

# ANGEWANDTE CHEMIE

90. Jahrgang 1978

Heft 4

Seite 233 – 316

## Quantitative Massenspektrometrie in Biochemie und Medizin

Von W. D. Lehmann und H.-R. Schulten<sup>[\*]</sup>

Der vorliegende Aufsatz gibt einen Überblick über den Stand der quantitativen Analyse mit dem Massenspektrometer in Biochemie und Medizin. Die Grundlagen dafür, die gekoppelte Anwendung chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden, die Entwicklung empfindlicher, genauer und überdies spezifischer massenspektrometrischer Nachweismethoden sowie das Prinzip der Verdünnung mit stabilen Isotopen werden an Beispielen erläutert. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind die Verfolgung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln und aktiven Metaboliten, die Erforschung von Stoffwechselwegen, die Unterstützung und Spezifizierung medizinischer Diagnosen und schließlich die Qualitätskontrolle einfacherer quantitativer Verfahren der klinischen Chemie.

### 1. Einleitung

Diese Arbeit beschreibt die Methoden der Massenspektrometrie (MS) und ihre Anwendungen zur quantitativen Analyse in Biochemie und Medizin. Meßverfahren und Ergebnisse werden anhand instruktiver Beispiele vorgestellt und diskutiert. Hinweise auf weiterführende Literatur geben einen Überblick über die wichtigsten Arbeiten der letzten zehn Jahre, ohne im strengen Sinne vollständig zu sein.

Grundsätzlich liegt der Vorteil des Massenspektrometers als Nachweissystem bei qualitativen und auch bei quantitativen Untersuchungen darin, daß eine hohe Empfindlichkeit und zugleich eine große Spezifität erreicht werden. Die quantitative massenspektrometrische Bestimmung baut dabei stets auf der Identifizierung einer Komponente auf. Bei komplexen Gemischen, wie sie z. B. bei biologischen Proben auftreten, wird der massenspektrometrischen Analyse noch ein Reinigungs- und Trennverfahren vorgeschaltet. Auf diese Weise gelingt die zuverlässige quantitative Bestimmung von Substanzmengen im Mikrogramm- bis Pikogramm-Bereich.

Über die Möglichkeiten der meist verwendeten Gaschromatographie(GC)-MS-Kopplungen sind viele Arbeiten erschienen (siehe z. B. [1–17]). Neueste Forschungsergebnisse über den Metabolismus von Arzneimitteln<sup>[18–21]</sup>, biochemisch-medizi-

nische Anwendungen stabiler Isotope<sup>[22,23,273]</sup> und quantitative Massenspektrometrie<sup>[24,286]</sup> sind in einer Reihe von Konferenzberichten veröffentlicht worden. Diese relativ neuen Methoden haben in den letzten Jahren einen starken Einfluß auf die Arzneimittelforschung ausgeübt<sup>[25–32]</sup>. Im Bereich der klinischen Chemie<sup>[33–45]</sup> liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf dem qualitativen und halbquantitativen Nachweis von anomalen Stoffwechselprodukten (siehe Abschnitt 7.4). Quantitative Messungen, z. B. die Präzisions-Isotopenanalyse der Atemluft, liefern ebenfalls diagnostisch wertvolle Hinweise (vgl. Abschnitt 8.1). Da in Biochemie und Medizin sehr häufig ein Interesse an Substanzen besteht, die neben vielen anderen Verbindungen in sehr geringer Konzentration vorliegen, und zudem die verfügbare Probenmenge meist gering ist, kommen die Vorteile des massenspektrometrischen Nachweises auf diesem Gebiet besonders eindrucksvoll zur Geltung.

### 2. Grundlagen der quantitativen Massenspektrometrie

Die Durchführung quantitativer Analysen mit dem Massenspektrometer stellt vom Meßprinzip her besondere Anforderungen. Die Intensität der Signale hängt außer von der Probenmenge noch von vielen experimentellen Parametern wie Ionisierungsausbeute, Fokussierung des Ionenstrahls, Transmission des Gerätes und Verstärkungsfaktor des Detektors ab. Da es schwierig ist, diese Größen alle im einzelnen zu bestimmen und sie über einen längeren Zeitraum konstant zu halten, wird in der Praxis stets eine vergleichende Messung von

[\*] Dr. W. D. Lehmann, Dr. H.-R. Schulten [+]  
Institut für Physikalische Chemie der Universität  
Wegelerstraße 12, D-5300 Bonn

[+] Korrespondenzautor.

Ionenströmen vorgenommen. Dieser Vergleich der Signalintensitäten von Probensubstanz (unbekannte Konzentration) und Standard (bekannte Konzentration) kann auf mehrere Arten durchgeführt werden:

1. Zunächst wird eine Kalibrierungskurve der Signalintensitäten (Signalhöhen oder -flächen) als Funktion der Substanzmenge aufgestellt und anschließend die unbekannte Konzentration mit dieser Standardkurve aus der Signalintensität ermittelt. Die quantitative Bestimmung erfordert hier den Vergleich zweier getrennter Meßvorgänge, wobei Eichlösungen bekannter Konzentration als *externer* Standard dienen. – Die Methode des Eichzusatzes kann ebenfalls angewendet werden. Nach Spalten der Probe in zwei gleiche Teile wird dem einen eine bekannte Menge der quantitativ zu bestimmenden Verbindung zugesetzt. Nun vergleicht man die Signalintensitäten des unbehandelten Probenteils und des Probenteils mit Eichzusatz. Da beide Probenteile getrennt aufgearbeitet und analysiert werden müssen, zählt dieses Verfahren zu denen mit externem Standard.

2. Wird eine Referenzsubstanz in bekannter Menge direkt der zu analysierenden Probe zugesetzt und gemeinsam mit der Probensubstanz aufgearbeitet und analysiert, so spricht man von einem Verfahren mit *internem* Standard. Soll zum Nachweis von Probe und Standard ein gemeinsames Ion verwendet werden („single ion monitoring“), so müssen Probe und Standard nacheinander in die Ionenquelle eingeführt werden. Dies kann z. B. durch Trennung in einem Gaschromatographen erreicht werden. Bei gleichzeitiger oder sich überschneidender Einführung von Probe und Standard in die Ionenquelle kann die getrennte Registrierung z. B. über den Nachweis ausgewählter Ionensorten („selected ion monitoring“, „multiple ion monitoring“) erfolgen. – Mit stabilen Isotopen markierte Verbindungen eignen sich im allgemeinen sehr gut als interner Standard, weil sie massenspektrometrisch von der nicht-markierten Verbindung klar unterscheidbar sind, chemisch aber praktisch damit übereinstimmen. Homologe oder auch nur chemisch ähnliche Verbindungen können ebenfalls als interner Standard dienen. In jedem Falle sollte vor der quantitativen Analyse die Eignung des gewählten internen Standards mit einer Eichkurve überprüft werden (siehe Abschnitt 4.2).

Vor der Besprechung einiger früherer Arbeiten sollen die Gebiete hervorgehoben werden, mit deren Entwicklung die Fortschritte auf dem Gebiet der quantitativen massenspektrometrischen Analyse sehr eng verbunden sind.

## 2.1. Verbesserung mikroanalytischer Trennverfahren und ihre Verwendung in Kopplung oder Kombination mit dem Massenspektrometer

Für eine quantitative Bestimmung muß die jeweilige Verbindung in möglichst reiner Form – abgesehen vom gegebenenfalls benutzten internen Standard – in das Massenspektrometer eingeführt werden. Der Gaschromatograph ist das Trennsystem, welches man am häufigsten mit dem Massenspektrometer kombiniert. Nach ersten Versuchen von *Henneberg*<sup>[46]</sup> mit einer direkten Kopplung der beiden Geräte entwickelten *Ryhage*<sup>[47]</sup> sowie *Watson* und *Biemann*<sup>[48]</sup> leistungsfähige Kopplungsglieder (Separatoren), die einerseits den Druck am Ausgang des Gaschromatographen auf den niedrigen Wert in der Ionenquelle des Massenspektrometers vermindern und andererseits die Probe relativ zum Trägergas anreichern. Che-

mische Verbindungen, deren thermische Labilität oder zu geringe Flüchtigkeit eine gaschromatographische Trennung nicht erlaubt und die sich auch nicht in Derivate<sup>[49]</sup> mit guten gaschromatographischen Eigenschaften umwandeln lassen, können vor der massenspektrometrischen Analyse z. B. durch Dünnsschicht-, Säulen- oder Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)<sup>[50]</sup> aufgearbeitet werden. Die Anwendung eines solchen Verfahrens erbringt neben der Reinigung eine weitere Meßgröße (Retentionszeit, *R<sub>f</sub>*-Wert), die zur Absicherung der quantitativen Analyse genutzt werden kann<sup>[51]</sup>.

## 2.2. Entwicklung massenspektrometrischer Meßverfahren für die quantitative Analyse

Um die Intensitäten mehrerer Ionensignale während der durch den Probenvorrat begrenzten Zeit zu messen, sind mehrere Techniken entwickelt und erprobt worden:

Wiederholtes Durchfahren eines vorgewählten Massenbereiches („repetitive scan“) durch Variation der magnetischen Feldstärke oder der Beschleunigungsspannung;

Nachweis ausgewählter Ionensorten, die abwechselnd und in schneller Folge durch Variation der Beschleunigungsspannung auf den Detektor fokussiert werden („selected ion monitoring“). Die Anwendung einer GC-MS-Kopplung mit dieser Art des Ionennachweises wird oft als Massenfragmentographie („mass fragmentography“) bezeichnet;

Nachweis nur einer Ionensorte. Diese Nachweisart erfordert bei Anwendung eines internen Standards, daß mindestens zwei Verbindungen nacheinander – etwa gaschromatographisch getrennt – in die Ionenquelle eingeführt werden;

Verwendung eines Mehrfachdetektors. Dabei werden meist zwei Ionensorten bei konstanten instrumentellen Bedingungen gleichzeitig registriert.

Die Nachweisempfindlichkeit dieser Verfahren für ein Ionensignal steigt in dem Maße, wie der Anteil der Meßzeit dieses Signals an der gesamten Meßzeit zunimmt. Sowohl beim Nachweis nur einer Ionensorte als auch bei Verwendung eines Mehrfachdetektors wird eine optimale Nachweisempfindlichkeit erreicht, weil dabei dieser Anteil 100% beträgt.

## 2.3. Verfügbarkeit stabilisotopen-markierter Verbindungen

Durch die technisch in großem Maßstab durchgeführte Anreicherung der stabilen Isotope von Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel etc. in den Vereinigten Staaten sind in den letzten Jahren stabilisotopen-markierte Biochemikalien kommerziell erhältlich geworden<sup>[52]</sup>. Solche Verbindungen haben sich als interne Standards für quantitative MS-Untersuchungen ausgezeichnet bewährt. Der Preis dieser Verbindungen ist durch die steigende Nachfrage in den letzten Jahren gesunken; so kostet zur Zeit 1 g [D<sub>1</sub>]-Glucose etwa 400,— DM und 1 g [<sup>1-13</sup>C]-Glucose rund 3000,— DM. Da für eine quantitative Bestimmung maximal Mikrogramm-Mengen des Standards benötigt werden, fallen jedoch diese Kosten nur mit Pfennigbeträgen pro Analyse ins Gewicht.

## 2.4. Kopplung von Massenspektrometer und Computer

Der Zeitaufwand für die Datenaufnahme und -verarbeitung bei massenspektrometrischen Analysen wird durch die Kopplung von Massenspektrometer und Computer erheblich verringert. Dies ermöglicht die Bearbeitung einer größeren Zahl

von Proben und schafft die Voraussetzung für Routine-Analysen, z. B. im klinischen Bereich. Die neuere Entwicklung, den Computer auch für die Regelung und Überwachung der Analysenparameter einzusetzen, führt zu einer vereinfachten und besser reproduzierbaren Bedienung des Massenspektrometers. Diesen Vorteilen stehen zwei Nachteile gegenüber: Zum einen liegen die Kosten für ein Computersystem in der gleichen Größenordnung wie für ein Massenspektrometer; zum anderen erhöht sich die Komplexität und damit auch die Anfälligkeit des Analysensystems.

### 3. Frühe massenspektrometrische Untersuchungen mit dem Nachweis ausgewählter Ionensorten an biochemisch wichtigen Verbindungen

#### 3.1. Spezifische Registrierung von Mischungskomponenten

Bei magnetischen Massenspektrometern wird ein Massenspektrum üblicherweise durch Variation der magnetischen Feldstärke erzeugt. Es ist aber auch möglich, bei konstantem Magnetfeld Ionen unterschiedlicher Masse durch Veränderung der Beschleunigungsspannung auf den Detektor zu fokussieren. Da sich eine Spannung wesentlich schneller und besser reproduzierbar zwischen vorgeählten Werten umschalten lässt als ein Magnetfeld (Trägheit und Hysterese des Magneten), wird bei magnetischen Massenspektrometern zum Nachweis ausgewählter Ionensorten meist die Beschleunigungsspannung variiert.

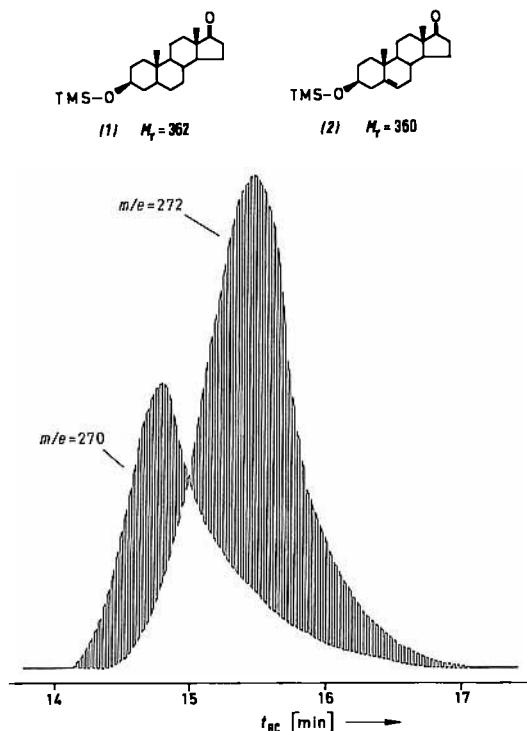


Abb. 1. Getrennte Registrierung der Trimethylsilyl(TMS)-Derivate von Epandrosteron (1) und Dehydroepiandrosteron (2) durch Registrierung von zwei ausgewählten Ionensorten ( $m/e = 272$  bzw. 270) mit einer GC-MS-Kopplung. Die beiden Substanzen sind gaschromatographisch nur teilweise getrennt ( $t_{EC}$  = Elutionszeit). Das Massenspektrometer wird so eingestellt, daß zuerst bei voller Beschleunigungsspannung das Ion mit der kleineren Masse durch Variation des Magnetfeldes auf den Detektor fokussiert wird. Dann wird die Beschleunigungsspannung so weit verringert, daß das schwerere Ion auf den Detektor trifft. Während der Analyse springt die Beschleunigungsspannung zwischen dem normalen und dem einjustierten tieferen Wert hin und her. Die Verbindungsline der entsprechenden Signalmaxima ergibt zwei Ionstrom-Profilen, die den getrennten Nachweis der beiden Verbindungen ermöglichen (nach [54]).

Die wiederholte stufenweise Veränderung der Beschleunigungsspannung zogen Nier et al.<sup>[53]</sup> bereits 1948 zur kontinuierlichen massenspektrometrischen Überwachung von Mischungen anorganischer Gase heran. Zur Registrierung biochemisch interessanter Verbindungen wurde diese Nachweisart erst 1966 von Sweeley et al.<sup>[54]</sup> angewendet. Die Autoren konstruierten für das Massenspektrometer eine Zusatzeinheit, welche die Beschleunigungsspannung zwischen zwei einstellbaren Werten hin und her springen läßt und damit die quasi-gleichzeitige Registrierung von zwei Ionensorten unterschiedlicher Masse ermöglicht. Das Ziel dieser Untersuchung war die getrennte Registrierung von Verbindungen, deren Mischung sich durch Gaschromatographie nicht oder nur teilweise trennen ließ. Die Autoren erreichten dies durch den massenspektrometrischen Nachweis ausgewählter Ionensorten im Eluat des Gaschromatographen. Abbildung 1 zeigt eine der untersuchten Mischungen.

Auf die gleiche Weise bestimmten Sweeley et al.<sup>[54]</sup> in Mischungen von Glucose und [ $D_7$ ]-Glucose den Anteil der deuterierten Verbindung in Mikrogramm-Proben mit einer Genauigkeit um 5 %.

In den folgenden Jahren wurden mehrere verbesserte Einheiten zur Variation der Beschleunigungsspannung beschrieben<sup>[55–65]</sup>.

Bei den heute oft verwendeten Quadrupol-Massenspektrometern<sup>[66]</sup> wird der Nachweis ausgewählter Ionensorten durch Variation der Quadrupol-Felder, also ebenfalls nur durch Veränderung elektrischer Felder, durchgeführt (siehe auch Abschnitt 5.3 und 6.2).

#### 3.2. Qualitativer Nachweis eines Medikaments und seiner Metaboliten

Bei einer der ersten Anwendungen des Nachweises ausgewählter Ionensorten identifizierten Hammar et al.<sup>[67]</sup> in menschlichem Blut das Arzneimittel Chlorpromazin und drei seiner Metaboliten mit einer GC-MS-Kopplung. Zwei dieser Metaboliten waren in so geringer Konzentration vorhanden, daß kein vollständiges Massenspektrum aufgenommen werden konnte. Dennoch konnten sie dadurch identifiziert werden, daß die Ionenstrom-Profiles von drei ausgewählten Ionen die gleichen Intensitätsverhältnisse zeigten wie in den Massenspektren der synthetischen Vergleichssubstanzen und daß die Retentionszeit von Probe und Vergleichssubstanz ebenfalls übereinstimmte. Offenbar im Hinblick auf die Möglichkeit, Verbindungen durch die relativen Intensitäten von massenspektrometrischen *Fragmenten* identifizieren zu können, nannten die Autoren diese Technik „Massenfragmentographie“. In der Originalliteratur finden sich rund 15 Bezeichnungen für diese Meßtechnik<sup>[68, 69]</sup>, wobei „mass fragmentography“ und „selected ion monitoring“ am weitesten verbreitet sind. Wir wollen hier die Bezeichnungen „Nachweis einer Ionensorte“ und „Nachweis ausgewählter Ionensorten“ verwenden und die Meßdaten „(ausgewählte) Ionenstrom-Profil“ („selected ion current profiles“) nennen.

#### 3.3. Isotopenverdünnung und quantitative Bestimmung

Häufig kann bei Aufgabe von Nanogramm-Mengen auf eine gepackte GC-Säule wegen der Eigenabsorption und thermischer Verluste am Ausgang kein Signal mehr erhalten werden. Wird allerdings gleichzeitig eine mit stabilen Isotopen

markierte Form der Verbindung in großem Überschuß injiziert, so wirkt die Absorptionskapazität der Säule auf die Gesamtmenge von markierter und nicht markierter Form und verringert so den Substanzverlust der unmarkierten Form erheblich. Die Verwendung isotopenmarkierter Analoga als Schlepper („carrier“) in einer GC-MS-Kopplung ermöglicht den Nachweis von Verbindungen im Pikogramm-Bereich<sup>[17]</sup>. Dieser häufig beschriebene Schleppereffekt scheint nach neueren Untersuchungen keine durchgängig zu beobachtende Erscheinung zu sein<sup>[280]</sup>.

In einer methodischen Arbeit benutzten Samuelsson et al.<sup>[70]</sup> den Zusatz einer mit stabilen Isotopen markierten Verbindung („stable isotope dilution“), um die Empfindlichkeit einer GC-MS-Kopplung zu erhöhen und zugleich einen quantitativen Nachweis zu führen. Sie gaben in etwa 1000fachem Überschuß ein dreifach deuteriertes Prostaglandin zu einer Probe mit der undeuterierten Form und registrierten die Ionenstromprofile der korrespondierenden Ionen  $m/e = 470$  und  $473$ . Eine Voraussetzung für eine so durchgeführte quantitative Bestimmung ist, daß die in großem Überschuß zugesetzte markierte Verbindung nur einen sehr geringen Anteil an nicht-markierter Komponente enthält. Bei der zitierten Untersuchung betrug der  $[D_0]$ -Anteil im  $[D_3]$ -Prostaglandin  $0.39\%$ ; nach dessen Berücksichtigung konnte die in der Probe vorliegende  $[D_0]$ -Komponente quantitativ bestimmt werden. Die Nachweissgrenze lag bei etwa  $3\text{ ng}$ , d. h. es war eine Mischung von  $3\mu\text{g}$   $[D_3]$ -Komponente und  $3\text{ ng}$  der nicht-markierten Verbindung in den Gaschromatographen injiziert worden.

Die Handhabung sehr geringer Probenmengen wird auch durch die Benutzung von Kapillarsäulen anstelle von gepackten Säulen in einer GC-MS-Kopplung erleichtert. Beim quantitativen Arbeiten mit Substanzmengen, bei denen die Absorption im Trennsystem eine untergeordnete Rolle spielt, wird meist ein etwa äquimolares Verhältnis zwischen Probe und Standard eingestellt, weil dadurch eine größere Genauigkeit erreicht wird.

Die erste quantitative Bestimmung eines Steroidhormons, also einer endogenen Verbindung, durch den Nachweis ausgewählter Ionensorten führten Siekmann et al.<sup>[71]</sup> durch. Mit zweifach deuteriertem Östron als internem Standard gelang die Konzentrationsbestimmung von Östron in Schwangerenplasma zu  $200\text{ ng}/2.5\text{ ml}$ . Bereits diese Untersuchung zeigte

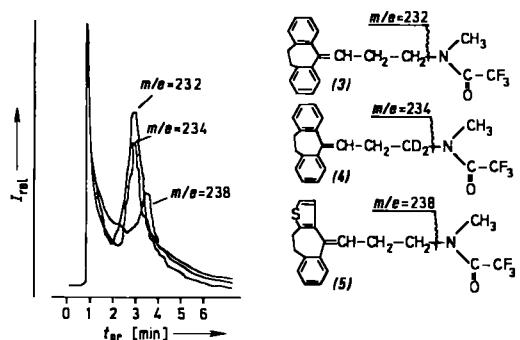


Abb. 2. Analyse eines Plasma-Extraktes, der Nortriptylin,  $[D_3]$ -Nortriptylin und ein Schwefel-„Homologes“ dieser Verbindung in Form der Trifluoracetyl(TFA)-Derivate (3), (4) bzw. (5) im Verhältnis 1:1:1 enthält ( $t_{EI}$  = Elutionszeit). Der Nachweis der ausgewählten Ionen  $m/e = 232$ , 234 und 238 zeigt, daß deuteriertes und nicht deuteriertes Nortriptylin nach der gleichen Retentionszeit eluiert und mit gleicher Empfindlichkeit registriert werden, während die schwefelhaltige Verbindung später eluiert und ein kleineres Signal ergibt. Bei der quantitativen Bestimmung im Blutplasma zeigte sich, daß die deuterierte Verbindung als interner Standard besser geeignet ist, weil auf ihrer ausgewählten Masse eine geringere Überlagerung von Fremdkomponenten auftrat (nach [72]).

die hohe Spezifität und die große Nachweisempfindlichkeit dieses Verfahrens (zwischen  $1\text{ ng}$  und  $50\text{ pg}$  für die untersuchten Steroidhormone).

Wenig später erprobten Gaffney et al.<sup>[72]</sup> eine quantitative Bestimmung von Nortriptylin, also einer exogenen Verbindung, mit der gleichen Methode. Dieses Medikament dient zur Behandlung psychischer Erkrankungen. Als internen Standard verwendeten sie sowohl zweifach deuteriertes Nortriptylin als auch ein Schwefel-„Homologes“ dieser Verbindung. Nach Extraktion aus Blutproben und Derivatisierung der sekundären Amine zur Trifluoracetyl(TFA)-Verbindungen gelang der Nachweis nach der GC-Trennung durch je ein ausgewähltes Ion (siehe Abb. 2).

Bei diesen frühen Arbeiten stand die quantitative Bestimmung durchaus nicht im Mittelpunkt. Dennoch entwickelte sich auf dieser Basis eine Vielzahl von quantitativen massenspektrometrischen Untersuchungen mit biochemisch-medizinischer Orientierung.

#### 4. Voraussetzungen für die quantitative Mikroanalyse

##### 4.1. Aufarbeitung und interner Standard

Obwohl die Aufarbeitungsprozedur bei jedem Bestimmungsverfahren der Probe und den nachzuweisenden Verbindungen angepaßt werden muß, lassen sich doch Gemeinsamkeiten beschreiben.

Der Probe, z. B. einer Körperflüssigkeit oder homogenisiertem Gewebe, wird direkt nach der Entnahme eine abgemessene Menge des internen Standards zugesetzt, der in der Probe gleichmäßig verteilt wird. Liegt ein Teil der nachzuweisenden Verbindung nicht in freier Form, sondern z. B. als Konjugat mit Glucuronsäure, Schwefelsäure etc. oder an ein Protein gebunden vor, was bei Medikamenten häufig der Fall ist, so folgt eine Hydrolyse zur Spaltung dieser Konjugate (z. B. mit starken Säuren oder Alkalien oder enzymatisch). Liegt kein Konjugat vor oder soll nur der freie Anteil der Verbindung bestimmt werden, so wird die Probe ohne diesen Schritt extrahiert. Diese Extraktion erfolgt meist durch Schütteln mit einem organischen Lösungsmittel, das gegenüber der wäßrigen Probenlösung eine separate Phase bildet<sup>[73]–[75]</sup>, oder durch eine Kombination von Chromatographie und Extraktion. Nach Konzentrieren dieses Extraktes durch Abblasen des Lösungsmittels mit einem Inertgas muß das Substanzgemisch in einem besonderen Schritt zerlegt werden, es sei denn, die nachzuweisende Substanz liegt bereits in so hoher Konzentration vor, daß der direkte massenspektrometrische Nachweis gelingt. Als Trennmethode kommen die Gaschromatographie, die Dünnschicht- und die Hochdruck-Flüssig-Chromatographie in Betracht, wobei die nachzuweisenden Verbindungen im Extrakt vor der GC-Trennung im allgemeinen derivatisiert werden, um ihre Flüchtigkeit und thermische Stabilität zu erhöhen. Nach der Trennung wird die Probsubstanz in das Massenspektrometer eingeführt und z. B. über den Nachweis ausgewählter Ionensorten quantitativ analysiert (siehe Abb. 3).

In der Praxis ist oft eine Vielzahl von Reinigungsschritten erforderlich<sup>[38]</sup>. Für die quantitative Bestimmung ist daher die Verwendung eines internen Standards die Methode der Wahl. Ein brauchbarer interner Standard muß einerseits der zu bestimmenden Verbindung möglichst ähnlich sein, damit das direkt nach der Probennahme eingestellte Konzentrations-

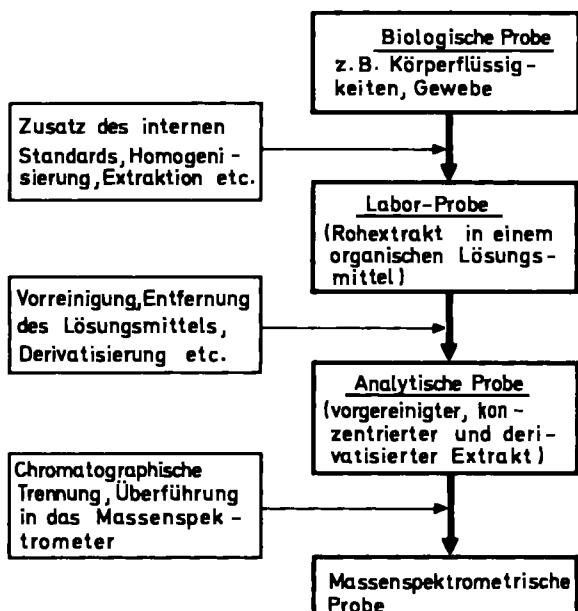


Abb. 3. Schematischer Gang der Aufarbeitung biologischer Proben für die quantitative massenspektrometrische Analyse.

verhältnis durch die Aufarbeitung nicht verändert wird, andererseits aber massenspektrometrisch klar von der Probensubstanz unterscheidbar sein. Ohne internen Standard müßten die Ausbeuten jedes einzelnen Extraktions- und Umsetzungsschrittes bestimmt werden, während bei Verwendung eines internen Standards eine einzige Messung des Konzentrationsverhältnisses von Probensubstanz und internem Standard ausreicht. Die Brauchbarkeit eines internen Standards und des Analysenverfahrens läßt sich durch die Untersuchung von Eichmischungen überprüfen.

#### 4.2. Eichkurven

Als Grundlage quantitativer massenspektrometrischer Bestimmungen sollte anhand von Eichmischungen aus Probensubstanz und Standard geprüft werden, ob im interessierenden Konzentrationsbereich Linearität zwischen der Mischungszusammensetzung und den Meßwerten, also dem Verhältnis

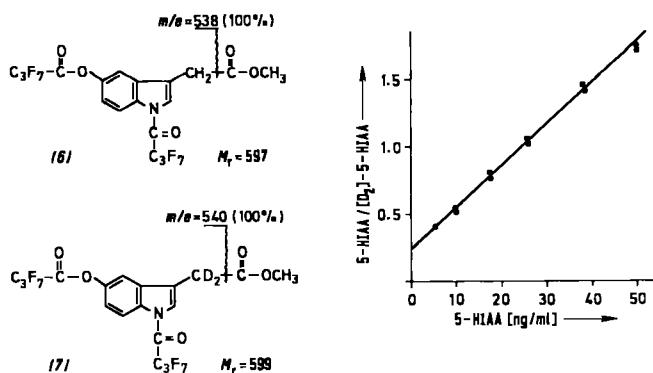


Abb. 4. Eichkurve (bezogen auf die Signalhöhen) zur Überprüfung eines quantitativen Bestimmungsverfahrens. Es wurden Eichmischungen hergestellt und analysiert, die in künstlicher Hirnflüssigkeit (CSF) [77] jeweils 40 ng/ml internen Standard ( $[D_2]$ -5-Hydroxy-3-indoleessigsäure,  $[D_2]$ -5-HIAA) und unterschiedliche Mengen 5-Hydroxy-3-indoleessigsäure (5-HIAA) enthielten. Die Kurve zeigt Linearität zwischen den Analysenwerten und der Konzentration an 5-HIAA. Der Ordinatenabschnitt stimmt damit überein, daß der interne Standard 20 %  $[D_0]$ -Komponente enthält. Für die GC-Trennung war die Derivatisierung zu den Bis(heptafluorbutyryl)(HFB)-methylestern (7) bzw. (6) erforderlich (nach [76]).

der Signalhöhen oder -flächen der Ionenstrom-Profile, besteht. Entsprechend den Bedingungen bei echten Analysen werden diese Eichmischungen meist so zusammengesetzt, daß zu einer konstanten Menge an internem Standard unterschiedliche Mengen an Probensubstanz gegeben werden. Abbildung 4 zeigt eine von Bertilsson et al. [76] nach diesem Verfahren erstellte Eichkurve. Diese Autoren bestimmten mit einer GC-MS-Kopplung und dem Nachweis ausgewählter Ionensorten die Konzentration von 5-Hydroxy-3-indoleessigsäure (5-HIAA) in menschlicher Hirnflüssigkeit. 5-HIAA ist ein wichtiges Abbauprodukt von 5-Hydroxytryptamin, einem biogenen Amin, das am Reizleitungsmechanismus der Nervenzellen beteiligt ist.

Der Verlauf der Eichkurve in Abbildung 4 zeigt, daß  $[D_2]$ -5-HIAA ein guter interner Standard ist. Bei der Untersuchung von fünf Proben wurden 8 bis 32 ng 5-HIAA/ml Hirnflüssigkeit gefunden. Der mittlere Fehler der jeweils aus fünf Messungen gemittelten Werte lag bei 20 ng bei 6 %, darüber bei 1–2 %.

Eine andere Lage der Eichkurve in Zusammenhang mit dem Nachweis einer Ionensorte und der Verwendung einer ähnlich aufgebauten Verbindung als internem Standard zeigt Abbildung 5. Walle et al. [78] bestimmten die Mengen des Medikaments Propanol und des aktiven Metaboliten 4-Hydroxy-

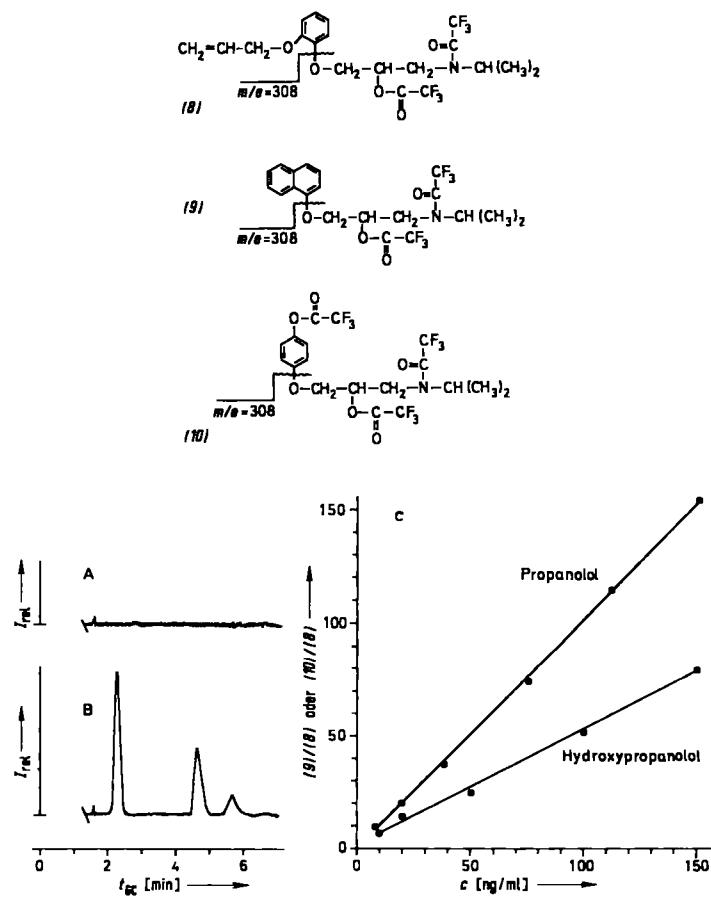


Abb. 5. Eichkurven (bezogen auf die Signalflächen) und Ionenstrom-Profile für die quantitative Bestimmung von Propanol und 4-Hydroxypropanol [in Form der Trifluoracetyl(TFA)-Derivate (9) bzw. (10)] mit Oxprenolol [in Form des TFA-Derivats (8)] als internem Standard. A) Leerwert des Ionenstromes auf  $m/e = 308$  bei der Analyse von Plasma ohne Verabreichung von Propanol und ohne Zugabe des internen Standards, B) nach Verabreichung von Propanol und Zusatz von (8). C) Die Eichkurven gehen durch den Ursprung, weil keine anderen Ionen mit  $m/e = 308$  stören. Die Steigung von praktisch 1 bei der Eichkurve von Propanol zeigt, daß praktisch gleiche Empfindlichkeit für die Komponenten (8) und (9) vorliegt. Die Steigung der Eichkurve von (10) ist nur etwa halb so groß, was auf Substanzverluste während der Aufarbeitung und Trennung hinweist (nach [78]).

propanolol in menschlichem Blutplasma. Sie benutzten dazu eine GC-MS-Kopplung und den Nachweis eines gemeinsamen Fragmentions von Medikament, Metabolit und Standard.

Um die Spezifität des gesamten Nachweisverfahrens zu sichern und die Proportionalität zwischen Substanzmenge und analytischen Daten nachzuweisen, sollten vor den quantitativen Bestimmungen Eichkurven aufgestellt werden. Im allgemeinen werden die Eichkurven aus den Meßwerten nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate konstruiert. Die Verwendung von stabilisotopen-markierten Verbindungen als interne Standards ergibt fast stets Eichkurven der Steigung 1 (innerhalb der Meßgenauigkeit). Sie gehen durch den Ursprung des Koordinatensystems, wenn die Standards praktisch keine unmarkierte Komponente enthalten und keine Überlagerung durch Ionen von Verunreinigungen erfolgt. Bei Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -,  $^{18}\text{O}$ -,  $^{15}\text{N}$ - etc. markierten Verbindungen (also nicht von deuterium-markierten Verbindungen) und Arbeiten bei relativ hohen Konzentrationen ( $> 10\text{ ng/ml}$ ) kann unter Umständen auf die Erstellung von Eichkurven verzichtet werden<sup>[28]</sup>. Solche Verbindungen zeigen optimale chemische Ähnlichkeit mit den zu bestimmenden nicht-markierten Analoga. Störungen durch Austausch der markierten gegen nicht-markierte Atome oder durch Isotopeneffekte sind nicht zu erwarten.

## 5. Vergleich der massenspektrometrischen Techniken für quantitative Bestimmungen

### 5.1. Richtigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit

Die **Richtigkeit** eines Meßwertes stellt dessen Abweichung vom wahren Wert dar. Systematische Fehler beeinflussen Meßwerte stets in einer Richtung und beeinträchtigen so deren Richtigkeit, während statistisch auftretende Schwankungen sich mit zunehmender Anzahl der Messungen herausmitteln.

Die **Genauigkeit** gibt ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Meßdaten bei wiederholter Analyse der gleichen Probe. Ausgedrückt wird die Genauigkeit als relative oder absolute Standardabweichung des arithmetischen Mittels eines Satzes von Meßwerten<sup>[79]</sup>.

Die **Empfindlichkeit** einer Messung wird durch das Verhältnis der registrierten Signalgröße zur eingesetzten Probenmenge beschrieben. Sie wird in der Massenspektrometrie z. B. als Coulomb/ $\mu\text{g}$  angegeben.

Im folgenden werden die zur quantitativen Analyse benutzten massenspektrometrischen Nachweistechniken in der Reihenfolge zunehmender Genauigkeit und Empfindlichkeit besprochen.

### 5.2. Wiederholtes Durchfahren eines vorgewählten Massenbereiches

Die vergleichende Intensitätsmessung mehrerer Ionensorten kann ohne zusätzliche Apparaturen durch wiederholtes Durchfahren eines Massenbereiches („repetitive scan“) erfolgen (siehe z. B. <sup>[80]</sup>). Bei relativ großer Probenmenge können bei konstantem Totalionenstrom direkt die Signalintensitäten verglichen werden (siehe Abschnitte 6.3 und 10.3). Läßt sich wegen der geringen Probenmenge oder wegen der Art der Probenufuhr (etwa durch direkte GC-Kopplung) der Totalionenstrom nicht über den Zeitraum einiger Massendurchläufe

konstant halten, so können nach der Messung aus den registrierten Massenspektrien die Ionenstrom-Profilen einzelner Ionensorten rekonstruiert werden. Dies ist effektiv nur durchführbar, wenn die Daten von einem Computer aufgenommen und verarbeitet werden (siehe Abschnitt 6.2). Zur vergleichenden Messung dienen dabei meist die Flächen der Ionenstrom-Profilen.

Das Durchfahren eines Massenbereiches liefert weniger genaue Meßwerte als die im folgenden besprochenen Verfahren<sup>[81, 82]</sup>, weil ein großer Teil der Meßzeit nicht zur Registrierung der interessierenden Ionen verwendet wird. Hinzu kommt, daß für die Aufnahme nicht verzerrter Massenspektren bestimmte Einstellungen für das Auflösungsvermögen und die Zeitkonstante des Verstärkersystems eingehalten werden müssen, die eine Justierung auf optimale Empfindlichkeit nicht gestatten. Diese Nachteile lassen sich jedoch zum Teil kompensieren, wenn nur ein kleiner Ausschnitt des Massenspektrums durchfahren wird und ein Vielkanalanalysator zur Akkumulation der Signale benutzt wird<sup>[268, 271]</sup>.

### 5.3. Nachweis ausgewählter Ionensorten

Die Genauigkeit der Intensitätsbestimmung ausgewählter Ionensorten mit einem magnetischen Massenspektrometer hängt von der Stabilität des Magnetfeldes, der Beschleunigungsspannung und des Verstärkersystems sowie von der Probenmenge ab. Im Nanogramm-Bereich beträgt die Genauigkeit großenteilsmäßig 1–2 %, wenn Probe und Standardverbindung etwa in gleicher Menge vorliegen. Bei Substanzmengen bis in den Mikrogramm-Bereich nimmt die Genauigkeit zu, im Subnanogramm-Bereich wird hingegen nur eine Genauigkeit von etwa  $\pm 10\%$  erreicht. Die Abnahme der Genauigkeit mit kleiner werdender Analysenmenge hängt mit der Zunahme der statistischen Schwankungen der Ionenströme und den Schwierigkeiten bei der reproduzierbaren Handhabung sehr kleiner Substanzmengen zusammen. Die besten mitgeteilten Werte liegen etwa bei einer Genauigkeit von  $\pm 0.3\%$  für eine Menge von 3 ng und  $\pm 10\%$  für 30 pg<sup>[83]</sup>. Diese Daten wurden mit einer Kapillarsäulen-GC-MS-Kopplung gemessen.

Vergleichbare Genauigkeiten wurden auch beim Arbeiten mit einem Quadrupol-Massenspektrometer gefunden<sup>[84]</sup>. Gegenüber magnetischen Instrumenten hat es den Vorteil, daß die Sprungzeiten zwischen den Massenwerten noch kürzer sind und daß Ionen beliebiger Masse ausgewählt werden können (beim magnetischen Instrument muß die kleinste ausgewählte Masse mindestens etwa 60 % der höchsten Masse betragen). Dafür muß aber beim Quadrupol-Gerät bei weit auseinanderliegenden Massen die Massenabhängigkeit der Ionentransmission korrigiert werden.

Die hauptsächlichen Fehlerquellen der quantitativen Bestimmungen liegen in Adsorptions-Desorptions-Effekten im Trennsystem oder in den Glasgefäßen, vor allem aber bei dem vergleichsweise simplen Abmessen des internen Standards. Bei der Herstellung der Standardlösungen sowie beim Abmessen eines aliquoten Teils – typische Menge 20  $\mu\text{l}$  – als Zusatz für die Probe können durchaus Fehler in der Größe von Prozenten entstehen. Dies gilt vor allem für den Fall, daß eine größere Zahl von Proben bearbeitet wird und Routinemessungen, z. B. im klinischen Bereich, über längere Zeit durchgeführt werden.

## 5.4. Nachweis nur einer Ionensorte

Bezogen auf die Analyse gleicher Substanzmengen wird beim Nachweis nur einer Ionensorte stets eine größere Genauigkeit erzielt als beim Nachweis mehrerer ausgewählter Ionensorten, denn im ersten Fall werden 100 % der Meßzeit zur Registrierung ausgenutzt. In einer vergleichenden Studie zur quantitativen Analyse eines Barbiturates mit diesen beiden Methoden zeigten *Lee* und *Millard*<sup>[85]</sup>, daß die gesteigerte Genauigkeit sich erst im Bereich von Substanzmengen unter 1 ng auswirkt. Die Autoren erzielten im Subnanogramm-Bereich die größte Genauigkeit, indem sie der Probe ein verwandtes Barbiturat als internen Standard und ein deuteriertes Derivat im Überschuß als Schlepper für die GC-Trennung zusetzen und die quantitative Bestimmung über den Nachweis eines gemeinsamen Fragmentions von Probe und Standard durchführten.

## 5.5. Gleichzeitiger Nachweis mit einem Mehrfachdetektor

Mit speziellen Massenspektrometern lassen sich auch Präzisions-Isotopenbestimmungen mit einer Genauigkeit bis zu 1:10<sup>5</sup> durchführen. Dazu sind allerdings größere Probenmengen, der Vergleich mit einem Standardgemisch genau bekannter Isotopenverteilung und die Registrierung mit einem Mehrfachdetektor erforderlich. Die Mehrfachdetektoren registrieren meist zwei Ionensorten gleichzeitig und sind von ihrer Konstruktion her auf einen relativ niedrigen Massenbereich beschränkt. Sie eignen sich besonders zur Gasanalyse, z. B. zur Präzisionsmessung des <sup>13</sup>C- oder <sup>18</sup>O-Gehaltes in CO<sub>2</sub>, wobei dann die Ionen der Masse 44 und 45 bzw. (44+45) und 46 gleichzeitig aufgefangen werden (siehe Abschnitt 8.1).

## 6. Anwendungsbeispiele: Quantitative Bestimmung von Arzneimitteln

### 6.1. GC-(EI)MS-Kopplung – Bestimmung des stationären Blutspiegels von Imipramin und Desipramin

Die tricyclische Verbindung Imipramin (11) wird häufig zur Chemotherapie psychischer Störungen angewendet. Das Ansprechen auf dieses Medikament ist individuell stark unterschiedlich, so daß die gleiche Tagesdosis therapeutisch wirksam, unwirksam oder auch toxisch sein kann. Bei der Bestimmung der Konzentrationen von Imipramin und seinem demethylierten Metaboliten Desipramin in Blutproben verschiedener Patienten wurden bei gleicher Tagesdosis ebenfalls starke individuelle Schwankungen gefunden. So untersuchten z. B. *Belvedere* et al.<sup>[86]</sup> mit einer Kopplung von Gaschromatograph und Elektronenstoß(EI)-Massenspektrometer und dem Nachweis ausgewählter Ionensorten die stationäre Plasma-Konzentrationen von Imipramin (11) und Desipramin bei Patienten, die eine konstante Tagesdosis Imipramin erhielten. Als internen Standard verwendeten sie Promazin (13), eine chemisch verwandte Verbindung. Die Eichkurven zeigten im Konzentrationsbereich von 5–200 ng/ml Plasma Linearität zwischen den Mischungszusammensetzungen und den Analysendaten. Aus Abbildung 6 geht das Elutionsverhalten der Verbindungen und der Verlauf der ausgewählten Ionenstrom-Profile hervor.

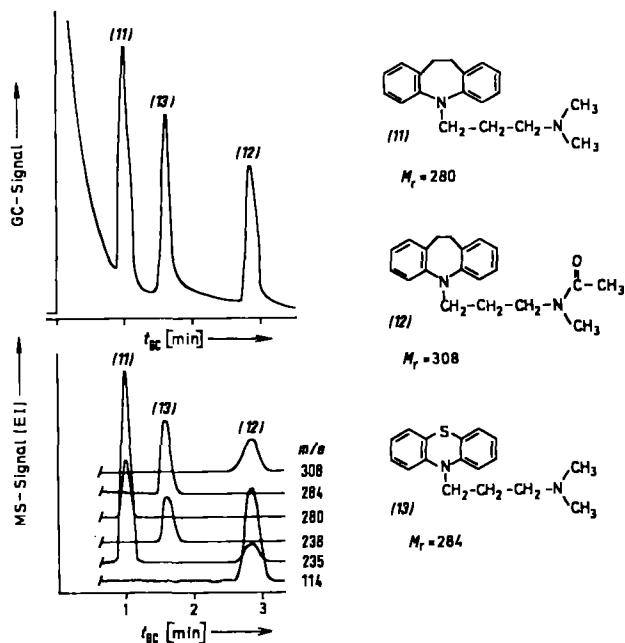


Abb. 6. Gaschromatogramm und ausgewählte Ionenstrom-Profilen eines Extraktes aus Blutplasma nach Verabreichung von Imipramin (11). Für die gaschromatographische Trennung wurde der Metabolit Desipramin in das Acetyl-Derivat (12) umgewandelt. Anhand der EI-Spektren wurden folgende Ionen für die Registrierung ausgewählt (in Klammern die relative Intensität [%]):  $m/e = 280$  (20) und 235 (73) für Imipramin (11);  $m/e = 308$  (30), 235 (10) und 114 (100) für Acetyl-desipramin (12);  $m/e = 284$  (17) und 238 (13) für Promazin (13). Da die Ionenstrom-Profilen mit einem Quadrupol-Massenspektrometer registriert wurden, konnten die größte und kleinste registrierte Masse relativ weit auseinanderliegend gewählt werden (nach [86]).

Die Empfindlichkeit des Verfahrens reichte bis etwa 5 ng/ml Plasma. Bei der Untersuchung eines Patienten konnte gezeigt werden, daß etwa eine Woche nach Einstellung auf eine Tagesdosis von 75 mg Imipramin ein konstanter Blutspiegel von etwa 70 ng/ml Imipramin und etwa 15 ng/ml Desipramin erreicht war.

### 6.2. GC-(CI)MS-Kopplung – Bestimmung des stationären Blutspiegels von Imipramin und Desipramin

In einer etwa gleichzeitigen Studie bestimmten *Claeys* et al.<sup>[87]</sup> ebenfalls die Plasma-Konzentrationen von Imipramin und Desipramin bei konstanter Tagesdosis. Sie synthetisierten für beide Verbindungen jeweils einen vierfach deuterierten internen Standard und benutzten die Chemische Ionisation (CI)<sup>[88, 89]</sup> mit Methan als Reaktionsgas, weil in den so erzeugten Massenspektren die  $[M + H]^+$ -Ionen mit 100 % relativer Intensität auftreten. Die EI-Massenspektren zeigen demgegenüber nur Molekülionen von geringer Intensität. Die angewendete Meßtechnik war das schnelle wiederholte Durchfahren eines bestimmten Bereiches des Massenspektrums („repetitive scan“) und Computer-Rekonstruktion der ausgewählten Ionenstrom-Profilen aus den gespeicherten Daten. (Die so gewonnenen Ionenstrom-Profilen werden manchmal auch „mass chromatogram“ genannt<sup>[90, 91]</sup>.) Für die Untersuchung wurde ein Quadrupol-Massenspektrometer benutzt, welches direkt mit dem Gaschromatographen und einem Computer gekoppelt war. Abbildung 7 zeigt Beispiele für die Ionenstrom-Profilen.

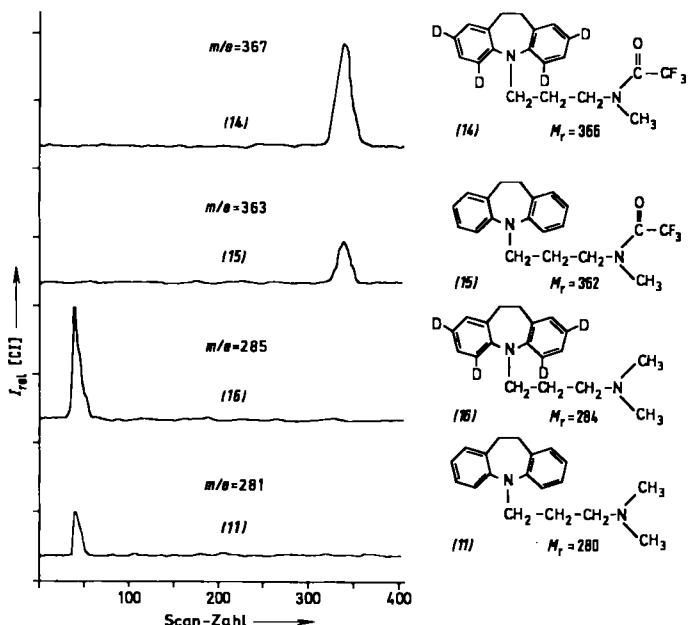


Abb. 7. Rekonstruierte Ionenstrom-Profiles von Imipramin (11), trifluoracetyliertem Desipramin (15) und ihren deuterierten Derivaten (16) bzw. (14) als interne Standards bei der GC-(CI)MS-Untersuchung einer Plasma-Probe. Das CI-Quadrupol-Massenspektrometer ist direkt mit einem Computer gekoppelt, der die Massenspektren in schneller Folge registriert (100 Spektren pro Minute) und aus diesen anschließend die Ionenstrom-Profile der ausgewählten Signale bei *m/e* = 280, 284, 362 und 366 rekonstruiert und ausgibt (nach [87]).

Die Untersuchung von sechs Patienten, die auf eine tägliche Dosis zwischen 250 und 350 mg Imipramin (11) eingestellt waren, ergab für den erreichten konstanten Blutspiegel Werte zwischen 55 und 290 ng/ml. Das Verhältnis zwischen dem Medikament und dem demethylierten Metaboliten Desipramin schwankte bei der Patientengruppe zwischen 0.5 und 1.85. An dieser relativ kleinen Gruppe von Patienten konnte eine Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen und dem therapeutischen Erfolg nicht festgestellt werden. Bei ausführlichen klinischen Untersuchungen in neuerer Zeit ergab sich jedoch ein solcher Zusammenhang<sup>[92, 93]</sup>.

### 6.3. (EI)MS mit Direkteinlaß – Pharmakokinetik von Cyclophosphamid bei Stoßtherapie

Cyclophosphamid (17) ist eines der am häufigsten angewandten Anti-Tumor-Medikamente<sup>[94, 95]</sup>. Einige seiner Metaboliten konnten über den Nachweis ausgewählter Ionensorten identifiziert werden (siehe z. B. [95]). Cyclophosphamid wird in hoher Einzeldosis verabreicht (zwischen 10 und 100 mg/kg Körpergewicht)<sup>[96]</sup>. Aufgrund der dabei auftretenden hohen Konzentrationen in Blut und Urin kann das Medikament ohne die Anwendung eines chromatographischen Trennverfahrens mit dem Massenspektrometer quantitativ bestimmt werden. Jarman et al.<sup>[97]</sup> untersuchten die Pharmakokinetik von Cyclophosphamid (17) im Blut, indem sie den Proben das vierfach deuterierte Derivat (18) als internen Standard zusetzen, die Plasmaproben mit Dichlormethan extrahierten und den eingedampften Extrakt über das Direkteinlaß-System in das Elektronenstoß(EI)-Massenspektrometer einführten. Abbildung 8 zeigt ein Ergebnis dieser Arbeit.

Die Autoren fanden eine Genauigkeit der Methode von 1 % bei Konzentrationen größer als 10 µg/ml und Abweichungen von 10 % bei 1 µg/ml. Bei noch kleineren Konzentrationen

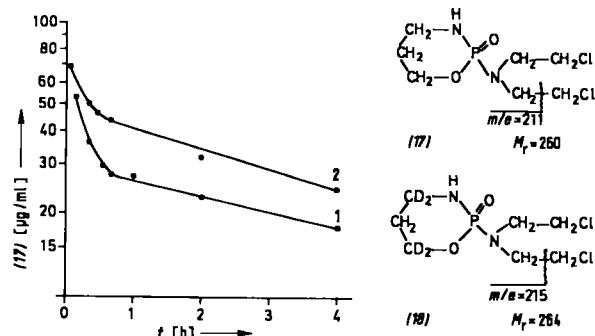


Abb. 8. Pharmakokinetik des Anti-Tumor-Medikamentes Cyclophosphamid (17) nach Gabe einer Einzeldosis (Patient 1: 12.5 mg/kg; Patient 2: 27.8 mg/kg). Die Konzentrationsskala ist logarithmisch unterteilt; aus der Steigung des linearen Teils der Kurve läßt sich die Halbwertszeit des Medikaments berechnen. Für die quantitative Bestimmung wurde bei konstantem Totalionenstrom wiederholt ein kleiner Massenbereich durchfahren, der die Fragmentionen der Masse 211 und 215 von Probensubstanz (17) bzw. Standard (18) enthielt (nach [97]).

stören Signale anderer Verbindungen, so daß eine Reinigung des Extraktes erforderlich wäre. Diese Arbeit zeigt, daß bei relativ hohen Konzentrationen eines Medikamentes die Spezifität des Massenspektrometers zusammen mit der Methode der Verdünnung mit einem stabilisopen-markierten Standard allein (ohne chromatographische Vortrennung) zur sicheren quantitativen Bestimmung ausreicht.

### 6.4. GC-(EI)MS-Kopplung – Pharmakokinetik einer Einzeldosis bei konstanter Tagesdosis

Bei länger dauernder Anwendung von Medikamenten werden diese häufig in einer Speicherform – etwa im Gewebe (z. B. an Protein) gebunden – im Organismus angesammelt und halten so auch nach Absetzen des Medikamentes noch über eine mehr oder weniger lange Zeit einen bestimmten Blutspiegel aufrecht. Sullivan et al.<sup>[98]</sup> konnten die unterschiedliche Verfügbarkeit von Puls- und Dauerdosierung eines Medikamentes mit quantitativen massenspektrometrischen Messungen nachweisen. Dazu gaben sie Hunden eine tägliche Dosis von etwa 60 mg des Schmerzmittels Propoxyphen und ersetzen

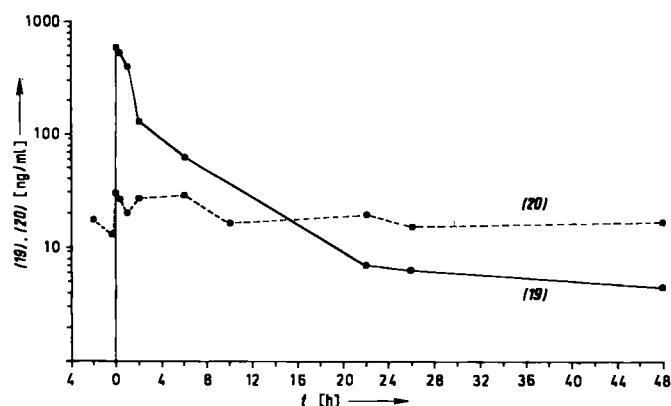


Abb. 9. Pharmakokinetik einer einmaligen Dosis [D<sub>1</sub>]-Propoxyphen (19) (5.5 mg/kg) am Tage 20 (Zeitpunkt 0) bei Hunden, die eine ständige Tagesdosis von [D<sub>0</sub>]-Propoxyphen (20) (ebenfalls 5.5 mg/kg) erhielten. Nach einem steilen Anstieg der Konzentration des deuterierten Medikaments (19) sinkt dessen Konzentration wesentlich rascher ab als die des [D<sub>0</sub>]-Medikaments (20). Dies deutet darauf hin, daß ein relativ großes Depot von gewegebundenem [D<sub>0</sub>]-Propoxyphen (20) existiert, von dem aus eine fast konstante Konzentration der [D<sub>0</sub>] Komponente im Blut aufrechterhalten wird (nach [98]).

ten am 20. Tag diese Dosis durch eine gleiche Menge [ $D_3$ ]-Propoxyphen. In Plasma-Proben wurde anschließend der Konzentrationsverlauf beider Komponenten gegen die Zeit verfolgt. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit einer GC-(EI)MS-Kopplung, dem Nachweis ausgewählter Ionenarten und der siebenfach deuterierten Verbindung als internem Standard. Die Eichkurven zeigten Linearität und eine große Genauigkeit der Bestimmung (0,5–2 % Standardabweichung). Aus Abbildung 9 gehen die Unterschiede im Konzentrationsverlauf bei Puls- und Dauerdosierung hervor. Die Untersuchung zeigt, daß es mit der Markierung durch stabile Isotope möglich ist, zu verschiedenen Zeitpunkten gegebene Dosen eines Medikaments zu unterscheiden und auch deren spezifische Pharmakokinetik aufzuklären.

## 6.5. Kurzer Überblick über weitere Bestimmungen von Arzneimitteln

Die meisten quantitativen Bestimmungen von Arzneimitteln wurden mit GC-(EI)MS-Kopplungen ausgeführt. Seltener ist die Benutzung der Dünnschicht-Chromatographie als Reinigungstechnik in Zusammenhang mit der Massenspektrometrie<sup>[99]</sup>. Ebenso wie die (EI)MS wird auch die (CI)MS vereinzelt mit dem Direkteinlaß-System angewendet<sup>[82, 100–102]</sup>. Von weiteren quantitativ bestimmten Medikamenten oder Drogen seien hier nur die Namen in alphabetischer Reihenfolge genannt: Acetanilid<sup>[103, 274]</sup>, Amobarbital<sup>[276]</sup>, Amphetamine<sup>[105–107, 275]</sup>, Amylobarbiton<sup>[104]</sup>, Bromisoval-Metaboliten<sup>[108]</sup>, Bupivacain<sup>[277]</sup>, Cannabis-Verbindungen<sup>[109–111]</sup>, Capsaicin<sup>[112]</sup>, Diphenylhydantoin<sup>[278]</sup>, Ephedrin<sup>[114]</sup>, Ethanol<sup>[113]</sup>, Guanethidin<sup>[115]</sup>, Ketamin<sup>[279]</sup>, Lidocain<sup>[102, 116]</sup>, Methadon<sup>[119]</sup>, Methaqualon<sup>[117, 118]</sup>, Methylphenidat<sup>[120]</sup>, Morphin<sup>[121–123]</sup>, Nortriptylin<sup>[124]</sup>, Octopamin<sup>[280]</sup>, Pentazocin<sup>[125]</sup>, Phencyclidin<sup>[126, 281]</sup>, Phenformin<sup>[127]</sup>, Phenylbutazon<sup>[282]</sup>, Pinazepam<sup>[128]</sup>, Pirbuterol<sup>[129]</sup>, Propanthelin<sup>[283]</sup>, Propoxyphen<sup>[130, 131]</sup>, Salbutamol<sup>[132]</sup>, Terbutalin<sup>[133]</sup>, Trazodon<sup>[134]</sup>, Verapamil<sup>[284]</sup> und Vincamin<sup>[285]</sup>. Das Ziel solcher Untersuchungen ist z.B. die Messung therapeutisch wirksamer Konzentrationen, die Kenntnis der Pharmakokinetik des Medikaments sowie seiner aktiven Metaboliten, die Messung der Ausscheidungsgeschwindigkeit und die Bestimmung des Mengenverhältnisses von Medikament und Metaboliten.

Über die Markierung von Medikamenten mit stabilen Isotopen ist es auch möglich, Isotopeneffekte bei der in-vivo-Metabolisierung zu beobachten (siehe z.B. <sup>[135–137]</sup>). Zu ihrer Erkennung wird nach Verabreichung z.B. einer 1:1-Mischung von nicht-markiertem und markiertem Medikament die Isotopenverteilung in den Metaboliten oder dem Medikament selbst verfolgt. Besonders große Effekte treten auf, wenn es mehrere etwa gleichberechtigte Abbaupfade gibt und bei einem davon durch die Isotopenmarkierung die Geschwindigkeitskonstante verändert wird. Die bisher beobachteten Isotopeneffekte bei der in-vivo-Metabolisierung betreffen stets den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium, wobei aufgrund von primären Isotopeneffekten der enzymatische Abbau der markierten Verbindung verlangsamt war.

Die vorgestellten Kombinationen von chromatographischen und massenspektrometrischen Meßmethoden ergeben in vielen Fällen einen differenzierteren und zuverlässigeren Einblick in den Verlauf und die Kinetik des Arzneimittel-metabolismus als es mit anderen Methoden möglich war.

## 7. Anwendungsbeispiele: Quantitative Bestimmung endogener Verbindungen

Die eben beschriebenen Vorzüge treffen ebenso auf die Bestimmung endogener, also körpereigener Verbindungen zu, da die gleiche Meßmethodik angewendet wird, soweit es sich um die direkte quantitative Bestimmung organischer Verbindungen handelt. Da viele wichtige Verbindungen in Körperflüssigkeiten und Geweben nur in sehr kleinen Konzentrationen vorliegen und bei der Probennahme am Patienten die verfügbare Probenmenge begrenzt ist, hat die Verwendung isotopenmarkierter Schlepper hier besondere Bedeutung.

### 7.1. GC-(EI)MS-Kopplung – Bestimmung einer endogenen Verbindung in Urin, Plasma, Hirnflüssigkeit, Hirn- und Lebergewebe

Mit nur geringfügigen Variationen bei der Extraktion und Aufarbeitung der Proben konnten Sjöquist et al.<sup>[138]</sup> mit einem GC-MS-Bestimmungsverfahren die Konzentration von 4-Hydroxy-3-methoxyphenylglykol (HMPG), dem wichtigsten Metaboliten von Noradrenalin, in Proben menschlicher und tierischer Herkunft messen. Die Verwendung der dreifach deuterierten Verbindung als interner Standard ergab relativ genaue Werte (siehe Abb. 10 und Tabelle 1).

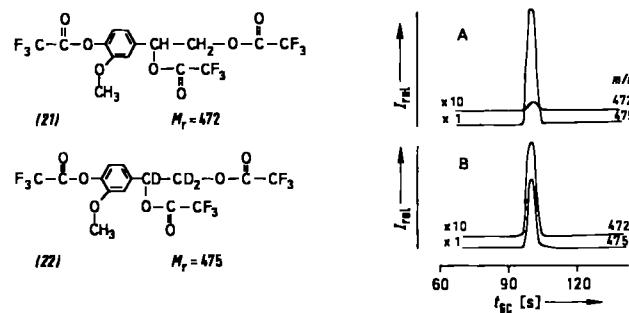


Abb. 10. Beispiel für die quantitative Bestimmung von 4-Hydroxy-3-methoxyphenylglykol (HMPG) mit [ $D_3$ ]-HMPG als internem Standard; die Verbindungen wurden als Tris(trifluoracetyl)(TFA)-Derivate (21) bzw. (22) analysiert. A) Ionenstrom-Profil von  $m/e = 472$  und 475 des internen Standards (22) zur Überprüfung von dessen Beitrag auf der Masse der nicht-deuterierten Verbindung (hier 0,8 %). B) Ionenstrom-Profil von  $m/e = 472$  und 475 bei der Messung eines Extraktes aus Hirngewebe der Ratte [nach [138]].

Tabelle 1. Konzentration von 4-Hydroxy-3-methoxyphenylglykol (HMPG) in Körperflüssigkeiten und Geweben (nach [138]).

Probe	HMPG [nmol/ml] oder [nmol/g]	Anzahl der Best.	Rel. Standard- abweichung [%]
<i>Mensch</i>			
Plasma	0,056 ± 0,003	18	5,4
Urin	7,4 ± 0,21	20	2,8
Hirnflüssigkeit	0,073 ± 0,006	16	8,2
<i>Ratte</i>			
Urin	24 ± 0,86	6	3,6
Gehirn	0,26 ± 0,016	10	6,2
Leber	0,099 ± 0,013	6	13

Nach Tabelle 1 unterscheiden sich die HMPG-Konzentrationen in den einzelnen Proben erheblich. Diese Werte gelten für die Gesamtkonzentration an HMPG, also die Summe von frei und konjugiert vorliegender Verbindung; vor der Aufarbeitung wurden die Proben enzymatisch mit Sulfatase hydrolysiert. Durch Subtraktion der Konzentration, die ohne

Hydrolyse gefunden wird, läßt sich der Anteil der konjugiert vorliegenden Verbindung ermitteln. Beim Menschen beträgt er in Urin und Plasma etwa 94 bzw. 90 %, in Hirnflüssigkeit hingegen 25 %.

## 7.2. Quantitative Hochauflösungs-Massenspektrometrie – Bestimmung von Steroiden mit dem Direkteinlaß-System und externem Standard

Das Gewebe menschlicher Eierstöcke enthält im Vergleich zu anderem Gewebe relativ hohe Konzentrationen an Steroidhormonen. Snedden und Parker<sup>[139]</sup> führten gefriergetrocknete Gewebeschnitte von Eierstöcken über das Direkteinlaß-System in ein EI-Massenspektrometer ein und benutzten zur Verdampfung der flüchtigen Bestandteile der Probe ein reproduzierbares Heizprogramm bis etwa 220°C. Sie erhielten Signale für Östron, Östradiol und Progesteron und stellten fest, daß bei einer massenspektrometrischen Auflösung von 10000 keine Signale anderer Verbindungen stören. Über den Nachweis ausgewählter Ionensorten registrierten sie während eines Verdampfungsvorganges die Ionenstrom-Profilen von je einem Ion der drei gesuchten Steroide und einem Ion der Eichsubstanz Perfluorbutylamin zur Kontrolle der exakten Massenlage. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Flächen der Ionenstrom-Profilen mit den entsprechenden Flächen separat erstellter Eichmessungen, also über einen externen Standard. Die nachgewiesenen Mengen der Steroide lagen zwischen 10 und 50 ppm bezogen auf das Gewicht des getrockneten Gewebes; die Standardabweichung betrug etwa 20 %, was zum Teil auf die externe Eichung zurückzuführen ist und zum Teil darauf, daß auf eine Homogenisierung der Gewebeproben verzichtet wurde. Diese Untersuchung sowie eine frühere der gleichen Autoren<sup>[140]</sup> zeigt, daß es in bestimmten Fällen möglich ist, anstelle einer Trennung die Erhöhung der massenspektrometrischen Auflösung zur spezifischen und auch quantitativen Bestimmung zu verwenden. Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde in einigen Fällen auch in einer GC-MS-Kopplung für quantitative Messungen benutzt<sup>[141, 142]</sup>.

## 7.3. Funkenionisations-Massenspektrometrie – Bestimmung von Metallen

Die Bestimmung anorganischer Bestandteile, wie z. B. Metallen, in biologischem Material ist eine wichtige analytische Aufgabe. Die Funkenionisations-Massenspektrometrie ist für den Nachweis von Metallen eine außerordentlich vielseitige und auch empfindliche Methode. Da als Detektor überwiegend eine Photoplatte verwendet wird, gestaltet sich der quantitative

Tabelle 2. Metallgehalt der Asche von Säugetierblut, mit der Funkenionisations-Massenspektrometrie quantitativ bestimmt. 20 weitere Elemente sind hier nicht aufgeführt (nach [148]).

Element	Konz. [µg/ml] Naßgewicht
Na	1930
Mg	59
Al	0.32
K	2250
Ca	44
Cr	0.07
Mn	0.35
Fe	1050

Nachweis aufwendiger als bei elektrischer Registrierung, ist aber auch für den Routine-Betrieb geeignet<sup>[143, 144]</sup>. Es sind Messungen mit internem<sup>[145, 146]</sup> und mit externem<sup>[147]</sup> Standard durchgeführt worden. Ball et al.<sup>[148]</sup> bestimmten mit der Funkenionisations-Massenspektrometrie und hoher Auflösung eine Vielzahl von Elementen, meist Metallen, in der Asche von Säugetierblut. Zur quantitativen Bestimmung wurden Eichkurven aufgestellt, die den Schwärzungsgrad der Photoplatte mit der Probenmenge korrelieren. Tabelle 2 zeigt einen Teil der Ergebnisse.

Die Fehlerbreite der Meßwerte wird zu 15 % angegeben; sie beruht zum Teil auf der Eichung mit einem externen Standard und zum Teil auf der Auswertung der Photoplate, die allein bereits Fehler zwischen 2 und 5 % liefert. Kürzlich wurde auch über sehr empfindliche Bestimmungen von Metallen in Form der Porphyrinchelate mit der EI-MS berichtet, wobei mehrfach deuterierte Porphyrinchelate als interne Standards dienten<sup>[149]</sup>.

In der biochemischen Analytik wurde die Isotopenverdünnungstechnik auch zur quantitativen Bestimmung von Calcium<sup>[150]</sup>, Blei<sup>[151]</sup> und Kalium<sup>[152]</sup> verwendet.

## 7.4. Aufstellung von Stoffwechselprofilen

Eine wichtige Frage bei der quantitativen Bestimmung endogener Verbindungen ist die nach dem diagnostischen Wert der gemessenen Konzentrationen. Umfangreiche Untersuchungen, bei denen eine Vielzahl von Stoffwechselprodukten gleichzeitig bestimmt wurden („metabolic profiling“)<sup>[37, 75, 153]</sup>, haben gezeigt, daß die als normal anzusehenden Konzentrationen eine relativ große Schwankungsbreite haben. Diese natürlichen Schwankungen sind durch individuelle Besonderheiten und durch die Variation der Ernährung bedingt.

Abweichungen im Urin-Stoffwechselprofil, die häufig die normale Schwankungsbreite bei weitem übersteigen, werden von einer Reihe angeborener Stoffwechselkrankheiten<sup>[34, 35, 40, 41]</sup> verursacht. Dem Organismus fehlt dabei aufgrund eines genetischen Defektes die Fähigkeit zur Synthese eines Enzyms, so daß eine bestimmte Substanz im Körper nicht mehr normal abgebaut werden kann, was zu einer deutlich erhöhten Ausscheidung dieses Stoffes oder von ungewöhnlichen Abbauprodukten dieser Verbindung führt.

Abbildung 11 verdeutlicht die Stoffwechselstörung bei der gut untersuchten Phenylketonurie (PKU), die durch das Fehlen des Enzyms zur Umwandlung von Phenylalanin (23) in Tyro-

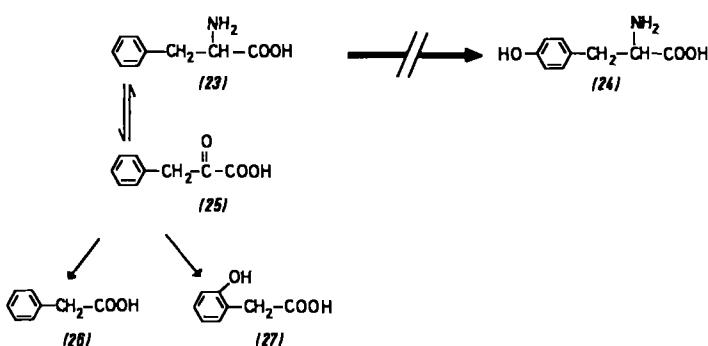


Abb. 11. Schema zur angeborenen Stoffwechselkrankheit Phenylketonurie (PKU). Es fehlt die Fähigkeit zur Synthese des Enzyms, welches normalerweise Phenylalanin (23) zu Tyrosin (24) hydroxyliert (metabolischer Block) [nach [230]].

sin (24) charakterisiert ist. Patienten mit PKU zeigen daher außergewöhnlich hohe Urin-Konzentrationen von Phenylalanin (23), Phenylbrenztraubensäure (25) und weiteren aromatischen Carbonsäuren, die nicht in 4-Stellung hydroxyliert sind. Außerdem sind 4-Hydroxybrenztraubensäure und 4-Hydroxyphenylmilchsäure infolge sekundärer Enzymhemmung in erhöhter Konzentration vorhanden.

Die Aufstellung von Stoffwechselprofilen mit GC-MS-Kopplungen hat besondere Bedeutung für die Früherkennung von angeborenen Stoffwechsel-Defekten an Neugeborenen und Kindern. Das Auftreten ungewöhnlicher Verbindungen in hohen Konzentrationen verursacht häufig, etwa durch kompetitive Hemmung anderer Enzymsysteme<sup>[154]</sup>, schwere Störungen in der körperlichen und geistigen Entwicklung. Diese können bei einer frühzeitigen Erkennung durch eine geeignete Diät, bei der PKU z. B. durch eine phenylalaninarme Diät, so gut wie vollständig vermieden werden.

Die quantitative Massenspektrometrie spielt bei der Erkennung von angeborenen Stoffwechselkrankheiten nur eine untergeordnete Rolle, da die Abweichungen meist so stark sind, daß sie bereits aus dem Gaschromatogramm erkannt und zum Teil auch quantitativ bestimmt werden können. Es wird versucht, computerunterstützte GC-MS-Analysen zur Diagnose von pathologischen Abweichungen im Stoffwechselprofil zu entwickeln, so daß sich auch größere Patientengruppen im Routine-Betrieb untersuchen lassen<sup>[155]</sup>.

## 7.5. Bestimmung weiterer endogener organischer Verbindungen

Die quantitative Bestimmung endogener Verbindungen nimmt einen ebenso breiten Raum ein wie die von Arzneimitteln und deren Metaboliten. Zwei der am besten untersuchten Verbindungsklassen sind Steroide<sup>[156–175]</sup> und Prostaglandine<sup>[176–187]</sup>. Ähnlich intensiv untersucht ist die Verteilung biogener Amine<sup>[154, 188–200]</sup>, metabolisch verwandter Verbindungen<sup>[201–211]</sup> und quartärer Ammonium-Ionen<sup>[287–291]</sup> in Körperflüssigkeiten und Geweben. Zu den weiteren mit der Massenspektrometrie quantitativ bestimmten Substanzen zählen eine Reihe von Aminosäuren<sup>[212–216]</sup>, Gallensäuren<sup>[217–219]</sup>, im Urin ausgeschiedene Carbonsäuren<sup>[37, 75, 220]</sup> und ein Tetrasaccharid<sup>[221]</sup>, das ebenfalls im Urin gefunden wurde.

## 8. Bestimmung stabiler Isotope in Stoffwechselprodukten

### 8.1. Der Atemtest: Präzisionsmessung der Kohlenstoff-13-Häufigkeit

Bei den bisher erwähnten quantitativen Bestimmungen lag das Gewicht auf der Konzentrationsmessung einer organischen Verbindung. Direkt nach der Probennahme wurde dazu meist durch Zugabe eines isotopenmarkierten internen Standards ein bestimmtes Isotopenverhältnis künstlich eingestellt und analysiert. Ebenso ist es möglich, einem Organismus eine Verbindung mit bekanntem Isotopenverhältnis als Substrat anzubieten und dessen Abbau über die Messung des Isotopenverhältnisses in einem Stoffwechselprodukt zu verfolgen. Ein vielversprechendes Anwendungsgebiet dieses Prinzips ist der <sup>13</sup>C-Atemtest, d. h. die Präzisionsbestimmung von <sup>13</sup>C im CO<sub>2</sub> der ausgeatmeten Luft nach Verabreichung von <sup>13</sup>C-angerei-

cherten Verbindungen. Mit <sup>14</sup>C-Markierung und Verfolgung der Radioaktivität in der Atemluft sind eine Reihe von Untersuchungen ausgeführt worden. Die Anwendung stabiler Isotope ist wegen der fehlenden Strahlenbelastung auch hier vorzuziehen, vor allem, weil häufig mit beiden Verfahren aussagekräftige Daten erhalten werden. Zu diesem Schluß kamen z. B. Shreeve et al.<sup>[222]</sup> bei einem Test der Lebermikrosomenfunktion mit Galaktose, die sowohl <sup>13</sup>C- als auch <sup>14</sup>C-markiert verabreicht wurde. Eine verminderte Ausscheidung von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> bzw. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> weist auf eine Störung der Mikrosomenfunktion hin.

Da beim Atemtest eine ausreichende Probenmenge zur Verfügung steht, können bei der massenspektrometrischen Analyse intensive und über längere Meßzeiten konstante Ionenströme erzeugt werden. Die Registrierung erfolgt durch einen Doppeldetektor, der im Falle der <sup>13</sup>C-Analyse im CO<sub>2</sub> die Ionen der Masse 44 und 45 gleichzeitig auffängt. Wird die Isotopenzusammensetzung der Probe relativ zu einer Standardmischung exakt bekannter Zusammensetzung bestimmt, so wird eine Genauigkeit bis zu 1 : 10<sup>5</sup> erreicht. Damit übertrifft die Meßgenauigkeit der Methode die natürliche Schwankungsbreite der <sup>13</sup>C-Häufigkeit der Atemluft<sup>[223, 224]</sup>, die für den Atemtest der empfindlichkeitsbegrenzende Faktor ist.

Die Möglichkeiten der Methode seien an einem interessanten Anwendungsbeispiel von Lacroix et al.<sup>[225–227]</sup> erläutert, die einen Atemtest nach Verabreichung *natürlich* <sup>13</sup>C-markierter Glucose durchführten. Sie fanden im CO<sub>2</sub> der Atemluft bei sechs Personen nach Fasten über Nacht ein Verhältnis <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C = 0.01085. Aus Mais gewonnene Glucose zeigt demgegenüber nach Verbrennung zu CO<sub>2</sub> eine höhere <sup>13</sup>C-Häufigkeit, nämlich 0.01100. Für das Experiment wurde den Versuchspersonen 100 g dieser Glucose in 400 ml Wasser gelöst verabreicht, und anschließend wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben zur Bestimmung der Glucose-Konzentration und Atemluftproben zur Kohlenstoff-Isotopenanalyse genommen. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis dieser Messungen.

Die Genauigkeit der massenspektrometrischen Isotopenanalyse des Kohlendioxids ist so groß, daß die relativ kleine Abweichung des Isotopenverhältnisses der Glucose aus einer natürlichen Quelle noch indirekt über den biologischen Abbau festgestellt werden kann. Hervorgerufen durch einen speziellen Syntheseweg der Pflanzen zeigt aus Mais und aus Zuckerrohr gewonnene Glucose einen höheren <sup>13</sup>C-Gehalt als aus Zuckerrüben hergestellte Glucose, deren <sup>13</sup>C-Häufigkeit nur wenig über der durchschnittlichen <sup>13</sup>C-Häufigkeit der Atemluft liegt.

Ähnliche Diagramme lassen sich auch mit wesentlich kleinen Mengen Glucose, die hoch <sup>13</sup>C-angereichert ist, aufstellen. Bei Personen mit gestörtem Glucose-Stoffwechsel (z. B. Diabetes) zeigt die Glucose-Konzentrationskurve ein höheres Maximum und die <sup>13</sup>C-Kurve einen deutlich flacheren Verlauf. Solche Experimente, bei denen sich Enzymaktivitäten mit <sup>13</sup>C-Markierung ohne jede Strahlenbelastung indirekt bestimmen lassen, haben besondere Bedeutung für die Untersuchung von Kindern und Schwangeren.

Eine <sup>13</sup>C-Analyse von CO<sub>2</sub> über den Nachweis ausgewählter Ionensorten benutzten Sano et al.<sup>[228]</sup> zur Bestimmung <sup>13</sup>C-markierter Verbindungen in Urinproben. Dazu koppelten sie einen Gaschromatographen über einen Pyrolysatoren mit einem Massenspektrometer, so daß die organischen Proben nach vollständiger Verbrennung massenspektrometrisch analysiert wurden. Ausgegeben wurde direkt das Verhältnis <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C

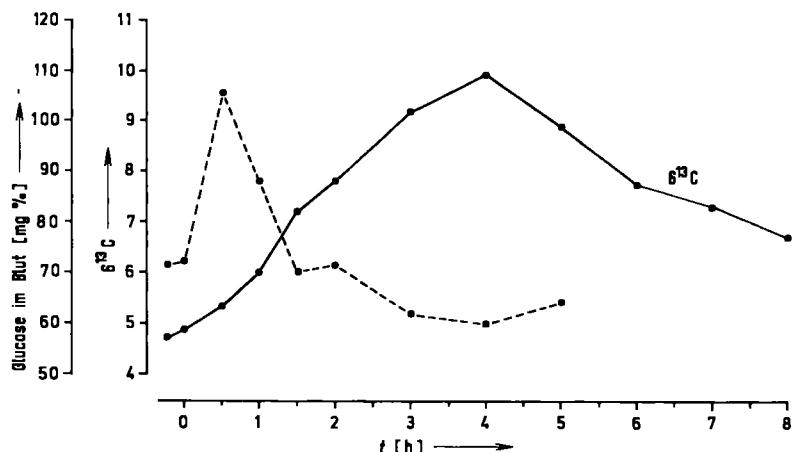


Abb. 12. Zeitlicher Verlauf des Blutzspiegels von Glucose (---) und des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses  $\delta^{13}\text{C}$  (—) in der ausgeatmeten Luft nach Gabe von 100 g Mais-Glucose (Mittelwerte von sechs Personen mit normalem Glucose-Stoffwechsel). Die  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit ist ausgedrückt relativ zu einem Standard mit dem Verhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.010806$ , wobei

$$\delta^{13}\text{C} = 10^3 \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1$$

Ausgedrückt in diesen Einheiten zeigte die eingesetzte Mais-Glucose nach Verbrennung zu  $\text{CO}_2$  ein  $\delta^{13}\text{C}$  von  $17.9 \pm 0.3$  (nach [225]).

als Analogsignal, wodurch das Auftreten einer  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindung im GC-Eluat als Peak zu erkennen ist.

## 8.2. Untersuchung von Stoffwechselwegen mit stabilen Isotopen

Eine elegante Anwendung finden stabile Isotope beim in-vivo-Studium der metabolischen Abbau- und Synthesewege<sup>[229]</sup>. Nach Belastung eines Organismus mit spezifisch markierten Substraten kann durch massenspektrometrische Analyse der Stoffwechselprodukte deren Gehalt an markierten Atomen festgestellt werden; oft liefert das Massenspektrum durch die Fragmentierung noch eine Information über die Position der markierten Atome im Molekül.

Curtius et al.<sup>[230]</sup> konnten an Patienten mit PKU (siehe Abb. 11) feststellen, daß nach Belastung mit deuteriertem Phenylalanin im Urin nur Metaboliten wie Phenylbrenztraubensäure (25), Phenylessigsäure (26), 2-Hydroxyphenylessigsäure (27) deuteriert aufraten, aber keine 4-hydroxylierten Produkte Deuterium enthielten. Dies bestätigte das Vorliegen eines metabolischen Blocks zwischen Phenylalanin und Tyrosin. Mit der Isotopenmarkierungs-Technik untersuchten Curtius et al. auch die Abbauwege einer Reihe aromatischer Carbonsäuren durch Einwirkung der Darmflora. Die Verwendung stabiler Isotope des Kohlenstoffs<sup>[231]</sup>, Sauerstoffs<sup>[232]</sup>, Stickstoffs etc. ist bei solchen Studien wegen der wesentlich kleineren Isotopeneffekte bei in-vivo-Umsetzungen und wegen des sehr stabilen Einbaus dieser Atome der Deuterium-Markierung vorzuziehen.

## 9. GC-MS als Kontrollverfahren für quantitative Bestimmungen

Von ihrer Empfindlichkeit und ihrem Anwendungsbereich her konkurriert die GC-MS-Kopplung bei quantitativen Bestimmungen mit einer Reihe anderer Methoden: der Gaschromatographie, vorzugsweise mit einem Elektroneneinfang-De-

tektor, Radio-Immuno-Methoden<sup>[233]</sup>, fluorometrischen und photometrischen Verfahren. Björkhem et al.<sup>[234]</sup> verglichen die Bestimmung der Östriol-Konzentration im Urin mit drei Methoden. Die Östriol-Konzentration im Urin schwangerer Frauen wird bei Risikoschwangerschaften routinemäßig verfolgt, weil sie wichtige Hinweise auf mögliche Komplikationen gibt. Die Autoren wenden die GC-MS-Kopplung als Kontrollverfahren für zwei einfache klinisch-chemische Verfahren an. Als interner Standard diente zweifach deuteriertes Östriol, das für die GC-Trennung in das Trimethylsilyl-Derivat (29) überführt wurde.

Nach Aufstellung einer Standardkurve konnten quantitative Bestimmungen im Konzentrationsbereich 2–50 µg/ml Urin mit einer relativen Standardabweichung von 6 % durchgeführt werden. In der klinischen Routine-Analyse wird die Östriol-Konzentration meist gaschromatographisch oder photometrisch bestimmt. Für einen Vergleich wurden Proben mit GC-MS, mit GC allein und photometrisch analysiert. Abbildung 13 zeigt die Korrelation zwischen den GC-MS- und den GC-Analysendaten.

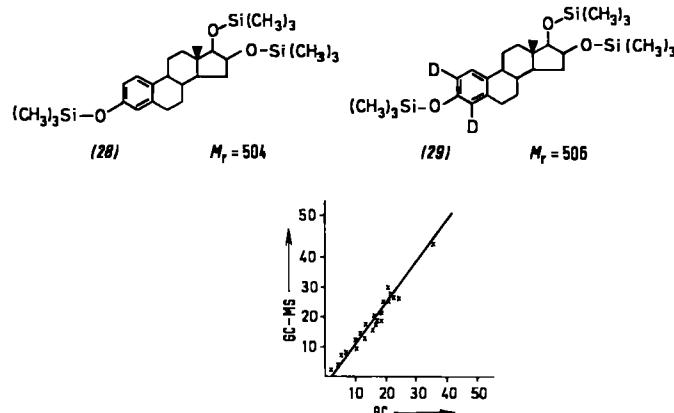


Abb. 13. Vergleich der Analysenwerte bei der quantitativen Bestimmung von Östriol mit einer gaschromatographischen Methode (GC) und einer GC-MS-Kombination (Zahlenwerte jeweils in [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]). Der Korrelationskoeffizient der Daten beträgt 0.97 (nach [234]).

Die Untersuchung zeigte, daß die im Routine-Betrieb für die Bestimmung von Östriol angewendeten Methoden ausreichend genau und spezifisch sind. Aus einer Reihe von vergleichenden quantitativen Untersuchungen<sup>[235–243]</sup> mit den oben genannten Methoden kann geschlossen werden, daß die GC-MS-Kopplung aufgrund ihrer hohen Spezifität in vielen Fällen zur Kontrolle einfacherer Routine-Versfahren angewendet werden kann. Ebenso ist sie bei der Erprobung neuer quantitativer Verfahren oft ein zuverlässiges Prüfverfahren.

## 10. Quantitative Messungen mit neuen Ionisierungstechniken

### 10.1. Atmosphärendruck-Ionisation (API)

Die Atmosphärendruck-Ionisation<sup>[244–247]</sup> ist eine Variante der Chemischen Ionisation, bei der in der Ionenquelle Atmosphärendruck herrscht. Die Probensubstanz (gegebenenfalls mit einem Lösungsmittel) wird im geheizten Einlaßsystem bei Normaldruck verdampft und gelangt danach rasch in die Nähe einer sehr kleinen Öffnung, die zu dem unter Hochvakuum stehenden Analysatorteil führt. Auf der Normaldruckseite der Öffnung werden durch eine radioaktive Quelle oder durch eine elektrische Entladung im Gas Primärionen erzeugt, die durch eine Folge von Sekundärreaktionen aus den Probenmolekülen Ionen bilden. Es entstehen sowohl positive als auch negative Ionen, die zusammen mit Neutralteilchen durch das Druckgefälle in den Analysatorteil strömen. Dort werden die Ionen durch Blenden beschleunigt und zu einem Ionenstrahl fokussiert.

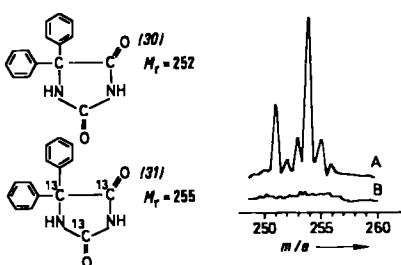


Abb. 14. API-Massenspektrum negativer Ionen eines Plasma-Extraktes (A) und zugehöriger Leerwert (B) des reinen Extraktionsmittels Dichlormethan. Die beiden intensiven Ionen sind die  $[M - 1]^-$ -Ionen des Medikaments Diphenylhydantoin (30) ( $m/e = 251$ ) und des  $^{13}\text{C}$ -markierten internen Standards (31) ( $m/e = 254$ ). Das Signal des internen Standards entspricht einer absoluten Substanzmenge von 480 pg. Die Konzentrationen von Probe und Standard betrugen 10.4 bzw. 24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Plasma. Der Nachweis erfolgte mit dem Quadrupol-Massenspektrometer durch wiederholtes Durchfahren des Bereichs  $m/e = 245$  bis 260. Die Daten wurden von einem Computer registriert und nach Ende der Analyse ausgegeben (nach [28]).

Da negative Ionen nach dem Prinzip der Chemischen Ionisation in relativ hohen Ausbeuten erzeugt werden können, sei hier ein Beispiel angeführt, bei dem negative Ionen für eine quantitative Bestimmung benutzt wurden. Horning et al.<sup>[28]</sup> bestimmten mit der API-Massenspektrometrie die Konzentration des Medikaments Diphenylhydantoin (30) in menschlichen Plasma-Proben. Die Autoren setzten die dreifach  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindung (31) als internen Standard zu, extrahierte mit Dichlormethan und gaben einen Teil dieses Extraktes ohne Vortrennung in das Einlaßsystem eines API-Massenpektrometers. Abbildung 14 zeigt das erhaltene Massenspektrum.

Im API-Spektrum negativer Ionen treten bei den Diphenylhydantoinen ausschließlich die  $[M - 1]^-$ -Ionen auf. Durch die relativ hohe Plasma-Konzentration konnte hier eine quantitative Bestimmung ohne Vortrennung ausgeführt werden (vgl. Abschnitt 6.3). Diese Methode ist so empfindlich, daß der untersuchte Probenteil dem Gehalt von nur 20 nl Plasma entsprach. Für die Kombination der API mit einer Trennmethode ist die direkte Kopplung mit einem Flüssig-Chromatographen beschrieben worden<sup>[248]</sup>.

### 10.2. Feldionisation (FI)

Das Prinzip der Feldionisation<sup>[249–251]</sup> besteht darin, daß organischen Molekülen in einem sehr hohen elektrischen Feld (einige  $10^7 \text{ V/cm}$ ) ein Elektron entzogen wird. Bei dieser Ionisierungsmethode wird nur relativ wenig Anregungsenergie übertragen, so daß die Feldionisations-Massenspektren im Vergleich zu Elektronenstoß(EI)-Massenspektren eine geringere relative Intensität der Fragmentionen und eine höhere relative Intensität der Molekülionen zeigen<sup>[246, 247]</sup>. Im Vergleich zu EI und Chemischer Ionisation (CI) liefert die Feldionisation deutlich geringere Ionenströme. Beziiglich der Empfindlichkeit der FI-Methode wird dieser Nachteil zum Teil dadurch ausgeglichen, daß die wenigen in den FI-Spektren auftretenden Ionen einen hohen Anteil des Totalionenstroms tragen. Reynolds et al.<sup>[118]</sup> erhöhten die Empfindlichkeit der FI durch zwei Maßnahmen: Sie benutzten zur Ionenerzeugung einen besonderen Emitter, der in unmittelbarer Nähe des Direkteinlaß-Systems lokalisiert ist, und verwendeten einen Vielkanal-Analysator zur Ionenzählung. Die Autoren konnten so mit einem internen Standard das Medikament Methaqualon (32) in Urinproben bis zu einer Konzentration von einigen ng/ml erfassen. Abbildung 15 zeigt ein für die quantitative Bestimmung aufgenommenes FI-Massenspektrum.

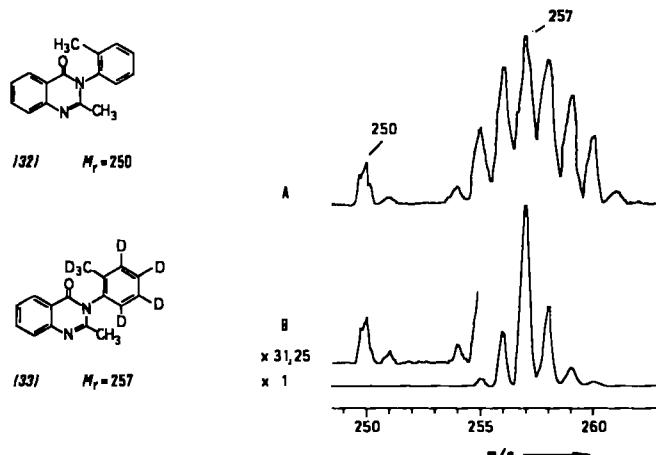


Abb. 15. FI-Massenspektrum der Molekülionengruppe von Methaqualon (32) und  $[\text{D}_6]$ -Methaqualon (33), registriert mit einem Vielkanal-Analysator und Ionenzählung. A) Logarithmische Registrierung; B) lineare Registrierung mit verschiedenen Empfindlichkeiten; die empfindlichere Spur entspricht einem Vollausschlag von 256 Ionen, die unempfindlichere einem Vollausschlag von 8000 Ionen. Die Konzentration der unmarkierten Verbindung (32) ergab sich zu 20 ng/ml Urin. Der Urinextrakt wurde chromatographisch gereinigt und über den Direkteinlaß verdampft (nach [118]).

Die Untersuchung hat gezeigt, daß es mit speziellen Ionennachweis-Methoden auch bei relativ schwachen Ionenströmen möglich ist, empfindliche quantitative Bestimmungen durchzuführen.

### 10.3. Felddesorption (FD)

Bei der Felddesorption werden ähnlich wie bei der FI die Ionen in einem starken elektrischen Feld erzeugt. Die Probe wird allerdings nicht wie bei der FI dem Emitter über die Gasphase zugeführt, sondern liegt zu Beginn der Analyse adsorbiert auf der Emitteroberfläche vor. Die Felddesorption ermöglicht die schonende Ionisierung auch von schwerflüchtigen und hochpolaren Verbindungen<sup>[252, 253]</sup>, insbesondere von Salzen<sup>[254–256]</sup>, weil ein separater Verdampfungsprozeß der Probe entfällt. Die Massenspektren zeigen häufig nur das Molekülion oder ein durch Anlagerung eines Kations an das Molekülion entstandenes Clusterion. Zur Anlagerung eignen sich Protonen, vor allem aber Alkalimetall-Kationen<sup>[257–259]</sup>. Dadurch trägt die Molekülionengruppe bei der FD häufig den gesamten Ionenstrom, was sich für eine quantitative Analyse günstig auswirkt, weil so eine optimale Empfindlichkeit erreicht wird, die Störungen durch Verunreinigungen verringert werden und struktursignifikante Fragmente nicht benötigt werden.

Die bei der Felddesorption oft kurzzeitigen und bei polaren Verbindungen auch fluktuierenden Ionenströme erfordern für eine quantitative Bestimmung eine integrierende Registrierung. Untersuchungen mit photographischer<sup>[260–263]</sup> und elektrischer<sup>[262, 264–266]</sup> Registrierung ergaben, daß es mit stabilisotopen-markierten Standards möglich ist, mit der Felddesorption quantitative Messungen mit guter Genauigkeit durchzuführen. Abbildung 16 zeigt erste Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Cyclophosphamid (17) unter Verwendung des deuterierten Standards (34).

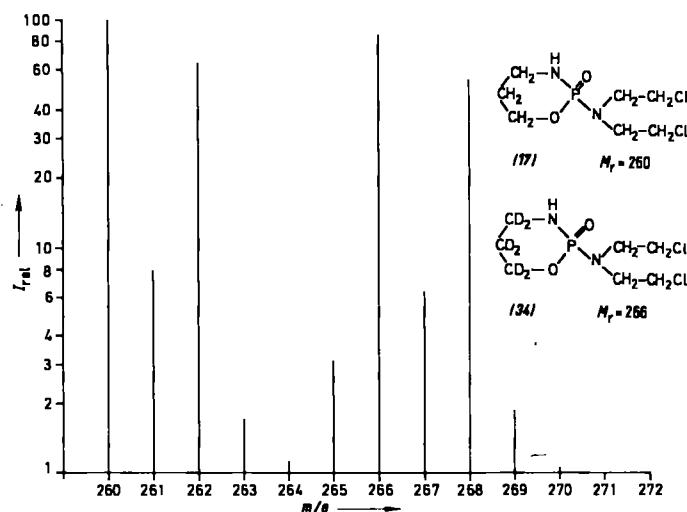


Abb. 16. FD-Massenspektrum der Molekülionengruppe eines Gemisches von  $[D_0]$ -Cyclophosphamid (17) und  $[D_6]$ -Cyclophosphamid (34) im Verhältnis 1:0.85. Zur Registrierung diente eine Photoplatte mit einer Auflösung von etwa 15 000. Die quantitative Auswertung des Schwärzungsgrades der Photoplatte ergibt Werte mit einem Fehler von etwa 5 % (nach [260]).

Durch hochauflösende Massenspektrometrie kann die Spezifität des massenspektrometrischen Nachweises so weit erhöht werden, daß sogar die quantitative Bestimmung in unbehandelten biologischen Proben gelingt (siehe Abschnitt 7.2). Abbildung 17 zeigt die mit Hochauflösungs-FD-MS erzeugten Desorptionsprofile einer Modellmischung aus Homovanillinsäure (35) und ihrem isotopenmarkierten Analogen (36).

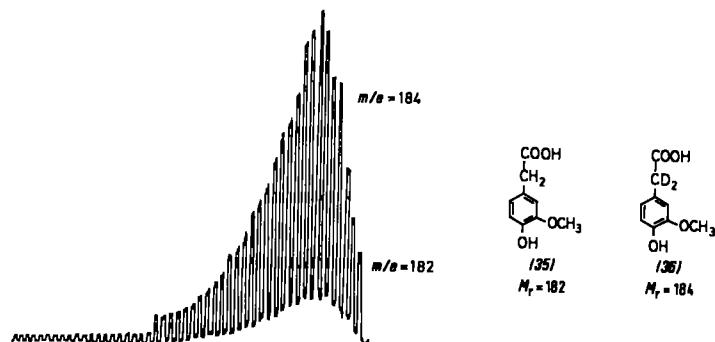


Abb. 17. Quantitative Hochauflösungs-FD-Massenspektrometrie von  $[D_0]$ -Homovanillinsäure (35) mit  $[D_2]$ -Homovanillinsäure (36) als internem Standard. Die Registrierung der Desorptionsprofile erfolgte bei linearer Erhöhung des Emitterheizstromes und Variation der Beschleunigungsspannung. Die Substanzmenge lag bei 400 bzw. 100 ng bei einer massenspektrometrischen Auflösung von 12 000. (35):(36) (theor.) = 1:4.35; (35):(36) (exp.) = 1:4.60 (+5.7 %). (Diese Bestimmung wurde mit einem doppelfokussierenden Massenspektrometer des Typs Varian MAT 731 durchgeführt.)

Die integrierende elektrische Registrierung der FD-Ionenströme für quantitative Messungen erfolgt sehr vorteilhaft mit einem Vielkanalanalysator, der die Signale akkumuliert und so automatisch eine Mittelwertbildung der relativen Intensitäten durchführt. Diese Meßtechnik gestattet die direkte Isotopenanalyse von markierten und nicht markierten organischen Molekülen<sup>[268]</sup>, was in Abbildung 18 an der protonierten Molekülgruppe des Krebsmedikamentes Methotrexat demonstriert ist. Die so erreichte Meßgenauigkeit läßt bei der Analyse

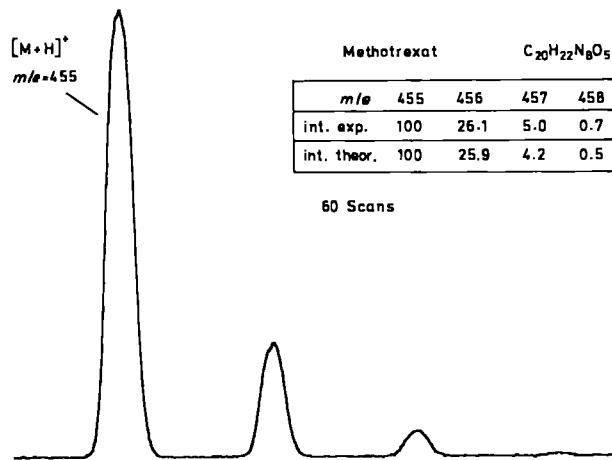


Abb. 18.  $[M + H]^+$ -Ionengruppe von Methotrexat, aufgenommen mit FD-Massenspektrometrie und Akkumulation von 60 cyclischen magnetischen Scans. Die Übereinstimmung der gefundenen relativen Intensitäten mit den aus den natürlichen Isotopenhäufigkeiten berechneten ist sehr gut.

von Naturstoffen mit sehr vielen Kohlenstoffatomen (>50) über die relative Intensität der Isotopensignale eine Abreicherung des Kohlenstoff-13 erkennen<sup>[268]</sup>, ein Effekt, der auch bei der Präzisions-Isotopenanalyse von Kohlenstoff aus Pflanzenmaterial gefunden wird<sup>[23, 225]</sup>.

Für den Nachweis von organischen und anorganischen Kationen, besonders für Ionen der Alkalimetalle<sup>[269, 270]</sup>, zeigt die FD-Massenspektrometrie eine außerordentlich große Empfindlichkeit. Dadurch gelingt der Nachweis dieser Ionen im ppb-Bereich auch in komplexen Gemischen ohne Vorbehandlung<sup>[271]</sup>. Der Nachweis des Spurenelementes Lithium, das zur Chemotherapie bestimmter Psychosen angewendet wird,

ist ein Beispiel für eine medizinisch relevante Metallanalyse. Abbildung 19 zeigt eine Bestimmung des Normalwertes von Lithium in menschlichem Plasma, die mit der Isotopenverdünnungs-Methode und Akkumulation der FD-Ionenströme mit einem Vielkanalanalysator durchgeführt wurde.

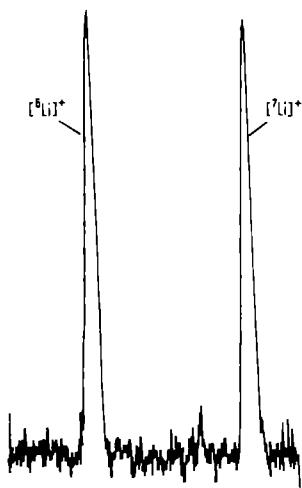


Abb. 19. Original-Registrierstruktur einer  $[\text{Li}]^+$ -Bestimmung mit FD-Massenspektrometrie. 23 cyclische magnetische Scans wurden mit dem Vielkanalanalysator akkumuliert. Es wurde eine bekannte Menge eines hoch isotopenangereicherten Lithiumsalzes als interner Standard verwendet. Standard:  ${}^6\text{Li}$  88.4%;  ${}^7\text{Li}$  11.6%; natürliche Häufigkeit:  ${}^6\text{Li}$  7.5%;  ${}^7\text{Li}$  92.5%. Die Auswertung ergab eine Lithium-Konzentration von 13.4  $\mu\text{g/l}$  im untersuchten menschlichen Plasma. Für die Messung wurden 2  $\mu\text{l}$  Plasma benötigt.

Für die quantitative Analyse organischer Verbindungen sind Probenmengen zwischen einem Nanogramm und einigen Mikrogramm – je nach Reinheit der Probe und Art der nachzuweisenden Verbindung – ausreichend. Die Empfindlichkeit für eine Reihe von organischen und anorganischen Kationen ist grob drei Größenordnungen höher. Diese bisherigen Ergebnisse lassen erkennen, daß die FD-Massenspektrometrie auch für die Lösung quantitativer Probleme aus dem Bereich von Biochemie und Medizin eine leistungsfähige Methode ist<sup>[267,272]</sup>.

## 11. Wertung und Ausblick

Mit Hilfe der Massenspektrometrie gelingt der spezifische, empfindliche und quantitative Nachweis von niedermolekularen, biochemisch wichtigen Verbindungen in biologischen Proben. Den Hauptanstoß für die Ausweitung quantitativer Analysen mit dem Massenspektrometer in den letzten Jahren bildete das größere Angebot an stabilisotopen-markierten Verbindungen, die als interne Standards für quantitative Bestimmungen benötigt werden. Die unbedenklichen stabilen Isotope werden bei vielen in-vivo-Untersuchungen am Menschen allmählich die radioaktiven Isotope ersetzen können, weil empfindliche massenspektrometrische Nachweismethoden für stabile Isotope zur Verfügung stehen. Einer breiten Anwendung stehen die relativ hohen Kosten bei der Anschaffung und beim Betrieb eines Massenspektrometers entgegen. Hinzu kommen heute im allgemeinen die Kosten für ein Datensystem, die in der gleichen Größenordnung wie die für das Spektrometer liegen. Gerechtfertigt wird dieser Aufwand durch die Vielseitigkeit des Gesamtsystems, die es möglich macht, analytische Probleme in Biochemie und Medizin zu lösen, die auf

andere Weise nur schwer oder auch nicht bearbeitet werden könnten. Aus diesen Gründen ist für die Zukunft eine rasche Weiterentwicklung und erfolgreiche Anwendung der quantitativen Massenspektrometrie in den genannten Gebieten zu erwarten.

*Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten. Weiterhin möchten wir uns bei Priv.-Doz. Dr. A. Niederwieser, Prof. Dr. H.-Ch. Curtius, Universitäts-Kinderklinik, Kinderspital Zürich, sowie bei Dr. L. Siekmann, Institut für Klinische Biochemie, Universität Bonn, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und wertvolle Hinweise bedanken.*

Eingegangen am 18. April 1977 [A 209]

- [1] M. F. Groat, K. L. Rinehart, Jr. in G. W. A. Milne: *Mass Spectrometry, Techniques and Applications*. Wiley-Interscience, New York 1972.
- [2] R. M. Caprioli in G. R. Waller: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience, New York 1972.
- [3] A. E. Gordon, A. Frigerio, J. Chromatogr. 73, 401 (1972).
- [4] A. Frigerio: *Proceedings of the International Symposium on Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Isle of Elba, Tamburini Publishers, Milano 1972.
- [5] E. Costa, B. Holmstedt: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Vol. 7. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Neurobiology*. Raven Press, New York 1973.
- [6] W. H. McFadden: *Techniques of Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Applications in Organic Analysis*. Wiley-Interscience, New York 1973.
- [7] G. Spiteller in J. F. Gross, R. Kaufmann, E. Wetterer: *Modern Techniques in the Physiological Sciences. Applications of Mass Spectrometry in the Physiological Sciences*. Academic Press, London 1973.
- [8] J. R. Majer, A. A. Boulton, Methods Biochemical Anal. 21, 467 (1973).
- [9] W. VandenHeuvel, Biomed. Mass Spectrom. 1, 207 (1974).
- [10] C. C. Sweeley, N. D. Young, J. F. Holland, S. C. Gates, J. Chromatogr. 99, 507 (1974).
- [11] W. J. Dreyer, A. Kuppermann, H. G. Boettger, C. E. Giffin, D. D. Norris, S. L. Grotz, L. P. Theard, Clin. Chem. 20, 998 (1974).
- [12] R. L. Foltz, Biomed. Mass Spectrom. 2, 227 (1975).
- [13] A. Frigerio, N. Castagnoli, J. Chromatogr. 110, 406 (1975).
- [14] A. M. Lawson, G. H. Draffan, Prog. Med. Chem. 12 (1975).
- [15] F. C. Falkner, B. J. Sweetman, J. T. Watson, Appl. Spectrosc. Rev. 10, 51 (1975).
- [16] E. Jellum, L. Eldjarn, Scand. J. Clin. Invest. 35, 143 (1975).
- [17] J. T. Watson: *Introduction to Mass Spectrometry, Biomedical, Environmental, and Forensic Applications*. Raven Press, New York 1976.
- [18] A. Frigerio, N. Castagnoli: *Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Raven Press, New York 1974.
- [19] A. Frigerio, N. Castagnoli: *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Vol. I. Spectrum Publications, New York 1976.
- [20] A. Frigerio: *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Vol. II. Spectrum Publications, New York, im Druck.
- [21] A. Frigerio, E. L. Ghisalberti: *Mass Spectrometry in Drug Metabolism*. Spectrum Publications, New York, im Druck.
- [22] P. D. Klein, S. V. Peterson: *Proceedings of the First International Conference on Stable Isotopes in Chemistry, Biology, and Medicine*. Mai 1973, Argonne, Ill., National Technical Information Service, U.S. Dept. of Commerce, Springfield, Va., AEC CONF-730525, 1974.
- [23] E. R. Klein, P. D. Klein: *Proceedings of the Second International Symposium on Stable Isotopes*. Oktober 1975, Oak Brook, Ill., National Technical Information Service, U.S. Dept. of Commerce, Springfield, Va., ERDA CONF-751027, 1976.
- [24] A. P. De Leenheer, R. R. Ronucci: *Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences*. Elsevier, Amsterdam 1977.
- [25] D. R. Knapp, T. E. Gaffney, Clin. Pharmacol. Ther. 13, 307 (1972).
- [26] M. G. Horning, J. Nowlin, K. Lertratanangkoon, R. N. Stillwell, W. G. Stillwell, R. M. Hill, Clin. Chem. 19, 845 (1973).
- [27] G. Spiteller, G. Remberg, Naturwissenschaften 61, 491 (1974).
- [28] M. G. Horning, W. G. Stillwell, J. Nowlin, K. Lertratanangkoon, D. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, E. C. Horning, R. M. Hill, J. Chromatogr. 91, 413 (1974).
- [29] P. Christiansen, Chromatographia 8, 463 (1975).
- [30] B. J. Millard in R. W. A. Johnstone: *Mass Spectrometry*. Vol. 3. Specialist Periodical Reports. Chemical Society, London 1975, S. 339.
- [31] M. G. Horning, J. Nowlin, C. M. Butler, K. Lertratanangkoon, K. Sommer, R. M. Hill, Clin. Chem. 21, 1282 (1975).
- [32] L. E. Martin, Chem. Ind. (London) 10, 430 (1976).
- [33] P. D. Klein, J. R. Haumann, W. J. Eisler, Clin. Chem. 17, 735 (1971).
- [34] E. Jellum, O. Stokke, L. Eldjarn, Clin. Chem. 18, 800 (1972).

- [35] F. Hutterer, J. Roboz, L. Sarkozi, A. Ruhig, P. Bacchin, Clin. Chem. 17, 789 (1972).
- [36] E. Jellum, O. Stokke, L. Eldjarn, Anal. Chem. 45, 1099 (1973).
- [37] I. Gau, J. Korth, B. Halpern, J. Chromatogr. 92, 435 (1974).
- [38] L. Eldjarn, E. Jellum, O. Stokke, J. Chromatogr. 91, 353 (1974).
- [39] H. Ch. Curtius, M. Roth: Clinical Biochemistry, Principles and Methods. de Gruyter, Berlin 1974.
- [40] R. A. Chalmers, A. M. Lawson, Chem. Br. 11, 290 (1975).
- [41] L. Eldjarn, E. Jellum, O. Stokke, Clin. Chem. 21, 63 (1975).
- [42] A. M. Lawson, Clin. Chem. 21, 803 (1975).
- [43] A. M. Lawson, Ann. Clin. Biochem. 12, 51 (1975).
- [44] M. G. Horning, J. Nowlin, K. Lertratanangkoon, M. Stafford, Clin. Chem. 21, 935 (1975).
- [45] O. Stokke, Biomed. Mass Spectrom. 3, 97 (1976).
- [46] D. Henneberg, Z. Anal. Chem. 170, 365 (1959); 183, 12 (1961).
- [47] R. Ryhage, Anal. Chem. 36, 759 (1964).
- [48] J. T. Watson, K. Biemann, Anal. Chem. 36, 1135 (1964).
- [49] J. Drozd, J. Chromatogr. 113, 303 (1975).
- [50] L. R. Snyder, J. J. Kirkland: Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience, New York 1974.
- [51] H. Nau, K. Biemann, Anal. Chem. 46, 426 (1974).
- [52] C. F. Eck, R. A. Schwind, Trans. Am. Nucl. Soc. 19, 68 (1974).
- [53] A. O. Nier, T. A. Abbott, J. K. Pickard, W. T. Leland, T. I. Taylor, C. M. Stevens, D. L. Dukey, G. Goertzel, Anal. Chem. 20, 188 (1948).
- [54] C. C. Sweeley, W. H. Elliott, I. Fries, R. Ryhage, Anal. Chem. 38, 1549 (1966).
- [55] C.-G. Hammar, R. Hessling, Anal. Chem. 43, 298 (1971).
- [56] P. D. Klein, J. R. Haumann, W. J. Eisler, Anal. Chem. 44, 490 (1972).
- [57] N. M. Frew, T. L. Isenhour, Anal. Chem. 44, 659 (1972).
- [58] D. J. Jenden, R. W. Silvermann, J. Chromatogr. Sci. 11, 601 (1973).
- [59] J. F. Holland, C. C. Sweeley, R. E. Thrush, R. E. Teets, A. A. Bieber, Anal. Chem. 45, 308 (1973).
- [60] W. F. Holmes, W. H. Holland, B. L. Shore, D. M. Bier, W. R. Sherman, Anal. Chem. 45, 2063 (1973).
- [61] J. T. Watson, D. R. Pelster, B. J. Sweetman, J. C. Frohlich, J. A. Oates, Anal. Chem. 45, 2071 (1973).
- [62] L. D. Gruenke, J. C. Craig, D. M. Bier, Biomed. Mass Spectrom. 1, 418 (1974).
- [63] A. Schoeller, J. M. Hayes, Anal. Chem. 47, 408 (1975).
- [64] N. D. Young, J. F. Holland, J. N. Gerber, C. C. Sweeley, Anal. Chem. 47, 2373 (1975).
- [65] C.-G. Hammar, G. Pettersson, P. T. Carpenter, Biomed. Mass Spectrom. 1, 397 (1974).
- [66] P. H. Dawson: Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications. Elsevier, Amsterdam 1976.
- [67] C.-G. Hammar, B. Holmstedt, Anal. Biochem. 25, 532 (1968).
- [68] J. T. Watson, F. C. Falkner, B. J. Sweetman, Biomed. Mass Spectrom. 1, 156 (1974).
- [69] F. C. Falkner, Biomed. Mass Spectrom. 4, 66 (1977).
- [70] B. Samuelsson, M. Hamberg, C. C. Sweeley, Anal. Biochem. 38, 301 (1970).
- [71] L. Siekmann, H.-O. Hoppen, H. Breuer, Z. Anal. Chem. 252, 294 (1970).
- [72] T. E. Gaffney, C.-G. Hammar, B. Holmstedt, R. E. McMahon, Anal. Chem. 43, 307 (1971).
- [73] M. G. Horning, E. A. Boucher, M. Stafford, E. C. Horning, Clin. Chim. Acta 37, 381 (1972).
- [74] M. G. Horning, P. Gregory, J. Nowlin, M. Stafford, K. Lertratanangkoon, C. Butler, W. G. Stillwell, R. M. Hill, Clin. Chem. 20, 282 (1974).
- [75] J. A. Thomson, S. P. Markey, Anal. Chem. 47, 1313 (1975).
- [76] L. Bertilsson, A. J. Atkinson, J. R. Atthaus, A. Härfast, J. E. Lindgren, B. Holmstedt, Anal. Chem. 44, 1434 (1972).
- [77] J. R. Pappenheimer, S. R. Heisey, E. F. Jordan, Am. J. Physiol. 200, 1 (1961).
- [78] T. Walle, J. Morrison, K. Walle, E. Conradi, J. Chromatogr. 114, 351 (1975).
- [79] F. W. Küster, A. Thiel, K. Fischbeck: Logarithmische Rechentafeln. 100. Aufl. de Gruyter, Berlin 1969.
- [80] L. Baczynskyi, D. J. Duchamp, J. F. Zieserl, Jr., U. Axen, Anal. Chem. 45, 479 (1973).
- [81] B. S. Middleditch, D. M. Desiderio, Anal. Chem. 45, 806 (1973).
- [82] R. J. Weinkam, M. Rowland, P. J. Meffin, Biomed. Mass Spectrom. 4, 42 (1977).
- [83] J. Eyem, G. Söredahl, Adv. Mass Spectrom. 7 (1977).
- [84] R. M. Caprioli, W. F. Fies, M. S. Story, Anal. Chem. 46, 463A (1974).
- [85] M. G. Lee, B. J. Millard, Biomed. Mass Spectrom. 2, 78 (1975).
- [86] G. Belvedere, L. Berti, A. Frigerio, C. Pantarotto, J. Chromatogr. 111, 313 (1975).
- [87] M. Claeyns, G. Muscetolla, S. P. Markey, Biomed. Mass Spectrom. 3, 110 (1976).
- [88] G. W. A. Milne, M. J. Lacey, Crit. Rev. Anal. Chem. 1974, 45.
- [89] W. D. Lehmann, H.-R. Schulzen, Chem. Unserer Zeit 10, 163 (1976).
- [90] R. A. Hites, K. Biemann, Anal. Chem. 42, 855 (1970).
- [91] W. L. Budde, Biomed. Mass Spectrom. 1, 427 (1974).
- [92] V. E. Ziegler, B. Tee Co, J. R. Taylor, P. J. Clayton, J. T. Biggs, Clin. Pharmacol. Ther. 19, 795 (1975).
- [93] J. T. Biggs, W. H. Holland, S. Chang, P. P. Hipps, W. R. Sherman, J. Pharm. Sci. 65, 261 (1976).
- [94] N. Brock in K. Hellmann, T. A. Connors: Chemotherapy. Bd. 7. Plenum, New York 1976.
- [95] N. Brock, H.-J. Hohorst, Z. Krebsforsch. 88, 185 (1977).
- [96] C. Fenselau, M. N. Kan, S. Billerts, M. Colvin, Cancer Res. 35, 1453 (1975).
- [97] M. Jarman, E. D. Gilby, A. B. Foster, P. K. Bondy, Clin. Chim. Acta 58, 61 (1975).
- [98] H. R. Sullivan, P. G. Wood, R. E. McMahon, Biomed. Mass Spectrom. 3, 212 (1976).
- [99] G. J. Down, A. F. Weston, J. Chromatogr. 103, 208 (1975).
- [100] J. B. Knight, S. B. Matin, Anal. Lett. 7, 529 (1974).
- [101] S. B. Matin, J. B. Knight, Biomed. Mass Spectrom. 1, 323 (1974).
- [102] W. A. Garland, W. F. Trager, S. D. Nelson, Biomed. Mass Spectrom. 1, 124 (1974).
- [103] J. D. Baty, P. R. Robinson, J. Wharton, Biomed. Mass Spectrom. 3, 60 (1976).
- [104] G. H. Draffan, R. A. Clare, F. M. Williams, J. Chromatogr. 75, 45 (1973).
- [105] A. K. Cho, B. J. Hodson, B. Lindeke, G. T. Milva, J. Pharm. Sci. 62, 1491 (1973).
- [106] A. K. Cho, B. Lindeke, B. J. Hodson, D. J. Jenden, Anal. Chem. 45, 570 (1973).
- [107] T. J. Danielson, A. A. Boulton, Biomed. Mass Spectrom. 1, 159 (1974).
- [108] A. Niederwieser, B. Steinmann, A. Matasovic, J. Chromatogr. 147, 163 (1978).
- [109] S. Agurell, B. Gustafsson, B. Holmstedt, K. Leander, J.-E. Lindgren, I. Nilsson, F. Sandberg, M. Asberg, J. Pharm. Pharmacol. 25, 554 (1973).
- [110] J. Rosenfeld, B. Bowins, J. Roberts, J. Perkins, A. S. Macpherson, Anal. Chem. 46, 2232 (1974).
- [111] J. Rosenfeld, V. Y. Taguchi, Anal. Chem. 48, 726 (1976).
- [112] K.-R. Lee, T. Suzuki, M. Kobashi, K. Hasagawa, K. Iwai, J. Chromatogr. 123, 119 (1976).
- [113] W. E. Pereira, R. E. Summons, T. C. Rindfleisch, Clin. Chim. Acta 51, 109 (1974).
- [114] K. Kawai, S. Baba, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 23, 289 (1975).
- [115] J. H. Hengstmann, F. C. Falkner, J. T. Watson, J. Oates, Anal. Chem. 46, 34 (1974).
- [116] J. M. Strong, A. J. Atkinson, Jr., Anal. Chem. 44, 2287 (1972).
- [117] R. Bonnichsen, C. Fri, C. Negoiata, R. Ryhage, Clin. Chim. Acta 40, 309 (1972).
- [118] J. H. Reynolds, H. d'A. Heck, M. Anbar, Biomed. Mass Spectrom. 2, 299 (1975).
- [119] H. R. Sullivan, F. J. Marshall, R. E. McMahon, E. Ånggård, L. M. Gunn, J. H. Holmstrand, Biomed. Mass Spectrom. 2, 197 (1975).
- [120] R. M. Milberg, K. L. Rinehart, Jr., R. L. Sprague, E. K. Sleator, Biomed. Mass Spectrom. 2, 2 (1975).
- [121] P. A. Clarke, R. L. Foltz, Clin. Chem. 20, 465 (1974).
- [122] W. O. R. Ebbighausen, J. H. Mowat, H. Stearns, P. Vestergaard, Biomed. Mass Spectrom. 1, 305 (1974).
- [123] P. P. Hipps, M. R. Eveland, E. R. Meyer, W. R. Sherman, T. J. Cicero, J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 642 (1976).
- [124] O. Borga, L. Palmer, A. Linnarson, B. Holmstedt, Anal. Lett. 4, 837 (1974).
- [125] S. Agurell, L. O. Boreus, E. Gordon, J. E. Lindgren, M. Ernebo, U. Lonroth, J. Pharm. Pharmacol. 26, 1 (1974).
- [126] D. C. K. Lin, A. F. Fentiman, Jr., R. L. Foltz, R. D. Forney, Jr., I. Sunshine, Biomed. Mass Spectrom. 2, 206 (1975).
- [127] S. B. Matin, J. H. Karam, P. H. Forsham, J. B. Knight, Biomed. Mass Spectrom. 1, 320 (1974).
- [128] A. Trebbi, G. B. Gervasi, V. Comi, J. Chromatogr. 110, 309 (1975).
- [129] F. C. Falkner, H. M. McIlhenny, Biomed. Mass Spectrom. 3, 207 (1976).
- [130] H. R. Sullivan, J. L. Emmerson, J. F. Marshall, P. G. Wood, R. E. McMahon, Drug Metab. Dispos. 2, 526 (1974).
- [131] J. F. Nash, I. F. Bennett, R. J. Bopp, M. K. Brunson, H. R. Sullivan, J. Pharm. Sci. 64, 429 (1975).
- [132] L. E. Martin, J. Rees, R. J. N. Tanner, Biomed. Mass Spectrom. 3, 184 (1976).
- [133] J. G. Leferink, I. Wagemaker-Engels, W. M. Arendse, R. A. A. Maes, M. van der Straeten, Biomed. Mass Spectrom. 3, 255 (1976).
- [134] G. Belvedere, A. Frigerio, C. Pantarotto, J. Chromatogr. 112, 631 (1975).
- [135] E. Dagne, L. Gruenke, N. Castagnoli, J. Med. Chem. 17, 1330 (1974).
- [136] J. A. Thompson, J. L. Holtzmann, Drug Metab. Dispos. 2, 577 (1974).
- [137] M. M. Abdel-Moneim, J. Med. Chem. 18, 427 (1975).
- [138] B. Sjöquist, B. Lindstrom, E. Ånggård, J. Chromatogr. 105, 309 (1975).
- [139] W. Snedden, R. B. Parker, Biomed. Mass Spectrom. 3, 295 (1976).
- [140] W. Snedden, R. B. Parker, Anal. Chem. 43, 1651 (1971).
- [141] D. S. Millington, D. Jenner, K. Griffiths, J. Steroid Biochem. 5, 302 (1974).
- [142] B. J. Kimble, R. E. Cox, R. V. McPherron, R. W. Olsen, E. Roitman, F. C. Walls, A. L. Burlingame, J. Chromatogr. Sci. 12, 647 (1974).
- [143] R. A. Burdo, J. R. Roth, G. H. Morrison, Anal. Chem. 46, 701 (1974).

- [144] J. A. Holcombe, D. W. Brinkman, R. D. Sacks, *Anal. Chem.* **47**, 441 (1975).
- [145] A. M. Fitchett, R. P. Buck, *Anal. Chem.* **46**, 710 (1974).
- [146] J. F. Jaworski, G. H. Morrison, *Anal. Chem.* **47**, 1173 (1975).
- [147] W. W. Harrison, G. G. Clemena, *Anal. Chem.* **44**, 940 (1972).
- [148] D. F. Ball, M. Barber, P. G. T. Vosser, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 365 (1974).
- [149] B. A. Davis, K. S. Hui, D. A. Durden, A. A. Boulton, *Biomed. Mass Spectrom.* **3**, 71 (1976).
- [150] L. J. Moore, L. A. Machlan, *Anal. Chem.* **44**, 2291 (1972).
- [151] M. B. Rabinowitz, G. M. Wetherill, J. D. Kopple, *Science* **182**, 725 (1973).
- [152] M. Murozumi, C. C. Patterson, T. J. Chow, *Bunseki Kagaku* (Japan Analyst) **22**, 145 (1973).
- [153] T. A. Witten, S. P. Levine, M. T. Killian, P. J. R. Boyle, S. P. Markey, *Clin. Chem.* **19**, 963 (1973).
- [154] H.-Ch. Curtius, M. Wolfsberger, B. Steinmann, U. Reidweik, J. Siegfried, *J. Chromatogr.* **99**, 529 (1974).
- [155] E. Jellum, P. Helland, L. Eldjarn, U. Markwardt, J. Marhöfer, *J. Chromatogr.* **112**, 573 (1975).
- [156] L. Siekmann, B. Spiegelhalder, H. Breuer, *Z. Anal. Chem.* **261**, 377 (1972).
- [157] H. Adlercreutz, D. H. Hunnemann, *J. Steroid Biochem.* **4**, 233 (1973).
- [158] B. F. Maume, P. Bournot, J. C. Lhuquenot, C. Baron, F. Barbier, G. Maume, M. Prost, P. Padieu, *Anal. Chem.* **45**, 1073 (1973).
- [159] L. Siekmann, *J. Steroid Biochem.* **5**, 727 (1974).
- [160] I. Björkheim, R. Blomstrand, O. Lautto, A. Lof, L. Svensson, *Clin. Chim. Acta* **56**, 241 (1974).
- [161] H. Adlercreutz, P. Nylander, D. H. Hunnemann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 332 (1974).
- [162] I. Björkheim, R. Blomstrand, L. Svensson, *Clin. Chim. Acta* **54**, 185 (1974).
- [163] I. Björkheim, H. Danielsson, *Anal. Biochem.* **59**, 508 (1974).
- [164] J. R. Chapman, E. Bailey, *J. Chromatogr.* **89**, 215 (1974).
- [165] M. Prost, B. F. Maume, *J. Steroid Biochem.* **5**, 133 (1974).
- [166] H. Adlercreutz, M. J. Tikkanen, D. H. Hunnemann, *J. Steroid Biochem.* **5**, 211 (1974).
- [167] R. J. Begue, J. Desgres, P. Padieu, J. A. Gustafsson, *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 763 (1974).
- [168] A. Ruokonen, R. Viiko, *J. Steroid Biochem.* **5**, 33 (1974).
- [169] L. Dehennin, A. Reiffsteck, R. Scholler, *J. Steroid Biochem.* **5**, 81 (1974).
- [170] K. Petrac, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **3**, 421 (1974).
- [171] P. Vestergaard, J. F. Sayegh, *J. Steroid Biochem.* **5**, 303 (1974).
- [172] M. Axelson, G. Schumacher, J. Sjövall, *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 535 (1974).
- [173] J. D. Baty, A. P. Wade, *Anal. Biochem.* **57**, 27 (1974).
- [174] H.-Ch. Curtius, J. Völlmin, M. J. Zagalak, M. Zachmann, *J. Steroid Biochem.* **6**, 677 (1975).
- [175] D. S. Millington, M. E. Buoy, G. Brooks, M. E. Harper, K. Griffiths, *Biomed. Mass Spectrom.* **2**, 219 (1975).
- [176] U. Axen, K. Green, D. Horlin, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 519 (1971).
- [177] J. C. Frohlich, B. J. Sweetman, K. Carr, J. Splawinski, J. T. Watson, E. Ånggard, J. A. Oates, *Adv. Biosci.* **9**, 321 (1973).
- [178] U. Axen, L. Baczyński, D. J. Duchamp, K. T. Kirton, J. F. Zieserl, *Adv. Biosci.* **9**, 91 (1973).
- [179] K. Green, *Adv. Biosci.* **9**, 140 (1973).
- [180] B. J. Sweetman, J. C. Frohlich, J. T. Watson, *Prostaglandins* **3**, 75 (1973).
- [181] K. Green, E. Granstrom, B. Samuelsson, *Anal. Biochem.* **54**, 434 (1973).
- [182] R. W. Kelly, *Anal. Chem.* **45**, 2079 (1973).
- [183] K. Green, E. Granstrom, B. Samuelsson, U. Axen, *Anal. Biochem.* **54**, 434 (1974).
- [184] S. Nicosia, G. Galli, *Prostaglandins* **9**, 397 (1975).
- [185] T. H. Cory, P. T. Lascelles, B. J. Millard, W. Snedden, B. W. Wilson, *Biomed. Mass Spectrom.* **3**, 117 (1976).
- [186] W. Seyberth, B. J. Sweetman, J. C. Frohlich, J. A. Oates, *Prostaglandins* **11**, 381 (1976).
- [187] K. Green, M. Hamberg, B. Samuelsson in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. Bd. 1. Raven Press, New York 1976, S. 47–58.
- [188] N. Narashimhachari, H. E. Hunwicz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 1064 (1973).
- [189] D. J. Jenden, M. Roch, R. A. Booth, *Anal. Biochem.* **55**, 438 (1973).
- [190] J. Wilner, H. F. Lefèvre, E. Costa, *J. Neurochem.* **23**, 857 (1974).
- [191] S. H. Koslow, M. Schlumpf, *Nature* **251**, 530 (1974).
- [192] M. Steptoe-Klaucu, H. Dolezalova, R. Fairweather, *Science* **183**, 536 (1974).
- [193] H. Miyazaki, Y. Hashimoto, M. Iwanaga, T. Kubodera, *J. Chromatogr.* **99**, 575 (1974).
- [194] N. Seiler, H. H. Schneider, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 381 (1974).
- [195] S. R. Philips, D. A. Durden, A. A. Boulton, *Can. J. Biochem.* **52**, 447 (1974).
- [196] B. Lindström, B. Sjöquist, E. Ånggard, *J. Labelled Compd.* **10**, 187 (1974).
- [197] D. A. Durden, B. A. Davis, A. A. Boulton, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 83 (1974).
- [198] M.-T. Wang, M. Yoshioka, K. Imai, Z. Tamura, *Clin. Chim. Acta* **63**, 13 (1975).
- [199] M.-T. Wang, M. Yoshioka, K. Imai, Z. Tamura, *Clin. Chim. Acta* **63**, 21 (1975).
- [200] F. Karoum, J. C. Gillin, R. J. Wyatt, E. Costa, *Biomed. Mass Spectrom.* **2**, 183 (1975).
- [201] H.-Ch. Curtius, M. Wolfsberger, U. Reidweik, W. Leimbacher, R. A. Maibach, W. Isler, *J. Chromatogr.* **112**, 523 (1975).
- [202] B. Sjöquist, E. Ånggard, *Anal. Chem.* **44**, 2297 (1972).
- [203] B. Sjöquist, J. Dailey, G. Sedvall, E. Ånggard, *J. Neurochem.* **20**, 729 (1973).
- [204] B. Sjöquist, B. Lindström, E. Ånggard, *Life Sci.* **13**, 1655 (1973).
- [205] C. G. Fri, F. A. Wiesel, G. Sedvall, *Life Sci.* **14**, 2469 (1974).
- [206] N. Narashimhachari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 36 (1974).
- [207] E. Ånggard, B. Sjöquist, B. Fyro, G. Sedvall, *Eur. J. Pharmacol.* **24**, 37 (1974).
- [208] F. A. Wiesel, C.-G. Fri, G. Sedvall, *J. Neural Transm.* **35**, 319 (1974).
- [209] L. Bertilsson, *J. Chromatogr.* **87**, 147 (1973).
- [210] F. Karoum, H. Lefèvre, L. B. Bigelow, E. Costa, *Clin. Chim. Acta* **43**, 127 (1973).
- [211] C. Braestrup, *Anal. Biochem.* **55**, 420 (1973).
- [212] W. E. Pereira, R. E. Summons, W. E. Reynolds, T. C. Rindfleisch, A. M. Duffield, *Clin. Chim. Acta* **49**, 401 (1973).
- [213] R. E. Summons, W. E. Pereira, W. E. Reynolds, T. C. Rindfleisch, A. M. Duffield, *Anal. Chem.* **46**, 82 (1974).
- [214] F. Petty, H. N. Tucker, S. V. Molinary, N. W. Flynn, J. D. Wander, *Clin. Chim. Acta* **66**, 111 (1976).
- [215] L. Bertilsson, E. Costa, *J. Chromatogr.* **118**, 398 (1976).
- [216] F. P. Abramson, M. W. McCaman, R. E. McCaman, *Anal. Biochem.* **51**, 482 (1974).
- [217] J. B. Watkins, D. Ingall, P. Szczepanik, P. D. Klein, R. Lester, *New Engl. J. Med.* **288**, 431 (1973).
- [218] H. Miyazaki, M. Ishibashi, M. Inoue, M. Itoh, T. Kubodera, *J. Chromatogr.* **99**, 553 (1974).
- [219] M. Inoue, M. Itoh, M. Ishibashi, H. Miyazaki, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **22**, 1949 (1974).
- [220] E. Sjöström, K. Pfister, E. Seppala, *Carbohyd. Res.* **38**, 293 (1974).
- [221] G. Lennartson, A. Lundblad, S. Sjöblad, S. Svensson, P. A. Öckerman, *Biomed. Mass Spectrom.* **3**, 51 (1976).
- [222] W. W. Shreeve, J. D. Shoop, D. G. Ott, B. B. McInteer, *Gastroenterology* **71**, 98 (1976).
- [223] G. E. v. Unruh, D. J. Hauber, D. A. Schoeller, J. M. Hayes, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 345 (1974).
- [224] P. D. Klein, D. A. Schoeller, *Z. Anal. Chem.* **279**, 134 (1976).
- [225] M. Lacroix, F. Mosora, M. Pontus, P. Lefebvre, A. Luickx, G. Lopez-Habib, *Science* **181**, 446 (1973).
- [226] P. J. Lefebvre, M. Lacroix, A. Luickx, G. Lopez-Habib, M. Pontus, *Diabetes* **22**, 291 (1973).
- [227] P. J. Lefebvre, F. Mosora, M. Lacroix, A. Luickx, G. Lopez-Habib, J. Duchesne, *Diabetes* **24**, 185 (1975).
- [228] M. Sano, Y. Yotsui, H. Abe, S. Sasaki, *Biomed. Mass Spectrom.* **3**, 1 (1976).
- [229] H.-Ch. Curtius, J. A. Völlmin, K. Baerlocher, *Anal. Chem.* **45**, 1107 (1973).
- [230] H.-Ch. Curtius, J. A. Völlmin, K. Baerlocher, *Clin. Chim. Acta* **37**, 277 (1972).
- [231] N. A. Matwiyoff, D. G. Ott, *Science* **181**, 1125 (1973).
- [232] D. Staschewski, *Chem.-Ztg.* **98**, 77 (1974).
- [233] C. D. Hawker, *Anal. Chem.* **45**, 878A (1973).
- [234] I. Björkhem, R. Blomstrand, L. Svensson, F. Tietz, K. Carlström, *Clin. Chim. Acta* **62**, 385 (1975).
- [235] R. L. Lin, N. Narashimhachari, *Anal. Biochem.* **57**, 46 (1974).
- [236] J. C. Lhuquenot, B. F. Maume, *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 411 (1974).
- [237] L. Dehennin, A. Reiffsteck, R. Scholler, *J. Steroid Biochem.* **5**, 767 (1974).
- [238] W. F. Balistreri, A. E. Cowen, A. F. Hofmann, P. A. Szczepanik, P. D. Klein, *Pediatr. Res.* **9**, 757 (1975).
- [239] H. Greenwood, W. Snedden, R. P. Hayward, J. Landon, *Clin. Chim. Acta* **62**, 213 (1975).
- [240] E. P. J. van der Slooten, H. J. van der Helm, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)* **22**, 1110 (1976).
- [241] I. Björkhem, R. Blomstrand, O. Lautto, *Clin. Chim. Acta* **65**, 343 (1976).
- [242] R. J. Francis, P. B. East, S. J. McLaren, J. Larman, *Biomed. Mass Spectrom.* **3**, 281 (1976).
- [243] H. Breuer, L. Siekmann, *J. Steroid Biochem.* **6**, 685 (1975).
- [244] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, *Anal. Chem.* **45**, 936 (1973).
- [245] M. G. Horning, L. Lertratanangkoon, J. Nowlin, W. G. Stillwell, R. N. Stillwell, T. E. Zion, P. Kellaway, R. M. Hill, *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 630 (1974).
- [246] M. G. Horning, W. G. Stillwell, J. Nowlin, K. Lertratanangkoon, D. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, E. C. Horning, R. M. Hill, *J. Chromatogr.* **91**, 413 (1974).

- [247] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, E. C. Horning, Anal. Chem. 47, 2369 (1975).
- [248] E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. G. Horning, R. N. Stillwell, J. Chromatogr. Sci. 12, 725 (1974).
- [249] H. D. Beckey, Angew. Chem. 81, 662 (1969); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 8, 623 (1969).
- [250] H. D. Beckey: Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry. Pergamon, Oxford 1977.
- [251] H. D. Beckey, H.-R. Schulten in C. N. McEwen, C. Merritt: Practical Spectroscopy Series. Marcel Dekker, New York 1978.
- [252] H. D. Beckey, H.-R. Schulten, Angew. Chem. 87, 425 (1975); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 14, 403 (1975).
- [253] H.-R. Schulten in D. Glick: Methods of Biochemical Analysis. Wiley-Interscience, New York 1977, Bd. 24, S. 313.
- [254] H.-R. Schulten, F. W. Röllgen, Org. Mass Spectrom. 10, 649 (1975).
- [255] H.-R. Schulten, F. W. Röllgen, Angew. Chem. 87, 544 (1975); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 14, 561 (1975).
- [256] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten in A. Frigerio, E. L. Ghisalberti: Mass Spectrometry in Drug Metabolism. Plenum Press, New York 1977, S. 325.
- [257] F. W. Röllgen, H.-R. Schulten, Org. Mass Spectrom. 10, 660 (1975).
- [258] H. J. Veith, Angew. Chem. 88, 762 (1976); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 695 (1976); J.-C. Promé, G. Puzo, Org. Mass Spectrom. 12, 23 (1977).
- [259] F. W. Röllgen, U. Gießmann, H.-R. Schulten, Adv. Mass Spectrom. 7, 1419 (1977).
- [260] H.-R. Schulten, Cancer Treat. Rep. 60, 501 (1976).
- [261] W. D. Lehmann, H. D. Beckey, H.-R. Schulten, Anal. Chem. 48, 1572 (1976).
- [262] H.-R. Schulten, W. D. Lehmann, M. Jarman in A. P. De Leenheer, R. R. Roncucci: Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences. Elsevier, Amsterdam 1977, S. 187.
- [263] S. Pfeifer, H. D. Beckey, H.-R. Schulten, Z. Anal. Chem. 284, 193 (1977).
- [264] W. D. Lehmann, H. D. Beckey, H.-R. Schulten in A. P. De Leenheer, R. R. Roncucci: Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences. Elsevier, Amsterdam 1977, S. 177.
- [265] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, Angew. Chem. 89, 180 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 184 (1977).
- [266] H.-R. Schulten, W. D. Lehmann, Anal. Chim. Acta 87, 103 (1976).
- [267] H.-R. Schulten, Adv. Mass Spectrom. 7, 83 (1977).
- [268] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, H. M. Schiebel, Z. Anal. Chem. 289, 11 (1978).
- [269] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, Anal. Chem. 49, 1744 (1977).
- [270] H.-R. Schulten, R. Ziskoven, W. D. Lehmann, Z. Naturforsch., im Druck.
- [271] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, Angew. Chem. 89, 890 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 852 (1977).
- [272] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, Biomed. Mass Spectrom. 5 (1978), im Druck.
- [273] E. R. Klein, P. D. Klein, Biomed. Mass Spectrom. 5, 91 (1978).
- [274] J. D. Baty, J. Playfer, D. A. Price Evans, J. Lamb, Biomed. Mass Spectrom. 4, 255 (1977).
- [275] S. B. Matin, S. H. Wan, J. B. Knight, Biomed. Mass Spectrom. 4, 118 (1977).
- [276] B. K. Tang, T. Inaba, W. Kalow, Biomed. Mass Spectrom. 4, 73 (1977).
- [277] J. Caldwell, J. R. Moffatt, R. L. Smith, B. A. Lieberman, R. W. Beard, W. Snedden, B. W. Wilson, Biomed. Mass Spectrom. 4, 322 (1977).
- [278] J. D. Baty, P. R. Robinson, Biomed. Mass Spectrom. 4, 36 (1977).
- [279] S. S. Lau, E. F. Domino, Biomed. Mass Spectrom. 4, 317 (1977).
- [280] B. J. Millard, P. A. Tippett, M. W. Couch, C. M. Williams, Biomed. Mass Spectrom. 4, 381 (1977).
- [281] A. E. Wilson, E. F. Domino, Biomed. Mass Spectrom. 5, 133 (1978).
- [282] R. J. Weintraub, M. Rowland, P. Meffin, Biomed. Mass Spectrom. 4, 42 (1977).
- [283] G. C. Ford, S. J. W. Grigson, N. J. Haskins, R. F. Palmer, M. Prout, C. W. Vose, Biomed. Mass Spectrom. 4, 94 (1977).
- [284] B. Spiegelhalder, M. Eichelbaum, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 27, 94 (1977).
- [285] H. O. Hoppen, R. Heuer, G. Seidel, Biomed. Mass Spectrom. 5, 133 (1978).
- [286] B. J. Millard: Quantitative Mass Spectrometry. Heyden, London 1977.
- [287] D. J. Jenden, L. B. Campbell in D. Glick: Methods of Biochemical Analysis. Wiley-Interscience, New York 1971, Bd. 18, S. 183.
- [288] I. Hanin: Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods. Raven Press, New York 1974.
- [289] L. B. Campbell, D. J. Jenden, J. Neurochem. 17, 1697 (1970).
- [290] W. B. Stavinoha, S. T. Weintraub, A. T. Modak, J. Neurochem. 23, 885 (1974).
- [291] S. T. Weintraub, A. T. Modak, W. B. Stavinoha, Brain Res. 105, 179 (1976).

## Optoakustische Spektroskopie in kondensierten Phasen

Von R. B. Somoano<sup>[\*]</sup>

Die optoakustische Spektroskopie ist ein neues zerstörungsfreies analytisches Verfahren, das in einfacher Weise Informationen über die Elektronenanregungsspektren von Pulvern, halbfesten Stoffen, Gelen und Flüssigkeiten liefert. Es läßt sich auch auf Proben anwenden, die mit konventionellen optischen Verfahren nicht untersucht werden können. Eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten auf den Gebieten der anorganischen und organischen Halbleiter, der Katalyse und vor allem der Biologie und der Medizin ist bereits erschlossen. Zu den Vorteilen der optoakustischen Spektroskopie zählt, daß das Signal nahezu unempfindlich gegenüber Lichtstreuung durch die Probe ist und daß Aussagen über strahlungslose Desaktivierungsprozesse gewonnen werden können. Nachteilig ist die Signalsättigung, die in Sonderfällen zu verringerter Intensität einzelner Absorptionsbanden führt.

### 1. Einleitung

Die optoakustische Spektroskopie („photoacoustic spectroscopy“, PAS) ist ein neues analytisches Verfahren, das Informationen über die Elektronenanregungsspektren von Feststoffen, halbfesten Stoffen, Gelen und Flüssigkeiten liefert.

[\*] Dr. R. B. Somoano  
Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology  
Pasadena, California 91103 (USA)

**Neue analytische Methoden (11)**

Der optoakustische Effekt („photoacoustic effect“, PA-Effekt) wurde bereits 1881 von Alexander G. Bell<sup>[1]</sup> entdeckt, doch fehlte damals weiteres Interesse an diesem Phänomen. Erst in letzter Zeit befaßte man sich wieder mit dem PA-Effekt, und es zeigte sich, daß die PAS ein sehr nützliches analytisches Verfahren zur Untersuchung fester und flüssiger Stoffe sein kann. Ein großer Teil der dazu notwendigen grundlegenden Arbeiten wurde von A. Rosencwaig, Bell Laboratories<sup>[2]</sup>, ausgeführt. Es ist beabsichtigt, in diesem Aufsatz eine Beschreibung