

**Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse von Digoxin und  
Digitoxin in menschlichem Serum  
- Referenzmethoden in der Klinischen Chemie -**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Anja Keßler  
aus  
Bonn

Bonn, März 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. L. Siekmann
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. Wamhoff

Tag der Promotion: 18.07.2001

**Für Uli und Rita**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	8
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	16
<b>3</b>	<b>Definitionen</b> .....	17
<b>4</b>	<b>Materialien</b> .....	19
4.1	Chemikalien .....	19
4.1.1	Chemikalien zur Darstellung von [ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Digoxin und [ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Digitoxin .....	19
4.1.2	Chemikalien zum Silikonisieren von Glasgefäßen .....	19
4.1.3	Chemikalien für die Probenvorbereitung von Seren und Kalibratoren zur Bestimmung von Digoxin bzw. Digitoxin im Serum .....	19
4.1.4	Lösungsmittel für die mobile Phase des HPLC-MS-Systems .....	20
4.2	Untersuchungsmaterialien .....	20
4.2.1	Kontrollmaterialien .....	20
4.2.2	Patientenproben .....	20
4.3	Geräte .....	21
4.3.1	Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Gerät .....	21
4.3.2	Hochdruckflüssigchromatographie-Gerät mit Dioden-Array-Detektor .....	25
4.3.3	Volumenmeßgeräte .....	26
4.3.4	Waagen und Gewichtssatz .....	26
4.3.5	Glas- und Kleingeräte .....	26
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	27
5.1	Darstellung von isotopenmarkierten Cardioglycosiden .....	27
5.1.1	Darstellung von deuteriertem Digoxin .....	27
5.1.2	Darstellung von deuteriertem Digitoxin .....	27
5.2	Bestimmung der Reinheit von Cardioglycosiden .....	28
5.2.1	Bestimmung der Reinheit von Digoxin mittels HPLC-DAD .....	28
5.2.2	Bestimmung der Reinheit von Digitoxin mittels HPLC-DAD .....	29
5.3	Silikonisieren von Glasgefäßen .....	29
5.4	Kalibration von Volumendosierungen und Einwaagen - Rückführung auf nationale Normale .....	29
5.5	Vorschrift zur Bestimmung der Digoxinkonzentration im Serum mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsmethode .....	30
5.5.1	Kalibratorlösungen .....	30

5.5.2	Probenvorbereitung.....	32
5.5.3	Kalibratoren.....	33
5.5.4	Quantitative Analyse mittels HLPC-ESI-MS.....	34
5.6	Vorschrift zur Bestimmung der Digitoxinkonzentration im Serum mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsmethode.....	34
5.6.1	Kalibratorlösung.....	34
5.6.2	Probenvorbereitung.....	35
5.6.3	Kalibratoren.....	36
5.6.4	Quantitative Analyse mittels HLPC-ESI-MS.....	36
5.7	Berechnung des Analysenergebnisses.....	37
5.8	Bestimmung der Meßunsicherheit des Analysenergebnisses.....	37
5.9	Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethoden zur Bestimmung von Digoxin und Digitoxin.....	39
5.9.1	Präzision.....	39
5.9.2	Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze.....	41
5.10	Routineverfahren zur Bestimmung von Cardioglycosidkonzentrationen.....	42
5.10.1	Bestimmung der Digoxinkonzentration mit Routineverfahren.....	42
5.10.2	Bestimmung der Digitoxinkonzentration mittels Routineverfahren.....	43
5.11	Statistische Verfahren.....	44
5.11.1	Standardabweichung.....	44
5.11.2	Variationskoeffizient.....	46
5.11.3	Statistisches Prüfverfahren zum Nachweis des Beitrags der Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen.....	46
5.11.4	Statistisches Verfahren zur Beurteilung der Ergebnisse verschiedener Methoden.....	47
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
6.1	Chemische Synthese isotopenmarkierter Cardioglycoside.....	48
6.1.1	Deuteriertes Digoxin.....	48
6.1.2	Deuteriertes Digitoxin.....	50
6.2	Reinheitsbestimmung der Cardioglycoside.....	52
6.2.1	Bestimmung der Reinheit von Digoxin.....	53
6.2.2	Bestimmung der Reinheit von Digitoxin.....	53
6.3	Durchführung und Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode zur quantitativen Bestimmung von Digoxin im Serum....	56

6.3.1	Bestimmung der Digoxinkonzentration im Serum mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode .....	56
6.3.2	Validierung der HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Digoxin .....	59
6.3.2.1	Präzision der Methode .....	59
6.3.2.2	Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze .....	61
6.3.3	Meßunsicherheit der Methode .....	62
6.4	Durchführung und Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode zur quantitativen Bestimmung von Digitoxin im Serum .	64
6.4.1	Bestimmung der Digitoxinkonzentration im Serum mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode .....	64
6.4.2	Validierung der HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Digitoxin .....	67
6.4.2.1	Präzision der Methode .....	67
6.4.2.2	Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze .....	69
6.4.3	Meßunsicherheit der Methode .....	71
6.5	Beurteilung von Routinemethoden zur Bestimmung von Cardioglycosiden .....	73
6.5.1	Enzymimmunologische Methode zur Bestimmung von Digoxin .....	73
6.5.2	Elektro-Chemilumineszenz-Immunologische Methode zur Bestimmung von Digoxin .....	75
6.5.3	Enzymimmunologische Methode zur Bestimmung von Digitoxin .....	77
6.5.4	Turbidimetrische-Immunologische Methode zur Bestimmung von Digitoxin ....	79
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>101</b>
10.1	Berechnung der Luftauftriebskorrektur .....	101
10.2	Berechnung der Kalibrationskurve .....	103
10.3	Berechnung des Analysenergebnisses .....	103
10.4	Analysenergebnisse der Digoxinbestimmungen .....	104
10.5	Analysenergebnisse der Digitoxinbestimmungen .....	108
10.6	Beurteilung von Routinemethoden .....	112

## Abkürzungen

DAD	Dioden-Array-Detektor
EP CRS	European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance
ESI	Elektrospray-Ionisation
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IDMS	Massenspektrometrische Isotopenverdünnung
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IRMM	Institute for Reference Materials and Methods
ISO	International Organisation for Standardization
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung in der Massenspektrometrie
NIST	National Institute for Standards and Technology
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
S	Standardabweichung
VK	relative Standardabweichung
VK <sub>W</sub>	relative Standardabweichung unter Wiederholungsbedingungen
VK <sub>R</sub>	relative Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen
U	erweiterte Meßunsicherheit
$\bar{x}$	Mittelwert

# 1 Einleitung

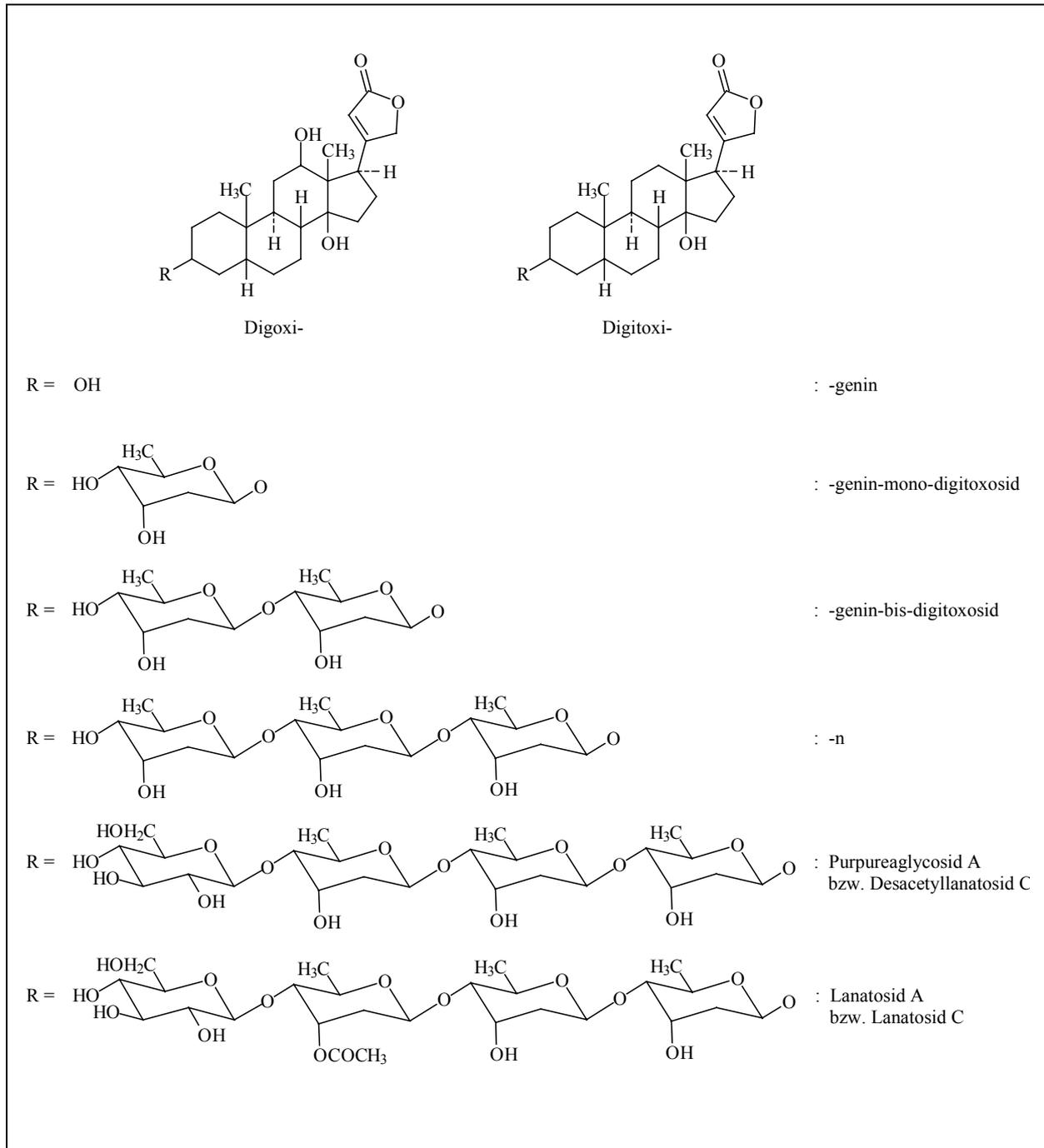
Digitoxin und Digoxin sind sekundäre Cardioglycoside, die aus den Blättern der Digitalis-Arten *Digitalis lanata* (wolliger Fingerhut) und *Digitalis purpurea* (roter Fingerhut) gewonnen werden. In diesen Pflanzen werden sie durch enzymatische Umwandlung aus den jeweiligen primären Cardioglycosiden gebildet; so entsteht Digitoxin aus Lanatosid A (*Digitalis lanata*) bzw. dem Purpureaglycosid A (*Digitalis purpurea*) und Digoxin aus Lanatosid C (*Digitalis lanata*) (Abb. 1).

Die Cardioglycoside bestehen aus einem Steroidteil, auch Aglycon genannt, der am Kohlenstoffatom 3  $\beta$ -glycosidisch mit einem Zuckerrest verknüpft ist. Die Aglycone Digoxigenin und Digitoxigenin gehören zur Steroidgruppe der Cardenolide. Die Ringe A/B sind in *cis*-, B/C in *trans*- und C/D wieder in *cis*-Stellung miteinander verknüpft [1]. Charakteristisch für diese Gruppe ist ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigter  $\gamma$ -Lactonring, der  $\beta$ -ständig an das Kohlenstoffatom 17 des Steroidgerüsts gebunden ist, und eine ebenfalls  $\beta$ -ständige tertiäre Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom 14 [2]. Digoxigenin besitzt darüber hinaus eine weitere Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom 12.

In Digoxin und Digitoxin ist ein Trisaccharid aus Digitoxose (2,6-Di-desoxy-D-ribohexose) mit dem jeweiligen Aglycon  $\beta$ -glycosidisch verknüpft. Die Digitoxose-Einheiten sind miteinander (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glycosidisch verbunden.

Ihre besondere Bedeutung als Pharmaka haben Digoxin und Digitoxin auf Grund ihrer enormen herzwirksamen Eigenschaften gewonnen. Der therapeutische Einsatz der Cardioglycoside erfolgt bei Herzinsuffizienz und supraventrikulären Herzrhythmusstörungen. In geringen Mengen erhöhen die cardioaktiven Steroide die Schlagkraft des Herzens. Die Schlagfolge wird verlangsamt und die Erregungsleitung erschwert. Eine zu große Dosis der Cardioglycoside kann jedoch toxisch wirken und zum Tode führen [3].

Die Wirkung der Cardioglycoside beruht auf der reversiblen Inhibition der membranassoziierten Natriumpumpe ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ). Dadurch ist der Transport von Natrium-Ionen von der intrazellulären zur extrazellulären Membranseite und von Kalium-Ionen in umgekehrter Richtung gehemmt. Die Zunahme von Natrium-Ionen im Zellinneren



**Abb. 1:** Digoxin und Digitoxin sowie strukturverwandte Verbindungen

aktiviert einen  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Carrier, der abhängig vom elektrischen Gradienten Natrium- und Calcium-Ionen in jede Richtung zwischen intra- und extrazellulärem Raum austauschen kann. Er verringert die innere Natrium-Konzentration und Calcium strömt vermehrt in die Zelle. Die erhöhte Konzentration von Calcium im Zellinneren bewirkt eine stärkere elektromechanische Kopplung und damit einen positiven inotropen Effekt (Erhöhung der Kontraktilität).

Für die Wirkung der Cardioglycoside ist ausschließlich der Aglyconteil verantwortlich. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß die freien Aglycone Digoxigenin und Digitoxigenin weniger wirksam sind. Die Verknüpfung der Zuckerreste mit dem Aglycon ist für die Löslichkeit und Verteilung der Substanzen im Körper notwendig. Die wesentlichen Unterschiede in der therapeutischen Wirksamkeit der verschiedenen Cardioglycoside beruhen auf ihren unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften. Die entscheidende Determinante ist der Polaritätsgrad, der von Digitoxin zum Digoxin zunimmt. Je geringer die Polarität der Substanz ist, desto größer ist ihre Lipoidlöslichkeit. Mit steigender Lipoidlöslichkeit nimmt die Resorbierbarkeit und der Grad der Plasmaeiweißbindung zu und die Eliminationsgeschwindigkeit ab [4].

So beträgt die Halbwertszeit von Digoxin 26 bis 52 Stunden und die Zeit bis zu Einstellung eines Gleichgewichts (steady-state) 5 bis 7 Tage. Ca. 23 % des Digoxins sind reversibel an Proteine gebunden [5]. Die Halbwertszeit des lipophileren Digitoxins beträgt 100 bis 200 Stunden. Der steady-state wird erst nach ca. einem Monat erreicht. Mit 90 % ist die reversible Bindung des Digitoxins an Proteine bedeutend höher als die des Digoxins [5].

Die Cardioglycoside werden entweder renal aus dem Körper ausgeschieden (Digoxin: 80 %, Digitoxin: 30 %) [6] oder durch Biotransformation der Stoffe in eine hydrophilere Form überführt. Diese Umwandlungen finden vor allem in der Leber statt. Dabei kann Digitoxin durch Hydroxylierung am Kohlenstoff 12 in Digoxin überführt werden. Durch sukzessive hydrolytische Abspaltung der Digitoxose-Moleküle entstehen die Bis-Digitoxoside, Mono-Digitoxoside und Aglycone von Digoxin und Digitoxin (Abb. 1) [7]. Die Hydrierung des ungesättigten Lactonrings des Aglycon führt zu Dihydrodigoxin. Durch weitere Stoffwechselprozesse (Oxidation, Epimerisierung und Konjugation mit Glucuronsäure oder Sulfaten) werden die Substanzen in ausscheidbare Formen umgewandelt. Einige dieser Metabolite sind bioaktiv und haben z.T. herzwirksame Eigenschaften [8].

Beim Einsatz der Cardioglycoside ist eine genaue Dosierung außerordentlich wichtig, da das therapeutisch wirksame Konzentrationsintervall klein ist. Besonders für Digoxin ist der therapeutische Bereich mit einer Serumkonzentration von 1,0 bis 2,6 nmol/l (0,8 bis 2,0 µg/l) extrem gering. Unterhalb dieser Konzentration (subtherapeutischer Bereich) bleibt die gewünschte Wirkung aus. Oberhalb von 3,8 nmol/l (3 µg/l) liegt die Konzentration bereits im toxischen Bereich [5]. Der therapeutische Bereich für Digitoxin ist um den Faktor 10 größer als der des Digoxins. Für die Therapie wird hier eine Serumkonzentration von 13 – 39 nmol/l

(10 - 30 mg /l) angestrebt. Toxische Konzentrationen liegen oberhalb von 59 nmol/l (45 mg/l) [5]. Liegt eine lebensbedrohliche Cardioglycosid-Intoxikation vor, so werden dem Patienten spezifische Fragmente eines Digitalis-Antitoxins vom Schaf (Fab-Antikörper) verabreicht. Durch Bindung des Cardioglycosids an diese Fragmente wird die Serumkonzentration des „freien“ Cardioglycosids verringert [9].

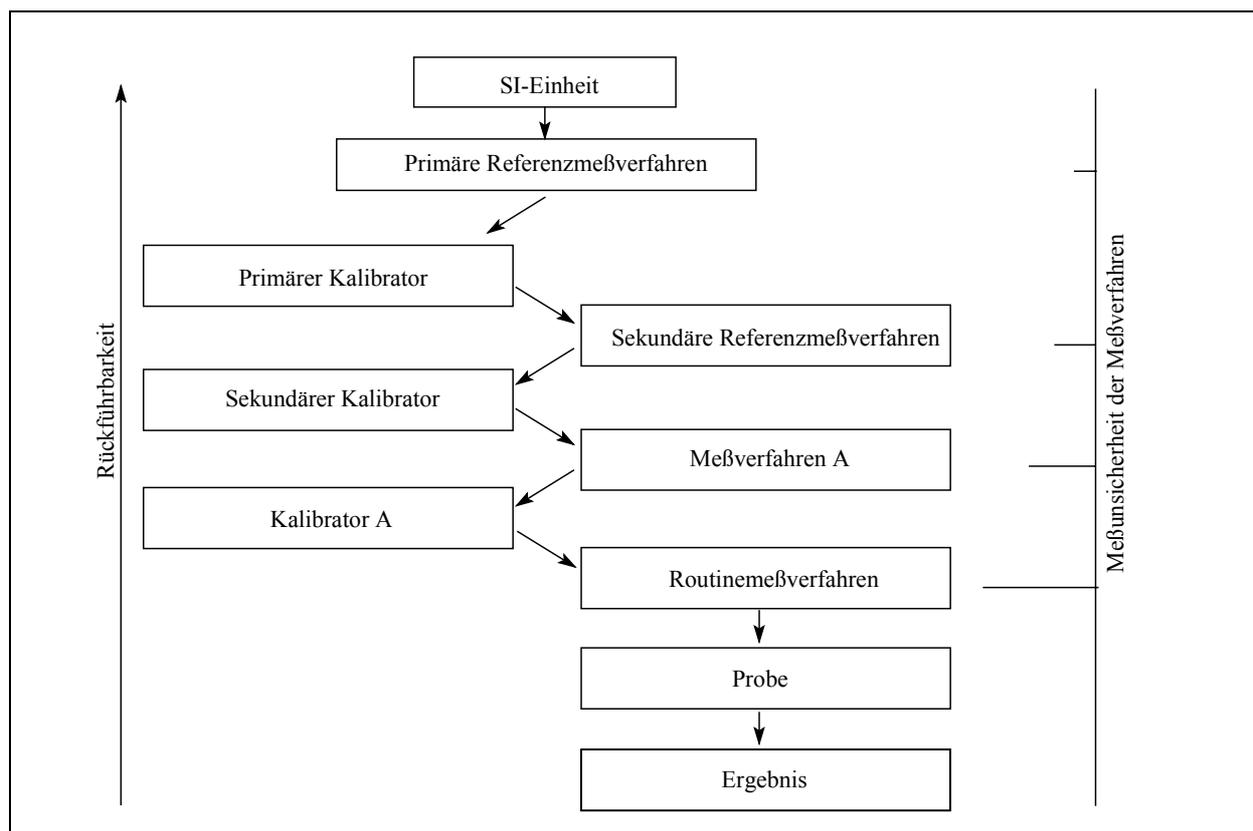
Damit bei der Therapie eine effektive Serumkonzentration erzielt wird und toxische oder subtherapeutische Werte vermieden werden, sind regelmäßige Konzentrationsbestimmungen der Cardioglycoside notwendig [10].

Die Bestimmung von Cardioglycosidkonzentrationen erfolgt heute in klinisch-chemischen Routinelaboratorien überwiegend mit immunchemischen Methoden. Die einzelnen Assays verschiedener Hersteller unterscheiden sich voneinander durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und verschiedener Detektionsmethoden wie Fluoreszenzpolarisation, Turbidimetrie oder Chemilumineszenz [6]. Für alle immunchemischen Meßverfahren entscheidend ist die Spezifität des Antikörpers, mit dem das Antigen – hier Digoxin oder Digitoxin – komplexiert wird. Ist die Spezifität des Antikörpers gering, so treten Kreuzreaktionen auf, d.h. der Antikörper bindet neben dem zu quantifizierenden Cardioglycosid auch strukturähnliche Bestandteile der Probe wie z.B. Metabolite der Biotransformation. Es konnte gezeigt werden, daß einige Digoxinmetabolite (z.B. Digoxigenin) in manchen Digoxin-Immunoassays eine hohe Kreuzreaktivität aufweisen und stärkere Immunaktivität als Digoxin selber zeigen [5]. Somit stellt sich das Problem, daß in Abhängigkeit von dem verwendeten Assay je nach der Spezifität der verwendeten Antikörper für ein und dieselbe Probe unterschiedliche Digoxin- oder Digitoxinkonzentrationen bestimmt werden, obwohl in einer gegebenen Serumprobe nur eine „wahre“ Konzentration vorliegen kann.

Dieses Phänomen ist auch für andere Meßgrößen in der klinisch-chemischen Analytik bekannt: In Abhängigkeit von der verwendeten Methode und vom durchführenden Labor variieren die Analysenergebnisse für ein und dieselbe Probe über einen mehr oder weniger großen Konzentrationsbereich. Qualitativ mangelhafte Laborergebnisse erschweren dem Arzt die Interpretation und können zum Nachteil des Patienten zu falschen Diagnosen führen.

Um die Zuverlässigkeit der Routinemethoden zu verbessern und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen - unabhängig mit welcher Methode und von welchem Labor diese ermittelt wurden - wurde in der Klinischen Chemie das Konzept der Rückführbarkeit von

Messungen eingeführt [11]. Dieses Konzept wurde in der allgemeinen chemischen Metrologie entwickelt. Entsprechend dem *Wörterbuch der Metrologie* [12] und dem *Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen* [13] ist die Rückführbarkeit einer Messung die „Eigenschaft eines Meßergebnisses oder des Wertes eines Normals, durch eine ununterbrochene Kette von Vergleichsmessungen mit angegebenden Meßunsicherheiten auf geeignete Normale, im allgemeinen internationale oder nationale Normale, bezogen zu sein“. Für die Praxis bedeutet dies, daß jede Routinemethode, mit der ein Wert ermittelt wird, zuvor mit einem geeigneten Material kalibriert werden muß. Wurde der Wert für diesen Kalibrator mit einer Methode A ermittelt, deren Meßverfahren auf einer metrologisch höheren Ebene angesiedelt ist, so ist die Routinemethode und damit der ermittelte Wert rückgeführt. Analog kann die Methode A wiederum mit einem Material kalibriert werden, dessen Wert mit einer Methode von ebenfalls höherem metrologischen Rang bestimmt wurde. Hieraus ergibt sich eine Hierarchie von Methoden und Materialien, an deren Spitze die SI-Einheit steht (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Konzeptes der Rückführbarkeit

Je höher eine Methode in dieser Hierarchie angesiedelt ist, desto geringer muß die Meßunsicherheit ihrer Ergebnisse sein. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung des hierarchischen Schemas der Rückführbarkeit ist die Spezifität aller angewandten

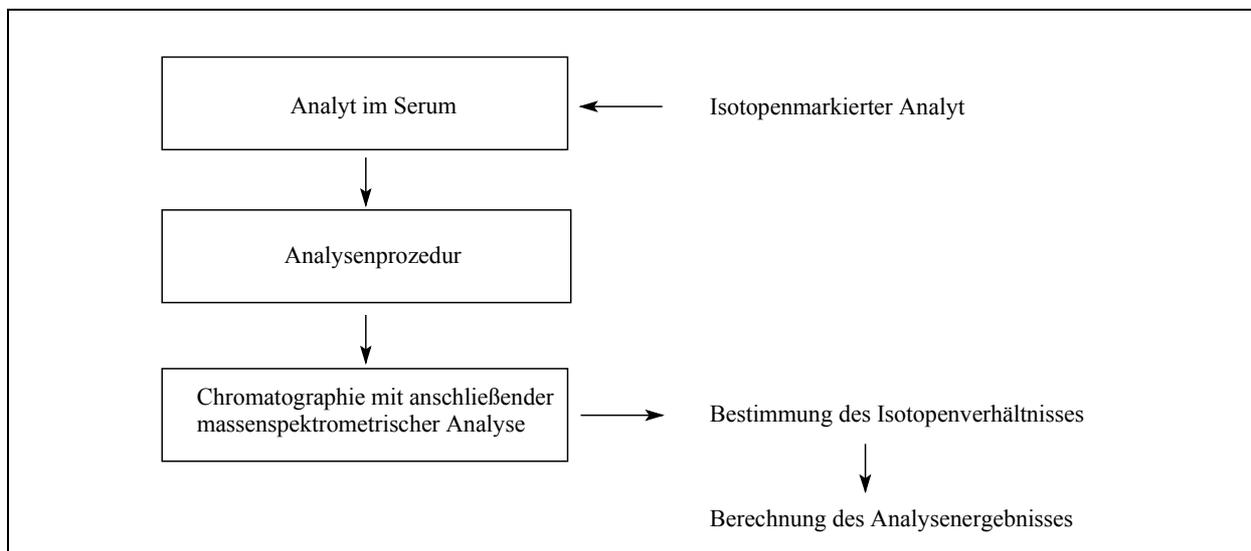
Analysenverfahren. Dies gilt in besonderem Maße für ein Primäres Referenzmeßverfahren, welches die höchst mögliche Ebene in der metrologischen Hierarchie darstellt. Es muß spezifisch für den zu untersuchenden Analyten sein, und alle Reaktionsschritte müssen gut definiert und genauestens beschrieben sein [14]. Die Meßunsicherheit der Methode muß minimal sein.

In Deutschland wird dieses Konzept der Rückführbarkeit von Meßergebnissen seit vielen Jahren im Rahmen der Externen Qualitätskontrolle von klinisch-chemischen Laboratorien angewendet. Im Eichgesetz sowie in der Eichordnung und den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung [15] ist festgelegt, daß alle medizinischen Laboratorien regelmäßig im Rahmen von Ringversuchen Kontrollmaterialien analysieren müssen. Die Zielwerte für die Kontrollmaterialien werden nach Möglichkeit mit Primären Referenzmethoden bestimmt. Für eine Reihe von Meßgrößen stehen bereits Primäre Referenzmethoden zur Verfügung, die in Speziallaboratorien entwickelt und angewendet werden; als Beispiele seien die Methoden zur Bestimmung von Glucose [16], Harnsäure [17], Harnstoff [18], Kreatinin [19], Cholesterin [20] und Gesamt-Glycerin [21] sowie die Hormone Cortisol [22], Progesteron [23], Aldosteron [23], Testosteron [23], Östradiol-17 $\beta$  [24], Östriol [25] und Thyroxin [26] genannt. Die Ergebnisse der Kontrollprobenmessungen in den Routinelaboratorien werden von sogenannten Referenzinstitutionen durch Vergleich mit den Referenzmethodenwerten beurteilt. Sofern ein Labor die Anforderungen erfüllt, erhält es ein Zertifikat, das den kontrollierenden Eichbehörden zur Beurteilung und den Kassenärztlichen Vereinigungen zur Abrechnung vorgelegt werden muß.

Für Substanzen mit eindeutig definierter molekularer Struktur wie z.B. Elektrolyte, organische Substanzen wie Digoxin oder Digitoxin und Metabolite wie Cholesterin, Kreatinin oder Steroidhormone können die Ergebnisse auf die SI-Einheit „Mol“ rückgeführt werden. (Primäre) Referenzmethoden, deren Ergebnisse direkt auf diese SI-Einheit rückführbar sind, müssen ein geeignetes Meßprinzip, das sich durch besonders hohe Spezifität und Richtigkeit auszeichnet, verwenden. Zu den international anerkannten Meßprinzipien dieser Art gehört neben der Coulometrie und Gravimetrie die massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse [27].

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnung wurde erstmals 1970 zur quantitativen Bestimmung von Steroidhormonen beschrieben [28]. Bei der Durchführung einer Methode, die auf diesem

Prinzip basiert, wird einer zu analysierenden, exakt abgemessenen Serumprobe eine definierte Menge der entsprechenden isotonenmarkierten Substanz als interner Standard zugegeben (Abb. 3). Nach Möglichkeit sollte es sich um eine stabile, nicht-radioaktive Markierung (z.B.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) handeln. Nach Äquilibrierung des Analyten mit der isotonenmarkierten Substanz in der Serumprobe folgen mehrere Reinigungsschritten (z.B. Eiweißfällung, Extraktion, Chromatographie, Derivatbildung) besteht. Vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgt eine chromatographische Trennung (z.B. Gaschromatographie, Hochleistungsflüssigchromatographie). Der so vorgereinigte Analyt wird aus der Chromatographiesäule in das Massenspektrometer eluiert. Das MS-Gerät wird so eingestellt, daß während der Analyse kontinuierlich zwei Massen aufgezeichnet werden, von denen die eine charakteristisch für den Analyten und die andere charakteristisch für die entsprechende isotonenmarkierte interne Standardverbindung ist, d.h. je nach Isotonenmarkierung um 2, 3 oder 4 Massen höher liegt. Auf diese Weise werden gleichzeitig zwei Massenchromatogramme aufgezeichnet, aus denen das Isotonenverhältnis (Signalflächenverhältnis) des nicht-markierten Analyten zum markierten Analyten ermittelt wird. Aus den Isotonenverhältnissen, die in Serumproben und in Kalibratoren mit definierten Mengen an isotonenmarkiertem und natürlichem Analyten gemessen werden, berechnet man die Analysenergebnisse (Abb. 3) [29].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der massenspektrometrischen Isotonenverdünnungsanalyse

Für alle bisher entwickelten Referenzmethoden, die das Prinzip der massenspektrometrischen Isotonenverdünnung verwenden, wurde als Analysensystem eine Kombination aus einem Gaschromatographen und einem Massenspektrometer verwendet. Diese Gerätekombination

ist jedoch nur für die Untersuchung thermostabiler Verbindungen geeignet. So werden Substanzen, die z.B. Zuckerreste besitzen, unter den hohen Temperaturbedingungen der Gaschromatographie zerstört. Eine alternative Möglichkeit, solche Substanzen nach einer Chromatographie massenspektrometrisch zu untersuchen, bietet die Kombination der Massenspektrometrie (MS) mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die HPLC kann bei Raumtemperatur stattfinden, so daß die Verbindungen unbeschadet zum Massenspektrometer gelangen. Lange Zeit konnte der direkte Einlaß von Proben in gelöster Form aus dem Eluat einer HPLC-Säule und die notwendige Ionisierung im Massenspektrometer technisch nicht realisiert werden [30]. Dieses Problem wurde dadurch gelöst, daß die Verdampfung und Ionisierung der flüssigen Proben in einer unter Atmosphärendruck arbeitenden Ionenquelle erfolgt, aus der heraus die teilweise desolvatisierten Ionen in den Analysatorteil des Massenspektrometers überführt werden. Bei diesem sogenannten Elektrosprayverfahren wird die in Lösung vorhandene Probe in einem starken elektrostatischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und einer wenige Millimeter davon entfernten Gegenelektrode angelegt wird. Durch eine Öffnung in dieser Gegenelektrode gelangen die gebildeten Ionen in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers. Auf Grund der milden Ionisierungsbedingungen ist die Fragmentierung vieler Substanzen unbedeutend; überwiegend werden protonierte Molekülionen oder Addukte von Molekülionen gebildet. Eine zusätzliche Fragmentierung kann durch Anlegen einer Spannung hinter der Gegenelektrode im Hochvakuumbereich stattfinden. Hierbei werden jedoch lediglich schwache Bindungen gespalten. Die Ionen werden in einem Iontrennsystem (Magnetfeld, Quadrupolfeld) entsprechend ihrem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) voneinander getrennt und mit einem Sekundärelektronenvervielfacher-Detektor nachgewiesen. Die Steuerung des HPLC-MS-Gerätesystems sowie die Aufzeichnung von Massenspektren und Massenchromatogrammen erfolgt computergesteuert.

## **2 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, für die Meßgrößen Digoxin und Digitoxin im menschlichen Serum Referenzmeßverfahren zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen nach dem Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse zu entwickeln. Hierzu war es erforderlich, die zu analysierenden Verbindungen in der Form isotopenmarkierter Substanzen chemisch zu synthetisieren. Die Meßverfahren sollten im Hinblick auf ihre Eignung als Primäre Referenzmethoden überprüft werden, damit sie im Rahmen der Externen Qualitätskontrolle zur Ermittlung von Zielwerten für Kontrollmaterialien eingesetzt werden können.

Durch Vergleichsmessungen an Patienten- und Kontrollproben wurde beispielhaft gezeigt, wie die hier entwickelten Referenzmeßverfahren zur Evaluierung von kommerziellen Routinemeßverfahren zur Bestimmung von Cardioglycosiden eingesetzt werden können.

### 3 Definitionen

**Referenzmeßverfahren:** Sorgfältig geprüfetes Meßverfahren zur Messung einer oder mehrerer Meßgrößen, bei dem alle Bedingungen und Prozeduren exakt beschrieben sind, und das aufgrund seiner Richtigkeit und Präzision zur Überprüfung der Genauigkeit anderer Methoden zur Bestimmung derselben Meßgrößen geeignet ist [31].

**Wahrer Wert:** Wert, der mit der Definition einer betrachteten speziellen Größe übereinstimmt [12]. Er kann mit keinem realen Meßverfahren ganz exakt bestimmt werden, allenfalls mit einer weitgehenden Annäherung [32].

**Referenzmethodenwert:** Wert für eine Meßgröße, der durch ein Referenzmeßverfahren erhalten wird [33]. Er ist die beste verfügbare Schätzung des wahren Wertes [32].

**Genauigkeit:** Ausmaß der Übereinstimmung zwischen dem Meßergebnis und einem wahren Wert der Meßgröße. „Genauigkeit“ ist ein qualitativer Begriff.

**Richtigkeit:** Übereinstimmung zwischen dem Erwartungswert (Mittelwert von Wiederholungsmessungen) und dem wahren Wert. Die Richtigkeit hat keinen numerischen Wert [34].

**Präzision:** Übereinstimmung zwischen Wiederholungsmessungen. Die Präzision hat keinen numerischen Wert [34].

**Meßunsicherheit:** Dem Meßergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die der Meßgröße zugeordnet werden könnte [13].

**Rückführbarkeit:** Eigenschaft eines Meßergebnisses oder des Wertes eines Normals, durch eine ununterbrochene Kette von Vergleichsmessungen mit angegebenden Meßunsicherheiten auf geeignete Normale, im allgemeinen internationale oder nationale Normale, bezogen zu sein [12].

**Leerprobe:** Die Leerprobe ist unter Idealbedingungen eine Probe, welche den nachzuweisenden oder den zu bestimmenden Bestandteil nicht enthält, sonst aber mit der Analysenprobe übereinstimmt [35].

**Nachweisgrenze:** Die Nachweisgrenze ist eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Bestandteiles. Der Bestandteil gilt als nachgewiesen, wenn sich das Signal der Analysenprobe deutlich (signifikant) vom Leerwert unterscheidet [35].

**Erfassungsgrenze:** Die Erfassungsgrenze ist diejenige Konzentration, bei der der Nachweis mit hoher Sicherheit gelingt. Sie liegt oberhalb der Nachweisgrenze [35].

**Bestimmungsgrenze:** Die Bestimmungsgrenze ist diejenige Konzentration, von der ab eine Messung eine vorgegebene Anforderung an die Präzision erfüllt. Sie liegt oberhalb der Erfassungsgrenze [35].

## 4 Materialien

### 4.1 Chemikalien

#### 4.1.1 Chemikalien zur Darstellung von [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Digoxin und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Digitoxin

Deuteriumoxid, Uvasol <sup>®</sup> ,	Merck, Darmstadt,
Digoxin,	Aldrich, Deisenhofen,
Digitoxin,	Fluka, Deisenhofen,
1,4-Dioxan, zur Analyse,	Merck, Darmstadt,
Tetrahydrofuran, zur Analyse,	Merck, Darmstadt,
(getrocknet über Molekularsieb 0,4 nm,	Merck, Darmstadt,)
Triethylamin, zur Synthese,	Merck, Darmstadt.

#### 4.1.2 Chemikalien zum Silikonisieren von Glasgefäßen

Cyclohexan, zur Analyse,	Merck, Darmstadt,
(getrocknet über Aluminiumoxid 90 aktiv, basisch,	
Korngröße 63 – 200 µm,	Merck, Darmstadt,)
Dichlordimethylsilan-Lösung, 2%ig	
in 1,1,1-Trichlorethan,	Merck, Darmstadt,
Dichlormethan, zur Analyse,	Merck, Darmstadt,
Methanol, SupraSolv,	Merck, Darmstadt.

#### 4.1.3 Chemikalien für die Probenvorbereitung von Seren und Kalibratoren zur Bestimmung von Digoxin bzw. Digitoxin im Serum

Ameisensäure, zur Analyse, 98 – 100 %,	Merck, Darmstadt,
Aqua dest.	
tert-Butylmethylether, SupraSolv,	Merck, Darmstadt,
Digoxin, EP CRS,	Promochem, Wesel,
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Digoxin,	Synthese siehe 5.1.1
Digitoxin, EP CRS,	Promochem, Wesel,

[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Digitoxin,	Synthese siehe 5.1.2
n-Heptan, reinst,	Merck, Darmstadt,
LiChroprepDiol, Korngröße 40 – 63 µm,	Merck, Darmstadt,
iso-Propanol, reinst,	Merck, Darmstadt,
Stickstoff 5.0, Reinheit ≥ 99,999 %,	Linde, München.

#### **4.1.4 Lösungsmittel für die mobile Phase des HPLC-MS-Systems**

Ameisensäure, zur Analyse, 98 – 100 %,	Merck, Darmstadt,
Aqua dest.,	
Methanol, SupraSolv,	Merck, Darmstadt.

## **4.2 Untersuchungsmaterialien**

### **4.2.1 Kontrollmaterialien**

Als Kontrollmaterialien wurden Humanserumpools verwendet, die zum Teil mit Digoxin bzw. Digitoxin und anderen Arzneimitteln aufgestockt waren. Die Pools wurden in Form von aliquotierten Einzelabfüllungen in lyophilisierter Form in Braunglasflaschen geliefert, die mit einem Silikongummiseptum verschlossen waren. Es handelte sich um Kontrollseren, die vom Referenzinstitut für Bioanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie für Ringversuche im Rahmen der Externen Qualitätskontrolle eingesetzt wurden. Die lyophilisierten Kontrollseren wurden der Vorschrift entsprechend mit 3 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umschwenken 60 min rekonstituiert.

### **4.2.2. Patientenproben**

Für die Untersuchung von Patientenseren wurden überschüssige, nicht mehr für andere Zwecke benötigte Probenreste verwendet, die dem Klinisch-Chemischen Labor des Instituts für Klinische Biochemie, Universitätskliniken Bonn, und dem Klinisch-Chemischen Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Stadt Nürnberg zur Bestimmung von Digoxin bzw. Digitoxin zugesandt wurden.

Das eingesendete Blut wurde zunächst zentrifugiert (1600 g) und das überstehende Serum anschließend abdekantiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei – 20 °C in Plastikröhrchen aufbewahrt.

## **4.3 Geräte**

### **4.3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Gerät**

Für die quantitative Analyse von Cardioglycosiden im Serum wurde eine Gerätekombination aus einem Hochleistungsflüssigchromatographie-Gerät und einem Massenspektrometer von Agilent Technologies (vormals Hewlett Packard) verwendet. Die Steuerung des Gerätesystems erfolgt über einen Personalcomputer mit Hilfe der Bedienungssoftware „HPLC/MSD ChemStation“, Rev. A.06.01.

Das Hochleistungsflüssigchromatographie-Gerät (HPLC) besteht aus einem binären Pumpensystem und einem Autosampler. In einem vorgeschalteten Degaser wurden die als mobile Phase eingesetzten Lösungsmittel entgast. Aqua dest. und Methanol, die jeweils 0,1 % (vol/vol) Ameisensäure enthielten, wurden als Fließmittel für das Gradienten-HPLC-System eingesetzt. In Ausnahmefällen wurde die Ameisensäure durch Kaliumacetat ersetzt, so daß die Lösungsmittel pro Liter 0,001 mol Kaliumacetat enthielten.

Als Trennsäule wurde eine 2 x 100 mm-Stahlsäule (Knauer, Berlin), gefüllt mit Octadecanyl-Reverse-Phase-Material, Korngröße 5 µm (Macherey & Nagel, Düren bzw. Merck, Darmstadt) verwendet.

Über eine Peek-Kapillare gelangte das Eluat zum Massenspektrometer (MS).

Das Quadrupolmassenspektrometer für den Massenbereich bis  $m/z$  3000 ist mit einem Elektrospray-Ionisierungsinterface (ESI) ausgestattet. Im Interface wird das Eluat zerstäubt und getrocknet. Der dazu benötigte Stickstoff wurde aus komprimierter Luft (Kompressor: Boge, Bielefeld) über einen Membrangenerator gewonnen.

Die Ionisierung der im Eluat gelösten Substanzen erfolgte unter Atmosphärendruck (Trockengas: Stickstoff, 9 l/min, 300 °C; Vernebelungsgas: Stickstoff, 30 psig). Durch ein Spannungsfeld von 4000 V werden die Ionen durch eine Glaskapillare in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers transportiert. Am Ende der Glaskapillare erfolgt durch eine angelegte, variierbare Spannung eine Fragmentierung der Ionen. Nach

Fokussierung des Ionenstrahls findet die Massentrennung im Quadrupolteil statt. Die Fragmente treffen nach Massen getrennt auf den Detektor, der die Signale elektronisch vervielfacht.

Die Kalibration der Massenskala des Gerätes erfolgte mit einem Tuning-Mix des Herstellers.

### **HPLC-ESI-MS-Bedingungen für die Bestimmung von Digoxin**

Für die mobile Phase bei der Chromatographie wurden Mischungen aus Methanol und Aqua dest. eingesetzt. Beide Lösungsmittel waren mit einem Anteil von 0,1 % Ameisensäure versetzt. Die Mischungsanteile von Methanol zu Wasser wurden während der chromatographischen Analyse mit einem integrierten Gradientensystem gesteuert. Das Fließmittelgemisch wurde mit einem Fluß von 0,3 ml/ min durch das System gepumpt. Vor Injektion der Proben und Standards wurde die HPLC-Säule mit einer Methanol : Aqua dest.-Mischung (50 : 50 (vol/vol)) äquilibriert. Nach der Injektion wurde der Anteil des Methanols in den ersten 10 Minuten des Analysenlaufs linear auf 78 % und danach bis zur 11. Minute auf 100% erhöht. Das System wurde dann 2 Minuten mit 100 % Methanol gespült und anschließend wieder mit der Ausgangsmischung Methanol : Aqua dest.-Mischung = 50 : 50 (vol/vol) äquilibriert. Die Gesamtlaufzeit eines Analysenzyklusses betrug 18 min.

Für die Aufzeichnung von Massenspektren des natürlichen und des deuterierten Digoxins wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen vorgegeben. Das injizierte Volumen entsprach einer Substanzmenge von ca. 10 µg.

**Tabelle 1:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von Digoxinmassenspektren

Scanbereich [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Stepsize [m/z]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
200 – 900	2	100	0,40	0,10	3,79

Für die massenspezifische Detektion wurden die Massen für die Ionen der Natriumaddukte des nicht-markierten Digoxins (m/z 803) und des deuterierten Digoxins (m/z 806) aufgezeichnet. Zusätzlich wurden in separaten Messungen die Massen von natürlichen und deuterierten Digoxigenin-bis-digitoxosid-Fragmenten (m/z 651 bzw. 654) detektiert.

Für die exakte Einstellung der Massen dieser Ionen in der Massenskala des Spektrometers wurde vorab ein Gemisch aus nicht-markiertem und isotopenmarkiertem Digoxin unter den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen gemessen.

**Tabelle 2:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von Digoxinmassenspektren in einem Bereich von 10 Masseneinheiten

Scanbereich [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Stepsize [m/z]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
800 – 810	5	225	0,1	0,05	0,67
649 – 659	5	100	0,1	0,05	0,67

Die maximalen Intensitäten der beiden Natriumaddukt-Ionen bzw. der beiden Fragmentionen wurden anschließend im Massenspektrum des Peaks bestimmt. Die so ermittelten Massen lagen unter den beschriebenen Bedingungen für die Natriumaddukte zwischen 803,3 und 803,5 bzw. 806,3 und 806,5. Die Massen der Fragmentionen lagen zwischen 651,3 und 651,5 bzw. 654,3 und 654,5.

Für die Erstellung massenspezifischer Chromatogramme wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Bedingungen für das Massenspektrometer gewählt.

**Tabelle 3:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von massenspezifischen Chromatogrammen des Digoxins

SIM [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Scanzeit/Ion [ms/Ion]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
803,3, 806,3	5	225	0,25	739	1,50
651,3, 654,3	5	100	0,25	739	1,50

### HPLC-ESI-MS-Bedingungen für die Bestimmung von Digitoxin

Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Methanol und Aqua dest. verwendet. Die Zusammensetzung wurde während der Analyse mit einem Gradientenmischer kontinuierlich variiert. Beide Lösungsmittel enthielten jeweils 0,1 % Ameisensäure. Vor der Injektion wurde die HPLC-Säule mit einer Methanol : Aqua dest.-Mischung (60 : 40 (vol/vol)) äquilibriert. Der Methanolanteil wurde nach der Injektion linear bis zur 10. Minute auf 87 % und anschließend bis zur 11. Minute auf 100% erhöht. Das System wurde zwei Minuten mit 100

% Methanol gespült und dann wieder mit der Ausgangsmischung Methanol : Aqua dest.-Mischung = 60 : 40 (vol/vol) äquibriert. Das Fließmittel wurde mit einem Fluß von 0,3 ml/min durch das System gepumpt. Die Gesamtlaufzeit eines Analysenzyklusses betrug 18 min.

Die Fragmentierung der Ionen erfolgte im Hochvakuumbereich des Massenspektrometers. Für die Aufzeichnung von Massenspektren wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Einstellungen des Massenspektrometers verwendet. Das injizierte Volumen entsprach einer Substanzmenge von ca. 10 µg.

**Tabelle 4:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von Digitoxinmassenspektren

Scanbereich [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Stepsize [m/z]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
200 – 900	2	75	0,40	0,10	3,79

Für die massenspezifische Detektion wurden die Massen für die Ionen der Natriumaddukte des nicht-markierten Digitoxins (m/z 787) und des isotope-markierten Digitoxins (m/z 790) aufgezeichnet. Davon unabhängig wurden in weiteren Kontrollmessungen die Massen des Kaliumaddukts des natürlichen und des deuterierten Digitoxins (m/z 803 und 806) detektiert. Um die Ionenausbeute dieses letztgenannten Massenpaares zu steigern, wurde dem HPLC-Fließmittel ausnahmsweise Kaliumacetat anstatt der sonst üblichen Ameisensäure zugesetzt (s.o.).

Zur Bestimmung der exakten Ionenmassen wurde zunächst ein Gemisch aus markierter und nicht-markierter Substanz analysiert und während der Chromatographie unter den in Tabelle 5 genannten Bedingungen gescannt.

**Tabelle 5:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von Digitoxinmassenspektren in einem Bereich von 10 Masseneinheiten

Scanbereich [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Stepsize [m/z]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
785 - 795	3	250	0,1	0,05	0,67
800 - 810	5	225	0,1	0,05	0,67

Die exakten Ionenmassen der beiden Natriumaddukt- bzw. Kaliumaddukt-Ionen wurden anschließend aus den Massenspektren abgelesen. Die so ermittelten Massen lagen für die Natriumaddukte zwischen 787,3 und 787,5 bzw. 790,3 und 790,5 und für die Kaliumaddukte zwischen 803,3 und 803,5 bzw. 806,3 und 806,5.

Zur quantitativen massenspektrometrischen Bestimmung wurden die massenspezifischen Chromatogramme des natürlichen und des deuterierten Digitoxins unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen aufgezeichnet.

**Tabelle 6:** Massenspektrometereinstellung für die Aufzeichnung von massenspezifischen Chromatogrammen des Digitoxins

SIM [m/z]	Gain	Fragmentor [V]	Peakbreite [min]	Scanzeit/Ion [ms/ Ion]	Scanzeit/Zyklus [s/ Zyklus]
787,3, 790,3	2	225	0,25	739	1,50
803,3, 806,3	2	250	0,25	739	1,50

#### 4.3.2 Hochdruckflüssigchromatographie-Gerät mit Dioden-Array-Detektor

Für die Bestimmung der Reinheit der Cardioglycoside wurde ein HPLC-Gerät (Gynkotek, München) verwendet, welches mit zwei Pumpen und einem Hochdruckgradientenmischer ausgestattet war. Die Proben wurden über einen Autosampler injiziert. Als Trennsäule wurde eine 4 x 250 mm-Säule, gefüllt mit LiChrosorb Diol, 5 µm Korngröße (Merck, Darmstadt), verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektor (DAD) (ausgestattet mit einer Deuteriumlampe) bei einer Wellenlänge von 220 nm. Für die Bearbeitung und Auswertung der UV-Spektren wurde die Software „Chromeleon“, Version 4.12 verwendet.

### 4.3.3 Volumenmeßgeräte

Für die Vorbereitung der Proben und Kalibratoren wurden folgende Volumenmeßgeräte verwendet:

Elektronisch gesteuertes Dosiergerät mit	
2,5 ml-Spritze, Microlab M,	Hamilton, Bonaduz, Schweiz,
Druckkolbenpipette, 100 µl, Varipetten 4810,	Eppendorf, Hamburg,
Druckkolbenpipette, 1000 µl, Varipetten 4810,	Eppendorf, Hamburg,
Meßkolben, 100 ml,	Brand, Wertheim/Main,
Meßkolben, 250 ml,	Brand, Wertheim/Main,
Spritze, 50 µl, mit fixiertem Wiederholadapter,	SGE, Melbourne, Australien.

### 4.3.4 Waagen und Gewichtssatz

Für die Kalibration der Volumenmeßgeräte und die Einwaage der Substanzen wurden folgende Waagen und Gewichtssätze verwendet:

Elektronische Mikrowaage MC1, Wägebereich bis 5,1 g,	Sartorius, Göttingen,
Feinwaage AC100, Wägebereich bis 100 g,	Mettler, Gießen,
Feinwaage 1474, Wägebereich bis 5 g,	Sartorius, Göttingen,
Gewichtssatz von 1 mg bis 200 g, Klasse E2, (zertifiziert vom Landesamt für Meß- und Eich- wesen Brandenburg, Potsdam).	Sartorius, Göttingen,

### 4.3.5 Glas- und Kleingeräte

Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R,	Heraeus/ Kendro, Hanau,
Schüttelmaschine, Unimax 2010,	Janke & Kunkel, Staufen,
Metallblock-Thermostat mit Begasungseinheit,	Toulemonde & C <sup>ie</sup> , Paris, Frankreich,
Glassäulen mit Fritten, Eigenentwurf, angefertigt von	Eich, Bonn,
Autosamplerröhrchen, Crimp V-Vial,	Glastechnik Gräfenroda, Gräfenroda.

## **5 Methoden**

### **5.1 Darstellung von isotopenmarkierten Cardioglycosiden**

Für die Synthese von isotopenmarkierten Cardioglycosiden wurden die natürlich vorkommenden Verbindungen als Ausgangsmaterialien eingesetzt. Die Markierung der Substanzen erfolgte durch den Austausch von Wasserstoffatomen gegen Deuteriumatome. Hierfür wurde ein von El Nemr et al. beschriebenes Verfahren zur Deuterierung von Kohlenhydraten an der  $\alpha$ -Position einer Carbonylfunktion [36] modifiziert.

#### **5.1.1 Darstellung von deuteriertem Digoxin**

Zur Herstellung der Reaktionslösung wurden 1,4-Dioxan, Tetrahydrofuran, Triethylamin und Deuteriumoxid im Verhältnis 4 : 4 : 2 : 3 (Volumenanteile) gemischt. Ca. 500  $\mu\text{g}$  Digoxin wurden in 10 ml dieser Mischung gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 20 Tagen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in Aliquote von je 500  $\mu\text{l}$  aufgeteilt und bei 80  $^{\circ}\text{C}$  unter Stickstoff eingedampft. Um einen Wasserstoff-Deuterium-Rücktausch labil gebundener Deuteriumatome, z.B. an Hydroxygruppen, zu ermöglichen, wurde der Rückstand mit 2 ml Aqua dest. aufgenommen und die Lösung wiederum unter Stickstoff bei 80  $^{\circ}\text{C}$  eingedampft.

Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst. Jedes Aliquot enthielt ca. 25  $\mu\text{g}$  des mehrfach, überwiegend dreifach deuterierten Digoxins. Die Lösung wurde bei 4  $^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **5.1.2 Darstellung von deuteriertem Digitoxin**

1,4-Dioxan, Tetrahydrofuran, Triethylamin und Deuteriumoxid wurden im Verhältnis 4 : 4 : 2 : 3 (Volumenanteile) gemischt. Ca. 500  $\mu\text{g}$  Digitoxin wurden in 10 ml dieser Mischung gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 20 Tagen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in Aliquote von je 1 ml geteilt und bei 80  $^{\circ}\text{C}$  unter Stickstoff eingedampft. Zum Austausch labil gebundener Deuteriumatome gegen Wasserstoffatome wurde der

Rückstand mit 2 ml Aqua dest. aufgenommen und die Lösung wiederum unter Stickstoff bei 80 °C eingedampft.

Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol aufgenommen. Jedes Aliquot enthielt ca. 50 µg des mehrfach, überwiegend dreifach deuterierten Digitoxins. Die Lösungen konnten bei 4 °C längere Zeit aufbewahrt werden.

## **5.2 Bestimmung der Reinheit von Cardioglycosiden**

Die als Kalibrationsmaterialien verwendeten Cardioglycoside wurden chromatographisch mit einem HPLC-DAD-Gerät (s. 4.3.2) auf ihre Reinheit untersucht. Die chromatographisch aufgetrennten Substanzen wurden an Hand ihrer UV-Absorption in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 900 nm mit dem Dioden-Array-Detektor nachgewiesen. Die Berechnung der Reinheit erfolgte aus den Signalflächen der Cardioglycosid-Peaks und der Verunreinigungen.

### **5.2.1 Bestimmung der Reinheit von Digoxin mittels HPLC-DAD**

1 mg Digoxin (Promochem, Wesel) wurde in 5 ml eines Lösungsmittelgemischs aus n-Heptan : iso-Propanol (70 : 30 vol/vol) durch 5-minütige Ultraschallbehandlung gelöst. 150 µl dieser Lösung wurden in das HPLC-System (4.3.2) injiziert.

Die Pumpe A förderte ein Lösungsmittelgemisch aus n-Heptan : iso-Propanol (80 : 20 vol/vol) und Pumpe B ein Gemisch aus n-Heptan : iso-Propanol (50 : 50 vol/vol). Zum Zeitpunkt der Injektion betrug der Förderanteil der Pumpe B 0 %. Er wurde innerhalb von 4 min auf 25 % erhöht. Bis zur 16. Minute wurde die Fließmittelzusammensetzung unverändert beibehalten und dann bis zur 22. Minute auf 65 % Förderanteil der Pumpe B erhöht. Anschließend wurde der Anteil der Pumpe B wieder auf 0 % heruntersetzt.

Die Reinheitsbestimmung wurde in einer 10-fach Bestimmung durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software „Chromeleon“, Version 4.12.

## **5.2.2 Bestimmung der Reinheit von Digitoxin mittels HPLC-DAD**

1 mg Digitoxin (Promochem, Wesel) wurde in 5 ml eines Lösungsmittelgemischs aus n-Heptan : iso-Propanol (70:30 vol/vol) gelöst und 100 µl der Lösung mit dem Autosampler injiziert (HPLC-DAD-Gerät: s. 4.3.2).

Das Laufmittel der Pumpe A bestand aus einem Lösungsmittelgemisch n-Heptan : iso-Propanol (80:20 vol/vol), das der Pumpe B aus dem Gemisch n-Heptan : iso-Propanol (50:50 vol/vol). Das System wurde bis zur 15. Minute isokratisch mit dem Fließmittel der Pumpe A betrieben, dann wurde bis zur 18. Minute der Anteil der Pumpe B auf 65 % erhöht. Anschließend wurde der Anteil der Pumpe B wieder auf 0 % herabgesetzt.

Die Digitoxin-Lösung wurde zehnmal chromatographiert, und die Flächen der aufgezeichneten Chromatographiesignale mit Hilfe der Software „Chromeleon“, Version 4.12, bestimmt.

## **5.3 Silikonisieren von Glasgefäßen**

Um die Oberfläche von Glasgefäßen zu desaktivieren und damit irreversible Adsorption der Analyten zu vermeiden, wurden sie mit einer Lösung aus Dichlordimethylsilan und getrocknetem Cyclohexan behandelt.

5 ml einer 2%igen Dichlordimethylsilan-Lösung in 1,1,1-Trichlorethan wurden mit 95 ml getrocknetem Cyclohexan zu einer 0,1%igen Lösung verdünnt. Zur Desaktivierung der Glasoberfläche wurde das Glasgefäß mit der Lösung gefüllt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Gefäß zunächst mit Methanol, dann mit Dichlormethan gespült und bei maximal 100 °C getrocknet.

Durch Aufheizen der Glasgeräte auf über 300°C konnte die Silikonisierung der Oberfläche wieder entfernt werden.

## **5.4 Kalibration von Volumendosierungen und Einwaagen Rückführung auf nationale Normale**

Volumina, die für die Berechnung der Analysenergebnisse relevant sind, werden mit automatischen Dosiergeräten, Meßkolben, Vollpipetten oder auch Mikroliterspritzen dosiert,

die vorab kalibriert wurden. Aus organisatorischen wie auch aus Kostengründen war es jedoch nicht möglich, alle Kalibrationen von einem akkreditierten Kalibrierlaboratorium durchführen zu lassen. Zur Sicherstellung der Rückführbarkeit wurde jedoch durch Vergleichskalibrationen einzelner Volumenmeßgeräte nachgewiesen, daß die Kalibrationsergebnisse der PTB und des akkreditierten Kalibrierlaboratoriums des Eichamts Illmenau mit denen der hier beschriebenen laborinternen Kalibrationen im Rahmen der Meßunsicherheit übereinstimmen [37]. Die hier angewandten Kalibrierverfahren sind darüber hinaus im Rahmen eines Akkreditierungsverfahrens für andere Meßgrößen von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) akzeptiert worden.

Bei der laborinternen Kalibrierung der Volumina wurden entsprechende Mengen Wasser mehrfach dosiert und gewogen. Die Volumina werden aus den Gewichten unter Berücksichtigung der Dichte des Wassers bei der jeweiligen Meßtemperatur berechnet [38]. Hierbei wurde für den Luftauftrieb in Abhängigkeit von Luftfeuchte, Luftdruck und Temperatur eine entsprechende Korrektur vorgenommen (10.1, Gl. 14).

Die Kalibration der verwendeten Waagen erfolgte in Anbindung an metrologisch höhere Normale, um die Rückführbarkeit der Wägungen sicherzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit diente ein Gewichtssatz der Klasse E2, kalibriert und zertifiziert von dem akkreditierten Massekalibrationslabor des Eichamts Brandenburg, als höheres Normal. Vor der Wägung der Wassermenge wurde die Waage zunächst mit dem zertifizierten Gewichtsstück kalibriert. Die folgende Wasserwägung war somit auf ein zertifiziertes Gewichtsnormal rückgeführt.

In Tabelle 11 (10.1) ist als Beispiel eine Berechnung mit allen zur Volumenkalibrierung notwendigen Angaben dargestellt.

Zur Einwaage von Referenzmaterialien wurde die Waage analog mit dem zertifizierten Gewichtssatz kalibriert, womit auch diese Einwaagen rückgeführt waren.

## **5.5 Vorschrift zur Bestimmung der Digoxinkonzentration im Serum mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsmethode**

### **5.5.1 Kalibratorlösungen**

Für die Kalibratorlösung I wurden ca. 2 mg Digoxin mit der kalibrierten Mikrowaage exakt eingewogen (z.B. 2,004 mg) und in einen kalibrierten 100 ml Kolben überführt. Der Kolben wurde mit etwas Methanol gefüllt, zum Lösen des Digoxins über Nacht bei Raumtemperatur

stehen gelassen und dann bis zur Eichmarke aufgefüllt. 250 µl der Kalibratorlösung I enthielten ca. 5 µg Digoxin. Die Lösung I wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Diese primäre Kalibratorlösung war für die Verwendung im Rahmen der hier durchgeführten Analysen zu konzentriert. Es erfolgte daher eine Verdünnung zur Kalibratorlösung II: Hierzu wurde in einem kalibrierten 250 ml Meßkolben eine Methanol-Aqua dest.-Mischung (50 : 50 vol/vol) vorlegt. Mit dem automatischen Dosiergerät wurden 250 µl der Kalibratorlösung I in den Kolben pipettiert und der Kolben bis zur Eichmarke mit der Methanol-Aqua dest.-Mischung (50 : 50 vol/vol) aufgefüllt. 200 µl der Kalibratorlösung II enthielten ca. 4 ng Digoxin. Die Lösung II wurde ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt.

Der genaue Gehalt der Kalibratorlösungen I und II errechnete sich aus der exakten Einwaage und den kalibrierten Volumina der Meßkolben und des Dosiergeräts.

Wenn bei der Verwendung dieser Kalibratorlösung die Raumtemperatur um mehr als 2 °C von der Temperatur bei der Zubereitung der Lösung abwich, mußte die Konzentration mit dem kubischen Ausdehnungskoeffizienten des Lösungsmittels bzw. der Lösungsmittelmischung korrigiert werden [39]:

$$c_T = c_{ST} / (1 + (T - T_{ST}) \cdot \gamma) \quad (\text{Gl. 1})$$

$c_T$  = Konzentration bei Benutzung

$c_{ST}$  = Konzentration bei Zubereitung der Kalibratorlösung

$T$  = Temperatur bei Benutzung

$T_{ST}$  = Temperatur bei Zubereitung der Kalibratorlösung

$\gamma$  = kubischer Ausdehnungskoeffizient

für die Lösungsmittelmischung Methanol : Aqua dest. = 50 : 50 (vol/vol) gilt

$\gamma = 0,00065$  [40]

Zur Herstellung der Gebrauchslösung des isotoopenmarkierten Digoxins wurde 1 ml der methanolischen Lösung des deuterierten Digoxins (Syntheseprodukt, s. 5.1.1) mit 14 ml einer Mischung aus Methanol und Aqua dest. (20 : 80 vol/vol) verdünnt. 22 µl dieser Lösung enthielten ca. 2 ng dreifach deuteriertes Digoxin ( $[^2\text{H}_3]$ Digoxin). Die Lösung konnte bei 4 °C mehrere Monate aufbewahrt werden und blieb hinsichtlich des Isotoopenmusters stabil, wie massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

### 5.5.2 Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der Digoxinkonzentration wurden alle Kontrollmaterialien und Patientenserum in Doppelbestimmungen aufgearbeitet und analysiert.

Für die Analysen wurden entgegen den sonst in der Analytik üblichen Gepflogenheiten nicht immer dieselben Mengen Serum eingesetzt. Vielmehr wurde von jedem Untersuchungsmaterial jeweils so viel Serum dosiert, daß die Analysenprobe ca. 2 ng Digoxin enthielt. Zur Abschätzung dieser Serummenge war eine orientierende Voranalyse mit Routinemethoden erforderlich. So wurde erreicht, daß die massenspektrometrisch ermittelten Isotopenverhältnisse nahe bei 1 lagen, was die größtmögliche Zuverlässigkeit der Meßergebnisse erwarten ließ. Die Proben wurden mit ca. 1200 µl Aqua dest. und 30 µl einer Ameisensäure : Aqua dest-Mischung (1:9 vol/vol) verdünnt. Mit Hilfe einer Mikroliterspritze mit fixiertem Wiederholadapter wurden 22 µl der isotonenmarkierten Digoxinlösung entsprechend 2 ng [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Digoxin in die verdünnte Probe dosiert. Zur Äquilibrierung des nicht-markierten mit dem isotonenmarkierten Analyten wurden die Proben bei Raumtemperatur über Nacht leicht geschüttelt.

Die Probe wurde dann mit 10 ml tert-Butylmethylether 15 min auf der Schüttelmaschine extrahiert und dann 10 min bei 4000 g und 10 °C zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgehebert und die wäßrige Phase ein zweites Mal mit 10 ml tert-Butylmethylether geschüttelt und zentrifugiert. Die beiden Etherphasen wurden vereinigt und unter Stickstoff bei ca. 30 °C eingedampft.

Im zweiten Reinigungsschritt wurde die Probe an einer mit LiChroprepDiol gefüllten Glassäule (Länge: ca. 36 cm, Innendurchmesser: 0,5 cm) chromatographiert. Diese mußte zuvor konditioniert und zur Bestimmung der Volumina der Vorfraktion und der Digoxinfraktion ein Elutionsprofil angefertigt werden (Ermittlung des Elutionsprofils s.u.). Es wurden 1,3 g Festphasenmaterial in die Säulen gefüllt und diese dann zunächst mit 50 ml Methanol und dann mit 35 ml einer n-Heptan : iso-Propanol-Mischung (60:40 vol/vol) gespült. Es folgte eine Äquilibrierung mit 10 ml des Fließmittels (n-Heptan : iso-Propanol = 60 : 40 (vol/vol), 0,1 % Ameisensäure).

Der nach der Extraktion erhaltene Trockenrückstand der zu analysierenden Probe wurde mit 200 µl des Fließmittels gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Vorfraktion (typischerweise 6 ml) wurde verworfen. Die Hauptfraktion mit einem Volumen von 1,3 ml wurde in einem

silikonisierten, spitzzulaufenden Autosamplerröhrchen (Gesamtvolumen ca. 1,5 ml) aufgefangen. Das Eluat wurde unter Stickstoff bei ca. 30 °C eingedampft.

Mit 200 µl eines Lösungsmittelgemischs (Methanol : Aqua dest. = 50 : 50 (vol/vol), 0,1 % Ameisensäure) wurde der Rückstand aufgenommen und das Autosamplerröhrchen mit einer Bördelkappe verschlossen.

### **Ermittlung des Elutionsprofils**

Das Elutionsprofil der Säule ist unter anderem abhängig von der Füllmenge des Festphasenmaterials und dem verwendeten Fließmittel. Es mußte daher für jede Material- und Fließmittelcharge einmal ermittelt werden. Zur Bestimmung der Vor- und Hauptfraktion wurden zunächst 10 ng Digoxin (gelöst in 200 µl Fließmittel) und anschließend portionsweise Fließmittel auf die Säule aufgetragen und die eluierten Fraktionen in Autosamplerröhrchen aufgefangen. Die Fraktionen wurden bei ca. 30 °C eingedampft, mit dem Fließmittel aufgenommen und mit dem HPLC-ESI-MS-Gerät analysiert. Die Fraktionen mit maximaler Peakintensität entsprachen der Hauptfraktion.

### **5.5.3 Kalibratoren**

Für die Erstellung der Kalibrationskurve wurden drei Kalibratoren mit unterschiedlichen Mengen an Digoxin (z.B. 3, 4 und 5 ng) jeweils im Triplet hergestellt. Für die Dosierung der Kalibratoren wurde mit dem Dosiergerät die Gebrauchskalibratorlösung II im Überschuß (ca. 1000 µl) angesaugt und definierte, kalibrierte Volumina (z.B. 150, 200 oder 250 µl) in ein silikonisiertes Autosamplerröhrchen mit Rundboden (Gesamtvolumen ca. 2,0 ml) abgegeben. Anschließend wurde mit der Mikroliterspritze mit fixiertem Wiederholadapter ein Volumen von ca. 2 x 22 µl der Lösung des isotope markierten Digoxins zugefügt.

Zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses im nicht-markiertem Digoxin wurden ausschließlich 250 µl der Kalibratorlösung II in ein silikonisiertes Autosamplerröhrchen pipettiert.

Analog wurden für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses im deuterierten Digoxin 2 x 22 µl der Lösung des isotope markierten Materials mit der Mikroliterspritze mit fixiertem Wiederholadapter in eine Vorlage von 250 µl der Mischung aus Methanol und Aqua dest. (50 : 50 (vol/vol)) in ein silikonisiertes Autosamplerröhrchen gegeben.

Alle Glasröhrchen wurden mit Bördelkappen verschlossen und durch leichtes Schütteln gemischt.

#### **5.5.4 Quantitative Analyse mittels HPLC-ESI-MS**

Für die quantitative Bestimmung wurden abwechselnd Aliquote der Proben (80 µl) und der Kalibratoren (50 µl) auf die HPLC-Säule injiziert. Nachdem alle Proben und Kalibratoren einer Analysenserie einmal gemessen wurden, wurde die gesamte Sequenz ein zweites Mal injiziert. Vor Beginn der Analyse wurde die exakte Einstellung der Massen der Natriumaddukte von nicht-markiertem und isotoopenmarkiertem Digoxin mit dem unter 4.3.1 beschriebenen Verfahren bestimmt. Die Massen wurden während der Analyse alternierend jeweils 739 ms gescannt. Ein Meßzyklus dauerte einschließlich der Totzeit 1,50 s.

Die Signalhöhen und -flächen der Massenchromatogramme wurden für die weitere Auswertung mit der Bedienungssoftware „HP LC/MSD ChemStation“ bestimmt.

### **5.6 Vorschrift zur Bestimmung der Digitoxinkonzentration im Serum mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsmethode**

#### **5.6.1 Kalibratorlösung**

Für die Kalibratorlösung I wurden ca. 2 mg Digitoxin mit der kalibrierten Mikrowaage genau eingewogen (z.B. 2,011 mg) und in einen kalibrierten 100 ml Meßkolben überführt. Der Kolben wurde mit Methanol bis zur Eichmarke gefüllt. 500 µl der Kalibratorlösung I enthalten ca. 10 µg Digitoxin. Die Lösung I wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Kalibratorlösung II wurden in einem kalibrierten 250 ml Meßkolben eine Mischung aus Methanol und Aqua dest. (50 : 50 (vol/vol)) vorlegt. Mit dem Dosiergerät wurden 500 µl der Lösung I in den Kolben pipettiert und der Kolben bis zur Eichmarke mit einer Methanol : Aqua dest.-Mischung (50 : 50 (vol/vol)) aufgefüllt. 200 µl der Kalibratorlösung II enthalten ca. 8 ng Digitoxin. Die exakte Konzentration ergibt sich aus der Einwaage und den kalibrierten Kolbenvolumina. Die Lösung II wurde ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt.

Wenn bei der Verwendung dieser Kalibratorlösung die Raumtemperatur um mehr als 2 °C von der Temperatur bei der Zubereitung der Lösung abweicht, mußte die Konzentration mit dem kubischen Ausdehnungskoeffizienten des Lösungsmittels bzw. der Lösungsmittelmischung korrigiert werden. Die Korrektur erfolgt wie unter 5.5.1 beschrieben.

Für die Gebrauchslösung des internen Standards wurden 2 ml der methanolischen Lösung des deuterierten Digitoxins mit 13 ml einer Mischung aus Methanol : Aqua dest. = 20 : 80 (Volumenanteile) verdünnt. In 24 µl dieser Gebrauchslösung waren ca. 8 ng dreifach deuteriertes Digitoxin ( $[^2\text{H}_3]$ Digitoxin) enthalten. Die Lösung konnte bei 4 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

### 5.6.2 Probenvorbereitung

Zur Ermittlung der Digitoxinkonzentration wurde für jedes Serum eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Serum wurde mit dem automatischen Dosiergerät pipettiert und mit 1200 µl Aqua dest. und 30 µl einer Mischung aus Ameisensäure und Aqua dest. (1:9 (vol/vol)) verdünnt. Mit Hilfe einer Mikroliterspritze mit fixiertem Wiederholadapter wurde in die Probe, welche ca. 8 ng Digitoxin enthielt, ein exakt definiertes Volumen des Isotopenmaterials, welches 8 ng  $[^2\text{H}_3]$ Digitoxin entsprach, dosiert. Unter leichtem Schütteln wurde das nicht-markierte Digitoxin mit dem isotopenmarkierten Digitoxin in der Probe über Nacht bei Raumtemperatur äquilibriert.

Im ersten Reinigungsschritt wurde die Probe mit 10 ml tert-Butylmethylether auf der Schüttelmaschine 15 min extrahiert und dann bei 4000 g und 10 °C 10 min zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgehebert und unter Stickstoff bei ca. 30 °C eingedampft.

Die anschließende chromatographische Reinigung der Probe erfolgte an einer mit LiChroprepDiol gefüllten Säule, welche zuvor wie folgt vorbereitet werden mußte: 1,3 g des Festphasenmaterials wurden in die Säule gefüllt und mit 50 ml Methanol und anschließend mit 35 ml einer n-Heptan : iso-Propanol-Mischung (65 : 35 (vol/vol)) gespült. Mit 10 ml des Fließmittels (n-Heptan : iso-Propanol = 65 : 35 (vol/vol), 0,1 % Ameisensäure) wurde die Säule äquilibriert.

Analog zu dem für Digoxin beschriebenen Verfahren (5.5.2) wurde ein Elutionsprofil mit 10 ng natürlichem Digitoxin angefertigt und die Hauptfraktion bestimmt.

Der Probenrückstand wurde mit 200 µl des Fließmittels gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Vorfraktion (typischerweise 6,5 ml) wurde verworfen und die Hauptfraktion mit einem Volumen von 1,3 ml in silikonisierten, spitzzulaufenden Autosamplerröhrchen (Gesamtvolumen ca. 1,5 ml) aufgefangen. Das Eluat wurde unter Stickstoff bei ca. 30 °C eingedampft.

Der Rückstand wurde mit 200 µl eines Lösungsmittelgemischs (Methanol : Aqua dest. = 50 : 50 (vol/vol), 0,1 % Ameisensäure) aufgenommen und das Autosamplerröhrchen mit einer Bördelkappe verschlossen.

### **5.6.3 Kalibratoren**

Für die Kalibration wurden drei verschiedene Kalibratoren vorbereitet, die unterschiedliche Mengen nicht-markiertes Digitoxin enthielten.

Bei der Dosierung des nicht-markierten Digitoxins wurden 1000 µl der Kalibrationslösung II mit dem Dosiergerät aufgenommen und 150, 200 bzw. 250 µl in silikonisierte Autosamplerröhrchen mit Rundboden abgegeben. Zu allen Kalibratoren wurde mit der Mikroliterspritze, die mit einem Wiederholungsadapter ausgestattet war, dieselbe Menge (ca. 8 ng) [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Digitoxin zugegeben. Die Autosamplerröhrchen wurden mit Bördelkappen verschlossen und zur Mischung der Komponenten leicht geschüttelt. Für jeden der drei verschiedenen Kalibratoren wurden mindestens drei Parallelansätze vorbereitet.

Weiterhin wurde auch je ein Kalibrator mit ausschließlich nicht-markiertem Digitoxin und ein Kalibrator mit ausschließlich [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Digitoxin analog vorbereitet.

### **5.6.4 Quantitative Analyse mittels HLPC-ESI-MS**

Die vorbereiteten Serumproben und Kalibratoren wurden abwechselnd mit dem Autosampler in das HPLC-MS-System injiziert. Zur Chromatographie wurden von den Serumproben 80 µl und von den Kalibratoren 50 µl auf die Säule aufgetragen. Das Massenspektrometer wurde nach der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Weise auf die Massen der Natriumaddukte des nicht-markierten und des dreifach deuterierten Digitoxins eingestellt. Die Massen wurden abwechselnd über einen Zeitraum von 739 ms gescannt. Einschließlich der Totzeit dauerte ein Meßzyklus 1,50 s.

Für die weitere Auswertung wurden die Signalhöhen und -flächen aus den Chromatogrammen mit der Bedienungssoftware „HP LC/MSD ChemStation“ bestimmt.

## 5.7 Berechnung des Analyseergebnisses

Für die quantitative Bestimmung einer Substanz M wurde ein massenspezifisches Chromatogramm eines Fragments bzw. Addukts dieser Substanz M aufgezeichnet. Gleichzeitig wurde das analoge Fragment oder Addukt der entsprechenden isotopenmarkierten Substanz M\*, die vorab dem Untersuchungsmaterial in definierter Form zugefügt wurde, detektiert. Auf die gleiche Weise wurden Kalibratoren vorbereitet und analysiert.

Aus den Flächen der beiden massenspezifischen Signale wurde der Quotient R mit

$$R = \text{Fläche}_M / \text{Fläche}_{M^*} \quad (\text{Gl. 2})$$

gebildet.

Die Kalibrationskurve wurde aus den Quotienten dreier Kalibratoren ermittelt. Da aus theoretischen Gründen keine lineare Beziehung zwischen den Quotienten und den Substanzen besteht [41], wurde die Kurve als Funktion eines Polynoms 2. Grades berechnet (10.2, Gl.15). Mit Hilfe dieser Kalibrationsfunktion wurde aus dem Quotienten R der Probe die Substanzmenge pro Probe errechnet. Unter Berücksichtigung des eingesetzten Serumvolumens wurde die Substanzkonzentration der Serumprobe ermittelt.

Die Festlegung der Kalibrationskurve sowie die anschließende Berechnung der Analyseergebnisse erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel.

## 5.8 Bestimmung der Meßunsicherheit des Analyseergebnisses

Zur vollständigen Angabe eines Meßergebnisses gehört neben der ermittelten Konzentration auch die Angabe der Meßunsicherheit dieses Analyseergebnisses. Die Meßunsicherheit setzt sich zusammen aus der zufälligen Meßunsicherheit ( $u_A$ ) und der systematischen Meßunsicherheit ( $u_B$ ).

Die zufällige Meßunsicherheit ( $u_A$ ) ergibt sich aus den Impräzisionen der einzelnen Arbeitsschritte in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Geräten. Die Impräzision „unter Wiederholungsbedingungen“ und „unter Reproduzierbarkeitsbedingungen“ beinhaltet die

Impräzision beim Verdünnen von Kalibratorlösungen sowie bei der Dosierung von Rekonstitutionsvolumina, Kalibratoren und Seren und die Impräzision des HPLC-MS-Instrumentes bei der Bestimmung der Isotopenverhältnisse. Diese Impräzisionen können im Einzelnen durch wiederholte Durchführung der Teilschritte der Analytik, d.h. durch Mehrfachwägung, -dosierung oder -isotopenverhältnismessung bestimmt werden. Sinnvollerweise ermittelt man jedoch die gesamte zufällige Meßunsicherheit, zu der alle diese Komponenten beitragen, durch Mehrfachbestimmungen eines Untersuchungsmaterials. Als Maß für die zufällige Komponente der Meßunsicherheit dient die Standardabweichung bzw. die relative Standardabweichung.

Die systematische Meßunsicherheit ( $u_B$ ) umfaßt die Meßunsicherheiten von (extern) kalibrierten und zertifizierten Materialien und Gegenständen, die während der Analyse verwendet werden. Hierzu gehören die Meßunsicherheit der Reinheit des Referenzmaterials (sofern diese als kalibrierter und zertifizierter Wert vorliegt) und die Meßunsicherheit der Kalibriergewichte sowie der extern kalibrierten Meßkolben.

Berechnet wird die kombinierte Meßunsicherheit<sup>1</sup> aus den Meßunsicherheiten der Einzelkomponenten nach folgender Formel:

$$u^2 = \sum_1^x u_x^2 \quad (\text{Gl. 3})$$

mit  $u_x$  = Meßunsicherheit der Einzelkomponente x

Durch Multiplikation mit dem Faktor  $k = 2$  erhält man die erweiterte Meßunsicherheit  $U$ <sup>1</sup>. Diese erweiterte Meßunsicherheit entspricht dem 95 %igen Vertrauensintervall.

$$U = k \cdot u \quad (\text{Gl. 4})$$

mit  $U$  = erweiterte Meßunsicherheit

---

<sup>1</sup> Ergeben sich aus der Berechnung mehrere Ziffern, so wird das Ergebnis mit den ersten beiden signifikanten Ziffern angegeben.

## **5.9 Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethoden zur Bestimmung von Digoxin und Digitoxin**

Die hier beschriebenen Methoden wurden nach verschiedenen Zuverlässigkeitskriterien - Präzision, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen - validiert. Die dazu durchgeführten experimentellen und statistischen Untersuchungen werden im Folgenden erläutert.

### **5.9.1 Präzision**

Charakteristische Kenngröße eines quantitativen Bestimmungsverfahrens ist seine Präzision. Die Präzision eines Meßverfahrens läßt sich jedoch nur qualitativ beschreiben (z.B. hoch, mittel, niedrig). Der inverse Begriff 'Impräzision' kann jedoch quantitativ, beispielsweise als Standardabweichung oder Variationskoeffizient beschrieben werden. Die Impräzision setzt sich aus Komponenten wie der Impräzision unter Wiederholungsbedingungen und der Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen, der Impräzision von Volumendosierungen sowie der Impräzision des HPLC-MS-Systems zusammen. Diese Beiträge wurden im Rahmen der Validierung der Methode im Detail untersucht. Als numerische Werte werden die Standardabweichungen bzw. die Variationskoeffizienten als Maß für die Impräzisionen angegeben.

#### **Präzision unter Wiederholungsbedingungen**

Für die Beurteilung der Präzision unter Wiederholungsbedingungen (Präzision in der Serie) wurde ein Kontrollmaterial, welches den zu bestimmenden Analyten enthielt, zehnmal aufgearbeitet und innerhalb einer Analysenserie analysiert. Die aus den Ergebnissen berechnete Standardabweichung (5.11.1, Gl.5) dient als Grundlage zur Beurteilung der Impräzision unter Wiederholungsbedingungen.

Darüber hinaus wurde für jedes Kontrollmaterial, welches in mehreren Serien jeweils in Doppelbestimmungen analysiert wurde, die Standardabweichung als Maß für die Impräzision unter Wiederholungsbedingungen aus den Doppelwerten berechnet [42] (5.11.1, Gl. 8).

### **Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen**

Die Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen (Präzision von Serie zu Serie) ergibt sich aus den Ergebnissen unabhängiger Analysenserien. Als Maß für die Impräzision wurde die Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen aus der Differenz der Varianzen, die sich aus Gl. 8 und Gl. 10 ergeben, errechnet.

Mit einem statistischen Verfahren (5.11.3) wurde geprüft, ob die Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Serien mehr als zufällig sind und somit die Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen signifikant zur Gesamtpräzision beiträgt.

### **Präzision der Volumendosierung**

Zur Ermittlung der Analytkonzentrationen ist es notwendig, die verwendeten Volumina exakt zu kennen. Daher wurden die für die Dosierung von Proben sowie Kalibratoren eingesetzten Volumina durch Mehrfachwägung der entsprechenden Menge an Wasser quantitativ bestimmt. Das Verfahren der Kalibration ist unter 5.4 beschrieben worden. Für die Bestimmung der Impräzision der Volumendosierung wurden die Standardabweichungen der Mehrfachwägung (5.11.1, Gl. 8) berechnet.

### **Präzision der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-Gerät**

Um die Meßpräzision des HPLC-MS-Systems unter Wiederholungsbedingungen zu ermitteln, wurden von einem Gemisch aus nicht-markiertem und isotopenmarkiertem Analyten zehnmal aufeinanderfolgend massenspezifische Chromatogramme aufgezeichnet und die Isotopenverhältnisse ermittelt. Als Maß für die Impräzision wurde aus den Flächenverhältnissen die Standardabweichung (5.11.1, Gl. 8) berechnet.

### **Gesamtpräzision**

Die Streuungen der Einzelergebnisse in einer Serie oder von Serie zu Serie sind bedingt durch die Impräzisionen, die während der Durchführung der Methode auftreten. Die Gesamtpräzision umfaßt alle oben beschriebenen Impräzisionen der einzelnen Teilschritte der Methoden.

Die Kontrollmaterialien sind im Rahmen dieser Arbeit mindestens in drei unabhängigen Serien jeweils im Doppelwert analysiert worden. Aus den gewonnenen Daten konnten die Analytkonzentration und die Gesamtpräzision der Bestimmung für jedes Serum ermittelt werden (s. 5.11.1, 5.11.2).

## 5.9.2 Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze

Mit abnehmender Konzentration eines Analyten wirkt sich die Streuung der Meßergebnisse zunehmend stärker auf die Meßunsicherheit des Ergebnisses aus. Bei sehr niedriger Konzentration eines Analyten ist der zuverlässige Nachweis nur dann möglich, wenn das Meßsignal deutlich größer ist als die Meßunsicherheit. Mit der Nachweisgrenze wird daher festgelegt, bei welcher Konzentration eines Analyten eine signifikante Unterscheidung von dem Signal einer Leerprobe möglich ist. Unmittelbar oberhalb der Erfassungsgrenze kann der untersuchte Analyt quantifiziert werden – jedoch mit entsprechend großer Unsicherheit.

Die Bestimmungsgrenzen legen einen Bereich fest, in dem eine quantitative Analyse mit befriedigender Präzision verläuft.

Die Grenzwerte wurden mit Hilfe der Leerwertmethode berechnet [35]. Bei dieser Methode wurde zunächst zu einem Serum, welches den zu bestimmenden Analyten nicht enthielt, isotonenmarkiertes Material pipettiert. Im Anschluß wurde diese Leerprobe entsprechend der beschriebenen Methoden aufgearbeitet und mehrfach analysiert. Aus den Flächenquotienten wurde der Mittelwert  $\bar{x}$  und die dazugehörige Standardabweichung  $S_L$  (5.11.1, Gl. 10) berechnet.

Im zweiten Schritt wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Aliquote des Leerserums wurden mit vier verschiedenen, genau definierten Mengen des zu untersuchenden Analyten aufgestockt. Für jede der vier Konzentrationen wurden sechs Proben erstellt. Nach Äquilibration der Seren über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Proben nach den entsprechenden Methoden aufgearbeitet und analysiert. Zur Auswertung wurden die analysierten Flächenquotienten nach Konzentrationsbereichen getrennt gemittelt und die Standardabweichung (5.11.1, Gl. 8) sowie die relative Standardabweichung (5.11.2, Gl. 11) berechnet.

Für die Auswertung wurden die Flächenverhältnisse (Ordinatenwerte) gegen die eingesetzten Analytkonzentrationen (Abzissenwerte) aufgetragen und die Regressionskurve ermittelt, die im unteren Bereich einen nahezu linearen Verlauf hat. Mit Hilfe der Steigung  $b$  und der Standardabweichung  $S_L$  der Leerprobe wurden Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze näherungsweise berechnet.

Für die Berechnung der **Nachweisgrenze**  $x_{(NG)}$  gilt:

$$x_{(NG)} = 3 \cdot S_L / b \quad (\text{Gl. 5})$$

Die **Erfassungsgrenze**  $x_{(EG)}$  erhält man mit folgender Formel:

$$x_{(EG)} = 6 \cdot S_L / b \quad (\text{Gl. 6})$$

Die **Bestimmungsgrenze**  $x_{(BG)}$  wird aus der Standardabweichung  $S_L$  und der Steigung  $b$  der Kalibrationsgerade wie folgt berechnet:

$$x_{(BG)} = 9 \cdot S_L / b \quad (\text{Gl. 7})$$

## **5.10 Routineverfahren zur Bestimmung von Cardioglycosidkonzentrationen**

Die Konzentrationen von Digoxin bzw. Digitoxin in Patientenseren und Kontrollmaterialien wurden parallel zu der hier beschriebenen massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode von geübten technischen Mitarbeitern mit jeweils zwei verschiedenen häufig angewandten kommerziellen Testverfahren unter Routinebedingungen bestimmt.

Bei allen Routinemethoden erfolgte die Dosierung des Serums, die Zugabe der Reagenzien, die Messung sowie die Berechnung der Analysenergebnisse automatisch. Überschritt die Analytkonzentration eines Serums den Meßbereich eines Gerätes, so mußte das Serum verdünnt gemessen werden. Bei der Berechnung des Ergebnisses war der entsprechende Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen.

### **5.10.1 Bestimmung der Digoxinkonzentration mit Routineverfahren**

Folgende Routineverfahren wurden für die Bestimmung der Digoxinkonzentration durchgeführt:

**Enzymimmunologische Methode**, Dimension, Dade Behring, Zentrallabor des Institutes für Klinische Biochemie der Universität Bonn: Das Serum wird mit einem Überschuß des  $F(ab')_2$ -Fragments des Digoxin-Antikörpers, an das  $\beta$ -Galaktosidase als Marker konjugiert ist, gemischt. Digoxin in der Probe bindet an die Konjugate. Im nächsten Schritt werden Magnetteilchen, die mit dem Digoxin nahe verwandten  $\gamma$ -Strophantin (Ouabain) beschichtet

sind, zur Probe gegeben. Diese Magneteilchen binden sich an die noch freien Konjugate und werden dann magnetisch aus der Probe entfernt. Der Überstand wird mit dem Substrat Chlorphenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid gemischt. Durch die  $\beta$ -Galaktosidase wird das Substrat zu Chlorphenolrot hydrolysiert, wodurch sich die Absorption bei der Wellenlänge 577 nm ändert [43].

**Elektro-Chemilumineszenz-Immunologische Methode**, Elecsys, Roche, Klinisch-Chemisches Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Stadt Nürnberg; Die Serumprobe wird mit einem Überschuß eines Digoxin-spezifischen Ruthenium-markierten Antikörpers versetzt. Mit diesem bindet das in der Probe enthaltene Digoxin. Biotinylierte Digoxin-Derivate und Mikropartikel, die mit Streptavidin beschichtet sind, werden hinzugemischt. Die Digoxin-Derivate binden sich an die noch freien Antikörper. Dieser Antikörper-Hapten-Komplex wiederum wird über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Mikropartikel gebunden. In der Meßzelle wird dieser Gesamtkomplex durch die magnetische Wirkung der Mikropartikel an die Oberfläche einer Elektrode fixiert. Nichtfixierte Substanzen werden entfernt. Durch Anlegen einer Spannung an die Elektroden wird die Chemilumineszenz-Emission induziert und mit einem Photomultiplier gemessen [44].

### 5.10.2 Bestimmung der Digoxinkonzentration mittels Routineverfahren

Die Bestimmung von Digitoxin erfolgte mit folgenden Methoden:

**Enzymimmunologische Methode**, Dimension, Dade Behring, Zentrallabor des Institutes für Klinische Biochemie der Universität Bonn: Das Serum wird mit einem Überschuß des  $F(ab')_2$ -Fragment des Digitoxin-Antikörpers, an das  $\beta$ -Galaktosidase als Marker konjugiert ist, gemischt. Digitoxin in der Probe bindet an die Konjugate. Im nächsten Schritt werden Magneteilchen, die mit dem Digitoxin nahe verwandten  $\gamma$ -Strophantin (Ouabain) beschichtet sind, zur Probe gegeben. Diese Magneteilchen binden sich an die noch freien Konjugate und werden dann magnetisch aus der Probe entfernt. Der Überstand wird mit dem Substrat Chlorphenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid gemischt. Durch die  $\beta$ -Galaktosidase wird das Substrat zu Chlorphenolrot hydrolysiert, wodurch sich die Absorption bei der Wellenlänge 577 nm ändert [45].

**Turbidimetrische-Immunologische Methode**, Olympus, Olymus-Diagnostica, Klinisch-Chemisches Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Stadt Nürnberg; der Serumprobe werden monoklonale, für Digitoxin-spezifische Antikörper sowie Mikropartikel, welche gleichmäßig mit einem Digitoxin-Derivat beschichtet sind, zugesetzt. Digitoxin aus der Probe konkurriert mit dem Mikropartikel-gebundenen Digitoxin um die Antikörper. Bindet Mikropartikel-gebundenes Digitoxin an den Antikörper, so bewirkt die resultierende Agglutinationsreaktion eine Trübungszunahme, die spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 700 nm gemessen werden kann [46].

## 5.11 Statistische Verfahren

### 5.11.1 Standardabweichung

Zur Charakterisierung der Präzision eines Analysenverfahrens verwendet man den Schätzwert  $s$  der Standardabweichung. Bei einer Serie von Meßwerten aus demselben Probenmaterial gibt sie die Differenz zwischen dem Wendepunkt der Gauß-Verteilungskurve und dem Mittelwert an.

Die Standardabweichung kann auch für eine Reihe von Proben verschiedenen Gehaltes bestimmt werden, wobei in jeder Probe eine endliche Zahl von Parallelbestimmungen durchgeführt wird. Bei Vorliegen von  $m$  Proben und jeweils  $n_A$  Parallelbestimmungen erhält man die Standardabweichung mit folgender Gleichung [47]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{n_A} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2}{n - m}} \quad (\text{Gl. 8})$$

$x_{ji}$  = i-ter Wert der j-ten Probe

$\bar{x}_j$  = Mittelwert der j-ten Probe

$m$  = Anzahl der Proben

$n_A$  = Anzahl der Parallelbestimmungen

$n$  = Zahl aller Messungen ( $n = mn_A$ )

Das Quadrat der Standardabweichung nennt man die Varianz. Die im Nenner stehende Größe  $n - m$  bezeichnet man als Zahl der Freiheitsgrade  $f$ . In dem Fall, daß eine Probe in mehreren, von einander unabhängigen Serien analysiert wird, entspricht  $m$  der Anzahl der Analysenserien.

Einen Sonderfall stellt die Bestimmung der Standardabweichung für eine Probe dar, die in mehreren unabhängigen Analysenserien jeweils im Doppelwert ( $n_A = 2$ ) analysiert wurde. Hier vereinfacht sich die Formel zu [47]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x'_j - x''_j)^2}{2m}} \quad (\text{Gl. 9})$$

$x'_j, x''_j$  = zusammengehörige Doppelbestimmungen  
der j-ten Probe

Für Kontrollproben, die in unabhängigen Analysenserien und an unterschiedlichen Meßtagen mehrfach bestimmt wurden, kann die Gesamtimpazität erfaßt werden. Diese setzt sich aus den Komponenten der Imprazität unter Wiederholungsbedingungen und den Streuungen von Serie zu Serie zusammen. Zunächst wird mit Hilfe des unter 5.11.3 erläuterten statistischen Prüfverfahrens getestet, ob die Streuungen von Serie zu Serie (Imprazität unter Reproduzierbarkeitsbedingungen) signifikant zur Gesamtimpazität des Ergebnisses beitragen.

Ist ein signifikanter Beitrag der Streuung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen nachweisbar, so berechnet sich die Gesamtimpazität nach Gleichung 8. Findet man keinen signifikanten Beitrag der Imprazität unter Reproduzierbarkeitsbedingungen, kann die Bestimmung der Standardabweichung der Gesamtimpazität mit Hilfe des Mittelwerts einer jeden Doppelbestimmung ( $\bar{x}_j$ ) und des Gesamtmittelwerts aller Ergebnisse ( $\bar{x}$ ) erfolgen:

$$s_A = \sqrt{\frac{n_A \sum (\bar{x}_j - \bar{x})^2}{m-1}} \quad (\text{Gl. 10})$$

Bei der Angabe der Standardabweichung werden die ersten beiden signifikanten Stellen angegeben.

### 5.11.2 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient<sup>1</sup> beschreibt die auf den Mittelwert  $\bar{x}$  bezogene relative, prozentuale Standardabweichung [47].

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Gl. 11})$$

### 5.11.3 Statistisches Prüfverfahren zum Nachweis des Beitrags der Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen

Zum Vergleich zweier Standardabweichungen bildet man das Verhältnis ihrer Varianzen:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (F \text{ stets} > 1) \quad (\text{Gl. 12})$$

Den Wert dieses Bruches stellt man einer theoretisch abgeleiteten und tabellierten Prüfgröße  $F(\bar{P}, f_1, f_2)$  gegenüber [47].

Diese hängt ab

- von der vereinbarten Wahrscheinlichkeit  $\bar{P}$ ,
- von der mit  $s_1$  verknüpften Zahl von Freiheitsgraden  $f_1$ ,
- von der mit  $s_2$  verknüpften Zahl von Freiheitsgraden  $f_2$ .

(So gilt z.B. für  $\bar{P} = 0,99$  und  $f_1 = 2$ ,  $f_2 = 3$ :  $F(\bar{P}, f_1, f_2) = 30,81$ )

Der Unterschied zwischen beiden Standardabweichungen wird als gesichert angesehen, wenn  $F > F(\bar{P}, f_1, f_2)$  ist.

---

<sup>1</sup>Ergeben sich aus der Berechnung mehrere Ziffern, so wird das Ergebnis mit den ersten beiden signifikanten Ziffern angegeben.

#### **5.11.4 Statistisches Verfahren zur Beurteilung der Ergebnisse verschiedener Methoden**

Die als Untersuchungsmaterialien verwendeten Patientenserum und Kontrollproben wurden sowohl mit Routinemethoden, die in Klinisch-Chemischen Laboratorien verwendet werden, als auch mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode analysiert. Mit Hilfe des statistischen Verfahrens nach Passing und Bablok [48] werden die Ergebnisse verglichen. Die computergestützte Berechnung erfolgte mit dem Kalkulationsprogramm EVAPAK der Firma Roche (basierend auf dem Kalkulationsprogramm Excel).

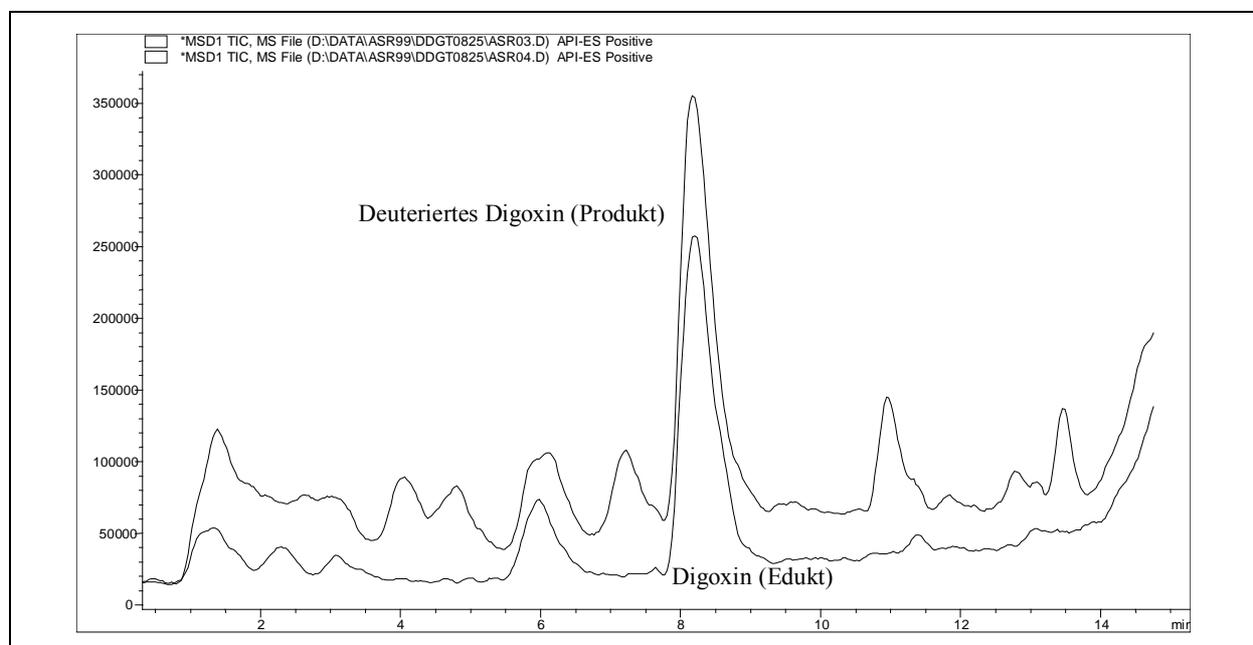
## 6 Ergebnisse

### 6.1 Chemische Synthese isotopenmarkierter Cardioglycoside

Zur Darstellung der isotopenmarkierten Verbindungen wurden die nicht-markierten Cardioglycoside nach der unter 5.1.2 beschriebenen Methode deuteriert und isoliert. Die Identifizierung der Deuterierungsprodukte erfolgte mit dem HPLC-MS-Gerät durch die Aufzeichnung von Massenspektren unter den in 4.3.1 beschriebenen Bedingungen.

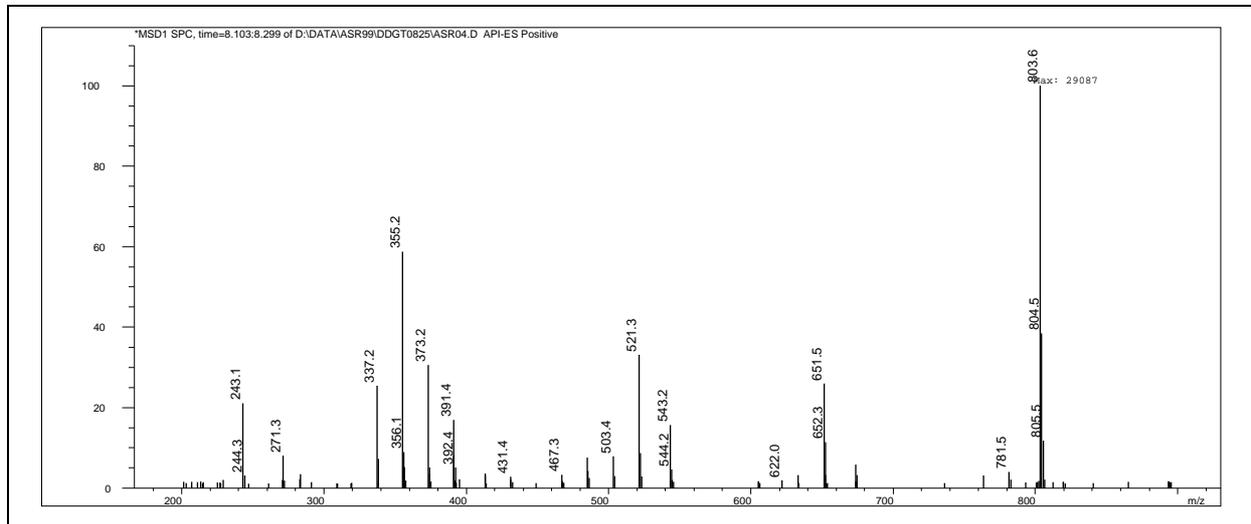
#### 6.1.1 Deuteriertes Digoxin

Das Deuterierungsprodukt des Digoxins wurde mit dem Edukt verglichen. In Abbildung 4 sind die getrennt aufgezeichneten Chromatogramme der beiden Verbindungen dargestellt, die durch kontinuierliche Aufzeichnung des Totalionenstroms mit dem MS-Gerät registriert wurden. Die Signale mit der Retentionszeit von 8,3 min konnten mit Hilfe der Massenspektren eindeutig nicht-markiertem bzw. deuteriertem Digoxin zugeordnet werden.

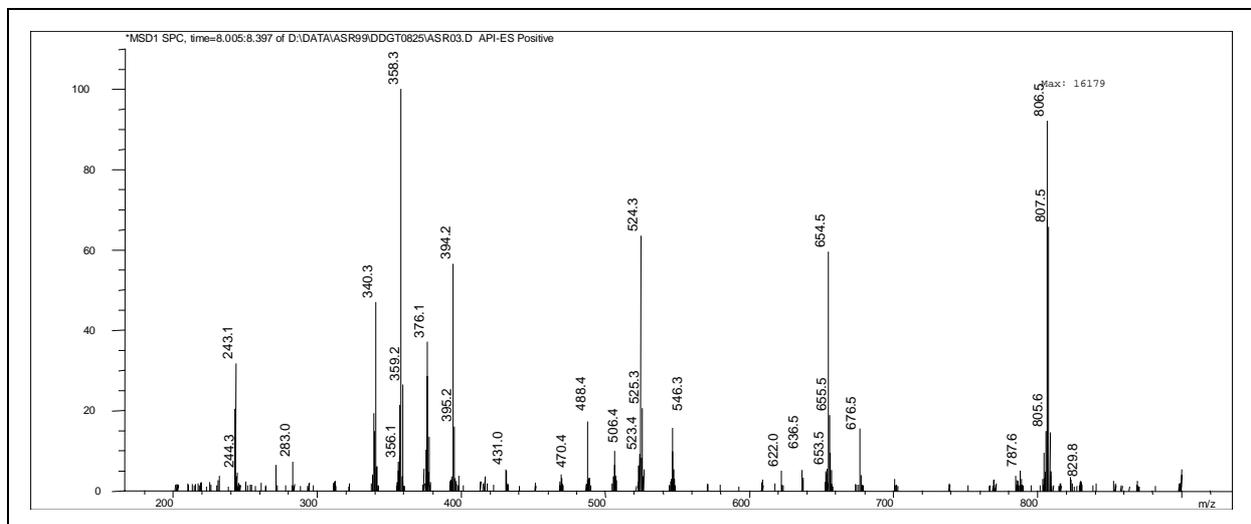


**Abb. 4:** HPLC-Chromatogramme von Digoxin und deuteriertem Digoxin; kontinuierliche Aufzeichnung des Totalionenstroms mit dem MS während der Chromatographie (die beiden getrennt voneinander aufgezeichneten Chromatogramme wurden in dieser Darstellung überlagert)

Die untersuchten Verbindungen bilden während des Ionisierungsprozesses Natriumaddukte. Hierzu reichen offenbar die geringen Mengen an Natrium-Ionen aus, die aus den Glasvorratsflaschen in die Chromatographiefließmittel gelangen, so daß eine Zugabe von Natriumsalzen nicht erforderlich ist.



**Abb. 5:** Massenspektrum von Digoxin nach Elektrospray-Ionisierung



**Abb. 6:** Massenspektrum von deuteriertem Digoxin nach Elektrospray-Ionisierung

Das Massenspektrums von Digoxin (Abb. 5) zeigt daher einen Basispeak bei m/z 803, der dem Natriumaddukt des unfragmentierten Moleküls entspricht. Durch Abspalten der Digitoxose-Einheiten vom Digoxinmolekül entstehen Fragmentationen ( $F+H^+$ ), die den Protonenaddukten von Digoxigenin-bis-digitoxosid (m/z 651), Digoxigenin-mono-digitoxosid (m/z 521) und Digoxigenin (m/z 391) entsprechen. Vom Steroidgerüst dieser Fragmentationen

werden Hydroxygruppen als Wasser abgespalten; hierdurch entstehen die Ionen  $m/z$  633,  $m/z$  503, 485, 467 bzw.  $m/z$  373, 355, 337. Desweiteren sind auch die Natriumaddukte der Fragmentationen zu beobachten ( $m/z$  673, 543, 413).

Im Massenspektrum des synthetisierten, deuterierten Digoxins (Abb. 6) sind die gleichen Addukte und Fragmente wie bei natürlichem Digoxin zu erkennen, jedoch durch die Deuterierung größtenteils um je drei Massen verschoben: das Natriumaddukt von [ $^2\text{H}_3$ ]Digoxin ( $m/z$  806), die Fragmentationen ( $\text{F}+\text{H}^+$ ) [ $^2\text{H}_3$ ]Digoxigenin-bis-digitoxosid ( $m/z$  654), [ $^2\text{H}_3$ ]Digoxigenin-mono-digitoxosid ( $m/z$  524) und [ $^2\text{H}_3$ ]Digoxigenin ( $m/z$  394) sowie (z.T.) die entsprechenden Natriumaddukte dieser Fragmentationen ( $m/z$  676 und 546). Wie bereits für das natürliche Digoxin beschrieben, entstehen auch beim deuterierten Digoxin durch Wasserabspaltung weitere Fragmentationen ( $m/z$  636,  $m/z$  506, 488 und 470 bzw.  $m/z$  376, 358 und 340).

Neben den dreifach markierten Ionen findet man auch kleine Anteile von nicht-markiertem und einfach-, zweifach- und vierfach-markiertem Digoxin. Aus dem Massenspektrum der Verbindung läßt sich folgende Isotopenverteilung ablesen: [ $^2\text{H}_0$ ] = 1,2 %, [ $^2\text{H}_1$ ] = 5,2 %, [ $^2\text{H}_2$ ] = 8,1 %, [ $^2\text{H}_3$ ] = 49,9 %, [ $^2\text{H}_4$ ] = 35,6 %.

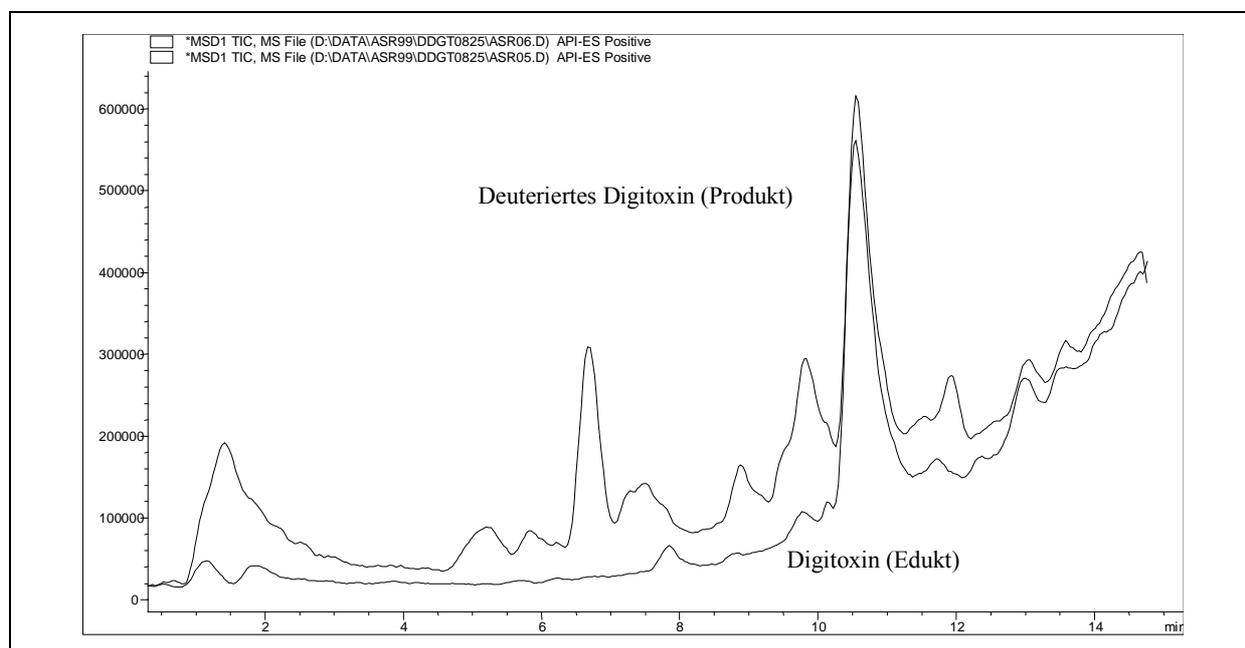
Da in dem Massenspektrum der deuterierten Verbindung auch bei Fragmentationen ohne Digitoxose-Einheiten und Hydroxygruppen der Massengewinn nachweisbar ist, kann daraus geschlossen werden, daß die Deuterierung des Ausgangsprodukts zum großen Teil am Steroidgerüst unter der Bildung von Kohlenstoff-Deuterium-Bindungen erfolgt ist.

### 6.1.2 Deuteriertes Digitoxin

Zur Charakterisierung des Deuterierungsproduktes des Digitoxins wurde als Referenzsubstanz das nicht-markierte Digitoxin verwendet. Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme, die durch kontinuierliche Aufzeichnung des Totalionenstroms im HPLC-Eluat mit dem Massenspektrometer als Detektor erhalten wurden, zeigt, daß die Retentionszeit (10,6 min) von Digitoxin mit der des Hauptproduktes der Deuterierung identisch ist (Abb. 7).

Im Massenspektrum des nicht-markierten Digitoxins (Abb. 8) bildet das Natriumaddukt des Moleküls bei  $m/z$  787 den Basispeak. Durch Abspaltung der Digitoxose-Einheiten ( $m/z$  130) vom Digitoxinmolekül entstehen die Fragmentationen ( $\text{F}+\text{H}^+$ ) Digitoxigenin-bis-digitoxosid ( $m/z$  635) Digitoxigenin-mono-digitoxosid ( $m/z$  505) und Digitoxigenin ( $m/z$  375) sowie ihre Natriumaddukte ( $m/z$  657, 527 und 397). Weitere Fragmentationen mit den Massen  $m/z$  487

und 469 sowie  $m/z$  357 und 339 entstanden durch Abspaltung der am Steroidgerüst von Digitoxigenin-mono-digitoxosid und Digitoxigenin vorhandenen Hydroxygruppen.



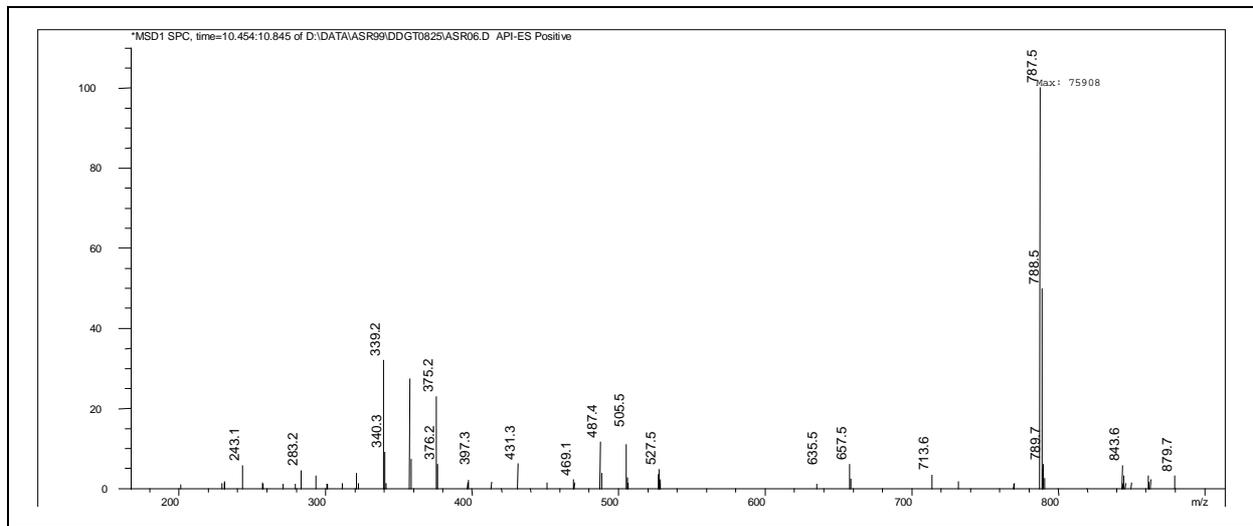
**Abb. 7:** HPLC-Chromatogramme von Digitoxin und deuteriertem Digitoxin; kontinuierliche Aufzeichnung des Totalionenstroms mit dem MS während der Chromatographie (die beiden getrennt voneinander aufgezeichneten Chromatogramme wurden in dieser Darstellung überlagert)

Das im Massenspektrum dargestellte Fragmentierungsmuster des deuterierten Digitoxins (Abb. 9) ist analog zu dem des nicht-markierten Digitoxins. Die Massen der meisten Fragmentionen sind jedoch durch die Deuterierung zu höheren Massen verschoben. Aus den Molekül- und Fragmentionen ist erkennbar, daß überwiegend an drei verschiedenen Positionen Wasserstoff gegen Deuterium ausgetauscht ist.

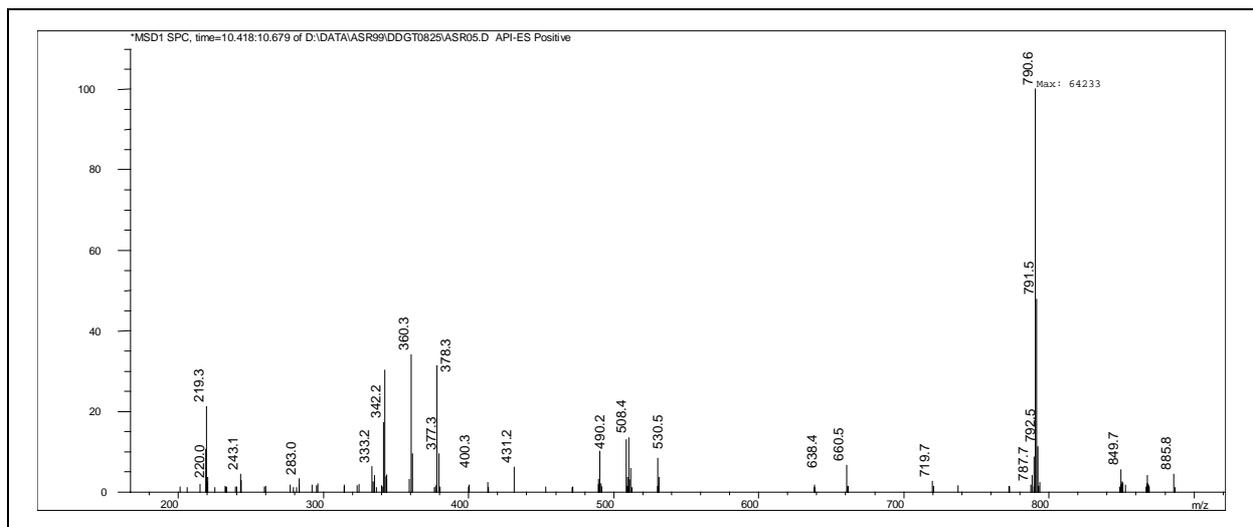
Darüber hinaus findet man auch kleine Anteile von nicht-markiertem und einfach-, zweifach- und vierfach-markiertem Digitoxin. Aus dem Massenspektrum der Verbindung läßt sich folgende Isotopenverteilung ablesen:  $[^2\text{H}_0] = 0,8 \%$ ,  $[^2\text{H}_1] = 2,4 \%$ ,  $[^2\text{H}_2] = 5,3 \%$ ,  $[^2\text{H}_3] = 62,2 \%$ ,  $[^2\text{H}_4] = 29,3 \%$ .

Neben dem Natriumaddukt als Basispeak ( $m/z$  790) sind als Fragmentionen ( $\text{F}+\text{H}^+$ )  $[^2\text{H}_3]\text{Digitoxigenin-mono-digitoxosid}$  ( $m/z$  638),  $[^2\text{H}_3]\text{Digitoxigenin-mono-digitoxosid}$  ( $m/z$  508) und  $[^2\text{H}_3]\text{Digitoxigenin}$  ( $m/z$  378) sowie die entsprechenden Natriumaddukte ( $m/z$  660, 530 und 400) zu beobachten. Durch Abspaltung der Hydroxygruppen am Steroidgerüst als Wasser entstehen die Ionen  $m/z$  490 sowie 360 und 342. Da auch diese Ionen ein um 3 Dalton

höheres Gewicht aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß die Deuteriumatome sich am Steroidteil des Moleküls befinden.



**Abb. 8:** Massenspektrum von Digitoxin nach Elektrospray-Ionisierung



**Abb. 9:** Massenspektrum von deuteriertem Digitoxin nach Elektrospray-Ionisierung

## 6.2 Reinheitsbestimmung der Cardioglycoside

Die Kalibration der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Methoden erfolgte mit Hilfe der natürlichen, nicht-markierten Cardioglycoside Digoxin bzw. Digitoxin. Diese Substanzen sind derzeit nicht als zertifizierte Referenzmaterialien mit einer Angabe über die Reinheit und deren Meßunsicherheit erhältlich. Daher wurden die europäisch anerkannten

Arzneimittelstandards dieser Substanzen mit HPLC-DAD auf ihre Reinheit untersucht und laborintern als Referenzmaterialien verwendet.

### **6.2.1 Bestimmung der Reinheit von Digoxin**

Unter den in 5.2.1 beschriebenen Bedingungen wurde Digoxin an einer mit Diol-Phase gefüllten HPLC-Säule chromatographiert (Abb. 10). Die Retentionszeit des Digoxins beträgt 12,4 min. Mit den Retentionszeiten 8,1 min, 10,3 min und 14,9 min sind weitere Signale detektiert worden, die signifikant vom Grundrauschen des Chromatogramms zu unterscheiden sind. In einem Leerwertchromatogramm des Lösungsmittelgemischs n-Heptan : iso-Propanol tritt keines dieser Signale auf.

Für die Berechnung der Reinheit des Digoxins wurde der prozentuale Anteil der Signalfäche des Digoxins bestimmt und die Ergebnisse aus zehn Bestimmungen gemittelt.

Der Digoxingehalt des untersuchten Arzneimittelstandards beträgt 96,839 %, die prozentuale Standardabweichung ist  $\pm 0,078$  %.

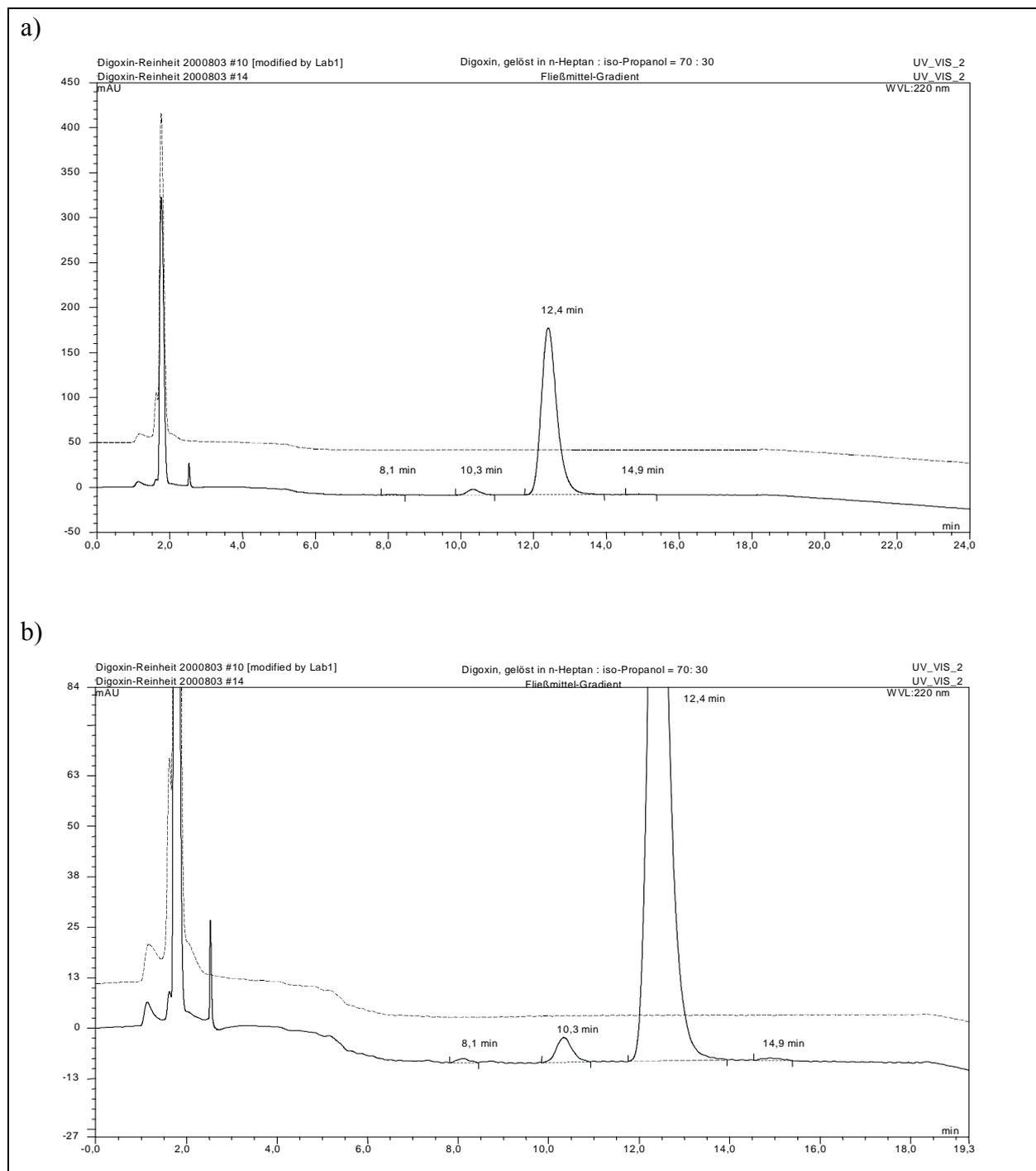
### **6.2.2 Bestimmung der Reinheit von Digitoxin**

Abbildung 11 zeigt die HPLC-Chromatographie des als Kalibriersubstanz verwendeten Digitoxins an einer Diol-Säule. Die Substanz eluierte bei den unter 5.2.2 beschriebenen Bedingungen mit einer Retentionszeit von 12,9 min.

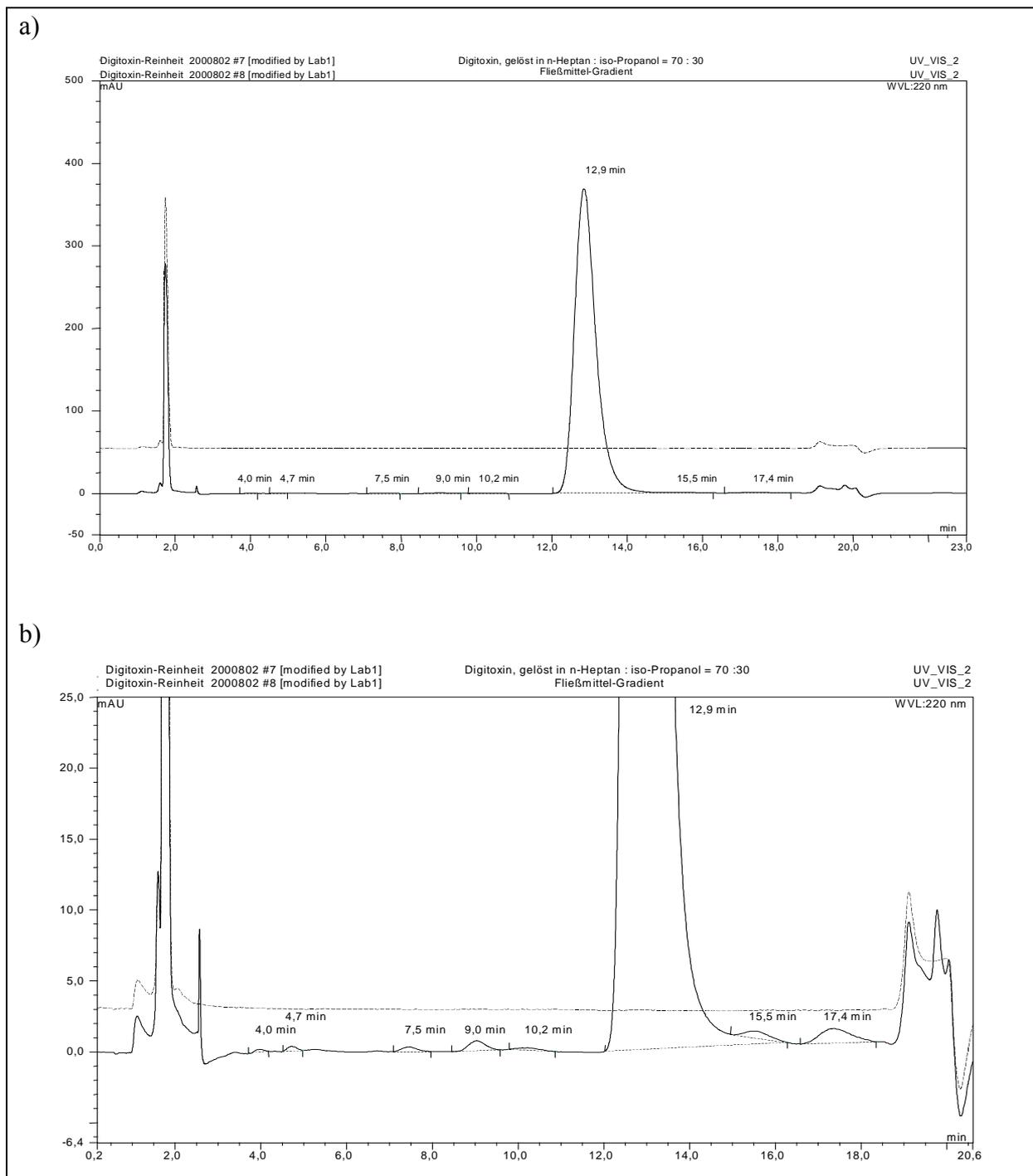
Im Chromatogramm sind weitere Signale mit den Retentionszeiten 4,0 min, 4,7 min, 7,5 min, 9,0 min, 10,2 min sowie 17,4 min zu erkennen, die sich signifikant vom Grundrauschen unterscheiden. Weiterhin ist in der Ausschnittvergrößerung des Chromatogramms des Digitoxins (Abb. 11 b) nach dem Digitoxin-Signal ein Nachpeak (Retentionszeit: 15,5 min) zuerkennen, der chromatographisch nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Bei der Bestimmung der Fläche des Digitoxin-Signals wurde die Fläche dieses Signals von der Gesamtfläche beider Signale subtrahiert. Mit Hilfe eines Leerwert-Chromatogramms konnte ausgeschlossen werden, daß Signale, die von Verunreinigungen des Lösungsmittels stammen, interferieren.

Die Reinheitsbestimmung wurde 10-mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Aus dem prozentualen Flächenanteil des Digitoxin-Signals wurde der Substanzgehalt berechnet.

Der Digitoxingehalt des verwendeten Arzneimittelstandards beträgt 99,23 % und die prozentuale Standardabweichung ist 0,14 %.



**Abb. 10:** HPLC-Chromatogramm von Digoxin an einer Diol-HPLC-Säule. Es erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 220 nm. Die nach Injektion von Leerwerten erhaltenen Chromatogramme sind als gestrichelte Linien dargestellt. a) Gesamtchromatogramm, b) Vergrößerter Ausschnitt aus dem Gesamtchromatogramm



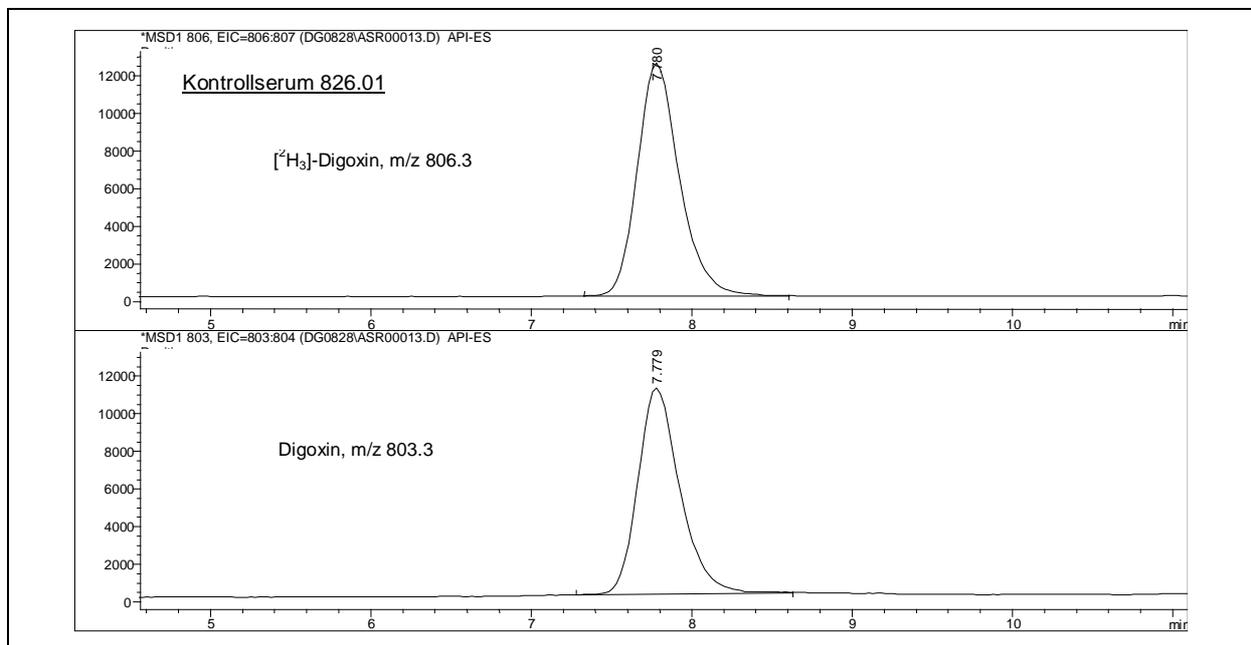
**Abb. 11:** HPLC-Chromatogramm von Digitoxin an einer Diol-HPLC-Säule. Es erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 220 nm. Die nach Injektion von Leerwerten erhaltenen Chromatogramme sind als gestrichelte Linien dargestellt.  
 a) Gesamtchromatogramm, b) Vergrößerter Ausschnitt aus dem Gesamtchromatogramm

## 6.3 Durchführung und Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode zur quantitativen Bestimmung von Digoxin im Serum

### 6.3.1 Bestimmung der Digoxinkonzentration im Serum mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode

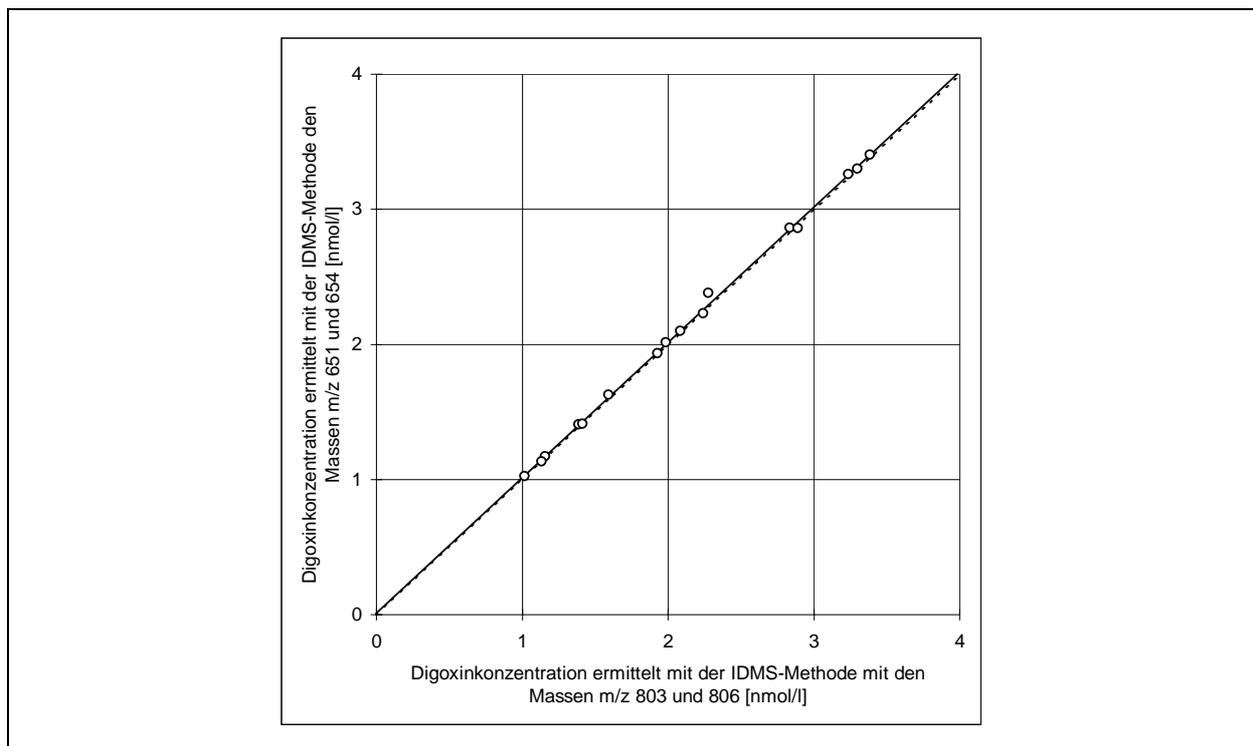
Mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode wurden die Digoxinkonzentrationen von insgesamt 16 Kontrollmaterialien und 33 Patientenseren bestimmt.

Nach Extraktion und chromatographischer Vorreinigung wurden die Serumproben an einer HPLC-Säule chromatographiert und das Eluat kontinuierlich in das Massenspektrometer geleitet. Die Aufzeichnung der massenspezifischen Chromatogramme erfolgte bei  $m/z$  803 für das Natriumaddukt des natürlichen Digoxins und  $m/z$  806 für das Natriumaddukt des  $[^2\text{H}_3]$ Digoxins. Abbildung 12 zeigt ein typisches Massenchromatogramm nach Aufarbeitung eines Kontrollmaterials.



**Abb. 12:** Massenspezifische HPLC-Chromatogramme nach Aufarbeitung einer Serumprobe; Aufzeichnung der Ionen  $m/z$  803 (Natriumaddukt des nicht-markierten Digoxins) und  $m/z$  806 (Natriumaddukt des deuterierten Digoxins)

Aus den Flächen dieser Signale wurde der Quotient  $R = \text{Fläche}_{m/z\ 803} / \text{Fläche}_{m/z\ 806}$  ermittelt. Mit Hilfe von Quotienten, die bei der Analyse von Kalibratoren erhalten wurden, konnte eine Kalibrationskurve erstellt und die Digoxinkonzentration in den Proben berechnet werden. Bei der Bestimmung von Digoxin in Kontrollmaterialien wurden darüber hinaus zur Kontrolle die Massen der Fragmentionen  $m/z\ 651$  bzw.  $654$  (für das natürliche bzw. das deuterierte Digoxigenin-bis-digitoxosid) aufgezeichnet. Auch aus diesen Signalfächen der Fragmentionen wurden unabhängig von der Auswertung der Molekülonen die Digoxinkonzentrationen berechnet.



**Abb. 13:** Vergleich der Digoxinkonzentrationen, berechnet aus den Isotopenverhältnissen der Massen  $m/z\ 803$ ,  $806$  und  $m/z\ 651$ ,  $654$ , ermittelt für 16 verschiedenen Kontrollmaterialien; die gestrichelt Linie ist die Identitätslinie

Durch die Verwendung unterschiedlicher Massenpaare ( $m/z\ 651$  und  $654$  bzw.  $m/z\ 803$  und  $806$ ) erfolgte die Bestimmung der Digoxinkonzentration von Kontrollmaterialien auf der Basis von zwei unabhängigen Detektionsmethoden. Die Ergebnisse beider Methoden (10.4, Tabelle 12) wurden einander graphisch gegenüber gestellt (Abb. 13) und mit Hilfe des statistischen Verfahrens nach Passing und Bablok (5.11.4) miteinander verglichen.

Die Gleichung für die Regressionsgerade lautet:

$$y = 1,001 * x + 0,015, \quad N = 16, \quad r = 0,999$$

- mit  $y$  = Digoxinkonzentration, berechnet aus dem Flächenverhältnis  $m/z 651 / m/z 654$   
 $x$  = Digoxinkonzentration, berechnet aus dem Flächenverhältnis  $m/z 803 / m/z 806$   
 $N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien  
 $r$  = Korrelationskoeffizient

Die hervorragende Übereinstimmung der Regressionsgeraden mit der Identitätslinie (Linie, die man bei exakter Übereinstimmung der Meßergebnisse erhalten würde) beweist, daß die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Meßverfahren nur minimal von einander abweichen.

Alle Proben und Kalibratoren wurden zweimal in das HPLC-MS-Gerät injiziert und analysiert. Für die Berechnung der Ergebnisse wurden die gemittelten Signalfächenverhältnisse der Doppelinjektionen verwendet.

Die Kontrollmaterialien wurden in mindestens drei von einander unabhängigen Serien (unterschiedliche Meßtage) jeweils im Doppelwert analysiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Kalibrationslösungen I war sichergestellt, daß die Berechnung der Ergebnisse dieser Serien jeweils auf einer anderen unabhängig ermittelten Kalibrationskurve basierte. Die ermittelten Konzentrationen der Kontrollmaterialien liegen in einem Bereich von 1,014 nmol/l (Kontrollserum 826 01) bis 3,384 nmol/l (Kontrollserum 727 02). Die Standardabweichung variiert von 0,0080 nmol/l (Kontrollmaterial 768 01) bis 0,044 nmol/l (Kontrollmaterial 826 06), die relative Standardabweichung (VK) liegt zwischen 0,49 % (Kontrollmaterial 826 04) und 2,2 % (Kontrollmaterial 826 03). Die aus den Doppelbestimmungen der verschiedenen Kontrollmaterialien berechnete Standardabweichung beträgt 0,018 nmol/l, was einer relativen Standardabweichung von 0,86 % entspricht. Die für Kontrollmaterialien ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 13 im Anhang aufgelistet.

Analog zu den Kontrollmaterialien wurden die Digoxinkonzentrationen in Patientenseren bestimmt. Von diesen Materialien standen in der Regel nur vergleichsweise kleine Volumina zur Verfügung, mit denen die Proben nicht in mehreren unabhängigen Analysenserien sondern nur einmal im Doppelwert analysiert werden konnten. Die Konzentrationen der untersuchten Patientenseren erstreckten sich über einen Bereich von 0,0090 nmol/l (Serum Nr. 2) bis 3,163 nmol/l (Serum Nr. 5). Die aus den Doppelbestimmungen errechnete

Standardabweichung beträgt 0,036 nmol/l. Dies entspricht einer durchschnittlichen relativen Standardabweichung von 3,4 %.

Die Ergebnisse für die Analysen für die Patientenseren sind in Tabelle 14 zu finden.

## **6.3.2 Validierung der HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Digoxin**

### **6.3.2.1 Präzision der Methode**

Es wurden unterschiedliche Komponenten, die die Präzision der Methode beeinträchtigen, betrachtet. Im Detail sind die Validierungsergebnisse in 10.4, Tabelle 13, 15 und 16 aufgeführt.

#### **Impräzision unter Wiederholungsbedingungen**

Das Kontrollmaterial 826 02 wurde für die Beurteilung der Präzision unter Wiederholungsbedingungen parallel zehnmal nach der hier beschriebenen Methode aufgearbeitet und innerhalb einer Serie analysiert. Die Digoxinkonzentration betrug im Mittel 2,262 nmol/l. Als Maß für die Impräzision unter Wiederholungsbedingungen wurde eine Standardabweichung von 0,015 nmol/l bzw. eine relative Standardabweichung von 0,67 % berechnet.

Aus den Doppelbestimmungen, die für die 16 verschiedenen Kontrollmaterialien in verschiedenen Serien durchgeführt wurden, konnte ebenfalls die Präzision in den Serien ermittelt werden. Die relative Standardabweichung unter Wiederholungsbedingungen lag für diese Materialien in einem Bereich von 0,37 % (Kontrollmaterial 826 04) bis 1,2 % (Kontrollmaterialien 727 01 und 826 01) (10.4, Tabelle 13).

#### **Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen**

Die Impräzisionen unter Reproduzierbarkeitsbedingungen der analysierten Kontrollmaterialien lagen in einem Intervall von 0,014 % (Kontrollmaterial 727 01) bis 1,5 % (Kontrollmaterial 826 03) (10.4, Tabelle 13).

Bei dem Kontrollmaterial 826 03 fiel der f-Test positiv aus, so daß in diesem Fall die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen signifikant zur Gesamtpräzision beitrug.

### **Impräzision der Volumendosierung**

Die verwendeten Probenvolumina lagen in einem Bereich von 0,630 und 2,460 ml, die Standardabweichungen für diese Dosierungen in einem Intervall von 0,00017 bis 0,00057 ml. Relativ ausgedrückt lag die Impräzision zwischen 0,010 und 0,054 % (10.4, Tabelle 15).

Für die Kalibratoren wurden Volumina von 100 bis 300 µl verwendet. Als Maß für die Impräzision wurden Standardabweichungen zwischen 0,056 und 0,080 µl ermittelt, die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,026 und 0,075 % (10.4, Tabelle 16).

Die Rekonstitution der lyophilisierten Kontrollmaterialien erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers mit 3 ml Aqua dest. Bei der 10fach-Wägung dieses Volumens wurde die Standardabweichung mit 0,00032 ml (relative Standardabweichung 0,011 %) bestimmt. Ebenso wurde das Volumen, welches der Kalibratorlösung I entnommen und zur Kalibratorlösung II verdünnt wurde, kalibriert. Das exakte Volumen betrug 250,241 µl, die Standardabweichung war 0,027 µl, was einer relativen Standardabweichung von 0,011 % entspricht.

### **Impräzision der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-Gerät**

Für die Ermittlung der Impräzision des HPLC-MS-Systems wurde ein Gemisch aus nicht-markiertem und deuteriertem Digoxin zehnmal unter Wiederholungsbedingungen gemessen. Aus den Signalflächen der massenspezifischen Chromatogramme, aufgezeichnet bei den Massen m/z 803 und 806, wurden die Flächenverhältnisse berechnet. Der Mittelwert der Flächenverhältnisse war 1,036. Die Standardabweichung als Maß für die Impräzision der Messungen betrug 0,010, was einer relativen Standardabweichung von 0,97 % entspricht.

### **Gesamtpräzision**

Die Einzelergebnisse für die analysierten Kontrollmaterialien sind unter dem Einfluß der beschriebenen Impräzisionen der Volumendosierungen und der Isotopenverhältnismessungen mit dem HPLC-MS-Gerät bestimmt worden. In der Gesamtstreuung der Meßergebnisse sind daher alle Einzelkomponenten, beispielsweise die Streuungen „unter Wiederholungsbedingungen“ und „unter Reproduzierbarkeitsbedingungen“, bei der Berechnung nach Gl. 8 bzw. Gl. 10 enthalten.

Die Digoxinkonzentrationen der analysierten Kontrollmaterialien lagen in einem Bereich von 1,014 bis 3,384 nmol/l. Die Standardabweichungen als Maß für die Gesamtpräzision reichten von 0,0080 und 0,044 nmol/l. Die relative Standardabweichung umfaßte ein Intervall von 0,49 bis 2,2 % (10.4, Tabelle 13).

### 6.3.2.2 Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze

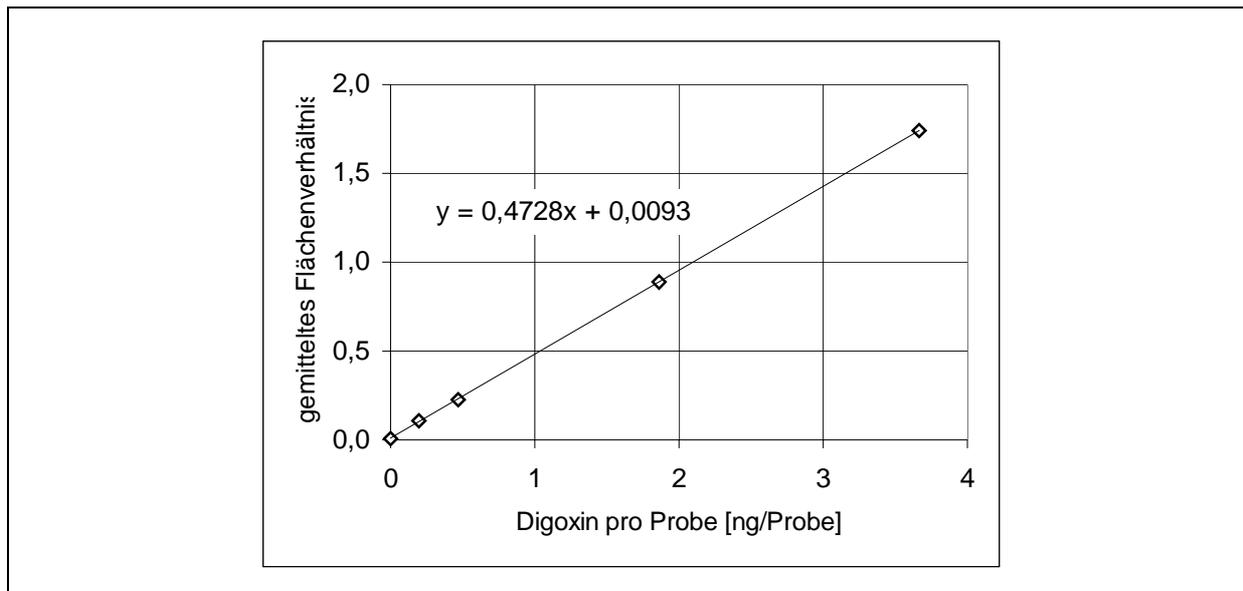
Die Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze erfolgte mit Hilfe der Leerwertmethode (5.9.3). Als Leerserum wurde ein lyophilisiertes Kontrollmaterial der Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie verwendet, welches kein Digoxin enthielt (Kontrollmaterial 646 00), dem jedoch deuteriertes Digoxin zugegeben wurde. Bei der HPLC-MS-Analyse dieses 'Leerserums' wurden keine durch das Serummaterial bedingten Interferenzen nachgewiesen. Aliquote dieses Leerserums wurden mit unterschiedlichen Digoxinmengen von 0 bis 3,7 ng aufgestockt und in Mehrfachbestimmungen ( $n = 6$ ) vermessen. Die Flächenverhältnisse wurden aus den Signalflächen der Massen  $m/z$  803 und 806 berechnet und gemittelt. Nach Gl. 8 wurden die jeweiligen Standardabweichungen  $S$  bestimmt (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Digoxinkonzentrationen, Flächenverhältnisse und Streuungsparameter bei Anwendung der Leerwertmethode zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

Digoxin pro Probe [ng/Probe]	Mittelwert der Flächenverhältnisse $\bar{x}$	Standardabweichung der Flächenverhältnisse $S$	Variationskoeffizient der Flächenverhältnisse VK [%]
0	0,0088	<b>0,0015 (= <math>S_L</math>)</b>	17,0
0,19618	0,1063	0,0022	2,0
0,47046	0,2280	0,0043	1,9
1,86066	0,8883	0,0080	0,91
3,6480	1,743	0,022	1,3

Die analysierten Flächenverhältnisse der Leerprobe sowie der Proben der Konzentrationsreihe wurde gegen die eingesetzten Digoxinmengen pro Probe aufgetragen (Abb. 14). Die Kalibrationskurve hatte im unteren, weitgehend linearen Bereich eine Steigung von  $b = 0,4728$ .

Nach Gl. 5 wurde die **Nachweisgrenze** berechnet mit  $x_{(NG)} = 0,0095$  ng/Probe (0,012 pmol/Probe). Als **Erfassungsgrenze** wurde  $x_{(EG)} = 0,019$  ng/Probe (0,024 pmol/Probe) ermittelt (Gl. 6). Die **Bestimmungsgrenze** liegt bei  $x_{(BG)} = 0,029$  ng/Probe (0,037 pmol/Probe) (Gl. 7).



**Abb. 14:** Graphische Darstellung zur Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze mit der Leerwertmethode

### 6.3.3 Meßunsicherheit der Methode

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Impräzisionen „unter Wiederholungsbedingungen“, „unter Reproduzierbarkeitsbedingungen“, der Volumendosierungen und der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-System im einzelnen quantifiziert. Als Gesamtimpräzision zusammengefaßt bilden diese Komponenten die zufällige Meßunsicherheit ( $u_A$ ) der Methode. In Abhängigkeit vom Untersuchungsmaterial variiert die zufällige Meßunsicherheit von 0,0080 bis 0,044 nmol/l. Relativ zur Konzentration betrachtet umfaßt die Standardabweichung ein Intervall von 0,49 bis 2,2 %.

Zur systematischen Meßunsicherheit ( $u_B$ ) tragen neben der Unsicherheit der Reinheit des Kalibrationsmaterials und der Einwaage des Kalibrationsmaterials auch die Meßunsicherheiten der durch Wägung kalibrierten Volumina bei. Diese Anteile entsprechen den Meßunsicherheiten der zur Kalibration verwendeten, zertifizierten Kalibriergewichte, die aus den Zertifikaten der PTB bzw. der Kalibrierlaboratorien des Deutschen Kalibrierdienstes entnommen werden können.

**Tabelle 8:** Meßunsicherheitsbudget der Digoxinkonzentration des Kontrollmaterials  
826 01 (ermittelte Digoxinkonzentration = 1,014 nmol/l)

<b>a) Zufällige Meßunsicherheit <math>u_A</math></b>				
<b>Parameter</b>			<b>Meßunsicherheit (<math>u_A</math>)</b>	
Standardabweichung unter Wiederholungsbedingungen			0,0098 nmol/l	1,2 %
Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen			0,0078 nmol/l	0,77 %
Kombinierte zufällige Meßunsicherheit $u_A$			0,010 nmol/l	0,97 %
<b>b) Systematische Meßunsicherheit <math>u_B</math></b>				
<b>Parameter</b>	<b>Nominalwert</b>	<b>Kalibrierter Wert</b>	<b>Meßunsicherheit (<math>u_B</math>)</b>	
Reinheit des Kalibrationsmaterials	96,8 %	96,8 %		0,078 %
Einwaage des Kalibrationsmaterials	2 mg	2,059 mg	0,001 mg	0,049 %
Volumen des Meßkolbens I	100 ml	100,011 ml	0,031 $\mu$ l	0,000031 %
Volumen des Meßkolbens II	250 ml	250,081 ml	0,066 $\mu$ l	0,000026 %
Volumen Kalibrator I	250 $\mu$ l	250,2410 $\mu$ l	0,00045 $\mu$ l	0,00018 %
Volumina Kalibrator II	150 $\mu$ l	149,4257 $\mu$ l	0,00040 $\mu$ l	0,00027 %
	200 $\mu$ l	199,2646 $\mu$ l	0,00038 $\mu$ l	0,00019 %
	250 $\mu$ l	249,4843 $\mu$ l	0,00045 $\mu$ l	0,00018 %
Rekonstitutionsvolumen	3 ml	3,0016 ml	0,00098 $\mu$ l	0,000033 %
Serumvolumen	2,460 ml	2,4431 ml	0,0090 $\mu$ l	0,00037 %
<b>c) Zusammenfassung des Meßunsicherheitsbudgets</b>				
<b>Parameter</b>			<b>Meßunsicherheit</b>	
Zufällige Meßunsicherheit ( $u_A$ )			0,010 nmol/l	0,97 %
Systematische Meßunsicherheit ( $u_B$ )			0,00093 nmol/l	0,092 %
Kombinierte Meßunsicherheit ( $u$ )			0,010 nmol/l	0,97 %
Erweiterte Meßunsicherheit ( $U$ )			0,020 nmol/l	1,9 %

Aus den Meßunsicherheiten all dieser Parameter wurde nach Gl. 3 der Gesamtbeitrag der systematischen Meßunsicherheit zur kombinierten Meßunsicherheit ( $u$ ) mit  $u_B = 0,092 \%$  errechnet. Die für dieses Ergebnis entscheidenden Anteile sind die Meßunsicherheit der Reinheit (0,078 %) und die der Einwaage (0,049 %) des Kalibrationsmaterials. Dagegen sind die Anteile der Meßunsicherheit für die Wägungen zur Kalibrierung der Volumina vernachlässigbar klein.

Ermittelt man aus systematischer und zufälliger Meßunsicherheit nach Gl. 3 die kombinierte Meßunsicherheit bzw. nach Gl. 4 die erweiterte Meßunsicherheit, so stellt sich heraus, daß der Anteil der systematischen Meßunsicherheit ( $u_B$ ) nicht signifikant für das Ergebnis ist. Als typisches Beispiel ist in Tabelle 8 das Meßunsicherheitsbudget für die Ermittlung eines Referenzmethodenwerts für das Kontrollmaterial 826 01 mit allen Komponenten zusammengefaßt.

In Tabelle 13 (10.4) sind die für die Kontrollmaterialien bestimmten erweiterten Meßunsicherheiten aufgeführt.

Das Kontrollmaterial 826 04 hat mit  $u = 0,49 \%$  bzw.  $U = 1,0 \%$  (erweiterte Meßunsicherheit) die geringste Meßunsicherheit und das Kontrollmaterial 826 03 die größte mit  $u = 2,2 \%$  bzw.  $U = 4,3 \%$ .

## **6.4 Durchführung und Validierung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode zur quantitativen Bestimmung von Digitoxin im Serum**

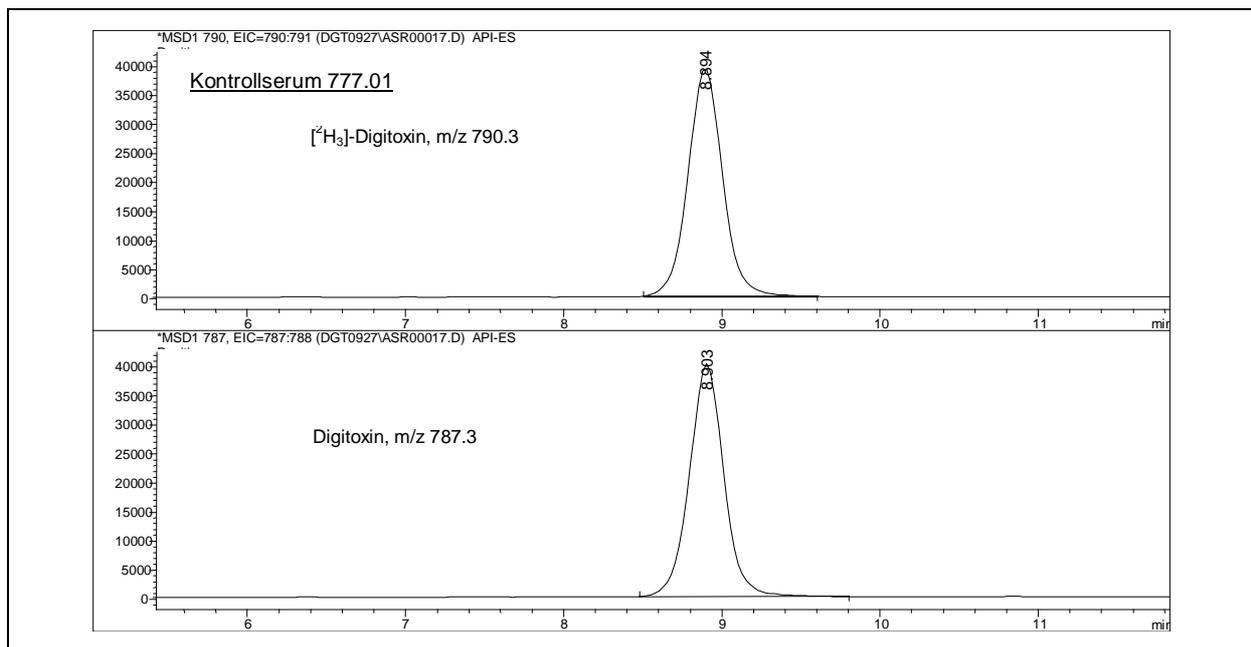
### **6.4.1 Bestimmung der Digitoxinkonzentration im Serum mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in 20 Kontrollmaterialien und 34 Patientenseren die Digitoxinkonzentrationen mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode bestimmt.

Die Proben wurden im Anschluß an eine Extraktion mit tert-Butylmethylether und säulenchromatographischer Vorreinigung an einer Diol-Säule mit dem HPLC-MS-Gerät analysiert. Dabei erfolgte die Aufzeichnung von massenspezifischen Chromatogrammen bei  $m/z$  787 für das Natriumaddukt des nicht-markierten Digitoxins und  $m/z$  790 für das Natriumaddukt des [ $^2\text{H}_3$ ]Digitoxins (Abb. 15). Aus den Signalflächen wurde der Quotient  $R =$

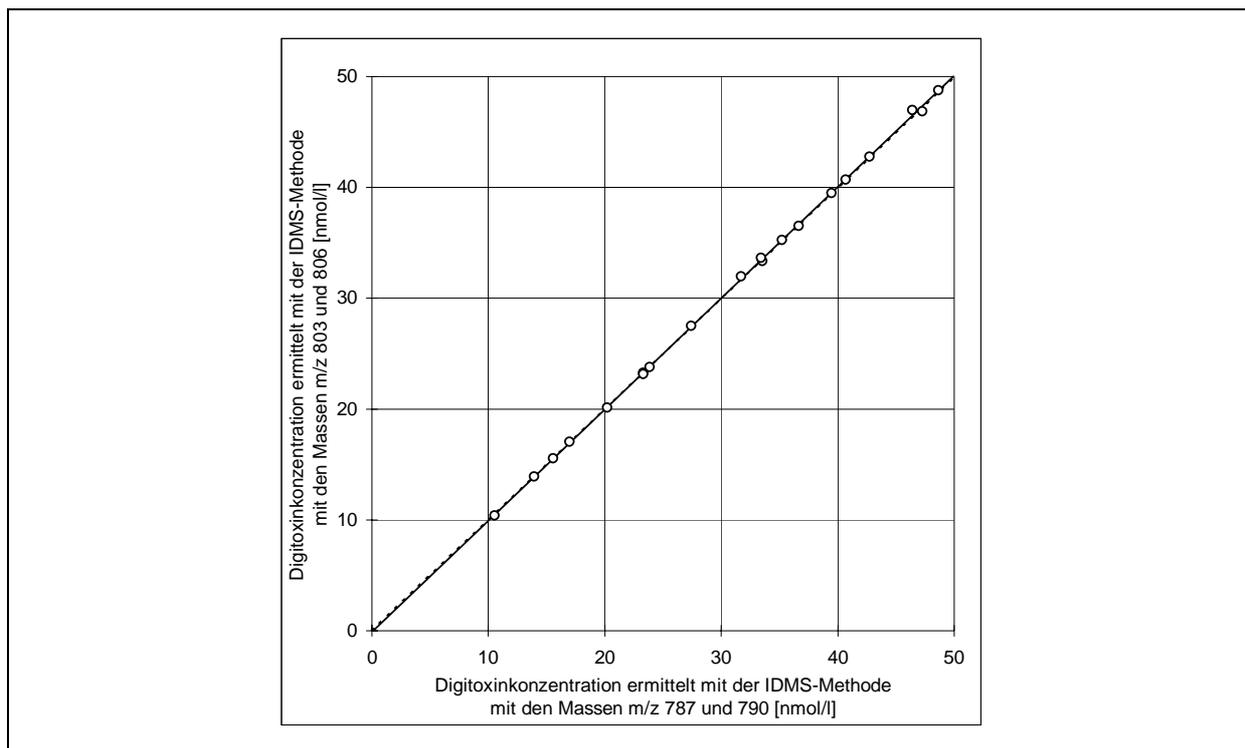
Fläche  $m/z$  787/ Fläche  $m/z$  790 berechnet. Aus den Quotienten der Signalflächen der Kalibratoren wurde die Kalibrationskurve (siehe 10.2) und anschließend nach Gl. 16 bzw. 17 die Digitoxinkonzentration der Proben errechnet.

In den Kontrollmaterialien wurden zur Überprüfung der Richtigkeit Zusatzversuche durchgeführt, bei denen die Digitoxinkonzentration aus massenspezifischen Chromatogrammen der Ionen  $m/z$  803 bzw. 806 für das Kaliumaddukt des nicht-markierten bzw. des deuterierten Digitoxins in unabhängigen Analysenserien aufgezeichnet und ausgewertet wurden.



**Abb. 15:** Massenspezifische HPLC-Chromatogramme nach Aufarbeitung einer Serumprobe; Aufzeichnung der Ionen  $m/z$  787 (Natriumaddukt des nicht-markierten Digitoxins) und  $m/z$  790 (Natriumaddukt des deuterierten Digitoxins)

Die beiden beschriebenen Digitoxinmethoden basieren auf der Detektion unterschiedlicher Ionenpaare. Daher können die beiden Methoden als unabhängig von einander betrachtet werden. Die Ergebnisse (10.5, Tabelle17) wurden mit dem statistischen Verfahren nach Passing und Bablok miteinander verglichen. Abbildung 16 zeigt die graphische Darstellung.



**Abb. 16:** Vergleich der Digitoxinkonzentrationen, berechnet aus den Isotopenverhältnissen der Massen  $m/z$  787, 790 und  $m/z$  803, 806, ermittelt für 16 verschiedene Kontrollmaterialien; die gestrichelte Linie ist die Identitätslinie

Folgende Gleichung wurde für die Regressionsgerade ermittelt:

$$y = 1,004 * x - 0,101, \quad N = 20, \quad r = 1,000$$

mit  $y$  = Digitoxinkonzentration, berechnet aus dem Flächenverhältnis  $m/z$  803 /  $m/z$  806

$x$  = Digitoxinkonzentration, berechnet aus dem Flächenverhältnis  $m/z$  787 /  $m/z$  790

$N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien

$r$  = Korrelationskoeffizient

Wie das Diagramm zeigt, sind die Regressionsgerade und die Identitätslinie (gestrichelt), die man bei exakter Übereinstimmung der Ergebnisse erhalten würde, nahezu deckungsgleich. Daher können die Ergebnisse der beiden Meßmethoden als sehr gut übereinstimmend beurteilt werden.

Für die Ermittlung der Digitoxinkonzentrationen in Kontrollmaterialien wurden diese in mindestens drei von einander unabhängigen Serien jeweils im Doppelwert analysiert.

Die Analysenserien können als unabhängig gelten, da für jede Serie eine neue Kalibrationskurve auf der Basis einer neu eingewogenen Kalibrationslösung I erstellt wurde.

Für die Kontrollmaterialien wurden Konzentrationen in einem Bereich von 10,52 nmol/l (Kontrollserum 858 04) bis 48,63 nmol/l (Kontrollserum 748 13) bestimmt. Die Standardabweichungen liegen zwischen 0,047 nmol/l (Kontrollmaterial 748 14) und 0,26 nmol/l (Kontrollmaterialien 777 06 und AP 5), und die relative Standardabweichung (VK) variiert von 0,18 % (Kontrollmaterial 777 05) bis 0,81 % (Kontrollmaterial 858 04). Die aus Doppelbestimmungen errechnete Standardabweichung beträgt 0,11 nmol/l; dies entspricht einer relativen Standardabweichung von 0,38 %.

Nach der hier beschriebenen Methode erfolgte auch die Bestimmung der Digitoxinkonzentration in Patientenseren. Von diesen Materialien standen in der Regel nur so kleine Volumina zur Verfügung, so daß nur einmal eine Doppelbestimmung durchgeführt werden konnte. Die Konzentrationen der Patientenseren liegen in einem Bereich von 0,58 nmol/l (Serum Nr. 9) bis 37,34 nmol/l (Serum Nr. 17). Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen errechnet sich eine Standardabweichung von 0,13 nmol/l; dies entspricht einer relativen Standardabweichung von 0,87 %.

In den Tabellen 18 bzw. 19 (10.5) sind die Ergebnisse für die Kontrollmaterialien bzw. Patientenseren aufgeführt.

## **6.4.2 Validierung der HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Digitoxin**

### **6.4.2.1 Präzision der Methode**

Für die Beurteilung der Präzision der Methode wurden die dazu beitragenden Komponenten untersucht. Alle Ergebnisse sind unter 10.5 in den Tabellen 18, 20 und 21 dargestellt.

#### **Impräzision unter Wiederholungsbedingungen**

Für die Bestimmung der Impräzision unter Wiederholungsbedingungen wurde das Kontrollmaterial AP 5 zwölfmal in einer Serie aufgearbeitet und mit dem HPLC-MS-Instrument analysiert.

Der Mittelwert der 12 Ergebnisse betrug 35,512 nmol/l. Die Standardabweichung als Maß für die Impräzision unter Wiederholungsbedingungen betrug 0,085 nmol/l, was einer relativen Standardabweichung von 0,24 % entspricht.

Darüber hinaus wurde für jedes der 20 Kontrollmaterialien die Präzision unter Wiederholungsbedingungen aus den Doppelbestimmungen ermittelt. Die relative Standardabweichung lag für diese Materialien in einem Bereich von 0,058 % (Kontrollmaterial AP 6) bis 0,75 % (Kontrollmaterial 858 04) (10.5, Tabelle 18).

### **Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen**

Die Impräzisionen der analysierten Kontrollmaterialien lagen unter Reproduzierbarkeitsbedingungen in einem Intervall von 0,027 % (Kontrollmaterial 777 04) bis 0,70 % (Kontrollmaterial AP 5) (10.5, Tabelle 18).

Mit statistischen Methoden (f-Test) konnte nachgewiesen werden, daß die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen nicht signifikant zur Gesamtpräzision beitrug (Ausnahme: Kontrollmaterial AP 6).

### **Impräzision der Volumendosierung**

Für die Dosierung von Serum wurden Volumina im Bereich von 240 bis 1000 µl verwendet. Die im Rahmen der Kalibration ermittelten Impräzisionen liegen in einem Intervall von 0,13 bis 0,54 µl, was einer relativen Standardabweichung von 0,025 bis 0,17 % entspricht (10.5, Tabelle 20).

Für die Volumina der Kalibratoren (100 bis 250 µl) wurden Standardabweichungen zwischen 0,056 und 0,075 µl ermittelt, die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,026 und 0,075 % (10.5, Tabelle 21).

Das Volumen zur Rekonstitution der lyophilisierten Kontrollmaterialien (3 ml) wurde durch 10-fach Wägung kalibriert. Die Standardabweichung dieser Dosierung betrug 0,00032 ml (VK = 0,011 %).

Das Volumen, welches der Kalibratorlösung I entnommen wurde, betrug 250,241 µl. Die Impräzision wurde mit 0,027 µl berechnet (VK = 0,011 %).

### **Impräzision der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-Gerät**

Um die Meßpräzision des HPLC-MS-Systems unter Wiederholungsbedingungen zu ermitteln, wurden Aliquote eines Gemischs aus nicht-markiertem und deuteriertem Digitoxin zehnmal nacheinander gemessen und die massenspezifischen Chromatogramme der Massen m/z 787

und 790 ausgewertet. Der Mittelwert der Isotopenverhältnisse war 1,0040, die Standardabweichung als Maß für die Impräzision der Messungen betrug 0,0050 (VK = 0,50 %).

### **Gesamtpräzision**

Die Einzelergebnisse für jedes Kontrollmaterial sind unter dem Einfluß der beschriebenen Impräzisionen der Volumendosierung und des HPLC-MS-Geräts ermittelt worden. In der Gesamtpräzision, berechnet nach Gl. 8 bzw. 10, sind alle einzelnen Beiträge der Impräzision, zu denen auch die Impräzisionen „unter Wiederholungsbedingungen“ und „unter Reproduzierbarkeitsbedingungen“ gehören, enthalten.

Für die Kontrollmaterialien wurden Digitoxinkonzentrationen im Bereich von 10,52 bis 48,63 nmol/l analysiert. Die berechnete Gesamtpräzision lag zwischen 0,047 und 0,26 nmol/l. Die relativen Standardabweichungen umfassen ein Intervall von 0,18 bis 0,81 % (10.5, Tabelle 18).

### **6.4.2.2 Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze**

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze des Meßverfahrens wurde die Leerwertmethode [35] angewandt. Hierfür wurde vorab lyophilisiertes Kontrollmaterial auf seine Eignung als Leerserum getestet.

Für das Kontrollmaterial 646 00 der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie konnte nachgewiesen werden, daß es kein Digitoxin enthielt. Darüber hinaus wurden keine durch das Serum bedingte Interferenzen nachgewiesen, so daß das Kontrollmaterial 646 00 als Leerserum geeignet war.

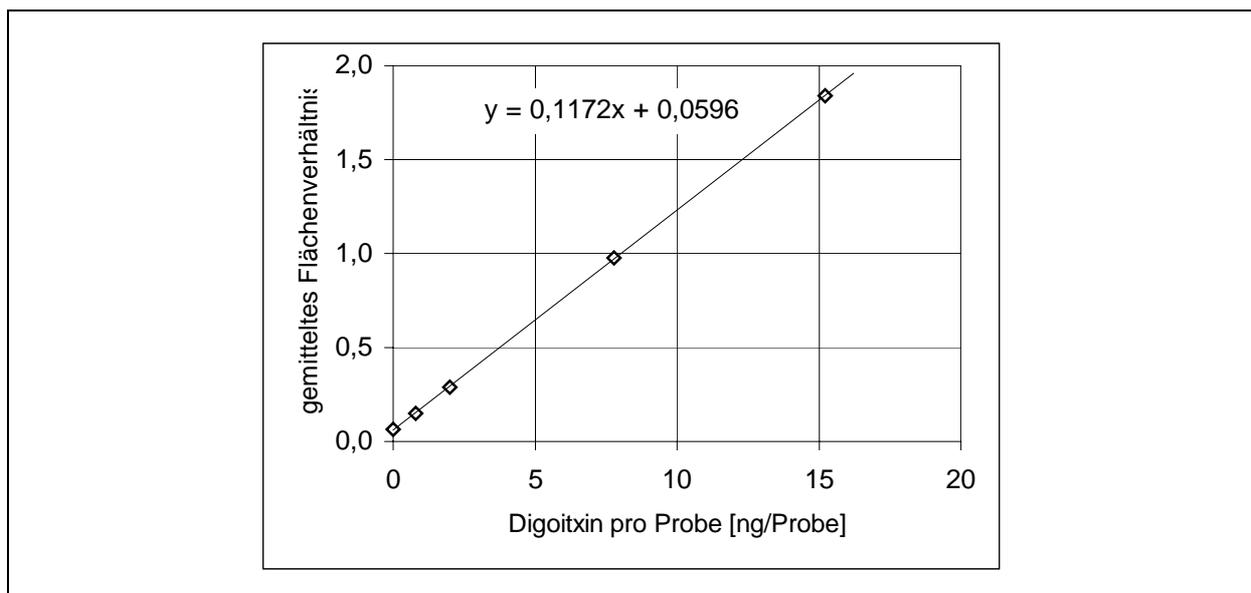
Die Durchführung der Leerwertmethode erfolgt auf die unter 5.9.3 beschriebene Weise. Bei der Auswertung wurden die Isotopenverhältnisse, bestimmt aus den Signalflächen der Massen  $m/z$  787 und 790, gemittelt. Nach Gl. 8 wurden die jeweiligen Standardabweichungen  $S$  bestimmt (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Zusammenstellung über die Digitoxinmengen der Proben, die im Rahmen der Leerwertmethode präpariert wurden, sowie die ermittelten Ergebnisse für die entsprechenden Flächenverhältnisse und ihre Standardabweichungen

<b>Digitoxin pro Probe [ng/Probe]</b>	<b>Mittelwert der Flächenverhältnisse <math>\bar{x}</math></b>	<b>Standardabweichung der Flächenverhältnisse S</b>	<b>Variationskoeffizient der Flächenverhältnisse VK [%]</b>
0	0,0631	<b>0,0013 (= S<sub>L</sub>)</b>	2,1
0,80119	0,15117	0,00075	0,50
1,99082	0,2898	0,0029	1,0
7,78909	0,9757	0,0033	0,33
15,20521	1,8405	0,0070	0,38

Die analysierten Flächenverhältnisse der Leerprobe sowie der Proben der Konzentrationsreihe wurden gegen die eingesetzten Digitoxinmengen pro Probe aufgetragen (Abb. 17). Die Kalibrationskurve ist in dem untersuchten Bereich annähernd linear. Für diesen Abschnitt wurde eine Steigung von  $b = 0,1172$  ermittelt.

Die **Nachweisgrenze** betrug  $x_{(NG)} = 0,033$  ng/Probe (0,043 pmol/Probe) (Gl. 5). Die **Erfassungsgrenze** liegt nach Gl. 6 bei  $x_{(EG)} = 0,067$  ng/Probe (0,087 pmol/Probe). Als **Bestimmungsgrenze** wurde  $x_{(BG)} = 0,10$  ng/Probe (0,13 pmol/Probe) (Gl. 7) ermittelt.



**Abb. 17:** Graphische Darstellung zur Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze mit der Leerwertmethode

### 6.4.3 Meßunsicherheit der Methode

Die Gesamtmeßunsicherheit der Methode setzt sich aus zufälligen und systematischen Komponenten zusammen.

Das Ergebnis der Gesamtimpräzision umfaßt alle Komponenten der Impräzision der Methode und beschreibt somit die zufällige Meßunsicherheit ( $u_A$ ) der Methode. Im Rahmen der durchgeführten Analysen liegt die zufällige Meßunsicherheit in Abhängigkeit vom Kontrollmaterial zwischen 0,18 und 0,81 %.

Bei der Bestimmung der systematischen Meßunsicherheit ( $u_B$ ) wurden die Unsicherheit der Reinheit des Kalibrationsmaterials, der Einwaage des Kalibrationsmaterials und der Kalibration der Volumina berücksichtigt. Die Meßunsicherheit der Reinheit beträgt 0,14 %, und die Meßunsicherheit der Einwaage des Kalibrationsmaterials ist 0,050 %. Die Meßunsicherheitsanteile der Volumenkalibration entsprechen denen der zur Kalibration verwendeten, zertifizierten Kalibriergewichte.

Aus den Meßunsicherheiten all dieser Parameter berechnet sich nach Gl. 3 der Gesamtbeitrag der systematischen Meßunsicherheit mit  $u_B = 0,17$  %, wobei die Meßunsicherheit der Reinheit und die der Einwaage des Kalibrationsmaterials die entscheidenden Anteile sind.

Die Berechnung der kombinierten Meßunsicherheit ( $u$ ) bzw. der erweiterten Meßunsicherheit ( $U$ ) erfolgt nach Gl. 3 bzw. Gl. 4. Hierbei ist festzustellen, daß der Anteil der systematischen Meßunsicherheit ( $u_B$ ) signifikant zum Gesamtergebnis beiträgt. Als Beispiel für das Meßunsicherheitsbudget eines typisches Kontrollmaterials sind in Tabelle 10 alle Meßunsicherheitsparameter für das Kontrollmaterial 748 15 zusammengefaßt.

Die erweiterten Meßunsicherheiten sind für alle Kontrollmaterialien in Tabelle 18 (10.5) zusammen gefaßt. Die geringste Meßunsicherheit wurde für das Kontrollmaterial 777 05 ( $u = 0,25$  % bzw.  $U = 0,50$  %) ermittelt. Die Meßunsicherheit des Kontrollmaterials 858 04 war mit  $u = 0,85$  % bzw.  $U = 1,7$  % die größte.

**Tabelle 10:** Meßunsicherheitsbudget der Digitoxinkonzentration des Kontrollmaterials  
748 15 (ermittelte Digitoxinkonzentration = 23,30 nmol/l)

<b>a) Zufällige Meßunsicherheit <math>u_A</math></b>				
<b>Parameter</b>			<b>Meßunsicherheit (<math>u_A</math>)</b>	
Standardabweichung unter Wiederholungsbedingungen			0,065 nmol/l	0,28 %
Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen			0,089 nmol/l	0,38 %
Gesamtpräzision			0,10 nmol/l	0,44 %
<b>b) Systematische Meßunsicherheit <math>u_B</math></b>				
<b>Parameter</b>	<b>Nominalwert</b>	<b>Kalibrierter Wert</b>	<b>Meßunsicherheit (<math>u_B</math>)</b>	
Reinheit des Kalibrationsmaterials	99,23 %	99,23 %		0,14 %
Einwaage des Kalibrationsmaterials	2 mg	2,020 mg	0,001 mg	0,050 %
Volumen des Meßkolbens I	50 ml	50,102 ml	0,0019 ml	0,0038 %
Volumen des Meßkolbens II	250 ml	249,934 ml	0,066 µl	0,000026 %
Volumen Kalibrator I	250 µl	250,2410 µl	0,00045 µl	0,00018 %
Volumina Kalibrator II	150 µl	149,4257 µl	0,00040 µl	0,00027 %
	200 µl	199,2646 µl	0,00038 µl	0,00019 %
	250 µl	249,4843 µl	0,00045 µl	0,00018 %
Rekonstitutionsvolumen	3 ml	3,0016 ml	0,00098 µl	0,000033 %
Serumvolumen	0,450 ml	0,4467 ml	0,00038 µl	0,085 %
<b>c) Zusammenfassung des Meßunsicherheitsbudgets</b>				
<b>Parameter</b>			<b>Meßunsicherheit</b>	
Zufällige Meßunsicherheit ( $u_A$ )			0,10 nmol/l	0,44 %
Systematische Meßunsicherheit ( $u_B$ )			0,040 nmol/l	0,17 %
Kombinierte Meßunsicherheit ( $u$ )			0,11 nmol/l	0,47 %
Erweiterte Meßunsicherheit ( $U$ )			0,22 nmol/l	0,94 %

## 6.5 Beurteilung von Routinemethoden zur Bestimmung von Cardioglycosiden

Die hier beschriebenen massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethoden zur Bestimmung von Cardioglycoside sollen als Referenzmeßverfahren dazu dienen, die in Klinisch-Chemischen Routinelaboratorien eingesetzten Testverfahren auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen. Hierzu wurden sowohl in Kontrollmaterialien als auch in Patientenseren die Analytkonzentrationen unter Routinebedingungen bestimmt und die Ergebnisse mit massenspektrometrisch ermittelten Referenzmethodenwerten verglichen.

Die Analytkonzentrationen in den Kontrollmaterialien und Patientenseren wurden in Klinisch-Chemischen Routinelaboratorien als Doppelwerte bestimmt.

### 6.5.1 Enzymimmunologische Methode zur Bestimmung von Digoxin

Die Untersuchungsmaterialien wurden mit einem Enzymimmunoassay der Firma Dade Behring analysiert. Der Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmunoassay (10.6, Tabelle 22 und 23) mit denen der Referenzmethode ist für die Kontrollmaterialien in Abbildung 18 und für Patientenseren in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Mit Hilfe des statistischen Auswerteverfahrens nach Passing und Bablok [48] wurden folgende Regressionsgeraden ermittelt:

Vergleich der Ergebnisse für Kontrollmaterialien:  $y = 1,053 * x + 0,024, r = 0,993, N = 18$

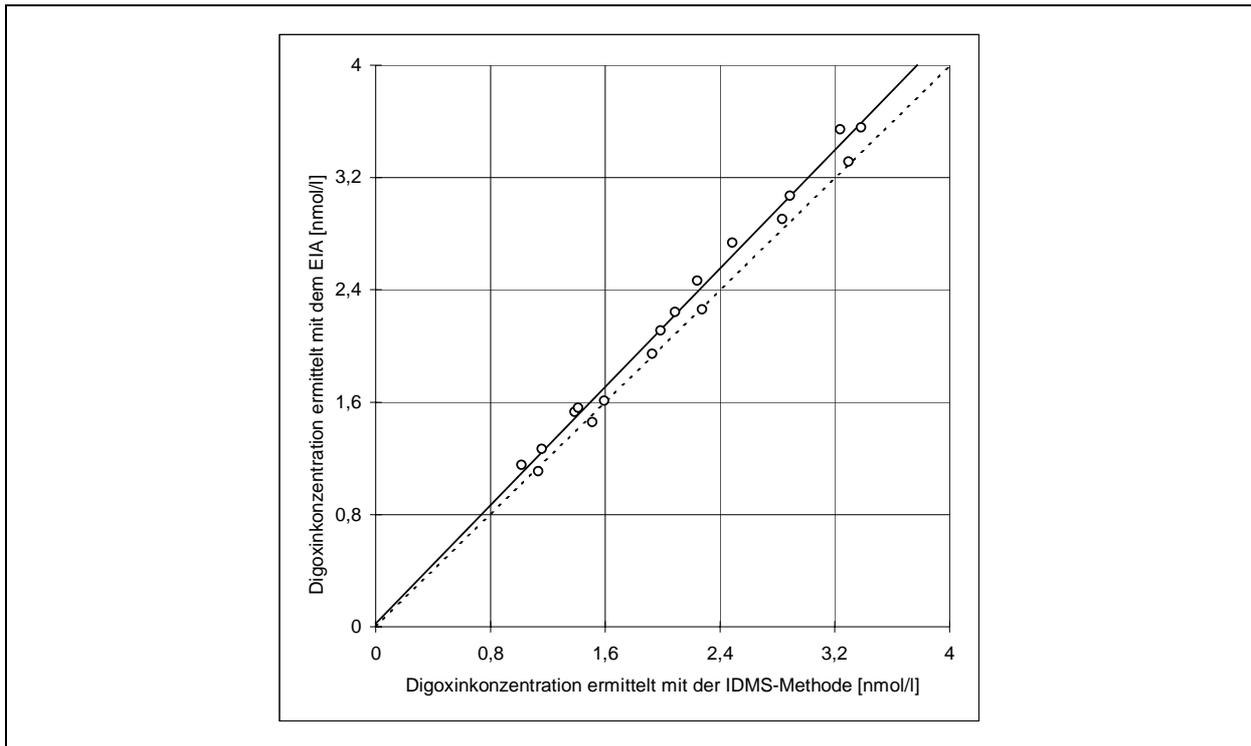
Vergleich der Ergebnisse für Patientenproben:  $y = 1,085 * x + 0,131, r = 0,698, N = 33$

mit  $y$  = Digoxinkonzentration, ermittelt mit dem Enzymimmunoassay

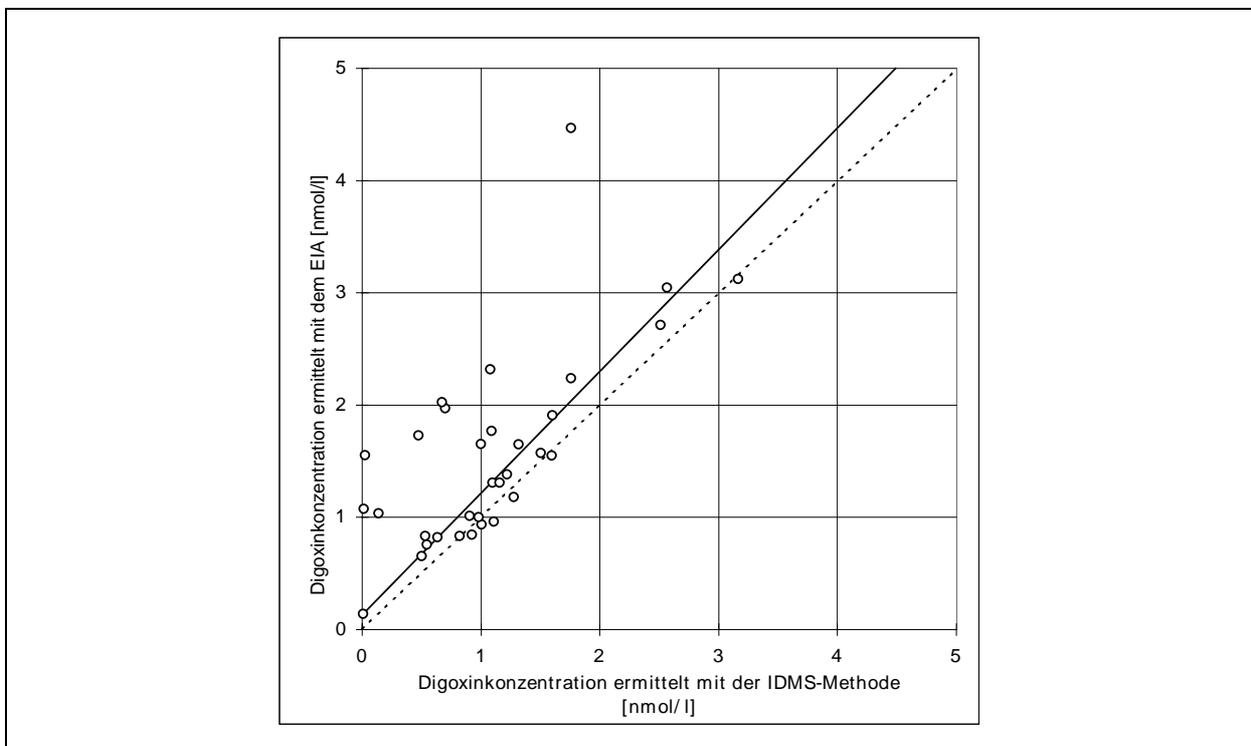
$x$  = Digoxinkonzentration, ermittelt mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode

$N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien bzw. Patientenseren

$r$  = Korrelationskoeffizient



**Abb. 18:** Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmunoassays von Dade Behring mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 18 Kontrollmaterialien

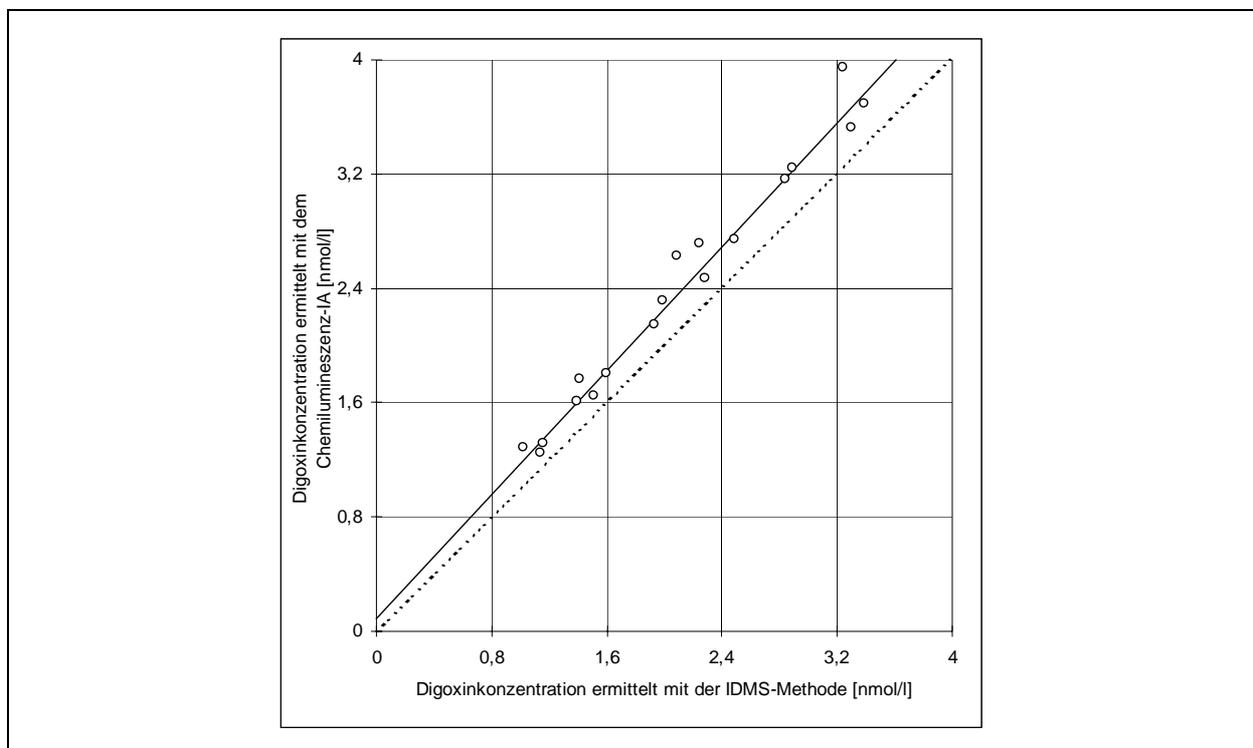


**Abb. 19:** Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmunoassays von Dade Behring mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 33 Patientenseren

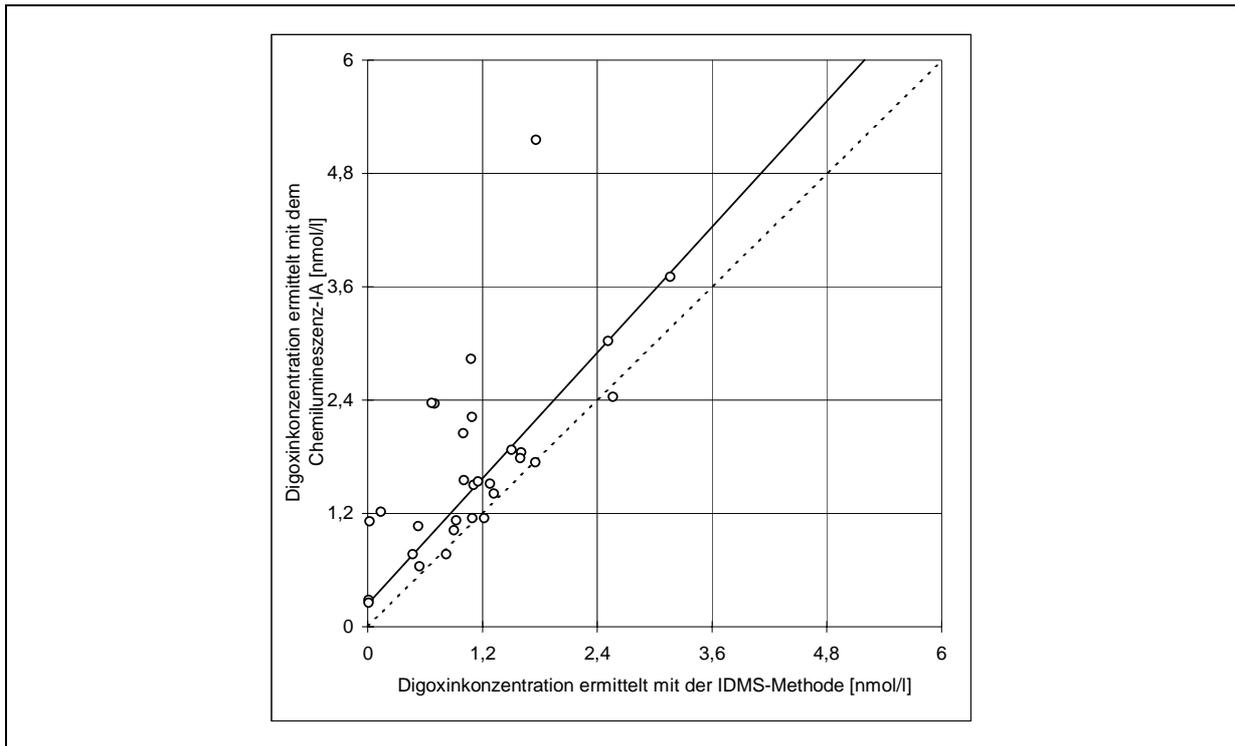
Sowohl für die Kontrollmaterialien als auch für die Patientenserien haben die Regressionsgeraden eine größere Steigung als die Identitätslinie. Das bedeutet, daß die Digoxinkonzentrationen, ermittelt mit dem Enzymimmunoassay, von den Referenzmethodenwerten abweichen. Die Streuung der Wertepaare um die Regressionsgerade ist bei den Kontrollmaterialien relativ gering. Bei den Patientenserien dagegen ist diese Streuung erheblich größer. Hier können bei kleinen Analytkonzentrationen Abweichungen der Routinemethode von bis zum 100fachen des Referenzmethodenwerts beobachtet werden.

### 6.5.2 Elektro-Chemilumineszenz-Immunologische Methode zur Bestimmung von Digoxin

Mit der Elektro-Chemilumineszenz-Immunologischen Methode von Roche wurden 18 Kontrollmaterialien und 30 Patientenserien untersucht. Die graphische Auswertung der Ergebnisse (10.6, Tabelle 22 und 23) ist für die Kontrollmaterialien bzw. die Patientenserien in Abbildung 20 bzw. Abbildung 21 dargestellt.



**Abb. 20:** Vergleich der Ergebnisse des Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassays von Roche mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 18 Kontrollmaterialien



**Abb. 21:** Vergleich der Ergebnisse des Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassays von Roche mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 30 Patientenseren

Nach dem Verfahren von Passing und Bablok [48] ergaben sich folgende Regressionsgeraden:

Vergleich der Ergebnisse für Kontrollmaterialien:  $y = 1,083 * x + 0,091$  ,  $N = 18$  ,  $r = 0,988$

Vergleich der Ergebnisse für Patientenproben:  $y = 1,108 * x + 0,243$  ,  $N = 30$  ,  $r = 0,681$

mit  $y$  = Digoxinkonzentration, ermittelt mit dem Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassay

$x$  = Digoxinkonzentration, ermittelt mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode

$N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien bzw. Patientenseren

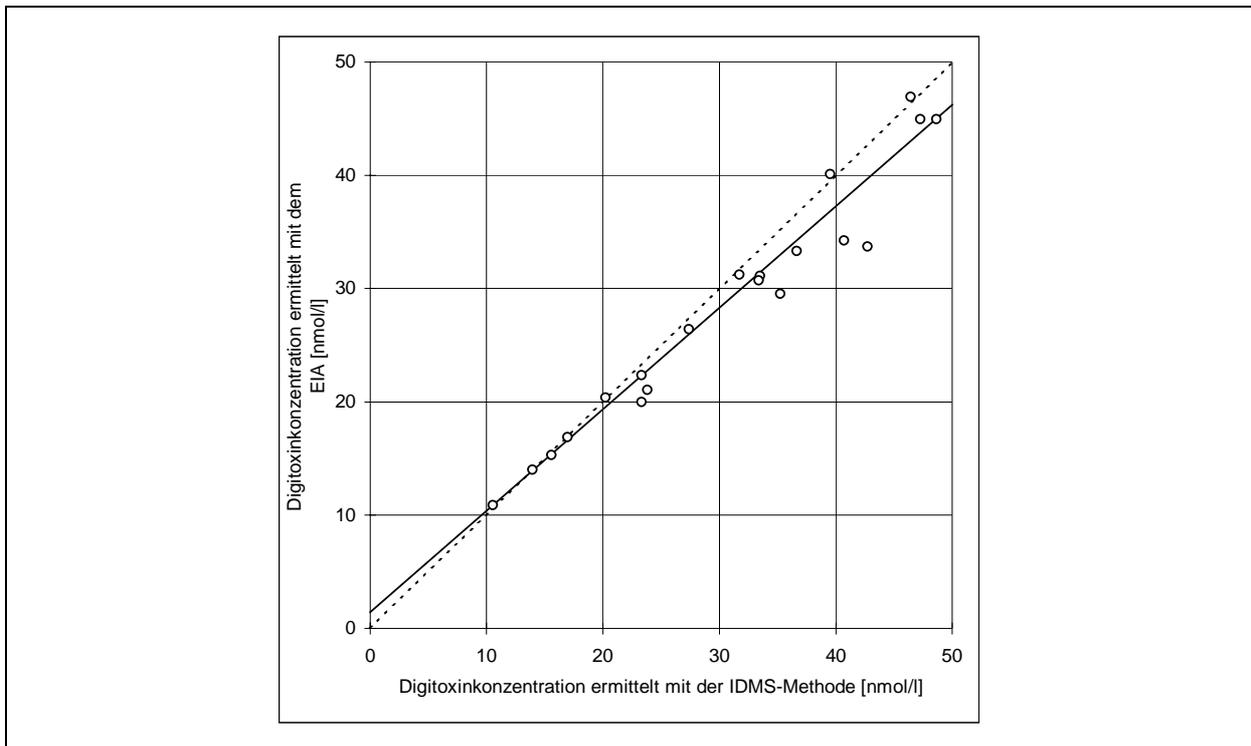
$r$  = Korrelationskoeffizient

Der Vergleich der Ergebnisse des Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassay mit den Ergebnissen der IDMS-Methode zeigt, daß mit der Routinemethode in Kontrollmaterialien und Patientenseren höhere Digoxinkonzentrationen bestimmt werden. Der Verlauf der beiden ermittelten Regressionsgeraden ist ähnlich. Es ist jedoch auffällig, daß bei Patientenproben

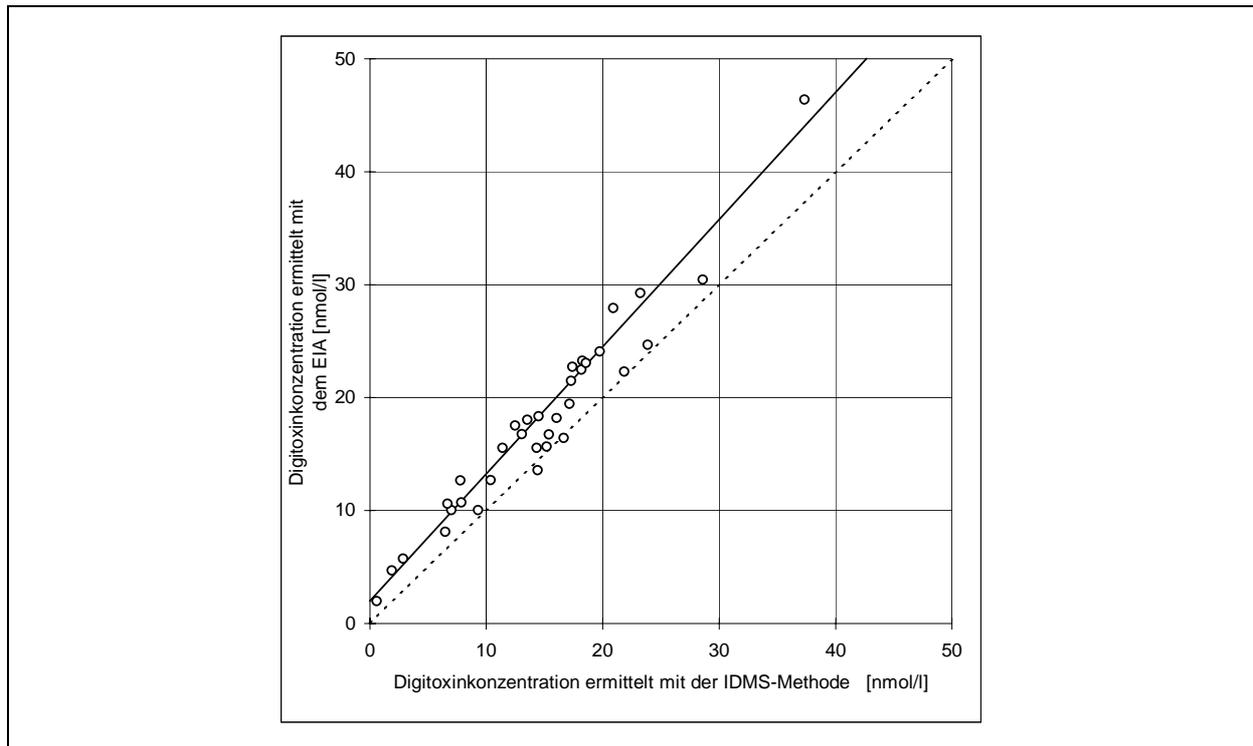
die Streuung der Werte um die Regressionsgerade viel größer ist als bei Kontrollmaterialien; dies wird auch aus dem niedrigen Korrelationskoeffizienten ( $r = 0,681$ ) bei dem Methodenvergleich für die Patientenserien deutlich.

### 6.5.3 Enzymimmunologische Methode zur Bestimmung von Digitoxin

Die Digitoxinkonzentrationen, ermittelt mit dem Enzymimmunoassay der Firma Dade Behring, wurden mit den Referenzmethodenwerten für Kontrollmaterialien in Abbildung 22 und für Patientenserien in Abbildung 23 verglichen. Die Ergebnisse und prozentualen Abweichungen von den Referenzmethodenwerten sind in 10.6, Tabelle 24 und 25 zusammengefaßt.



**Abb. 22:** Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmunoassays von Dade Behring mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 20 Kontrollmaterialien



**Abb. 23:** Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmunoassays von Dade Behring mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 34 Patientenserum

Die nach Passing und Bablok [48] ermittelten Regressionsgeraden lauten:

Vergleich der Ergebnisse für Kontrollmaterialien:  $y = 0,895 * x + 1,441$  ,  $r = 0,977$  ,  $N = 20$

Vergleich der Ergebnisse für Patientenproben:  $y = 1,126 * x + 2,024$  ,  $r = 0,972$  ,  $N = 34$

mit  $y$  = Digitoxinkonzentration, ermittelt mit dem Enzymimmunoassay

$x$  = Digitoxinkonzentration, ermittelt mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode

$N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien bzw. Patientenserum

$r$  = Korrelationskoeffizient

Aus der graphischen Darstellung (Steigung und Achsenabschnitt) erkennt man, daß die mit dem Assay ermittelten Werte im Durchschnitt kleiner sind als die Referenzmethodenwerte. Im Gegensatz dazu ist die Steigung der für Patientenserum ermittelten Regressionsgerade größer als die der Identitätslinie; darüber hinaus findet man einen positiven Achsenabschnitt

von 2,02 nmol/l für die immunologisch bestimmten Ergebnisse. Die mit dem Assay analysierten Digitoxinkonzentrationen sind somit im Durchschnitt größer als die Referenzmethodenwerte.

#### **6.5.4 Turbidimetrische-Immunologische Methode zur Bestimmung von Digitoxin**

In 20 Kontrollmaterialien und 34 Patientenproben wurde die Digitoxinkonzentration mit einem Turbidimetrie-Immunoassay der Firma Olympus bestimmt. Die Ergebnisse (10.6, Tabelle 24 und 25) wurden mit den Zielwerten verglichen, die mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode ermittelt wurden. In den Abbildungen 24 bzw. 25 werden die Vergleiche für die Kontrollmaterialien bzw. die Patientenproben graphisch dargestellt.

Mit dem Regressionsverfahren nach Passing und Bablok [48] wurden folgende Geraden ermittelt:

Vergleich der Ergebnisse für Kontrollmaterialien:  $y = 1,066 * x - 2,084$ ,  $r = 0,993$ ,  $N = 20$

Vergleich der Ergebnisse für Patientenproben:  $y = 1,231 * x + 2,030$ ,  $r = 0,771$ ,  $N = 34$

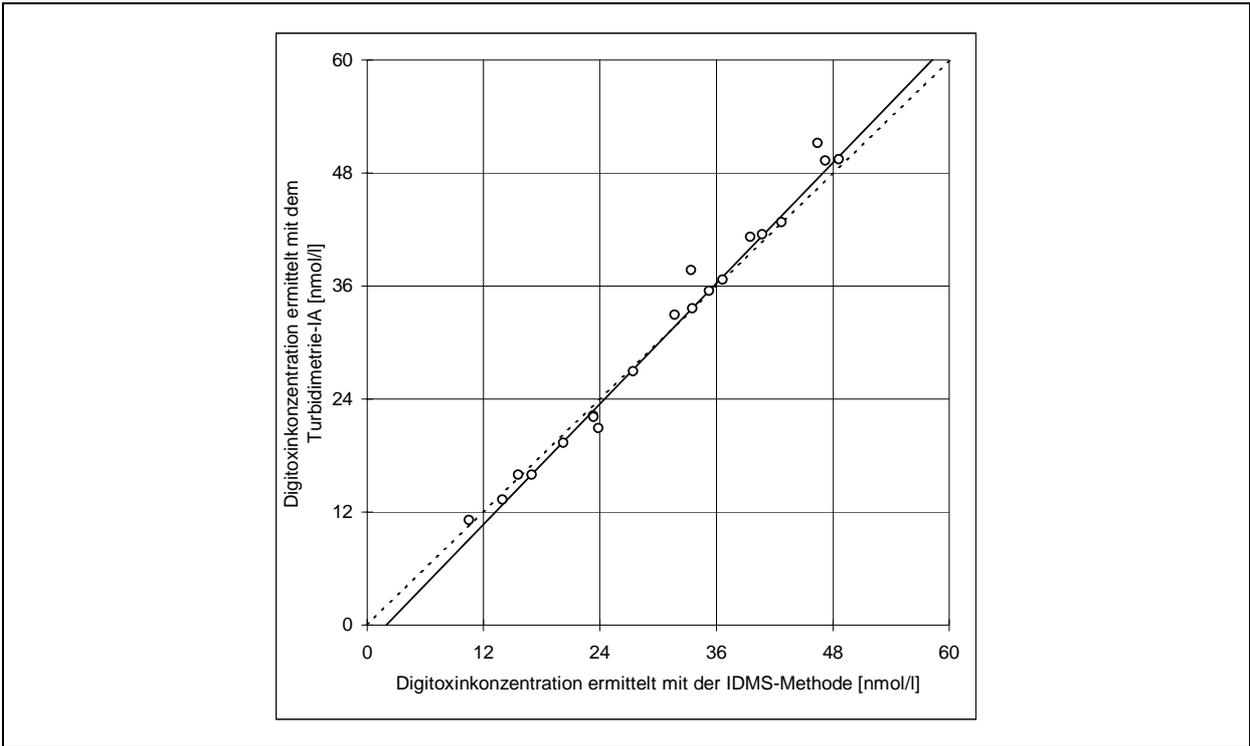
mit  $y$  = Digitoxinkonzentration, ermittelt mit dem Turbidimetrie-Immunoassay

$x$  = Digitoxinkonzentration, ermittelt mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode

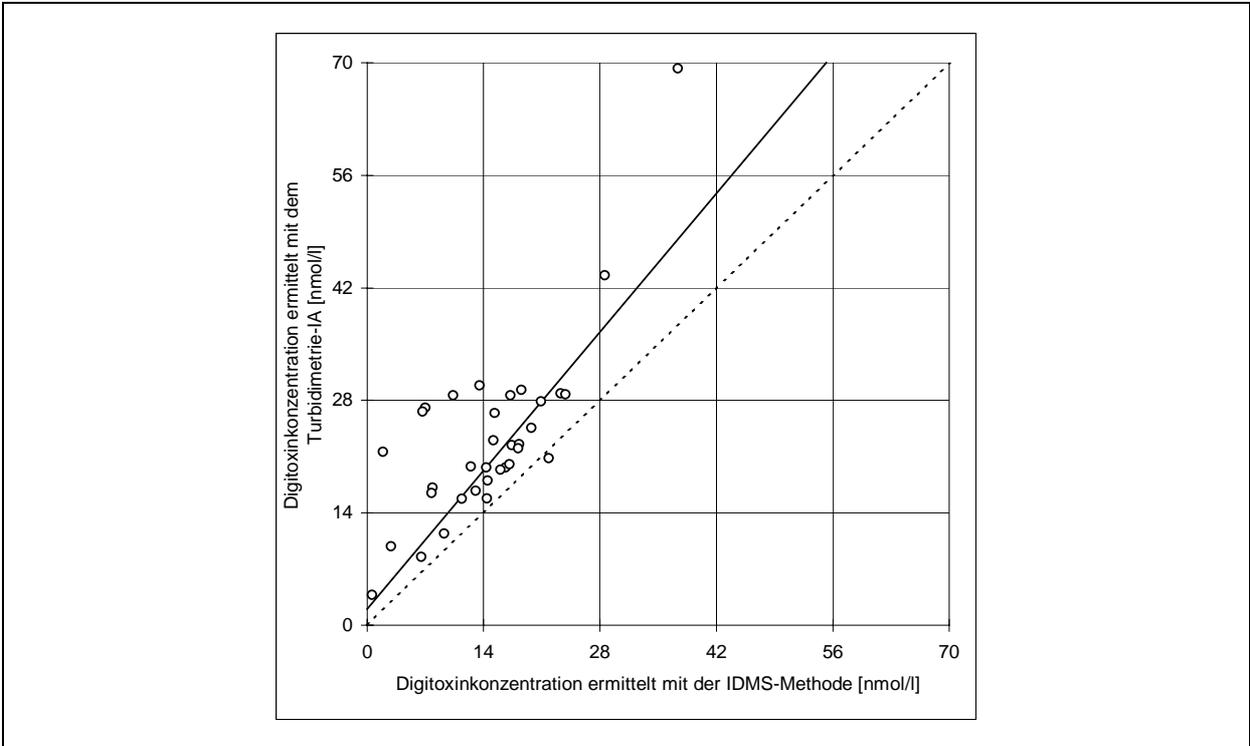
$N$  = Anzahl der Kontrollmaterialien bzw. Patientenseren

$r$  = Korrelationskoeffizient

Der Vergleich der Ergebnisse der Kontrollmaterialien zeigt, daß die Wertepaare im Bereich der Identitätslinie liegen. Der Geradenverlauf läßt erkennen, daß im unteren Konzentrationsbereich die mit dem Turbidimetrie-Immunoassay ermittelten Digitoxinkonzentrationen zu niedrig, im oberen Konzentrationsbereich jedoch zu hoch sind. Die Streuung der Daten um die Gerade ist sehr gering, was auch durch den hohen Korrelationskoeffizienten ( $r = 0,993$ ) zum Ausdruck gebracht wird. Die Regressionsgerade, ermittelt aus den Wertepaaren von Patientenseren, weicht hingegen deutlich von der Identitätsgeraden ab. Die mit dem Turbidimetrie-Immunoassay ermittelten Digitoxinkonzentrationen sind über den ganzen untersuchten Bereich höher als die Zielwerte. Im Gegensatz zu den Kontrollmaterialien streuen die Werte um die Gerade sehr stark.



**Abb. 24:** Vergleich der Ergebnisse des Turbidimetrie-Immunoassays von Olympus mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 20 Kontrollmaterialien



**Abb. 25:** Vergleich der Ergebnisse des Turbidimetrie-Immunoassays von Olympus mit denen der Referenzmethode, ermittelt für 34 Patientenseren

## 7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Validierung von Referenzmeßverfahren zur quantitativen Bestimmung der Cardioglycoside Digoxin und Digitoxin im menschlichen Serum beschrieben. Die Verfahren beruhen auf dem Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse. Im Rahmen der Validierung wurde geprüft, ob die Methoden Anforderungen an Referenzmeßverfahren erfüllen, wie sie in internationalen Standards festgelegt worden sind [49].

Eines der wichtigsten Kriterien für die Bewertung von Meßverfahren ist die **Genauigkeit** der Analysenergebnisse. Diese wird einerseits bestimmt durch ihre **Richtigkeit** und zum anderen durch ihre **Präzision**.

Für die **Richtigkeit** einer Methode ist es notwendig, daß das verwendete Meßsystem eine sehr hohe Spezifität in Bezug auf den zu bestimmenden Analyten aufweist. Die Verwendung der Hochleistungsflüssigchromatographie als Trennsystem und des Massenspektrometers als selektiver Detektor bieten ideale Voraussetzungen für ein solches hochspezifisches Meßsystem.

Die HPLC stellt eine effektive Möglichkeit dar, die Komponenten einer Probe voneinander zu trennen. Unter optimierten Bedingungen treten die einzelnen Komponenten in unterschiedlich lang andauernde Wechselwirkungen mit der mobilen und stationären Phase des HPLC-Systems. Hierdurch eluieren die unterschiedlichen Komponenten zeitlich und räumlich getrennt von der Säule. Dieses chromatographische Trennverfahren wird mit einem hochspezifischen Detektor kombiniert. Das Massenspektrometer ermöglicht die selektive Detektion von Molekül- oder Fragmentionen, die charakteristisch für die Massen der zu analysierenden Substanzen sind. Durch das beschriebene Meßsystem konnten nach Einstellung der substanzcharakteristischen Ionen bei  $m/z$  651 und 654 bzw.  $m/z$  803 und 806 ausschließlich Fragmente bzw. Natriumaddukte von Digoxin und der entsprechenden isotopenmarkierten Verbindung aufgezeichnet werden. Ebenso wurden bei der Untersuchung von Digitoxinproben bei den Massen  $m/z$  787 und 790 bzw.  $m/z$  803 und 806 nur die Natrium- bzw. Kaliumaddukte von natürlichem und isotopenmarkiertem Digitoxin registriert. Trotz der Anwendung dieses hochspezifischen Meßsystems ist die Richtigkeit der Analysenergebnisse nicht notwendigerweise gewährleistet, wenn während der Probenvorbereitung (Extraktion, säulenchromatographische Reinigung) Anteile des zu bestimmenden Analyten verloren gehen.

Solche Wiederfindungsverluste während des Analysengangs werden am besten durch die Anwendung eines internen Standards korrigiert. Als interner Standard ist der Einsatz einer isoto­penmarkierten Variante des zu untersuchenden Analyten ideal, da angenommen werden kann, daß sich die zu analysierenden nicht-markierten Verbindungen und die isoto­penmarkierten Analoga in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften nahezu identisch verhalten; bei der massenspektrometrischen Detektion sind sie jedoch durch das unterschiedliche Molekül­gewicht gut von einander zu unterscheiden.

Für die Entwicklung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode, wie sie hier beschrieben wird, stellt die Verfügbarkeit geeigneter isoto­penmarkierter interner Standardverbindungen eine unabdingbare Voraussetzung dar. Für die zu analysierenden Substanzen Digoxin und Digitoxin war isoto­penmarkiertes Material nicht kommerziell verfügbar. Es mußte daher ein Weg zur Synthese dieser Verbindungen gefunden werden. Durch Deuterierung der natürlich vorkommenden Substanzen gelang es, geeignetes Material herzustellen. Die Produkte der Deuterierung wurden im Vergleich mit den Ausgangssubstanzen mit dem HPLC-MS-Gerät untersucht. An Hand der Chromatogramme war zu erkennen, daß sowohl für Digoxin als auch für Digitoxin die Retentionszeiten der Edukte mit denen der synthetisierten Substanzen identisch sind. Die Massenspektren zeigten jedoch, daß das jeweilige Reaktionsprodukt ein um drei Masseneinheiten höheres Molekül­gewicht besitzt als die Ausgangssubstanz. Die Fragmentierungsmuster zeigen, daß der Austausch von Wasserstoffatomen gegen Deuteriumatome an Kohlenstoffatomen des Steroidteils des Moleküls erfolgte. Für die IDMS-Messungen ist es von großem Vorteil, wenn der isoto­penmarkierte interne Standard eine Massendifferenz von nicht weniger als drei Massen zum natürlichen Cardioglycosid aufweist. In diesem Fall ist der durch die natürliche Isotopenverteilung bedingte Anteil des natürlichen Analyten bei der Messung der isoto­penmarkierten Substanz minimal. Da die Isotopenmarkierung am Steroidteil erfolgt ist, kann dieser Vorteil der dreifach Markierung auch bei der Messung von Fragmenten, die durch Abspaltung einer Digitoxose-Einheit entstanden sind, genutzt werden (z.B.  $m/z$  651, 654).

Für den Einsatz als interner Standard ist entscheidend, daß die Deuterierung des Materials im Rahmen der Analysenbedingungen irreversibel ist und kein Rücktausch der Deuteriumatome gegen Wasserstoffatome stattfindet. Eine Mischung aus isoto­penmarkiertem und natürlichem Digoxin bzw. Digitoxin wurde in Aliquote geteilt. Ein Aliquot wurde ohne Probenvorbereitung, das andere mit Probenvorbereitung analysiert und ausgewertet. Die ermittelten Ergebnisse waren im Rahmen der Meßunsicherheit identisch, so daß eine Rücktausch ausgeschlossen werden kann.

Theoretisch ist es denkbar, daß die physikalisch-chemischen Eigenschaften der isotonenmarkierten Substanz sich durch Isotopeneffekte geringfügig von denen der natürlich vorkommenden Analyte unterscheiden. Wenn diese Effekte jedoch in Kalibratoren und Serumproben in gleichem Maße auftreten, so würden die Analysenergebnisse nicht verfälscht werden. Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, wurden Aliquote eines Leerserums mit Kalibratoren aufgestockt, aufgearbeitet und analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß eine auf diese Weise auf Serumbasis ermittelte Kalibrationskurve mit einer nach dem üblichen Verfahren erstellten Kalibrationskurve übereinstimmte und somit identische Analysenergebnisse lieferte.

Für die Berechnung der Analysenergebnisse ist es nicht notwendig, die Konzentration des internen Standards zu kennen. Entscheidend ist jedoch, daß sowohl Kalibratoren als auch Serumproben exakt dieselbe Menge des isotonenmarkierten Materials erhalten. Dies wurde durch die Dosierung des internen Standards mit einer Mikroliterspritze mit justiertem Wiederholungsadapter realisiert.

Die Richtigkeit der Methode ist nicht nur von der Spezifität der Analytik sondern auch von der Qualität des Kalibrationsmaterials abhängig, das zur Berechnung der Analysenergebnisse notwendig ist. Dieses Kalibrationsmaterial sollte einerseits eine möglichst hohe und exakt bekannte Reinheit besitzen; für die Berechnung der Gesamtmeßunsicherheit des Analysenverfahrens ist es jedoch außerordentlich wichtig, daß auch die Meßunsicherheit der Reinheit bekannt ist. Für viele klinisch-chemische Meßgrößen wie z.B. Cholesterin, Kreatinin und Harnstoff sind Kalibrationsmaterialien von nationalen oder internationalen Metrologieinstituten (NIST, IRMM) charakterisiert und zertifiziert worden. Für Digoxin und Digitoxin sind jedoch derzeit entsprechende zertifizierte Kalibrationsmaterialien noch nicht erhältlich. Daher wurden für die Durchführung der hier beschriebenen Methoden die europäischen Arzneimittelstandards (European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance, EP CRS) von Digoxin und Digitoxin verwendet. In Rahmen von Vorversuchen war festgestellt worden, daß diese Materialien die geringsten Anteile an Nebenbestandteilen besitzen. Für die Bestimmung ihrer Reinheit wurden diese Substanzen mit der Hochdruckflüssigchromatographie unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors, der die Absorption im sichtbaren und UV-Bereich bestimmt, untersucht. Aus den UV-Absorptionssignalen sowohl des Haupt- als auch der Nebenbestandteile wurde der Digoxinanteil der Präparation mit  $96,839 \% \pm 0,078 \%$  bestimmt. Für Digitoxin wurde eine Reinheit von  $99,23 \% \pm 0,14 \%$  ermittelt. Bei dieser Art der Bestimmung der Reinheit der verwendeten Cardioglycosidpräparationen handelt es sich lediglich um eine Abschätzung, da

die Struktur der Verunreinigungen und daher die individuellen molaren Extinktionskoeffizienten nicht bekannt sind. Dieser Tatsache wird mit einer sehr großzügigen Angabe der Meßunsicherheit der Reinheit Rechnung getragen. Optimal wäre der Einsatz eines offiziell zertifizierten Referenzmaterials mit exakt bestimmter Reinheit und der Angabe über die Meßunsicherheit. In Zusammenarbeit mit europäischen Institutionen werden derzeit entsprechende Vorbereitungen getroffen, um diese Zertifizierung im Rahmen eines EU-Projektes zu verwirklichen.

Die Richtigkeit der ermittelten Ergebnisse ist nur dann gewährleistet, wenn Begleitkomponenten aus dem Serummaterial und den verwendeten Reagenzien mit den Signalen des natürlich vorkommenden Analyten und des isotoopenmarkierten Analogon nicht interferieren. Um dies zu überprüfen, erfolgte die Ermittlung der Digoxinkonzentrationen der untersuchten Kontrollmaterialien in getrennten Analysen durch die Detektion unterschiedlicher Ionenpaare ( $m/z$  803, 806 und  $m/z$  651, 654). Da nicht anzunehmen ist, daß interferierende Begleitsubstanzen dasselbe Molekül- und Fragmentationmuster wie die zu untersuchenden Substanzen haben, erlaubt dieses Verfahren eine objektive Kontrolle der Spezifität des Verfahrens. Ein statistisches Verfahren zum Vergleich der unabhängig voneinander ermittelten Analyseergebnisse (nach Passing und Bablok [48]) zeigt eine hervorragende Übereinstimmung. Es kann daher als bewiesen angesehen werden, daß Komponenten aus der biologischen Matrix oder aus den Reagenzien keinen störenden Einfluß auf das Analyseergebnis ausüben.

In der entsprechenden Untersuchung für Digitoxin wurden für die Bestimmung der Konzentrationen der Kontrollmaterialien die Signale der Ionenpaare  $m/z$  787, 790 bzw.  $m/z$  803, 806 aufgezeichnet. Hier konnte ebenfalls an Hand des statistischen Verfahrens nach Passing und Bablok gezeigt werden, daß die Ergebnisse unter Anwendung unterschiedlicher Massen zur Detektion exakt übereinstimmende Ergebnisse liefern, so daß Interferenzen durch Begleitkomponenten ausgeschlossen werden können.

Die Tatsache, daß die mit unterschiedlichen, substanzcharakteristischen Molekül- bzw. Fragmentmassen ermittelten Peakflächen zu dem gleichen Analyseergebnis führen, bestätigt die Richtigkeit der Methoden zur quantitativen Bestimmung von Digoxin bzw. Digitoxin.

In weiteren Untersuchungen zur Spezifität des Analysenverfahrens werden Kontrollmaterialien analysiert, die entweder kein isotoopenmarkiertes oder kein nicht-markiertes Digoxin bzw. Digitoxin enthielten. In keinem Fall wurden Signale für die jeweils fehlende Komponente gefunden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethoden ein hohes Maß an Spezifität aufweisen. Durch die Anwendung des Isotopenverdünnungsprinzips ist darüber hinaus eine exakte Kontrolle der Wiederfindung gewährleistet, so daß die hier beschriebenen Verfahren im Hinblick auf ihre Richtigkeit als Referenzmethoden höherer Ordnung angesehen werden können.

Die **Präzision** der Methoden wird durch zufällige Streuungen bei Dosier- und Meßschritten während des Analysenverfahrens beeinflusst. Die Präzision ist ein qualitativer Begriff, der nicht quantitativ beschrieben werden kann; es wird daher in der Regel die Impräzision, die in inverser Beziehung zur Präzision steht, als eine quantitative Größe angegeben (z.B. als Standardabweichung). Es konnte gezeigt werden, daß in der Regel die Dosier- und Meßstreuungen in einer Analysenserie (Impräzision der Volumendosierung, Impräzision der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-System) die Hauptbeiträge zur Gesamtimpräzision darstellen. Eher selten beeinflusst die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen (von Tag zu Tag, von Analysenserie zu Analysenserie) die Gesamtimpräzision. Nur für die Ergebnisse der Kontrollmaterialien 826 03 und AP 6 konnte mit einem statistischem Prüfverfahren (f-Test) nachgewiesen werden, daß die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen signifikant zur Gesamtimpräzision beitrug. Für andere Kontrollmaterialien, die in den gleichen Analysenserien bestimmt wurden, traf dies jedoch nicht zu. Daher kann davon ausgegangen werden, daß dieser Beitrag der Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen nicht auf methodische Mängel zurückzuführen ist. Es ist vielmehr zu vermuten, daß Unterschiede zwischen den unterschiedlichen, von Tag zu Tag benutzten Einzelabfüllungen, bedingt durch z.B. Inhomogenitäten des Ausgangsmaterials oder unpräzise Abfüllungen, die Ursache sind („vial-to-vial-Variabilität“). Aus diesem Grund ist die Gesamtimpräzision in diesen beiden Materialien auch größer als bei anderen Kontrollmaterialien.

Für die Digoxinkontrollmaterialien ergibt sich insgesamt eine relative Standardabweichung von 0,49 % bis 2,2 %, für die der Digitoxinkontrollmaterialien von 0,18 % bis 0,81 %. Im Hinblick auf die Anforderungen an Referenzmeßverfahren kann eine solch geringe Streuung der Meßergebnisse als sehr zufriedenstellend angesehen werden.

Die **Nachweisgrenze**, die **Erfassungsgrenze** und die **Bestimmungsgrenze** wurden für die beiden im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Bestimmungsmethoden mit Hilfe der

Leerwertmethode [35] ermittelt. Für das Digoxinmeßverfahren konnte die Nachweisgrenze mit  $x_{(NG)} = 0,012$  pmol/Probe, die Erfassungsgrenze mit  $x_{(EG)} = 0,024$  pmol/Probe und die Bestimmungsgrenze bei  $x_{(BG)} = 0,037$  pmol/Probe festgelegt werden. Für die Digitoxinmethode lagen die analog ermittelten Grenzen bei  $x_{(NG)} = 0,043$  pmol/Probe (Nachweisgrenze),  $x_{(EG)} = 0,087$  pmol/Probe (Erfassungsgrenze) und  $x_{(BG)} = 0,13$  pmol/Probe (Bestimmungsgrenze).

Bei der Angabe dieser Grenzen wurden bewußt die Einheiten [pmol/Probe] bzw. [ng/Probe] gewählt, da es das Methodenprinzip erlaubt, das Serumvolumen der Probe an die Analytmenge anzupassen. Somit ist es theoretisch möglich, auch Seren mit sehr geringer Analytkonzentration durch die Aufarbeitung eines entsprechend großen Serumvolumens zu analysieren. In der Regel erfolgte die Ermittlung der Analysenergebnisse deutlich oberhalb der Bestimmungsgrenze der Verfahren. An Bedeutung gewinnen Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, wenn nur geringe Mengen an Serummaterial zur Verfügung stehen. Für die Bestimmung von Digoxin war sowohl von den Kontrollmaterialien als auch von den Patientenseren ausreichend Serummaterial vorhanden. Somit konnten alle Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze der Methode ermittelt werden. Für die Bestimmung der Digoxinkonzentration in den Kontrollmaterialien und in 30 der 33 Patientenseren stand ebenfalls ausreichend Material für die Analysen zur Verfügung. Die geringen Serumvolumina der Patientenseren Nr. 2 und Nr. 10 jedoch ermöglichten eine Digoxinbestimmung oberhalb der Nachweisgrenze, jedoch unterhalb der Erfassungsgrenze; für das Patientenserum Nr. 18 reichte das Serummaterial für eine Digoxinbestimmung oberhalb der Erfassungs-, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze aus.

Zu dem Ergebnis eines Meßverfahrens gehört neben der Angabe der Konzentration auch die der **Meßunsicherheit**. Die kombinierte (gesamte) Meßunsicherheit wird aus der zufälligen und der systematischen Komponente berechnet. Der ‚zufällige‘ Anteil der Meßunsicherheit wird aus laborinternen Meßdaten ermittelt, beispielsweise aus der Streuung der Volumendosierungen oder der Isotopenverhältnismessungen mit dem HPLC-MS-Gerät. Die Meßunsicherheiten für die einzelnen Teilschritte des Analysenverfahrens ebenso wie die resultierende gesamte ‚zufällige‘ Meßunsicherheit werden als Standardabweichungen angegeben. Die ‚systematische‘ Komponente ist dadurch gekennzeichnet, daß ihr Beitrag zur Meßunsicherheit nicht aus laborinternen Daten ermittelt werden kann, sondern aus extern zur Verfügung stehenden Quellen übernommen werden muß, beispielsweise aus Zertifikaten über die Kalibriergewichte oder über die Reinheit der Referenzsubstanzen. Auch diese

systematischen Komponenten werden als Standardabweichungen beschrieben. Um eine minimale Meßunsicherheit zu erhalten, müssen die Meßunsicherheit aller beitragenden Komponenten so weit wie möglich reduziert werden.

Die zufällige Komponente der Meßunsicherheit wurde durch die Verwendung von direktverdrängenden Pipettiersystemen (z.B. elektronisch gesteuertes Dosiergerät, Mikroliterspritze mit Wiederholadapter) minimiert. Ein großer Anteil der zufälligen Meßunsicherheit wird durch die Impräzision der Isotopenverhältnismessung mit dem HPLC-MS-Gerät verursacht. Um diesen Beitrag zu reduzieren, wurden alle Proben und Kalibratoren doppelt injiziert und die anschließende Auswertung mit den gemittelten Werten durchgeführt. Um den Beitrag der systematischen Meßunsicherheit möglichst gering zu halten, wurden für die Kalibration der Volumina und Einwaagen Kalibriergewichte mit geringer Meßunsicherheit verwendet. Es handelte sich um einen Gewichtssatz der Klasse E2, für den ein Kalibrierschein des Deutschen Kalibrierdienstes der PTB vorliegt. Als weitere Komponente trägt die Meßunsicherheit der Reinheit der Kalibriersubstanz zur gesamten systematischen Meßunsicherheit bei. Da für Digoxin sowie Digitoxin derzeit keine zertifizierte primäre Referenzmaterialien erhältlich sind, wurden Cardioglycosidpräparationen verwendet, deren Reinheit sowie die entsprechende Meßunsicherheit der Reinheitsbestimmung im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

Für das Meßverfahren zur Bestimmung der Digoxinkonzentration wurde der Anteil der systematische Meßunsicherheit mit 0,092 % ermittelt. Er trägt nicht signifikant zur kombinierten Meßunsicherheit bei, die für die untersuchten Materialien maximal 2,2 % betrug.

Bei der Bestimmung der Digitoxinkonzentrationen beträgt der Anteil der systematischen Meßunsicherheit 0,17 %. Er muß bei der Berechnung der kombinierten Meßunsicherheit als signifikanter Beitrag berücksichtigt werden. Das Maximum der kombinierten Meßunsicherheit lag für die analysierten Kontrollmaterialien bei 0,85 %.

Zusammenfassend betrachtet ist die kombinierte Meßunsicherheit sowohl für die Digoxinergebnisse als auch für die Digitoxinergebnisse sehr gering. Dies ist für die Akzeptanz der Methoden als Referenzmeßverfahren eine wichtige Voraussetzung.

Referenzmeßverfahren, wie sie hier entwickelt und beschrieben werden, sind keineswegs für die Analytik von Patientenproben unter Routinebedingungen in der täglichen Labordiagnostik vorgesehen. Sie werden üblicherweise in hochspezialisierten Referenzlaboratorien zur Ermittlung von Zielwerten in Kalibratoren und Kontrollmaterialien oder im Rahmen der

Validierung von Routinemethoden angewandt. **Robustheit** und **Praktikabilität** sind daher als weitere Merkmale nicht von entscheidender Bedeutung für die Validität von Referenzmethoden. Dennoch sind die hier beschriebenen Methoden in ihrer Durchführung so robust und praktikabel, daß sie bei entsprechender Ausrüstung ohne Schwierigkeit in andere Referenzlaboratorien transferiert werden können.

Durch die Vorreinigung der Probe mittels Extraktion und Chromatographie unter Atmosphärendruck wurden störende Begleitkomponenten wie z.B. Proteine entfernt. Unter den milden Bedingungen der HPLC werden die Substanzen nicht zerstört wie dies beispielsweise bei gaschromatographischen Methoden häufig zu befürchten ist. Eine Derivatisierung der Substanzen zur Verbesserung der thermischen Stabilität ist daher nicht notwendig.

Für die spezifische massenspektrometrische Detektion der Analyte ist es sinnvoll, Ionen mit einer möglichst hohen Masse und Intensität aufzuzeichnen. Der Zusatz von Ameisensäure zum HPLC-Fließmittel bewirkt eine Erhöhung der Ausbeute für die Ionen der Natriumaddukte von Digoxin und Digitoxin und des Digoxigenin-bis-digitoxosid-Fragments sowie der entsprechenden deuterierten Verbindungen, wobei die Natrium-Ionen offenbar in ausreichender Menge aus den Oberflächen der verwendeten Glasgefäße ausgespült werden und so in die Probe gelangen. Ein Zusatz von Natriumsalzen führt nicht zu einer erhöhten Ionenausbeute der Natriumaddukte. Durch Zusatz von Kaliumacetat wird die Ionenausbeute des Kaliumaddukts von Digitoxin sowie die des deuteriertes Analogons erhöht. Es zeigt sich jedoch, daß sich Kaliumacetat nach dem Zerstäuben und Trocknen des Lösungsmittels im Elektrospray-Interface abscheidet. Der Wartungsaufwand für das Gerät wird dadurch erheblich größer. Aus diesem Grund wurden für Digitoxin bzw. das deuterierte Analogon die Ionen der Natriumaddukte mit den Massen  $m/z$  787 bzw. 790 statt der höhermolekularen Kaliumaddukte ( $m/z$  803 und 806) aufgezeichnet.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die beschriebenen Meßverfahren zur quantitativen Bestimmung von Digoxin bzw. Digitoxin in Humanserum die Anforderungen an Referenzmeßverfahren ohne Einschränkungen erfüllen. Die Meßergebnisse der hier beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Cardioglycosidkonzentrationen können in Anbetracht der hohen Spezifität und Richtigkeit sowie der geringen Meßunsicherheit als Referenzmethodenwerte angesehen werden. Die ermittelten Stoffmengenkonzentrationen gelten daher als rückgeführt auf die SI-Einheit „Mol“. Die hier entwickelten Referenzmeßverfahren sollen daher zur Evaluierung von Meßverfahren niedrigerer

metrologischer Ordnung und zur Ermittlung von Zielwerten für die externe Qualitätskontrolle der Routinelaboratorien herangezogen werden.

Für die Bestimmung der Cardioglycosidkonzentrationen im Serum gibt es heute bereits eine Vielzahl von **Routinemethoden**, die alle auf demselben analytischen Prinzip des Immunoassays basieren, sich jedoch durch unterschiedliche Detektionsverfahren (Turbidimetrie, Enzymaktivität, Elektro-Chemilumineszenz) voneinander unterscheiden. Der routinemäßige Einsatz der Methoden erfordert eine schnelle und einfache Durchführung der Analysen. Durch die meistens vollmechanisierte Durchführung der Routinemethoden ist die Präzision der Ergebnisse sehr gut. Dies kann durch die Mehrfachmessung derselben Probe bewiesen werden.

Eine Aussage über die Richtigkeit dieser Routineergebnisse konnte jedoch bisher nicht gemacht werden, da rückgeführte Zielwerte als Bewertungsgrundlage fehlten. In der Vergangenheit konnten daher verschiedene Routinemethoden sowohl für die Bestimmung von Digoxin als auch von Digitoxin nur auf die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse hin getestet werden [8, 10, 50, 51]. Für die Bewertung der Externen Qualitätskontrolle wurden unterschiedliche, methodenabhängige Sollwerte als Zielwerte verwendet, d.h. eine Ergebnisbeurteilung erfolgte nur im Vergleich mit Werten, die mit dem selben Analysenprinzip ermittelt wurden.

In den Richtlinien der Bundesärztekammer sind Grenzen festgelegt, an Hand derer die Ergebnisse von Teilnehmern der Externen Qualitätskontrolle beurteilt werden. Die Richtlinien werden derzeit überarbeitet. Ein Vorschlag sieht vor, daß die Kontrolle dann als bestanden gilt, wenn die Abweichung des Teilnehmerergebnisses vom Zielwert einen festgelegten Prozentsatz bzw. für niedrigere Konzentrationen einen festgelegten Betrag nicht überschreitet. Dieser Vorschlag sieht für die Bestimmung von Digoxin vor, daß bei Konzentrationen über 1,9 nmol/l die maximal zulässige Abweichung 34 % betragen darf; unterhalb von 1,9 nmol/l darf die Abweichung höchstens 0,65 nmol/l sein. Analog ist für Digitoxinkonzentrationen über 19,6 nmol/l die maximal zulässige Abweichung mit 28 % festgelegt; unterhalb von 19,6 nmol/l darf die Abweichung nicht mehr als 5,5 nmol/l betragen. Bei diesen maximal zulässigen Abweichungen handelt es sich um Strafgrenzen, d.h. Laboratorien, deren Ergebnissen stärker vom Zielwert abweichen, können vom Eichamt mit einer Geldbuße bestraft werden. Darüber hinaus können die Laboratorien ohne den Nachweis der bestandenen Kontrolle nicht mit den Krankenkassen ihre entstandenen Kosten abrechnen.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und geprüften Referenzmeßverfahren können in Zukunft in der Externen Qualitätskontrolle methodenunabhängige, rückgeführte Referenzmethodenwerte als Zielwerte für die Beurteilung der unterschiedlichen Routinemethoden verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden zwei häufig verwendete Testmethoden zur Bestimmung von Digoxin durch Vergleichsanalyse mit dem Referenzmeßverfahren evaluiert. Zu diesem Zweck wurden dieselben Patientenserum und Kontrollmaterialien sowohl mit dem Referenzmeßverfahren als auch mit einem Enzymimmunoassay und einem Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassay analysiert.

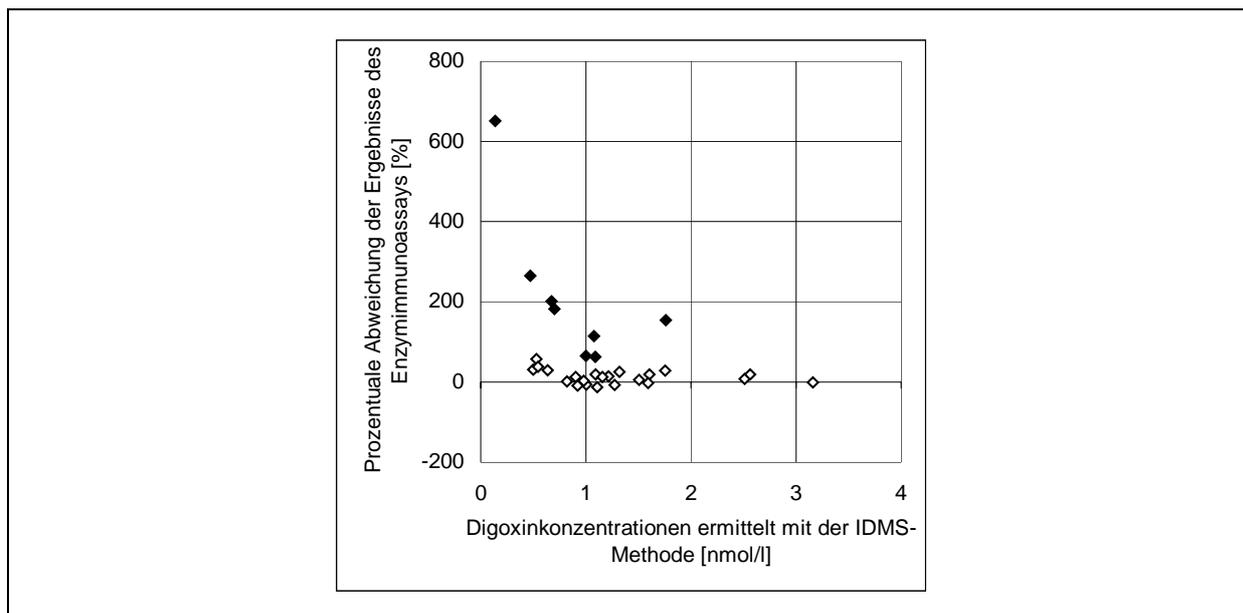
Ebenso wurden die Ergebnisse zweier Routinemethoden, die häufig für die Bestimmung von Digitoxin im Serum angewandt werden, mit den Werten des hier entwickelten Referenzmeßverfahrens verglichen. Hierzu wurden mit dem Referenzmeßverfahren sowie mit einem Enzymimmunoassay und einem Turbidimetrie-Immunoassay dieselben Patientenserum und Kontrollmaterialien untersucht.

Für die Beurteilung der untersuchten Routinemethoden wurden die vorgeschlagenen Grenzen der Richtlinien der Bundesärztekammer als Bewertungsgrundlage verwendet.

Die Ergebnisse der Digoxinbestimmung mit dem Enzymimmunoassay weichen bei den Kontrollmaterialien um + 6,3 % (Median der Differenzen) von den Referenzmethodenwerten ab. Alle Abweichungen dieser Ergebnisse sind innerhalb der vorgeschlagenen Grenzen der Richtlinien der Bundesärztekammer.

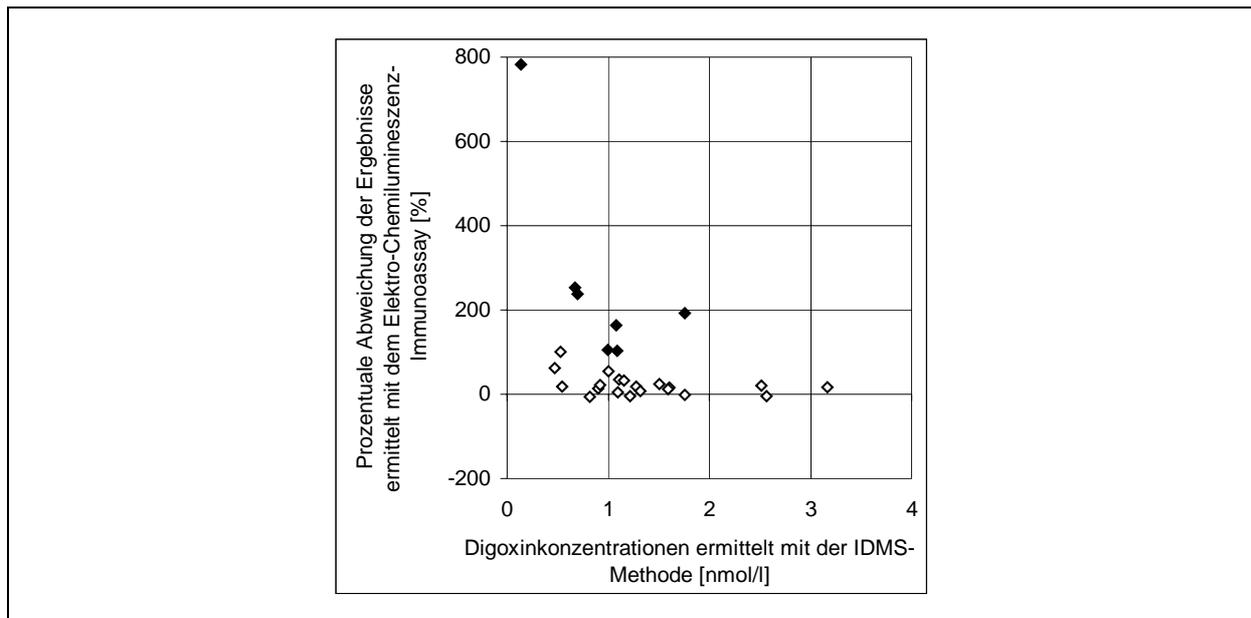
Die Abweichung der Ergebnisse von Patientenserum beträgt + 25,3 % (Median der Differenzen) von den Zielwerten. Die Ergebnisse von 10 der 33 untersuchten Patientenserum überschreiten die zulässigen Maximalabweichungen (Die entsprechenden Seren sind in Tabelle 23 mit „\*“ gekennzeichnet). Besonders bei niedrigen Digoxinkonzentrationen sind die ermittelten Werte zu hoch (Abb. 26).

Die massenspektrometrisch ermittelten Konzentrationen der Patientenserum Nr. 2, 10 und 18 liegen unterhalb der vom Hersteller des Enzymimmunoassays angegebenen Nachweisgrenze von 0,08 nmol/l. Dennoch wurden mit dem untersuchten Enzymimmunoassay für die Seren Nr. 10 und 18 Digoxinkonzentrationen ermittelt, die im therapeutischen Bereich lagen.



**Abb. 26:** Prozentuale Abweichung der Digoxinergebnisse von Patientenseren, ermittelt mit dem Enzymimmunoassay von Dade Behring, bezogen auf die mit der IDMS-Methode analysierten Zielwerte. Die ausgefüllten Punkte markieren die Ergebnisse, deren Abweichung vom Zielwert über die zulässigen Grenzen hinaus gehen. Die Abweichungen der Patientenseren Nr. 2, 10 und 18 sind in diesem Diagramm nicht dargestellt; sie sind größer als 800 %.

Auch bei der Beurteilung des Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassays von Roche zeigen sich Unterschiede je nach dem analysierten Untersuchungsmaterial. Die Ergebnisse für Kontrollmaterialien weichen um + 12,9 % (Median der Differenzen) von den Zielwerten ab. Alle Ergebnisse sind innerhalb der maximal zulässigen Abweichungsgrenzen. Die in Patientenproben bestimmten Digoxinkonzentrationen sind jedoch 28,7 % (Median der Differenzen) höher als die Zielwerte und nicht alle der 30 Patientenseren liegen innerhalb der zulässigen Abweichungsgrenzen. Acht Patientenseren weichen über diese Grenzen hinaus von den Zielwerten ab (Abb. 27). In Patientenseren, deren massenspektrometrisch ermittelte Digoxinkonzentration unterhalb der vom Hersteller des Immunoassays mit 0,19 nmol/l angegebene unteren Nachweisgrenze liegen, wurden Werte gemessen, die z.T. im therapeutischen Bereich liegen (siehe Patientenserum Nr. 17 und Nr. 18).

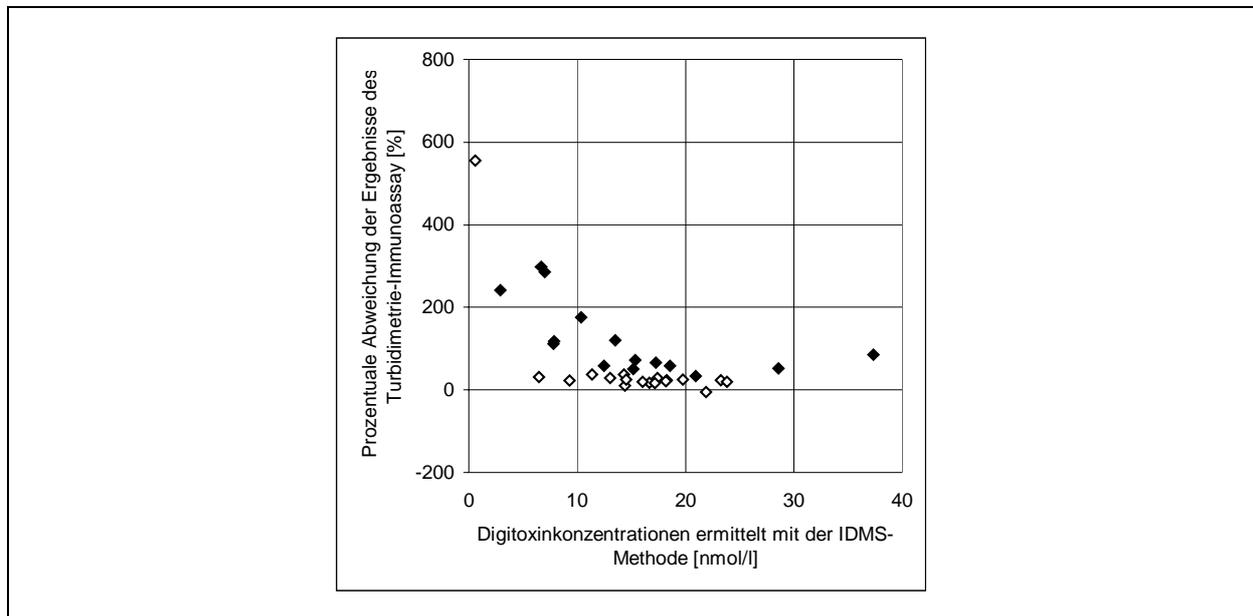


**Abb. 27:** Prozentuale Abweichung der Digoxinergebnisse von Patientenseren, ermittelt mit dem Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassay von Roche, bezogen auf die mit der IDMS-Methode analysierten Zielwerte. Die ausgefüllten Punkte markieren die Ergebnisse, deren Abweichung vom Zielwert über die zulässigen Grenzen hinaus gehen. Die Abweichungen der Patientenseren Nr. 2, 10 und 18 sind in diesem Diagramm nicht dargestellt; sie sind größer als 800 %.

Die mit dem Enzymimmunoassay bestimmten Digoxinkonzentrationen von Kontrollmaterialien weichen um  $-4,5\%$  (Median der Differenzen), von Patientenseren um  $+24,8\%$  (Median der Differenzen) von den Zielwerten ab. Die Tendenz der Kontrollmaterialien zu niedrigeren Werten und die der Patientenseren zu höheren Konzentrationen ist auch aus dem Verlauf der Regressionsgeraden der beiden Meßreihen (Abb. 19, Abb. 20) zu erkennen. Trotz der Abweichungen von den Zielwerten sind die Ergebnisse sowohl für Kontrollmaterialien als auch für Patientenseren relativ zufriedenstellend. Lediglich das Patientenserum Nr. 33 überschreitet mit  $33,4\%$  die maximal zulässige prozentuale Abweichung.

Die Ergebnisse der Kontrollmaterialien, ermittelt mit einem Turbidimetrie-Immunoassay, stimmen mit den Referenzmethodenwerten als Zielwerten gut überein. Die Abweichung beträgt  $0,5\%$  (Median der Differenzen). Kein Wert weicht über die maximal zulässige Abweichung hinaus vom Zielwert ab. Im Gegensatz dazu weichen die Ergebnisse der Patientenseren um  $37,5\%$  (Median der Differenzen) von den Zielwerten ab. Die Ergebnisse

von 16 der 34 untersuchten Patientenseren weichen stärker von den Referenzmethodenwerten ab als maximal zulässig.



**Abb. 28:** Prozentuale Abweichung der Digitoxinergebnisse von Patientenseren, ermittelt mit dem Turbidimetrie-Immunoassay von Olympus, bezogen auf die mit der IDMS-Methode analysierten Zielwerte. Die ausgefüllten Punkte markieren die Ergebnisse, deren Abweichung vom Zielwert über die zulässigen Grenzen hinaus gehen. Die Abweichung des Patientenserums Nr. 15 ist in diesem Diagramm nicht dargestellt; sie ist größer als 800 %.

Die Vergleiche zeigen, daß die Ergebnissen der Routinemethoden von den Referenzmethodenwerten als Zielwerten mehr oder weniger stark abweichen. Es fällt auf, daß die Abweichungen bei Kontrollmaterialien weitaus geringer sind als bei Patientenproben. Kontrollmaterialien sind auf Serumbasis hergestellte, mit Analyten aufgestockte Proben, die im Gegensatz zu Patientenproben keine oder nur geringe Anteile von Metaboliten enthalten. Diese Metabolite können bei der Messung von Patientenproben mit den Antikörpern der Routinemethoden kreuzreagieren [52]. Neben Abbauprodukten des Digoxins und Digitoxins sind weitere Komponenten wie Steroidhormone, strukturell verwandte Medikamente und endogene digoxinähnliche immunreaktive Faktoren (DLIF) [8, 50] bekannt, die zu Kreuzreaktionen führen können. Durch die Kreuzreaktionen werden höhere Konzentrationswerte vorgetäuscht. Solche fehlerhaften Meßwerte können zur Fehlinterpretation und falscher Behandlung von Patienten führen.

Beurteilt man die Routinemethoden anhand der Ergebnisse, die für Kontrollmaterialien, die auch in der externen Qualitätskontrolle eingesetzt werden, erzielt wurden, so haben sowohl die Methoden zur Bestimmung von Digoxin als auch die zur Bestimmung von Digitoxin die Anforderungen an die Richtigkeit der Ergebnisse erfüllt.

Die Analyse von Patientenseren zeigt jedoch für die Bestimmung von Digoxin, daß durch die mangelhafte Spezifität der beiden eingesetzten Methoden z.T. deutlich größere Abweichungen von den Zielwerten auftreten als sie nach den Richtlinien der Bundesärztekammer maximal zulässig sind.

Bei der Anwendung des Turbidimetrie-Immunoassay zur Digitoxinbestimmung erfüllten die Ergebnisse von 16 der 34 untersuchten Patientenseren die Anforderungen nicht. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der mangelnden Spezifität des Antikörpers und/oder den Mängeln des Detektionsprinzips. Eine deutlich bessere Analytik zeigt der Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Digitoxin. Lediglich ein Ergebnis der untersuchten 34 Patientenseren zeigt eine größere als die maximal zulässige Abweichung vom Zielwert.

Die durchgeführten Methodenvergleiche zeigen, daß durch die Entwicklung der Referenzmethoden für die Bestimmung von Digoxin und Digitoxin im Serum ein objektiver Bewertungsmaßstab zur Beurteilung von Routinemethoden geschaffen wurde. Die Einführung der Referenzmethoden zur Ermittlung von Zielwerten in der externen und internen Qualitätskontrolle dürfte zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der Routinebestimmungen von Digoxin und Digitoxin im menschlichem Serum beitragen.

## 8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenzmethoden zur Bestimmung der Cardioglycoside Digoxin und Digitoxin in menschlichem Serum entwickelt. Die Methoden basieren auf dem Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse.

Zunächst mußten isotopenmarkierte Verbindungen synthetisiert werden, die für die Methoden als interne Standards geeignet waren. Aus den natürlich vorkommenden Substanzen Digoxin und Digitoxin konnten mit Hilfe eines Reaktionsgemisch aus Dioxan, Tetrahydrofuran, Triethylamin und Deuteriumoxid die entsprechenden deuterierten Verbindungen gewonnen werden.

Ein definiertes Volumen an Serum, welches den zu untersuchenden Analyten enthielt, wurde mit dem entsprechenden deuterierten internen Standard versetzt. Die Vorreinigung der Probe erfolgte durch Extraktion mit tert-Butylmethylether und säulenchromatographischer Reinigung an einer mit Diol-Phase gefüllten Säule. Anschließend wurde die Probe durch hochleistungs-flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Analyse untersucht, wobei während der Chromatographie Ionen des nichtmarkierten und deuterierten Analyten kontinuierlich registriert wurden. Die Berechnung des Analysenergebnisses erfolgte aus den massenspektrometrisch ermittelten Isotopenverhältnissen in der Serumprobe und in Standardgemischen aus definierten Mengen von nichtmarkiertem und deuteriertem Analyten.

Die Richtigkeit der analysierten Konzentrationen ist eine der wichtigsten Anforderungen an eine Referenzmethode. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, daß die beschriebenen Referenzmethoden ein hohes Maß an Richtigkeit besitzen. Im Rahmen der Validierung wurden darüber hinaus die Präzision, die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Methoden sowie die Meßunsicherheit der Ergebnisse untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die entwickelten Methoden im Hinblick auf diese Aspekte die internationalen Anforderungen an Referenzmethoden erfüllen. Gleichzeitig zeichnen sich die beschriebenen Referenzmethoden durch Praktikabilität und Robustheit in der Anwendung aus.

Die beschriebenen Referenzmethoden sollen zur Zielwertermittlung von Digoxin und Digitoxin in Kontrollmaterialien für die externe Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Laboratorien eingesetzt werden.

Darüber hinaus stehen die hier entwickelten Referenzmeßverfahren zur Validierung der Richtigkeit von kommerziellen Routinemeßverfahren zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Routinemethoden zur Bestimmung von Digoxin und zwei Routinemethoden zur Bestimmung Digitoxin evaluiert. Als Untersuchungsmaterialien wurden Kontrollmaterialien und Patientenproben eingesetzt. Die Zielwerte wurden mit den hier entwickelten Referenzmethoden ermittelt. Anhand von maximal zulässigen Abweichungen, die im Rahmen der externen Qualitätskontrolle als Bewertungsgrenzen gelten sollen, wurden die Routineergebnisse bewertet.

Die Vergleichsergebnisse zeigen große Unterschiede in Abhängigkeit vom analysierten Untersuchungsmaterial. Für Kontrollmaterialien, die keine Metabolite oder kreuzreagierenden Substanzen beinhalten, lagen alle Ergebnisse der untersuchten Routinemethoden im Rahmen der Bewertungsgrenzen. Für Patientenserien konnten jedoch besonders bei den Routinemethoden zur Bestimmung von Digoxin und dem Turbidimetrie-Immunoassay zur Bestimmung von Digitoxin große Abweichungen der Ergebnisse von den Zielwerten gezeigt werden. Die maximal zulässigen Abweichungsgrenzen werden hier zum Teil deutlich überschritten. Als Ursache für die nicht-zufriedenstellenden Ergebnisse der Routinemethoden können die mangelhafte Spezifität der Antikörper oder Mängel der Detektionsverfahren vermutet werden.

## 9 Literatur

1. Beyer, H.; Walter, W.; Lehrbuch der Organischen Chemie, 22. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1991)
2. Klyne, W.; The chemistry of the steroids, 3<sup>rd</sup> edition, Methuen & Co LTD, London (1965)
3. Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München (1998)
4. Estler, C.-J. (Hrsg.); Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2000)
5. Valdes, R.Jr.; Jortani, S.A.; Gheorghiade, M.; Standards of laboratory practice: cardiac drug monitoring, Clin. Chem. 44:5 (1998) 1096-109
6. Greiling, H.; Gressner, A.M. (Hrsg.); Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 1. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1987)
7. Jortani, S.A.; Trepanier, D.; Yatscoff, T.WW.; Valdes, Jr. R.; Convergence of three methods to resolve discrepant immunoassay Digoxin results, Clin. Chem. 43:9 (1997) 1805-8
8. Scholer, A.; Boecker, J.; Engelmayer, U.; Feldmann, K.; Hannak, D.; Kattermann, R.; et al.; Comparability of a new turbidimetric digoxin test with other immunochemical tests and with HPLC – a multicenter evaluation, Clin. Chem. 43:1 (1997) 92-9
9. Valdes, R.Jr.; Jortani, S.A.; Monitoring of unbound digoxin in patients treated with anti-digoxin antigen-binding fragments: a model for the future?, Clin. Chem. 44:9 (1998) 1883-5
10. Azzay, H.M.E.; Duh, S.-H.; Maturen, A.; Schaller, E.; Shaw, L.; Grimaldi, R.; Shock, G.; Christenson, R. H.; Multicenter study of Abbott AxSYM<sup>®</sup> Digoxin II assay and comparison with 6 methods for susceptibility to digoxin-like immunoreactive factors, Clin. Chem. 43:9 (1997) 1635-40
11. Siekmann, L.; Measurement traceability in clinical chemical analyses, IVD Technology 7:1 (2001) 41-50
12. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Internationales Wörterbuch der Metrologie – International vocabulary of basic and general terms in metrology, 2. Auflage, Beuth Verlag, Berlin (1994)
13. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OILM; Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1<sup>st</sup> edition, ISO, Geneva (1993)
14. Müller, M.M.; Implementation of reference systems in laboratory medicine, Clin. Chem. 46:12 (2000) 1907-9

15. Bundesärztekammer; Qualitätssicherung der quantitativen Bestimmungen im Laboratorium: Neue Richtlinien der Bundesärztekammer, Dt.Ärztebl. 85 (1988) A699-712
16. Schumann, G.; Entwicklung von vier Referenzmethoden für die Qualitätssicherung klinisch-chemischer Laboratoriumsuntersuchungen, Habilitationsschrift, Hannover 1996
17. Siekmann, L.; Determination of uric acid in human serum by isotope dilution-mass spectrometry: A definitive method in clinical chemistry, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23 (1985) 129-135
18. Keßler, A.; Siekmann, L.; Measurement of urea in human serum by isotope dilution mass spectrometry: a reference procedure, Clin. Chem. 45:9 (1999) 1523-9
19. Siekmann, L.; Determination of creatinine in human serum by isotope dilution-mass spectrometry: A definitive method in clinical chemistry, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23 (1985) 137-144
20. Siekmann, L.; Hüskes, K.P.; Breuer, H.; Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography - a reference method in clinical chemistry, Z. anal. Chem. 279 (1976) 145-146
21. Siekmann, L.; Schönfelder, A.; Siekmann, A.; Isotope dilution-mass spectrometry of total glycerol in human serum - a reference method in clinical chemistry, Z. Anal. Chem. 324 (1986) 280-281
22. Siekmann, L.; Determination of cortisol in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry: A definitive method in clinical chemistry, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20 (1982) 883-892
23. Siekmann, L.; Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: A definitive method in clinical chemistry, J. Steroid Biochem. 11 (1979) 117-123
24. Siekmann, L.; Determination of oestradiol-17 $\beta$  in human serum by isotope dilution-mass spectrometry, J. Clin. Chem. Clin. Biochem 22 (1984) 551-557
25. Siekmann, L.; Isotope dilution-mass spectrometry of oestriol and oestradiol-17 $\beta$ : an approach to definitive methods, Z. Anal. Chem. 280 (1978) 122-123
26. Siekmann, L.; Measurement of thyroxine in human serum by isotope dilution mass spectrometry, Biomed. Environm. Mass Spectrom. 14 (1987) 683-688
27. Kaarls, R.; Quinn, R.J.; The Comité Consultatif pour la Quantité de Matière: a brief review of its origin and present activities, Metrologia 34 (1997) 1-5
28. Siekmann, L.; Hoppen, H.O.; Breuer, H.; Zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten unter

- Verwendung eines Multiple Ion Detectors (Fragmentographie), *Z. Anal. Chem.* 252 (1970) 294-298
29. Siekmann, L.; Gaschromatographie-Massenspektrometrie als Referenz- und definitive Methode in der Klinischen Chemie, In: H. Günzler (Hrsg.), *Analytiker-Taschenbuch*, Bd. 10, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1991
  30. Lehmann, W.D.; *Massenspektrometrie in der Biochemie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)
  31. ISO International Organisation for Standardization, *ISO Guide 30, Terms and definitions used in connection with reference materials*, 2<sup>nd</sup> edition, ISO, Geneva 1992
  32. Röhle, G.; Siekmann, L.; Qualitätssicherung quantitativer Bestimmungen, In: Thomas, L. (Hrsg.); *Labor und Diagnose*, 5. Auflage, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg (1996)
  33. Dybkaer, R.; Vocabulary for use in measurement procedures and description of reference materials in laboratory medicine, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35:2 (1997) 141-173
  34. ISO International Organisation for Standardization, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions*, 1<sup>st</sup> edition, ISO 5725-1, Geneva (1994)
  35. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze*, DIN 32 645, Beuth Verlag, Berlin (1994)
  36. El Nemr, A.; Tsuchiya, T.; A Convenient Method for Deuteration at the Alpha Position of an Oxo Group in Carbohydrates, *Tetrahedron Letters* 39 (1998) 3543-3546
  37. Eichzertifikat 507 (Meßkolben), ausgestellt vom Landesamt für Mess- und Eichwesen Thüringen (2000)
  38. PTB-Mitteilungen, 100:3 (1990) 196
  39. Weast, R.C.; (Hrsg.), *CRC Handbook of chemistry and physics*, 65<sup>th</sup> edition, CRC Press, Florida (1984)
  40. Mitteilung von Herrn H. Wolf, PTB, Braunschweig
  41. Pickup, J.F.; McPherson, C.K.; A theory of stable-isotope dilution mass spectrometry, In: de Leenheer, A.P.; Roncucci, R.R.; *Quantitative mass spectrometry in life sciences*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1977)
  42. Snedecor, G.W.; Query no. 92, *Biometrics* 8 (1952) 85-6
  43. Digoxin Flex<sup>TM</sup>, Testbeschreibung der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg (1998)
  44. ElecsysQ Digoxin Immunoassay, Testbeschreibung der Firma Roche (1999)

45. Digitoxin Flex<sup>®</sup>, Testbeschreibung der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg (2000)
46. Digitoxin OSR6403, Testbeschreibung der Firma Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg
47. Doerffel, K.; Geyer, R.; Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen, 5., bearbeitete Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1981)
48. Bablok, W.; Haeckel, R.; Meyers, W.; Wosniok, W.; Biometrical methods, In: Haeckel, R. (Hrsg.); Evaluation methods in laboratory medicine, VCH Verlag, Weinheim (1993)
49. Thienpont, L.; Franzini, C.; Kratochvila, J.; Middle, J.; Ricós, C.; Siekmann, L.; Stöckl, D. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33 (1995) 949-957
50. Schlebusch, H.; von Mende, S.; Grün, U.; Gembruch, U.; Bald, R.; Hansmann, M.; Determination of digoxin in the blood of pregnant women, fetuses and neonates before and during anti-arrhythmic therapy, using four immunochemical methods, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29:1 (1991) 57-66
51. Fischer, D.C.; Driesch, R.; A critical evaluation of different assays for the determination of digitoxin in human serum, *J. Lab. Med.* 21:9 (1997) 457-62
52. Gault, M.H.; Longerich, L.L.; Loo, J.C.K.; Ko, P.T.H.; Fine, A.; Vasdev, S.C.; Dawe, M.A.; Digoxin biotransformation, *Clin. Pharmacol. Ther.* 35 (1984) 74-82

## 10 Anhang

### 10.1 Berechnung der Luftauftriebskorrektur

Berechnung der Luftdichte:

$$a = \frac{0.34844 \cdot p - (0.00252 \cdot t - 0.020582) \cdot h}{273.15 + t} \quad (\text{Gl. 13})$$

mit

- a = Luftdichte in  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- p = Luftdruck in hPa (mbar)
- h = relative Luftfeuchte in %
- t = Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$

Berechnung des Luftauftriebs:

$$m = R \cdot \frac{1 - \frac{a}{8000}}{1 - \frac{a}{p}} \quad (\text{Gl. 14})$$

mit

- m = Masse
- R = Anzeige der Waage
- p = Dichte des Wägeguts in  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$

Tabelle 11: Beispiel für ein Rechenschema zur Volumenkalibrierung (Excel-Rechenblatt)

**Volumenkalibrierung**

Gerät:	Hamilton I, Spritze 2	Waage:	Mettler AC 100
Identifikation:	Glaspipette / Glasröhrchen	Gewichtssatz No.:	Sartorius 40212345 / PTB-Nr.:1.11-006817/94
Nennvolumen:	<b>0,390 ml Aqua dest.</b>	Klasse:	E2
Bearbeiter:	P. 56 ASI 2050 / 100 / <b>390</b> / 2200	Eichgewicht [g]:	0,39997
		Meßunsicherheit [mg]:	0,00849

Datum	Gewichts-Anzeige g	Temperatur [°C]	Luftdruck [mbar]	Relative Luftfeuchte [%]	Eichgewicht [g]	Dichte des Wassers [kg*m-3]	Volumen 20 °C [ml]	Volumen bei Meßtemp. [ml]	Korrig. Gewicht [g]	Dichte der Luft [kg*m-3]	Masse [g]
04.12..2000	0,3866	20,4	998	54	0,3997	998,1174	0,3878	0,3878	0,3867	1,178942313	0,3871
	0,3866	20,4	998	54		998,1174	0,3878	0,3878	0,3867	1,178942313	0,3871
	0,3858	20,4	998	54		998,1174	0,3870	0,3870	0,3859	1,178942313	0,3863
	0,3869	20,4	998	54	0,4000	998,1174	0,3881	0,3881	0,3870	1,178942313	0,3874
	0,3863	20,4	998	54		998,1174	0,3875	0,3875	0,3864	1,178942313	0,3868
	0,3863	20,4	998	54		998,1174	0,3875	0,3875	0,3864	1,178942313	0,3868
	0,3864	20,4	998	54		998,1174	0,3876	0,3876	0,3865	1,178942313	0,3869
	0,3861	20,4	998	54	0,3999	998,1174	0,3873	0,3873	0,3862	1,178942313	0,3866

---

Mittelwert:	<b>0,3999</b>	Mittelwert:	<b>0,3876</b>
S.D.:	0,00015	S.D.:	0,00034
VK:	0,0382	VK:	0,087

## 10.2 Berechnung der Kalibrationskurve

Kalibrationsfunktion:  $R_i = ax_i^2 + bx_i + c$  (Gl. 15)

mit  $x_i$  = Stoffmenge des Analyten M im Kalibrator i (i = 1,2,3)

$R_i$  = Quotient (Fläche<sub>M</sub> / Fläche<sub>M\*</sub>) des Kalibrators i

$$a = \frac{R_1(x_3 - x_2) + R_2(x_1 - x_3) + R_3(x_2 - x_1)}{(x_1 - x_2)(x_2 - x_3)(x_3 - x_1)}$$

$$b = \frac{R_2 - R_3}{x_2 - x_3} - a(x_2 + x_3)$$

$$c = R_1 - ax_1^2 - bx_1$$

## 10.3 Berechnung des Analyseergebnisses

Wenn  $a \geq 0$  gilt:  $x_p = \sqrt{\frac{R_p - c}{a} + \left(\frac{b}{2a}\right)^2} - \frac{b}{2a}$  (Gl. 16)

Wenn  $a < 0$  gilt:  $x_p = -\sqrt{\frac{R_p - c}{a} + \left(\frac{b}{2a}\right)^2} - \frac{b}{2a}$  (Gl. 17)

mit  $x_p$  = Stoffmenge des Analyten M in der Probe P

$R_p$  = Quotient (Fläche<sub>M</sub> / Fläche<sub>M\*</sub>) der Probe P

## 10.4 Analysenergebnisse der Digoxinbestimmungen

**Tabelle 12:** Bestimmung von Digoxin in Kontrollmaterialien unter Verwendung unterschiedlicher Massenpaare <sup>1</sup>

<b>Pool-Nr.</b>	<b>Digoxin bestimmt mit den Massen 803, 806 [nmol/l]</b>	<b>Digoxin bestimmt mit den Massen 651, 654 [nmol/l]</b>	<b>Differenz der Mittelwerte [%]</b>
727 01	1,155	1,171	1,4
727 02	3,384	3,405	0,62
727 03	1,385	1,411	1,9
727 04	1,592	1,628	2,3
727 05	1,986	2,016	1,5
768 01	1,130	1,136	0,53
768 03	3,297	3,301	0,12
768 04	1,926	1,934	0,42
768 05	2,275	2,383	4,8
768 06	2,834	2,865	1,1
826 01	1,014	1,024	0,99
826 02	2,241	2,229	-0,54
826 03	1,412	1,414	0,14
826 04	2,889	2,862	-0,93
826 05	2,085	2,102	0,82
826 06	3,236	3,263	0,83

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

**Tabelle 13:** Referenzmethodenwerte für Digoxin, die mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode in Kontrollmaterialien ermittelt wurden <sup>1</sup>

Pool-Nr.	IDMS-Methode (m/z 803,806) [nmol/l]	Impräzision				Erweiterte Meßunsicherheit	
		S [nmol/l]	VK [%]	VK <sub>w</sub> [%]	VK <sub>R</sub> [%]	U [nmol/l]   [%]	
727 01	1,155	0,013	1,2	1,2	0,014	0,027	2,3
727 02	3,384	0,025	0,73	0,72	0,14 *	0,050	1,5
727 03	1,385	0,015	1,1	0,78	0,79 *	0,030	2,2
727 04	1,592	0,0085	0,54	0,47	0,28 *	0,017	1,1
727 05	1,986	0,018	0,90	0,99	0,45 *	0,036	1,8
727 06	2,486	0,040	1,7	0,99	1,4 *	0,083	3,4
768 01	1,130	0,0080	0,71	0,58	0,45 *	0,016	1,4
768 02	1,508	0,011	0,74	0,62	0,44 *	0,022	1,5
768 03	3,297	0,037	1,1	1,0	0,53 *	0,074	2,2
768 04	1,926	0,019	0,97	1,1	0,68 *	0,037	1,9
768 05	2,275	0,029	1,3	0,88	0,97 *	0,057	2,5
768 06	2,834	0,036	1,3	0,49	1,3 *	0,073	2,6
826 01	1,014	0,010	0,97	1,2	0,77 *	0,020	1,9
826 02	2,241	0,021	0,92	0,62	0,73 *	0,041	1,8
826 03	1,412	0,031	2,2	0,44	1,5	0,061	4,3
826 04	2,889	0,014	0,49	0,37	0,34 *	0,028	1,0
826 05	2,085	0,017	0,81	0,90	0,41 *	0,034	1,6
826 06	3,236	0,044	1,3	0,72	1,2 *	0,087	2,7

\*) Der f-Test ist negativ; damit trägt die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen nicht signifikant zur Gesamtpräzision bei.

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

**Tabelle 14:** Referenzmethodenwerte für Digoxin, die mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode in Patientenseren ermittelt wurden

Nr.	1. Ergebnis [nmol/l]	2. Ergebnis [nmol/l]	Mittelwert [nmol/l]	Nr.	1. Ergebnis [nmol/l]	2. Ergebnis [nmol/l]	Mittelwert [nmol/l]
1	0,5568	0,4406	<b>0,499</b>	18	0,0254	0,0173	<b>0,021**</b>
2	0,0090	0,0098	<b>0,0094*</b>	19	1,6129	1,5912	<b>1,602</b>
3	1,7595	1,7555	<b>1,758</b>	20	0,5488	0,5400	<b>0,544</b>
4	0,5263	0,5330	<b>0,530</b>	21	0,7948	0,8448	<b>0,820</b>
5	3,1419	3,1820	<b>3,163</b>	22	0,4742	0,4724	<b>0,473</b>
6	0,6972	0,7016	<b>0,699</b>	23	0,8878	0,9136	<b>0,901</b>
7	1,1058	1,1095	<b>1,108</b>	24	1,1060	1,0833	<b>1,095</b>
8	0,9910	1,0197	<b>1,005</b>	25	1,1646	1,2668	<b>1,216</b>
9	1,2645	1,2867	<b>1,276</b>	26	1,3232	1,3121	<b>1,318</b>
10	0,0142	0,0053	<b>0,010*</b>	27	1,1091	1,2023	<b>1,156</b>
11	0,6564	0,6853	<b>0,671</b>	28	1,7690	1,7416	<b>1,755</b>
12	1,5035	1,5035	<b>1,504</b>	29	2,4873	2,6446	<b>2,566</b>
13	2,5052	2,5184	<b>2,512</b>	30	0,9781	0,9699	<b>0,979</b>
14	1,0870	1,0935	<b>1,090</b>	31	1,5949	1,5904	<b>1,593</b>
15	0,6617	0,6092	<b>0,635</b>	32	1,0759	1,0788	<b>1,077</b>
16	0,9952	1,0030	<b>0,999</b>	33	0,9347	0,9100	<b>0,922</b>
17	0,1385	0,1366	<b>0,138</b>				

\* Bestimmung erfolgte wegen Serummangels unterhalb der Erfassungsgrenze

\*\* Bestimmung erfolgte wegen Serummangels unterhalb der Bestimmungsgrenze

**Tabelle 15:** Volumina für die Dosierung von Seren<sup>1</sup>

<b>Nennvolumen</b>	<b>Kalibriervolumen</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Relative Standardabweichung</b>
<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[%]</b>
0,630	0,62596	0,00034	0,054
0,800	0,79590	0,00035	0,044
0,900	0,89494	0,00049	0,054
1,030	1,02797	0,00031	0,030
1,140	1,13387	0,00026	0,023
1,200	1,19350	0,00040	0,032
1,320	1,31136	0,00021	0,016
1,420	1,40947	0,00033	0,023
1,540	1,52969	0,00017	0,011
1,660	1,65019	0,00028	0,017
1,780	1,76786	0,00043	0,024
2,075	2,06388	0,00021	0,010
2,225	2,20886	0,00049	0,022
2,460	2,44308	0,00057	0,023

**Tabelle 16:** Volumina für die Dosierung von Kalibratoren<sup>1</sup>

<b>Nennvolumen</b>	<b>Kalibriervolumen</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Relative Standardabweichung</b>
<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[%]</b>
100	99,201	0,075	0,075
150	149,580	0,056	0,038
200	199,140	0,071	0,036
250	249,167	0,064	0,026
300	298,760	0,080	0,027

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

## 10.5 Analyseergebnisse der Digitoxinbestimmungen

**Tabelle 17:** Bestimmung von Digitoxin in Kontrollmaterialien unter Verwendung unterschiedlicher Massenpaare<sup>1</sup>

<b>Pool-Nr.</b>	<b>Digitoxin bestimmt mit den Massen 787, 790 [nmol/l]</b>	<b>Digitoxin bestimmt mit den Massen 803,806 [nmol/l]</b>	<b>Differenz der Mittelwerte [%]</b>
748 11	31,71	31,99	0,88
748 12	36,63	36,53	-0,27
748 13	48,63	48,76	0,27
748 14	16,95	17,07	0,67
748 15	23,30	23,25	-0,21
777 01	13,94	13,92	-0,14
777 02	20,20	20,14	-0,30
777 03	27,40	27,50	0,36
777 04	33,50	33,34	-0,48
777 05	40,69	40,69	0,00
777 06	47,24	46,87	-0,78
858 01	33,38	33,61	0,69
858 02	39,49	39,47	-0,05
858 03	46,42	46,99	1,23
858 04	10,52	10,42	-0,95
858 05	15,57	15,55	-0,13
858 06	23,82	23,80	-0,08
AP 2	42,72	42,80	0,19
AP 5	35,23	35,26	0,09
AP 6	23,31	23,16	-0,64

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

**Tabelle 18:** Referenzmethodenwerte für Digitoxin, die mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode in Kontrollmaterialien ermittelt wurden<sup>1</sup>

Pool-Nr.	IDMS-Methode (m/z 787,790) [nmol/l]	Impräzision				Erweiterte Meßunsicherheit	
		S [nmol/l]	VK [%]	VK <sub>w</sub> [%]	VK <sub>R</sub> [%]	U [nmol/l]   [%]	
748 11	31,71	0,12	0,39	0,13	0,41*	0,27	0,85
748 12	36,63	0,21	0,58	0,26	0,58*	0,44	1,2
748 13	48,63	0,14	0,28	0,35	0,23*	0,32	0,66
748 14	16,953	0,047	0,28	0,19	0,23*	0,11	0,66
748 15	23,30	0,10	0,44	0,28	0,38*	0,22	0,94
777 01	13,94	0,053	0,38	0,29	0,27*	0,12	0,83
777 02	20,20	0,091	0,45	0,33	0,34*	0,19	0,96
777 03	27,40	0,085	0,31	0,36	0,21*	0,19	0,71
777 04	33,50	0,18	0,53	0,29	0,027*	0,37	1,1
777 05	40,69	0,074	0,18	0,14	0,13*	0,20	0,50
777 06	47,24	0,26	0,55	0,22	0,58*	0,57	1,2
858 01	33,38	0,13	0,38	0,35	0,17*	0,28	0,83
858 02	39,49	0,24	0,61	0,53	0,33*	0,51	1,3
858 03	46,42	0,24	0,52	0,45	0,29*	0,51	1,1
858 04	10,52	0,085	0,81	0,75	0,33*	0,18	1,7
858 05	15,57	0,093	0,60	0,30	0,58*	0,19	1,2
858 06	23,82	0,14	0,60	0,46	0,44*	0,29	1,2
AP 2	42,72	0,23	0,53	0,44	0,33*	0,47	1,1
AP 5	35,23	0,26	0,72	0,32	0,70*	0,53	1,5
AP 6	23,31	0,17	0,70	0,058	0,50	0,56	1,4

\*) Der f-Test ist negativ; damit trägt die Impräzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen nicht signifikant zur Gesamtpräzision bei.

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

**Tabelle 19:** Referenzmethodenwerte für Digitoxin, die mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsmethode in Patientenseren ermittelt wurden

<b>Nr.</b>	<b>1. Ergebnis</b> <b>[nmol/l]</b>	<b>2. Ergebnis</b> <b>[nmol/l]</b>	<b>Mittelwert</b> <b>[nmol/l]</b>	<b>Nr.</b>	<b>1. Ergebnis</b> <b>[nmol/l]</b>	<b>2. Ergebnis</b> <b>[nmol/l]</b>	<b>Mittelwert</b> <b>[nmol/l]</b>
1	7,8739	7,8408	<b>7,86</b>	18	23,1699	23,3302	<b>23,25</b>
2	13,4500	13,5981	<b>13,52</b>	19	16,6979	16,6126	<b>16,66</b>
3	6,9772	7,0494	<b>7,01</b>	20	15,3948	15,3385	<b>15,37</b>
4	6,6702	6,6886	<b>6,68</b>	21	23,8847	23,8215	<b>23,85</b>
5	14,1758	14,4747	<b>14,33</b>	22	14,4130	14,4279	<b>14,42</b>
6	17,0594	17,7479	<b>17,40</b>	23	10,3358	10,4188	<b>10,38</b>
7	6,4340	6,5326	<b>6,48</b>	24	14,3782	14,6215	<b>14,50</b>
8	2,8736	2,8849	<b>2,88</b>	25	17,1656	17,1410	<b>17,15</b>
9	0,5848	0,5775	<b>0,58</b>	26	13,0498	13,0498	<b>13,05</b>
10	9,2996	9,2724	<b>9,29</b>	27	16,0091	16,0467	<b>16,03</b>
11	18,2706	18,2455	<b>18,26</b>	28	19,7353	19,7670	<b>19,75</b>
12	11,3127	11,4612	<b>11,39</b>	29	18,3694	18,7508	<b>18,56</b>
13	18,2455	18,9600	<b>18,60</b>	30	28,4559	28,7282	<b>28,59</b>
14	12,4320	12,4879	<b>12,46</b>	31	21,3767	22,3481	<b>21,86</b>
15	1,8759	1,8759	<b>1,88</b>	32	7,7508	7,8073	<b>7,78</b>
16	15,1321	15,2446	<b>15,19</b>	33	20,9090	20,9407	<b>20,92</b>
17	37,3027	37,3766	<b>37,34</b>	34	17,1980	17,3299	<b>17,26</b>

**Tabelle 20:** Volumina für die Dosierung von Seren<sup>1</sup>

<b>Nennvolumen</b>	<b>Kalibriervolumen</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Relative Standardabweichung</b>
<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[%]</b>
0,245	0,24361	0,00041	0,17
0,305	0,30331	0,00016	0,054
0,350	0,34852	0,00028	0,080
0,390	0,38764	0,00034	0,087
0,450	0,44673	0,00037	0,083
0,490	0,48794	0,00050	0,102
0,520	0,51634	0,00013	0,025
0,610	0,60656	0,00054	0,088
0,670	0,66650	0,00029	0,044
0,770	0,76481	0,00023	0,030
1,005	0,99826	0,00028	0,028

**Tabelle 21:** Volumina für die Dosierung von Kalibratoren<sup>1</sup>

<b>Nennvolumen</b>	<b>Kalibriervolumen</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Relative Standardabweichung</b>
<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[%]</b>
100	99,201	0,075	0,075
150	149,580	0,056	0,038
200	199,140	0,071	0,036
250	249,167	0,064	0,026

<sup>1</sup> Für die Ergebnisse wurden so viele Stellen angegeben wie durch zwei signifikante Stellen der Meßunsicherheit beschrieben wurden.

## 10.6 Beurteilung von Routinemethoden

**Tabelle 22:** Bestimmung von Digoxin in Kontrollmaterialien

Pool-Nr.	Referenzmethode (IDMS) [nmol/l]	Enzymimmunoassay [nmol/l]	Abweichung [%]	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay [nmol/l]	Abweichung [%]
727 01	1,155	1,268	9,8	1,321	14,4
727 02	3,384	3,558	5,1	3,692	9,1
727 03	1,385	1,531	10,5	1,615	16,6
727 04	1,592	1,613	1,3	1,808	13,6
727 05	1,986	2,112	6,3	2,321	16,9
727 06	2,486	2,736	10,1	2,744	10,4
768 01	1,130	1,107	-2,0	1,256	11,2
768 02	1,508	1,460	-3,2	1,654	9,7
768 03	3,297	3,316	0,6	3,526	6,9
768 04	1,926	1,946	1,0	2,154	11,8
768 05	2,275	2,261	-0,6	2,474	8,7
768 06	2,834	2,906	2,5	3,167	11,8
826 01	1,014	1,153	13,7	1,295	27,7
826 02	2,241	2,465	10,0	2,718	21,3
826 03	1,412	1,562	10,6	1,769	25,3
826 04	2,889	3,071	6,3	3,244	12,3
826 05	2,085	2,243	7,6	2,628	26,0
826 06	3,236	3,546	9,6	3,949	22,0

**Tabelle 23:** Bestimmung von Digoxin in Patientenseren

Nr.	Referenzmethode (IDMS) [nmol/l]	Enzymimmuno- assay [nmol/l]	Abweichung [%]	Elektro- Chemilumineszenz -Immunoassay [nmol/l]	Abweichung [%]
1	0,499	0,653	30,9		
2	0,009	0,141	1 466,6	0,282	3033,3
3	1,758	4,469	154,2	5,154 *	193,2
4	0,530	0,832	57,0	1,064	100,8
5	3,163	3,124	-1,2	3,705	17,1
6	0,699	1,972 *	182,1	2,359 *	237,5
7	1,108	0,960	-13,4	1,500	35,4
8	1,005	0,935	-7,0	1,551	54,3
9	1,276	1,178	-7,7	1,513	18,6
10	0,010	1,076 *	10 660,0	0,256	2460,0
11	0,671	2,023 *	201,5	2,372 *	253,5
12	1,504	1,575	4,7	1,872	24,5
13	2,512	2,715	8,1	3,026	20,5
14	1,090	1,767 *	62,1	2,218 *	103,5
15	0,635	0,820	29,1		
16	0,999	1,652 *	65,4	2,051 *	105,3
17	0,138	1,037 *	651,5	1,218 *	782,6
18	0,021	1,555 *	7 304,8	1,115 *	5209,5
19	1,602	1,908	19,1	1,846	15,2
20	0,544	0,755	38,8	0,640	17,6
21	0,820	0,832	1,5	0,768	-6,3
22	0,473	1,728 *	265,3	0,768	62,4
23	0,901	1,011	12,2	1,024	13,7
24	1,095	1,306	19,3	1,152	5,2
25	1,216	1,382	13,7	1,152	-5,3
26	1,318	1,651	25,3	1,409	6,9
27	1,156	1,306	13,0	1,537	33,0
28	1,755	2,240	27,6	1,739	-0,9
29	2,566	3,046	18,7	2,433	-5,2
30	0,979	0,999	2,0		
31	1,593	1,549	-2,8	1,782	11,9
32	1,077	2,318 *	115,2	2,833 *	163,0
33	0,922	0,845	-8,4	1,128	22,3

\* Abweichung des Ergebnisses ist größer als die zulässige Maximalabweichung

**Tabelle 24:** Bestimmung von Digitoxin in Kontrollmaterialien

<b>Pool-Nr.</b>	<b>Referenzmethode (IDMS) [nmol/l]</b>	<b>Enzymimmunoassay [nmol/l]</b>	<b>Abweichung [%]</b>	<b>Turbidimetrie-Immunoassay [nmol/l]</b>	<b>Abweichung [%]</b>
74811	31,71	31,24	-1,5	32,98	4,0
74812	36,63	33,33	-9,0	36,65	0,1
74813	48,63	44,96	-7,6	49,48	1,7
74814	16,95	16,86	-0,6	15,97	-5,8
74815	23,30	22,35	-4,1	22,25	-4,5
77701	13,94	13,98	0,3	13,35	-4,2
77702	20,20	20,39	0,9	19,37	-4,1
77703	27,40	26,40	-3,7	26,96	-1,6
77704	33,50	31,11	-7,1	33,64	0,4
77705	40,69	34,24	-15,9	41,49	2,0
77706	47,24	44,96	-4,8	49,35	4,5
85801	33,38	30,71	-8,0	37,70	12,9
85802	39,49	40,12	1,6	41,23	4,4
85803	46,42	46,92	1,1	51,18	10,3
85804	10,52	10,89	3,5	11,13	5,8
85805	15,57	15,29	-1,8	15,97	2,6
85806	23,82	21,04	-11,7	20,94	-12,1
AP 2	42,72	33,72	-21,1	42,80	0,2
AP5	35,23	29,54	-16,2	35,47	0,7
AP6	23,31	20,00	-14,2	22,12	-5,1

**Tabelle 25:** Bestimmung von Digitoxin in Patientenseren

Nr.	Referenzmethode (IDMS) [nmol/l]	Enzymimmuno- assay [nmol/l]	Abweichung [%]	Turbidimetrie- Immunoassay [nmol/l]	Abweichung [%]
1	7,86	10,72	36,4	17,15 *	118,2
2	13,52	18,04	33,4	29,84 *	120,7
3	7,01	10,06	43,5	27,09 *	286,4
4	6,68	10,59	58,5	26,57 *	297,8
5	14,33	15,55	8,5	19,63	37,0
6	17,40	22,74	30,7	22,38	28,6
7	6,48	8,10	25,0	8,51	31,3
8	2,88	5,75	99,7	9,82 *	241,0
9	0,58	1,96	237,9	3,80	555,2
10	9,29	10,06	8,3	11,39	22,6
11	18,26	23,26	27,4	22,51	23,3
12	11,39	15,55	36,5	15,71	37,9
13	18,18	22,48	23,7	21,99	21,0
14	12,46	17,51	40,5	19,76 *	58,6
15	1,88	4,71	150,5	21,57 *	1.047,3
16	15,19	15,68	3,2	23,00 *	51,4
17	37,34	46,40	24,3	69,27 *	85,5
18	23,25	29,28	25,9	28,88	24,2
19	16,66	16,42	-1,4	19,61	17,7
20	15,37	16,73	8,9	26,40 *	71,8
21	23,85	24,69	3,5	28,75	20,5
22	14,42	13,55	-6,0	15,81	9,6
23	10,38	12,69	22,3	28,62 *	175,7
24	14,50	18,35	26,6	18,04	24,4
25	17,15	19,47	13,5	20,00	16,6
26	13,05	16,76	28,4	16,73	28,2
27	16,03	18,18	13,4	19,34	20,6
28	19,75	24,09	22,0	24,57	24,4
29	18,56	23,08	24,4	29,28 *	57,8
30	28,59	30,45	6,5	43,52 *	52,2
31	21,86	22,32	2,1	20,78	-4,9
32	7,78	12,65	62,6	16,47 *	111,7
33	20,93	27,93 *	33,4	27,85 *	33,1
34	17,26	21,49	24,5	28,62 *	65,8

\* Abweichung des Ergebnisses ist größer als die zulässige Maximalabweichung

Herrn Prof. Dr. L. Siekmann möchte ich herzlich danken für sein Engagement, mit dem er diese Arbeit begleitet hat und seine Diskussionsbereitschaft, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Weiterhin gilt mein Dank

Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Bidlingmaier für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes,

dem Referenzinstitut für Bioanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln,

Frau Anita Siekmann, für ihre unzähligen Ratschläge bei der Analyse von Proben; ihre Erfahrung und ihr Wissen waren eine unerschöpfliche Quelle, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat,

Frau D. Christoph, Frau D. Eckert und Frau A. Müller für ihre stetige Hilfsbereitschaft,

den Damen und Herren im Klinisch-Chemischen Labor des Instituts für Klinische Biochemie, Universitätskliniken Bonn, die Patientenserum gesammelt haben und immer wieder bereit waren, Proben am Gerät der Firma Dade Behring zu messen,

Herrn Dr. Weidemann, Herrn Dr. Degel, Frau Ascheneller sowie den Damen und Herrn im Klinisch-Chemischen Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Stadt Nürnberg, für das Sammeln von Patientenserum sowie das Messen zahlreicher Proben an den Geräten der Firmen Roche und Olympus,

Frau Prisca Jäger für das zügige Korrekturlesen und die kritische Diskussion,

Meiner Familie für ihr reges Interesse, mit dem sie meine Arbeit verfolgt hat, und die Gewißheit, jederzeit Rückhalt zu finden,

Uli Keßler, der mir durch kritisches Nachfragen und viele Diskussionen bei dieser Arbeit geholfen hat, für die liebevollste Unterstützung, bei der auch die Entfernung keine Rolle spielt.