* **35**;(2) 137-138.
- Chatzimichalakis, P. F., Samanidou, V. F., Verpoorte, R. und Papadoyannis, I. N. (2004): **Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction.** *J Sep Sci* **27**;(14) 1181-1188.
- Chaurasia, C. S., Muller, M., Bashaw, E. D., Benfeldt, E., Bolinder, J., Bullock, R., Bungay, P. M., DeLange, E. C., Derendorf, H., Elmquist, W. F., Hammarlund-Udenaes, M., Joukhadar, C., Kellogg, D. L., Jr., Lunte, C. E., Nordstrom, C. H., Rollema, H., Sawchuk, R. J., Cheung, B. W., Shah, V. P., Stahle, L.,

- Ungerstedt, U., Welty, D. F. und Yeo, H. (2007): **AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application, and regulatory perspectives.** *J Clin Pharmacol* **47**;(5) 589-603.
- Chen, Y. T. und Ling, Y. C. (2002): **Detection of water-soluble vitamins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using porphyrin matrices.** *J Mass Spectrom* **37**;(7) 716-730.
- Choudhary, G., Hart, B., Cho, D. und Caudill, M. (2008): **Determination of Choline and Its Metabolites Using an LTQ Linear Ion Trap Mass Spectrometer.** *Thermo Scientific; Application Note* 334.
- Cianciolo, R. E., Bischoff, K., Ebel, J. G., Van Winkle, T. J., Goldstein, R. E. und Serfilippi, L. M. (2008): **Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid.** *J Am Vet Med Assoc* **233**;(5) 729-737.
- Cohen, L. H. und Gusev, A. I. (2002): **Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry.** *Anal Bioanal Chem* **373**;(7) 571-586.
- Cook, H. A., Klampfl, C. W. und Buchberger, W. (2005): **Analysis of melamine resins by capillary zone electrophoresis with electrospray ionization-mass spectrometric detection.** *Electrophoresis* **26**;(7-8) 1576-1583.
- Cruywagen, C. W., Stander, M. A., Adonis, M. und Calitz, T. (2009): **Hot topic: pathway confirmed for the transmission of melamine from feed to cow's milk.** *J Dairy Sci* **92**;(5) 2046-2050.
- Cui, M., McCooney, M. A., Fraser, C. und Mester, Z. (2004): **Quantitation of lysergic acid diethylamide in urine using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry.** *Anal Chem* **76**;(23) 7143-7148.
- Dahl, S.G. (1981). **Clinical Pharmacology and Psychiatry, Neuroleptic Antidepressants Research (2nd International Meeting 1980).** E. Usdin, Dahl, S.G. und Gram, L.F. Macmillan. London.
- Dai, Y., Whittall, R. M. und Li, L. (1996): **Confocal Fluorescence Microscopic Imaging for Investigating the Analyte Distribution in MALDI Matrices.** *Anal Chem* **68**;(15) 2494-2500.
- Dai, Y., Whittall, R. M. und Li, L. (1999): **Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures.** *Anal Chem* **71**;(5) 1087-1091.
- Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E. und Murphy, C. M. (2003): **Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid.** *J Am Soc Mass Spectrom* **14**;(11) 1290-1294.

- Day, J. C., Kornecook, T. J. und Quirion, R. (2001): **Application of in vivo microdialysis to the study of cholinergic systems.** *Methods* **23**;(1) 21-39.
- de Boer, P., Westerink, B. H. und Horn, A. S. (1990): **The effect of acetylcholinesterase inhibition on the release of acetylcholine from the striatum in vivo: interaction with autoreceptor responses.** *Neurosci Lett* **116**;(3) 357-360.
- Debowski, Janusz K. und Wilde, Neil D. (1993): **Determination of isocyanuric, acid, ammelide, ammeline and melamine in crude isocyanuric acid by ion chromatography.** *Journal of Chromatography A* **639**;(2) 338-340.
- Dekker, L. J., Burgers, P. C., Guzel, C. und Luider, T. M. (2007): **FTMS and TOF/TOF mass spectrometry in concert: identifying peptides with high reliability using matrix prespotted MALDI target plates.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **847**;(1) 62-64.
- Desmarchelier, A., Guillamon Cuadra, M., Delatour, T. und Mottier, P. (2009): **Simultaneous Quantitative Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Cow's Milk and Milk-Based Infant Formula by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.** *J Agric Food Chem.*
- Deutsche Norm (1998): **DIN 32633:1998-12, Chemische Analytik - Verfahren der Standardaddition - Verfahren, Auswertung.** *Normenausschuss Materialprüfung (NMP) im DIN.*
- Deutsche Norm (2008): **DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung.** *Normenausschuss Materialprüfung (NMP) im DIN ICS 71.040.01; 1-28.*
- Diehl, G. und Karst, U. (2000): **Post-column oxidative derivatization for the liquid chromatographic determination of phenothiazines.** *J Chromatogr A* **890**;(2) 281-287.
- Dionex (2009): **Rapid Determination of Melamine in Liquid Milk and Milk Powder by HPLC on the Acclaim Mixed-Mode WCX-1 Column with UV Detection.** *Dionex, Application Note 221.*
- Dobson, R. L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R. T., Baker, T. R., Pullen, A. M., Regg, B. T., Bigalow-Kern, A. S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. und Daston, G. P. (2008): **Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs.** *Toxicol Sci* **106**;(1) 251-262.
- Doktycz, S. J., Savickas, P. J. und Krueger, D. A. (1991): **Matrix/sample interactions in ultraviolet laser-desorption of proteins.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **5**;(4) 145-148.

- Donegan, M., Tomlinson, A. J., Nair, H. und Juhasz, P. (2004): **Controlling matrix suppression for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**;(17) 1885-1888.
- Dreisewerd, K. (2003): **The desorption process in MALDI.** *Chem Rev* **103**;(2) 395-426.
- Duncan, M. W., Matanovic, G. und Cerpa-Poljak, A. (1993): **Quantitative analysis of low molecular weight compounds of biological interest by matrix-assisted laser desorption ionization.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**;(12) 1090-1094.
- Duncan, M. W., Roder, H. und Hunsucker, S. W. (2008): **Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**;(5) 355-370.
- Edmondson, R. D. und Russell, D. H. (1996): **Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass measurement accuracy by using delayed extraction.** *J Am Soc Mass Spectrom* **7**;(10) 995-1001.
- EFSA, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit. (2008a). **"Die EFSA bewertet die möglichen Risiken im Hinblick auf denkbare Melamin in zusammengesetzten Lebensmitteln aus China."** available at: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753824_1211902098433.htm; Accessed: 15.01.2010.
- EFSA, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (2008b): **Statement of EFSA on risks for public health due to the presences of melamine in infant milk and other milk products in China.** *The EFSA Journal* **807**; 1-10.
- Eger, K., Troschütz, R. und Roth, H. J. (2006). **Arzneistoffanalyse.** Deutscher Apotheker Verlag. Stuttgart.
- Ehling, S., Tefera, S. und Ho, I. P. (2007): **High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid.** *Food Addit Contam* **24**;(12) 1319-1325.
- Ekinci, R. und Kadakal, Ç. (2005): **Determination of seven water-soluble vitamins in tarhana, a traditional Turkish cereal food, by high-performance liquid chromatography** *Acta Chromatographica* **15**; 289-298.
- El-Sayed, Wael S., El-Baz, Ashraf F. und Othman, A. M. (2006): **Biodegradation of melamine formaldehyde by Micrococcus sp. strain MF-1 isolated from aminoplastic wastewater effluent.** *International Biodeterioration & Biodegradation* **57**;(2) 75-81.
- Erb, C., Troost, J., Kopf, S., Schmitt, U., Loffelholz, K., Soreq, H. und Klein, J. (2001): **Compensatory mechanisms enhance hippocampal acetylcholine release**

- in transgenic mice expressing human acetylcholinesterase.** *J Neurochem* **77**;(2) 638-646.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration. (2008a). **"Interim Safety and Risk Assessment of Melamine and its Analogues in Food for Humans [a]."** available at:
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Melamine/ucm164522.htm>; Accessed: 15.01.2010.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration. (2008b). **"Interim Safety and Risk Assessment of Melamine and its Analogues in Food for Humans [a]; Update 28.11.2008."** available at:
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Melamine/ucm164520.htm>; Accessed: 15.01.2010.
- Felician, O. und Sandson, T. A. (1999): **The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease.** *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **11**;(1) 19-31.
- Feng, D., Zhou, Z. und Bo, M. (1995): **An investigation of the thermal degradation of melamine phosphonite by XPS and thermal analysis techniques.** *Polymer Degradation and Stability* **50**;(1) 65-70.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989): **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** *Science* **246**;(4926) 64-71.
- Filigenzi, M. S., Tor, E. R., Poppenga, R. H., Aston, L. A. und Puschner, B. (2007): **The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**;(24) 4027-4032.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U und Starke, K. (2001). **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.** Urban & Fischer Verlag München - Jena. **8**.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. und Wilcock, G. K. (1999): **The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**;(2) 137-147.
- Garber, E. A. (2008): **Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology.** *J Food Prot* **71**;(3) 590-594.
- Gatti, R. und Gioia, M. G. (2005): **Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B6 vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals.** *Analytica Chimica Acta* **538**;(1-2) 135-141.
- Geiss, S. und Einax, J. W. (2001): **Comparison of detection limits in environmental analysis--is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification.** *Fresenius J Anal Chem* **370**;(6) 673-678.

- Ghous, T. und Townshend, A. (1999): **Flow injection determination of chlorpromazine by inhibition of glutamate dehydrogenase.** *Analytica Chimica Acta* **387**;(1) 47-51.
- Gibbons, R. D. (1994). **Statistical methods for groundwater monitoring.** John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Tronto, Singapore: 111.
- Gil-Bea, F. J., Garcia-Alloza, M., Dominguez, J., Marcos, B. und Ramirez, M. J. (2005): **Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit.** *Neurosci Lett* **375**;(1) 37-41.
- Gobey, J., Cole, M., Janiszewski, J., Covey, T., Chau, T., Kovarik, P. und Corr, J. (2005): **Characterization and performance of MALDI on a triple quadrupole mass spectrometer for analysis and quantification of small molecules.** *Anal Chem* **77**;(17) 5643-5654.
- Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H. und Nordhoff, E. (2001): **Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics.** *Anal Chem* **73**;(3) 434-438.
- Gong, X. M., Dong, J., Sun, J., Wang, H. T., Zhao, S. Y. und Zhu, L. P. (2008): **Determination of Melamine in Vegetable Materials by High Performance Liquid Chromatography.** *Food Science* **27**;(4) 321-.
- Grant, D. C. und Helleur, R. J. (2007): **Surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**;(6) 837-845.
- Grant, D. C. und Helleur, R. J. (2008): **Simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization.** *Anal Bioanal Chem* **391**;(8) 2811-2818.
- Guo, Z. und He, L. (2007): **A binary matrix for background suppression in MALDI-MS of small molecules.** *Anal Bioanal Chem* **387**;(5) 1939-1944.
- Guo, Z., Zhang, Q., Zou, H., Guo, B. und Ni, J. (2002): **A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry.** *Anal Chem* **74**;(7) 1637-1641.
- Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A. und Hercules, D. M. (1995): **Improvement of Signal Reproducibility and Matrix/Comatrix Effects in Maldi Analysis.** *Anal Chem* **67**;(6) 1034-1041.
- Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A. und Hercules, D. M. (1996): **Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization.** *Anal Bioanal Chem* **354**;(4) 455-463.

- Halbach, O und Dermietzel, R. (2002). **Neurotransmitters and Neuromodulators**. Wiley-VCH. Weinheim: 41-52.
- Hartmann, J., Erb, C., Ebert, U., Baumann, K. H., Popp, A., König, G. und Klein, J. (2004): **Central cholinergic functions in human amyloid precursor protein knock-in/presenilin-1 transgenic mice**. *Neuroscience* **125**;(4) 1009-1017.
- Hartmann, J., Kiewert, C., Duysen, E. G., Lockridge, O. und Klein, J. (2008): **Choline availability and acetylcholine synthesis in the hippocampus of acetylcholinesterase-deficient mice**. *Neurochem Int* **52**;(6) 972-978.
- Hatsis, P., Brombacher, S., Corr, J., Kovarik, P. und Volmer, D. A. (2003): **Quantitative analysis of small pharmaceutical drugs using a high repetition rate laser matrix-assisted laser/desorption ionization source**. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**;(20) 2303-2309.
- Hattori, H., Yamamoto, S., Iwata, M., Takashima, E., Yamada, T. und Suzuki, O. (1992): **Sensitive determination of phenothiazines in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection**. *J Chromatogr* **579**;(2) 247-252.
- Hau, A. K., Kwan, T. H. und Li, P. K. (2009): **Melamine toxicity and the kidney**. *J Am Soc Nephrol* **20**;(2) 245-250.
- Hayen, H. und Karst, U. (2003): **Analysis of phenothiazine and its derivatives using LC/electrochemistry/MS and LC/electrochemistry/fluorescence**. *Anal Chem* **75**;(18) 4833-4840.
- He, Q., Liu, M., Huang, L., Yang, Y. und Liao, S. (2008): **[Determination of melamine in milk powder and milk by high performance liquid chromatography]**. *Se Pu* **26**;(6) 752-754.
- Heller, D. N. (2007): **Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects**. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**;(5) 644-652.
- Heller, D. N. und Nochetto, C. B. (2008): **Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry**. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**;(22) 3624-3632.
- Hemstrom, P. und Irgum, K. (2006): **Hydrophilic interaction chromatography**. *J Sep Sci* **29**;(12) 1784-1821.
- Henke, H. und Lang, W. (1983): **Cholinergic enzymes in neocortex, hippocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients**. *Brain Res* **267**;(2) 281-291.

- Henn, C., Loffelholz, K. und Klein, J. (1998): **Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **357**;(6) 640-647.
- Heudi, O., Kilinc, T. und Fontannaz, P. (2005): **Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes.** *J Chromatogr A* **1070**;(1-2) 49-56.
- Hillenkamp, F. und Karas, M. (2007). **MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications.** F. Hillenkamp und Peter-Katalinic, J. Wiley-VCH. Weinheim.
- Hopfgartner, G. und Bourgoigne, E. (2003): **Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry.** *Mass Spectrom Rev* **22**;(3) 195-214.
- Hows, M. E., Organ, A. J., Murray, S., Dawson, L. A., Foxton, R., Heidbreder, C., Hughes, Z. A., Lacroix, L. und Shah, A. J. (2002): **High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the rapid high sensitivity measurement of basal acetylcholine from microdialysates.** *J Neurosci Methods* **121**;(1) 33-39.
- Huang, G., Ouyang, Z. und Cooks, R. G. (2009): **High-throughput trace melamine analysis in complex mixtures.** *Chem Commun (Camb)* (5) 556-558.
- Huang, T., Yang, L., Gitzen, J., Kissinger, P. T., Vreeke, M. und Heller, A. (1995): **Detection of basal acetylcholine in rat brain microdialysate.** *J Chromatogr B Biomed Appl* **670**;(2) 323-327.
- Hung, K. C., Ding, H. und Guo, B. (1999): **Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins.** *Anal Chem* **71**;(2) 518-521.
- Hung, K. C., Rashidzadeh, H., Wang, Y. und Guo, B. (1998): **Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA.** *Anal Chem* **70**;(14) 3088-3093.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1986): **Summaries & Evaluations, Melamine.** *IARC* **39**; 333.
- Ibanez, M., Sancho, J. V. und Hernandez, F. (2009): **Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Chim Acta* **649**;(1) 91-97.
- Ichikawa, J. und Meltzer, H. Y. (2000): **The effect of serotonin(1A) receptor agonism on antipsychotic drug-induced dopamine release in rat striatum and nucleus accumbens.** *Brain Res* **858**;(2) 252-263.

- Ikarashi, Y., Harigaya, Y., Tomidokoro, Y., Kanai, M., Ikeda, M., Matsubara, E., Kawarabayashi, T., Kuribara, H., Younkin, S. G., Maruyama, Y. und Shoji, M. (2004): **Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice.** *Neurobiol Aging* **25**;(4) 483-490.
- Ingelfinger, J. R. (2008): **Melamine and the global implications of food contamination.** *N Engl J Med* **359**;(26) 2745-2748.
- Ishikawa, Y., Suzuki, O. und Hattori, H. (1990): **Positive- and negative-ion mass spectrometry and rapid clean-up of 19 phenothiazines.** *Forensic Sci Int* **44**;(2-3) 93-105.
- Jaskolla, T. W. und Karas, M. (2010): **Lucky Survivor zum Letzten - Experimentelle Bestätigung eines lange postulierten Modells.** DGMS 2010, Halle (Saale), DGMS.
- Jaskolla, T. W., Lehmann, W. D. und Karas, M. (2008): **4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**;(34) 12200-12205.
- Jeong, W. I., Do, S. H., Jeong da, H., Chung, J. Y., Yang, H. J., Yuan, D. W., Hong, I. H., Park, J. K., Goo, M. J. und Jeong, K. S. (2006): **Canine renal failure syndrome in three dogs.** *J Vet Sci* **7**;(3) 299-301.
- Jutzi, K., Cook, A. M. und Hutter, R. (1982): **The degradative pathway of the s-triazine melamine. The steps to ring cleavage.** *Biochem J* **208**;(3) 679-684.
- Kang, M. J., Tholey, A. und Heinzle, E. (2000): **Quantitation of low molecular mass substrates and products of enzyme catalyzed reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**;(21) 1972-1978.
- Kang, M. J., Tholey, A. und Heinzle, E. (2001): **Application of automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the measurement of enzyme activities.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**;(15) 1327-1333.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. und Hillenkamp, F. (1987): **Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds.** *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **78**; 53-68.
- Karas, M., Bachmann, D. und Hillenkamp, F. (1985): **Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules.** *Analytical Chemistry* **57**;(14) 2935-2939.
- Karas, M., Gluckmann, M. und Schafer, J. (2000): **Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors.** *J Mass Spectrom* **35**;(1) 1-12.

- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988): **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Anal Chem* **60**;(20) 2299-2301.
- Karas, M. und Kruger, R. (2003): **Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism.** *Chem Rev* **103**;(2) 427-440.
- Karbiwnyk, C. M., Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Storey, J. M., Madson, M. R., Miller, K. E., Giesecker, C. M., Miller, R. A., Rummel, N. G. und Reimschuessel, R. (2009): **Determination of cyanuric acid residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Chim Acta* **637**;(1-2) 101-111.
- Karnes, H. T., Shiu, G. und Shah, V. P. (1991): **Validation of bioanalytical methods.** *Pharm Res* **8**;(4) 421-426.
- Kebarle, P. und Tang, L. (1993): **From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry.** *Anal Chem* **65**;(22) 972A-986A.
- Kehr, J., Dechent, P., Kato, T. und Ogren, S. O. (1998): **Simultaneous determination of acetylcholine, choline and physostigmine in microdialysis samples from rat hippocampus by microbore liquid chromatography/electrochemistry on peroxidase redox polymer coated electrodes.** *J Neurosci Methods* **83**;(2) 143-150.
- Keller, B. O. und Li, L. (2001): **Detection of 25,000 molecules of substance P by MALDI-TOF mass spectrometry and investigations into the fundamental limits of detection in MALDI.** *J Am Soc Mass Spectrom* **12**;(9) 1055-1063.
- Keski-Rahkonen, P., Lehtonen, M., Ihalainen, J., Sarajarvi, T. und Auriola, S. (2007): **Quantitative determination of acetylcholine in microdialysis samples using liquid chromatography/atmospheric pressure spray ionization mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**;(18) 2933-2943.
- Kim, B., Perkins, L. B., Bushway, R. J., Nesbit, S., Fan, T., Sheridan, R. und Greene, V. (2008): **Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.** *J AOAC Int* **91**;(2) 408-413.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. und Olah, T. (2000): **Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization.** *J Am Soc Mass Spectrom* **11**;(11) 942-950.
- Klampfl, C. W., Andersen, L., Haunschmidt, M., Himmelsbach, M. und Buchberger, W. (2009): **Analysis of melamine in milk powder by CZE using UV detection and hyphenation with ESI quadrupole/TOF MS detection.** *Electrophoresis* **30**;(10) 1743-1746.

- Klein, J. (2000): **Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids.** *J Neural Transm* **107**;(8-9) 1027-1063.
- Knochenmuss R, Dubois F, Dale mJ, Zenobi R (1996): **Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanism in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**; 871.
- Knochenmuss, R., Stortelder, A., Breuker, K. und Zenobi, R. (2000): **Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization.** *J Mass Spectrom* **35**;(11) 1237-1245.
- Kopf, S. R., Buchholzer, M. L., Hilgert, M., Loffelholz, K. und Klein, J. (2001): **Glucose plus choline improve passive avoidance behaviour and increase hippocampal acetylcholine release in mice.** *Neuroscience* **103**;(2) 365-371.
- Kovarik, P., Grivet, C., Bourgoigne, E. und Hopfgartner, G. (2007): **Method development aspects for the quantitation of pharmaceutical compounds in human plasma with a matrix-assisted laser desorption/ionization source in the multiple reaction monitoring mode.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**;(6) 911-919.
- Kraft, P., Alimpiev, S., Dratz, E. und Sunner, J. (1998): **Infrared, surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry on frozen aqueous solutions of proteins and peptides using suspensions of organic solids.** *J Am Soc Mass Spectrom* **9**;(9) 912-924.
- Kromidas, S. (2007). **Validierung in der Analytik.** U. Gruber und Klein, W. WILEY-VCH. Weinheim, **4**.
- Laassis, B., Aaron, J. J. und Mahedero, M. C. (1994): **Fluorimetric determination of phenothiazine derivatives by photooxidation in a flow-injection system.** *Talanta* **41**;(11) 1985-1989.
- Lacroix, L. P., Ceolin, L., Zocchi, A., Varnier, G., Garzotti, M., Curcuruto, O. und Heidbreder, C. A. (2006): **Selective dopamine D3 receptor antagonists enhance cortical acetylcholine levels measured with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry without anti-cholinesterases.** *J Neurosci Methods* **157**;(1) 25-31.
- LeRiche, T., Osterodt, J. und Volmer, D. A. (2001): **An experimental comparison of electrospray ion-trap and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectra for the characterization of small drug molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**;(8) 608-614.
- Li, Y. und Brown, P. R. (2003): **The optimization of HPLC-UV conditions for use with FTIR detection in the analysis of B vitamins.** *J Chromatogr Sci* **41**;(2) 96-99.

- Lidgard, R. und Duncan, M. W. (1995): **Utility of Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry for the Analysis of Low-Molecular-Weight Compounds.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **9**;(2) 128-132.
- Lin, M., He, L., Awika, J., Yang, L., Ledoux, D. R., Li, H. und Mustapha, A. (2008): **Detection of melamine in gluten, chicken feed, and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC.** *J Food Sci* **73**;(8) T129-134.
- Ling, Y. C., Lin, L. und Chen, Y. T. (1998): **Quantitative analysis of antibiotics by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**;(6) 317-327.
- Litzau, J. J., Mercer, G. E. und Mulligan, K. J. (2008): **GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid.** *FDA-LIB 4423 Melamine and Related Compounds.*
- Liu, J. X., Cong, W. H., Xu, L. und Wang, J. N. (2004): **Effect of combination of extracts of ginseng and ginkgo biloba on acetylcholine in amyloid beta-protein-treated rats determined by an improved HPLC.** *Acta Pharmacol Sin* **25**;(9) 1118-1123.
- Löffelholz, K. und Klein, J. (2006). **The Brain Cholinergic System** E. Giacobini und Pepeu, G. Taylor & Francis. London.
- Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V. und Zagulin, V.A. (1973): **The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution.** *Sov. Phys. JETP* **37**; 45.
- Marchei, E., Pellegrini, M., Pacifici, R., Palmi, I. und Pichini, S. (2005): **Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine in dietary supplements.** *J Pharm Biomed Anal* **37**;(3) 499-507.
- Markopoulou, C. K., Kagkadis, K. A. und Koundourellis, J. E. (2002): **An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography.** *J Pharm Biomed Anal* **30**;(4) 1403-1410.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. und Vallette, F. M. (1993): **Molecular and cellular biology of cholinesterases.** *Prog Neurobiol* **41**;(1) 31-91.
- Mast, R. W., Jeffcoat, A. R., Sadler, B. M., Kraska, R. C. und Friedman, M. A. (1983): **Metabolism, disposition and excretion of [14C]melamine in male Fischer 344 rats.** *Food Chem Toxicol* **21**;(6) 807-810.

- Matuszewski, B. K. (2006): **Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **830**;(2) 293-300.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. und Chavez-Eng, C. M. (2003): **Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.** *Anal Chem* **75**;(13) 3019-3030.
- Melnick, R. L., Boorman, G. A., Haseman, J. K., Montali, R. J. und Huff, J. (1984): **Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents.** *Toxicol Appl Pharmacol* **72**;(2) 292-303.
- Mi, J., Zhang, Z., Zhang, Z., Li, P. und Fang, Y. (2008): **Rapid Screening and Confirmation of Melamine Residues in Milk and Its Products by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.** *Agilent Application Note - Food*
- Midttun, O., Hustad, S., Solheim, E., Schneede, J. und Ueland, P. M. (2005): **Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Clin Chem* **51**;(7) 1206-1216.
- Miliotis, T., Kjellstrom, S., Nilsson, J., Laurell, T., Edholm, L. E. und Marko-Varga, G. (2002): **Ready-made matrix-assisted laser desorption/ionization target plates coated with thin matrix layer for automated sample deposition in high-density array format.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**;(2) 117-126.
- Mock, K. K., Sutton, C. W. und Cottrell, J. S. (1992): **Sample immobilization protocols for matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**;(4) 233-238.
- Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S. G., Rosales-Martinez, D., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Cubedo-Fernandez-Trapiella, A. und Izquierdo-Hornillos, R. C. (2008): **Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples.** *Anal Bioanal Chem* **392**;(3) 523-531.
- Myskow, W., Lasota, T. und Stachyra, A. (1983): **Cyanuric acid--a s-triazine derivative as a nitrogen source for some soil microorganisms.** *Acta Microbiol Pol* **32**;(2) 177-183.
- Nascentes, Clésia C., Cárdenas, Soledad, Gallego, Mercedes und Valcárcel, Miguel (2002): **Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines.** *Analytica Chimica Acta* **462**;(2) 275-281.
- Nicola, A. J., Gusev, A. I., Proctor, A., Jackson, E. K. und Hercules, D. M. (1995): **Application of the fast-evaporation sample preparation method for improving quantification of angiotensin II by matrix-assisted laser desorption/ionization.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **9**;(12) 1164-1171.

- Nielen, M. W. F. und van de Ven, H. J. F. M. (1996): **Characterization of (Methoxymethyl)melamine Resin by Combined Chromatographic/Mass Spectrometric Techniques.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**;(1) 74-81.
- Nirogi, R., Mudigonda, K., Kandikere, V. und Ponnamaneni, R. (2010): **Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry.** *Biomed Chromatogr* **24**;(1) 39-48.
- Ogasawara, H., Imaida, K., Ishiwata, H., Toyoda, K., Kawanishi, T., Uneyama, C., Hayashi, S., Takahashi, M. und Hayashi, Y. (1995): **Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation.** *Carcinogenesis* **16**;(11) 2773-2777.
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T. und Katsura, I. (2000): **Identification and characterization of the high-affinity choline transporter.** *Nat Neurosci* **3**;(2) 120-125.
- Ono, Shin, Funato, Tatsuo, Inoue, Yasuhiko, Munechika, Tetsue, Yoshimura, Toshiaki, Morita, Hiroyuki, Rengakuji, Sei-Ichi und Shimasaki, Choichiro (1998): **Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography.** *Journal of Chromatography A* **815**;(2) 197-204.
- Ostrogovich, G., Bacaloglu, R. und Fliegl, E. (1968): **The nucleophilic substitution reactions in s-triazanic systems--I : Kinetics and mechanism of alkaline hydrolysis of the melamine.** *Tetrahedron* **24**;(6) 2701-2705.
- Owen, S. J., Meier, F. S., Brombacher, S. und Volmer, D. A. (2003): **Increasing sensitivity and decreasing spot size using an inexpensive, removable hydrophobic coating for matrix-assisted laser desorption/ionisation plates.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**;(21) 2439-2449.
- Pan, Ying und Cotter, Robert J. (1992): **Measurement of initial translational energies of peptide ions in laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Organic Mass Spectrometry* **27**;(1) 3-8.
- Pelizzetti, Ezio, Maurino, Valter, Minero, Claudio , Carlin, Vilma , Tosato, Maria L. , Pramauro, Edmondo und Zerbinati, Orfeo (1990): **Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides.** *Environ. Sci. Technol.* **24**;(10) 1559-1565.
- Pena, A., Lino, C. und Silveira, M. I. (2005): **Survey of caffeine levels in retail beverages in Portugal.** *Food Addit Contam* **22**;(2) 91-96.
- Perera, Indral K., Perkins, John und Kantartzoglou, Stamatina (1995): **Spin-coated samples for high resolution matrix-assisted laser desorption/ionization**

- time-of-flight mass spectrometry of large proteins.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **9**;(2) 180-187.
- Peterson, D. S. (2007): **Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Mass spectrometry reviews* **26**;(1) 19-34.
- Peterson, D. S., Luo, Q., Hilder, E. F., Svec, F. und Frechet, J. M. (2004): **Porous polymer monolith for surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**;(13) 1504-1512.
- Petit, Christine, Murakami, Kazuo, Erdem, Arzum, Kilinc, Emrah, Borondo, Gemma Ortiz, Liegeois, Jean-François und Kauffmann, Jean-Michel (1998): **Horseradish Peroxidase Immobilized Electrode for Phenothiazine Analysis.** *Electroanalysis* **10**;(18) 1241-1248.
- Pichon, V., Chen, L., Guenu, S. und Hennion, M. C. (1995): **Comparison of sorbents for the solid-phase extraction of the highly polar degradation products of atrazine (including ammeline, ammelide and cyanuric acid).** *Journal of Chromatography A* **711**;(2) 257-267.
- Pieles, U., Zurcher, W., Schar, M. und Moser, H. E. (1993): **Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res* **21**;(14) 3191-3196.
- Ponder, E. L. , Fried, B. und J., Sherma (2004): **Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails** *Acta Chromatographica* **14**; 70-82.
- Presoto, A. E. F. , Rios, M. D. G. und de Almeida-Muradian, L. B. (2004): **Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Vitamins B₁, B₂ and B₆ in Royal Jelly.** *J. Braz. Chem. Soc.* **15**;(1) 136-139.
- Preston, L. M., Murray, K. K. und Russell, D. H. (1993): **Reproducibility and quantitation of matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: effects of nitrocellulose on peptide ion yields.** *Biol Mass Spectrom* **22**;(9) 544-550.
- Puschner, B., Poppenga, R. H., Lowenstine, L. J., Filigenzi, M. S. und Pesavento, P. A. (2007): **Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats.** *J Vet Diagn Invest* **19**;(6) 616-624.
- QingQing, W., KeXin, F., Wei, S., HongQiang, R., Rong, Z. und ChiaHui, S. (2009): **Highly sensitive detection of melamine based on reversed phase liquid chromatography mass spectrometry** *Chinese Science Bulletin* **54**; 732-737.
- Rao, Anling, Hu, Henglong und Nobre, Anna Christina (2005): **Original Investigation: The effects of combined caffeine and glucose drinks on**

- attention in the human brain.** *Nutritional Neuroscience: An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System* **8**;(3) 141-153.
- Rathore, R., Corr, J., Scott, G., Vollmerhaus, P. und Greis, K. D. (2008): **Development of an inhibitor screening platform via mass spectrometry.** *J Biomol Screen* **13**;(10) 1007-1013.
- Redemann, C. E. und Lucas, H. J. (1940): **Some Derivatives of Cyameluric Acid and Probable Structures of Melam, Melem and Melon.** *J Am Soc Mass Spectrom* **62**;(4) 842-846.
- Reimschuessel, R., Giesecker, C. M., Miller, R. A., Ward, J., Boehmer, J., Rummel, N., Heller, D. N., Nochetto, C., de Alwis, G. K., Bataller, N., Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Satzger, R. D., Crowe, J. B., Wilber, N. R., Reinhard, M. K., Roberts, J. F. und Witkowski, M. R. (2008): **Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs.** *Am J Vet Res* **69**;(9) 1217-1228.
- Reyner, L. A. und Horne, J. A. (2002): **Efficacy of a 'functional energy drink' in counteracting driver sleepiness.** *Physiol Behav* **75**;(3) 331-335.
- Root, D. S. und Dauterman, W. C. (1996): **Cyromazine toxicity in different laboratory strains of the tobacco hornworm (Lepidoptera: Sphingidae).** *J Econ Entomol* **89**;(5) 1074-1079.
- Sancho, J. V., Ibáñez, M., Grimalt, S., Pozo, Ó J. und Hernández, F. (2005): **Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta* **530**;(2) 237-243.
- Saracino, M. A., Amore, M., Baioni, E., Petio, C. und Raggi, M. A. (2008): **Determination of selected phenothiazines in human plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with coulometric detection.** *Anal Chim Acta* **624**;(2) 308-316.
- Sauvage, M. F., Marquet, P., Rousseau, A., Buxeraud, J., Raby, C. und Lachútre, G. (1998): **Determination of Trimeprazine and Its Main Metabolites in Mouse Serum and Thyroid by Liquid Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **21**;(20) 3173 - 3185.
- Schuerenberg, M., Luebbert, C., Eickhoff, H., Kalkum, M., Lehrach, H. und Nordhoff, E. (2000): **Prestructured MALDI-MS sample supports.** *Anal Chem* **72**;(15) 3436-3442.
- Seidl, R., Stockler-Ipsiroglu, S., Rolinski, B., Kohlhauser, C., Herkner, K. R., Lubec, B. und Lubec, G. (2000): **Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat.** *Life Sci* **67**;(4) 421-435.

- Seno, H., Hattori, H., Ishii, A., Kumazawa, T., Watanabe-Suzuki, K. und Suzuki, O. (1999): **High performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for phenothiazines with heavy side chains in whole blood.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**;(23) 2394-2398.
- SeQuant, Merck (2008): **Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Animal Feed via ZIC®-HILIC Chromatography - Mass Spectrometry.** *Merck SeQuant Technical Note TN-015.*
- Shackman, H. M., Shou, M., Cellar, N. A., Watson, C. J. und Kennedy, R. T. (2007): **Microdialysis coupled on-line to capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry for monitoring acetylcholine in vivo.** *J Neurosci Methods* **159**;(1) 86-92.
- Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T. und Yacobi, A. (2000): **Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress.** *Pharm Res* **17**;(12) 1551-1557.
- Shaler, T. A., Wickham, J. N., Sannes, K. A., Wu, K. J. und Becker, C. H. (1996): **Effect of impurities on the matrix-assisted laser desorption mass spectra of single-stranded oligodeoxynucleotides.** *Anal Chem* **68**;(3) 576-579.
- Shia, J. und Diehl, D. (2008): **Rapid, Specific Analysis of Melamine and Cyanuric Acid in Infant Formula by LC/MS/MS.** *Waters Application Note No 720002865en.*
- Shimada, K., Mino, T., Nakajima, M., Wakabayashi, H. und Yamato, S. (1994): **Application of the desulfurization of phenothiazines for a sensitive detection method by high-performance liquid chromatography.** *J Chromatogr B Biomed Appl* **661**;(1) 85-91.
- Sleno, L. und Volmer, D. A. (2005a): **Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**;(14) 1928-1936.
- Sleno, L. und Volmer, D. A. (2005b): **Toxin screening in phytoplankton: detection and quantitation using MALDI triple quadrupole mass spectrometry.** *Anal Chem* **77**;(5) 1509-1517.
- Sleno, L. und Volmer, D. A. (2006): **Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**;(10) 1517-1524.
- Smirnov, I. P., Zhu, X., Taylor, T., Huang, Y., Ross, P., Papayanopoulos, I. A., Martin, S. A. und Pappin, D. J. (2004): **Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry.** *Anal Chem* **76**;(10) 2958-2965.

- Smoker, M. und Krynitsky, A. J. (2008): **Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version 1.0.** *FDA-LIB 4422 Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods.*
- Srinivas, N. R. (2009): **Dodging matrix effects in liquid chromatography tandem mass spectrometric assays--compilation of key learnings and perspectives.** *Biomed Chromatogr* **23**;(5) 451-454.
- Strupat, K., Karas, M. und Hillenkamp, F. (1991): **2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption--ionization mass spectrometry.** *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **111**; 89-102.
- Su, A. K., Liu, J. T. und Lin, C. H. (2005): **Rapid drug-screening of clandestine tablets by MALDI-TOF mass spectrometry.** *Talanta* **67**;(4) 718-724.
- Sunner, J., Dratz, E. und Chen, Y. C. (1995): **Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions.** *Anal Chem* **67**;(23) 4335-4342.
- Suszkiw, J. B. und Pilar, G. (1976): **Selective localization of a high affinity choline uptake system and its role in ACh formation in cholinergic nerve terminals.** *J Neurochem* **26**;(6) 1133-1138.
- Tanaka, E., Nakamura, T., Terada, M., Shinozuka, T., Hashimoto, C., Kurihara, K. und Honda, K. (2007): **Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **854**;(1-2) 116-120.
- Tang, H. W., Ng, K. M., Chui, S. S., Che, C. M., Lam, C. W., Yuen, K. Y., Siu, T. S., Lan, L. C. und Che, X. (2009): **Analysis of melamine cyanurate in urine using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Anal Chem* **81**;(9) 3676-3682.
- Taylor, A., Sakuma, T. und Schreiber, A. (2008): **Fast, Sensitive LC/MS/MS Method for the Accurate Quantitation and Confirmation of Melamine and Cyanuric Acid in Pet Food Samples.** *Application Note Applied Biosystems: Melamine and Cyanuric Acid.*
- Taylor, P. und Radic, Z. (1994): **The cholinesterases: from genes to proteins.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **34**; 281-320.
- Tholey, A. und Heinzle, E. (2006): **Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives.** *Anal Bioanal Chem* **386**;(1) 24-37.
- Thomas, J. B., Yen, J. H., Schantz, M. M., Porter, B. J. und Sharpless, K. E. (2004): **Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard**

- reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography.** *J Agric Food Chem* **52**;(11) 3259-3263.
- Toth, J. P. und Bardalaye, P. C. (1987): **Capillary gas chromatographic separation and mass spectrometric detection of cyromazine and its metabolite melamine.** *J Chromatogr* **408**; 335-340.
- Tsai, T. R., Cham, T. M., Chen, K. C., Chen, C. F. und Tsai, T. H. (1996): **Determination of acetylcholine by on-line microdialysis coupled with pre- and post-microbore column enzyme reactors with electrochemical detection.** *J Chromatogr B Biomed Appl* **678**;(2) 151-155.
- Turnipseed, S. B., Casey, C., Nochetto, C. und Heller, D. N. (2008): **Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS.** *FDA-LIB 4421 Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula.*
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) und Center for Veterinary Medicine (CVM). (2001). **"Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation."** available at: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf; Accessed: 15.01.2010.
- Uutela, P., Reinila, R., Piepponen, P., Ketola, R. A. und Kostianen, R. (2005): **Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**;(20) 2950-2956.
- Vail, T., Jones, P. R. und Sparkman, O. D. (2007): **Rapid and unambiguous identification of melamine in contaminated pet food based on mass spectrometry with four degrees of confirmation.** *J Anal Toxicol* **31**;(6) 304-312.
- van der Zeyden, M., Oldenziel, W. H., Rea, K., Cremers, T. I. und Westerink, B. H. (2008): **Microdialysis of GABA and glutamate: analysis, interpretation and comparison with microsensors.** *Pharmacol Biochem Behav* **90**;(2) 135-147.
- Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I. und Michotte, Y. (2009): **Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**;(23) 2198-2207.
- van Kampen, J. J., Burgers, P. C., de Groot, R. und Luider, T. M. (2006): **Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry.** *Anal Chem* **78**;(15) 5403-5411.
- van Kampen, J. J., Burgers, P. C., Groot, R. de, Gruters, R. A. und Luider, T. M. (2010): **Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis.** *Mass Spectrometry Reviews* **9999**;(9999) n/a.

- Varelis, P., Beck, J., Wang, K. und Ghosh, D. (2008): **Analysis of Melamine and Cyanuric Acid in Food Matrices by LC-MS/MS.** *Thermo Scientific; Application Note 424.*
- Varelis, P. und Jeskelis, R. (2008): **Preparation of [13C3]-melamine and [13C3]-cyanuric acid and their application to the analysis of melamine and cyanuric acid in meat and pet food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **25**;(10) 1208-1215.
- Vestal, M. L., Juhasz, P. und Martin, S. A. (1995): **Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **9**;(11) 1044-1050.
- Vo, T. D., Himmelsbach, M., Haunschmidt, M., Buchberger, W., Schwarzinger, C. und Klampfl, C. W. (2008): **Improved analysis of melamine-formaldehyde resins by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using ion-trap and quadrupole-time-of-flight mass spectrometers.** *J Chromatogr A* **1213**;(1) 83-87.
- Volmer, D. A., Sleno, L., Bateman, K., Sturino, C., Oballa, R., Mauriala, T. und Corr, J. (2007): **Comparison of MALDI to ESI on a triple quadrupole platform for pharmacokinetic analyses.** *Anal Chem* **79**;(23) 9000-9006.
- von Brocke, A., Nicholson, G. und Bayer, E. (2001): **Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry.** *Electrophoresis* **22**;(7) 1251-1266.
- Vorm, O., Roepstorff, P. und Mann, M. (1994): **Improved Resolution and Very High-Sensitivity in Maldi ToF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation.** *Anal Chem* **66**;(19) 3281-3287.
- Wagner, M., Varesio, E. und Hopfgartner, G. (2008): **Ultra-fast quantitation of saquinavir in human plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization and selected reaction monitoring mode detection.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **872**;(1-2) 68-76.
- Wang, L., Henday, S. M., Liu, X., Tracy, M. und Schnute, W. C. (2007). **"Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric Acid Using LC-MS with the Acclaim Mixed-Mode WAX-1 Column and Mass Spectrometric Detection."** available at: www.dionex.com/en-us/webdocs/62283-LPN%201991-01%20N_Melamine.pdf; Accessed: 15.01.2010.
- Webster, R. A. (2001). **Neurotransmitters, Drugs and Brain Function.** John Wiley & Sons Inc. New York: 117-136.
- Wei, J., Buriak, J. M. und Siuzdak, G. (1999): **Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon.** *Nature* **399**;(6733) 243-246.

- Wen, X., Dagan, S. und Wysocki, V. H. (2007): **Small-molecule analysis with silicon-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry**. *Anal Chem* **79**;(2) 434-444.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. und Racke, K. (1998): **Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans**. *Pharmacol Ther* **77**;(1) 59-79.
- Westerink, B. H. (2000): **Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain**. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **747**;(1-2) 21-32.
- White, K. E. und Cummings, J. L. (1996): **Schizophrenia and Alzheimer's disease: clinical and pathophysiologic analogies**. *Compr Psychiatry* **37**;(3) 188-195.
- Whittal, R. M. und Li, L. (1995): **High-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization in a linear time-of-flight mass spectrometer**. *Anal Chem* **67**;(13) 1950-1954.
- WHO, World Health Organization. (2008). **"Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food ; 25 September 2008 - Updated 30 October 2008 "** available at: www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine.pdf; Accessed: 15.01.2010.
- Wiley, W.C. und McLaren, I.H. (1955): **Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution**. *Rev. Sci. Instr.* **26**; 1150-1157.
- Wilkinson, W. R., Gusev, A. I., Proctor, A., Houalla, M. und Hercules, D. M. (1997): **Selection of internal standards for quantitative analysis by matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry**. *Anal Bioanal Chem* **357**; 241-248.
- Woo, H. K., Northen, T. R., Yanes, O. und Siuzdak, G. (2008): **Nanostructure-initiator mass spectrometry: a protocol for preparing and applying NIMS surfaces for high-sensitivity mass analysis**. *Nat Protoc* **3**;(8) 1341-1349.
- Woollard, D. C. und Indyk, H. E. (2002): **Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography**. *J AOAC Int* **85**;(4) 945-951.
- Wu, K. J., Steding, A. und Becker, C. H. (1993): **Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix**. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**;(2) 142-146.
- Xin, H. und Stone, R. (2008): **Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine**. *Science* **322**;(5906) 1310-1311.

- Xu, S., Li, Y., Zou, H., Qiu, J., Guo, Z. und Guo, B. (2003): **Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Anal Chem* **75**;(22) 6191-6195.
- Yalcin, T., Dai, Y. und Li, L. (1998): **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation.** *J Am Soc Mass Spectrom* **9**;(12) 1303-1310.
- Yamaguchi, S., Fujita, T., Fujino, T. und Korenaga, T. (2008): **Suppression of matrix-related ions using cyclodextrin in MALDI mass spectrometry.** *Anal Sci* **24**;(11) 1497-1500.
- Yamashita, M. und Fenn, J. B. (1984): **Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme.** *Journal of Physical Chemistry* **88**;(20) 4451-4459.
- Yan, L., Wu, M., Zhang, Z., Zhou, Y., Lin, L., Fang, E., Xu, D. und Chen, L. (2008): **[Determination of melamine residue in raw milk and dairy products using hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry].** *Se Pu* **26**;(6) 759-762.
- Yan, Z., Caldwell, G. W., Jones, W. J. und Masucci, J. A. (2000): **A simple method to improve spectral quality in matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometric analysis by using Micro Mate labeling tape as a sample support.** *Anal Biochem* **277**;(2) 267-270.
- Yang, S., Ding, J., Zheng, J., Hu, B., Li, J., Chen, H., Zhou, Z. und Qiao, X. (2009): **Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.** *Anal Chem* **81**;(7) 2426-2436.
- Yang, Y. X., Liu, T., Zhou, G. Y. und Wang, B. J. (2008): **Determination of Melamine in Wheat Gluten by High Performance Liquid Chromatography.** *Chin. J. Instrumen. Anal.* **27**; 322-324.
- Yao, J., Scott, J. R., Young, M. K. und Wilkins, C. L. (1998): **Importance of matrix:analyte ratio for buffer tolerance using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight.** *J Am Soc Mass Spectrom* **9**;(8) 805-813.
- Zackheim, J. A. und Abercrombie, E. D. (2003): **HPLC/EC detection and quantification of acetylcholine in dialysates.** *Methods Mol Med* **79**; 433-441.
- Zenobi, R. und Knochenmuss, R. (1998): **Ion formation in MALDI mass spectrometry.** *Mass Spectrometry Reviews* **17**;(5) 337-366.

- Zhang, M. Y., Hughes, Z. A., Kerns, E. H., Lin, Q. und Beyer, C. E. (2007): **Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitation of acetylcholine and related neurotransmitters in brain microdialysis samples.** *J Pharm Biomed Anal* **44**;(2) 586-593.
- Zhou, J., Ens, W., Standing, K. G. und Verentchikov, A. (1992): **Kinetic energy measurements of molecular ions ejected into an electric field by matrix-assisted laser desorption.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**;(11) 671-678.
- Zhu, L., Gamez, G., Chen, H., Chingin, K. und Zenobi, R. (2009): **Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS).** *Chem Commun (Camb)* (5) 559-561.
- Zhu, X., Chen, B., Ma, M., Luo, X., Zhang, F., Yao, S., Wan, Z., Yang, D. und Hang, H. (2004): **Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multi-dimension information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry.** *J Pharm Biomed Anal* **34**;(3) 695-704.
- Zhu, Y., Wong, P. S., Cregor, M., Gitzen, J. F., Coury, L. A. und Kissinger, P. T. (2000): **In vivo microdialysis and reverse phase ion pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination and identification of acetylcholine and related compounds in rat brain.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**;(18) 1695-1700.
- Zielke, H. R., Zielke, C. L. und Baab, P. J. (2009): **Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review.** *J Neurochem* **109 Suppl 1**; 24-29.
- Zubenko, G. S. (1997): **Molecular neurobiology of Alzheimer's disease (syndrome?).** *Harv Rev Psychiatry* **5**;(4) 177-213.

8 Anhang

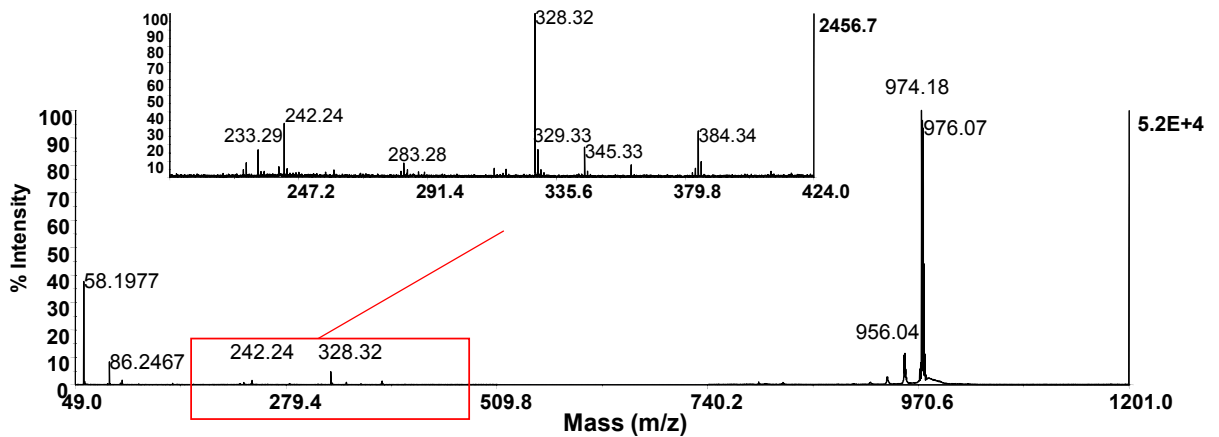


Abbildung 8.1 Spektrum der hochmolekularen Matrix F20TPP

Die drei Modelanalyten hatten eine Konzentration von je 1 pmol/ μ l. Trotz dieser hohen Konzentration ist Lidocain nicht detektierbar. Die beiden anderen Analyten sind noch erkennbar.

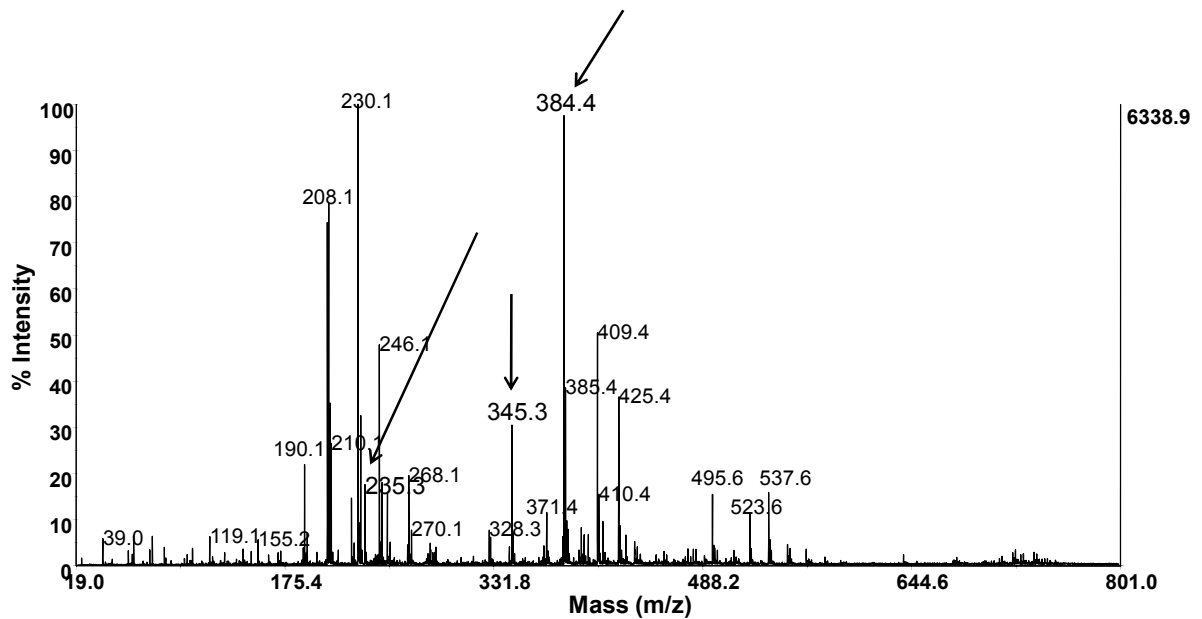


Abbildung 8.2 Spektrum von CI-CCA mit den drei Modellanalyten

Die Analyten hatten eine Konzentration von je 100 fmol/ μ l. Alle Analyten sind deutlich erkennbar, allerdings sind auch viele störende Matrixsignale vorhanden.

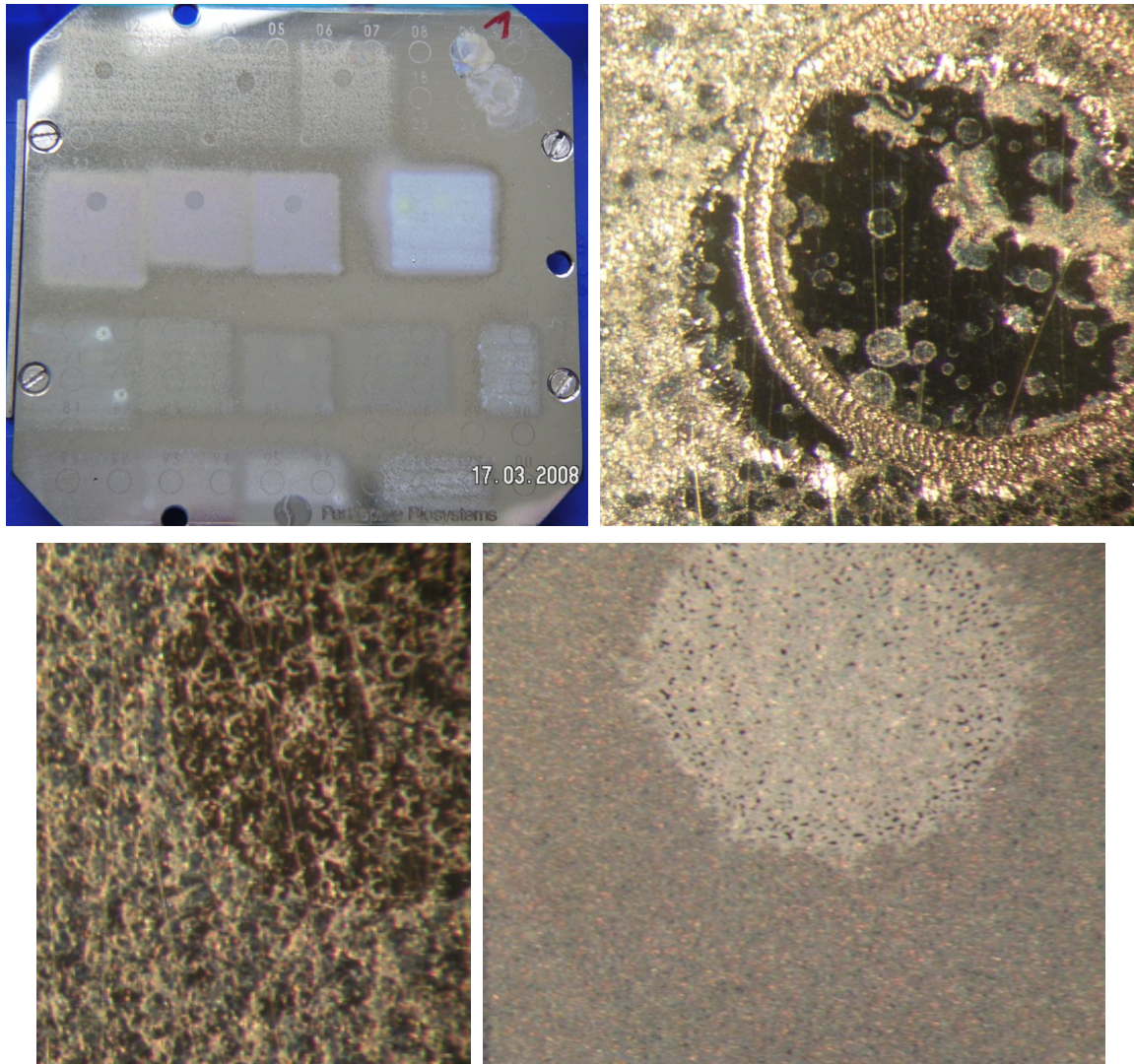


Abbildung 8.3 **Fotographien Sprayversuche TLP**

Bild 1: Versuch mit SunChrom-MALDI-Spotter unter verschiedenen Bedingungen; Bild 2-4: Sprayversuche mit Airbrush Pistole - nach Auftragen der Probe bildet sich kein innerer Kreis wie bei „herkömmlicher“ TLP beobachtet

variable IS-Konz.	LLOQ [ng/ml]	Ø% RSD	Ø% Error	R ²
Promethazin	1,4	5,4	6,4	0,9996
Chlorprothixen	1,6	6,1	4,9	0,9930
Chlorpromazin	1,6	6,2	5,9	0,9975
Perazin	1,7	6,3	9,9	0,9979
Trifluopromazin	1,8	8,4	6,1	0,9977
Thioridazin	1,9	7,2	6,7	0,9989
Trifluoperazin	4,1	8,6	10,4	0,9964
Flupentixol	4,4	9,2	10,3	0,9938
Fluphenazin	4,4	9,3	11,0	0,9957

Tabelle 8.1 Bestimmungsgrenze, Präzision, FWH und Linearität der gemessenen Phenothiazine

Als IS wurde Levomepromazin mit variabler Konzentration verwendet.

Anhang

Die folgenden Tabellen zeigen die Präzision (als %RSD) und Linearität der Quantifizierung unterschiedlicher Arzneistoffe mit variabler IS-Konzentration (IS hat dieselbe Konzentration wie der Analyt). Zur einfacheren Übersichtlichkeit sind RSD Werte > 15% gelb und > 20% rot dargestellt.

IS Procain									
Konz [fmol/μl]	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	1,9	3,8	4,9	5,2	0,5	6,3	10,9	4,6	7,2
1000	18,9	8,4	4,4	9,8	4,8	11,4	15,3	5,6	14,6
500	4,2	2,3	3,8	0,8	0,7	3,9	3,1	1,7	7,7
250	2,5	3,7	5,5	2,0	1,2	23,5	6,4	8,0	23,6
100	1,1	5,3	2,7	5,9	1,9	17,1	10,8	7,6	18,5
50	3,6	2,5	0,4	3,4	2,7	10,3	5,7	3,0	12,2
25	5,6	4,6	1,4	7,3	0,8	49,0	10,2	5,5	13,6
10	2,3	1,9	1,3	1,9	1,7	10,1	0,7	4,6	1,2
5	3,8	2,0	2,3	2,4	4,0	15,8	4,1	4,6	3,3
1	12,2	2,6	3,4	1,1	9,9	18,6	4,1	2,1	7,3
R²	0,9924	0,9906	0,9998	0,9867	0,9987	0,9838	0,9814	0,9974	0,9819

IS Xylometazolin									
Konz [fmol/μl]	Procain	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	1,9	5,6	6,8	7,1	1,5	8,2	12,7	6,3	8,9
1000	17,1	15,4	19,5	19,2	13,3	16,9	28,2	13,3	18,3
500	4,3	6,5	8,1	4,7	3,7	5,6	7,2	4,6	6,4
250	2,5	5,5	5,4	3,6	3,5	22,9	7,2	8,0	22,5
100	1,1	5,0	2,2	5,0	1,0	16,1	9,9	6,6	17,5
50	3,6	6,1	3,7	6,3	6,1	13,7	8,7	6,2	15,3
25	5,8	5,7	6,6	12,5	5,3	45,8	15,2	6,1	12,5
10	2,3	4,3	2,4	4,0	1,4	8,8	2,6	2,8	2,6
5	3,8	1,8	1,9	1,6	1,1	19,4	0,6	0,8	1,7
1	12,8	11,7	10,9	11,7	7,2	7,4	15,1	10,7	10,6
R²	0,9826	0,9994	0,9844	0,9988	0,9930	0,9937	0,9966	0,9904	0,9932

Anhang

IS Melperon									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	3,7	5,5	1,2	2,2	4,1	3,1	7,7	1,5	5,0
1000	8,8	15,7	7,7	3,8	9,2	3,3	13,9	4,2	6,7
500	2,4	6,4	2,2	2,6	2,8	5,6	2,7	3,5	9,8
250	3,7	5,5	4,0	1,9	2,6	21,2	3,5	5,7	21,7
100	5,1	4,9	2,7	3,5	4,0	15,3	7,4	5,6	18,0
50	2,6	6,2	2,5	2,9	1,2	7,8	4,2	2,0	10,1
25	4,5	5,8	3,8	7,6	3,7	52,0	10,1	9,2	17,1
10	1,9	4,2	2,5	1,2	3,4	11,2	2,0	6,3	2,4
5	2,0	1,8	0,7	0,5	2,3	17,6	2,0	2,6	2,0
1	2,6	11,6	5,0	2,4	7,7	17,6	6,6	2,2	4,7
R²	0,9827	0,9990	0,9854	0,9992	0,9930	0,9913	0,9972	0,9863	0,9916
IS Trimethoprim									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	4,8	6,7	1,2	1,4	5,3	2,0	6,6	1,9	4,2
1000	4,3	19,7	7,6	7,1	8,5	10,0	10,8	7,1	13,1
500	3,7	7,8	2,2	3,4	4,3	5,3	1,6	3,9	9,8
250	5,4	5,5	4,0	3,8	5,0	17,9	2,6	2,6	17,8
100	2,6	2,2	2,7	3,6	1,4	15,5	8,4	5,6	17,5
50	0,4	3,8	2,5	3,0	2,5	10,3	5,4	2,7	11,9
25	1,4	6,4	3,9	6,1	1,4	50,5	9,0	6,9	15,0
10	1,3	2,4	2,5	1,7	1,1	8,8	2,0	3,8	2,5
5	2,3	1,9	0,7	0,4	2,7	17,3	1,9	2,7	2,6
1	3,4	10,3	5,0	2,7	10,4	17,1	4,0	2,9	9,2
R²	0,9998	0,9935	0,9921	0,9914	0,9992	0,9846	0,9894	0,9967	0,9900

Anhang

IS Metoclopramid									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	5,2	7,1	2,2	1,4	5,7	1,1	5,8	3,2	2,9
1000	10,0	19,4	3,8	7,4	11,7	3,9	10,6	7,2	6,6
500	0,8	4,5	2,5	3,4	1,4	3,2	2,5	1,0	7,2
250	2,0	3,6	1,9	3,9	1,2	21,8	4,5	6,1	22,0
100	5,9	5,0	3,5	3,6	4,0	12,4	5,0	2,2	14,7
50	3,4	6,5	2,8	3,0	1,7	9,6	2,6	0,9	9,7
25	7,5	12,2	7,3	6,2	7,6	56,9	2,9	13,0	21,0
10	1,9	3,9	1,2	1,7	2,7	10,0	2,3	5,5	2,8
5	2,4	1,6	0,5	0,4	2,3	17,7	1,7	2,4	2,1
1	1,1	11,2	2,5	2,7	9,2	17,6	4,5	1,0	7,0
R²	0,9694	0,9980	0,9989	0,9721	0,9852	0,9926	0,9992	0,9795	0,9934
IS Yohimbin									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Thioridazin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	1,9	3,5	3,7	4,5	4,3	5,4	9,8	4,9	5,7
1000	11,8	6,4	9,5	13,8	13,3	11,3	22,6	7,3	13,3
500	2,6	1,6	4,9	6,4	3,0	4,4	5,5	3,0	6,4
250	2,6	3,9	5,7	8,1	4,5	26,2	8,9	10,6	26,3
100	3,9	4,9	8,7	6,4	9,8	20,5	14,6	11,4	21,5
50	0,9	3,4	2,8	1,3	4,2	10,2	6,4	3,7	12,6
25	5,2	6,6	0,9	4,4	7,3	53,0	9,7	10,1	18,0
10	2,3	1,5	3,9	1,5	3,2	7,8	2,8	2,4	3,1
5	2,1	3,5	2,5	3,1	2,9	17,7	4,1	4,1	2,1
1	12,1	6,8	10,0	11,7	11,2	10,1	15,4	10,1	6,5
R²	0,9537	0,9920	0,9951	0,9578	0,9976	0,9847	0,9989	0,9624	0,9873

Anhang

IS Thioridazin									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Prazosin	Verapamil	Loperamid
2000	6,3	8,2	3,1	2,0	1,1	6,8	4,8	3,9	2,4
1000	12,2	16,3	3,3	10,4	3,8	12,5	13,9	7,5	3,5
500	4,0	5,6	5,5	5,2	3,2	4,3	3,7	2,3	4,4
250	22,5	22,8	19,7	17,5	20,6	21,8	16,5	14,9	5,7
100	18,9	17,7	16,5	17,0	13,3	16,9	8,8	10,9	4,1
50	10,1	13,6	7,6	10,1	9,1	8,0	7,9	8,5	7,5
25	38,2	37,0	40,5	39,1	42,9	38,4	44,6	34,4	28,9
10	9,5	8,5	10,5	8,3	9,4	8,0	10,1	6,0	10,4
5	14,8	17,6	16,1	15,9	16,2	18,2	17,5	18,3	17,8
1	20,6	7,7	19,0	19,0	19,5	11,6	23,2	18,4	16,3
R²	0,8882	0,9817	0,9729	0,8844	0,9861	0,9299	0,9889	0,9509	0,9996
IS Prazosin									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Verapamil	Loperamid
2000	11,2	13,1	8,0	6,8	5,9	11,7	4,9	8,5	4,2
1000	14,3	30,6	14,7	10,3	11,2	18,4	15,2	16,3	17,0
500	3,0	6,9	2,7	1,6	2,4	3,7	3,7	2,6	8,2
250	6,6	7,5	3,5	2,6	4,5	5,7	17,5	2,3	18,1
100	11,0	10,0	7,7	8,7	5,0	9,0	8,6	3,4	11,9
50	5,8	9,2	4,1	5,5	2,6	3,2	8,2	2,7	7,2
25	10,5	15,0	9,7	9,2	2,9	10,5	60,0	16,0	24,0
10	0,7	2,5	2,0	2,0	2,3	2,3	10,7	5,1	0,5
5	4,1	0,6	2,0	1,9	1,7	1,7	19,4	1,0	2,3
1	4,1	13,9	6,8	3,9	4,5	13,6	20,5	5,4	11,6
R²	0,9520	0,9930	0,9957	0,9554	0,9989	0,9737	0,9898	0,9663	0,9917

Anhang

IS Verapamil									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Loperamid
2000	4,5	6,1	1,5	1,9	3,3	4,7	3,9	8,1	6,1
1000	5,6	14,2	4,3	6,8	7,6	5,0	7,4	16,2	10,6
500	1,7	4,5	3,5	3,9	1,0	2,1	2,3	2,7	6,2
250	7,9	8,3	5,5	2,7	6,0	7,2	15,5	2,3	15,7
100	7,8	6,8	5,6	5,8	2,2	5,9	10,3	3,5	12,6
50	3,0	6,5	2,0	2,7	0,9	0,8	8,9	2,7	9,5
25	5,4	6,3	9,2	6,7	12,1	5,8	42,9	14,8	7,9
10	4,6	2,8	6,3	3,9	5,6	2,9	6,1	5,0	5,2
5	4,7	0,8	2,6	2,8	2,4	1,2	20,3	1,0	2,1
1	2,1	10,3	2,2	2,9	1,0	8,2	16,7	5,4	6,3
R²	0,9964	0,9935	0,9904	0,9956	0,9872	0,9969	0,9870	0,9819	0,9844
IS Loperamid									
Konz [fmol/μl]	Procain	Xylometazolin	Melperon	Trimethoprim	Metoclopramid	Yohimbin	Thioridazin	Prazosin	Verapamil
2000	7,4	9,3	5,0	4,2	2,9	8,0	2,4	4,3	6,1
1000	15,9	16,9	6,9	14,1	6,8	15,9	3,6	15,7	10,9
500	7,4	6,6	9,3	9,4	6,9	7,4	4,3	7,9	6,0
250	21,1	20,7	19,3	16,2	19,6	20,7	5,8	16,4	14,4
100	20,6	19,4	18,8	19,0	15,4	18,7	4,0	11,7	13,1
50	13,1	16,8	10,7	12,8	10,1	10,2	7,2	7,4	10,0
25	12,8	12,8	16,5	14,0	18,7	13,2	34,5	21,1	7,6
10	1,2	2,6	2,4	2,5	2,8	2,6	11,1	0,5	5,3
5	3,4	1,7	1,9	2,5	2,1	1,0	19,3	2,3	2,1
1	7,1	11,2	4,6	8,7	6,7	4,6	16,1	11,0	6,1
R²	0,8641	0,9764	0,9663	0,8596	0,9832	0,9133	0,9995	0,9881	0,9368

Tabelle 8.2 Auswertung der Präzision und Linearität aus der Quantifizierung unterschiedlicher Arzneistoffe mit variabler IS-Konzentration

Jeder Arzneistoff der Mischung wurde als IS getestet.

Konz. [pmol/μl]	Anzahl Laserschüsse		
	1000	2000	5000
	∅% RSD	∅% RSD	∅% RSD
2,000	19,97	14,45	4,09
1,000	9,45	8,67	3,56
0,500	4,61	12,90	1,33
0,250	9,87	2,55	3,69
0,100	7,88	4,51	9,11
0,050	4,31	5,70	8,32
0,025	5,39	8,25	8,91
0,010	5,19	6,63	5,62
0,005	17,98	10,49	3,02
R²	0,9935	0,9958	0,9959

Tabelle 8.3 **Auswirkung der Anzahl Laserschüsse auf Linearität und relative Standardabweichung**

Als Analyt wurde Metoclopramid verwendet. Als IS wurde Trimethoprim mit einer Konzentration von 50 fmol/μl eingesetzt.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
500	31,37	3,82	5
100	52,77	2,95	1
50	33,61	10,60	0,5
25	30,88	4,62	0,25
10	35,33	14,98	0,1
5	29,32	12,52	0,05
2,5	29,79	27,51	0,025
1	1,34	21,85	0,01
R²	0,9981	0,9999	

Tabelle 8.4 **Auswertung ACh und Ch mit nur einem IS mit variabler Konzentration**

AMCh wurde als IS mit derselben Konzentration wie ACh verwendet. CHCA wurde als Matrix verwendet. Deutlich ist die hohe Standardabweichung und schlechtere Linearität für Ch erkennbar. Für ACh ist die RSD nur bei niedriger Konzentration zu hoch.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
500	30,25	26,06	5
100	45,85	26,00	1
50	50,34	12,55	0,5
25	47,56	7,61	0,25
10	11,93	11,22	0,1
5	17,89	18,03	0,05
2,5	57,91	26,86	0,025
1	17,68	65,01	0,01
0,5	23,32	62,19	0,005
R²	0,9674	0,9957	

Tabelle 8.5 Auswertung ACh und Ch mit nur einem IS mit konstanter Konzentration

AMCh wurde als IS mit 100 fmol/μl eingesetzt. CHCA wurde als Matrix verwendet. Erneut ist die hohe Standardabweichung und schlechte Linearität für Ch erkennbar.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
250	1,16	4,17	2,5
100	0,70	11,61	1
50	2,59	5,16	0,5
25	1,82	7,58	0,25
10	1,54	13,56	0,1
5	2,08	Ausreißerwert	0,05
2,5	3,05	14,58	0,025
1	2,32	18,09	0,01
0,5	3,95	n.d.	0,005
0,1	8,49	n.d.	0,001
R²	0,9999	0,9992	

Tabelle 8.6 Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit variabler Konzentration unter Verwendung von CHCA

AMCh wurde als IS für ACh, Ch-d₉ als IS für Ch mit jeweils variabler Konzentration verwendet. Ch war über den gesamten Messbereich, ACh bis 10 fmol/μl mit jeweils guter Linearität bestimmbar.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
250	4,03	2,53	2,5
100	1,20	3,42	1
50	2,62	4,11	0,5
25	1,28	2,39	0,25
10	2,74	7,20	0,1
5	1,69	12,51	0,05
2,5	3,84	10,46	0,025
1	5,71	3,54	0,01
0,5	2,78	16,18	0,005
0,1	11,23	n.d.	0,001
R²	0,9999	0,9970	

Tabelle 8.7 Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit variabler Konzentration unter Verwendung von CI-CCA

AMCh wurde als IS für ACh, Ch-d₉ als IS für Ch mit jeweils variabler Konzentration verwendet. Ch war über den gesamten Messbereich, ACh bis 5 fmol/μl mit jeweils guter Linearität bestimmbar.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
250	15,30	5,75	2,5
100	Ausreißerwert	13,80	1
50	10,02	2,88	0,5
25	8,77	6,78	0,25
10	13,29	7,58	0,1
5	1,73	14,21	0,05
2,5	4,78	10,23	0,025
1	6,49	23,99	0,01
0,5	5,63	n.d.	0,005
0,1	23,52	n.d.	0,001
0,05	12,83	n.d.	0,0005
R²	0,9981	0,9953	

Tabelle 8.8 Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit konstanter Konzentration unter Verwendung von CHCA

AMCh wurde als IS für ACh mit 100 fmol/μl, Ch-d₉ als IS für Ch mit 2,5 pmol/μl verwendet. Ch war bis 0,5 pmol/μl, ACh bis 25 fmol/μl mit jeweils akzeptabler Linearität bestimmbar.

Konz. [pmol/μL]	% RSD		Konz. [pmol/μL]
	Ch	ACh	
250	Ausreißerwert	4,12	2,5
100	6,49	6,76	1
50	10,13	5,25	0,5
25	14,51	8,26	0,25
10	5,01	4,77	0,1
5	5,24	12,30	0,05
2,5	0,54	8,11	0,025
1	1,72	14,98	0,01
0,5	4,67	8,84	0,005
0,1	7,81	n.d.	0,001
0,05	16,78	n.d.	0,0005
R²	0,9934	0,9935	

Tabelle 8.9 Auswertung ACh und Ch mit zwei IS mit konstanter Konzentration unter Verwendung von CI-CCA

AMCh wurde als IS für ACh mit 100 fmol/μl, Ch-d₉ als IS für Ch mit 2,5 pmol/μl verwendet. Ch war über den gesamten Messbereich, ACh bis 5 fmol/μl mit jeweils akzeptabler Linearität bestimmbar.

Publikationen:

Quantitative Determination of Acetylcholine and Choline in Microdialysis Samples by MALDI-TOF MS

Markus Persike, Martina Zimmermann, Jochen Klein und Michael Karas
Analytical Chemistry (2010); 82: 922-929

Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system

Markus Persike und Michael Karas

Rapid Communications in Mass Spectrometry (2009); 23: 3555-3562

Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MS(n)

Katrin Schütz, Markus Persike, Reinhold Carle und Andreas Schieber
Analytical and Bioanalytical Chemistry (2006); 384, 1511-1517

Vorträge:

Fast determination of Acetylcholine and Choline in aCSF by MALDI-TOF-MS

DGMS Jahrestagung 2009 in Konstanz, 08.03-11.03.09

Analysis of small pharmaceutical drugs by MALDI-TOF-MS

Doktorandenseminar des *Institutes für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische Biologie*, Frankfurt/Main, 07.04.2008

Analyse von Arzneistoffen mittels MALDI-TOF

Applied Biosystems MALDI-TOF-TOF Seminar in Darmstadt, 29.01.08

Posterbeiträge:

Fast quantification of small molecules using MALDI-TOF-MS

Markus Persike und Michael Karas

DGMS Jahrestagung 2010 in Halle (Saale), 07.03-10.03.10

Quantification of melamine and derivatives using MALDI-TOF-MS

Anne Arnold, Markus Persike, Tabiwang N. Arrey und Michael Karas

DGMS Jahrestagung 2010 in Halle (Saale), 07.03-10.03.10

Fast quantification of melamine by MALDI-MS

Markus Persike, Tabiwang N. Arrey und Michael Karas

Deutscher Lebensmittelchemiker Tagung 2009 in Berlin, 14.09-16.09.2009

Fast quantification of different phenothiazines in human plasma by MALDI-TOF-MS

Markus Persike und Michael Karas

IMSC Tagung 2009 in Bremen, 30.08-04.09.09

Quantification of small pharmaceutical drugs by MALDI-TOF

Markus Persike und Michael Karas

ASMS Jahrestagung 2008 in Denver (USA), 01.06 -05.06.08

Quantification of small pharmaceutical drugs by MALDI-TOF

Markus Persike und Michael Karas

DGMS Jahrestagung 2008 in Gießen, 02.03 -05.03.08

Optimization of MALDI-preparation protocols for high-sensitive analysis of pharmaceutical drugs

Markus Persike und Michael Karas

DGMS Jahrestagung 2007 in Bremen, 11.03 -14.03.08

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Verfahrensentwicklung zur Analytik kleiner Moleküle mittels MALDI-Massenspektrometrie“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt, 12. Mai 2010

Markus Persike