

**Entwicklung einer DIP-EESI-MS und der  
Einsatz von ambienten Ionisationsmethoden  
zur Analyse von Arzneimitteln**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

–Dr. rer. nat. –

vorgelegt von M. Sc.

**Claudia Lenzen**

geboren in Bad Karlshafen

Angewandte Analytische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis Februar 2017 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz im Institut Angewandte Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online



*Offen im Denken*



Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/77369  
**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230413-110148-4



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-SA 4.0) genutzt werden.

Gutachter: Prof. Dr. Oliver J. Schmitz  
PD Dr. Ursula Telgheder

Vorsitzender: Prof. Dr. Maik Walpuski

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2023

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Entwicklung einer DIP-EESI-MS und der Einsatz von ambienten Ionisationsmethoden zur  
Analyse von Arzneimitteln“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Spangenberg, 14.08.2022



*Claudia Lenzen*

---

Claudia Lenzen

## ***Danksagung***

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver J. Schmitz für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine fachliche Betreuung und Unterstützung bei jeglichem Diskussionsbedarf sowie für die Möglichkeit, die modernsten analytischen Instrumente im Labor selbständig zu nutzen. Vielen Dank, dass ich an einem spannenden und abwechslungsreichen Thema forschen durfte, dass mir darüber hinaus einen direkten Einstieg in die Arbeitswelt ermöglichte.

Meinen herzlichsten Dank an Frau PD Dr. Ursula Telgheder, die nach meiner Masterarbeit auch das Korreferat meiner Dissertationsschrift übernommen hat.

Weiter möchte ich mich herzlich bei Herrn Rolf Eichelberg und den Mitarbeitern der Firma SIM Scientific Instruments Manufacturer GmbH für die kompetente Beratung und die technische Hilfestellung während der gesamten Arbeit bedanken. Ebenso gilt mein Dank der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF), ohne deren finanzielle Förderung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Winterfeld, dem Geschäftsführer der Adler Apotheke in Burscheid, für die fachlichen Diskussionen und die Bereitstellung der Medikamente.

Ich bedanke mich bei allen damaligen Kollegen und Mitarbeitern des Arbeitskreises der Angewandten Analytischen Chemie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft, vor allem bei Maria Madani und Jörg Hippler. Maria, vielen herzlichen Dank, für die aufmunternden Gespräche und jedes offene Ohr, dass du für mich hattest, sowohl während meiner Doktorarbeit als auch schon die vielen Jahre davor und auch für die ganzen Arbeiten die Du im Arbeitskreis erledigt hast, ohne dass es auffiel. Ohne dich wäre so manche Chemikalie und Pipette noch immer verschollen. Jörg, vielen Dank für deine unermüdliche Hilfe in technischen Fragen und das „Handauflegen“ bei nicht funktionierenden Geräten. Weiter möchte ich mich ganz herzlich bei unserer Laborantin Jennifer bedanken, die unermüdlich Proben injiziert hat, wenn ich nicht da sein konnte.

Ein großes Dankeschön geht an meine Bürokollegen. Hier möchte ich vor allem bei Simeon Horst bedanken. Simeon, vielen herzlichen Dank, dass du mich während unserer gemeinsamen Arbeitszeit ertragen hast, mir die verdreckte Quelle nicht ständig vorgeworfen hast, für deine Spontanität bei den Messzeiten, deine motivierenden und aufbauenden Gespräche, die schöne Zeit bei Käsefondue und Co., für das Korrekturlesen dieser schwierigen Arbeit und natürlich für die unzähligen, komischen Erinnerungen, die immer noch für gute Laune sorgen. Ebenso möchte ich mich bei Anja Heimann bedanken, dass sie die ganzen organischen Formeln, die überwiegend den Anhang schmücken, durchgesehen hat, sowie die anregenden Diskussionen, ob die eine oder andere Reaktion möglich ist.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, denn ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Danke für alles.

*"I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work."*

Thomas Alva Edison

### Abstract

The present thesis is concerned with the development and optimisation of an ion source with a direct inlet system and based on electrospray ionisation for the analysis of pharmaceuticals. Because the ionisation mechanism of the new ion source is most likely based on the mechanism of extractive ESI, it is named DIP-EESI.

After optimisation of the source parameters, lower detection and quantification limits could be determined with the DIP-EESI-MS than with the DIP-APCI or DIP-APPI using pure substances that could be ionised well with the DIP-EESI. Only a low background level was generated by the ESI spray, resulting in a baseline level comparable to that observed with the DIP-APCI. The DIP-EESI can therefore be classified as having the same performance as the DIP-APCI. Comparable results were also obtained in comparison with related methods using the same ionisation mechanism of the EESI described in the literature [1–3].

Based on the results obtained with the pure substances, the DIP-EESI could be applied for the analysis of pharmaceuticals.

In the analysis of pharmaceuticals, the DIP-EESI showed lower intensities of the active substances compared to the DIP-APCI due to the EESI mechanism. However, the DIP-EESI also shows a lower ionisation of excipients, such as starch, stearate or povidone. This minimises interference from excipients and allows screening for unknown impurities and identification of known impurities.

Quantitative analysis of temperature-stable substances such as acetylsalicylic acid and screening for impurities is not possible with the DIP-EESI. However, the thermal decomposition products can be detected in situ and structurally elucidated.

With the DIP-EESI and the DIP-APCI, a rapid method could be developed to investigate the temperature-stable pharmaceuticals and to screen for unknown impurities. This method could be applied to all the pharmaceuticals examined without the need for time-consuming method development. However, the active ingredients of the tablets had to be dissolved because they were so well ionised that even with the smallest possible sample weight, the active ingredient could still be detected after the source had been heated up for several hours.

The DIP-EESI was used to examine tablets that had been halved and repackaged for patient-specific secondary blistering. These tablets were stored in their original or new packaging in a translucent plastic container in daylight without further precautions on the laboratory bench for up to 3 years.

Solutions of these tablets containing an amount of the active ingredient that could be analysed with DIP-EESI were compared with each other. Of nine substances investigated, a significant difference in the concentration of active ingredient in the tablets was found for clonazepam and primidone between the original and repackaged tablets. The relative standard deviations for the assay of the active ingredients were on average 4.3 %.

In addition, screening for known impurities in the tablets was performed. The DIP-EESI is so sensitive that it can still detect these impurities in the commercially available tablets, even though their content is below the maximum permitted limit. An identification of the known impurities could be done via fragmentation reactions. The results obtained with DIP-EESI were compared with those from DIP-APCI and HPLC-ESI-MS investigations and partially confirmed.

Since the DIP-EESI is less susceptible to interference by auxiliary substances than the DIP-APCI, it was also possible to screen solutions with a high content of dissolved auxiliary substances for unknown impurities or conspicuous masses. Some of the unknown substances detected in the tablet solution could be separated via the temperature gradient of the DIP to such an extent that they could be fragmented individually from one another and examined. For example, with the DIP-EESI, five different substances could be detected in amlodipine tablets due to the separation, which would have been detected as one substance without temperature separation. A structure could be postulated for some of these substances. It was possible to develop a rapid procedure for the analysis of pharmaceuticals with the DIP-EESI and to demonstrate the potential of the method.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Ambiente Massenspektrometrie.....	1
1.1.1 ESI und verwandte Ionisierungsmethoden.....	2
1.1.2 APCI und verwandte Ionisierungsmethoden.....	17
1.2 Ionenfallenmassenspektrometrie.....	23
1.3 Analyse von Arzneimitteln.....	25
1.3.1 Analytische Prüfungen für Tabletten.....	26
1.3.2 Stabilitätsstudien an Tabletten.....	28
1.3.3 Patientenindividuelle Zweitverblisterung.....	29
1.3.4 Analyse von Arzneimitteln (Tabletten).....	30
2 Problemstellung und Zielsetzung.....	32
3 Experimenteller Teil.....	34
3.1 Geräte und Materialien.....	34
3.1.1 Massenspektrometrie und Direkteinlass-System.....	34
3.1.2 Flüssigchromatographie-System.....	34
3.1.3 Chromatographie-Säulen.....	34
3.1.4 Sonstige Geräte.....	35
3.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.6 Sonstige Software.....	35
3.2 Chemikalien.....	35
3.2.1 Lösungsmittel und Eluenten.....	35
3.2.2 Additive.....	36
3.2.3 Gase.....	36
3.2.4 Proben und Standards.....	36
3.3 Methoden.....	37
3.3.1 Untersuchungen mit HPLC-UV/MS.....	38
3.3.2 Untersuchungen mit DIP-APCI oder DIP-EESI.....	50
4 Ergebnisse und Diskussion.....	55
4.1 Funktionsweise der DIP-EESI.....	55
4.2 Entwicklung und Optimierung.....	55
4.3 Analytische Grenzen.....	69
4.4 Analyse von Medikamenten.....	73
4.4.1 Vergleich von originalverpackten und neuverpackten Tabletten.....	73
4.4.2 Vergleich DIP-APCI, DIP-EESI, HPLC-MS und HPLC-UV.....	87
4.4.3 Einschränkungen der Medikamentenanalyse mit DIP-APCI oder DIP-EESI.....	147
5 Zusammenfassung/Fazit.....	163
6 Anhang.....	165
6.1 Namensverzeichnis der Verunreinigungen.....	165
6.1.1 Amlodipin.....	165
6.1.2 Irbesartan.....	165

---

6.1.3	Metoprolol .....	166
6.1.4	Midodrin .....	166
6.1.5	Mirtazapin .....	166
6.1.6	Pipamperon.....	167
6.1.7	Piracetam .....	167
6.1.8	Primidon.....	167
6.1.9	Trazodon .....	167
6.2	Chronogramme, Spektren und mögliche Fragmente .....	168
6.2.1	Amlodipin.....	168
6.2.2	Clonazepam.....	182
6.2.3	Irbesartan.....	188
6.2.4	Metoprolol .....	193
6.2.5	Midodrin .....	210
6.2.6	Mirtazapin .....	213
6.2.7	Pipamperon.....	214
6.2.8	Primidon.....	217
6.2.9	Trazodon .....	236
7	Abbildungsverzeichnis .....	243
8	Tabellenverzeichnis.....	254
9	Literaturverzeichnis .....	255

## Abkürzungsverzeichnis

(N)IR	(Nah)infrarot
°C	Grad Celsius
ABP	Abbauprodukte
AI	<i>Ambient ionisation</i>
AP/TD-EESI	<i>Atmospheric-Pressure Thermal Desorption-Extractive Electrospray Ionisation</i>
ApBetrO	Apothekenbetriebsordnung, Apothekenbetriebsordnung
APCI	Atmosphärendruck-Chemische Ionisation ( <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )
API	Atmosphärendruck-Ionisation ( <i>Atmospheric pressure ionization</i> )
AP-MALDI	<i>Atmospheric-pressure matrix-assisted laser desorption ionization</i>
APPI	Atmosphärendruck-Photoionisation ( <i>Atmospheric pressure photoionization</i> )
AP-TD/ESI	Atmosphärendruck- thermische Desorption/ Elektrospray-Ionisation
ASAP	<i>atmospheric solids analysis probe</i>
BPC	<i>Base peak Chronogram</i> oder <i>Base peak Chromatogram</i> bei chromatographischen Messungen
CEM	<i>Chain Ejection Model</i>
CI	<i>chemische Ionisation</i>
CID	stoßinduzierte Dissoziation ( <i>collision-induced-dissociation</i> )
CRM	<i>Charge Residue Model</i>
ct	<i>Counts</i>
$d_1$	Abstand zwischen Sprayer und Probenoberfläche bei der DESI
$d_2$	Abstand zwischen MS und Probenoberfläche bei der DESI
Da	Dalton
DAPCI	Desorptions-Atmosphärendruck-Chemische Ionisation ( <i>desorption atmospheric pressure chemical ionization</i> )
DART	<i>Direct analysis in real time</i>
DESI	<i>Desorption electrospray ionization</i>
DI	Desorptionsionisation
DIP	<i>direct-inlet probe</i>
DIP-APCI	DIP-Atmospheric pressure chemical ionisation
DIP-APPI	<i>DIP-Atmospheric pressure photoionization</i>
DP	<i>Direct probe</i>
DSC	Differential-Scanning-Kalorimetrie
DTA	Differentialthermoanalyse
EESI	extraktive Elektrospray-Ionisation ( <i>extractive Electrospray-Ionisation</i> )
EI	Elektroneneinschlag ( <i>Electron Impact</i> )

EIC	<i>Extracted Ion Chronogram</i> oder <i>Extracted Ion Chromatogram</i> bei chromatographischen Messungen
ELS	<i>Evaporative Light Scattering</i>
ESA-Py	<i>electrospray-assisted pyrolysis-ionization</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation ( <i>Electrospray ionisation</i> )
eV	Elektronenvolt
EW	Einwaage
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FD-ESI	<i>Fused-Droplet Elektrospray-Ionisation</i>
GC	Gaschromatographie
HCT	Hydrochlorothiazid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
HPTLC	<i>High-performance thin-layer chromatography</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IEM	<i>Ion Evaporation Model</i>
IS	interner Standard
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie (Liquid chromatography)
LIT	lineare (zweidimensionale) Ionenfalle ( <i>linear ion trap</i> )
LOD	Nachweisgrenze ( <i>Limit of detection</i> )
logK <sub>ow</sub>	logarithmischer Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LOQ	Bestimmungsgrenze ( <i>Limit of quantification</i> )
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
min	Minute
MPIS	Multi-Purpose-Quellengehäuse ( <i>Multipurpose ion source</i> )
MS	Massenspektrometrie
MTS	<i>p</i> -Toluolsulfonsäuremethylester
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PDA	<i>Photodiode-array</i>
PF-USP	Pharmacopeia Forum der USP-NF
PG	Prüfgröße
Ph. Eur.	europäisches Arzneibuch ( <i>European Pharmacopoeia</i> )
psi	<i>Pound-force per square inch</i>
QIT	Quadrupol-(dreidimensionale) Ionenfalle ( <i>Quadrupole ion trap</i> )
QQQ	Triplequadrupol
r.H.	relative Luftfeuchtigkeit ( <i>relative humidity</i> )

R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RF	Radiofrequenz
RSD	relativen Standardabweichungen
s	Sekunde
S/N	<i>Signal-to-noise</i>
SESI	<i>Secondary electrospray ionization</i>
SPS	<i>Smart parameter setting</i>
TD-Einheit	Thermodesorptionseinheit
TD-ESI	Thermodesorptions-ESI-System
TEA	Triethylamin
TG	Thermogravimetrie
THF	Tetrahydrofuran
TLC/TD/I-MS	<i>Thin-layer chromatography / thermal desorption / ionisation mass spectrometry</i>
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxyd
USP	<i>United States Pharmacopeial</i>
USP-NF	<i>USP-National Formulary</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VU	Verunreinigung
VUs	Verunreinigungen
VUV	Vakuum Ultraviolett
$\alpha$	Aufschlagwinkel des Sprays auf die Oberfläche bei der DESI
$\beta$	Winkel zwischen MS und Probenoberfläche



## 1 Einleitung

Die Massenspektrometrie (MS) ist heutzutage ein unverzichtbares Werkzeug der Analytik. Sie beschränkt sich nicht nur auf die chemische Analytik, sondern hat unlängst Einzug in die Physikalische Chemie, Biochemie, Pharmazie, Medizin und viele weitere angrenzende Gebiete genommen. Aufgrund steigender Komplexität der Proben wird die Massenspektrometrie vor allem gekoppelt mit verschiedenen Trenntechniken, wie der Chromatographie und der elektrophoretischen Trennung eingesetzt. Doch seit der ersten Veröffentlichung der *Desorption electrospray ionization*<sup>1</sup> (DESI) 2004 [4] und der *Direct analysis in real time* (DART) 2005 [5] als erste ambiente Ionisationsmethoden, steigt die Zahl der direkten Analysen mittels Massenspektrometrie ohne vorherige Trennung und Probenvorbereitung. Diese Verfahren haben aufgrund der geringen Probenvorbereitung ein großes Potential für die Forschung und Entwicklung aber auch für Qualitätskontrollen in vielen Zweigen der Industrie. [6–11]

### 1.1 Ambiente Massenspektrometrie

Bei der ambienten Massenspektrometrie erfolgt die Ionisierung unter Umgebungsbedingungen (*ambient ionisation*; AI). Die *ambient ionisation* sollte nicht mit der Atmosphärendruck-Ionisation (*Atmospheric pressure ionization*; API) verwechselt werden. Beide Techniken haben zwar viele Gemeinsamkeiten doch weisen die Techniken, die streng unter *ambient ionisation* fallen grundlegende Charakteristika auf. Unter *ambient ionisation* versteht man die direkte Analyse von weitgehend unbehandelten Proben oder Objekten in der offenen Umgebung. Der native Zustand und die räumliche Integrität der Probe bleiben dabei weitestgehend erhalten. Die „Probenvorbereitung“ kann dabei in Echtzeit und unmittelbar vor der Ionisierung oder während der Analyse der Analyten stattfinden [12]. Dabei werden von der Probe nur einzelne Moleküle ins Massenspektrometer geleitet und nicht die gesamte Probe. Während bei der API die Ionisierung ebenfalls unter Atmosphärendruck erfolgt, muss sie nicht in der offenen Umgebung stattfinden, sondern z.B. unter einer Stickstoffatmosphäre. Des Weiteren werden bei den API-Systemen Ionen aus meist verdünnten, flüssigen Lösungen erzeugt. Prominenteste Vertreter der API sind die klassische Elektrosprayionisation (ESI) oder die Atmosphärendruck-Chemische Ionisation (APCI). [10, 13, 14]

Der Begriff, der *ambient ionisation*, wurde vor allem seit der Einführung der DESI 2004 [4] und der DART 2005 [5] geprägt. Seitdem sind zahlreiche ambiente Ionisierungsmethoden veröffentlicht worden, deren Zahl noch immer rapide ansteigt. So waren es 2010 bereits 30 neue Techniken, die oft getrennte Desorptions- und Ionisationsprozesse in einer einzigen Methode kombinieren, während 10 Jahre später

---

<sup>1</sup> Hinweis: Englische Begriffe werden nicht grundsätzlich ins Deutsche übersetzt. Existiert eine im Deutschen gängige Übersetzung wird diese verwendet. Ist eine solche Übersetzung nicht bekannt oder nicht gebräuchlich, wird weiterhin der englische Begriff verwendet.

ca. 95 Techniken beschrieben wurden [15], was das immense Potential dieser Techniken widerspiegelt. Diese ambienten Ionisierungsmethoden können sich sowohl durch ihren Desorptionsmechanismus als auch durch ihren Ionisationsprozess unterscheiden. Sie können in drei unterschiedliche Ionisationsprozesse unterteilt werden: In Elektrospray-Ionisation (ESI), Atmosphärendruck-Chemische Ionisation (*Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) und Atmosphärendruck-Photoionisation (*Atmospheric pressure photoionization*; APPI) verwandte Prozesse. Die Einsatzgebiete dieser Techniken hängen dementsprechend auch von der Art der Ionisierung ab. [7, 10, 13]

In den nächsten Kapiteln werden einige der Techniken, die auf ESI und APCI basieren, vorgestellt. Da es inzwischen eine Vielzahl von Techniken gibt, die unterschiedlichste Desorptionstechniken verwenden, werden hier überwiegend nur die Techniken betrachtet, die einen ähnlichen Aufbau oder Mechanismus zu der in dieser Arbeit verwendeten Ionisierungsverfahren haben, sowie die beiden Ionisationsmechanismen der ESI und APCI.

### 1.1.1 ESI und verwandte Ionisierungsmethoden

Die ESI und ESI-verwandte Ionisierungsmethoden können aufgrund ihres Ionisationsprozesses für mittelpolare bis polare Stoffe sowie gleichermaßen für die Analyse von kleinen als auch von großen Molekülen von mehreren kDa eingesetzt werden. Ob sich eine spezielle Ionisierungsmethode für einen speziellen Analyten eignet, hängt dabei vom eingesetzten Desorptionsmechanismus ab, der sich entsprechend der verwendeten Technik unterscheidet. Wurde der Analyt erfolgreich desorbiert, erfolgt hier die Ionisation entsprechend des ESI-Mechanismus. [13]

#### 1.1.1.1 Die ESI und der ESI Mechanismus

Das Elektronenspray selbst ist eine altbekannte Technik, wurde aber zunächst nicht in der Analytik genutzt, sondern um Gegenstände z.B. Autokarosserien zu lackieren [16].

Erstmals 1968 wurde von Dole et al. [17] ein Elektronenspray im analytischen Kontext verwendet und 1984 wurde das erste ESI erzeugte Massenspektrum veröffentlicht [18]. Danach ging es rasch mit der Entwicklung der ESI voran. So wurde bereits drei Jahre später die ESI als Brücke zwischen Flüssigchromatographie (*Liquid chromatography*, LC) und MS dargestellt [19] und weitere zwei Jahre später wurden erstmals Spektren von Biomoleküle mit Mehrfachladungen von Fenn et al. [20] publiziert. Die ESI wird dabei genutzt, um Moleküle aus der flüssigen Phase in gasförmige, geladene Spezies zu überführen, die dann mit dem MS detektiert werden können. Üblicherweise werden mit Hilfe der ESI im positiven Ionisierungsmodus protonierte Moleküle bzw. im negativen Ionisierungsmodus deprotonierte Moleküle gebildet. In beiden Modi können Moleküle mit Mehrfachladungen entstehen. Dabei kann es auch zu verschiedenen Adduktbildungen z.B. mit Natrium, Ammonium oder Chlorid kommen. Die Ladung,

die ein Molekül in der flüssigen Phase trägt, ist nicht zwingend gleich der Ladung, die es nach dem ESI-Prozess in der Gasphase besitzt. [21, 22]

Der ESI-Prozess lässt sich mit einer elektrolytischen Flusszelle vergleichen, bei der der Ladungstransport zwischen Sprühkapillare und Gegenelektrode über das geladene Aerosol erfolgt. Der Aufbau moderne ESI-Quellen kann sich je nach Hersteller leicht unterscheiden. Die ESI-Quellen bestehen, i.d.R., aus folgenden Komponenten, s. Abb. 1:

- Eine Kapillare aus rostfreiem Stahl oder metallisiertem Quarzglas, durch die die flüssige Probe fließt.
- Eine zweite Kapillare, die sogenannte Transferkapillare (aus metallbeschichtetem Glas oder Metall) oder eine ebene Metallplatte mit enger Öffnung, die dafür sorgt, dass die erzeugten Ionen in das Massenspektrometer gelangen.
- Eine Hochspannungsversorgung zur Erzeugung der Potentialdifferenz zwischen Spraykapillare und MS-Inlet.
- Gasversorgung zur pneumatischen Erzeugung/Unterstützung des ESI-Sprays, zur Desolvatisierung und/oder zum Declustering sowie Gegenstromflüssen zur Reduktion der Quellenkontamination.
- Ein differentielles Vakuumsystem aus verschiedenen Kammern und Ionenfokussierungssystemen, um die freien Gasphasen-Ionen möglichst effizient vom Atmosphärendruck in das Hochvakuum des MS zu transportieren. [23]

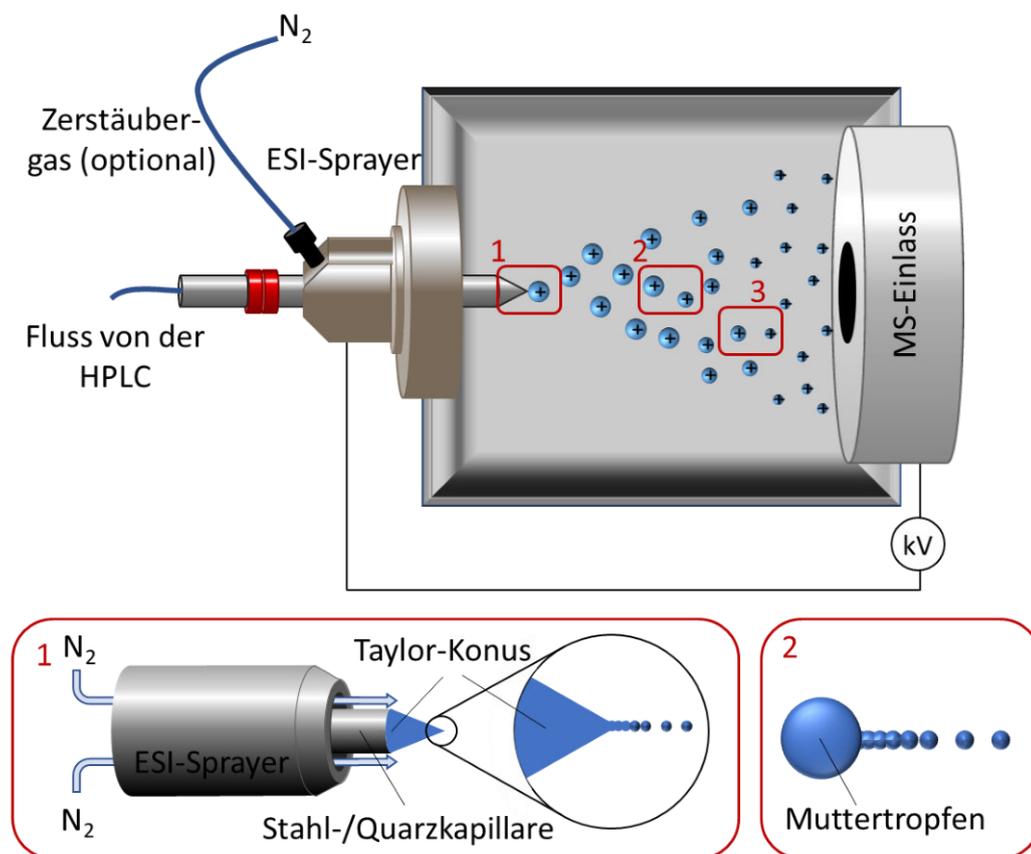


Abb. 1: Schematische Darstellung ESI-Anordnung, sowie des Taylor-Konus (unten links (1)) und der Nasenbildung der Muttertropfen (unten rechts (2)) (Markierung 3 ist in Abb. 2 dargestellt)

Dabei kann die Anordnung der Komponenten durchaus unterschiedlich sein. So nutzen einige Hersteller die sogenannte Off-Axis Geometrie, bei der Sprühkapillare und MS-Inlet in einem Winkel von  $30^\circ - 45^\circ$  zueinander versetzt sind [19, 23–25]. Die meisten inzwischen verwendeten ESI-Quellen nutzen eine orthogonale, also eine  $90^\circ$ -Anordnung, wodurch das MS-Inlet besser vor Verstopfung geschützt wird und besser kleinere Tröpfchen mit hoher Ladungsdichte in die Öffnung gelangen, während große Tröpfchen vom Zerstäubergas wegtransportiert werden [26, 27]. Eine noch effizientere Methode neutrale Moleküle vor dem Eintritt in das MS abzuscheiden, bietet die sogenannte Z-Spray-Geometrie mit einem doppelt orthogonalen System [28].

Einige Hersteller arbeiten mit einem geerdeten Sprayer, während die Hochspannung an der Transferkapillare anliegt [27], andere Hersteller legen die Spannung an die Spray-Kapillare an [24, 25]. Ein weiterer Aufbau ist seit 2014 verfügbar, bei dem die Hochspannung an einem zylindrischen Stab angelegt wird, der vom Spray umsprüht wird [29–32]. Jedoch arbeiten alle Systeme nach dem Prinzip des ESI-Mechanismus und liefern daher vergleichbare Daten [23].

Zur Erzeugung des ESI-Sprays wird eine Flüssigkeit durch die Kapillare gepumpt. Aufgrund der Potentialdifferenz von 3–4 kV bildet sich an der Öffnung der Kapillare zum Massenspektrometer hin der sogenannten *Taylor-Konus* [33, 34]. An der Spitze des *Taylor-Konus* entsteht ein Flüssigkeitsstrahl, von dem sich aufgrund der Ladungsdichte Mikrometer große Tropfen lösen (Abb. 1 unten links) [35]. Jedes Tröpfchen trägt dabei auf seiner Oberfläche etwa  $10^6$  Ladungen [36]. Diese Tröpfchen stoßen sich aufgrund ihrer hohen Ladung gegenseitig ab und bilden ein feines Spray, das Elektrospray. Dieser Prozess kann unter Zuhilfenahme eines Stickstoffstroms um die Kapillare herum unterstützt werden (Pneumatisch unterstütztes System). Es werden zusätzlich kleine Tröpfchen mitgerissen, wodurch vor allem bei Flüssigkeiten mit einer hohen Oberflächenspannung die Tröpfchenbildung unterstützt wird. [14]

Während die geladenen Tröpfchen zum gegenüberliegenden Massenspektrometer fliegen, verdunstet das Lösemittel aus den Tröpfchen und sie schrumpfen zusammen. Durch den Verdunstungsprozess steigt die Ladungsdichte im Tröpfchen an. Die Tröpfchen explodieren nicht wie anfangs vermutet aufgrund des Erreichens des *Rayleigh-Limits* durch *Coulomb-Explosionen*, sondern bilden Ausstülpungen oder Nasen aus, ähnlich denen am *Taylor Konus*, aus denen kleinere Tröpfchen abgesondert werden, die nur noch 1–2 % der Masse aber 10–18 % der Ladung der Muttertropfen besitzen (Abb. 1 unten rechts). [35] Auf diese Weise verlieren die Muttertropfen kontinuierlich an Volumen, während die Ladung durch Absonderung kleinerer Tröpfchen beim Erreichen bzw. bereits bei 70 – 80% des *Rayleigh-Limits* abnimmt [36, 37]. Dieser Vorgang aus Schrumpfen und Zerfall in kleinere Tröpfchen wiederholt sich kontinuierlich bis Tröpfchen im nm-Bereich entstehen [38].

Dabei verändert sich die Umgebung der Tröpfchen auf ihrem Weg vom Sprayer zum MS-Eingang kontinuierlich. Aufgrund des Verdunstungsprozesses kühlen die Tropfen zum einen ab [39], zum anderen verändert sich die Lösungsmittelzusammensetzung der Tröpfchen, da der organische Anteil schneller

verdunstet als der wässrige Anteil. Der Analyt kann dadurch überwiegend von Wasser umgeben sein und sich ggf. in einer Lösungsmittelmischung befinden, in der er nicht mehr löslich ist. [40] Genauso werden Salze, schwer verdampfbare Pufferbestandteile oder sogenannte *Supercharging Agents*, die im Bulk nur in Spuren vorkommen, im Tropfen konzentriert und können trotz der Lebenszeit von einigen  $\mu\text{s}$  bis  $\text{ms}$  einen Effekt auf den Analyten haben. [41, 42]

Aber nicht nur die Vorgänge im Tropfen, sondern auch die Prozesse an und in der Kapillare können einen Einfluss auf den Analyten haben. So wird eine Stahlkapillare im positiven Ionisationsmodus langsam durch Oxidationsprozesse abgebaut, wie Chen et al. [43] zeigten. Ebenso kann auch der Analyt oxidiert werden, wie von He et al. [44] beschrieben. Auch der pH-Wert in der Kapillare ändert sich, wie von van Berkel et al. bewiesen wurde, die in einer Glaskapillare mit Hilfe eines pH-Indikators eine Änderung von pH 7 nach pH 3 in 90 min beobachten konnten [45].

Wie die Analyten aus den nm großen Tröpfchen nun entlassen werden, wird noch diskutiert. Einige Experimente und Computersimulationen sprechen für das sogenannte „*Ion Evaporation Model*“ kurz IEM oder Ionenemissionsmodell. Vor allem für kleine Moleküle scheint dieses Modell sehr gut anwendbar zu sein. Laut diesem Modell werden kleine, lösungsmittelfreie, geladene Moleküle aus dem Tropfen entlassen, wenn diese aufgrund des fortschreitenden Verdunstungsprozesses eine zu hohe Oberflächenladung aufweisen (vgl. Abb. 2 oben). [46–48]

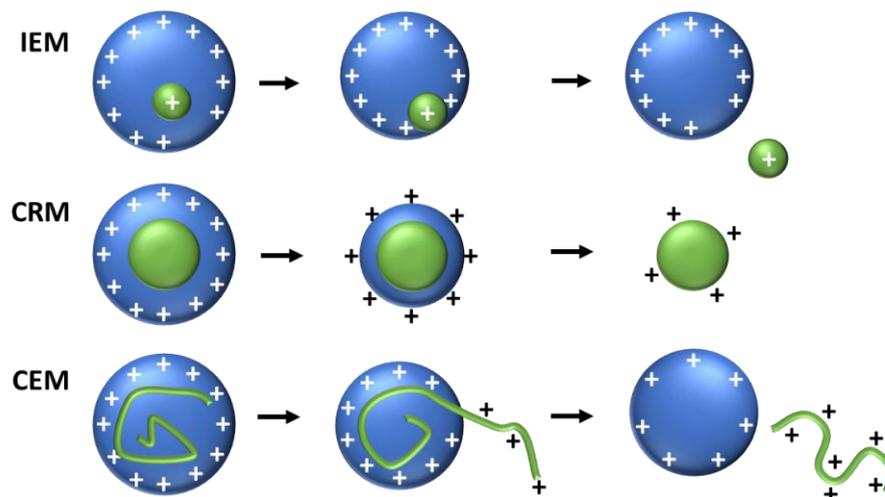


Abb. 2: Darstellung des Ion Evaporation Model (IEM, oben), des Charge Residue Model (CRM, Mitte) und des Chain Ejection Model (CEM, unten). (genauere Erläuterungen s. Text) Abbildung modifiziert aus [49]

Andere Experimente und Computermodelle deuten darauf hin, dass vor allem bei großen Molekülen, z.B. gefalteten Proteinen im MDa-Bereich, das sogenannte „Charge Residue Model“ CRM wahrscheinlicher ist. Dieses Modell beschreibt, dass das Lösungsmittel immer weiter verdunstet und kleinere Moleküle wie z.B. Puffersalze und Lösungsmittelmoleküle mit Ladung aus dem Tropfen, entsprechend dem IEM austreten. Zum Schluss, wenn alle Lösungsmittelmoleküle den Tropfen verlassen haben, behält das

Molekül einige Ladungen nahe dem Rayleigh-Limit und liegt vollständig lösungsmittelfrei geladen vor (Abb. 2 Mitte). [17, 50, 51]

Das neuste Model befasst sich mit der Freisetzung von nicht gefalteten Proteinen oder ungeordneten Polymeren. Das sogenannte „Chain Ejection Model“ CEM beschreibt, wie ein längliches Molekül stückweise aus einem Tropfen freigesetzt wird. Wird die Ladungsdichte des Tropfens zu groß, wird ein Teil des Moleküls mit einigen Ladungen aus dem Tropfen freigesetzt. Der Tropfen bekommt einen „Molekülschwanz“. Mit fortschreitender Verdunstung des Lösungsmittels und steigender Oberflächenladung des Tropfens wird der Molekülschwanz immer länger, bis das Molekül schließlich vollständig freigesetzt wurde. Auch hier liegt die Ladungsdichte auf dem Molekül nahe dem Rayleigh-Limit (Abb. 2 unten). [49]

Im letzten Schritt wird der Analyt vom Umgebungsdruck ins Vakuum und anschließend ins Hochvakuum geleitet. Hierbei werden letzte anhaftende Lösungsmittelmoleküle durch eine Potentialdifferenz beim Übergang der Vorvakuumstufe in die Hochvakuumstufe entfernt. [52]

#### 1.1.1.2 DESI

Im Falle der ESI lassen sich nur lösliche Substanzen untersuchen, sofern sie mittels ESI ionisierbar sind. Mit anderen Methoden, wie *Sekundärionen-Massenspektrometrie* oder *Matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) lassen sich auch feste Proben ionisieren. Sie benötigen aber eine umfangreiche Probenvorbereitung. Zusätzlich muss die Probe noch ins Vakuum eingebracht werden. Mit der *Atmospheric-pressure-MALDI* (AP-MALDI) konnten erstmals Ionen von festen Proben unter Umgebungsdruck erzeugt werden. Damit war sie eine der wichtigen Vorläufer der ambienten MS-Experimente, obwohl der ungehinderte Zugang zur Probe, sowie eine möglichst geringe Probenvorbereitung noch fehlte. [53]

Beide Punkte werden von der ersten veröffentlichten *ambient ionisation* Methode, der DESI erfüllt. Die vielversprechende Neuerung war, dass mit ihr Proben direkt an der freien Luft, unter Umgebungsbedingungen untersucht werden können. [4, 53]

Dabei kombiniert die DESI einige Merkmale von ESI mit einigen Eigenschaften der Desorptionsionisations-(DI) Methoden, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Wichtig ist nur, dass bei den DI-Methoden eine Art Projektil im Vakuum verwendet wird, wie Photonen, angeregte Atome oder angeregte Ionen, um Probenmaterial aus einer Oberfläche herauszuschlagen. Die Verwandtschaft von DESI zu den DI-Methoden wird in der Art der Desorption deutlich, da bei DESI die ESI-Tröpfchen als Projektil verwendet werden. Die Verwandtschaft zur ESI wird im instrumentellen Aufbau deutlich. [4]

Die DESI Ionenquelle besteht im Wesentlichen aus einem pneumatisch unterstützten Mikro-Elektrosprayer, einem Oberflächenhalter und einer Positionierungsvorrichtung. Der Sprayer, wie auch der Oberflächenhalter, können in alle Richtungen im Raum bewegt werden. Dies dient sowohl dazu den Abstand  $d_1$  zwischen Sprayer und Probenoberfläche sowie den Abstand  $d_2$  zwischen MS und Probenoberfläche, als auch den Aufschlagwinkel  $\alpha$  des Sprays auf die Oberfläche ( $0^\circ - 90^\circ$ ) und den Winkel zwischen MS und Oberfläche  $\beta$  einzustellen. Kommerziell erhältliche DESI-Quellen sind heute mit zwei Kameras ausgestattet,

um die exakte Einstellung von Abstand und Winkel kontrollieren zu können. [53] Außerdem lässt sich die Probe im ESI-Spray in einem gewissen Umfang frei bewegen, wodurch die Probe während der Messung kontinuierlich bewegt und neu im Raum ausgerichtet werden kann (Abb. 3). [4]

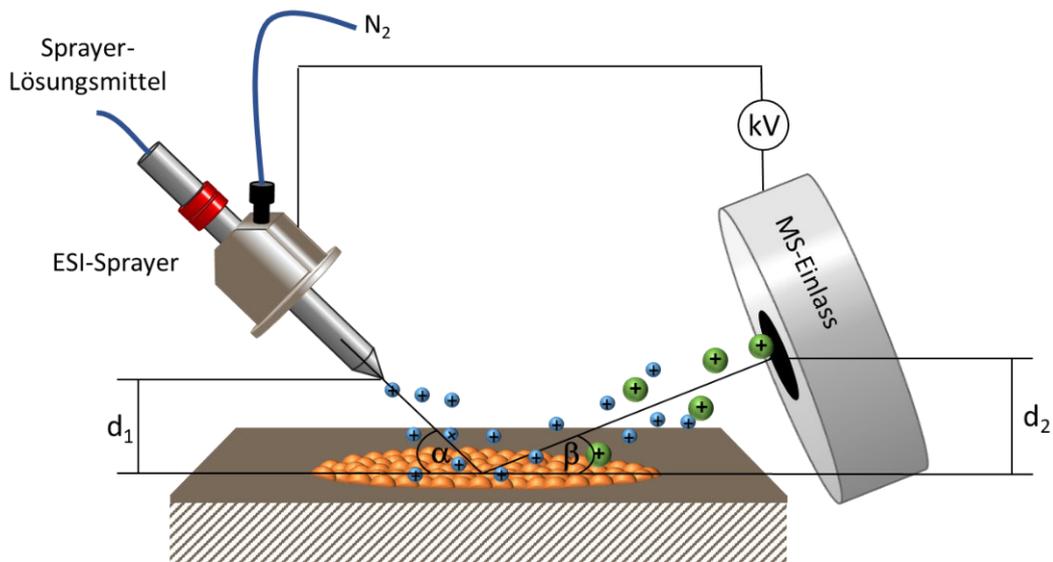


Abb. 3: Schematische Darstellung der DESI, und der wichtigsten geometrischen Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  sowie  $d_1$  und  $d_2$

Neben den geometrischen Parametern, wird die Leistung der DESI durch die Gas- und Flüssigkeitsströme, die Spray-Spannung, und die Beschaffenheit (Zusammensetzung, Temperatur, Potential, Rauheit) der Oberfläche, auf der sich die Probe befindet, beeinflusst [53, 54].

Als ESI-Spray-Lösungsmittel wird im einfachsten Fall Wasser, meist jedoch ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser und einer organischen Säure verwendet. Wie bei der klassischen ESI, wird das Spray durch Anlegen einer Spannung von mehreren kV und pneumatischer Unterstützung erzeugt. [4, 55] Die DESI zeigt kaum Grenzen, welche Proben mit ihr untersucht werden können. Mit ihr lassen sich feste Proben, einschließlich komplexer biologischer Materialien sowie lebendes Gewebe, aber auch Flüssigkeiten, gefrorene Lösungen und adsorbierte Gase untersuchen. [4, 53] Zusätzlich kann der Probenhalter über eine Heizpatrone bis 300 °C beheizt werden. In einigen Fällen kann die Oberflächenhalterung auch durch ein Fließband ersetzt werden, wodurch ein hoher Durchsatz an Proben ermöglicht wird. [53] Die ersten DESI-Quellen wurden direkt vor das API-MS-Interface gebaut. Um das Potential der Quelle besser ausnutzen zu können, wurde das API-MS-Interface mit einer möglichst flexiblen Ionen-Transferkapillare ausgestattet. Dies ermöglicht sowohl das einfachere Einstellen eines idealen Winkels zwischen Probenoberfläche und MS, als auch die Untersuchung von Proben, während diese chemisch und/oder mechanisch manipuliert werden. [4, 53]

Mit Hilfe chemischer Manipulationen konnten von Takáts et al. [53] z.B. spezifische Reaktionsprodukte erzeugt werden, um die Identität der Analyten zu bestätigen oder die Chiralität zu bestimmen. Aufgrund der freien Beweglichkeit der Probe im ESI-Spray kann DESI auch als bildgebendes Verfahren genutzt

werden. Weiterhin kann die DESI ebenso wie die ESI mehrfach geladene Ionen erzeugen, wodurch auch biologisches Material, wie Proteine analysiert werden können. [4]

Bei Untersuchungen verschiedener Moleküle haben Takáts et al. herausgefunden, dass für kleine Moleküle, wie Sprengstoffe, Lipide und Pharmaka andere Einstellungen optimal waren, als für große Moleküle, wie Proteine, Peptide, Nukleinsäure und künstliche Polymere [6, 53, 56].

Aufgrund der unterschiedlichen Parameter für die beiden Analytgruppen schlugen Takáts et al. drei Ionisationsmechanismen vor, von denen je nach Analyten und Spraygeometrie einer dominiert:

Der erste Mechanismus beschreibt die Aufnahme von Analytmolekülen in die Elektrospray-Tröpfchen, den sogenannten Tröpfchen-Aufnahme-Mechanismus (*Droplet pickup mechanism*). Hierbei schlägt ein geladenes Tröpfchen auf der Oberfläche auf und benetzt sie. Das geladene Tröpfchen nimmt dabei Moleküle von der Oberfläche in sich auf [57]. Am Rand des aufgeschlagenen Tropfens bilden sich Sekundär-Tröpfchen, die sich aufgrund der kinetischen Energie des Primär-Tropfens und durch ihr Potential von der Oberfläche lösen. [54, 56] Mithilfe des Gasstroms und des Sogs des Vakuums des MS-Interfaces, werden die freigesetzten Tröpfchen Richtung MS transportiert. Die Ionisierung der Analytmoleküle, die in den Tröpfchen gelöst sind oder an den Tröpfchen haften, erfolgt über den ESI-Mechanismus [58]. [53]

Dieser von Takáts et al. vorgeschlagene Mechanismus, der auf Grundlage der experimentellen Beobachtungen überwiegend große Moleküle ionisiert, wurde durch Untersuchungen von Venter et al. [56] gestützt. Venter et al. beobachtete, wie Tropfen des Sprays sich auf der Oberfläche bildeten und dann über die Oberfläche rollten, bevor sich von diesen Tropfen Sekundär-Tröpfchen lösten und in die Luft freigesetzt wurden (Abb. 4). Die Ähnlichkeit von DESI- und ESI-Spektren von Proteinen und anderen großen Molekülen, ist auf die Ionisierung der Analyt-Moleküle, über den ESI-Mechanismus zu erklären. [6, 53, 56, 59]

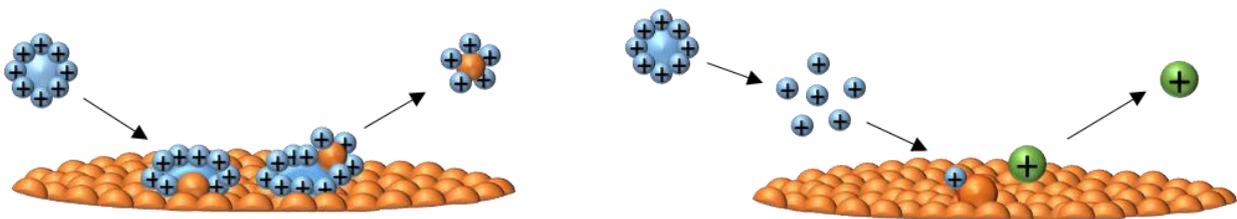


Abb. 4: Schematische Darstellung des Tröpfchen-Aufnahme-Mechanismus (*Droplet pickup mechanism*) (links) und des zweiten DESI-Mechanismus, wie von Takáts et al. [53] beschrieben (rechts)

Der zweite Mechanismus (schematisch dargestellt in Abb. 4 rechts) beschreibt den Ladungstransfer zwischen gasförmigen Ionen, die durch das Elektrospray gebildet werden und den Analyt-Molekülen auf der Oberfläche. Hierbei werden die Analyt-Moleküle durch eine Art chemisches Sputtern von der Oberfläche gelöst. Das chemische Sputtern bezeichnet einen Prozess, üblicherweise im Vakuum, bei dem

Analyt-Moleküle gleichzeitig desorbiert und durch Ladungstransfer mit Primär-Ionen (Elektron, Proton oder eines anderen Ions) mit niedrigen Translationsenergien ionisiert werden. [53, 60]

Über diesen Mechanismus werden, ausgehend von den experimentellen Beobachtungen, vor allem kleine Moleküle ionisiert, wenn die Lösungsmitteltröpfchen ausreichend Zeit haben, vor dem Auftreffen auf die Oberfläche, zu desolvatisieren [53]. In einer späteren Veröffentlichung stellte Venter et al. diesen Mechanismus in Frage, da die kinetische Energie der Moleküle innerhalb des Tropfens pro Molekül zu klein ist und die Tröpfchen zu langsam sind, um einen Sputter-Prozess auszulösen [56].

Der dritte von Takáts et al. vorgeschlagene Mechanismus beinhaltet die Verdampfung/Desorption neutraler Spezies von der Oberfläche. Die Verdampfung/Desorption der Moleküle von der Oberfläche erfolgt durch ihren Dampfdruck und kann begünstigt werden, indem dem Spray ein Additiv (z.B. Säure oder Base) beigesetzt wird, das den Dampfdruck der Moleküle herabsetzt. Die Ionisierung erfolgt durch Protonen- oder Elektronentransferreaktionen in der Gasphase (Abb. 5). [4, 56, 61]

Der Transport der Analytionen zum Massenspektrometer erfolgt für Mechanismus zwei und drei ebenfalls durch statische Ladungsakkumulation auf der Oberfläche, Impulsübertragung durch den Ionenaufprall auf die Oberfläche und den Sog des Vakuums am Eingang der Transferkapillare [4, 53, 61].

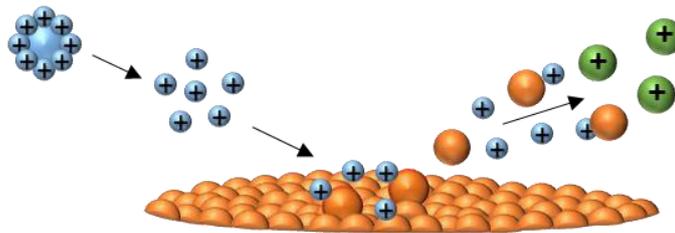


Abb. 5: Schematische Darstellung des dritten DESI-Mechanismus, wie er von Takáts et al. beschrieben wurde [53]

Generell scheint es so, dass sich mittels DESI alle ESI gängigen Analyten untersuchen lassen. Darüber hinaus können auch unpolare Verbindungen wie Carotin und TNT [53] mit DESI ionisiert werden. In diesen Fällen ähneln die Spektren denen der APCI. Neben den Protonierungs-/Deprotonierungsprozessen beobachteten Takáts et al. für diese Analyten auch Elektronenabstraktion und Elektroneneinfang. Sie detektierten aber keine mehrfach geladenen Spezies. [4, 6, 53]

Die Genauigkeit für quantitative Bestimmungen mit DESI liegt bei etwa 5% relativer Standardabweichungen (RSD). Mit Hilfe von internen Standards (IS) können auch niedrigere Werte erreicht werden. Dies ist nur für feste Proben möglich, die aus Lösungen abgeschieden werden. Bei natürlichen Oberflächen ist die Verwendung eines IS meist nicht möglich, da er nicht homogen mit der Probe vermischt werden kann. IS können zwar dem Spray direkt zugegeben oder vorher auf die Oberfläche aufgetragen werden, liefern aber streng genommen keine quantitativen Ergebnisse. Relative quantitative Bestimmungen verwandter chemischer Spezies lassen sich mit einer hohen Reproduzierbarkeit durchführen. [4, 6, 53, 61]

### 1.1.1.3 EESI

Da die DESI aber nicht zur Analyse von Verbindungen, die außerhalb der Flüssigphase instabil sind, geeignet ist, entwickelten Chen et al. [62] 2006 die extraktive Elektrospray-Ionisation (EESI). Chen et al. nutzen die EESI, um Verbindungen in komplexen flüssigen Matrizen zu untersuchen und zu charakterisieren. Im Gegensatz zur traditionellen ESI, bei der gelöste Analyte direkt infundiert werden, um Ionen zu erzeugen, werden beim EESI-Verfahren die Analyte mit Hilfe eines elektronisch geerdeten Sprayers zerstäubt/vernebelt. Sie bilden ein Gas oder ein Aerosol einer verflüchtigten Flüssigkeit oder eines desorbierten Feststoffs. Mit Hilfe eines zweiten Sprayers, der orthogonal zum Probensprayer angeordnet ist, werden aus einem Lösungsmittel(-gemisch) geladenen Tröpfchen erzeugt. Als Lösungsmittel(-gemisch) wird in der Regel Wasser verwendet, das manchmal angesäuert ist und/oder mit Methanol oder Ethanol versetzt ist. Die „vernebelte“ Probe wird mit dem geladenen Spray vermischt. Die anschließende Ionisierung erfolgt durch Flüssig-Flüssig-Extraktion zwischen den kollidierenden Mikrotropfen. Die Verbindungen werden kontinuierlich und ohne Probenvorbereitungsschritte aus der Analytlösung in das Lösungsmittelspray extrahiert und durch Ladungstransferprozesse ionisiert. Eine schematische Darstellung des EESI-Systems ist in Abb. 6 gezeigt. [62–64]

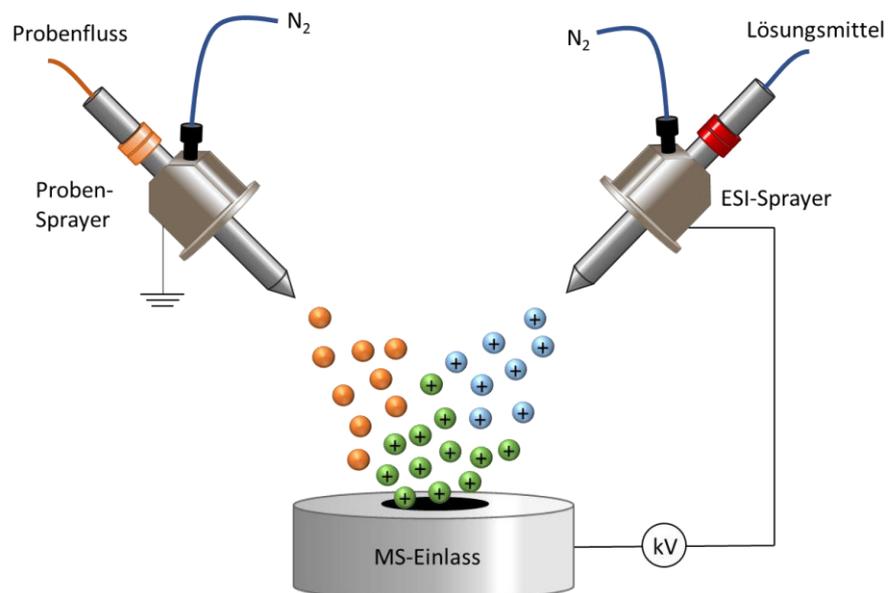


Abb. 6: Schematische Darstellung des EESI-Systems

Ein vergleichbares System hatten Chang et al. [65] bereits 2002 vorgestellt. Sie erzeugten ein Probenaerosol mit Hilfe eines Ultraschallzerstäubers, das dann in die ESI-Kammer geleitet wurde und dort mit dem ESI-Spray „verschmolz“. Sie berichteten in ihrer Arbeit, dass für die verwendeten wässrigen Protein- und Peptid-Lösungen wesentlich höhere Salzfrachten (bis zu 10 %) toleriert wurden als bei der konventionellen ESI. Sie bezeichneten ihr System als Fused-Droplet Elektrospray-Ionisation (FD-ESI). Die FD-ESI kann als Vorgängermodell oder Parallelentwicklung zur EESI angesehen werden. [14, 65, 66]

Wie durch die Veröffentlichungen von Chang et al. [65] und Shieh et al. [67] ersichtlich, zeigt die EESI im Vergleich mit der ESI eine höhere Toleranz gegenüber Probenmatrices und signifikant geringere Ionensuppressionseffekte. Da die Zerstäubungs- und Ionisierungsprozesse räumlich und zeitlich isoliert sind, erfordert die EESI keine Probenvorbehandlung. Diese Vorteile machen die EESI zu einer idealen Ionisierungsmethode für die Analyse von Proben im Spurenbereich in komplexen Matrices, wie z.B. Körperflüssigkeiten, [62, 68, 69], Lebensmittel [62, 70–74], Kosmetika [75, 76] und Pharmaka [71, 77].

Li et al. konnten für Salbutamol und Terbutalin, Wirkstoffe von Aerosol-Arzneimitteln, Nachweisgrenzen von 10 pg/mL bzw. 9 pg/mL ermitteln [71]. Gu et al. konnten für die gleiche Arzneimittelklasse die Wirkstoffe Econazolnitrat, Beclomethasondipropionat, Salicylsäuremethylester, Diphenhydramin, Terbutalin und Salbutamol nachweisen, indem sie direkt aus einer handelsüblichen Pumpsprayflasche einen Sprühstoß in das ESI Spray abgaben. Sie erhielten für Salbutamol, das sie in verschiedenen Konzentrationen in Pumpsprayflaschen füllten, eine lineare Regression zwischen 20 und 100 ppb mit  $R^2 = 0,9989$  und einer relativen Standardabweichung von 6,4%. Sie konnten eine Nachweisgrenze von 10 ppt ermitteln, was mit den Daten von Li et al. übereinstimmt. [77] Die EESI bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur schnellen online massenspektrometrischen Analyse. [62, 63, 72]

Wie die Analyten mittels EESI im Detail ionisiert werden oder warum die Signalstabilität bei der Analyse komplexer, salzreicher, biologischer Proben erhalten bleibt ist nicht bekannt. Chen et al. vermuten, dass unpolare Bestandteile der Probe, wie Herbizide, um die Oberfläche der neutralen Probentröpfchen konkurrieren, während polare Bestandteile der Probe, wie Salze, durch erhöhte Solvatisierung im Tropfenzentrum stabilisiert werden. Die Moleküle an der Oberfläche der neutralen Tröpfchen werden dann bei Tröpfchenkollisionen in die geladenen Tröpfchen extrahiert. [62]

Allgemein geht man davon aus, dass Ionisierungen bei EESI und FD-ESI über einen von zwei Pfaden erfolgen, entweder

1. über Flüssigphasen-Wechselwirkungen zwischen den neutralen Analyt-Tröpfchen und den geladenen Elektrospray-Tröpfchen oder
2. über Gasphasen-Ionen-Molekül-Reaktionen zwischen den neutralen Analyt-Molekülen und den aus ESI-Lösungsmittel-Tröpfchen emittierten geladenen Ionen [64, 65, 67, 78–82].

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass die Ionisierung vor allem über Flüssigphasen-Wechselwirkungen erfolgt und Gasphasen-Ionen-Molekül-Reaktionen für flüssige Proben keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen [69, 72, 83–87].

Eine weitere Studie zum Ionisations-Mechanismus der EESI von flüssigen Proben wurde von Law et al. [64] mit Hilfe von Fluoreszenzstudien in der EESI-Fahne durchgeführt. Sie postulierten, dass

1. geladene ESI-Tröpfchen und neutrale Probentröpfchen vorwiegend in der flüssigen Phase interagieren.
2. der Extraktionsprozess stark abhängig ist von der Löslichkeit des Analyten in den Lösungsmitteln des ESI-Sprays und des Probensprays sowohl im positiven und negativen Modus. Hierdurch soll eine selektive Extraktion zwischen den geladenen ESI-Tröpfchen und den neutralen Analyt-Tröpfchen möglich sein.

Weiter postulierten sie, dass es beim Zusammentreffen von Analyt- und ESI-Tröpfchen entweder zu einem Zurückprallen, einem Zerreißen oder Fragmentieren der Tröpfchen kommt. Bei diesen drei Interaktionen ist jeweils eine selektive Flüssig-Flüssig-Extraktion möglich und die Ionisierungseffizienz des Analyten ist von seiner Löslichkeit im ESI-Lösungsmittel und im Probenlösungsmittel abhängig. Ein vollständiges Vermischen der beiden Tröpfchen sei nach Law et al. von untergeordneter Bedeutung, da hier keine Abhängigkeit von der Löslichkeit besteht, sondern von der Oberflächenspannung der Tröpfchen und der Lösemittelmischbarkeit zwischen den beiden Sprühlösungsmitteln (Abb. 7). [64]

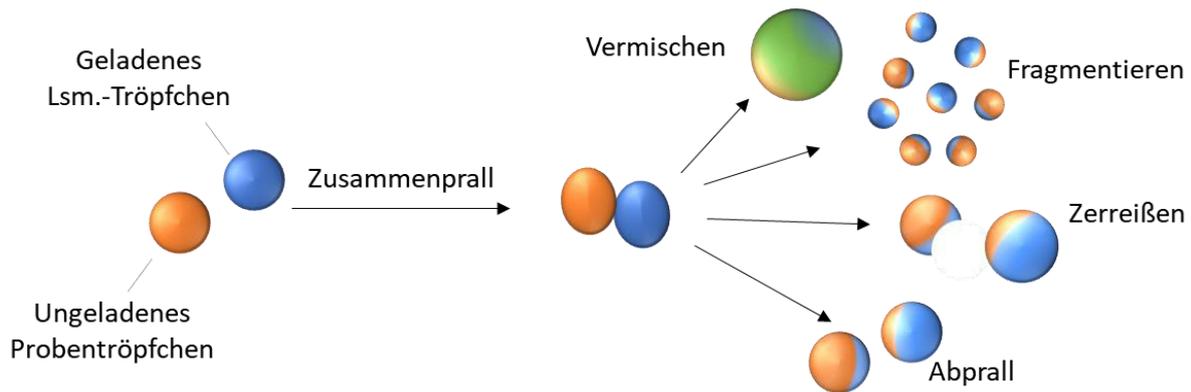


Abb. 7: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen eines ESI-Tröpfchens (blau) und eines Probentropfchens (orange). Modifiziert aus [88]

Dieses Postulat wurde durch Untersuchungen von Wang et al. [88] gestützt, die berichteten, dass die Fragmentierung der Tröpfchen aufgrund der Tröpfchen-Größenverteilung im Spray und der kinetischen Energie der Tröpfchen, die dominierende Wechselwirkung seien müsste [88].

Eine weitere Fragestellung des Ionisierungsmechanismus von Partikeln im EESI-Prozess, wurde von Kumbhani et al. [82] untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Partikel in ihrem Experiment folgenden Wechselwirkungen unterliegen können (Abb. 8):

1. Geladene ESI-Tröpfchen adsorbieren auf der Partikeloberfläche. (Der Partikel ist deutlich größer, als das durch Verdampfung bereits geschrumpften ESI-Tröpfchen)
2. Ist die Oberfläche im Lösungsmittel löslich, löst sich ein Teil des Partikels im ESI-Tröpfchen. Besteht der Partikel aus mehreren Schichten, kann sich hierbei nur die äußere Schicht lösen oder auch die darunterliegenden Schichten.
3. Durch weiteres Verdampfen des ESI-Tröpfchens erhöht sich punktuell die Ladung auf dem Partikel. Beim Erreichen des Rayleigh-Limits, wird ein Teil des Materials, das sich im Tropfen befindet vom Partikel fortgetragen. Es bildet sich mit der Zeit ein „Krater“ aus, aus dem weiter Material herausgetragen werden kann.
4. Ist die Oberfläche im Lösungsmittel nicht löslich bzw. benötigt der Auflösungsprozess mehr Zeit als das Verdampfen des ESI-Tropfens, verdampft der Tropfen lediglich von der Oberfläche, ohne eine signifikante Ionisierung des Analyten.

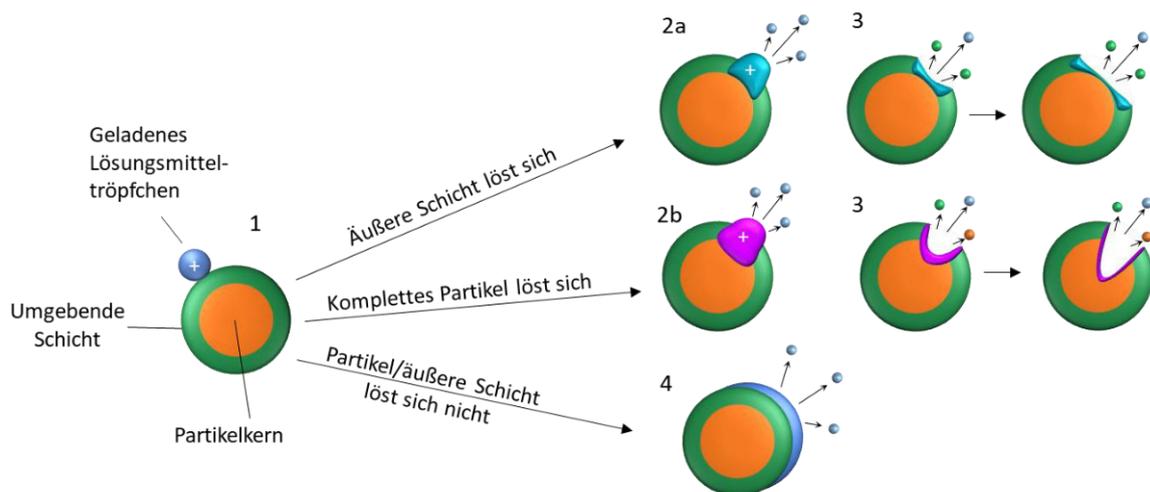


Abb. 8: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen eines ESI-Tröpfchens (blau) und eines Probenpartikels (orange) mit einer äußeren Schicht (grün). Modifiziert aus [82]

Weiter vermuteten Kumbhani et al., dass bei ausreichender Benetzung des Partikels bzw. günstigen Größenverhältnissen, zwischen ESI-Tropfen und Partikel sich mehrere Krater bilden können, wodurch der gesamte Partikel aufgelöst werden kann. [82]

Basierend auf der EESI mit zwei Sprayern, wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die ganz auf den Probensprayer verzichten und stattdessen eine Thermodesorptionseinheit verwenden, um die Probe freizusetzen. Einige dieser Verfahren werden im Folgenden kurz vorgestellt.

#### AP/TD-EESI

Die Atmospheric-Pressure Thermal Desorption-Extractive Electrospray Ionisation (AP/TD-EESI), die 2013 von Devenport et al. [2] entwickelte wurde, nutzt statt eines Proben-Sprayers eine selbstgebaute Thermodesorptionseinheit (TD-Einheit). Neutrale Analyten verdampfen aus dem Probenhalter der TD-Einheit und steigen in das darüber erzeugte ESI-Spray auf, wo sie ionisiert werden.

Die beschriebene TD-Einheit bestand aus einer zylindrischen Heizpatrone, die in einem Edelstahlrohr montiert war. Mit Hilfe eines Aluminiumadapters konnte ein direkter Kontakt zwischen Heizpatrone und einem Messingprobenhalter ( $\varnothing$ : 2,5 mm, l: 10mm) hergestellt werden. Die TD-Einheit wurde in ein Loch in einem Edelstahlrohr eingesetzt, dass zwischen ESI-Sprayer und MS-Einlass positioniert war, um das ESI-Spray räumlich zu begrenzen (Abb. 9). [2] Dieser Aufbau erinnert stark an das Atmosphärendruck-thermische Desorption/ Elektrospray-Ionisation (AP-TD/ESI) System, dass 2009 von Basile et al. [1] entwickelt wurde.

Devenport et al. konnten 2013 zeigen, dass sich die AP/TD-ESI gekoppelt mit einem Q-ToF zur Detektion von p-Toluolsulfonsäuremethylester (MTS) in einer pharmazeutischen Ersatzmatrix (Stärke) mit einer Nachweisgrenze von 0,1  $\mu\text{g/g}$  mit 22 % RSD eignet [2]. Sie schlossen daraus, dass sich die Technik auch

potenziell für das Screening von MTS in verschiedenen Wirkstoffen und möglicherweise anderen Alkylsulfonsäureester, die während der pharmazeutischen Herstellungsprozesse gebildet werden, eignet [2]. In einem weiteren Artikel 2013 stellten Devenport et al. [3] eine Methode vor, wie Kreatin aus Urin mit Hilfe seines  $C^{13}$ -Isotops als interner Standard nach Acetylierung im Probengefäß quantitativ bestimmt werden konnte. Sie gaben eine Analysenzeit von einer Minute pro Probe an [3].

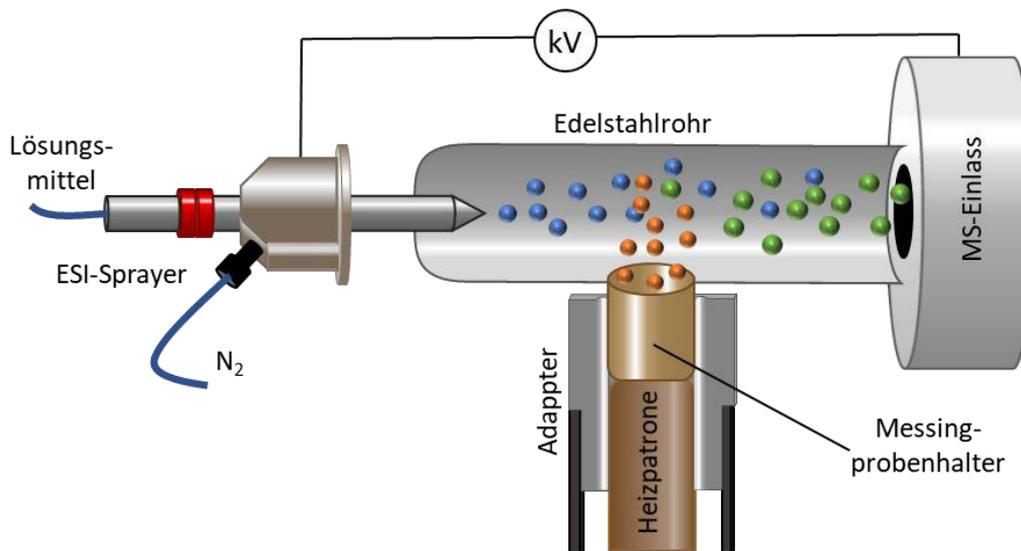


Abb. 9: Schematische Darstellung der AP/TD-EESI, wie sie von Devenport et al. [2] beschrieben wurde

### AP-TD/ESI

Die *Atmospheric-Pressure-Thermal Desorption/Electrospray Ionisation* (AP-TD/ESI) wurde von Basile et al. [1] 2009 entwickelt, um den direkten Nachweis von flüchtigen Verbindungen und/oder Pyrolyseprodukten bei atmosphärischem Druck zu ermöglichen. Sie beschrieben ihre Entwicklung als Weiterentwicklung der elektroassistierten Pyrolyseionisation (*electrospray-assisted pyrolysis-ionization*, ESA-Py) sowie der oben beschriebenen EESI.

Die beschriebene AP-TD/ESI-Einheit, in Abb. 10 gezeigt, bestand aus einem beheizbaren Reagenzglas, das in unmittelbarer Nähe einer geschlossenen pneumatisch unterstützten ESI-Sprühfahne platziert wurde. Hierzu verwendeten sie eine konventionelle, pneumatisch unterstützte ESI-Quelle, die mit Hilfe eines PFA-Schlauches mit der Reaktionskammer verbunden war. Die Reaktionskammer bestand aus einem Edelstahlrohr, in das durch eine obere Öffnung ein geflansches Reagenzglas ( $\varnothing$ : 4 mm, l: 31 mm) in eine untere Öffnung gehängt werden konnte. Mit Hilfe eines Heizdrahtes konnte das Reagenzglas, und somit die flüssigen oder festen Proben im Reagenzglas, innerhalb von 3 min auf 335°C erhitzt werden.

Die thermisch desorbierten (Pyrolyse-)Produkte steigen aus dem Reagenzglas auf und kreuzten aufgrund ihrer räumlichen Nähe das ESI-Spray. Wie bei der EESI sollen hierbei die Analyten mit den geladenen Tröpfchen des ESI-Sprays wechselwirken, ionisiert werden und anschließend zur Analyse weiter ins Massenspektrometer transferiert werden. [1]

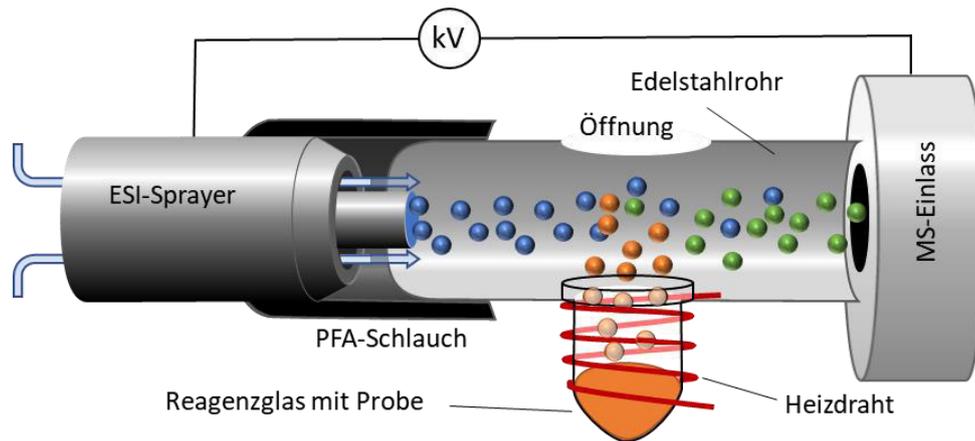


Abb. 10: Schematische Darstellung der AP-TD/ESI, wie sie von Basile et al. [1] beschrieben wurde

### TLC/TD/I-MS

2010 wurde von Ovchinnikova et al. [89] eine Methode entwickelt, mit der Substanzen von einer *High-performance thin-layer chromatography* (HPTLC-) Platte mit Hilfe einer robusten proximalen Sonde (einem Lötkolben) thermisch desorbiert wurden und anschließend mittels ESI, APCI sowie einer Kombination aus ESI und APCI ionisiert wurden. Sie bezeichneten ihr System als Thin-layer chromatography / thermal desorption / ionisation mass spectrometry (TLC/TD/I-MS).

Zur Thermodesorption der Substanzen von der TLC-Platte nutzten sie einen Lötkolben, mit dem Temperaturen von 25 °C bis 350 °C erreicht werden konnten. Die Spitze des Lötkolbens wurde so justiert, dass sie direkt vor dem Einlass in die Ionenquelle positioniert war. Die TLC-Platte wurde dann von unten an den Lötkolben herangeführt und konnte mit einem x-y-z-Positionierer unter der Lötkolbenspitze bewegt werden. Die desorbierten aufsteigenden Analyten wurden mit Hilfe von Unterdruck über eine externe Pumpe in eine mit einem Edelstahlrohr modifizierte Ionenquelle gezogen.

Mit diesem Verfahren konnten mit für die HPTLC typischen Plattenbeladungen qualitativ hochwertige Massenspektren erhalten werden. Für Paracetamol bzw. Acetaminophen konnten sie eine lineare Regression zwischen 100 und 1000 ng Plattenbeladung mit  $R^2 = 0,89$  und einer relativen Standardabweichung von 3,3 % erzielen. Sie ermittelten eine Nachweisgrenze von 370 ng Plattenbeladung für Acetaminophen. Für andere ausgewählte Substanzen, wie TNT und Sudan Rot berichteten sie von Nachweisgrenzen im Bereich von 24 bis 5700 ng Plattenbeladung, wobei es sich hierbei um Verbindungen mit unterschiedlichen Flüchtigkeiten handelte. [89]

### TD-ESI

Das sogenannte Thermodesorptions-ESI-System (TD-ESI) wurde 2010 von Reynolds et al. [90] zur Untersuchung von Atemaerosolproben, adsorbiert auf Tenax-Röhrchen, veröffentlicht. Reynolds et al. modifizierten eine handelsübliche ESI-Quelle so, dass der Auslass einer thermischen Desorptionseinheit für Tenax-Röhrchen ca. 1 cm unterhalb und 0,5 cm entfernt von der ESI-Spitze positioniert war. So wurden die aus der Kühlfalle der TD-Einheit desorbierten Substanzen im ESI-Spray ionisiert und konnten

anschließend analysiert werden. Mit dem verwendeten TD-ESI-Ionenmobilitätsmassenspektrometer konnten sie Nachweisgrenzen von ca. 0,8 ng für 2-Butanon, 2-Nonanon, Hexanal, Heptanal, 2-Octanol und 2-Hexanol erzielen. [90]

Ein weiteres ebenfalls als TD-ESI/MS bezeichnetes System, dargestellt in Abb. 11, wurde von Huang et al. [91] 2013 beschrieben.

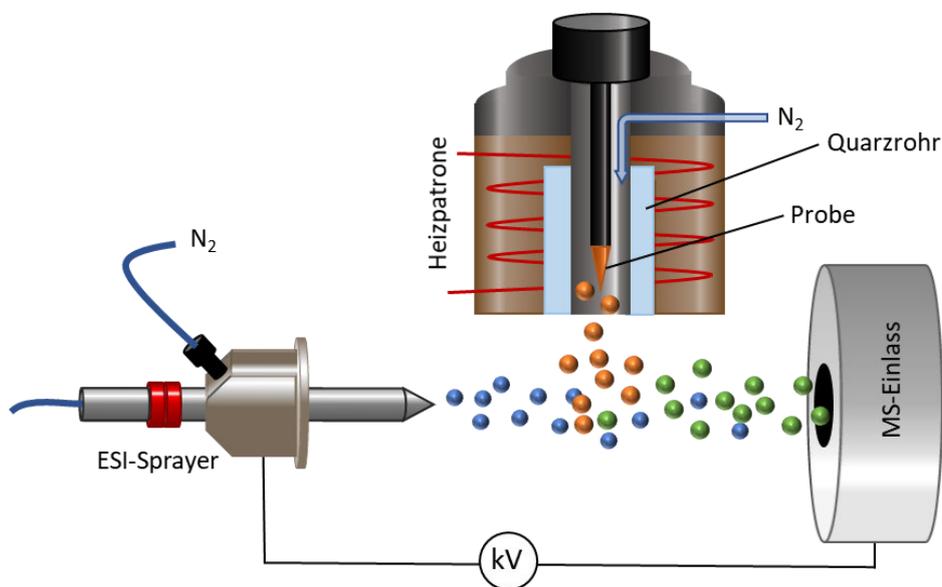


Abb. 11: Schematische Darstellung der TD-ESI, wie sie von Huang et al. [91] beschrieben wurde

Die TD-ESI-Quelle besteht hier aus einer *Direct probe* (DP), einer Thermodesorptionseinheit und einem Elektrosprayer. Die DP wurde zur Probenahme von Analyten in Lösung, in halbfesten bzw. viskosen Darreichungsformen oder auf festen Oberflächen verwendet. Für flüssige Proben wurde eine Impfstöcke aus rostfreiem Stahl verwendet, die ca. 2 µL Probenlösung aufnehmen konnte. Für viskose Darreichungsformen und feste Proben wurde eine Akkupunktur-Nadel verwendet, an der das Probenmaterial haften konnte. Die DP wurde zur Desorption der Analyten in die Thermodesorptionseinheit eingeführt und dort auf 250 °C erhitzt. Die desorbierten Substanzen wurden mit Hilfe eines Stickstoffstroms durch ein Quarzrohr in das ESI-Spray transferiert und dort ionisiert. Zur Reinigung wurde anschließend die DP in einer Gasflamme ausgeglüht.

Mit diesem TD-ESI-System, gekoppelt an ein Triplequadrupol-MS (QQQ-MS), konnten Huang et al. die Wirkstoffe in rezeptfreien Arzneimitteln wie flüssige Augentropfen, viskosen kalten Siruplösungen, Salben und einer Arzneimitteltabelle sowie Spuren von illegalen Drogen und Sprengstoffen auf Oberflächen untersuchen. Für Paracetamol in wässriger Lösung konnten sie so eine lineare Regression zwischen 20-500 ppb mit  $R^2 = 0,9978$  erhalten mit einer relativen Standardabweichung <10 %. Die gesamte Analysenzeit, von Probenahme bis zur Reinigung der DP gaben sie mit unter 15 s an. [91]

In den folgenden Jahren veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe weitere Studien mit dem TD-ESI-QQQ-MS, darunter die Analyse von Pestiziden in verschiedenen Matrices [92–94], von Konservierungsmitteln

[95], sowie von psychoaktiven Medikamenten aus Magensaft und behandelten Blutproben (LOD: 1-500 ppb) [96], illegalen Drogen in und auf Lebensmitteln (LOD: 0,1-1 ppm) [97], illegaler „Straßen“-Drogen in Anwesenheit von Adulteranzien (Verfälschungsmittel) (LOD: 1-60 ppb) [98] und Untersuchung von Photodegradationsprodukten in Sonnenschutzmitteln [99].

### 1.1.2 APCI und verwandte Ionisierungsmethoden

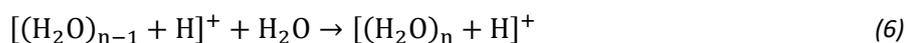
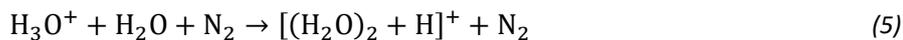
Die APCI und APCI-verwandten Ionisierungsmethoden können aufgrund ihres Ionisationsprozesses für mittelpolare, aber auch für niedere polare Stoffe eingesetzt werden. Ob sich eine spezielle APCI-Ionisierungsmethode für einen Analyten eignet, hängt, wie auch bei den ESI-verwandten Ionisierungsmethoden, vom eingesetzten Desorptionsmechanismus ab. Dabei kann der Desorptionsmechanismus derselbe sein, wie für die ESI-verwandten Methoden. Wurde der Analyt erfolgreich desorbiert, erfolgt die Ionisation entsprechend des APCI-Mechanismus.

#### 1.1.2.1 Die APCI und der APCI Mechanismus

Die APCI stellt eine Variante der klassischen chemischen Ionisation (CI) im Vakuum dar. Mit der APCI werden durch Ionen-Molekülreaktionen Analyt-Ionen bei Atmosphärendruck erzeugt. Der Quellaufbau ähnelt dem einer gewöhnlichen ESI-Quelle. Anstatt des ESI-Sprayers wird ausschließlich ein beheizbarer, pneumatischer Zerstäuber verwendet. Das Zerstäubungsgas (*nebulizer gas*) kann auf mehrere 100 °C erhitzt werden, um das Lösungsmittel vollständig zu verdampfen. Anschließend erfolgt die Ionisation mittels Corona-Entladung. Trotz der hohen Temperaturen, die bei der APCI genutzt werden, handelt es sich um ein schonendes Ionisationsverfahren, da zum einen kein thermisches Gleichgewicht zwischen dem Analyten und der Heizpatrone hergestellt wird. Zum anderen, weil die freigesetzte Energie, die durch die exotherme Protonierung entsteht, durch Stoßkühlung mit dem umgebenden Zerstäubungsgas abtransportiert wird. Da vor der Ionisation meist eine chromatographische Trennung eingesetzt wird, gehört die APCI, wie die ESI zu den API-Methoden und nicht zu den ambienten Ionisationsmethoden. Sie wird vor allem dann eingesetzt, wenn die Analyte mittels ESI nicht zugänglich sind. [100–103]

Das erste Verfahren, das mit APCI einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom einem Massenanalysator zuführte, wurde 1973 von Horning et al. [101] beschrieben. Horning et al. nutzten zur Primärionenerzeugung eine <sup>63</sup>Ni-Quelle, die im Laufe der Zeit durch den Einsatz der effizienteren Koronaentladung ersetzt wurde. Als Reaktionsmechanismus unter Atmosphärendruck gab Horning et al. den bereits von Good et al. [104] beschriebenen Mechanismus an. Good et al. hatten 1970 die Ionen-Molekülreaktionen von reinem Stickstoff und Stickstoff mit Spuren von Wasser bei 0,5–4 Torr untersucht [104]. Der beschriebene Mechanismus ist in Gleichung (1) bis (6) dargestellt.

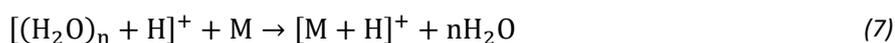




Zunächst wird  $\text{N}_2^{+\bullet}$  durch Elektroneneinschlag (*Electron Impact, EI*) erzeugt. Horning et al. nutzen hierzu einen  $\beta$ -Strahler, während Good et al. einen Elektronenstrahl verwendeten und Shahin protonierte Wasser-Cluster mittels Koronaentladung erzeugte [105].

Anschließend reagiert das  $\text{N}_2^{+\bullet}$  mit einem weiteren  $\text{N}_2$  Molekül zu  $\text{N}_4^{+\bullet}$  (Gleichung (2)). Unter Ausschluss von Wasser handelt es sich nach Horning et al. [101] bei  $\text{N}_4^{+\bullet}$  um das endgültige Produkt [101]. Bei Anwesenheit von Wasser entsteht durch Ladungstransferreaktionen ein Wasserkationen-Radikal (Gleichung (3)), das dann mit einem weiteren Wassermolekül zu einem Oxoniumion und einem Hydroxylradikal reagiert (Gleichung (4)). Durch Folgereaktionen mit weiteren Wassermolekülen entstehen anschließend protonierte Wasser-Cluster (Gleichung (5) und (6)). Die Verteilung der Wasser-Clustergrößen hängt überwiegend von der Wasserkonzentration und der Quelltemperatur ab. [101, 104–106]

Moleküle (M), die eine größere Protonenaffinität als die Wasser-Cluster haben, werden durch Protonentransferreaktionen ionisiert und es entstehen Quasi-Molekül-Ionen (Gleichung (7)). Es werden protonierte Moleküle oder protonierte Dimere gebildet. Dies ist abhängig von den Reaktionsbedingungen, der Konzentration an neutralen Analyt-Molekülen und der Protonenaffinität des Moleküls. [103, 107, 108]



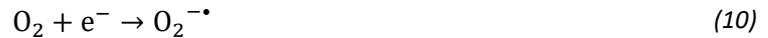
Werden Moleküle, die eine niedrigere Protonenaffinität als Wasser (ca. 12,5 eV) [109] besitzen, wie z.B. Benzol (9,5–10,5 eV) [109] ebenfalls in die Quelle gegeben, werden diese bevorzugt durch Ladungstransferreaktionen gemäß Gleichung (3) zu Radikalkationen ( $\text{B}^{+\bullet}$ ) ionisiert. Im Falle des Benzols zu  $\text{C}_6\text{H}_6^{+\bullet}$ . Die entstehenden Radikalkationen ( $\text{B}^{+\bullet}$ ) können mit weiteren Benzolmolekülen zu Dimeren ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}^{+\bullet}$ ) reagieren. [110] Es entstehen keine Protonen-Cluster-Ionen und Protonentransferreaktionen finden meistens nicht statt. Stattdessen werden Probenmoleküle durch Ladungstransferreaktionen gemäß Gleichung (8) ionisiert.



Da Benzol auch als Protonendonator fungiert, können in diesem Fall auch Protonentransferreaktionen neben den Ladungstransferreaktionen stattfinden. [103, 111]

Negative Ionen werden durch Anlagerung von thermischen Elektronen, die an der Spitze der Koronaentladungsnadel gebildet werden, an Molekülen mit positiver Elektronenaffinität erzeugt (Gleichung (9)). Sauerstoff, der für gewöhnlich immer in der APCI-Quelle vorhanden ist [112] und eine

Elektronenaffinität von 0,45 eV [113] besitzt, wird gemäß Gleichung (10) ionisiert und kann als Reaktantion mit Probenmolekülen weiterreagieren, gemäß den Gleichungen (11) bis (13). [102]



Reaktionen nach Gleichung (11) finden statt, wenn die Elektronenaffinität der reagierenden Spezies größer ist als die von  $O_2$ . Reaktionen nach Gleichung (12) werden beobachtet, wenn die Protonenaffinität von  $O_2^{-\bullet}$  größer ist als die des Moleküls AH. Reaktionen nach Gleichung (13) finden statt, wenn die Protonenaffinität von einem Molekül B größer ist als die des Moleküls A. [101, 102, 112, 114]

### 1.1.2.2 DAPCI

Erstmalig wurde die *Desorptions-Atmosphärendruck-Chemische Ionisation (desorption atmospheric pressure chemical ionization, DAPCI)* 2005 von Takáts et al. [115] beschrieben. Sie ersetzten für ihre Experimente den Elektrospray-Emitter der DESI-Quelle durch eine konisch zulaufende Edelstahlnadel und mischten dem Stickstoffstrom verschiedene Lösungsmitteldämpfe bei. An die Edelstahlnadel legten sie eine Spannung von 3-6 kV an, wodurch die Ionisierung der Analyten durch Koronaentladung stattfand. Diese Experimente wurden ursprünglich zum besseren Verständnis des DESI-Mechanismus durchgeführt, da bei DAPCI der Tropfenaufnahmemechanismus ausgeschlossen ist. [61, 115]

Die Hauptunterschiede zwischen DESI und DAPCI bestehen darin, dass statt des ESI-Sprays bei DAPCI nur ein (heißer) Lösungsmitteldampf verwendet wird [61] und die elektrische Ladung primär durch Koronaentladung erzeugt wird [115]. Bei ausreichend feuchter Umgebungsluft, zur Bildung von  $H_3O^{+}$ -Reaktantionen, kann auf eine Zugabe von Lösungsmittel verzichtet werden. [116, 117]

Die durch die Koronaentladung gebildeten Reaktantionen reagieren mit den desorbierten Analyten in der Gasphase oder es erfolgt ein Ladungstransfer an der Oberfläche, wodurch je nach Ionisationsmodus größtenteils protonierte oder deprotonierte Moleküle entstehen [116, 118]. Der Ionisierungsmechanismus von DAPCI ist größtenteils APCI-ähnlich. Somit ist DAPCI empfindlicher für Verbindungen mäßiger Polarität. [8]

DAPCI wurde für die Analyse von Melamin und Cyanursäure in Milchprodukten [119], Biomarkern für die Qualität von Lebensmitteln, Pestiziden und Herbiziden [117], den Vergleich verschiedener Tees [120], zum Nachweis von Sprengstoffen [117, 121, 122], unerlaubten Nahrungsergänzungsmitteln [117], pharmazeutischen Wirkstoffen in Salben [116, 123] und in Tabletten [116, 117] sowie der Herkunftsidentifizierung von Tabletten [124] eingesetzt. Dabei konnten Williams et al. zeigen, dass DAPCI für schwach polare Substanzen gegenüber DESI und für einige Substanzen, wie z. B. für Hydrocortison, auch gegenüber DART

bis zu 50fach sensitiver war [116, 123]. Chen et al. berichteten für den Nachweis von Loratidin aus Tabletten, sogar von einer Verbesserung der Sensitivität von mehr als das 100fache [117]. Zhang et al. untersuchte nicht nur den Wirkstoff Amoxicillin in verschiedenen Tabletten, sondern verglichen auch den Fingerprint photogestresster Proben und thermisch gestresster Proben mit dem Original. Sie berichteten, dass für das lichtempfindliche Amoxicillin nach 4 h Bestrahlung mit Sonnenlicht bzw. UV-Licht deutliche Veränderungen im Fingerprint sichtbar wurden. Für zwei dieser Zersetzungsprodukte schlugen sie nach MS/MS-Untersuchungen eine Summenformel vor. [124]

### 1.1.2.3 ASAP

Um modernen Massenspektrometern, die mit einer ESI und/oder APCI-Quelle ausgestattet waren, Proben in festem oder flüssigen Zustand zuführen zu können, wie es bei Vakuumsystemen mit EI- oder CI-Quelle über eine Schubstange möglich ist, modifizierten McEwen et al. [125] eine herkömmliche ESI-Quelle. Dazu schnitten sie ein ca. 5 mm großes Loch in die Verkleidung der Quelle, so dass ein Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, das zuvor in die Probe getaucht worden war, in den Gasstrom des ESI oder APCI-Sprayer positioniert werden konnte. Die Probemoleküle desorbierten im (heißen) Stickstoffstrom von der Kapillare und wurden mittels Koronaentladung über den APCI-Mechanismus ionisiert. Meist wurde die Temperatur des Stickstoffstroms isotherm gehalten, je nach Analyt zwischen 20 und 650°C [126, 127], konnte aber auch kontinuierlich erhöht werden [128, 129]. Dieses Verfahren kommt ohne Lösungsmittel aus, wie es üblicherweise in DESI und DAPCI verwendet wird und wurde unter Standard APCI-Bedingungen betrieben. McEwen et al. bezeichneten ihre ambienten Ionisationstechnik als *atmospheric solids analysis probe* (ASAP), die in Abb. 12 dargestellt ist. [125]

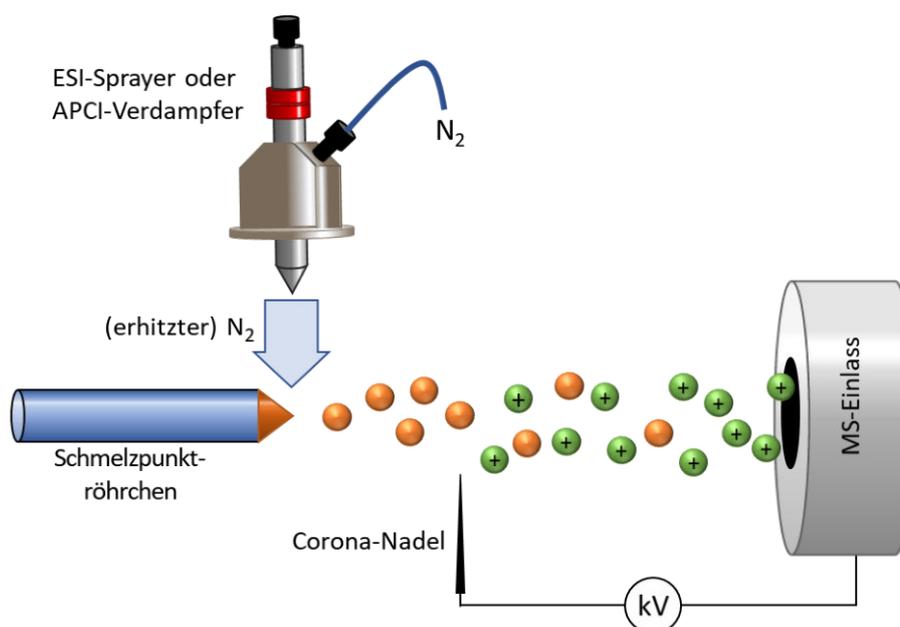


Abb. 12: Schematische Darstellung der ASAP, wie sie von McEwen et al. [125] beschrieben wurde

Obwohl Moleküle mit der ASAP gemäß dem APCI Ionisierungsmechanismus ionisiert werden, konnten mit ihr kleine Moleküle sowohl niedriger Polarität als auch hoher Polarität ionisiert werden [130].

ASAP ist inzwischen für eine Reihe von Massenspektrometern verschiedener Firmen kommerziell zu erwerben [131] und wurde für eine Reihe an Analysen eingesetzt. Darunter die Analyse von Medikamenten [125, 126, 129, 130, 132], Polymere [125, 133–137], Polyaromatischen Kohlenwasserstoffen [126, 128], Rohöl [127], zum Nachweis von z.B. Lipiden, Capsaicin und Carotinoide aus biologischen Proben [125, 126], von Additiven aus Kunststoffen [125, 133, 138] sowie zur Untersuchung von Stoffwechselwegen [139]. Auch der schnelle Wechsel von DESI auf ASAP innerhalb von ca. 1 min konnte von Lloyd et al. gezeigt werden, um Verbindungen unterschiedlicher Polarität effizient zu untersuchen [126]. Ebenso können mit einer weiteren Modifikation sauerstoff- und feuchtigkeitslabile Substanzen untersucht werden. Dies ist möglich, indem die Probe unter Schutzgas im Schmelzpunktbestimmungsröhrchen eingeschmolzen wird und das Röhrchen erst in der ASAP-Quelle aufgebrochen wird, um die Substanz zu analysieren. [140]

#### 1.1.2.4 DIP-APCI

Ein ähnliches Prinzip machten sich Krieger et al. [141] zunutze. Sie verwendeten ein handelsübliches Direkt-Einlass-System (*direct-inlet probe*, DIP) für Gaschromatographie- (GC-)MS-Systeme, das sie an eine selbstgebaute APCI-Quelle montierten (Abb. 13, links). Die DIP war mit einer temperatur-programmierbaren Schubstange ausgestattet, über die die Proben in die Quelle eingeführt wurden. Auf die Spitze der Schubstange konnte entweder ein Tiegelhalter montiert werden, in den ein kleiner Aluminiumtiegel ( $\varnothing$ : ~1 mm, l: ~13 mm) gesteckt werden konnte oder es konnte ein Tiegelhalter mit festverbautem Tiegel verwendet werden. Das Volumen der Tiegel beträgt 2  $\mu$ L, wodurch sich nur kleine Probenmengen untersuchen lassen. Zur Installation der DIP-APCI an eine Ionenfalle der Firma Bruker verwendeten Krieger et al. das zuvor von Schiewek et al. [142] entwickelte Multi-Propose-Quellengehäuse (*Multipurpose ion source*, MPIS). [143]

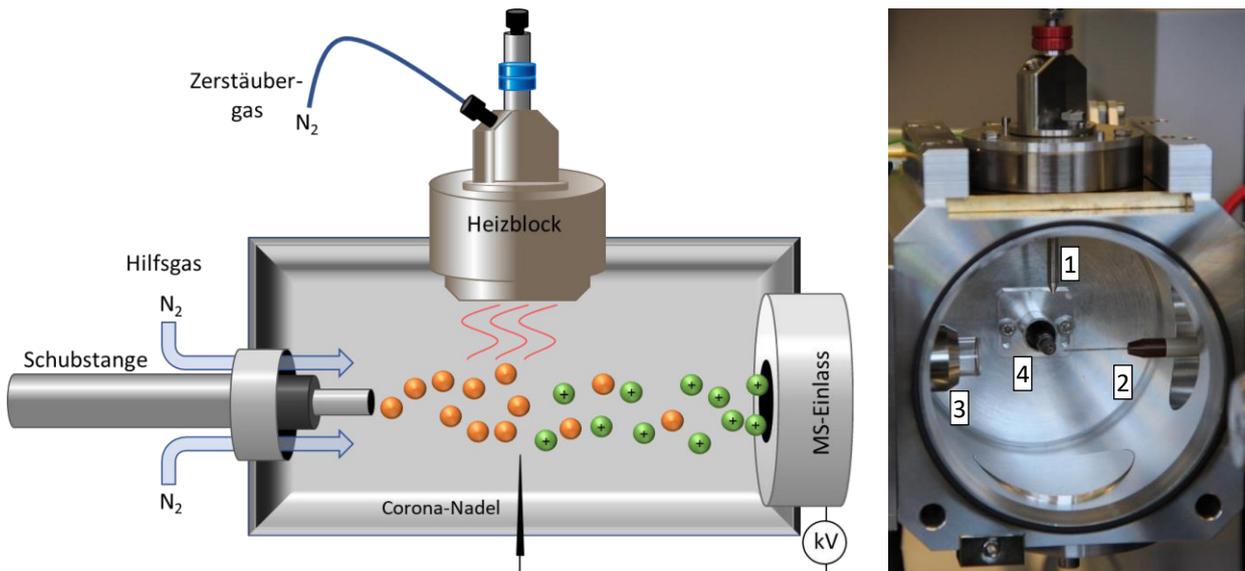


Abb. 13: Links: Schematische Darstellung der DIP-APCI, wie sie von Krieger et al. [141] beschrieben wurde. Rechts: Blick in die Multipurpose ion source (MPIS), die bereits mit den drei möglichen Vorrichtungen zur Ionisation ausgerüstet ist. Zu sehen ist der ESI-Sprayer (1), die Corona-Nadel (2), die VUV-Lampe (3) und die Spitze der Schubstange mit eingesetztem Tiegel (4)

Später wurde auch die von Horst et al. [144] entwickelte *DIP-Atmospheric Pressure Photoionization* (DIP-APPI), die sie zur Bestimmung von Bisphenol A aus recyceltem Papier nutzten, an dieses Quellgehäuse angeschlossen (siehe Abb. 13, rechts).

Durch den Temperaturgradienten war es Krieger et al. möglich, nicht die ganze Probe auf einmal in der Quelle zu desorbieren, sondern die Desorption, entsprechend der Siedepunkte bzw. Dampfdrücke der Substanzen zu steuern. Sie erhofften sich dadurch mögliche Ionensuppressionseffekte zu minimieren, da weniger verschiedene Substanzen zeitgleich in der Quelle waren. [141]

Anders als bei ASAP wird der Temperaturgradient zur Desorption nicht manuell über den Stickstoffstrom, sondern automatisch mit einer Heizrate von 0,1 bis 2,9 °C/min bis 400 °C und mit bis zu drei verschiedenen Rampen, gesteuert. Ein zusätzlicher Stickstoffstrom (Hilfsgas), der die Schubstange umströmte, wurde im positiven Modus genutzt, um die desorbierten Analyten zum Einlass des Massenspektrometer zu leiten. Im negativen Modus wurde der Stickstoffstrom durch synthetische Luft ersetzt. Die Ionisierung der Analyten erfolge auch hier über den APCI-Mechanismus. [141]

Ein weiterer Vorteil gegenüber der ASAP ist die Möglichkeit der Automatisierung, die durch Verwendung eines CombiPal-Autosamplers speziell für die DIP gegeben ist.

Die DIP-APCI wurde von Krieger et al. für die Analyse von Standardsubstanzen sowie von *Radix Angelicae sinensis*, für die Trennung und Analyse eines Methylestergemisches und die Unterscheidung von zwei verschiedenen *R. Angelicae* Spezies verwendet. [141] Später veröffentlichten sie den Einsatz der DIP-APCI für die (semi-)quantitative Bestimmung von Cumarin aus verschiedenen Zimtproben sowie Lebensmitteln [145] und für ein zerstörungsfreies Screening auf verschiedene Weichmacher in Kunststoffen [143].

## 1.2 Ionenfallenmassenspektrometrie

Da die Analyte mit den ambienten Ionisationsverfahren überwiegend alle zeitgleich in der Ionenquelle freigesetzt werden, verwendet man Massenspektrometer, die in der Lage sind, zwischen den einzelnen Analyten zu unterscheiden. Neben einer Reihe anderer Massenspektrometer werden hierfür Ionenfallenmassenspektrometer [77, 143, 144] eingesetzt, die differenziert werden in lineare (zweidimensionale) Ionenfallen (*linear ion trap*, LIT) und Quadrupol-(dreidimensionale) Ionenfallen (*Quadrupole ion trap*, QIT). Im Folgenden wird nur die QIT beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die Quadrupol-Ionenfallen gehen auf das Prinzip des Ionenkäfigs, der von Paul et al. 1953 entwickelt wurde, zurück [146, 147]. Die QIT besteht aus einer Ringelektrode, die oben und unten von zwei hyperbolisch geformten Elektroden, den Endkappen abgedeckt wird. Die Endkappen sind elektrisch miteinander verbunden und mit Bohrungen versehen, durch die die Ionen ein- bzw. austreten können. (s. Abb. 14). Zwischen Ringelektrode und Endkappen liegen Gleichstrom- und Radiofrequenz-(RF-)Potentiale an, durch die sich ein dreidimensionales Quadrupolfeld mit Rotationssymmetrie in der Ionenfalle bildet. Die Ionenfalle ist zusätzlich mit einem sogenannten Puffergas, meist Helium gefüllt. [148–150]

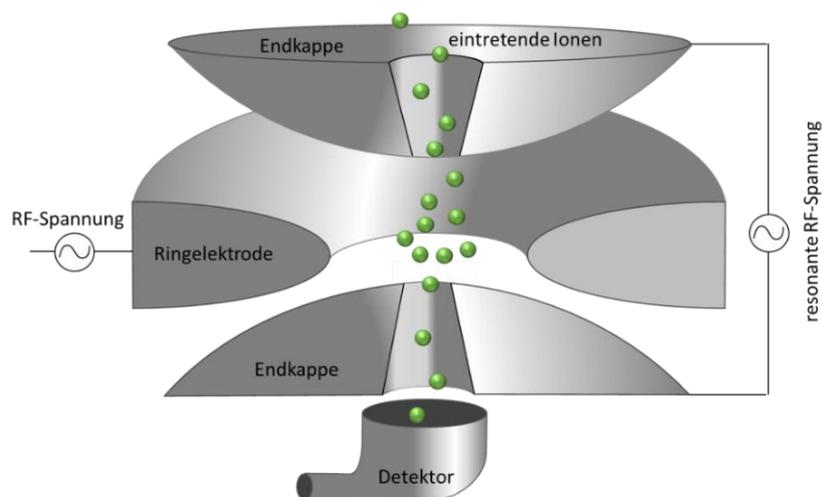


Abb. 14: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Ionenfallen-Querschnittes. Modifiziert aus [149, 150]

Die in einer externen Ionenquelle erzeugten Ionen gelangen in den Einflussbereich eines Einfangpotentials, das an den Endkappen der Falle anliegt. Durch dieses Einfangpotential werden sie in die Ionenfalle befördert und in einem parabolischen Potential-Topf in der Mitte der Falle auf einer stabilen Flugbahn gespeichert. Für jedes Masse-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ -Verhältnis) kann mit einem bestimmten Spannungs- und Frequenzbereich eine stabile Flugbahn für die Ionen erzeugt werden. Diese Bereiche können durch Lösen der Mathieu-Differenzialgleichung bestimmt werden. Außerdem kann mit ihr das kleinste bestimmbar  $m/z$ -Verhältnis ermittelt werden. [14, 100, 147, 149]

Die Bewegungen eines Ions, das in der Falle gespeichert ist, wird durch axiale und radiale Frequenzen bestimmt, wodurch seine Flugbahn der einer Acht gleicht [151, 152]. Um Ionen effektiv im Fallenzentrum zu sammeln, wird die Auslenkung ihrer Flugbahn, d.h. die Geschwindigkeit der Ionen, durch Kollision mit Heliumatomen, minimiert. Man spricht von Stoßkühlung. [14, 100, 148, 149]

Durch Anlegen einer entsprechenden Wechselfspannung an die Endkappen, kann die Flugbahn des Ions beeinflusst werden und es vom Zentrum wegbewegt werden. Es wird stärker dem Einfangfeld ausgesetzt, dadurch beschleunigt und gewinnt an kinetischer Energie, wodurch gezielt Ionen durch die Endkappenöffnungen ausgestoßen werden können. Das Entfernen der unerwünschten Ionen kann sowohl von niedriger zu hoher Masse, als auch andersherum ausgeführt werden. Hierdurch ist es möglich ein bestimmtes  $m/z$  Verhältnis oder einen schmalen  $m/z$ -Bereich zu isolieren. Die Ionen können aber auch massenselektiv nacheinander durch kontinuierliche Erhöhung der Frequenz aus der Falle ausgestoßen werden. Dieses Verfahren erlaubt das Scannen der  $m/z$ -Verhältnisse von niedriger zu hoher Masse. [14, 100, 149, 153, 154] Neben dem Scannen der  $m/z$ -Verhältnisse können die Ionen auch fragmentiert und die Fragmente anschließend gemessen werden. Man spricht von MS/MS oder  $MS^2$ -Untersuchungen.

$MS^2$ -Untersuchungen werden durch die stoßinduzierte Dissoziation (*collision-induced-dissociation*, CID) möglich. Bei der CID werden die isolierten Ionen (eines  $m/z$ -Verhältnisses) vom Zentrum der Falle wegbewegt und beschleunigt (angeregt). Es kommt zu Kollisionen mit den Heliumatomen, wodurch die kinetische Energie der Ionen teilweise in innere Energie umgewandelt wird. Im Grenzfall ist die innere Energie so groß, dass die Ionen dissoziieren. Ziel ist es, alle isolierten Ionen zu dissoziieren und möglichst alle gebildeten Fragmentationen einzufangen. Dies wird durch periodische Anregung und Stoßkühlung erreicht. Da bei einer Kollision mit einem Heliumatom nur eine geringe Menge an Energie übertragen wird, werden überwiegend Dissoziationen mit geringer Aktivierungsenergie hervorgerufen. Durch abwechselnde Anregung und Stoßkühlung können aber auch Fragmentierungen mit hohen Aktivierungsenergien erreicht werden. So ist es möglich alle massenselektierten Ionen zu dissoziieren, während gleichzeitig bis zu 90 % der Fragmentationen in der Falle gespeichert werden. [14, 100, 149, 155, 156]

Da die Anreicherung und Isolierung des zu fragmentierenden Ions, des Mutterions (*parent ion*), in der Falle und die Fragmentierung des Mutterions zeitlich getrennt ablaufen, ist es möglich das Mutterion so lange in der Falle anzureichern, bis eine bestimmte Konzentration des Ions in der Falle vorliegt. Dadurch ist es möglich, bei konstantem Rauschen ein vorher definiertes signal-to-noise-( $S/N$ -)Verhältnis zu erreichen. Durch Konstanthalten des  $S/N$ -Verhältnisses, kann das Mutterion oder seine Fragmente über einen großen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Der Nachteil hierbei ist, dass das Produktionensignal nicht mehr proportional zur Probenkonzentration, sondern zur Akkumulationszeit ist. [14, 100, 149, 155]

Die besondere Bedeutung der Quadrupolionenfalle besteht aber darin, mit ihr neben den  $MS^2$ -Untersuchungen auch  $MS^3$ -,  $MS^4$ - ...  $MS^n$ - Untersuchungen durchzuführen. Dazu wird aus den gebildeten

Fragmentationen ein Ion isoliert und dieses über den oben beschriebenen CID-Prozess erneut fragmentiert. Dies kann n-fach wiederholt werden, so dass man zu  $MS^n$ -Untersuchungen kommt. [14, 100, 149, 155] Mit der in dieser Arbeit verwendeten Ionenfalle war es prinzipiell möglich  $MS^n$ -Untersuchungen bis  $MS^{11}$  durchzuführen. Wenn im Verlauf dieser Arbeit von  $MS^n$ -Untersuchungen geschrieben wird, handelt es sich um mindestens  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Untersuchungen. Es können aber auch  $MS^4$ -Untersuchungen durchgeführt worden sein, dies ist aber nicht zwingend der Fall.

Ein Nachteil dieser Falle ist, dass nur eine begrenzte Anzahl an Ionen in ihr gespeichert werden können. Gelangen sehr viele Ionen eines Moleküls in die Falle, erreicht die Falle in kürzester Zeit ihre Akkumulationsgrenze und geringkonzentrierte Ionen gehen im Rauschen unter, da von ihnen nur sehr wenige in der Falle akkumuliert werden. [149]

### 1.3 Analyse von Arzneimitteln

Die gesetzliche Grundlage für Arzneimittel bildet das Arzneimittelgesetz (AMG). Gemäß §55 AMG, ist das Arzneibuch eine Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln über die Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln und den bei ihrer Herstellung verwendeten Stoffen. Das Arzneibuch enthält auch Regeln für die Beschaffenheit von Behältnissen und Umhüllungen.

In Deutschland werden drei Arzneibücher verwendet, das europäische Arzneibuch (allgemeingültig), das deutsche Arzneibuch (enthält ergänzende Regelungen, die nur für Deutschland Gültigkeit haben) und das homöopathische Arzneibuch.

Nach dem europäischen Arzneibuch (*European Pharmacopoeia*, Ph. Eur. (offiziell)) sind Arzneimittel Substanzen oder Kombinationen von Substanzen, die

- a) Eigenschaften zur Heilung oder zur Verhütung menschlicher und/oder tierischer Krankheiten haben
- b) bei Menschen und/oder Tieren verwendet werden können, um die physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder um eine medizinische Diagnose zu erstellen. [157, 158]

Ein Arzneimittel besteht dabei aus einem oder mehreren Wirkstoffen und meist mehreren Arzneimittelträgern, den sogenannten Hilfsstoffen. Enthält ein Arzneimittel ausschließlich pflanzliche Arzneistoffe oder Arzneistoffzubereitungen, wird es als pflanzliches Arzneimittel bezeichnet. [157, 158]

Die aktiven Bestandteile des Arzneimittels werden als Wirkstoffe bezeichnet. Das sind Stoffe, die dazu bestimmt sind, pharmakologische oder eine andere unmittelbare Wirkung bei der Diagnose, Heilung, Linderung, Behandlung oder Verhütung von Krankheiten zu entfalten. Während Hilfsstoffe, jeder andere Bestandteil eines Arzneimittels ist, der kein Wirkstoff ist. [157, 158]

Arzneimittel können in verschiedenen Formen vorliegen, unter anderem als Kapseln, Kaugummis, Ohr-, Nasen- und Augenpräparate, parentale Zubereitungen, Injektionen, halbfeste Zubereitungen, wie Cremes und Salben, Sticks oder Tabletten. [157, 158]

In Deutschland ist die Tablette eine häufig eingesetzte Form der Arzneimittel. Ph. Eur. definiert die Tablette als feste Zubereitung, die jeweils eine Einzeldosis eines oder mehrerer Wirkstoffe enthält und durch Verarbeiten von gleichen Volumina an Partikeln hergestellt wird. Die Partikel enthalten dabei homogen verteilt einen oder mehrere Wirkstoffe sowie verschiedene Hilfsstoffe. Die Tablettenkerne können zusätzlich von anderen Substanzen überzogen sein, die verschiedene Aufgaben erfüllen. Handelt es sich um einen sehr dünnen Polymerüberzug (natürlicher oder synthetischer Polymere), werden die Tabletten als Filmtabletten bezeichnet. [157]

Hilfsstoffe und Überzüge beeinflussen das Verhalten des Arzneimittels, z.B. können sie die Freisetzung des Wirkstoffes erst im Darm, z.B. bei pH 7 oder nach bzw. über eine gewisse Zeit ermöglichen. Wird dies maßgeblich durch den Überzug einer Tablette erzeugt, darf die Tablette nicht geteilt werden. Sie können auch für die Stabilisierung des Wirkstoffes verwendet werden, um eine mögliche Zersetzung des Wirkstoffes zu unterbinden. Die Funktion der Hilfsstoffe ist meist nur dem Hersteller bekannt und unterliegt der Geheimhaltung. Ebenso wie die genaue Zusammensetzung der Tablette. Lediglich die Wirkstoffmenge sowie die enthaltenen Hilfsstoffe ohne Mengenangaben müssen deklariert werden. Genauere Angaben muss der Arzneimittelhersteller nur z.B. bei der Zulassung, bei der entsprechenden Behörde machen. [157]

### 1.3.1 Analytische Prüfungen für Tabletten

Welche Prüfungen an Arzneimitteln oder Wirkstoffen durchgeführt werden muss, wird nicht allein durch die Arzneibücher definiert. Für den europäischen, japanischen und US-amerikanischen Markt werden die Prüfungen für neue Wirkstoffe, neue Arzneimittel oder neue Formulierungen durch die ICH-Guidelines<sup>2</sup> geregelt, die vom Gesetzgeber anerkannt sind. [157]

So müssen für ein neues Tabletten-Arzneimittel diverse Prüfparameter und ihre Akzeptanzkriterien sowie die Methode, wie diese geprüft werden, spezifiziert sein. Einige dieser Parameter müssen einmalig pro Charge bestimmt werden, für andere müsse auch Daten aus Stabilitätsstudien vorliegen, aus denen eine Haltbarkeit abgeleitet und/oder belegt werden kann. [159, 160]

Die analytischen Prüfparameter aus der ICH-Guideline Q6A [159] für Arzneimittel in Tablettenform sind:

Aussehen: Z.B. von Größe, Form und Farbe. Ggf. reicht eine organoleptische Prüfung.

Identifizierung: Identifizierung des Wirkstoffes muss mit einem Verfahren bestimmt werden, dass zwischen verwandten Strukturen unterscheiden kann. Wenn keine Störungen vorliegen, reicht hier die Identifizierung z.B. mittels Infrarotspektroskopie aus. Eine Identifizierung alleine über die Retentionszeit ist nicht zulässig. Hier wird ein unabhängiger zweiter Parameter benötigt, wie z.B. ein UV- oder Massenspektrum. Die Verwendung von LC-UV(-Diodenarray), LC-MS oder GC-MS ist zulässig.

Gehalt: Bestimmung des Wirkstoff-Gehalts mit einer gemäß ICH Q2 Guideline validierten Methode [161].

---

<sup>2</sup> Internationale Konferenz zur Harmonisierung technischer Anforderungen für die Zulassung von Humanarzneimitteln (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

Verunreinigungen: Die Überwachung von organischen und anorganischen Verunreinigungen (Abbauprodukte) gemäß ICH Q3B [162] und Lösungsmittelrückständen (ICH Q3C) [163] muss ebenfalls mit einer gemäß ICH Q2 Guideline validierten Methode erfolgen [161].

Dissolution (Freisetzung): Bei der Wirkstofffreisetzung wird geprüft, ob die Tablette innerhalb einer bestimmten Zeit eine bestimmte Menge Wirkstoff an das umgebende Medium abgegeben hat. Die Prüfung kann als Ein-Punkt-Messungen für Darreichungsformen mit sofortiger Freisetzung, als Profizug über mehrere Zeitpunkte für Darreichungsformen mit verlängerter Wirkstofffreisetzung oder in verschiedenen Medien für Darreichungsformen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung erfolgen.

Uniformity of dosage units (Gleichmäßigkeit der Einzeldosis): Hier sind die Spezifikationen klar in Ph. Eur. [157] festgelegt, die mit einer adäquaten Methode zu bestimmen sind:

- a) Gleichmäßigkeit des Gehalts: Wird bei überzogenen Tabletten und Tabletten mit einem deklarierten Wirkstoffgehalt  $< 25$  mg oder  $< 25\%$  der Gesamtmasse bestimmt. Der Wirkstoffgehalt muss  $85\% - 115\%$  des Durchschnittsgehalt von 10 Tabletten betragen. Maximal eine Tablette darf innerhalb der Grenzen von  $75\% - 125\%$  des Durchschnittsgehalt von 10 Tabletten liegen.
- b) Gleichmäßigkeit der Masse: Wird bei Tabletten, die nicht überzogen sind und einen deklarierten Wirkstoffgehalt  $\geq 25$  mg bzw.  $\geq 25\%$  der Gesamtmasse haben, bestimmt. Das individuelle Gewicht von 20 Tabletten wird bestimmt sowie der Durchschnittsgehalt von mind. 10 Tabletten. Je nach Durchschnittsgewicht, darf das Gewicht der einzelnen Tablette unterschiedlich stark variieren, siehe Tabelle 1.
- c) Teilbarkeit von Tabletten: Je ein Teil von 30 zufällig ausgewählten, geteilten Tabletten wird für diesen Test verwendet. Es wird die durchschnittliche Masse der 30 Teile und die einzelnen Massen bestimmt. Die Masse jedes Tablettenteils muss  $85\% - 115\%$  der durchschnittlichen Massen betragen. Maximal eine Einzelmasse darf innerhalb der Grenzen von  $75\% - 125\%$  der durchschnittlichen Masse liegen.

Tabelle 1: Limits des Tablettengewichtes für die Bestimmung der Gleichheit des Gewichtes [157]

Durchschnittsgewicht von 10 Tabletten	Nicht mehr als 2 Einzelmassen dürfen das Limit übersteigen	Keine Einzelmasse darf das Limit übersteigen
$< 80$ mg	$90\% - 110\%$	$80\% - 120\%$
$80$ mg – $250$ mg	$92,5\% - 107,5\%$	$86\% - 114\%$
$> 250$ mg	$95\% - 105\%$	$90\% - 110\%$

Wassergehalt: Der Wassergehalt kann direkt oder über den Trocknungsverlust bestimmt werden. Eine Bestimmung ist vor allem dann sinnvoll, wenn der Wirkstoff empfindlich auf Feuchtigkeit reagiert oder ein anderer Parameter, wie die Dissolution durch den Wassergehalt beeinträchtigt werden kann.

Mikrobielle Grenzwerte: Akzeptanzkriterien für die Gesamtzahl der aeroben Mikroorganismen, der Hefen und Schimmelpilze und die Abwesenheit spezifischer unerwünschter Bakterien müssen festgelegt werden. Außer durch den Herstellungsprozess besteht kein signifikantes Risiko einer mikrobiellen Kontamination oder Vermehrung. [157, 159]

### 1.3.2 Stabilitätsstudien an Tabletten

Die Parameter Aussehen, Gehalt, Verunreinigungen, Dissolution und Wassergehalt, aber auch Gehalt an (antimikrobiellen) Konservierungsmitteln (z. B. Antioxidantien), und mikrobielle Grenzwerte werden ebenfalls in Stabilitätsstudien geprüft. Stabilitätsprüfungen dienen dem Nachweis, wie sich die Qualität des Arzneimittels im Laufe der Zeit unter dem Einfluss verschiedener Umgebungsfaktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Licht verändert, und um eine Haltbarkeitsdauer sowie empfohlene Lagerbedingungen festzulegen. Daher werden alle Eigenschaften des Arzneimittels geprüft, die sich während der Lagerung verändern können und wahrscheinlich die Qualität, Sicherheit und/oder Wirksamkeit beeinflussen. Die verwendeten analytischen Verfahren müssen vollständig validiert und stabilitätsanzeigend sein. [160]

Die Stabilitätsstudien werden an verschiedenen Chargen durchgeführt, die so verpackt und hergestellt sind, wie sie auch nach der Zulassung für den Markt zur Verfügung stehen werden. Das bedeutet in ihrer Primärverpackung, dem Tablettenblister mit allen eventuellen Aufdrucken und Aufklebern, sowie in ihrer Sekundärverpackung ebenfalls mit allen eventuellen Aufdrucken und Aufklebern. Zusätzliche Stabilitätsstudien ohne die (Sekundär-)Verpackung können sinnvoll sein, wenn z.B. dies die normalen Lagerbedingungen widerspiegelt. [160]

Stabilitätsstudien werden meist über einen langen Zeitraum von einem bis mehrere Jahre durchgeführt. Bei den Langzeitstudien werden die Tabletten über die gesamte Lagerungszeit den für die Klimazone üblichen Bedingungen (Europa 25 °C, 60 % r.H.) ausgesetzt. Daneben gibt es sogenannte beschleunigte Stabilitätstest, die meist nur ein halbes Jahr umfassen und bei höherer Temperatur und Luftfeuchtigkeit stattfinden. Prüfzeitpunkte werden im ersten Jahr meist alle 3 Monate durchgeführt, danach in größeren Abständen, bei den beschleunigten Stabilitätstest könne Zwischenprüfzeitpunkte sinnvoll sein. [160]

Die Lagerbedingungen werden anschließend gegenüber thermischer Stabilität sowie ggf. Empfindlichkeit gegenüber Feuchtigkeit bewertet. Die Stabilität eines Arzneimittels ist nicht mehr gegeben, wenn mind. einer der folgenden Punkte nicht erfüllt ist:

1. Eine 5%ige Änderung des Assays gegenüber dem Ausgangswert,
2. ein Überschreiten des Akzeptanzkriteriums für ein Abbauprodukt,
3. Nichterfüllung der Akzeptanzkriterien für das Aussehen und die physikalischen Eigenschaften wie z. B. Farbe, Anbacken, Härte, Teilbarkeit,
4. Nichteinhaltung des Akzeptanzkriteriums für den pH-Wert oder
5. Nichteinhaltung des Akzeptanzkriteriums für die Dissolution. [160]

Für Verunreinigungen gelten besondere Kriterien, da sie die Patientensicherheit gefährden können. Als Verunreinigungen gelten alle Substanzen, die nicht mutwillig dem Arzneimittel zugefügt wurden. Bei der Prüfung von Tabletten auf Verunreinigungen werden vor allem Verunreinigungen untersucht, die während der Herstellung entstehen und/oder Abbauprodukte, die während der Stabilitätsstudien beobachtet werden, inklusive der Verunreinigungen, die sich durch potenzielle Abbaupfade und aus der Wechselwirkung mit Hilfsstoffen und/oder dem unmittelbaren Behälterverschlussystem ergeben. Weniger

bedeutend sind Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess des Wirkstoffes oder der Hilfsstoffe, außer es handelt sich um Abbauprodukte oder die eingesetzten Wirk- und Hilfsstoffe wurden vor der Herstellung der Tablette nicht auf Verunreinigungen geprüft. [162, 163]

Jede Verunreinigung, die zu irgendeinem Zeitpunkt während der Entwicklung und/oder der Stabilitätsstudien beobachtet wird, ob die Verunreinigung identifiziert wurde oder nicht, muss in die Spezifikation des Arzneimittels aufgenommen und überprüft werden. Hierbei gibt es verschiedene Grenzwerte, ab wann für welche maximale Tagesdosis die Verunreinigung nur gemeldet (d.h. detektiert), identifiziert und quantifiziert werden muss. Die Grenzwerte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die verwendeten Analyseverfahren müssen zwar entsprechend empfindlich und präzise sein, um den Grenzwerten gerecht zu werden und müssen gemäß ICH Q2A und Q2B validiert sein [161], aber insbesondere die Spezifität der Methode muss gegeben sein, um die spezifizierten und nicht spezifizierten Verunreinigungen nachweisen zu können. [162]

Tabelle 2: Grenzwerte für Verunreinigungen abhängig von der jeweiligen maximalen Tageshöchstdosis [162]

Maximale tägliche Dosis	Melde-Grenzwert <sup>1</sup>	Identifizierungsgrenzwert	Qualifizierungsgrenzwert
< 1mg	0,1 %	1,0 % oder 5 µg TDI	1,0 % oder 50 µg TDI
1 mg – 10 mg		0,5 % oder 20 µg TDI	
10 mg – 100 mg		0,2 % oder 2 mg TDI	0,5 % oder 200 µg TDI
100 mg – 1 g			0,2 % oder 3 mg TDI
1 g-2g	0,05 %	0,1 %	0,15%
> 2 g			

<sup>1</sup> Die Melde-Grenze ist mindestens gleich der Bestimmungsgrenze der analytischen Methode (TDI: total daily intake, tägliche Aufnahme)

Die Quantifizierung der Verunreinigungen kann, wenn sie notwendig wird, über geeignete Referenzstandards erfolgen. Gehaltsabschätzungen können auch über den Gehalt des Wirkstoffes erfolgen, ggf. muss ein Korrekturfaktor verwendet werden, wenn die Responsewerte von Verunreinigung und Wirkstoff zu weit auseinander liegen. Eine Korrektur braucht nicht erfolgen, wenn der Gehalt der Verunreinigung ohne Korrektur überschätzt wird. Die Abschätzung des Gehaltes von identifizierten oder nicht identifizierten Abbauprodukten über eine Referenzsubstanz (als Referenz kann hier auch der Wirkstoff dienen) ohne Korrekturfaktor darf nur erfolgen, wenn plausibel belegt wird, dass die Annahme zutrifft, dass beide Substanzen äquivalente Detektorreaktion hervorrufen. [162]

### 1.3.3 Patientenindividuelle Zweitverblisterung

Neben den Formulierungsstoffen einer Tablette unterliegen auch die Verpackungsmaterialien der Primärverpackung den Regelungen der Arzneibücher [157]. Da die Haltbarkeit der Arzneimittel in ihrer Primärverpackung bestimmt und überprüft wird, ist es in Europa nur in begründeten Ausnahmefällen, nach Prüfung und Genehmigung durch die entsprechende Behörde, erlaubt, die Arzneimittel aus ihrer Primärverpackung zu entnehmen und neu zu verpacken. Lediglich die Sekundärverpackung sowie der Beipackzettel dürfen ausgetauscht werden. [158, 164]

Auf dem US-Amerikanischen Markt hingegen ist eine Entnahme aus der Primärverpackung und Neuverpackung von Medikamenten durch geschultes Fachpersonal nicht verboten, da es durch die *Food and Drug Administration* (FDA) und das *United States Pharmacopeial* (USP) eine klare Regelung in Bezug auf das Neu- bzw. Umverpacken von Arzneimitteln sowie die Prüfung kritischer Parameter gibt. [165]

In Deutschland gibt es eine Ausnahme vom europäischen Verbot, die sogenannte „Patientenindividuelle Neuverpackung von Fertigarzneimitteln für bestimmte Einnahmezeitpunkte“ [166]. Diese Neuverpackung von Medikamenten dient dazu, dem Patienten die verschriebenen Medikamente in den entsprechenden Dosierungen für die jeweiligen Entnahmekzeitpunkte für eine Woche zusammenzustellen, um das Patientenwohl und die Patientensicherheit zu erhöhen [167]. Der Umgang mit diesen neuverpackten Arzneimitteln wird über das AMG und die Apothekenbetriebsordnung (ApBetrO) geregelt. Nach § 4 Abs. 14 AMG handelt es sich bei der patientenindividuellen manuellen Neuverpackung um die Herstellung eines Arzneimittels. Eine Zulassung dieser „neuen“ Arzneimittel braucht gemäß § 21 Absatz 2 Punkt 1 und 1a nicht zu erfolgen. Da die patientenindividuelle manuelle Neuverpackung von Fertigarzneimitteln im Einzelfall aufgrund einer Verschreibung oder sonstigen Anforderung einer einzelnen Person geschieht, wird sie über die ApBetrO geregelt. Die genauen Vorgaben zu den Anforderungen an das Qualitätsmanagementsystem, das Personal und die Räumlichkeiten der Apotheke sowie die Kennzeichnung der neuverpackten Arzneimittel sind in § 34 ApBetrO zusammengefasst. Außerdem existiert eine Leitlinie der Bundesapothekerkammer zur Qualitätssicherung. In der Leitlinie sowie in § 7 Absatz 1b ApBetrO, wird eine Plausibilitätsprüfung über die gleichbleibende Qualität im Wochendosiersystem über den Haltbarkeitszeitraum verlangt. Nach § 7 Absatz 2 ApBetrO kann von einer analytischen Prüfung abgesehen werden, sofern die Qualität des Arzneimittels durch das Herstellungsverfahren, die organoleptische Prüfung des fertig hergestellten Arzneimittels gewährleistet ist. [158, 166, 167]

Umfasst die Neuverpackung der Arzneimittel das Halbieren der Tabletten auf schriftliche ärztliche Anforderung, darf dies nur befolgt werden, wenn ansonsten die Versorgung nicht gesichert werden kann und wenn über validierte Methoden sichergestellt ist, dass die Qualität des Arzneimittels über den Haltbarkeitszeitraum stabil bleibt. Welche Parameter geprüft werden müssen, um eine Aussage über die Qualität zu treffen, ist jedoch nicht festgelegt. [166]

Die Haltbarkeitsdauer der Tabletten im Wochendosiersystem wird nach Aussage des Apothekers der Adler Apotheke (Burscheid, Deutschland) auf zwei Wochen begrenzt. Das Verwenden des Haltbarkeitsdatums des Herstellers darf nicht erfolgen, da die Tabletten der Primärverpackung entnommen worden sind. Eine Entnahme der Tabletten auf Vorrat und/oder Neuverpackung vor dem Verkauf ist ebenfalls verboten. [158, 166]

#### **1.3.4 Analyse von Arzneimitteln (Tabletten)**

Für die Analyse von Arzneimitteln werden verschiedenste Techniken eingesetzt. Einige eignen sich nur zur Prüfung bestimmter Parameter wie Bruchfestigkeit, nicht sichtbare Partikel oder Zerfallszeit und wurden genau dazu entwickelt diese Parameter zu prüfen. Mit anderen Techniken lassen sich sogenannte Limit-

Tests durchführen, die i.d.R. nur die An- und Abwesenheit bestimmter Stoffe anzeigen. Ggf. kann mit ihnen eine grobe Abschätzung über den Gehalt erfolgen, wenn z.B. mehrere verschieden konzentrierte Vergleichslösungen vorhanden sind. Wieder andere Techniken werden eingesetzt, um Summenparameter, wie Verseifungs-, Säure- oder Esterzahl zu bestimmen. Diesen Techniken liegt z.B. die Titration oder die Spektroskopie zugrunde, die sich ebenfalls eignet, unter gewissen Voraussetzungen, den Wirkstoffgehalt in Arzneimittel zu prüfen. [157, 165]

Allein die Techniken zur quantitativen Gehaltsbestimmung des Wirkstoffs sind sehr vielfältig. Dies sind unter anderem verschiedene Spektroskopie-Techniken (z.B. UV, (Nah)infrarot ((N)IR), Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*; NMR)), Titrimetrie, elektroanalytische Techniken, chromatographische Methoden, inklusive (Hochleistungs-) Dünnschichtchromatographie ((HP)TLC), GC und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High-performance liquid chromatography*; HPLC) mit ihren diversen Detektor-Kopplungen sowie die Kapillarelektrophorese. [157, 165] Das Feld der Methoden kann weiter eingeschränkt werden, indem nur solche in Betracht gezogen werden, die zur Detektion von Verunreinigungen der Arzneimittel und Hilfsstoffe eingesetzt werden. Bei den verwendeten chromatographischen Techniken geht der Trend hin zu immer schnelleren Analysen, empfindlicheren und spezifischeren Detektoren, wie den Massenspektrometern. Aber auch Kosteneinsparungen und eine Reduzierung des Lösungsmittelverbrauchs ist zu beobachten. [168–170]

Viele Methoden, die in pharmazeutischen Analyselaboren entwickelt werden, werden nie veröffentlicht, da sie nur für ein bestimmtes Arzneimittel entwickelt werden und oft der Geheimhaltung des Labors oder des Auftraggebers unterliegen.

Unter den chromatographischen Techniken ist die HPLC sowohl für Wirkstoff als auch für Fertigarzneimittel, die am häufigsten eingesetzte Technik [171]. In Kombination mit dem UV- oder *Photodioden-array* (PDA-) Detektor zeichnet sie sich vor allem durch ihre große Spezifität und gleichzeitig ausreichende Präzision, Richtigkeit und Empfindlichkeit aus. Der UV-Detektor kann aber nur selten eine eindeutige Identifizierung liefern.

Für spezielle Fragestellungen werden auch andere Detektoren, wie MS-, IR-, Lichtstreu- (*Evaporative Light Scattering*; ELS), Leitfähigkeits- oder Fluoreszenzdetektoren, eingesetzt. Für alle diese Detektoren muss, um arzneibuchkonform zu arbeiten, in aufwendigen Tests vor jeder Analyse die Spezifität, Präzision und Richtigkeit sowie ggf. Empfindlichkeit belegt werden [161], wodurch der Arbeitsaufwand für chromatographische Techniken vergleichsweise hoch ist. Die HPLC-UV/PDA sowie HPLC-MS Analysen bieten hingegen den Vorteil, dass eine Vielzahl an Verbindungen detektiert werden können und die Chromatogramme mit der richtigen Software relativ leicht zu interpretieren sind. [168–170, 172, 173]

Doch nicht nur durch die Tests, die benötigt werden, um den Anforderungen der Arzneibücher gerecht zu werden, machen die chromatographischen Techniken vergleichsweise zeitaufwendig. Auch die benötigte Probenvorbereitung kann zeitaufwendig werden. Sie reicht von gar keiner Probenvorbereitung für flüssige Proben, wie z.B. Nasenspray oder für feste Arzneimittel vom einfachen Zerfallen/Suspendieren und anschließendem Filtrieren bis hin zu mehrstufigen Extraktions- und Anreicherungs-schritten. [174, 175]

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Bei Tabletten, die patientenindividuell zweitverblistered wurden, dürfen die Haltbarkeitszeiträume des Herstellers nicht mehr verwendet werden, da sie sich nur auf die ursprüngliche Primärverpackung bezieht [157, 158, 164, 166]. Zwar muss zurzeit nur für halbierte Tabletten die Stabilität der halbierten neuverpackten Tabletten durch eine validierte Methode belegt werden [158, 166, 167], aber im Sinne der Patientensicherheit wäre dies auch für ganze neuverpackte Arzneimittel sinnvoll.

Die patientenindividuelle Zweitverblisterung wird in Deutschland nach Verordnung durch einen Arzt in Apotheken durchgeführt. Nach Aussage des Apothekers der Adler Apotheke (Burscheid, Deutschland) verfügen Apotheken nicht über die Möglichkeiten, Stabilitätsstudien im klassischen Sinn, also im Sinne der ICH-Guidelines, durchzuführen. Zum einen fehlen die Lagermöglichkeiten, zum anderen die Zeit und das Equipment für jedes neu verpackte Arzneimittel einzelne Stabilitätsstudien durchzuführen, da diese meist auf einer Entwicklung und Validierung einer chromatographischen Methode beruhen.

Doch nicht nur für die patientenindividuelle Zweitverblisterung, sondern auch für die Analyse neuhergestellter Arzneimittel, ist es von Vorteil eine Methode oder ein Verfahren zu entwickeln, dass den Zeitaufwand der Probenvorbereitung und Systemeignungstests, sowie für Entwicklung und Validierung der Methode für das einzelne Arzneimittel senkt. Die Entwicklung der Massenspektrometrie in den letzten Jahren zeigt eine Möglichkeit auf, Arzneimittel ohne oder nur mit geringen Probenvorbereitungsaufwand direkt zu analysieren. Gelingt es, eine solche Methode zu entwickeln, können damit der Lösungsmittelverbrauch sowie allgemein die Kosten für die Analyse von Arzneimitteln gesenkt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung der DIP-ESI, die an ein Ionenfallenmassenspektrometer gekoppelt werden soll. Es wird erwartet, dass durch die Ionisierung nach dem ESI-Mechanismus verstärkt polare Substanzen, die mittels DIP-APCI [143] nicht oder nur schlecht zugänglich sind, besser ionisiert und detektiert werden.

Die DIP-ESI soll, wie schon die DIP-APCI und die DIP-APPI, an das von Schiewek et al. entwickelte Multi-Propose-Quellengehäuse angeschlossen werden. Größe und Design der Quelle sollen nicht verändert werden. Weiterhin soll das DIP-System der Firma SIM GmbH zum Einbringen fester oder flüssiger Proben in die Ionenquelle dienen. Mit diesem System ist eine reproduzierbare Positionierung fester und flüssiger Proben sowie möglicherweise eine (teilweise) Trennung der Analyten durch Erhitzen der Probe über einen oder mehrere Temperatur-Gradienten möglich.

Die Ionisierung der Analyten soll auf dem Prinzip der ESI basieren. Da die desorbierten, gasförmigen Analyten wie bei der EESI bzw. AP-TD/EESI mit einem analytfreien ESI-Spray interagieren, wird die entwickelte Ionenquelle im Folgenden als DIP-EESI-Ionenquelle bezeichnet. [144, 176]

Die Optimierung soll vor allem die Position des ESI-Sprayers sowie die optimalen Gas- und Flüssigkeitsströme und die angelegten Spannungen abdecken. Nach Abschluss der Optimierung wird die Validierung mit

verschiedenen Standards durchgeführt, um ihr Potential mit dem der DIP-APCI [143] und DIP-APPI [144] zu vergleichen. Anschließend sollen die Arzneimittel, die von der Adler Apotheke (Burscheid, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden, mit der neu entwickelten Quelle untersucht werden. Hierfür soll eine möglichst allgemein gültige Methode entwickelt werden, mit der sich viele Arzneimittel untersuchen lassen. Weiter soll die Methode möglichst ohne Probenvorbereitung auskommen.

Da Arzneimittel aber Substanzen mit unterschiedlicher Polarität enthalten können und einige Substanzen sich durchaus besser mittels APCI ionisieren lassen [100, 116, 117, 123, 177–179], werden die Medikamente ebenfalls mit der DIP-APCI untersucht und die Ergebnisse mit denen der neuentwickelten Quelle verglichen. Zusätzlich sollen die Ergebnisse der DIP-Systeme mit denen aus HPLC-Systemen verglichen werden, um sie zu verifizieren.

Abschließend soll nach Möglichkeit eine Methode entwickelt werden, mit der Stabilitätsuntersuchungen, wie sie im Rahmen der patientenindividuellen Zweitverblisterung nötig werden, durchgeführt werden können. Der Fokus liegt hier auf dem Screening nach bekannten und unbekanntem Verunreinigungen, die sich sowohl in den originalverpackten als auch in den neuverpackten Arzneimitteln bilden können. Weiter soll untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen der original und der neuverpackten Tablette finden lassen, die Rückschlüsse auf eine Instabilität des Arzneimittels zulassen.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Geräte und Materialien

#### 3.1.1 Massenspektrometrie und Direkteinlass-System

Ionenfallenmassenspektrometer „AmazOn Speed“ der Firma Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland), ausgestattet mit

- DIP-APCI-System, bestehend aus:
  - *Multipurpose ion source*, MPIS der Firma iGenTraX UG (Haan, Deutschland) mit APCI-Nadel und APCI-Verdampfer, Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland) ausgestattet
  - Direct Inlet Probe (inkl. Steuerungssystem), SIM (Oberhausen, Deutschland)
  - Kontrolle Hilfgasfluss: Schwebekörper-Durchflussmesser, Krohne (Duisburg, Deutschland) nach Entwicklung der DIP-EESI Verwendung des GFC Massendurchflussregler, Aalborg Instruments & Controls Inc. (New York, USA)
- DIP-EESI-System, bestehend aus:
  - *Multipurpose ion source*, MPIS der Firma iGenTraX UG (Haan, Deutschland) mit Appollo II ESI-Sprayer, Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland) ausgestattet
  - Direct Inlet Probe (inkl. Steuerungssystem), SIM (Oberhausen, Deutschland)
  - Kontrolle Hilfgasfluss: GFC Massendurchflussregler, Aalborg Instruments & Controls Inc. (New York, USA)
  - Spritzenpumpe, Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland) mit 2,5 mL Spritze, Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
- Software: *ESI Compass for AmazOn*, Version 1.3 und 1.5, Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)

#### 3.1.2 Flüssigchromatographie-System

Accela™ UHPLC System der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Bremen, Deutschland), bestehend aus folgenden Komponenten:

- Accela Autosampler
- Accela 1250 Pump
- PDA Detektor
- Software: Thermo Xcalibur 3.0.63

#### 3.1.3 Chromatographie-Säulen

- C8 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent eclipse XDB-C8), Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Deutschland)
- CN 150 x 2 mm, 3 µm (Luna®), Phenomenex Ltd. Deutschland (Aschaffenburg, Deutschland)
- C18 100 x 3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex®), Phenomenex Ltd. Deutschland (Aschaffenburg, Deutschland)
- C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, Alltech Associates, Inc. (Deerfield, USA)

### 3.1.4 Sonstige Geräte

- Reinstwasseranlage: Arium® pro VF pure water system, Sartorius, (Göttingen, Deutschland)
- Feinwaage: CP324S, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
- MiniSpin® Zentrifuge, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Vortex-2-Genie, Scientific Industries Inc. (New York, USA)
- Ultraschallbad, VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- pH-Meter, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

- Glas-Vials, 1,5 mL, klar und braun, VWR (Langenfeld, Deutschland)
- Schraubkappen für Kurzgewindeflaschen, blau mit PTFE-Septum, WICOM (Heppenheim, Deutschland)
- Pipettenspitzen gelb, 1-200 µL und blau, 100-1000 µL, Ratiolab, (Dreieich, Deutschland)
- Einmal-Kanülen, 5 mL, BBraun (Melsungen, Deutschland)
- Spritzenvorsatzfilter PTFE, 0,2 µm und 0,45 µm, WICOM (Heppenheim, Deutschland)
- 5 µL Glas-Spritze, Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)

### 3.1.6 Sonstige Software

- Microsoft Office Excel 2010
- Origin Pro, Version 2019b, OriginLab Corporation (Northampton, USA)
- ChemDraw® Prime, Version 16.0.1.4, CambridgeSoft, PerkinElmer Informatics, Inc. (Rodgau, Deutschland)
- Minitab17®, Version 17.2, Minitab Ltd. (Coventry, United Kingdom)

## 3.2 Chemikalien

### 3.2.1 Lösungsmittel und Eluenten

- Wasser wurde arbeitstäglich frisch hergestellt
- Methanol, LC/MS grade, VWR (Leuven, Belgien)
- Acetonitril, HPLC grade, VWR (Leuven, Belgien)
- Tetrahydrofuran, HPLC grade, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol, analytical reagent grade  $\geq 99,9\%$ , Thermo Fisher Scientific Inc. (Bremen, Deutschland)
- Isopropanol, LC/MS HiPersolv  $\geq 99,9\%$ , VWR (Leuven, Belgien)
- Hexan,  $\geq 98\%$ , Biosolve LTD (Valkenswaard, Niederlande)
- Toluol,  $\geq 99,8\%$ , Janssen Chimica (Beerse, Belgien)
- Dichlormethan  $\geq 99,99\%$ , Acros organics (Geel, Belgien)

### 3.2.2 Additive

- Ameisensäure (98–100%, Suprapur®), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Ammoniumformiat (99.0 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Essigsäure (100%), VWR (Leuven, Belgien)
- Ammoniumacetat (97%), Fluka, (Steinheim, Deutschland)
- Ammoniaklösung (30–33%), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Diammoniumhydrogenphosphat (99,5 %), Fluka, (Steinheim, Deutschland)
- Ammoniumdihydrogenphosphat (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Phosphorsäure, (p.a. 85 %) AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat (99 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Natriumdihydrogenphosphat (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Dikaliumhydrogenphosphat (99 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Tetraammoniumhydroxid-Pentahydrat (98 %), AlfaAesar (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.2.3 Gase

- Helium (99,999%), Air Liquid, (Düsseldorf, Deutschland)
- Stickstoff (*boil-off* von fl. N<sub>2</sub>), Linde, (Essen, Deutschland)

### 3.2.4 Proben und Standards

- Koffein (99.4 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Kampfer (98 %), Riedel de Haën (Seelze, Deutschland)
- Colchicin (≥ 95%), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Alle Tabletten wurden von der Adler Apotheke (Burscheid, Deutschland) zur Verfügung gestellt, durch die auch die patientenindividuellen Zweitverblisterung durchgeführt wurde.

- Amlodipin Besylat Tabletten (5 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DT2093,  
neuverpackt: Ch.-B. DJ0323
- Clonazepam Tabletten, Rivotril® (0,5 mg), Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. E0755B02,  
neuverpackt: Ch.-B. E0755B02
- Hydrochlorothiazid Tabletten, HCT (12,5 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DM9216,  
neuverpackt: Ch.-B. DM9216
- Kombipräparat Irbesartan/Hydrochlorothiazid Filmtabletten, Co Aprovel® (150 mg/12,5 mg), Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. 3V003,  
neuverpackt: Ch.-B. 3V003

- Metoprololtartrat Tabletten (50 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DR 6109,  
neuverpackt: Ch.-B. DE 3239
- Midodrinhydrochlorid Tabletten, Gutron® Tabletten (2,5 mg), Nycomed GmbH (Konstanz, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. 196366,  
neuverpackt: Ch.-B. 196366
- Mirtazapin Filmtabletten (15 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DP7742,  
neuverpackt: Ch.-B. DC0845
- Pipameron Tabletten (40 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DP6977,  
neuverpackt: Ch.-B. DF8296
- Piracetam Filmtabletten (800 mg), 1A Pharma® (Oberhachingen, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. DK2110,  
neuverpackt: Ch.-B. CF9923
- Primidon Tabletten, Mylepsinum® (250 mg), AWD.pharma GmbH Co. KG (Radebeul, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. L41575,  
neuverpackt: Ch.-B. L41573
- Trazodon Tabletten, (100 mg), neuraxpharm® Arzneimittel GmbH (Langenfeld, Deutschland)  
originalverpackt: Ch.-B. 132043,  
neuverpackt: Ch.-B. 122247

### 3.3 Methoden

Die Medikamente wurden in ihrer originalen bzw. neuen Verpackung in einem lichtdurchlässigen Kunststoffbehälter bei Tageslicht ohne weitere Vorsichtsmaßnahmen auf der Laborarbeitsfläche gelagert. Das heißt, sie wurden weder vor Licht noch vor Feuchtigkeits- oder Temperatureinflüssen geschützt. Eine Stressung der Medikamente wurde nicht durchgeführt. Das Interesse lag darauf, unter den Bedingungen, denen Tabletten gewöhnlich ausgesetzt sind, eventuelle Unterschiede zwischen den originalverpackten und halbierten neuverpackten Tabletten, zu detektieren. Abbauprodukte sollten nicht künstlich herbeigeführt werden. Die Arzneimittel sollten gemäß Apotheke zwei Wochen nach Neuverpackung haltbar sein und nicht über diesen Zeitraum hinaus gelagert werden. Für meine Untersuchungen wurden die Arzneimittel deutlich länger (bis zu 3 Jahre) gelagert, da sie zu Beginn der Arbeit von der Adler Apotheke neu verpackt worden waren und keine neuen Tabletten im Verlauf der Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Daher ist es prinzipiell möglich, dass mehr Verunreinigungen in dem längeren Zeitraum entstanden sind. Für die Untersuchungen wurden die Medikamente am Untersuchungstag aus ihren jeweiligen Verpackungen entnommen.

### 3.3.1 Untersuchungen mit HPLC-UV/MS

#### 3.3.1.1 Generell

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Methoden basieren überwiegend auf der Ph. Eur und der USP. Die in den Monographien vorgeschriebenen Säulendimensionen waren zum Teil nicht vorhanden. Daher wurden die Flüsse mit Hilfe der Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst.

$$F_{\text{neu}} = \frac{F_{\text{alt}} \cdot l_{\text{neu}} \cdot d_{\text{neu}}^2 \cdot p_{\text{alt}}}{l_{\text{alt}} \cdot d_{\text{alt}}^2 \cdot p_{\text{neu}}} \quad (14)$$

In Gleichung (14) bedeutet:

alt: Wert der ursprünglich in der Methode verwendeten Säule	l: Länge der Säule in mm
neu: Wert der verwendeten Säule	d: Durchmesser der Säule in mm
F: Fluss in mL/min	p: Partikeldurchmesser in $\mu\text{m}$

Die Testlösungen und Performancelösungen der einzelnen Arzneimittel wurden nach folgendem Protokoll zubereitet. Die Anzahl der verwendeten Tabletten, Einwaagen sowie die Menge und die Zusammensetzung des verwendeten Lösungsmittels, werden im jeweiligen Kapitel des Wirkstoffs beschrieben.

#### Herstellung der Testlösung

Eine bestimmte Anzahl an Tabletten wurde gewogen und aus ihnen ein Mischmuster hergestellt. Dazu wurden die Tabletten fein gemörsert. Ein Äquivalent des Tablettenpulvers wurde genau eingewogen und in einem bestimmten Volumen Lösungsmittel für 30 min im Ultraschallbad suspendiert. Nachdem sich die Suspension weitgehend getrennt hatte, wurden ca. 5-10 mL des Überstandes abgenommen und durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die ersten 3 – 5 mL wurden verworfen, um mögliche Verunreinigungen durch den Filter zu minimieren. Ca. 1,5 mL des restlichen Filtrats wurde in ein LC-Vial abgefüllt und mit LC-UV/ESI-MS analysiert.

#### Herstellung der Performancelösung

Ein Äquivalent der Testlösung wurde mit einem bestimmten Volumen Lösungsmittel verdünnt und anschließend gemäß der Vorgabe aus Ph. Eur. durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die ersten 5 mL wurden verworfen, um mögliche Verunreinigungen durch den Filter zu minimieren. Ca. 1,5 mL des restlichen Filtrats wurde in ein LC-Vial abgefüllt und mit LC-UV/ESI-MS analysiert.

3.3.1.2 *Amlodipin*

Lösungsmittel: Acetonitril : Methanol : Wasser 15:35:50 v/v/v

Testlösung (1 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 5 ganze bzw. 10 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 5 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,651 g (20 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

Performancelösung (1,5 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 15 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 10 mL

LC-UV/ESI-MS Methode

Die verwendete Methode basiert auf der USP 35 Monographie Amlodipin Besylat Tabletten [165], der Ph. Eur. 5.0 Monographie 01/2005:1491 für Amlodipin Besylat [180] sowie einem Eintrag im Pharmacopeial Forum der USP-NF (PF-USP) der den Artikel über Amlodipin Besylat im USP Medicines Compendium diskutiert [181]. Da die Methode bereits MS gängig war, wurde sie für die MS-Detektion nicht weiter modifiziert. Die Methodenparameter sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Methodenparameter der Amlodipin-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)				
Eluent (isokratisch):	Acetonitril : Methanol : Ammoniumacetatlösung (50 mmol/L; eingestellt mit verd. Essigsäuresäure/Ammoniaklösung auf pH 5.0) 15:35:50 v/v/v				
Fluss:	394 µL/min*				
Injektionsvolumen:	10 µL				
Säulentemp.:	25 °C				
Probentemp.:	10 °C				
Detektion UV:	237 nm und 190-600 nm				

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäuberdruck:	32 psi
Massenbereich:	100 – 700 Da	Dry-Gasfluss:	10,6 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	409 m/z	Dry-Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

3.3.1.3 *Clonazepam*

Lösungsmittel: Tetrahydrofuran (THF) : Methanol : Wasser 10:42:28 v/v/v

Testlösung (250 mg/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 6 ganze  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 0,5 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,759 g (2,5 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 10 mL

Performancelösung (250 µg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Ph. Eur. 7.0 Monographie 01/2008:0890 für Clonazepam [157].

Die Methodenparameter sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Methodenparameter der Clonazepam LC-UV-Messungen

## HPLC

Säule:	C8 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent eclipse XDB-C8)
Eluent (isokratisch):	THF : Methanol : Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (60 mmol/L, pH 8,0 eingestellt mit verd. Ammoniaklösung) 10:42:48 v/v/v
Fluss:	1 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulentemp.:	25 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	205 nm und 190-600 nm

LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Ammoniumdihydrogenphosphatlösung durch eine leicht flüchtige Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Der Fluss wurde nach Durchgang durch den UV-Detektor 1:1 gesplittet, so dass 500 µL/min ins MS geleitet wurden. Die Methodenparameter sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Methodenparameter der Clonazepam LC-MS-Messungen

## HPLC

Säule:	C8 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent eclipse XDB-C8)			
Eluent (isokratisch):	THF : Methanol : Ammoniumformiatlösung (60 mmol/L, pH 8,0 eingestellt mit verd. Ammoniaklösung) 10:42:48 v/v/v			
Fluss:	1 mL/min			
Injektionsvolumen:	20 µL			
Säulentemp.:	25 °C			
Probentemp.:	10 °C			
Detektion UV:	245 nm und 190-600 nm			

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäubedruck:	44 psi
Massenbereich:	50 – 500 Da	Dry-Gasfluss:	10,9 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	316 m/z	Dry-Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

## APCI-MS

APCI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Verdampfergasdruck:	30 psi
Massenbereich:	50 – 500 Da	Dry-Gasfluss:	1,3 L/min	Verdampfergastemp.:	300 °C
Zielmasse:	316 m/z	Dry-Gastemp.:	250 °C	Kapillarspannung:	4,5 kV
				End Plate Offset:	0,5 kV

## 3.3.1.4 Irbesartan

Lösungsmittel: Acetonitril : Wasser 33:67 v/v

Testlösung (1 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze bzw. 6 halbierte

Wirkstoffgehalt pro Tablette: 150 mg

Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,035 g (20 mg)

Volumen Lösungsmittel: 20 mL

Performancelösung (1,5 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL

Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Waters Application Note von Chavali et al. [182] und der Ph. Eur. 7.0 Monographie 04/2010:2465 für Irbesartan [157]. Die Methodenparameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Methodenparameter der Irbesartan LC-UV-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)
Eluent (isokratisch):	0,55 % wässrige Phosphorsäure : Acetonitril 67:33 v/v
Fluss:	0,79 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemp.:	30 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	220 nm und 190-600 nm

LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die verdünnte Phosphorsäure durch verdünnte Ameisensäure gleicher Konzentration ersetzt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Methodenparameter der Clonazepam LC-MS-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)		
Eluent (isokratisch):	0,55 % wässrige Ameisensäure: Acetonitril 67:33 v/v		
Fluss:	0,79 mL/min		
Injektionsvolumen:	10 µL		
Säulentemp.:	30 °C		
Probentemp.:	10 °C		
Detektion UV:	220 nm und 190-600 nm		

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäuberdruck:	44 psi
Massenbereich:	100 – 600 Da	Dry-Gasfluss:	10,9 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	429 m/z	Dry-Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

3.3.1.5 *Metoprolol-Tartrat*

Abweichung zum allgemeinen Protokoll: Das Tablettenpulver wurde nur in Wasser im Ultraschallbad suspendiert und anschließend mit Acetonitril aufgefüllt und gevortext.

Testlösung (0,5 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze bzw. 6 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 50 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,025 g (10 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 18 mL Wasser aufgefüllt auf  
 20 mL mit Acetonitril

Performancelösung (0,5 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV/ESI-MS Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Agilent Technologies Application Note von Rongjie [183]. Diese Methode wurde für die MS-Detektion nicht weiter modifiziert, da die Methode bereits LC-MS gängig war. Die Methodenparameter sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Methodenparameter der Metoprolol -Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)				
Eluent A:	Acetonitril				
Eluent B:	10 mM Ammoniumformiat in Wasser				
Gradient:	Zeit [min]	0	10	11	20
	Eluent B [%]	10	50	10	10
Fluss:	500 µL/min				
Injektionsvolumen:	10 µL				
Säulentemp.:	30 °C				
Probentemp.:	10 °C				
Detektion UV:	280 nm und 190-600 nm				

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäuberdruck:	44 psi
Massenbereich:	50 – 600 Da	Dry-Gasfluss:	11,0 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	375 m/z	Dry-Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

3.3.1.6 *Midodrin Hydrochlorid*

Lösungsmittel: Acetonitril : Wasser 12:88 v/v

Testlösung (1 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 5 ganze bzw. 10 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 2,5 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,526 g (10 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 10 mL

Performancelösung (50 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 5 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 100 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der USP 35 Vorschrift für Midodrin Hydrochlorid [165]. Die Methodenparameter sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Methodenparameter der Midodrin LC-UV-Messungen

HPLC	
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)
Eluent (isokratisch):	Acetonitril : Kaliumdihydrogenphosphatlösung (100 mmol/L, pH 4,0 eingestellt mit verd. Phosphorsäure) 12:88 v/v
Fluss:	820 µL/min*
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemp.:	25 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	290 nm und 190-600 nm

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Kaliumdihydrogenphosphatlösung durch eine leicht flüchtige Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Methodenparameter der Midodrin LC-MS-Messungen

HPLC					
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)				
Eluent (isokratisch):	Acetonitril : Ammoniumformiatlösung (100 mmol/L, pH 4,0 eingestellt mit verd. Ameisensäure) 12:88 v/v				
Fluss:	820 µL/min*				
Injektionsvolumen:	10 µL				
Säulentemp.:	25 °C				
Probentemp.:	10 °C				
Detektion UV:	290 nm und 190-600 nm				
ESI-MS					
ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäubedruck:	68 psi
Massenbereich:	50 – 400 Da	Dry-Gasfluss:	10,8 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	200 m/z	Dry-Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

3.3.1.7 *Mirtazapin*

Lösungsmittel: Acetonitril : Wasser 50: 50 v/v

Testlösung (1,5 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze	Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,312 g (30 mg)
Wirkstoffgehalt pro Tablette: 15 mg	Volumen Lösungsmittel: 20 mL

Performancelösung (1,5 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL	Volumen Lösungsmittel: 20 mL
------------------------------	------------------------------

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Ph. Eur. 7.0 Monographie 7.0/2009:2338 für Mirtazapin [157]. Die Methodenparameter sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: *Methodenparameter der Mirtazapin LC-UV-Messungen*

## HPLC

Säule:	C18 250x4.6 mm, 5 µm (Alltech Associates)
Eluent (isokratisch):	THF : Methanol : Acetonitril: 18%ige Tetraammoniumhydroxidlösung pH 7,4 (eingestellt mit verd. Phosphorsäure)
Fluss:	1 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemp.:	40 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	240 nm und 190-600 nm

3.3.1.8 *Pipamperon*

Lösungsmittel: Acetonitril : Wasser 27:73 v/v

Testlösung (2 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten:	4 ganze bzw. 8 halbierte
Wirkstoffgehalt pro Tablette:	40 mg
Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff):	0,093 g (20 mg)
Volumen Lösungsmittel:	10 mL

Performancelösung (0,2 mg/L):

Äquivalent Testlösung:	5 µL
Volumen Lösungsmittel:	50 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Veröffentlichung von Trabelsi [184]. Abweichend zu der von Trabelsi beschriebenen Methode wurde hier auf die Verwendung von THF verzichtet, da durch die Verwendung von THF zu viele Verunreinigungen eingeschleppt wurden und der Eluent bereits eine deutliche Absorption zeigte. Stattdessen wurde der Acetonitrilanteil erhöht. Die Methodenparameter sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Methodenparameter der Pipamperon LC-UV-Messungen

HPLC	
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)
Eluent (isokratisch):	Acetonitril:Natriumdihydrogenphosphatlösung (50 mmol/L, eingestellt mit verd. Phosphorsäure auf pH 6,5) 27:73 v/v
Fluss:	170 µL/min*
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulentemp.:	30 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	246 nm und 190-600 nm

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

#### LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Natriumdihydrogenphosphatlösung durch eine Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Methodenparameter der Pipamperon LC-MS-Messungen

HPLC					
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)				
Eluent (isokratisch):	Acetonitril: Ammoniumformiat (50 mmol/L, eingestellt mit verd. Ammoniaklösung auf pH 6,5) 27:73 v/v				
Fluss:	170 µL/min*				
Injektionsvolumen:	20 µL				
Säulentemp.:	30 °C				
Probentemp.:	10 °C				
Detektion UV:	246 nm und 190-600 nm				
ESI-MS					
ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Zerstäubedruck:	13 psi
Massenbereich:	50 – 500 Da	Dry- Gasfluss:	7,8 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	376 m/z	Dry- Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

#### 3.3.1.9 Piracetam

Lösungsmittel: Acetonitril : Wasser 10:90 v/v

#### Testlösung (500 mg/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze bzw. 6 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 800 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,052 g (50 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 100 mL

#### Performancelösung (500 µg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Ph. Eur. 7.0 Monographie 01/2008:1733 für Piracetam [157]. Die Methodenparameter sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Methodenparameter der Piracetam LC-UV-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 250x4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ (Alltech Associates)
Eluent (isokratisch):	Acetonitril: $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (5,7 mmol/L, pH 6,0 eingestellt mit verd. $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 10:90 v/v
Fluss:	1 mL/min
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{L}$
Säulentemp.:	25 $^\circ\text{C}$
Probentemp.:	10 $^\circ\text{C}$
Detektion UV:	205 nm und 190-600 nm

LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Dikaliumhydrogenphosphatlösung durch eine leicht flüchtige Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Weiterhin wurde der Fluss nach Durchgang durch den UV-Detektor 1:1,2 gesplittet, so dass 400  $\mu\text{L}/\text{min}$  ins MS geleitet wurden. Die Methodenparameter sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Methodenparameter der Piracetam LC-MS-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 250x4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ (Alltech Associates)			
Eluent (isokratisch):	Acetonitril: Ammoniumformiatlösung (5,7 mmol/L, eingestellt mit verd. Ammoniaklösung auf pH 6,0) 10:90 v/v			
Fluss:	1 mL/min			
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{L}$			
Säulentemp.:	25 $^\circ\text{C}$			
Probentemp.:	10 $^\circ\text{C}$			
Detektion UV:	205 nm und 190-600 nm			

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 $\text{m/z s}^{-1}$	Zerstäuberdruck:	40 psi
Massenbereich:	50 – 400 Da	Dry- Gasfluss:	10,9 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	143 $\text{m/z}$	Dry- Gastemp.:	350 $^\circ\text{C}$	End Plate Offset:	0,5 kV

## 3.3.1.10 Primidon

Abweichung zum allgemeinen Protokoll: Das Tablettenpulver wurde nur in Methanol im Ultraschallbad suspendiert und anschließend mit Wasser aufgefüllt und gevortext.

Testlösung (1 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze bzw. 6 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 250 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,057 g (50 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 17,5 mL Methanol aufgefüllt auf  
 50 mL mit Wasser

Performancelösung (1 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 20 µL  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der Ph. Eur. 5.0 Monographie 01/2005:0584 für Primidon [180] und der USP 35 Monographie für Primidon bzw. Primidon Tabletten [165]. Abweichend zu der USP Vorschrift wurde hier auf die Verwendung von 0,5 % THF im Eluenten verzichtet, da durch die Verwendung von THF zu viele Verunreinigungen eingeschleppt wurden und der Eluent bereits eine deutliche Absorption zeigte. Die Methodenparameter sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Methodenparameter der Primidon LC-UV-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 µm (Kinetex, Phenomenex)
Eluent (isokratisch):	Methanol : Natriumdihydrogenphosphatlösung (50 mmol/L, eingestellt mit verd. Phosphorsäure auf pH 5,0) 35:65 v/v
Fluss:	553 µL/min*
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemp.:	25 °C
Probentemp.:	10 °C
Detektion UV:	220 nm, 215 nm und 190-600 nm

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Natriumdihydrogenphosphatlösung durch eine leicht flüchtige Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Methodenparameter der Primidon LC-MS-Messungen

## HPLC

Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 $\mu\text{m}$ (Kinetex, Phenomenex)
Eluent (isokratisch):	Methanol : Ammoniumformiatlösung (50 mmol/L, eingestellt mit verd. Ammoniaklösung auf pH 5,0) 35:65 v/v
Fluss:	553 $\mu\text{L}/\text{min}^*$
Injektionsvolumen:	10 $\mu\text{L}$
Säulentemp.:	25 $^{\circ}\text{C}$
Probentemp.:	10 $^{\circ}\text{C}$
Detektion UV:	220 nm, 215 nm und 190-600 nm

## ESI-MS

ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 $\text{m/z s}^{-1}$	Zerstäubedruck:	50 psi
Massenbereich:	50 – 500 Da	Dry- Gasfluss:	10,9 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV
Zielmasse:	250 $\text{m/z}$	Dry- Gastemp.:	350 $^{\circ}\text{C}$	End Plate Offset:	0,5 kV

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

## 3.3.1.11 Trazodon-Hydrochlorid

Lösungsmittel: Methanol : Wasser 75:25 v/v

Testlösung (0,5 g/L):

Anzahl verwendeter Tabletten: 3 ganze bzw. 6 halbierte  
 Wirkstoffgehalt pro Tablette: 100 mg  
 Einwaage Tablettenpulver (Wirkstoff): 0,060 g (10 mg)  
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

Performancelösung (0,5 mg/L):

Äquivalent Testlösung: 20  $\mu\text{L}$   
 Volumen Lösungsmittel: 20 mL

LC-UV Methode

Die verwendete Methode basiert auf der USP 35 Monographie für Trazodon Hydrochlorid Tabletten [165]. Aufgrund der veränderten Säulendimensionen musste hier nicht nur der Fluss angepasst werden, sondern auch der Gradient. Dies entspricht nicht mehr den zulässigen Änderungen nach USP. Die Methodenparameter sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Methodenparameter der Trazodon LC-UV-Messungen

HPLC							
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 $\mu\text{m}$ (Kinetex, Phenomenex)						
Eluent A:	Methanol						
Eluent B:	10 mM Ammoniumdihydrogenphosphatlösung in Wasser (pH 6,0 eingestellt mit verd. Phosphorsäure bzw. verd. Ammoniaklösung)						
Gradient:	Zeit [min]	0	1,5	10	12	13	20
	Eluent A [%]	35	35	65	65	35	35
Fluss:	1 mL/min*						
Injektionsvolumen:	4 $\mu\text{L}$						
Säulentemp.:	30 °C						
Probentemp.:	10 °C						
Detektion UV:	246 nm, 254 nm und 190-600 nm						

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

#### LC-UV/ESI-MS Methode

Um eine MS gängige Methode zu erhalten, wurde die Ammoniumdihydrogenphosphatlösung durch eine leicht flüchtige Ammoniumformiatlösung gleicher Konzentration ersetzt. Der Fluss wurde nach Durchgang durch den UV-Detektor 1:1 gesplittet, so dass 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  ins MS geleitet wurden. Die Methodenparameter sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Methodenparameter der Trazodon LC-MS-Messungen

HPLC							
Säule:	C18 100x3,0 mm, 2,7 $\mu\text{m}$ (Kinetex, Phenomenex)						
Eluent A:	Acetonitril						
Eluent B:	10 mM Ammoniumformiat in Wasser (pH 6,0 mit verd. Ameisensäure bzw. verd. Ammoniaklösung eingestellt)						
Gradient:	Zeit [min]	0	1,5	10	12	13	20
	Eluent B [%]	35	35	65	65	35	35
Fluss:	1 mL/min*						
Injektionsvolumen:	4 $\mu\text{L}$						
Säulentemp.:	30 °C						
Probentemp.:	10 °C						
Detektion UV:	246 nm, 254 nm und 190-600 nm						
ESI-MS							
ESI Modus:	Positive	Scan-Rate:	8100 $\text{m/z s}^{-1}$	Zerstäuberdruck:	44 psi		
Massenbereich:	50 – 750 Da	Dry- Gasfluss:	10,6 L/min	Kapillarspannung:	4,5 kV		
Zielmasse:	372 $\text{m/z}$	Dry- Gastemp.:	350 °C	End Plate Offset:	0,5 kV		

\*Der Fluss wurde mittels Gleichung (14) an die veränderten Säulendimensionen angepasst

### 3.3.2 Untersuchungen mit DIP-APCI oder DIP-EESI

#### 3.3.2.1 *Probenvorbereitung*

##### Herstellung der Standardlösungen

Für die Entwicklung und Optimierung der DIP-EESI-Ionenquelle wurden 20 mg/L Koffein und Kampfer Standards in Methanol verwendet, die aus einer 1 g/L Stammlösung in Methanol hergestellt wurden. Zur Charakterisierung der DIP-EESI wurden Koffein-Standards im Konzentrationsbereich von 1 – 500 mg/L, Kampfer- und Colchicin-Standards im Konzentrationsbereich von 0,5 – 200 mg/L verwendet. Diese wurden ebenfalls durch Verdünnen der jeweiligen 1 g/L Stammlösung in Methanol hergestellt.

##### Probenvorbereitung für die Analyse ganzer Tabletten

Für die Analyse von Tablettenpulver wurde je Wirkstoff eine Tablette gemörsert. 0,1 mg des Tablettenpulvers wurden in den Tiegel der DIP eingewogen und anschließend mit DIP-APCI analysiert.

Die Testlösungen der einzelnen Arzneimittel wurden nach folgendem Protokoll zubereitet. Die verwendeten Einwaagen, Verdünnungen und Endkonzentrationen der Lösungen sind Tabelle 20 zu entnehmen.

##### Herstellung der Testlösung

3 ganze Tabletten bzw. 6 halbierte Tabletten wurden gewogen und aus ihnen ein Mischmuster hergestellt. Dazu wurden die Tabletten fein gemörsert. Ein Äquivalent des Tablettenpulvers wurde genau eingewogen und in einem bestimmten Volumen Methanol<sup>3</sup> für 30 min im Ultraschallbad suspendiert. Anschließend wurden 1,5 mL der Suspension zentrifugiert und ein Äquivalent des Zentrifugats auf die Zielkonzentration mit demselben Lösungsmittel verdünnt. 1 µL der Lösung wurde anschließend mit DIP-APCI-MS oder DIP-EESI-MS analysiert.

Die hergestellten Lösungen wurden jeweils als Sechsfach-Bestimmung untersucht. Eventuelle Ausreißer wurden mittels Ausreißertest nach Dixon ermittelt, so dass einzelne Analysen mit  $n = 5$  statt  $n = 6$  durchgeführt wurden. Wurden mehr als ein Ausreißer ermittelt wurde die Analyse wiederholt.

---

<sup>3</sup> Für Midodrin wurde Wasser und für Piracetam Acetonitril verwendet, aufgrund der besseren Löslichkeit.

Tabelle 20: Einwaagen (EW), Verdünnungen und Endkonzentrationen der verwendeten Tabletten-Lösungen für die DIP-APCI und DIP-EESI-Messungen

Wirkstoff	Soll-Einwaagen	DIP-APCI- Messungen		DIP-EESI- Messungen	
	Tablettenpulver (Wirkstoff)	Verdünnung	c (Tablette) (c (Wirkstoff))	Verdünnung	c (Tablette) (c (Wirkstoff))
<b>Amlodipin</b>	0,400 g (12,3 mg)	EW/ 5 mL → 0,2 mL/1 mL	16 g/L (0,49 g/L)	EW/5 mL → 0,4 mL/1 mL	32 g/L (0,74 g/L)
<b>Clonazepam</b>	0,750 g <sup>1</sup> (2,5 mg) <sup>1</sup> 0,600 g <sup>2</sup> (2,0 mg) <sup>2</sup>	EW/5 mL → 0,4 mL/ 1mL	30 g/L (0,10 g/L)	EW/5 mL	60 g/L (0,20 g/L)
<b>HCT</b>	0,080 g (12,5 mg)	EW/5 mL → 0,2 mL/1 mL	3,2 g/L (0,49 g/L)	EW/5 mL → 0,6 mL/1 mL	9,6 g/L (1,48 g/L)
<b>Irbesartan*</b>	0,171 g <sup>1</sup> (100 mg) <sup>1</sup> 0,400 g <sup>2</sup> (230 mg) <sup>2</sup>	EW/5 mL → 0,2 mL/10 mL	0,7 g/L (0,39 g/L)	EW/5 mL → 0,15 mL/10 mL	1,2 g/L (0,68 mg/L)
<b>Metoprolol</b>	0,06 g (24 mg)	EW/10 mL → 0,2 mL/1 mL	1,2 g/L (0,48 g/L)	EW/10 mL → 0,2 mL/1 mL	1,2 g/L (0,48 g/L)
<b>Midodrin</b>	0,21 g (4 mg)	EW /5 mL → 0,5 mL/ 1 mL	21,0 g/L (0,40 g/L)	EW /5 mL	42,0 g/L (0,80 g/L)
<b>Mirtazapin</b>	0,125 g (12,5 mg)	EW /5 mL → 0,2 mL//1 mL	5,0 g/L (0,50 g/L)	EW /5 mL → 0,8 mL/1 mL	20,0 g/L (1,98 g/L)
<b>Pipamperon</b>	0,040 g (8,5 mg)	EW /5 mL → 1,0 mL/ 10 mL	0,8 g/L (0,17 g/L)	EW /5 mL → 1,0 mL/ 10 mL	0,8 g/L (0,17 g/L)
<b>Piracetam</b>	0,083 g (80 mg)	EW /10 mL → 0,1 mL/1 mL	0,8 g/L (0,80 g/L)	EW /10 mL → 0,2 mL/1 mL	1,6 g/L (1,54 g/L)
<b>Primidon</b>	0,2 g (176 mg)	EW /10 mL → 0,1 mL/1 mL	0,2 g/L (0,19 g/L)	EW /10 mL → 0,5 mL/1 mL	1,0 g/L (0,88 g/L)
<b>Trazodon</b>	0,12 g (20 mg)	EW /5 mL → 0,25 mL/ 1 mL	6,0 g/L (1,00 g/L)	EW /5 mL → 0,25 mL/ 1 mL	6,0 g/L (1,00 g/L)

\* Kombi-Präparat mit Hydrochlorothiazid, HCT wurde hier nicht untersucht. <sup>1</sup> DIP-APCI-Messungen; <sup>2</sup> DIP-EESI-Messungen

### 3.3.2.2 Parameter der DIP-APCI-MS Analysen

Die Untersuchungen mit der DIP-APCI wurden mit der von Krieger et al. [143] entwickelten Ionenquelle mit den in Tabelle 21 angegebenen Parametern durchgeführt.

Tabelle 21: Parameter für die DIP-APCI-Messungen gemäß Krieger et al. [143]

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Injektionsvolumen	1 $\mu$ L	Hilfsgasfluss	120 L/h
Ionisationsmodus	Positiv	Vaporizer-Gasfluss	30 psi
max. Massenbereich	50-1000 m/z	Vaporizer-Temp.	300 °C
Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	Kapillarspannung	4,5 kV
Dry-Gasfluss	1,3 L/h	End Plate Offset	0,5 kV
Dry-Gastemp.	250 °C		

Der oben genannte Hilfsgasfluss wurde bei den DIP-APCI-Messungen zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe eines Schwebekörper-Durchflussmessers der Firma Krohne (Duisburg, Deutschland), später mit Hilfe eines Massendurchflussreglers der Firma Aalborg Instruments & Controls Inc. (New York, USA), geregelt. Das Injektionsvolumen wurde über eine 5- $\mu$ L-Hamiltonspritze in den DIP-Tiegel gefüllt. Alle anderen in Tabelle 21 angegebenen Parameter wurden über die Bruker Software Compass eingestellt. Weitere Einstellungen der Ionenfalle sind Tabelle 22 zu entnehmen. Diese Einstellungen wurden auch bei den DIP-EESI-Messungen und HPLC-ESI-Messungen nicht verändert.

Tabelle 22: Weitere Parameter der Ionenfalle

Parameter	Einstellung
Mass Range Modus	Enhanced Resolution
Beladung der Ion Trap	Steuerung über ICC ( <i>Ion charge control</i> )
Zielwert (ICC)	200 000
Akkumulationszeit (ICC)	100 ms
Anzahl gemittelter Spektren	10
Steuerung des Ionentransfers von der Quelle zu Fall	<i>Smart parameter setting</i> (SPS) (optimiert automatisch den Ionentransfer im Bereich der gewählten Zielmasse)
Zielmasse (SPS)	Jeweils die Masse des [M+H] <sup>+</sup> des Wirkstoffes (bei gezielten Untersuchungen einer Verunreinigung die Masse der Verunreinigung)

## 3.3.2.3 Parameter der DIP-EESI-MS Analysen

Im Laufe der Entwicklung, Optimierung und Charakterisierung der DIP-EESI-Ionenquelle wurden unterschiedliche Parameter verwendet, die z.T. in Kapitel 4.2 wiedergegeben sind.

Unter optimalen Bedingungen wurde die DIP-EESI-Ionenquelle mit den in Tabelle 23 zusammengefassten Parametern betrieben.

Tabelle 23: Parameter für die DIP-EESI-Messungen z.T. veröffentlicht von Lenzen et al. [176]

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Injektionsvolumen	1 $\mu\text{L}$	Kapillarspannung	1250 V
Ionisationsmodus	Positiv / Negativ*	End Plate Offset	500 V
max. Massenbereich	50-1000 m/z	ESI-Tip-Position	x: 27,5 mm z: 18 mm
Scan-Rate:	8100 m/z s <sup>-1</sup>	ESI-Fluss	7,5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Dry-Gasfluss	3,5 L/h	ESI-Spray-Zusammensetzung	Methanol : Wasser 50:50 v/v mit 1% Ameisensäure
Dry-Gastemp.	350 °C	Zerstäuberdruck	20 psi
Hilfsgasfluss	100 L/h		

\* nur für die HCT-Messungen verwendet

Der oben genannte Hilfsgasfluss wurde bei den DIP-EESI-Messungen ausschließlich mit Hilfe des Massendurchflussreglers der Firma Aalborg Instruments & Controls Inc. (New York, USA) geregelt. Das Injektionsvolumen wurde auch hier über eine 5- $\mu\text{L}$ -Hamiltonspritze in den DIP-Tiegel gefüllt. Alle anderen in Tabelle 23 angegebenen Parameter wurden über die Bruker Software Compass eingestellt. Weitere Einstellungen der Ionenfalle wurden bereits in Tabelle 22 beschrieben.

## 3.3.2.4 DIP-Methoden

Die Steuerung der DIP erfolgte über einen manuellen Controller der Firma SIM (Oberhausen, Deutschland). Es wurden verschiedenen Temperaturprogramme verwendet, die in Tabelle 24 zusammengefasst sind.

Tabelle 24: Temperaturgradienten der DIP-APCI und DIP-EESI-Messungen

Methode \ Parameter	1	1a	1b	2	3	4	5	6	6a
Starttemperatur	40 °C	40 °C	40 °C	30 °C	40 °C	60 °C	30 °C	40 °C	40 °C
Haltezeit	0,1 min	0,1 min	0,1 min	0 min	0 min	0 min	0,1 min	0,1 min	0,1 min
Endtemperatur	400 °C	300 °C	150 °C	400 °C	400 °C				
Heizrata	2,0 °/s	2,0 °/s	2,0 °/s	2,9 °/s	2,9 °/s	2,0 °/s	2,0 °/s	1,0 °/s	1,0 °/s
Haltezeit	1 min	3 min	5 min	1 min	1,5 min	1 min	0 min	1 min	4 min
Messzeit	5 min	5 min	5 min	4 min	5 min	4 min	1,5 min	10 min	10 min

Methode 1 wurde als Standardmethode verwendet und diente als Ausgangspunkt für die folgenden Variationen. Soweit nichts anderes angegeben ist, wurde immer diese Methode verwendet. Methode 1a und 1b unterscheiden sich nur in der Länge der Haltezeit. Diese wurde zum Ausheizen der DIP verlängert, um mögliche Verschleppungen, die bei der Analyse von Midodrin und Irbesartan mit DIP-APCI beobachtet wurden, zu minimieren.

Methode 2 wurde für die Analyse vom Amlodipin mit DIP-EESI und Methode 3 für die Analyse von HCT und Irbesartan mit DIP-EESI eingesetzt. Für die Bestimmung der analytischen Grenzen der DIP-EESI wurde Methode 4 mit Colchicin und Methode 5 mit Kampfer verwendet. Methode 5 wurde ebenfalls für die iterative Optimierung der DIP-EESI eingesetzt.

Die Methoden 6 und 6a wurden genutzt, um ggf. eine bessere Trennung zwischen dem Wirkstoff und den Hilfsstoffen bzw. Verunreinigungen zu ermöglichen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse (Kapitel 4.2 Entwicklung und Optimierung, Kapitel 4.3 Analytische Grenzen und Kapitel 4.4.2.2 Piracetam) wurden bereits veröffentlicht (Lenzen, C.; Winterfeld, G. A.; Schmitz, O. J.; Comparison of piracetam measured with HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS, DIP-APCI-MS, and a newly developed and optimized DIP-ESI-MS Anal Bioanal Chem, 408 (2016) 4103–4110.).

### 4.1 Funktionsweise der DIP-EESI

Die Analyten, die aus dem Tiegel der DIP verdampfen, werden mit Hilfe eines Stickstoffstroms Richtung MS-Inlet transportiert. Auf dem Weg zum MS-Inlet durchqueren sie das ESI-Spray, in dem sie gemäß dem EESI-Mechanismus durch Flüssigphasen-Wechselwirkungen zwischen den neutralen Analyt-Tröpfchen oder Partikeln und den geladenen Elektrospray-Tröpfchen ionisiert werden.

### 4.2 Entwicklung und Optimierung

Für die Entwicklung der DIP-EESI wurde der APCI-Verdampfer der DIP-APCI Quelle durch den ESI-Sprayer der *Appoll II ESI Source* der Firma Bruker ersetzt. Das ESI-Spray und der Transport der Analyten von der DIP zum MS wird potentiell von folgenden Parametern beeinflusst:

- der Position der DIP bzw. der Abstand zwischen DIP-Spitze und ESI-Spray bzw. MS-Einlass
- der Position des ESI-Sprayers
- den Gasflüssen
- dem Lösungsmittelfluss
- der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches für das ESI-Spray
- der Dry-Gas-Temperatur
- der angelegten Spannung

Da es sich bei der DIP um ein kommerziell erwerbbares Produkt handelt, konnte die Länge der Schubstange nicht verändert werden. Die kürzeste Distanz zwischen DIP-Spitze und MS-Einlass konnte nur auf 6 cm eingestellt werden. Da nicht davon auszugehen war, dass eine Vergrößerung des Abstandes zu einer Verbesserung der Ergebnisse führte, wurde dieser Abstand konstant gehalten.

Die Position des Sprayers konnte durch einen x-Achsen-Positionierer zwischen MS-Inlet und DIP-Spitze variiert werden. Der Abstand konnte zwischen 27,5 und 43 mm in 0,1-mm-Schritten in Bezug auf das Spray-Shield des MS justiert werden. Um den Abstand des Sprayers in z-Position zu variieren, wurden 2 mm dicke Metallscheiben angefertigt, die unter die Halterung des Sprayers montiert werden konnten. Hierdurch war es möglich, den Abstand zwischen der ESI-Kapillare und der Mitte des MS-Inlets zwischen 6 und 20 mm zu variieren (Abb. 15).

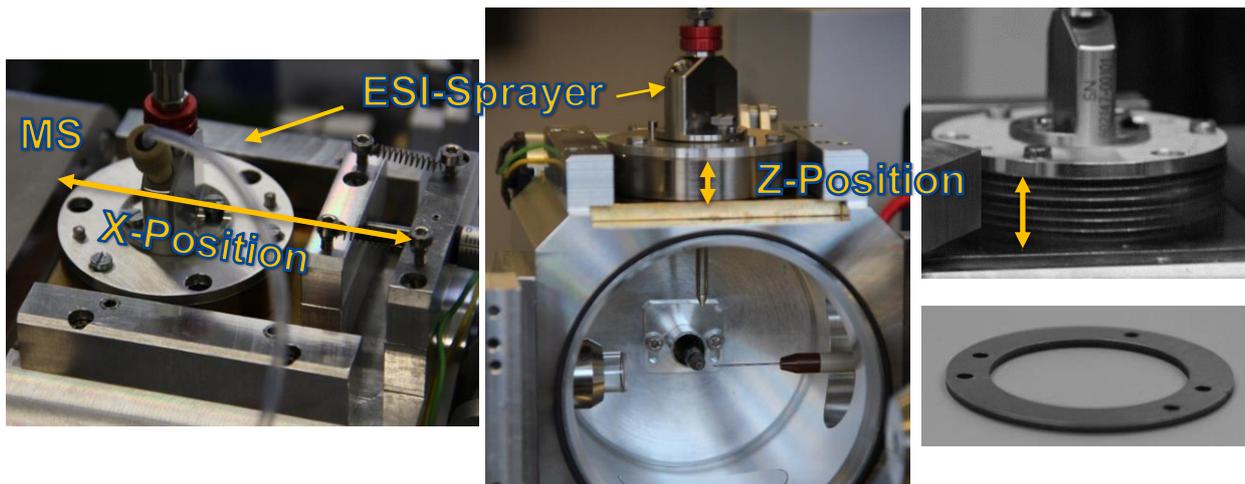


Abb. 15: Links: Positionierung des ESI-Sprayers in x-Richtung, Mitte: Positionierung in z-Richtung mit Hilfe von Metallscheiben (rechts), die unter den Sprayer montiert wurden. Rechts unten einzelne Metallscheibe.

Die DIP-EESI-Quelle wird von mehreren Gasen durchströmt (Abb. 16). Dies sind:

- Das Hilfsgas, das um die Schubstange der DIP strömt und den Analyten zum MS geleitet. Das Hilfsgas konnte zwischen 60 und 180 L/h variiert werden.
- Das Zerstäubergas, das zur Erzeugung des Sprays verwendet wurde, konnte zwischen 10 und 80 psi variiert werden.
- Das sogenannte Dry-Gas, das vom MS dem Analyten und dem ESI-Spray entgegenwirkt, da es verhindern soll, dass Flüssigkeitströpfchen in das MS gelangen. Der Dry-Gasfluss wurde in Abhängigkeit mit dem Fluss des ESI-Sprays, gemäß Herstellerangaben, zwischen 6 und 12 L/min variiert und stellt hier keine eigenständige Größe dar. Zusätzlich konnte die Dry-Gas-Temperatur zwischen 200 und 350 °C variiert werden.

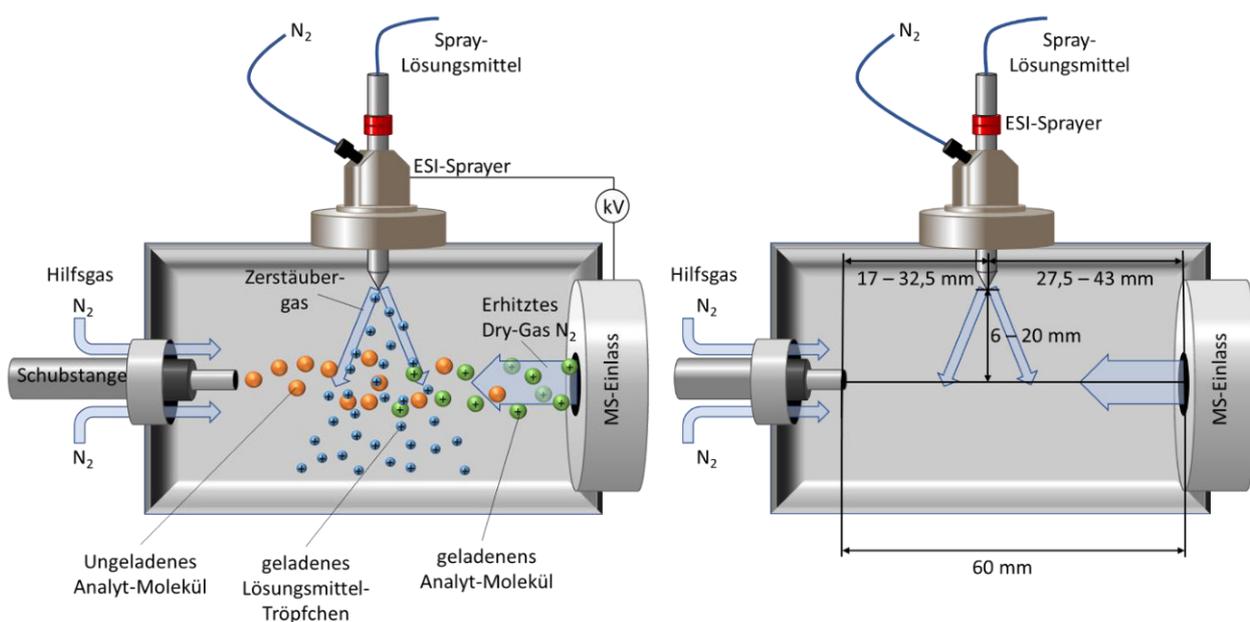


Abb. 16: Schematische Darstellung der DIP-EESI

Der Lösungsmittelfluss des ESI-Sprays wurde in zwei Schritten optimiert. Während der ersten Optimierung wurde der Fluss mit Hilfe einer HPLC-Pumpe bereitgestellt. Hier konnte der Fluss nur bis zu 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  reduziert werden und wurde daher zwischen 50 und 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  variiert. Diese „hohen“ Flüsse bis 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  verursachten während der Optimierung jedoch schwere Probleme, die weiter unten in diesem Kapitel erläutert werden. Daher wurde in einem zweiten Schritt das Lösungsmittel mit Hilfe einer Spritzenpumpe zugegeben, wodurch Flüsse zwischen 5 und 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  realisiert werden konnten.

Die Dry-Gastemperatur wurde aufgrund der Herstellerangaben für Flüsse > 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  nur an der oberen Grenze der möglichen Temperatur zwischen 200 und 350  $^{\circ}\text{C}$  variiert. Die Kapillarspannung wurde zwischen 500 und 4500 V variiert. Als ESI-Spray-Lösungsmittel wurde eine Mischung aus Wasser und Methanol zu gleichen Teilen verwendet, die mit Ameisensäure versetzt wurde. Die Formiatkonzentration des Sprays wurde zwischen 0,1 und 1% variiert und die optimale Konzentration für die verwendeten zwei Modellsubstanzen Koffein und Kampfer bestimmt.

Viele Parameter üben gegenseitig Einfluss aufeinander aus. So wird beispielsweise die Tröpfchengröße des pneumatischen ESI-Sprays durch die Temperatur, den Flüssigkeitsstrom, den Zerstäubendruck und die angelegte Spannung beeinflusst. Die erste Optimierung wurde deshalb mit Hilfe des Programms Minitab<sup>®</sup> 17 durchgeführt. Dieses Programm bietet die Möglichkeit faktorielle Versuchspläne zu erstellen und anschließend die Bewertung des faktoriellen Designs durchzuführen. Mit diesem Programm war es möglich, maximal fünf Parameter gleichzeitig zu optimieren.

Zunächst wurden acht Parameter (Position in x- und z-Richtung, Hilfsgasfluss, Zerstäubendruck, ESI-Spray-Fluss mit dazu gehörigem Dry-Gasfluss, Dry-Gas-Temperatur, Formiatkonzentration) mit Hilfe von drei faktoriellen Versuchsplänen, bei denen zwei Parameter konstant gehalten wurden, optimiert.

Der 1. Versuchsplan umfasste den Hilfsgasfluss, den Zerstäubendruck, den ESI-Spray-Fluss, die Position in x-Richtung und die Dry-Gas-Temperatur. Die Formiatkonzentration (1,0 %) und die z-Position (18,5 mm) wurden konstant gehalten. Hierbei wurde festgestellt, dass das Signal der Modellsubstanz umso intensiver war, je größer die Dry-Gastemperatur war (Abb. 17 e)). Daher wurde im 2. Versuchsplan die Dry-Gastemperatur auf 350 $^{\circ}\text{C}$ , dem höchsten Niveau eingestellt und weiterhin die z-Position konstant

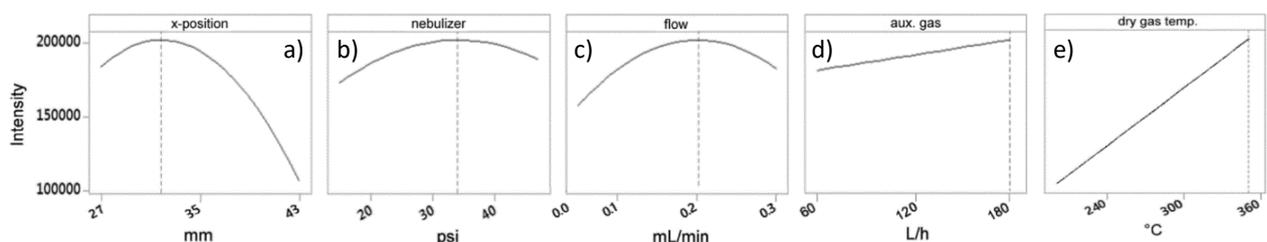


Abb. 17: Simulierte Kurven des Programms Minitap<sup>®</sup>17 für die optimierten Parameter im 1. Versuchsplan a) Position in x-Richtung (zwischen dem MS-Einlass und der Oberseite der Schubstange, Bereich: 27,5 – 43 mm optimierter Wert: 32 mm), b) Zerstäubendruck (Bereich: 10- 80 psi optimierter Wert: 34 psi), c) ESI-Spray-Fluss (Bereich: 0,05 – 0,3 mL/min optimierter Wert: 0,2 mL/min), d) Hilfsgasfluss (Bereich: 60-180 L/h optimierter Wert: 180 L/h), e) Dry-Gas-Temperatur (Bereich: 200- 350  $^{\circ}\text{C}$  optimierter Wert: 350  $^{\circ}\text{C}$ )

gehalten. Bei der Untersuchung der Parameter Hilfsgasfluss, Zerstäubergasdruck, ESI-Spray-Fluss, Position in x-Richtung und Formiatkonzentration wurde festgestellt, dass das Optimum der Formiatkonzentration bei ca. 0,9 % liegt (Abb. 18 a)). Da im Bereich zwischen 0,8 und 1,0% der Formiatgehalt nur wenig Einfluss auf die Intensität der Modellsubstanz hat, wurde weiter mit einer Formiatkonzentration von 1,0 % gearbeitet. Im Vergleich zum 1. Versuchsplan wurde für die Position des Sprayers in x-Richtung, den Zerstäuberdruk und den Fluss jeweils kleinere Werte ermittelt, wie man in Abb. 18 c) – e) sieht.

Im 3. Versuchsplan wurde die Formiatkonzentration bei 1,0 % und, wie auch im 2. Versuchsplan, die Dry-Gas-Temperatur auf 350 °C konstant gehalten. Hilfsgasfluss, Zerstäuberdruk, ESI-Spray-Fluss, die Position in x- und z-Richtung wurden variiert. Für den Hilfsgasfluss, Zerstäuberdruk, ESI-Spray-Fluss und die Position in x-Richtung konnten keine signifikanten Änderungen zwischen 2. und 3. Versuchsplan beobachtet werden. Daher werden diese Daten nicht gezeigt. Die Ergebnisse der Optimierung der z-Position ist in Abb. 18 f) dargestellt.

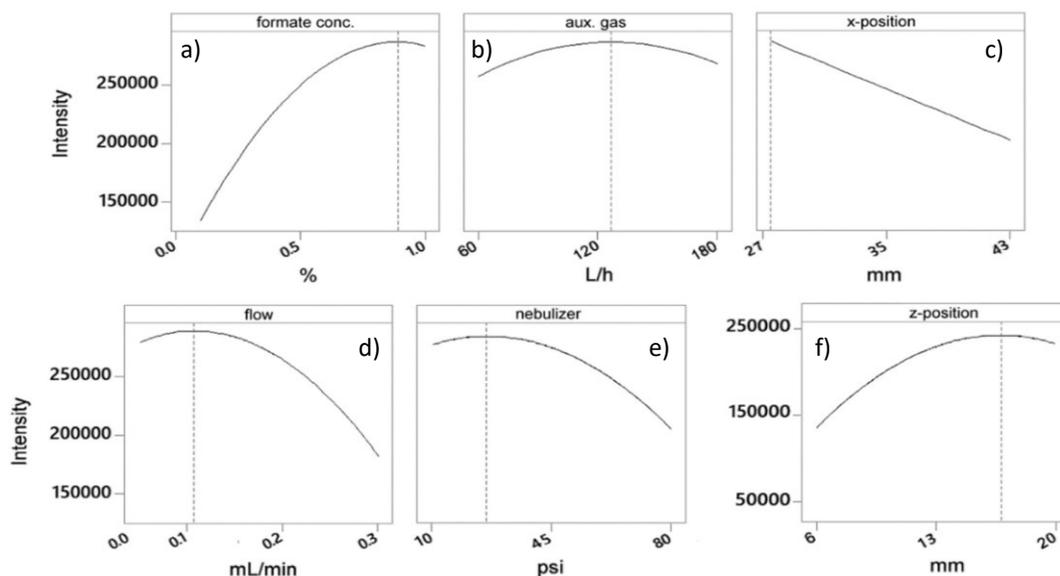


Abb. 18: Simulierte Kurven des Programms Minitap®17 für die optimierten Parameter im 2. Versuchsplan a) Formiatkonzentration (Bereich: 0,1- 1,0 % optimierter Wert: 0,9%), b) Hilfsgasfluss (Bereich: 60-180 L/h optimierter Wert: 125 L/h), c) Position in x-Richtung (zwischen dem MS-Einlass und der Oberseite der Schubstange, Bereich: 27,5 – 43 mm optimierter Wert: 27,5 mm), d) ESI-Spray-Fluss (Bereich: 0,05 – 0,3 mL/min optimierter Wert: 0,1 mL/min), e) Zerstäubergasdruck (Bereich: 10- 80 psi optimierter Wert: 26 psi), f) Position in z-Richtung (Abstand zum oberen Ende der Schubstange, Bereich: 6 – 20 mm optimierter Wert: 18 mm) aus dem 3. Versuchsplan

Abschließend wurde nach den drei faktoriellen Designs folgende optimalen Parameter ermittelt:

x-Position	27,5 mm	ESI-Fluss	100 µL/min
z-Position	18 mm	Dry-Gasfluss (ESI-Fluss abhängig)	6,9 L/min
Hilfsgasfluss	125 L/h	Dry-Gas-Temperatur	350 °C
Zerstäubergasdruck	26 psi	Formiatkonzentration	1,0 %

Nach dieser ersten Optimierung musste festgestellt werden, dass mit den Parametern nicht gearbeitet werden konnte, da sich nach nur fünf Tagen in der kompletten Quelle auf allen Aluminiumbauteilen ein weiß-beige farbiger Belag gebildet hatte, der sich nicht lösen ließ und nur mechanisch entfernt werden konnte. Vermutlich handelt es sich bei diesem Belag um Aluminiumoxid, das sich durch die Einwirkung des formiathaltigen ESI-Sprays auf die Aluminiumbauteile und den hohen Temperaturen in der Quelle gebildet hatte [185, 186].

Die naheliegende Lösung war, einen Abfluss zu konstruieren, der dem überschüssigen Spray erlaubt abzufließen. Der Abfluss wurde im Boden des Quellgehäuses platziert und enthielt einen Flansch mit ca. 3 cm Durchmesser, an den ein Abflussschlauch befestigt werden konnte. Der Abflussschlauch wurde in ein Sammelgefäß geleitet, das an der Laborluftabsaugung angeschlossen war. Da die Laborabsaugung einen zu starken Unterdruck aufwies, wurde das Sammelgefäß nicht vollständig verschlossen, da ansonsten Störungen in der Quelle und ein drastischer Signalabfall auftraten (Abb. 19).

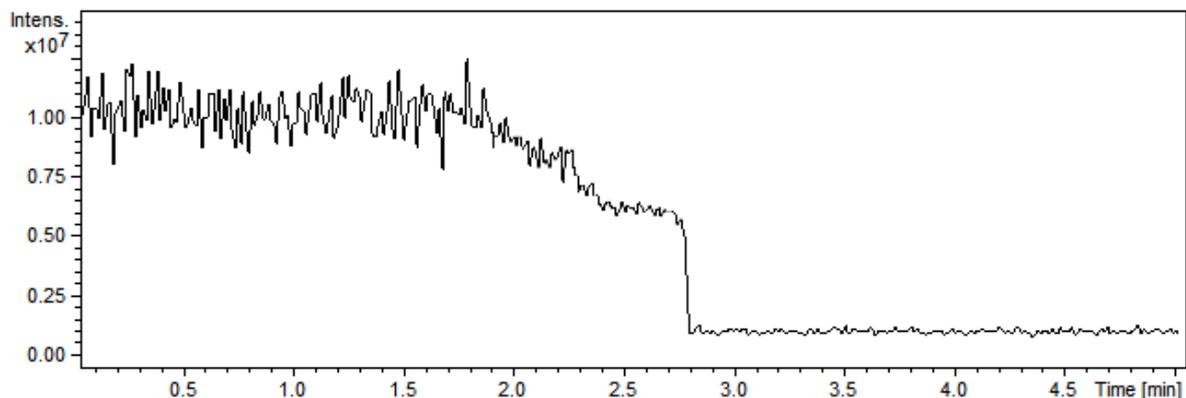


Abb. 19: Signalverlust hervorgerufen durch Verschließen des Abfallsammelgefäßes, das zwischen Laborabsaugung und Ionenquelle eingebaut war.

Zusätzlich wurde getestet, ob es möglich ist, den ESI-Fluss weiter zu minimieren, um weniger reaktives Spray in die Quelle gelangen zu lassen. Neben der Beschädigung der Quelle, sollte so auch der Eintrag möglicher Störsignale aus dem Spray minimiert werden. Bereits ein erster Versuch zeigte, dass eine weitere Verringerung des ESI-Spray-Flusses möglich ist, und dass der von Minitap ermittelte optimale Fluss von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  wahrscheinlich eher von der verwendeten HPLC-Anlage beeinflusst wurde, als von der Ionenquelle. Die verwendete HPLC-Anlage war nur für einen Bereich von 50 – 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  ausgelegt. Aufgrund des niedrigen Flusses, konnten Druckschwankungen der HPLC im Verlauf des Chromatogramms beobachtet werden, wodurch die Messungen beeinflusst wurden (Abb. 20). Trotzdem wurden kleinere Flüsse von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit der HPLC für einen ersten Versuch getestet und starke Schwankungen der Ergebnisse in Kauf genommen. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, konnte eine Intensitätszunahme von fast 400% durch Reduktion des Flusses von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  erzielt werden.

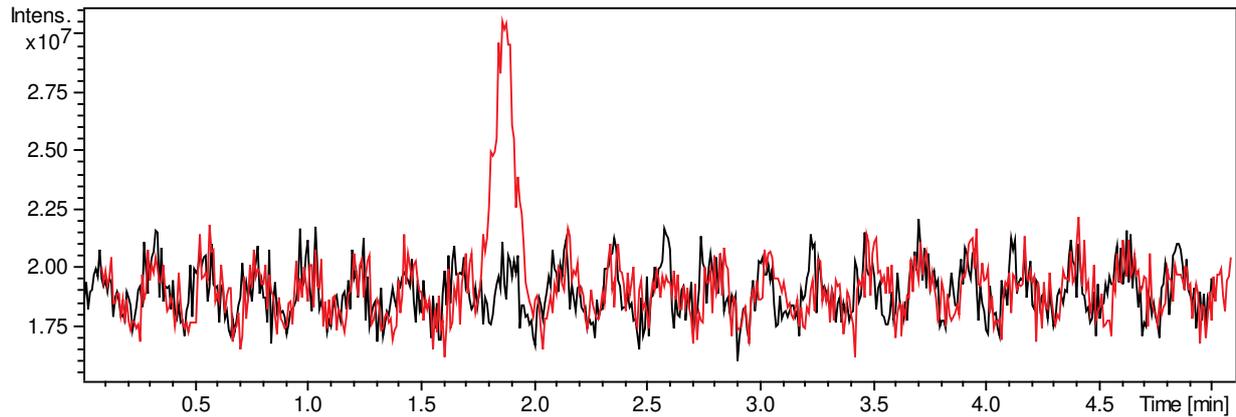


Abb. 20: Overlay-Chromatogramm eines Blanks (schwarz) und einer 25 mg/mL Koffeinlösung (rot) analysiert mit DIP-EESI. Das ESI-Spray wurde mit der HPLC mit einem Fluss von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  gefördert. Die Druckimpulse, die von der HPLC verursacht werden sind deutlich zu sehen.

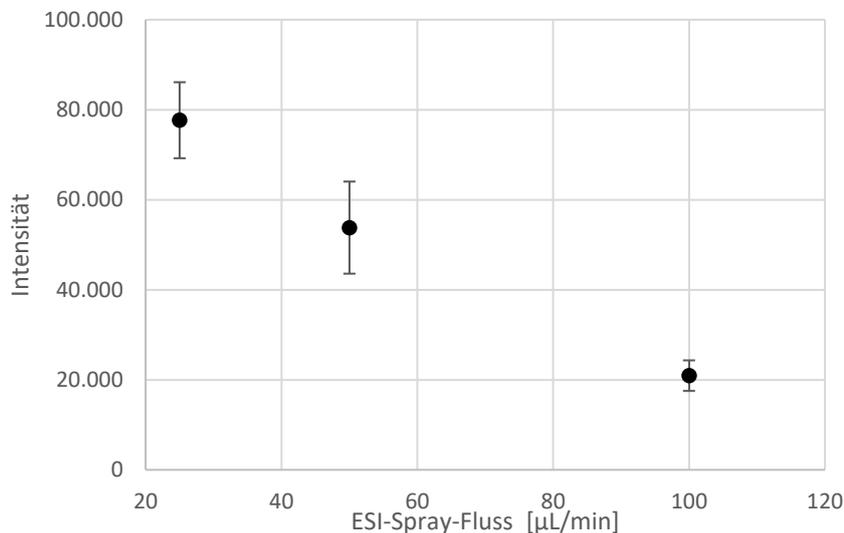


Abb. 21: Einfluss von kleineren Flussraten auf die Signalintensität des Kampfer-Signals. Getestet wurden die Flussraten 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit der HPLC. Die größere Schwankung der Messpunkte bei kleineren Flussraten kommt wahrscheinlich durch die nicht reproduzierbaren HPLC-Bedingungen zustande.

Da kein „konstanter“ Fluss von der HPLC in diesem Bereich geliefert werden konnte, wurde für weitere Optimierungsexperimente der Fluss über eine Spritzenpumpe zur Verfügung gestellt, die über die Bruker Software gesteuert werden konnte. Das maximale Volumen der Spritze betrug 2500  $\mu\text{L}$ . Aufgrund des begrenzten Lösungsmittelvolumens konnten keine großen faktoriellen Versuchspläne, wie sie mit Minitab geplant worden sind, mehr umgesetzt werden, da es bei jedem neuen Füllen der Spritze zu einer Änderung der Intensitäten kommen konnte. Die Minitab Versuchspläne dauerten bei einer Messzeit von ca. 5 min pro Messpunkt etwa 8 h. Das bedeutet, dass bei einem ESI-Fluss von 25  $\mu\text{L}/\text{h}$  die Spritze mindestens 5mal neu gefüllt werden muss. Aufgrund der Änderungen konnte Minitab die Daten nicht mehr korrekt interpretieren, da das Programm nicht erkennen konnte, ob diese Änderungen aus dem

Nachfüllen der Spritze herrührten oder ob es sich um eine echte Intensitätsänderung handelte. Ein Beispiel dieser Änderungen für zwei Messpunkte ( $n=3$ ) mit drei Spritzenfüllungen ist in Abb. 22 dargestellt.

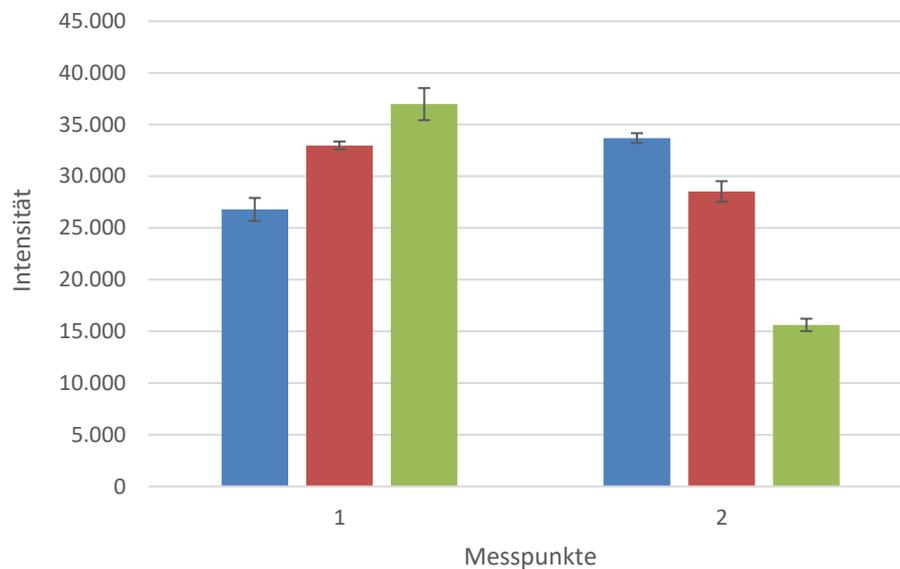


Abb. 22: Beispiele für die Änderung der mittleren Intensität ( $n=3$ ) durch Neufüllen der Spritze; gezeigt an zwei Messpunkten (1 und 2) für drei Spritzenfüllungen (blau, grün und rot)

Der Gedanke, den Fluss weiter über die HPLC bereitzustellen, wurde verworfen. In diesem Fall hätte ein druckschwankungsfreier Fluss von z.B.  $500 \mu\text{L}/\text{min}$  eingestellt werden müssen und der Versuchsaufbau hätte wie folgt ausgesehen (Abb. 23): Zwischen HPLC und ESI-Sprayer wäre eine Kapillare konstanter Länge angeschlossen worden. Aufgrund der Geräteanordnung ist die Änderung der Länge dieser Kapillare nur schwer zu bewerkstelligen, da die Kapillare fest mit der HPLC und fest mit dem ESI-Sprayer verschraubt ist. Hinzu kommt, dass die kürzeste Strecke zwischen HPLC-Pumpe und ESI-Sprayer ca. 1 m beträgt. Es hätten höchstens längere Kapillaren eingebaut werden können.

Über ein T-Stück würde eine zweite Kapillare an die HPLC angeschlossen, die den Fluss teilt, so dass bei einem 1:1 Splitt nur die Hälfte an Lösungsmittel zum ESI-Sprayer befördert wird. Diese Kapillare ließe sich problemlos kürzen.

Da der Rückdruck des ESI-Sprayers nicht bekannt ist, müsste für jede Flussrate die Länge der zweiten Kapillare experimentell bestimmt werden. Das bedeutet, dass z.B. eine Kapillare von ca. 25 cm Länge stückchenweise hätte gekürzt und die Flussrate bestimmt werden müssen, bis der korrekte Rückdruck bzw. Fluss eingestellt worden wäre. Vor allem für kleine Flüsse müsste die Kürzung millimetergenau erfolgen, da z.B. 1 mm Änderung bereits einen Fehler von ca. 7 % bei einer Flussrate von  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  ausmacht. Hinzu kommt, dass der Rückdruck des ESI-Sprayers abhängig vom Zerstäubergasfluss und der anliegenden Spannung ist. Daher hätte die Justierung der Kapillarlänge bei eingeschaltetem ESI-Sprayer direkt am MS erfolgen müssen. Für die hier überprüften Flussraten hätten mehr als sieben Kapillaren angefertigt werden müssen. Daher war der materielle und zeitliche Aufwand zu hoch.

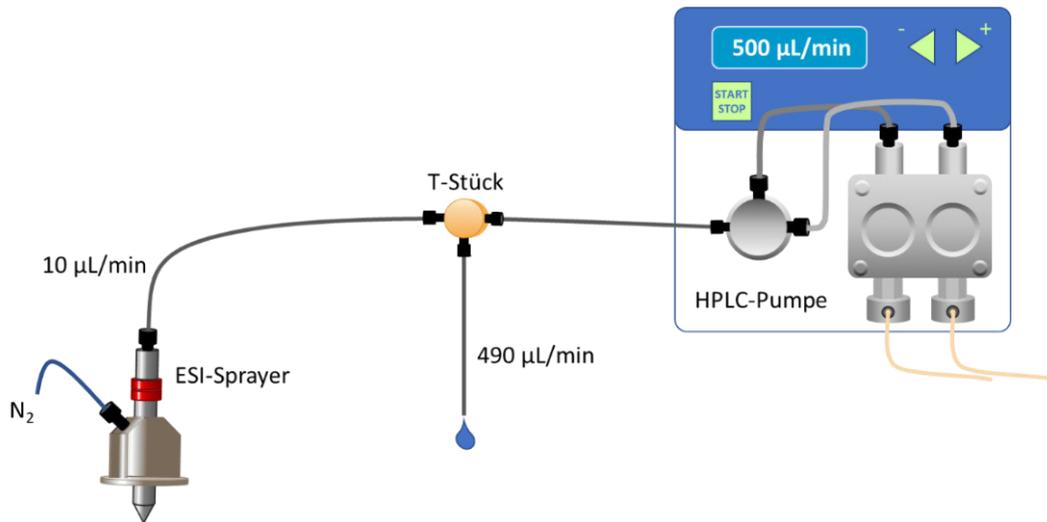


Abb. 23: Schematische Darstellung, wie die Teilung des HPLC-Flusses aussehen könnte

Die zweite Optimierung wurde daher iterativ durchgeführt. Dazu wurden die weiteren Versuche so geplant, dass mindestens zwei Punkte parallel mit einer Spritzenfüllung untersucht werden konnten. War es dennoch nötig, während einer Messserie die Spritze neu zu füllen, wurden mehrere Messpunkte wiederholt, um sicher zu gehen, dass die Intensitätsänderung auf eine Veränderung der Einstellung zurückzuführen ist. Nachdem für jeden Wert ein Optimum, d.h. ein möglichst intensives Signal bei möglichst niedrigem Rauschen bestimmt oder festgelegt worden war, wurde jeder Wert um sein ermitteltes Optimum variiert, um zu überprüfen, ob dieser Wert korrekt ermittelt wurde, während alle anderen Werte auf ihrem Optimum konstant gehalten wurden. Sollte sich das Optimum hierbei ändern, wurden die Versuche mit dem neuen Optimum wiederholt, bis keine Verbesserung mehr zu beobachten war.

Im ersten manuellen Schritt wurde die bestmögliche Kapillarspannung zwischen 0,5 und 4,0 kV in 0,5 kV Schritten ermittelt, sowie der Fluss von 100 µL/min auf 50, 25 und 10 µL/min weiter abgesenkt. Wie aus Abb. 24 ersichtlich (roter Bereich), wurde für die Kapillarspannung ein Wert um 1,5 kV ermittelt. Weiter wurden die ersten Ergebnisse für eine mögliche Reduktion des ESI-Flusses bestätigt. Mit der Spritzenpumpe konnte hierbei ein Flussoptimum um  $25 \mu\text{L} \pm 10 \mu\text{L}$  beobachtet werden.

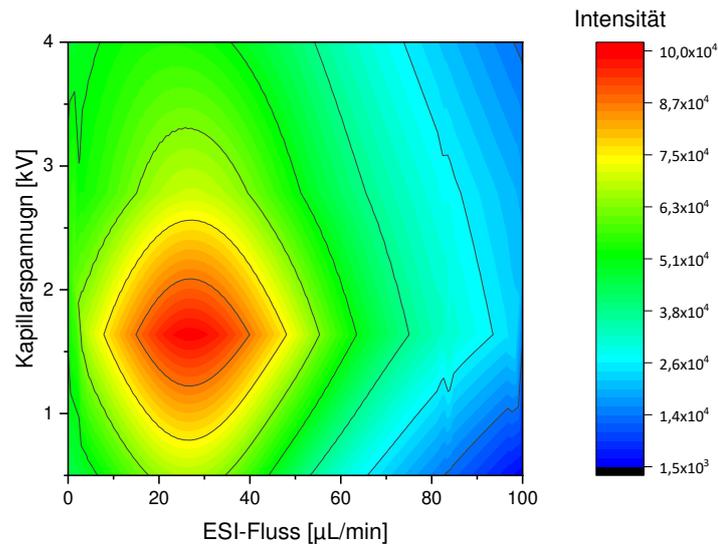


Abb. 24: Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten ( $n=3$ ) der Optimierung der Kapillarspannung und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.

Da der Zerstäubedruck direkten Einfluss auf das ESI-Spray hat, dessen Fluss drastisch reduziert wurde, wurden im nächsten Schritt diese beiden Parameter weiter untersucht. Für den Zerstäubedruck wurde ausgehend vom zuvor ermittelten Optimum (26 psi) ein Untersuchungsbereich zwischen 10 und 40 psi in 5 psi Schritten gewählt. Um das Optimum besser bestimmen zu können, wurde der ESI-Fluss im Bereich zwischen 5 und 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  in 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  Schritten variiert. Das bereits über Minitab ermittelte Optimum für den Zerstäubedruck von 26 psi konnte auch für den geringeren Fluss bestätigt werden. Aufgrund des Messdesigns konnte für den ESI-Fluss das Optimum zwischen 10 und 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  nicht weiter eingengt werden (Abb. 25).

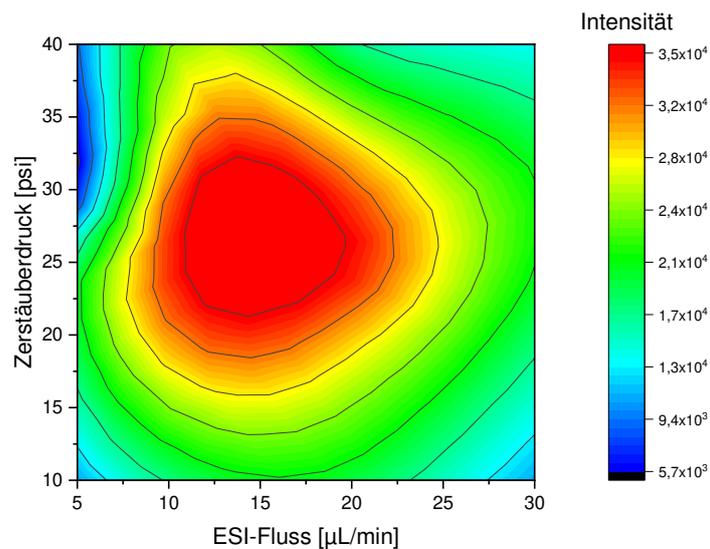


Abb. 25: Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten ( $n=3$ ) der Optimierung des Zerstäubedruckes und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.

Eine Überprüfung der Sprayer-Position in x- und z-Richtung mit einem ESI Fluss von 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ , sowie eine Überprüfung der z-Position in Abhängigkeit vom ESI-Fluss im optimalen Bereich von 10-20  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei konstanter x-Position von 27,5 mm, bestätigte die zuvor mit Minitab erhaltenen Ergebnisse. Die Ergebnisse der Optimierung sind in Abb. 26 dargestellt. Die x-Position des Sprayers zeigt auch hier ein Optimum für die kleinste mögliche Einstellung von 27,5 mm direkt vor dem MS-Einlass. Für die z-Position konnte in Abhängigkeit der x-Position ein Optimum von 16 mm ermittelt werden. In Abhängigkeit des ESI-Flusses liegt das Optimum zwischen 16 bis 18 mm mit der Tendenz zu 18 mm. Da der Abstand in z-Richtung nur in 2 mm Schritten variiert werden konnte, wurde als Optimum 18 mm festgelegt, was mit dem Minitab Ergebnis übereinstimmt. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die optimale Position des Sprayers in z-Richtung nicht maßgeblich vom ESI-Fluss beeinflusst wird.

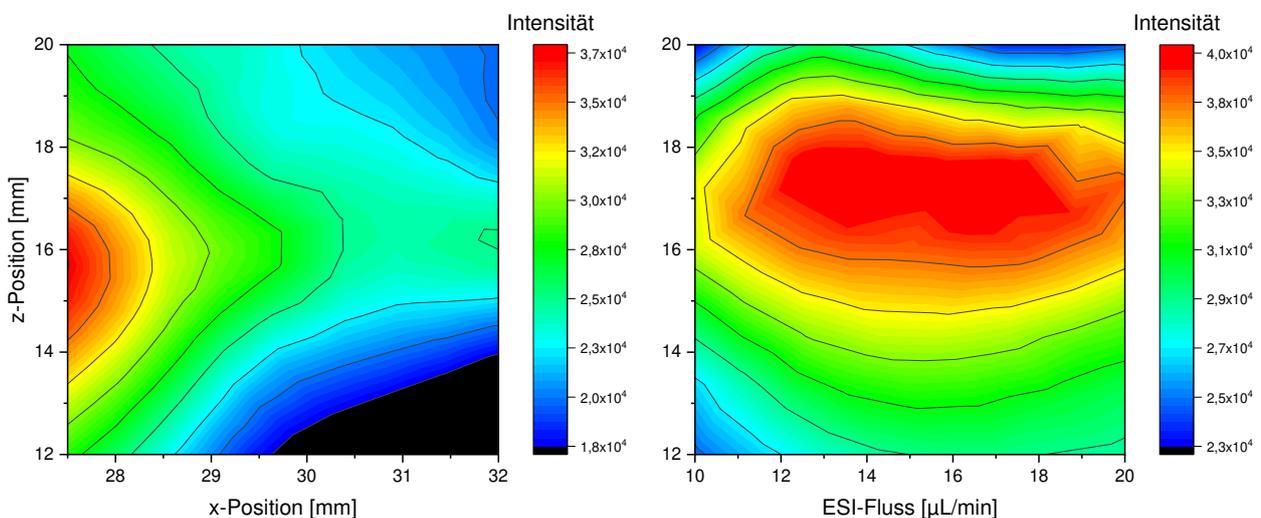


Abb. 26: Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten ( $n=3$ ) der Überprüfung der x- und z-Position des Sprayers (links) und der z-Position in Abhängigkeit des ESI-Flusses (rechts). Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.

Für den verwendeten ESI-Sprayer werden von Bruker für unterschiedliche Flussbereiche verschiedene Kapillarlängen des Sprayers empfohlen. Als Kapillarlänge wird hier die Länge der Kapillare verstanden, die aus dem Zerstäuber herausragt. Bruker empfiehlt eine Kapillarlänge von 0,4 mm für Flüsse  $< 20 \mu\text{L}/\text{min}$ . Für den dauerhaften Betrieb mit Flüssen  $> 500 \mu\text{L}/\text{min}$  wird eine Kapillarlänge von 0 mm empfohlen und für den Bereich zwischen 20 und 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  sowie einen ständig wechselnden Betrieb wird eine Kapillarlänge von 0,25 mm empfohlen. Die Kapillarlänge lässt sich mithilfe einer brukereigenen Einstellvorrichtung, sowie einer Lupe mit Skala (0,05 mm Schritte) einstellen.

Um zu überprüfen, ob die Kapillarlänge auch auf die Ergebnisse der DIP-EEIS einen Einfluss hat, wurde die Kapillarlänge auf 0,25 mm und auf 0,4 mm eingestellt. Für beide Kapillarlängen wurde der ESI-Fluss zwischen 5 und 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  variiert. Der Zerstäuberdruck wurde mit 25 psi konstant gehalten. Die

Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt. Mit der verlängerten Sprayer-Kapillare konnte eine geringe Signalverbesserung bei kleinen Flüssen zwischen 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  erreicht werden.

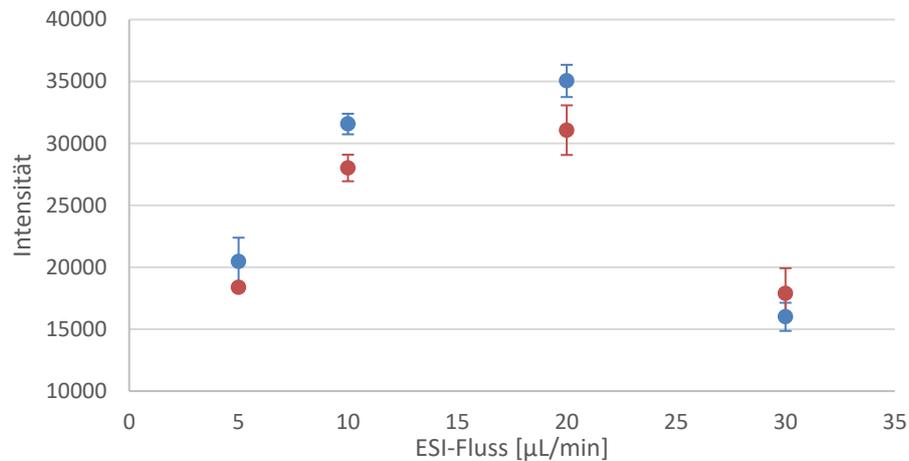


Abb. 27: Vergleich der Sprayer-Kapillarlänge (blau: 0,4 mm; rot: 0,25 mm) bei verschiedenen ESI-Flüssen

Da nun mit kleineren Flüssen von max. 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  gearbeitet wurde, konnte im Gegensatz zu den hohen Flüssen von 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  zu Beginn der Optimierung versuchsweise auf den Abfluss verzichtet werden. Durch Entfernen des Abflusses und somit auch Entfernen der Absaugung von Material aus der Quelle durch die angeschlossenen Laborabsaugung, konnte die Absaugung als Störungsquelle eliminiert werden. Die Auswirkungen der Absaugung, wenn diese korrekt installiert war, waren jedoch gering, wie aus der Überprüfung des ESI-Flusses in Abhängigkeit vom Zerstäuberdruck hervorgeht. Für die Überprüfung des Einflusses der Absaugung wurde der Zerstäuberdruck zwischen 15 und 30 psi und der ESI-Fluss zwischen 5 und 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  variiert. Während das Optimum für den Fluss mit Abfluss im Bereich 10 bis 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  lag, wurde ohne Abfluss bzw. ohne Absaugung ein Optimum von 7,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  für den ESI-Fluss und von 20 psi für den Zerstäuberdruck beobachtet (Abb. 28).

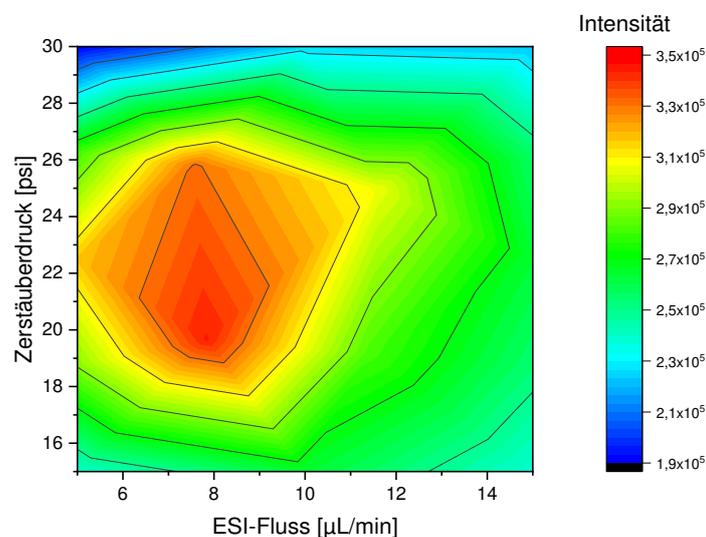


Abb. 28: Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten ( $n=3$ ) der Überprüfung des Zerstäuberdruckes und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.

Ebenfalls aufgrund des niedrigen ESI-Flusses bestand die Möglichkeit, den Dry-Gasfluss zu variieren. Bisher wurde in allen Versuchsreihen der Dry-Gasfluss abhängig vom ESI-Fluss eingestellt, gemäß den Empfehlungen von Bruker, um den Eintrag von Flüssigkeiten in das Massenspektrometer so gering wie möglich zu halten. Die Empfehlungen von Bruker beziehen sich auf die in der HPLC verwendete ESI-Flüsse zwischen 20 und 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Für kleine ESI-Flüsse zwischen 20 und 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  empfiehlt Bruker einen Dry-Gasfluss von 6 bis 8 L/min. Das Risiko, dass bei einem ESI-Fluss von 7,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  und einer Dry-Gas-Temperatur von 350 °C Flüssigkeiten in das MS gelangen, wurde als gering eingestuft.

Durch Verringerung des Dry-Gasflusses wurde erwartet, dass ähnlich wie bei der DIP-APCI und der DIP-APPI die Intensität zunimmt [143, 144], da der Dry-Gasfluss dem Hilfsgasfluss, der die Analyten von der DIP Richtung Massenspektrometer leitet, entgegengesetzt ist. Diese Erwartung wurde in Teilen erfüllt. Es konnte, wie in Abb. 29 links zu sehen ist, mit abnehmendem Dry-Gasfluss eine Zunahme der Intensität beobachtet werden. Die Intensitätszunahme konnte jedoch nicht nur für die Analytmass, sondern auch für alle Störionen in der Quelle beobachtet werden. Das bedeutet, dass das *signal-to-noise* Verhältnis mit steigender Intensität bzw. niedrigerem Dry-Gasfluss abnahm (Abb. 29 rechts). Während die größten Signale bei einem Dry-Gasfluss von 1,3 L/h (kleinere Werte sind gerätebedingt nicht möglich) erzielt wurden, wurden die besten *signal-to-noise* Werte für einen Dry-Gasfluss über 4,5 L/h erzielt.

Als Kompromiss zwischen Signalintensität und gutem *signal-to-noise*-Verhältnis wurde der Dry-Gasfluss auf 3,5 L/h festgelegt. Der Kompromiss wurde eingegangen, weil zum einen befürchtet wurde, dass trotz des besseren *signal-to-noise* Verhältnisses bei 4,5 L/h bei kleineren Konzentrationen die Peaks aufgrund der geringeren Peakintensität nicht mehr detektiert werden können. Zum anderen, weil die *signal-to-noise* Verhältnisse bei 4,5 L/h und bei 3,5 L/h mit  $28 \pm 2$  und  $25 \pm 2$  im gleichen Bereich liegen, während die Peakintensität bei 3,5 L/h mit 75 200 counts deutlich höher lag als bei 4,5 L/h mit 43 500 counts.

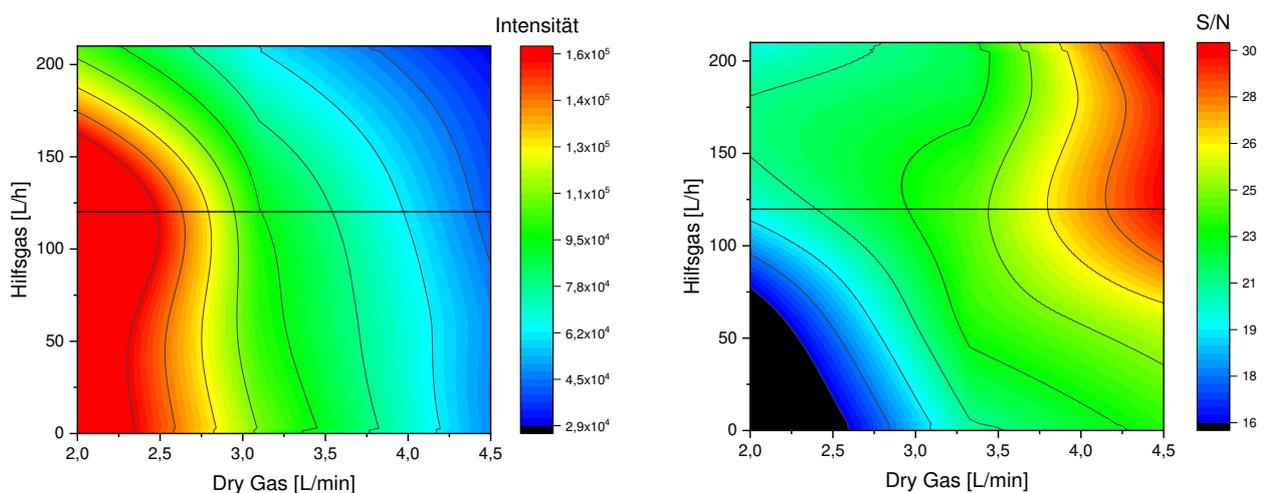


Abb. 29: Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignalintensitäten ( $n=3$ , links), der mittleren *signal-to-noise* Verhältnisse ( $n=3$ , rechts) zur Bestimmung des Dry-Gasflusses und des Hilfsgasflusses. Die Markierung des Hilfsgasflusses bei 120 L/h gibt den höchsten Hilfsgasfluss an, mit dem die DIP ihre maximale Temperatur von 400 °C z.T. noch erreichen konnte.

Der Hilfsgasfluss, der dem Dry-Gasfluss entgegen gerichtet ist, wurde ebenfalls untersucht und im Bereich 0 bis 210 L/h variiert. Da die Analyten von der DIP durch den Hilfsgasfluss Richtung Massenspektrometer geleitet werden, war es zunächst überraschend, dass für kleinere Hilfsgasflüsse höhere Signale erhalten wurden, auch wenn dieser Effekt nicht so ausgeprägt war, wie für das Dry-Gas (Abb. 29). Ebenso wie beim Dry-Gas, wurden bei hohen Hilfsgasflüssen höhere *signal-to-noise* Verhältnisse erhalten, während die Signalintensität abnahm, wie in Abb. 29 zu sehen ist. Zudem wurde beobachtet, dass ab einem Hilfsgasfluss von >120 L/h die Endtemperatur von 400 °C der DIP nicht mehr erreicht wird. Die Endtemperatur bei 120 L/h schwankte zwischen 360 und 400 °C. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei der Entwicklung und Optimierung der DIP-APPI beobachtet. Hier konnte die Endtemperatur ab ca. 250 L/h nicht mehr erreicht werden. [187] Dass bei der DIP-EESI dieses Phänomen bereits bei kleineren Hilfsgasflüssen auftritt, lässt sich dadurch erklären, dass bei der DIP-APPI und DIP-APCI über den Verdampfer ein heißer Gasstrom in die Quelle geleitet wird. Dieser Gasstrom wird bei der DIP-EESI durch das Zerstäubergas ersetzt, das nicht erhitzt werden kann. Somit wird zusätzlich zum „kalten“ Hilfsgas „kaltes“ Zerstäubergas in die Quelle geblasen. Hinzu kommt die Abkühlung durch die Verdunstung des ESI-Sprays, wodurch die Quelltemperatur weiter herabgesetzt wird. Die Temperatur der Quelle durch eine Heizung zu erhöhen, konnte nicht realisiert werden, weil die Anschlüsse für die Quellenheizung, die im Quellendesign vorgesehen waren, von den Antrieben der DIP blockiert wurden (Abb. 30).

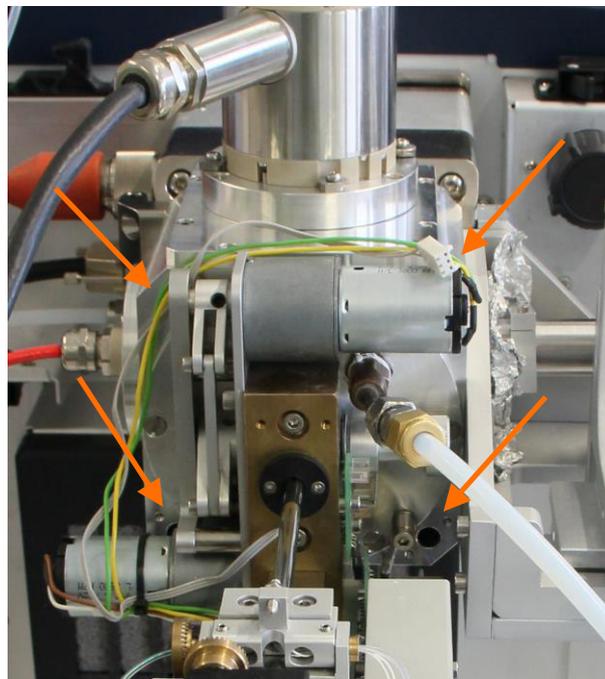


Abb. 30: Frontansicht der DIP-Multipurpose-Quelle. Markiert sind die möglichen Bohrungen/Positionen zur Installation einer Heizung des Quellkörpers, welche durch die Motoren und Scharniere der DIP blockiert werden.

Dadurch, dass die DIP durch das Hilfsgas gekühlt wird, steigt die Temperatur der DIP zum Ende des Temperaturgradienten nicht mehr linear an, sondern verläuft eher negativ logarithmisch. Da als Modellsubstanzen Koffein und Kampfer gewählt wurden, zwei Substanzen, die bereits bei niedrigen

Temperaturen verdampfen (Koffein: Sublimation ab 178 °C, Kampfer: Siedepunkt 209 °C), verdampfen diese Substanzen wahrscheinlich noch im linearen Bereich des Temperaturgradienten. Für Substanzen, die einen höheren Siedepunkt haben, und damit erst am Ende des Temperaturgradienten, im negativ logarithmischen oder im stagnierenden Bereich, verdampfen, wird eine geringere Intensität erwartet, da ihr Verdampfungsprofil flacher und somit weniger intensiv ausfallen wird.

Da bei Hilfsgasflüssen über 120 L/h die Endtemperatur der DIP nicht mehr erreicht werden kann, können nur die Hilfsgasflüsse zwischen 0 und 120 L/h berücksichtigt werden. In diesem Bereich verändert sich die Intensität der Modellsubstanzen kaum. Die *signal-to-noise*-Verhältnisse nehmen mit steigendem Hilfsgasfluss leicht zu. Daher wurde ein Hilfsgasfluss von 100 L/h für weitere Messungen festgelegt.

Eine Überprüfung der Werte ergab, dass sich nur für die Kapillarspannung das Optimum geringfügig von 1,5 kV auf 1,25 kV verschoben hat, wie in Abb. 31 zu sehen ist. Die Veränderung des Optimums ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass für die Überprüfung des Optimums 0,25 kV Schritte gewählt wurden, während zuvor bei der ersten Bestimmung des Optimums 0,5 kV Schritte gewählt wurden und deshalb das Optimum verpasst wurde. Durch die Messung zweier zusätzlicher Punkte bei 1,125 kV und 1,375 kV wurde die Auflösung nochmals verfeinert und das Optimum bei 1,25 kV bestätigt.

Die Überprüfung der restlichen Werte ergab keine weitere Verbesserung.

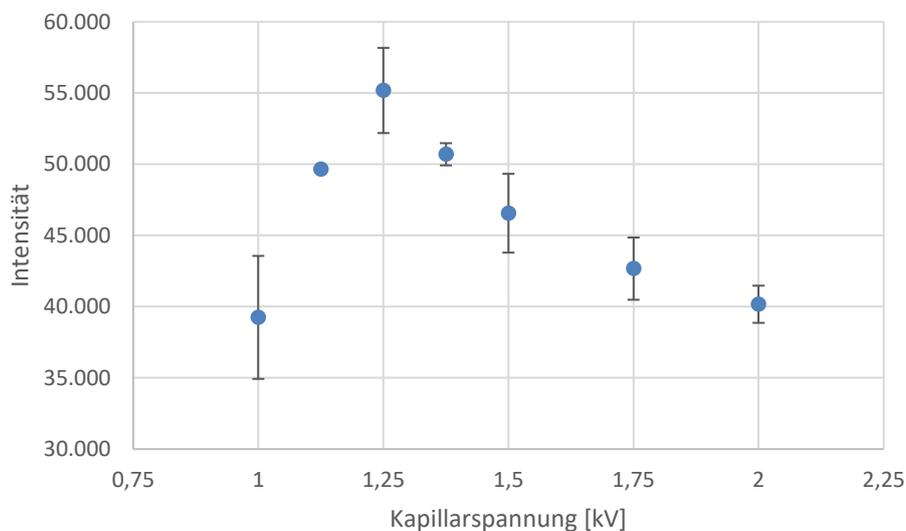


Abb. 31: Überprüfung der Kapillarspannung nach iterativer Optimierung

Abschließend wurde nach den beiden Optimierungen folgende optimalen Parameter ermittelt:

x-Position	27,5 mm	ESI-Fluss	7,5 µL/min
z-Position	18 mm	Dry-Gasfluss (ESI-Fluss abhängig)	3,5 L/min
Hilfsgasfluss	100 L/h	Dry-Gas-Temperatur	350 °C
Zerstäubergasdruck	20 psi	Formiatkonzentration	1,0 %
Kapillarspannung	1,25 kV	Sprayer-Kapillarlänge	0,4 mm

### 4.3 Analytische Grenzen

Um die Möglichkeit der Durchführung quantitativer Analysen zu evaluieren, sowie analytischen Grenzen der DIP-EESI besser erfassen zu können, wurden Kalibrationsreihen mit drei Substanzen aufgenommen. Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze, sowie die Vertrauensbänder wurden gemäß DIN ISO 8466-2 [188], DIN 32645 [189] und Zscheppank et al. [190] ermittelt. Als Modellsubstanzen für die Kalibrationen wurden Koffein, Colchicin und Kampfer verwendet, um einen möglichst großen Bereich unterschiedlicher Polaritäten abdecken zu können. Koffein dient mit einem  $\log K_{OW}$  von -0,07 als Vertreter eher polarer Substanzen, Colchicin mit einem  $\log K_{OW}$  von 1,30 und Kampfer mit einem  $\log K_{OW}$  von 2,38 als Vertreter unpolarer Substanzen [191].

Als Dreifachbestimmung wurden 12 Koffeinstandards im Konzentrationsbereich von 1 – 500 mg/L analysiert. Die oberen Standards mit 250 mg/L und 500 mg/L konnten nicht verwendet werden, da für Konzentrationen über 100 mg/L ein Sättigungseffekt beobachtet werden konnte. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mit 2,3 und 8,2 ng pro Injektion (1  $\mu$ L) ermittelt. Als Arbeitsbereich konnte somit nur der Bereich zwischen 2 und 100 mg/L verwendet werden. In diesem Bereich zeigten die  $[M+H]^+$ -Signale eine positive quadratische Regression mit  $R^2=0,9997$  (Abb. 32), während die lineare Regression mit  $R^2=0,9948$  bestimmt wurde. Dass es sich um eine quadratische Regression handelt, wurde mit Hilfe des Mandeltests mit einem Signifikanzniveau von 99% bestätigt.

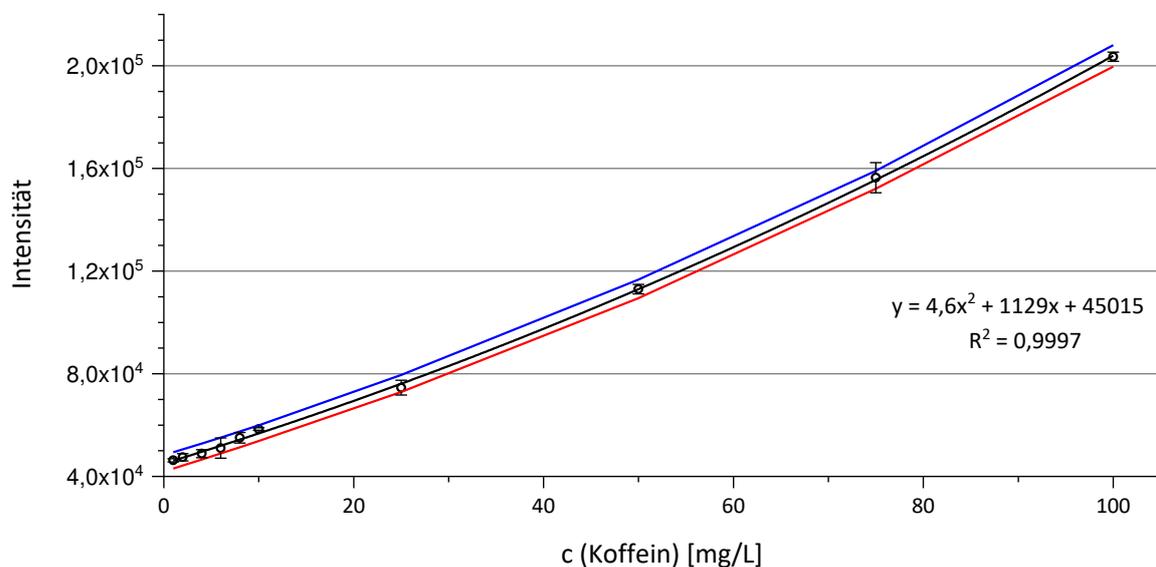


Abb. 32: Positive quadratische Kalibrationskurve von Koffein (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190])

Für die Kalibrierung von Kampfer wurden 13 Standards im Bereich von 0,8 – 200 mg/L verwendet. Hier konnte bereits ab 80 mg/L ein Sättigungseffekt beobachtet werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mit 1,1 und 4,0 ng pro Injektion (1  $\mu$ L) ermittelt. Als Arbeitsbereich konnte hier nur der Bereich zwischen 1 und 80 mg/L verwendet werden. In diesem Bereich zeigten die Signale ebenfalls eine positive quadratische Regression mit  $R^2=0,9992$  (Abb. 33), während die lineare Regression mit  $R^2=0,9970$

bestimmt wurde. Dass es sich um eine quadratische Regression handelt, wurde ebenfalls mit Hilfe des Mandeltests mit einem Signifikanzniveau von 99% bestätigt.

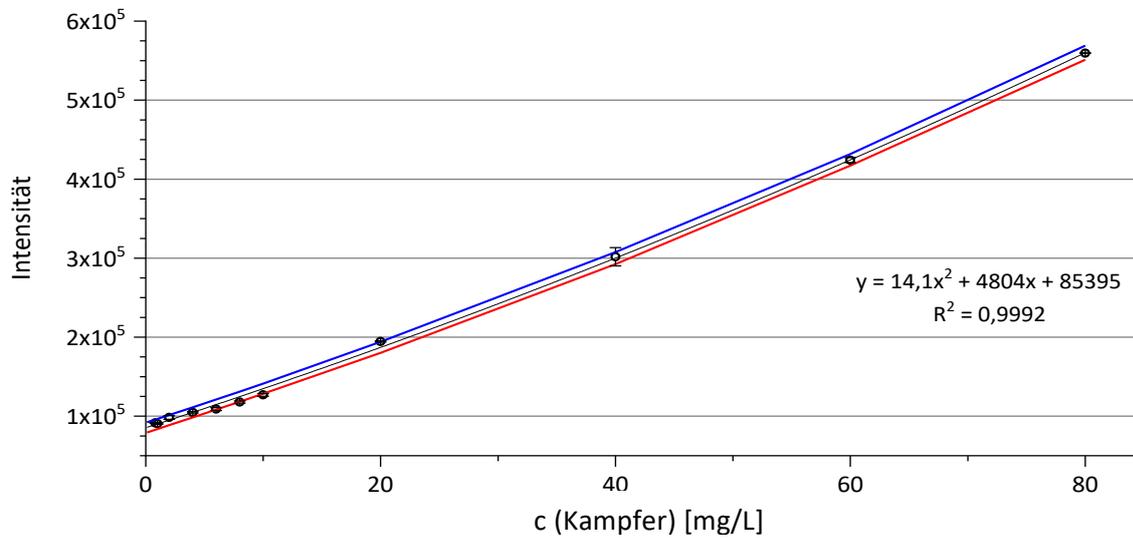


Abb. 33: Positive quadratische Kalibrationskurve von Kampfer (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190])

Ähnliche Ergebnisse konnten auch für Colchicin beobachtet werden. Für Colchicin wurden 7 Standards im Bereich von 0,5 – 100 mg/L untersucht. In diesem Bereich konnte keine Sättigung festgestellt werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mit 5,3 und 17,4 ng pro Injektion (1  $\mu$ L) ermittelt. Als Arbeitsbereich konnte hier der Bereich zwischen 5 und 100 mg/L verwendet werden. In diesem Bereich zeigten die Signale ebenfalls eine positive quadratische Regression mit  $R^2 = 0,9990$  (Abb. 34), während die lineare Regression mit  $R^2 = 0,9754$  bestimmt wurde. Dass es sich um eine quadratische Regression handelt, wurde ebenfalls mit Hilfe des Mandeltests mit einem Signifikanzniveau von 99% bestätigt.

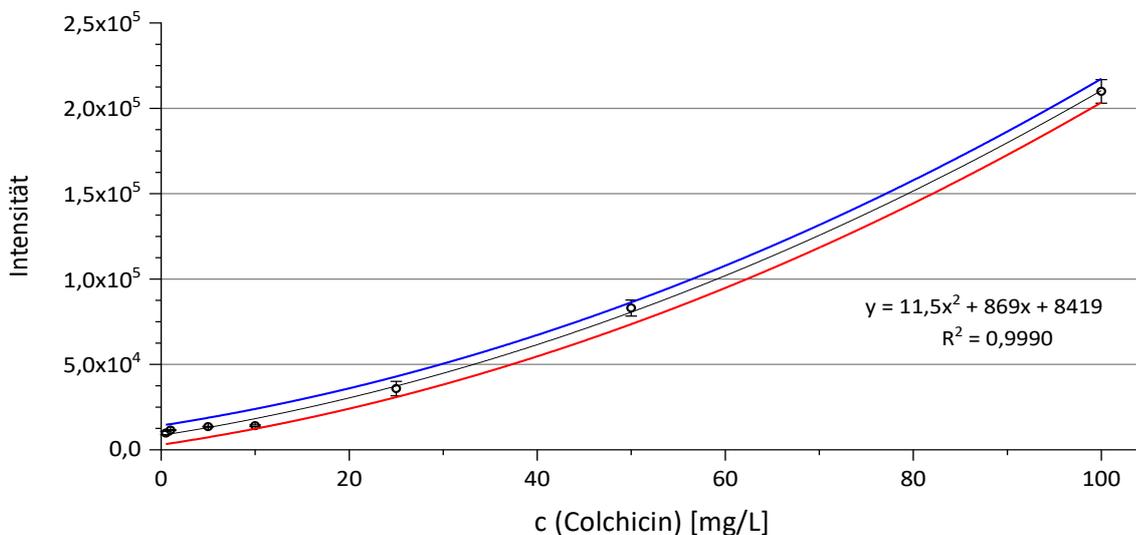


Abb. 34: Positive quadratische Kalibrationskurve von Colchicin (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190])

Für alle drei Substanzen konnte ein ähnlicher Arbeitsbereich sowie ähnliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt werden. Die Ergebnisse sind mit denen konform, die für die quantitative Analyse mit der DIP-APCI [143] und der DIP-APPI [144], vgl. Tabelle 25, ermittelt wurden. Weiter liegen die ermittelten Werte der drei Substanzen mit denen, die aus der Abbildung 3 der Veröffentlichung von Horst et al. [144] abgeschätzt wurden, im gleichen Bereich. Ebenso vergleichbar sind die Ergebnisse der DIP-EESI mit verwandten Systemen. So ermittelten Basile et al. mit der AP/TD-EESI für Dipicolinsäure eine Nachweisgrenze von 10 ng (60 pmol) [1] und Devenport et al. mit der AP/TD-EESI für p-Toluolsulfonsäuremethylester eine Nachweisgrenze von 5 ng (27 pmol) [2] und für Kreatin von 8 ng (61 pmol) [3].

Tabelle 25: Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der drei Ionisierungsmethoden DIP-EESI, DIP-APPI und DIP-APCI für verschieden Substanzen.

	DIP-EESI			DIP-APPI [144]	DIP-APCI [143]
	Koffein	Colchicin	Kampfer	Koffein	Kumarin
LOD [ng]	2,3	5,3	1,1	4,7	7,2
[pmol]	12	13	7	24	49
LOQ [ng]	8,2	17,4	4,0	15,9	25,3
[pmol]	42	44	26	82	173
RSD <i>Intraday</i> (%)	n.a.	n.a.	3,4 – 11,3	2,7	1,5 – 11,8
RSD <i>Interday</i> (%)	0,5 – 0,9	1,3 – 11,8	0,4 – 0,9	15,7	2,1 – 8,9

LOD: Limit of detection, LOQ: Limit of quantification, RSD: relative Standardabweichung (Standard deviation)

Im Vergleich zu Koffein als polarere Substanz konnte, entgegen der Erwartung für die unpolaren Substanzen Kampfer und Colchicin, kein deutlicher Unterschied für die Nachweisgrenzen ermittelt werden, wie sie aufgrund des ESI-Mechanismus erwartet wurden. Kampfer, die unpolarste der drei getesteten Substanzen, zeigt zwar eine niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenze als Koffein und Colchicin, aber dies dürfte nicht ausschließlich auf ihre Polarität zurückzuführen sein. So wird Kampfer im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen mit einem schmalen Peak im Chronogramm detektiert (Abb. 35), wodurch auch kleine Mengen noch detektiert und integriert werden können.

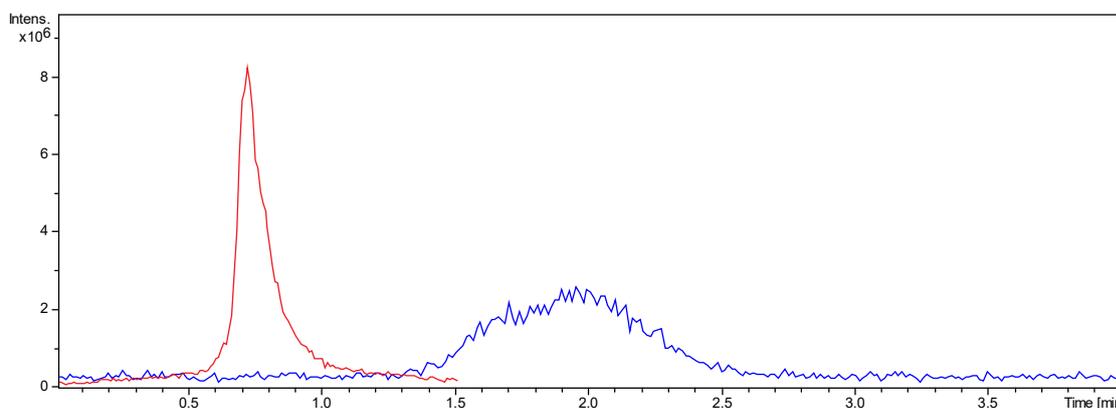


Abb. 35: Vergleich der Verdampfungsprofile von Kampfer (rot) und Colchicin (blau)

Die Grenzen für Koffein und Colchicin sind hingegen fast identisch. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Polaritätsunterschiede zwischen Koffein und Colchicin nicht groß genug sind, um einen Effekt, der durch den Ionisierungsmechanismus bedingt ist, zu beobachten. Zum anderen kann das Limit durch das Quellendesign und/oder das verwendete Massenspektrometer bedingt sein, da auch mit den anderen Ionisierungsmethoden wie DIP-APPI und DIP-APCI, wie oben beschrieben, die Grenzen im gleichen Bereich bzw. bei der DIP-APCI für Koffein sogar leicht höher liegen.

Bei der Diskussion der Nachweisgrenzen, sollte ebenfalls berücksichtigt werden, dass für Colchicin im Vergleich zu Kampfer und Koffein weniger Punkte im unteren Konzentrationsbereich analysiert wurden, was zu höheren Nachweisgrenzen führen kann. Hinzu kommt, dass die Werte für Colchicin eine höhere Streuung aufweisen, als die für Koffein und Kampfer. Wodurch die Vertrauensbänder breiter werden und die berechneten Grenzen entsprechend höher liegen. Dass die Messwerte von Colchicin stärker schwanken, ist darauf zurückzuführen, dass Colchicin einen höheren Siedepunkt (559 °C) als Kampfer (204 °C) hat [191]. Dadurch entsteht für Colchicin ein etwa dreimal so breiter und entsprechend niedrigerer Peak im Chronogramm wie für Kampfer, wodurch vor allem für niedrigere Konzentrationen eine Integration erschwert wird (Abb. 35).

Ein weiterer limitierender Faktor der DIP-EESI im Vergleich zur DIP-APCI ist der stark erhöhte Hintergrund, vgl. Abb. 36. Es ist selbstverständlich, dass mit der DIP-APCI andere Substanzen ionisiert werden als mit der DIP-EESI, bzw. einige Substanzen mit dem jeweilige Ionisationsverfahren besser ionisiert werden. Jedoch werden bei einer Messung von Methanol mit der DIP-EESI deutlich mehr Signale detektiert als mit der DIP-APCI. Mit der DIP-APCI wurden einige konkrete Signale detektiert, während mit der DIP-EESI ab  $m/z > 200$  die Signale sehr vieler Massen erhöht sind, und hier eine diffuse Signalverteilung zu sehen ist. Da der Blindwert der DIP-EESI der einzelnen Masse bereits ein erhöhtes Signal und z.T. auch ein erhöhtes Rauschen zeigt, ist zu erwarten, dass auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in diesem  $m/z$ -Bereich höher liegen als bei der DIP-APCI bei gleich guter Ionisierung der Substanz.

Die erhöhten Hintergrundsignale konnten mit dem zur Verfügung stehenden Equipment nicht entfernt werden. Mögliche Quellen sind die Kapillare zwischen Spritzenpumpe und ESI-Sprayer, die Spritze bzw. der Teflon-Stempel der Spritze und der Needle-Port zur Verbindung von Kapillare und Spritzennadel. Hier steht vor allem der Needle-Port im Focus, da je nachdem wie gut die Nadel im Port platziert war, die Anzahl und die Intensität der Hintergrundsignale ab- bzw. zunahm.

So konnte gelegentlich beim Einführen der Nadel in das Port-Tubing ein „Kratzen“ der Nadel als Vibrationen wahrgenommen werden. In diesen Fällen konnten keine Messungen durchgeführt werden, da zu viele und zu intensive Hintergrundsignale sichtbar waren. Durch Entfernen und erneutem Platzieren der Nadel (ohne „Kratzen“) konnten dann Massenspektren mit akzeptablen Hintergrundsignalen erzielt werden. Jedoch variierte die Intensität der Hintergrundsignale bei jedem erneuten Platzieren der Nadel. Vermutlich wurde, je nachdem wie zentral und gerade die Nadel in den Needle-Port eingeführt wurde, mehr oder weniger Wandmaterial abgeschabt bzw. beschädigt.

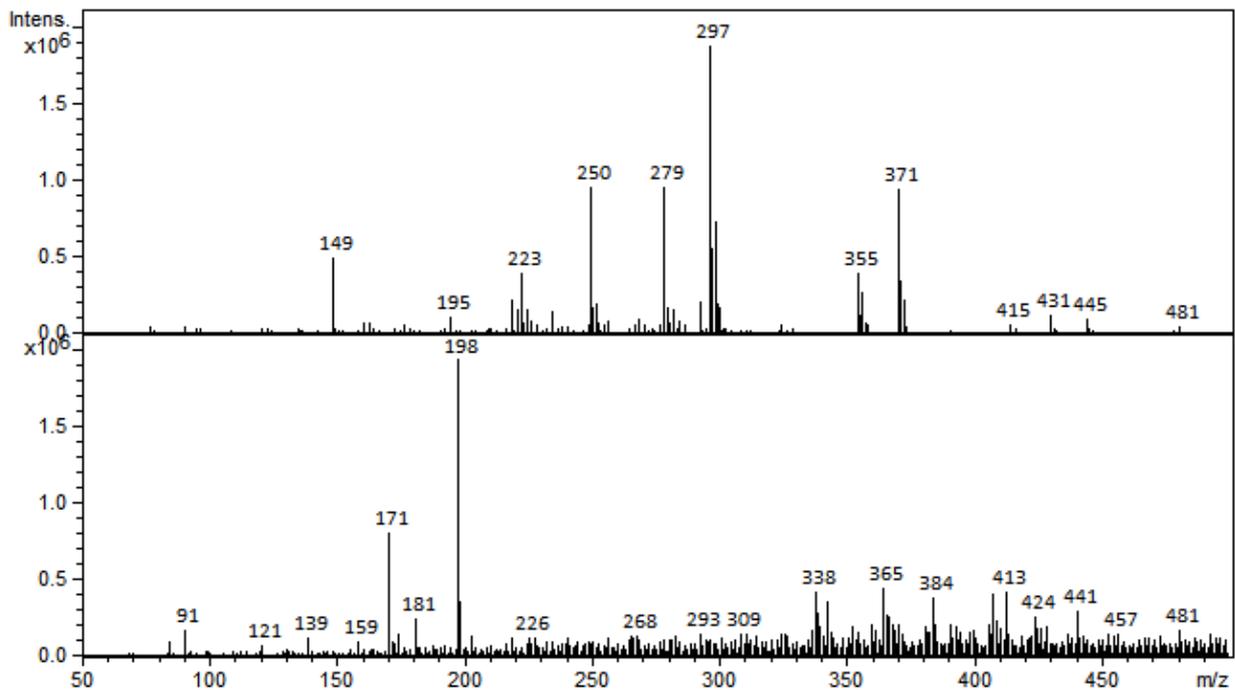


Abb. 36: Massenspektrum von je 1  $\mu\text{L}$  Methanol. Ionisiert mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten). Mit DIP-EESI werden mehr Hintergrundsignale beobachtet als mit DIP-APCI, die weniger, dafür intensivere Signale liefert.

Im Vergleich einer „korrekt“ platzierten Nadel in einem neuen Needle-Port und einem gebrauchten („verkratzten“) Needle-Port konnte keine deutliche Änderung der Hintergrundsignale beobachtet werden. Ebenso konnten die Hintergrundsignale durch Verwendung einer reinen Glasspritze oder dem Austausch der PEEK-Kapillare durch andere PEEK-Kapillaren oder eine Metallkapillare nicht reduziert werden. Auch der Austausch der verwendeten Chemikalien führte nicht zu einer Reduktion der Hintergrundsignale.

## 4.4 Analyse von Medikamenten

### 4.4.1 Vergleich von originalverpackten und neuverpackten Tabletten

Da Apotheken, die die patientenindividuelle Neuverpackung vornehmen, verifizieren müssen, dass die Stabilität der halbierten neuverpackten Tabletten gleich der originalverpackten Tabletten ist, wurden ausgewählte Arzneimittel mit der DIP-APCI und der DIP-EESI untersucht, um eine Methode zu entwickeln, mit der das möglich ist.

Im Sinne der Patientensicherheit sollten sich original- und neuverpackte Tablette nicht unterscheiden. In der neuen Verpackung sind die Tabletten aber weder vor Licht noch vor Feuchtigkeit geschützt, wodurch sowohl bekannte als auch unbekannte Verunreinigungen entstehen können. Da Apotheken, die die patientenindividuelle Zweitverblisterung vornehmen, keine umfangreichen Stabilitätsstudien gemäß ICH-Guidelines durchführen können, sollte ein einfacher Vergleich der Spektren der originalverpackten Tablette, mit denen der neuverpackten Tabletten mögliche Unterschiede aufdecken.

Unter der Annahme, dass für die Wirkstoffe aus den Arzneimitteln ähnliche Bestimmungsgrenzen wie für die Modellsubstanzen aus Kapitel 4.3 erzielt werden, kann mit einer maximalen Einwaage von 1 mg der im Arzneimittelgesetz geforderte Reporting Threshold für unbekannte Verunreinigungen von 0,05 % bzw. 0,1 % für sieben der neun mit DIP-APCI bzw. DIP-EESI untersuchbaren Arzneimittel erreicht werden.

Bei einer bekannter Bestimmungsgrenze, die gleich dem Reporting Threshold ist, kann bei bekanntem Tablettengewicht die theoretische Einwaage der Tablette bestimmt werden. Z.B. wiegt eine Clonazepam-Tablette 0,1517 g und enthält 0,5 mg Wirkstoff. Der Reporting Threshold für Verunreinigungen liegt bei 0,1% und ist gleich der Bestimmungsgrenze von 30 ng. Dementsprechend müssten von der Clonazepam-Tablette 9,1 mg eingewogen werden. Da der Tiegel aber nur ein Fassungsvermögen von 1 mg besitzt, liegt die theoretische Einwaage über dem Fassungsvermögen des Tiegels. Genauso verhält es sich bei den Midodrin Tabletten.

Die notwendigen Mindesteinwaagemengen aller untersuchten Tabletten sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Von den zwölf zur Verfügung stehenden Arzneimitteln konnten drei nicht mit der DIP analysiert werden, da sie thermisch nicht stabil waren, siehe Kapitel 4.4.3

Tabelle 26: Reporting Threshold für zwei verschiedenen Einwaagen sowie die Tablettenpulver-Einwaage mit der es möglich ist, mit einem LOQ von 30 ng den Reporting Threshold zu erreichen.

Wirkstoff	Wirkstoffgehalt pro Tablette	Reporting Threshold <sup>1</sup> für		Theoretische Einwaage <sup>2</sup>
		1 mg Einwaage	0,1 mg Einwaage	
Amlodipin	5 mg	30,7 ng	3,1 ng	1,0 mg
Clonazepam	0,5 mg	3,3 ng	0,3 ng	9,1 mg <sup>3</sup>
Metoprolol	50 mg	397,1 ng	39,7 ng	0,1 mg
Midodrin	2,5 mg	19,0 ng	1,9 ng	1,6 mg <sup>3</sup>
Mirtazapin	15 mg	96,1 ng	9,6 ng	0,3 mg
Pipamperon	40 mg	214,4 ng	21,4 ng	0,1 mg
Piracetam	800 mg	479,9 ng	48,0 ng	0,1 mg
Primidon	250 mg	440,1 ng	44,0 ng	0,1 mg
Trazodon	100 mg	83,0 ng	8,3 ng	0,2 mg

<sup>1</sup> der Reporting Threshold muss mindestens als LOQ erreicht werden

<sup>2</sup> Die theoretische Einwaage an Tablettensubstanz beruht auf der Annahme, dass ein LOQ von 30 ng für den jeweiligen Wirkstoff erhalten wird

<sup>3</sup> Theoretische Einwaage liegt über dem Fassungsvermögen des DIP-Tiegels

Für erste Tests wurden ca. 0,1 mg der pulverisierten Tablette untersucht. Aufgrund der Wäagegenauigkeit kann hier nur von einer geschätzten Einwaage gesprochen werden. Eine genauere Angabe der eingewogenen Menge ist nicht möglich, da keine präzisere Waage zur Verfügung stand und die Mindesteinwaagemenge deutlich unterschritten wurde (Ablesegenauigkeit der Waage 0,1 mg). Auf

diesem Weg sind keine quantitativen Bestimmungen möglich. Für die ersten Tests war eine ungefähre Einwaage völlig ausreichend. Die Analyse der ersten Tests erfolgte nur mit DIP-APCI, da die DIP-EESI war zu diesem Zeitpunkt als Ionenquelle noch nicht entwickelt war.

Diese sehr geringe Probenmenge reichte aber aus, dass nach Verdampfen der Probe die Quelle und die Schubstange so stark mit Wirkstoff kontaminiert waren, dass sie für mehrere Stunden bei 400 °C ausgeheizt werden musste, bis das Hauptsignal soweit zurückgegangen war, dass eine erneute Probenaufgabe möglich war. Die Analyse von Tablettenpulver war sowohl aufgrund der schwierigen Einwaage, als auch aufgrund der langen Ausheizzeiten des DIP-Systems keine Lösung.

Für weitere Untersuchungen wurde daher die Probenmenge reduziert, in dem die gemörserte Tablette in Methanol suspendiert wurde. Auf eine weitere Aufarbeitung der Suspension wurde hier für die ersten Tests mit Piracetam und Aspirin verzichtet, da die Probenvorbereitung so einfach wie möglich gestaltet werden sollten und die geringen Feststoffpartikel aus den Hilfsstoffen, die sich schnell absetzten, keine Probleme bei der Probenaufgabe in den DIP-Tiegel verursachten.

Durch Verwenden von Lösungen konnte die verwendete Tablettenmenge besser gesteuert werden und störende Hilfsstoff weitestgehend vom Wirkstoff abgetrennt werden. Die Konzentration der Lösung war auf maximal 1 mg/mL beschränkt, da es sonst zu Verschleppungen des Wirkstoffes kam. Ein Austausch des DIP-Tiegels war nicht möglich, da hierdurch die Reproduzierbarkeit der Messungen stark variierten und ein Vergleich zwischen original und neuverpackter Tablette nicht mehr möglich war.

Vorrangiges Ziel der Arbeit war die Untersuchung auf Unterschiede zwischen original- und neuverpackten Tabletten, auch wenn die im Arzneibuch beschriebenen Thresholds nicht mehr erreicht werden konnten. Hierzu wurden sowohl die Tablettenlösungen als auch die Blankproben, die nur das verwendete Lösungsmittel enthielten, sechsmal analysiert, um eventuelle Schwankungen durch die Messungen statistisch erfassen und beurteilen zu können.

Zurzeit muss die Auswertung weitestgehend manuell erfolgen. Anders als bei der Chromatographie, bei der man zwei Chromatogramme miteinander vergleichen kann, um neue oder unterschiedlich große Peaks zu erkennen, müsste man jede Massenspur bei den DIP-Messungen miteinander vergleichen. Dieser manuelle Vorgang ist bei den DIP-Systemen sehr zeitaufwendig, wodurch der Vorteil einer schnellen Analyse mit den DIP-Systemen zurzeit nicht genutzt werden kann. Eine entsprechende Softwareentwicklung mit der auch die abstrakten, unförmigen Verdampfungsbereiche, wie sie mit den DIP-Systemen entstehen, interpretiert und ausgewertet werden können, kann hier Abhilfe schaffen.

Zur Auswertung der DIP-EESI bzw. DIP-APCI Daten wurde wie folgt vorgegangen:

Von den erhaltenen Analysen wurde das Basepeak-Chronogramm (BPC) erzeugt. Aus dem BPC wurde jeweils über die gesamte Analysendauer ein sogenanntes „Average Mass“ Spektrum mit Hilfe der Software DataAnalysis von Bruker Daltonics berechnet. Beim *Average Mass* Spektrum wird das gemittelte Spektrum über den gewählten Chronogrammbereich berechnet.

Für jeden gemessenen  $m/z$ -Wert werden die gemittelte Intensität über das Spektrum berechnet. Wenn sich in der neuverpackten Tablette eine Substanz bildet, die detektiert werden kann, so ist diese Masse oder sind diese Massen intensiver als in der originalverpackten Tablette. Damit reicht es aus, die Intensitäten auf die Solleinwaage zu normieren und sie dann zu vergleichen.

Der Vergleich erfolgt statistisch über den Mittelwert-t-Test. Die Prüfgröße (PG) des Mittelwert-t-Tests wird mit dem Wert der zweiseitigen Student-Verteilung für ein Signifikanzniveau von 99 % und 95 % verglichen.

- Es liegt ein signifikanter Unterschied vor, wenn  $PG > t$  (99 %).
- Kein statistisch nachweisbarer, aber wahrscheinlicher Unterschied liegt vor, wenn  $t$  (99 %)  $> PG > t$  (95 %).
- Kein Unterschied liegt vor, wenn  $PG < t$  (95 %).

Nimmt die Intensität des Wirkstoffgehaltes in der neuverpackten Tablette ebenfalls signifikant ab, kann dies zwei Gründe haben:

1. Der Wirkstoffgehalt in der Tablette ist geringer:

- Dies macht beim Vergleich der Intensitäten im Ergebnis, keinen Unterschied

2. Während der Probenpräparation/Injektion ist ein Fehler aufgetreten.

- Alle Massen, die von der fehlerhaften Probenpräparation/Injektion betroffen sind, werden mit einer signifikant geringeren Intensität detektiert und somit mit einem signifikanten Unterschied. Dieses Problem kann durch Verwenden eines internen Standards behoben werden. Da eine allgemein gültige Methode für möglichst viele Arzneimittel entwickelt werden sollte, konnte kein interner Standard genutzt werden, da dieser für jedes Medikament neu angepasst werden muss.
- Massen, die sich in der neuverpackten Tablette vermehrt gebildet haben, besitzen eine höhere Intensität in der neuverpackten Tablette als in der originalverpackten Tablette. Wurde unwissentlich weniger Tablettensubstanz von der neuverpackten Tablette analysiert als von der originalverpackten Tablette werden auch die Signale für die erhöhten Massen kleiner. Es kann der Fall eintreten, dass diese Massen eine so geringe Intensität besitzen, dass sie über den Mittelwert-t-Test nicht mit einem signifikanten Unterschied erkannt werden. Dies führt zu einem falsch negativen Ergebnis. Auch dieses Problem kann durch Verwenden eines internen Standards behoben werden. Wie oben beschrieben war die Verwendung eines internen Standards nicht möglich.

Daher wurden nicht die Intensitäten, sondern die Verhältnisse der Intensität von einer Masse zur Intensität der Wirkstoffmasse über den Mittelwert-t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Wenn falsche Ergebnisse durch eine falsche Probenpräparation entstehen, sind sie durch die Normierung auf die Wirkstoffmasse falsch positiv und werden in den nächsten Untersuchungsschritten eliminiert.

Es werden alle  $m/z$ -Verhältnisse berücksichtigt, die sich signifikant vom Blank unterscheiden. D.h. die Intensität des Signals der neuverpackten Tablette muss mindestens die Intensität des Blanks plus 3x seine Standardabweichung besitzen, um berücksichtigt zu werden. Außerdem wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, bei denen das Intensitäts-Verhältnis in der neuverpackten Tablette größer war als in der

originalverpackten Tablette, da mit einer Zunahme einer Verunreinigung gerechnet wurde und eine Abnahme der Verunreinigung die Tablettenqualität nicht negativ beeinflusst und somit irrelevant ist. Anschließend wurde von allen m/z-Werten, die den oben genannten Kriterien entsprachen, das *Extracted Ion Chromogram* (EIC) angefertigt und alle m/z-Werte ausgeschlossen, die im EIC lediglich Rauschen zeigten. Von den m/z-Werten, bei denen ein Verdampfungsbereich zu sehen war, wurde dieser integriert und die Flächen von original- und neuverpackter Tablette erneut über den Mittelwert-t-Test geprüft, ob tatsächlich ein signifikanter Unterschied vorlag.

Über dieses Auswertungsverfahren konnten in den Clonazepam Tabletten Substanzen detektiert werden, die einen signifikanten Unterschied zwischen original- und neuverpackter Tablette aufwiesen. Die Ergebnisse sind ausführlich in Kapitel 4.4.1.1 Seite 79 dargestellt.

Neben der Suche nach Unterschieden von Verunreinigungen, wurde auch der Wirkstoffgehalt in den neuverpackten Tabletten mit den originalverpackten Tabletten überprüft. Hierzu wurde lediglich die Fläche des  $[M+H]^+$ -Signals des Wirkstoffes im Chronogramm auf die Solleinwaage normiert und die Flächen miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 37 dargestellt. Zusätzlich wurde in Abb. 37 die Fläche des Wirkstoffes in der originalverpackten Tablette nach Einwaagekorrektur zur besseren Darstellung auf 100 % normiert. Wie zu erkennen ist, konnte für Clonazepam und Primidon sowohl mit DIP-EESI als auch mit DIP-APCI ein signifikanter Unterschied für den Wirkstoff detektiert werden. Diese beiden Medikamente werden in den folgenden Kapiteln genauer betrachtet. Für alle anderen Arzneimittel ist der Wirkstoffgehalt in der original- und neuverpackten Tablette innerhalb der analytischen Schwankungen gleich.

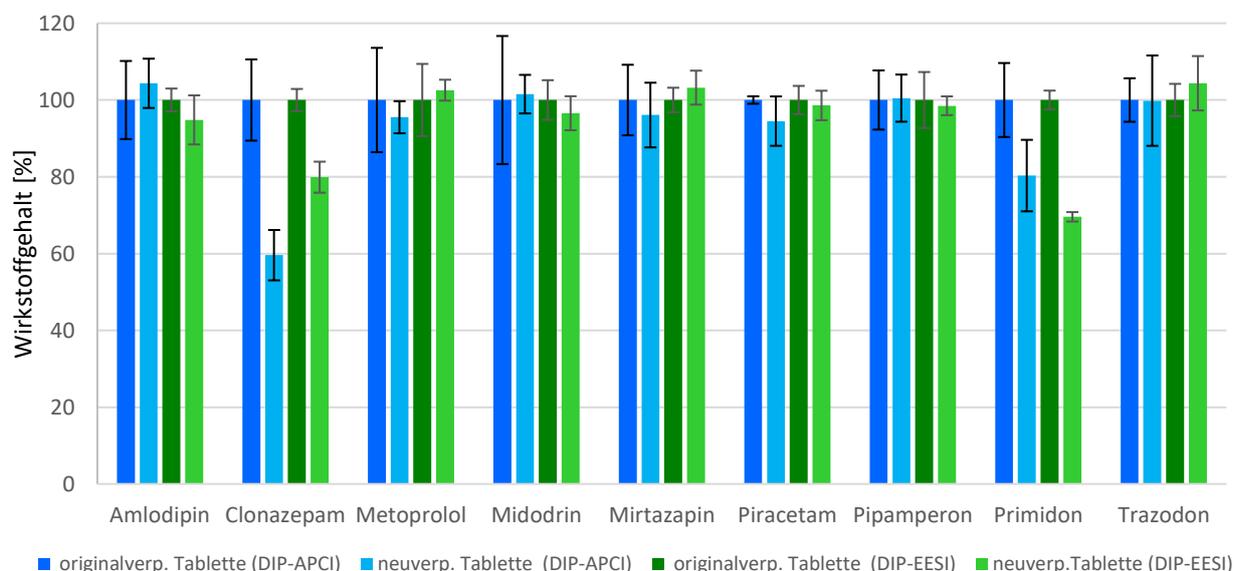


Abb. 37: Vergleich der Konzentration an Wirkstoff in der originalverpackten Tablette und der neuverpackten halbierten Tablette für die neun untersuchten Medikamente. Zur leichteren Darstellung wurde angenommen, dass für die originalverpackten Tabletten jeweils 100 % Wirkstoff gefunden wurde. (Blau: Ionisierung mit DIP-APCI, Grün: Ionisierung mit DIP-EESI; dunkel: originalverpackte Tablette; hell: neuverpackte Tablette)

Die relativen Standardabweichungen der DIP-EESI liegen im Mittel für die neun analysierten Arzneimittel bei 4,3 %. Die DIP-APCI zeigt dagegen mit 8,2% eine fast doppelt so hohe relative Standardabweichung. Die relativen Standardabweichungen für die einzelnen Untersuchungen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Relative Standardabweichung [%] der Gehaltsbestimmung der Wirkstoffe

	analysiert mit DIP-APCI		analysiert mit DIP-EESI	
	originalverp.	neuverp.	originalverp.	neuverp.
Amlodipin	10,2	6,4	3,0	6,4
Clonazepam	10,6	6,6	2,9	4,0
Metoprolol	13,6	4,2	9,4	2,7
Midodrin	16,7	5,0	5,2	4,4
Mirtazapin	9,2	8,4	3,2	4,4
Piracetam	1,0	6,4	3,7	3,8
Pipamperon	7,7	6,1	7,3	2,4
Primidon	9,6	9,3	2,5	1,2
Trazodon	5,7	11,8	4,2	7,1
Mittelwert	8,2		4,3	

Der Wirkstoffgehalt von Tabletten darf im Mittel bis zu 10 % um den deklarierten Wert schwanken. Bei einer maximal zulässige Wirkstoffkonzentration von 110 % darf die relative Standardabweichung der analytischen Methode maximal 4,2 % betragen [157]. Damit liegt die mittlere relative Standardabweichung der DIP-EESI nahe an diesem Wert und für viele Einzelbestimmungen sogar unter dem maximalen Wert. Die relative Standardabweichung kann durch Automatisierung verschiedene Faktoren gesenkt werden. Den größten Einfluss dürfte hier die manuelle Probeninjektion und die manuelle Integration der Verdampfungsbereiche haben.

Bei der angewandten manuellen Probeninjektion wurde mit den kleinsten Spritzen zur manuellen Probenaufgabe gearbeitet. Mit der verwendeten 5- $\mu$ L-Spritze wurde 1  $\mu$ L Lösung in den DIP-Tiegel injiziert. Die Skala war laut Hersteller 39 mm lang, der Stempel musste 7,8 mm weit herausgezogen werden, um 1  $\mu$ L zu injizieren. Wurde der Stempel auch nur um 0,5 mm falsch positioniert entspricht dies einem Fehler von bis zu 6,4 %. Durch Automatisieren der Probeninjektion in den Tiegel kann dieser Fehler reduziert werden. Hinzu kommt, dass für einige Medikamente kein reproduzierbares Verdampfungsprofil erhalten werden konnte, wie z.B. in Abb. 38 für Midodrin gezeigt. Manuell lassen sich die Integrationsgrenzen nur schwer festlegen, was eine höhere Streuung zur Folge hat. Eine entsprechende Softwareentwicklung mit der auch die abstrakten, unförmigen Verdampfungsbereiche, wie sie mit den DIP-Systemen entstehen, interpretiert und ausgewertet werden können, kann hier Abhilfe schaffen.

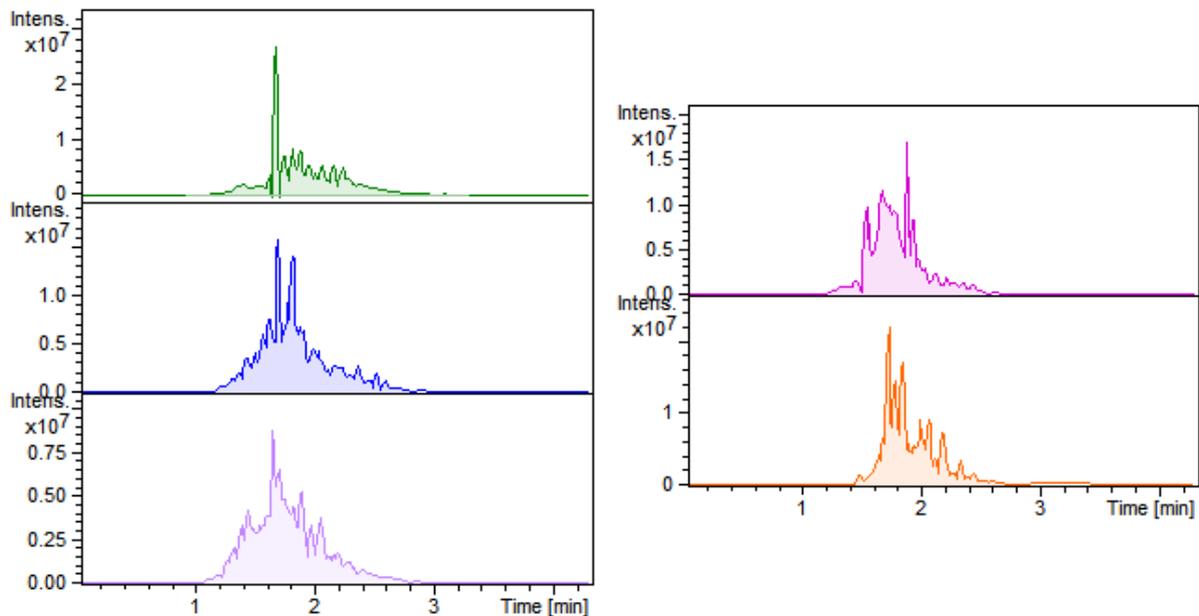


Abb. 38: Chronogramme von originalverpackten Midodrin-Tabletten gelöst in Methanol, ionisiert mit DIP-APCI. Es konnten keine reproduzierbaren Chronogramme erhalten werden.

#### 4.4.1.1 Clonazepam

Clonazepam zeigt, wie oben beschrieben, sowohl bei der Untersuchung mittels DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI, eine deutliche Abnahme des Wirkstoffes, der bereits durch ein Overlay der EICs für den protonierten Wirkstoff sichtbar wird (siehe Abb. 39). Eine Abnahme des Wirkstoffgehaltes ist bei Clonazepam nicht verwunderlich, da die Substanz lichtempfindlich ist, und sogar in der Packungsbeilage darauf hingewiesen wird, dass die Tabletten dem Originalgebinde nicht entnommen werden dürfen, um den Inhalt vor Licht zu schützen. Daher ist es fraglich, ob solche Substanzen in lichtdurchlässigen Schlauchblister für die patientenindividuelle Zweitverblisterung neu verpackt werden sollten oder wie es z.B. gemäß der USP vorgeschrieben wird, in einer lichtundurchlässigen Verpackung.

Mit der DIP-EESI wurde eine Abnahme des Wirkstoffes von ca. 20 % und mit der DIP-APCI sogar eine Abnahme von ca. 40 % detektiert. Beim Vergleich der beiden Ionisierungsmethoden wird deutlich, dass der Wirkstoff wesentlich besser mittels DIP-APCI ionisiert wird als mittels DIP-EESI.

Generell ist die Ionenausbeute mittels DIP-EESI geringer als die mittels DIP-APCI. Ein Vorteil ist, dass mit der DIP-EESI die Hilfsstoffe, die sich eventuell gelöst haben, weniger stark ionisiert werden, wodurch es zu weniger Interferenzen kommt. Bei allen Vorteilen der DIP-EESI konnte Clonazepam nur in geringen Mengen ionisiert werden. Der protonierte Wirkstoff war nur als untergeordnete Masse im Spektrum sichtbar (Abb. 40). Es konnten mit der DIP-EESI keine Verunreinigungen detektiert werden, die einen Unterschied zwischen original- und neuverpackter Tablette zeigten. Eine Steigerung der Konzentration der Lösung war nicht möglich, da in einer 0,15 g schweren Tablette laut Hersteller lediglich 0,5 mg Wirkstoff vorhanden sind. Auch wenn mit der DIP-EESI die Hilfsstoffe der Tablette nicht ionisiert und

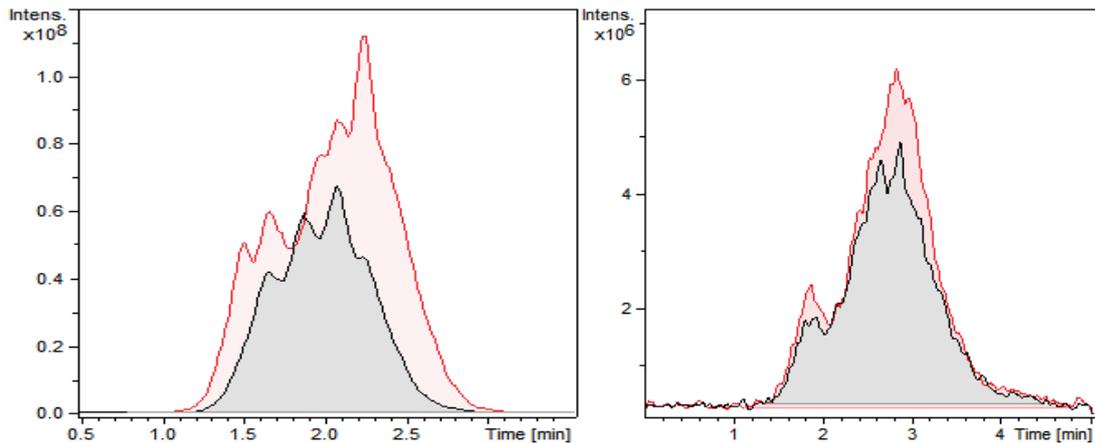


Abb. 39: Beispiele für Chronogramme von Clonazepam Tabletten (EIC für  $m/z = 316$ ). Rot: originalverpackte Tablette; Schwarz neuverpackte Tablette; Ionisierung mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (Rechts)

detektiert werden, wird die Quelle dennoch durch die verdampften Hilfsstoffe kontaminiert. Eine Analyse der Tablette in Pulverform, wodurch die Konzentration an Wirkstoff erhöht werden kann, bot sich wegen der Kontamination nicht an.

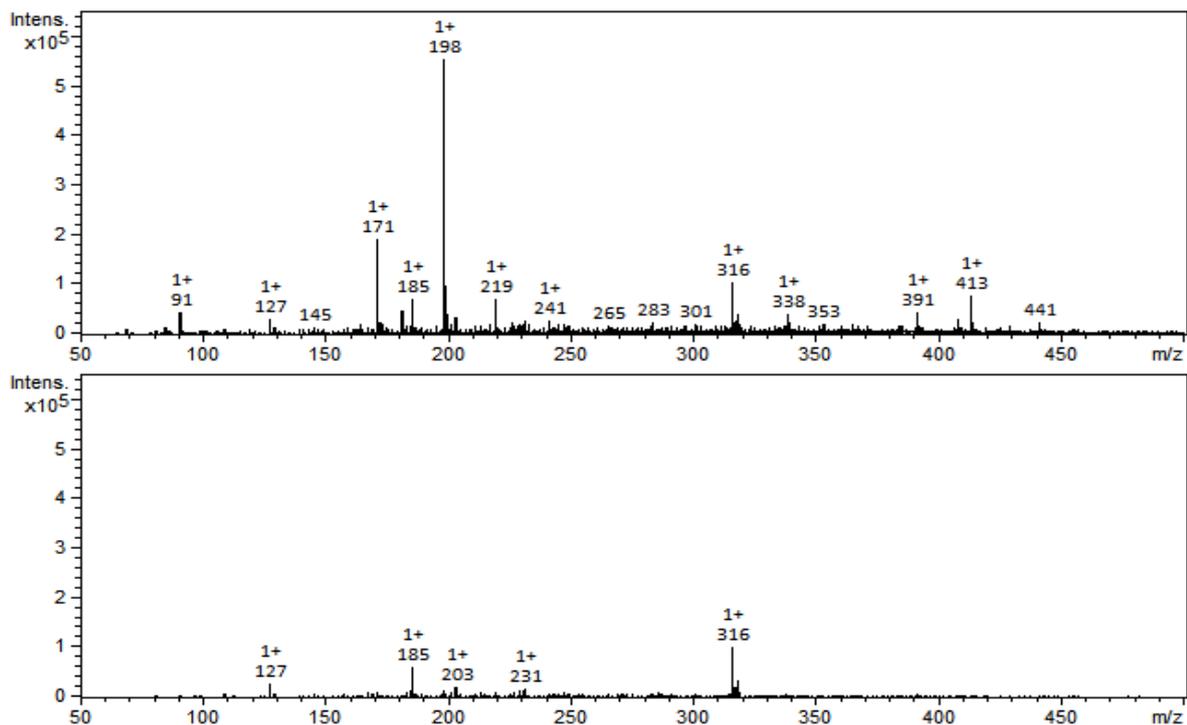


Abb. 40: Average Mass Spektrum von Clonazepam nach Analyse mit DIP-EESI. Oben ohne Hintergrundabzug, unten nach Hintergrundabzug. Das  $[M+H]^+$  von Clonazepam mit  $m/z = 316$  kann nur in untergeordneter Form detektiert werden.

Mit der DIP-APCI ließ sich der Wirkstoff in Lösung problemlos ionisieren. Es konnten in der halbierten neuverpackten Tablette drei  $m/z$ -Werte gefunden werden, die intensiver waren als in der originalverpackten Tablette,  $m/z = 252$ ,  $282$  und  $285$ , vgl. Abb. 41. Das vollständige Spektrum ist in Abb. 173 im Anhang 6.2.2 Seite 182 zu sehen.

Die Signale von  $m/z = 285$  sowie  $m/z = 257$  zeigten keinen Unterschied zwischen original- und neuverpackter

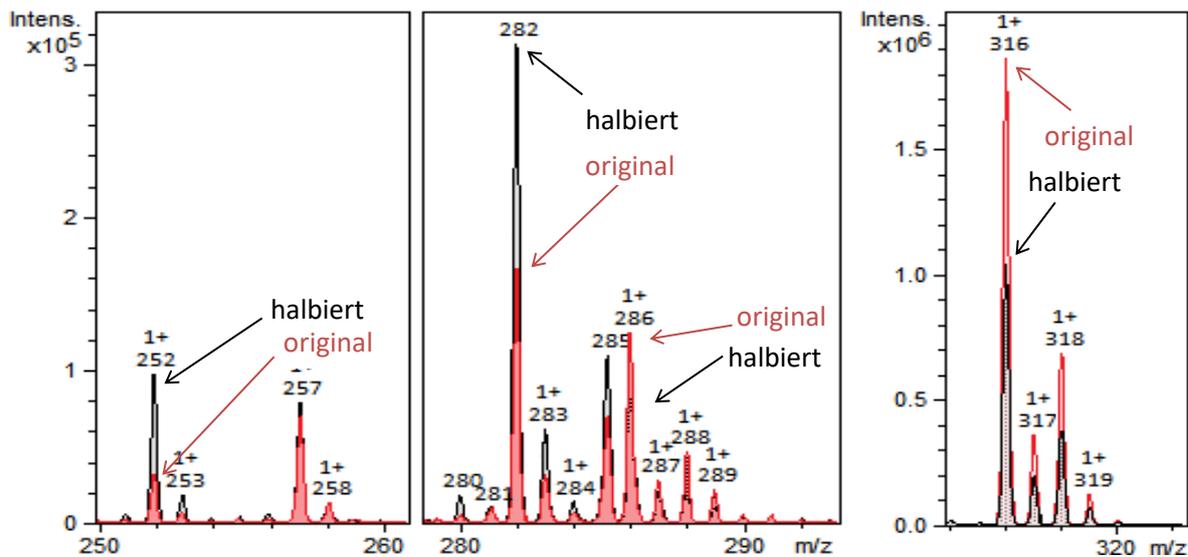


Abb. 41: Ausschnitte der Massenspektren der originalverpackten Clonazepam Tablette (rot) und der halbierten neuverpackten Tablette (schwarz) im Overlay. Rechts das Signal für den protonierten Wirkstoff. Links die Signale für die unbekannt Verunreinigungen ( $m/z = 252$  und  $282$ ), die in der halbierten neuverpackten Tablette deutlich intensiver sind als in der halben Tablette (Zoom 6x)

Tablette und konnten beide durch  $MS^2$ -Untersuchungen und über Vergleichsspektren als Fragmente des in der Tablette verwendeten Magnesiumstearats identifiziert werden (Abb. 42) und sind daher nicht ursächlich für die Wirkstoffabnahme. Das Signal  $m/z = 257$  wurde mituntersucht, da die Masse sehr intensiv im Spektrum detektiert wurde. Es bestand die Möglichkeit, dass es sich auch um eine unbekannt Verunreinigung handeln könnte, deren Konzentration in der neuverpackten Tablette nicht ansteigt.

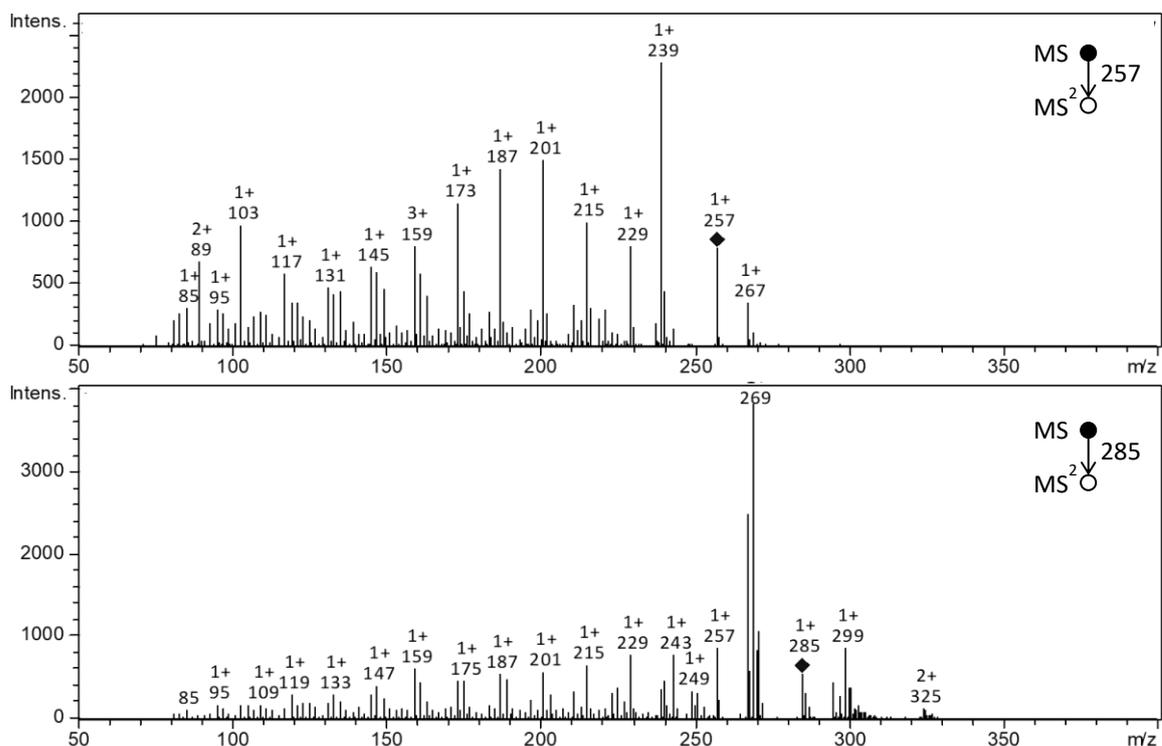


Abb. 42: Fragmentierung vom  $m/z = 257$  (Palmitat) und  $m/z = 285$  (Stearat) beides Fragmente des Magnesiumstearates, das als Hilfsstoff in der Formulierung verwendet wird.

Aus der Substanz mit  $m/z = 282$  konnten durch  $MS^2$ -Untersuchungen die Fragmente  $m/z = 254$  ( $\Delta m 28$ ) und  $236$  ( $\Delta m 46$ ) erhalten werden. Die Fragmentspektren von  $m/z = 282$  sind im Anhang 6.2.2 ab Seite 185 dargestellt. Beide Massendifferenzen wurden auch schon bei der Fragmentierung des Wirkstoffes beobachtet,  $m/z = 316 \rightarrow 288$  ( $\Delta m 28$ ) und  $m/z = 316 \rightarrow 270$  ( $\Delta m 46$ ).

Weiterführende  $MS^3$ -Untersuchungen von  $m/z = 282 \rightarrow 236$  ergaben die Fragmente  $m/z = 208$  ( $\Delta m 28$ ),  $207$  ( $\Delta m 29$ ) und  $180$  ( $\Delta m 56$ ). Auch diese Massendifferenzen konnten beim Wirkstoff beobachtet werden,  $m/z = 316 \rightarrow 270 \rightarrow 242$  ( $\Delta m 28$ ),  $241$  ( $\Delta m 29$ ) und  $214$  ( $\Delta m 56$ ). Die Fragmentierung sowie der Fragmentierungsweg von Clonazepam sind im Anhang 6.2.2 ab Seite 182 dargestellt. Eine Übersicht der erhaltenen Fragmente zeigt Tabelle 28.

Tabelle 28: Übersicht der erhaltenen  $MS^n$ -Fragmente des Wirkstoffs Clonazepam  $m/z = 316$  und der unbekanntes Substanz  $m/z = 282$ . Alle erhaltenen Fragmente zeigen zwischen der unbekanntes Substanz und dem Wirkstoff die Massendifferenz von 34 Da.

$m/z = 316 \rightarrow$	288	270	251	176			
		270	→	242	241	214	
$m/z = 282 \rightarrow$	254	236					
		236	→	208	207	180	

Für die Struktursuche der unbekanntes Substanz wurde angenommen, dass es sich um eine wirkstoffverwandte Substanz handelte. Diese Annahme konnte aufgrund der erhaltenen Fragmente, die sich alle um eine Massendifferenz von 34 unterschieden, gefestigt werden. Da das Isotopenmuster von  $m/z = 282$  nicht mehr das typische  $^{35/37}\text{Cl}$ -Isotopenmuster aufweist wie der Wirkstoff, konnte die Struktur aus Abb. 43 (2. von rechts) postuliert werden. Bei dieser Clonazepam-ähnlichen Substanz handelt es sich um Nitrazepam. Literaturspektren von Agilent [192] und aus der  $m/z$  Cloud [193] zeigen gleiche bzw. sehr ähnliche (Fragment-)Spektren, wodurch die Struktur von  $m/z = 282$  bestätigt wird.

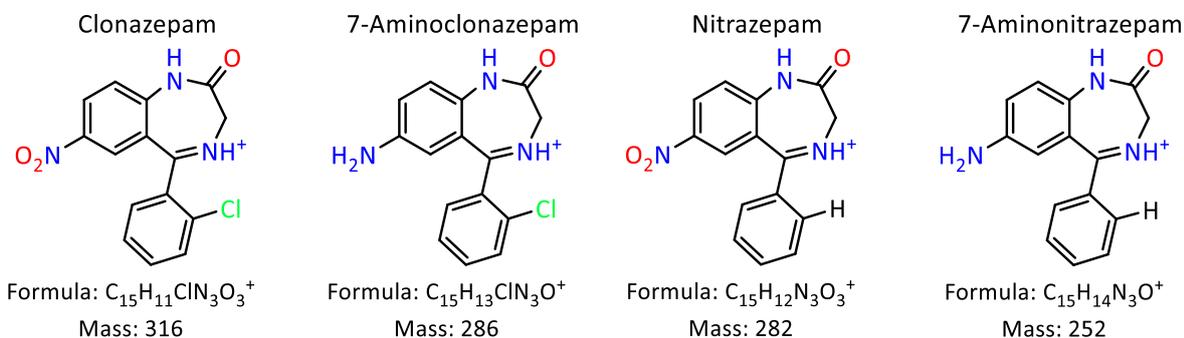


Abb. 43: Strukturformeln der Substanzen Clonazepam, 7-Aminoclonazepam, Nitrazepam und 7-Aminonitrazepam

Für die zweite unbekanntes Substanz  $m/z = 252$  wurde ein deutlich anderes Spektrum als das des Wirkstoffes oder des Nitrazepams erhalten. Die Fragmentspektren der unbekanntes Substanz  $m/z = 252$  sind im Anhang 6.2.2 ab Seite 184 dargestellt. Auch hier konnte kein  $^{35/37}\text{Cl}$ -Isotopenmuster gefunden werden. Weiter

deuteten einige Fragmente mit  $\Delta m$  17 darauf hin, dass die Substanz eine endständige Aminogruppe besitzt. Ausgehend von Nitrazepam, das zu der unbekannt Substanz eine Massendifferenz von 30 Da aufweist, wurde vermutet, dass sich statt der Nitrogruppe eine Aminogruppe gebildet haben könnte. Mit der so postulierten Substanz, abgebildet in Abb. 43 rechts, dem 7-Aminonitrazepam konnten alle Massen der  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren erklärt werden. Der Fragmentierungsweg ist ebenfalls im Anhang 6.2.2 ab Seite 184 nachzulesen. Die Literaturspektren von Agilent [192] und aus der  $m/z$  Cloud [193] weisen sehr ähnliche (Fragment-)Spektren auf, wodurch auch hier die Struktur bestätigt wird. Es konnten keine Angaben darüber gefunden werden, dass sich 7-Aminonitrazepam ohne enzymatischen Einfluss oder gezielte Reduktion aus Nitrazepam bildet [194–196]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass sich 7-Aminonitrazepam in der Tablette gebildet hat. Es könnte aber sein, dass 7-Aminonitrazepam durch die Corona-Entladung entsteht. Dass prinzipiell Reduktionen durch Corona-Entladungen im positiven Modus möglich sind, wurde von Pei et al. durch die Reduktion von Chinon und Chinon-Derivaten beschrieben [197]. In dem Fall, dass sich 7-Aminonitrazepam durch die Corona-Entladung gebildet hat, müsste sich auch das 7-Aminoclonazepam, durch Reduktion der Nitro-Gruppe von Clonazepam, finden lassen. Mit  $m/z = 286$  und dem erwarteten  $^{35/37}Cl$ -Isotopenmuster konnte ein Signal für 7-Aminoclonazepam gefunden werden. Die erhaltenen Fragmentspektren sowie der Fragmentierungsweg sind im Anhang 6.2.2 ab Seite 186 dargestellt. Die Fragmentierung dieses Signals zeigt deutlich die aus der Literatur bekannten Fragmentensignale. Eine Abnahme des Signals in der halben neuverpackten Tablette konnte ebenfalls beobachtet werden.

Eine Überprüfung der Ergebnisse mittels HPLC-ESI-MS konnte nur in Teilen erfolgen, da nicht mehr ausreichend Probenmaterial der halben Tabletten zur Verfügung stand. Neue halbierte und neuverpackte Tabletten konnten nur von einer zweiten Charge erhalten werden, die nicht mehr denselben Lagerbedingungen ausgesetzt war. Daher konnten nur noch die originalverpackten Tabletten untersucht werden. Hier wurde in sehr geringer Konzentration ein Peak für das 7-Aminoclonazepam detektiert. Die Konzentration war jedoch so gering, dass keine  $MS^2$ -Untersuchungen möglich waren. Es wurden keine Peaks für Nitrazepam und 7-Aminonitrazepam detektiert. Hier sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei der HPLC-ESI-MS Methode um keine validierte Methode handelt, mit der es gesichert ist, dass die Verbindungen 7-Aminoclonazepam, Nitrazepam und 7-Aminonitrazepam detektiert werden. Die aus Ph. Eur. 7.0 entnommene HPLC Methode ist nicht für die oben beschriebenen Substanzen ausgelegt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Substanzen von der Methode nicht erfasst werden oder vom Wirkstoff überlagert werden. Da mit der DIP-EESI der Wirkstoff ebenfalls nur in geringem Maße ionisiert wurde, besteht außerdem die Möglichkeit, dass auch mit HPLC-ESI die Substanzen nicht ausreichend ionisiert werden konnten, um sie nachzuweisen. Daher wurden weitere Untersuchungen mit HPLC-APCI-MS durchgeführt. Mit der APCI konnte ein Peak für  $m/z = 282$  detektiert werden. Für diesen Peak konnte nicht das bekannte Nitrazepamspektrum erhalten werden. Somit können auch mittels HPLC-APCI-MS die beobachteten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass auch mit der HPLC-APCI-MS der Clonazepam-Peak bei Verwendung derselben Lösung, deutlich intensiver ist als mit HPLC-ESI-MS.

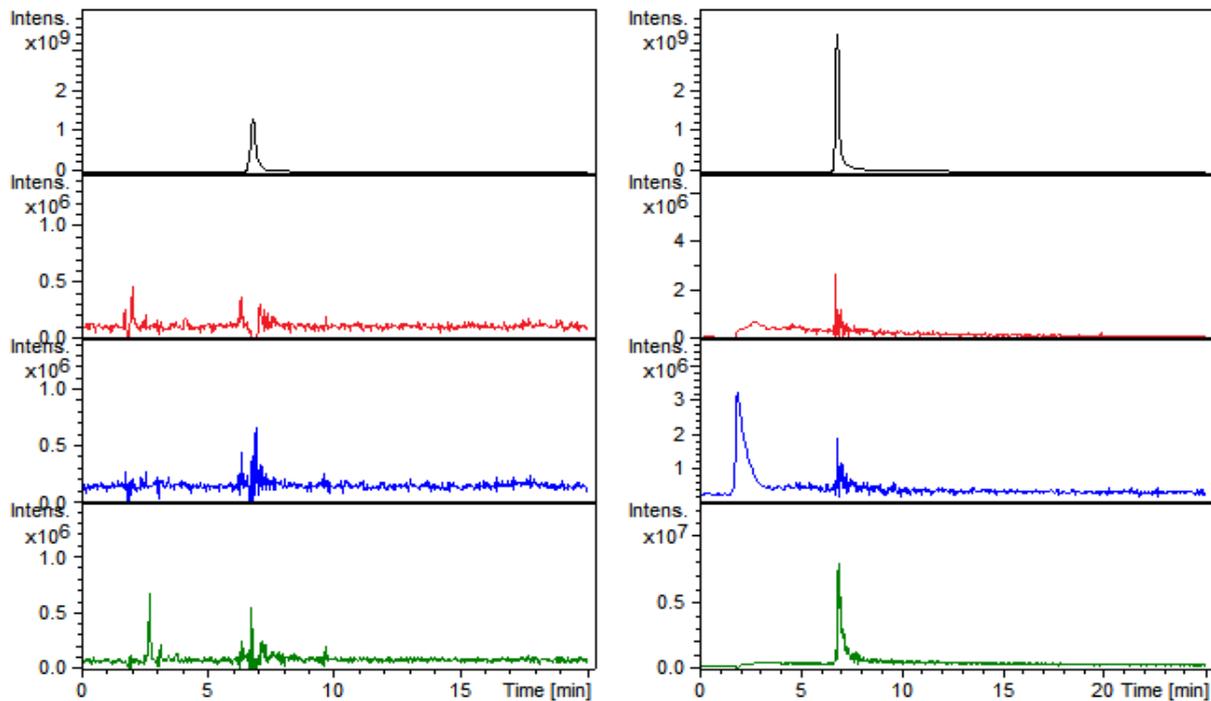


Abb. 44: Chromatogramme der Analyse von Clonazepam Tabletten mit HPLC-ESI-MS (links) und mit HPLC-APCI-MS (rechts); schwarz: EIC<sup>4</sup> von  $m/z = 316$  entspricht dem protonierten Wirkstoff; rot: EIC von  $m/z = 252$ ; blau EIC von  $m/z = 282$ ; grün: EIC von  $m/z = 286$

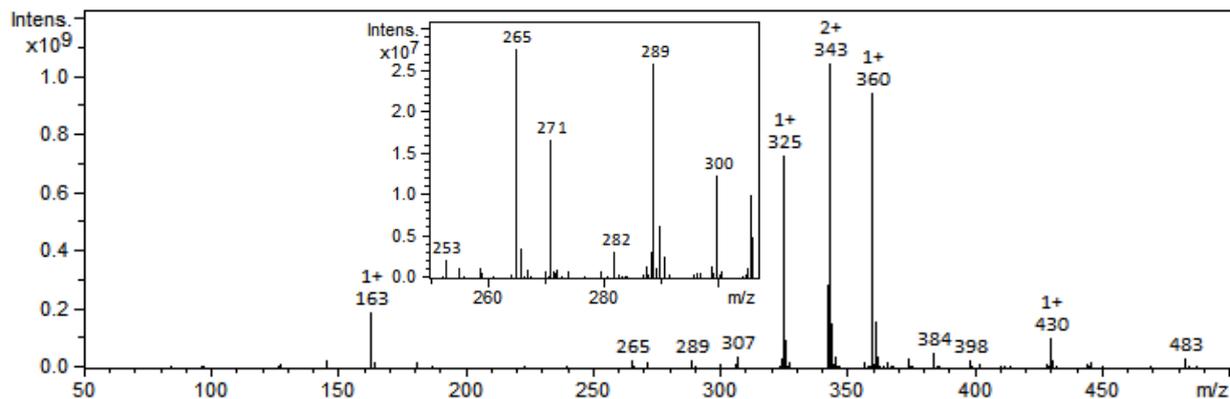


Abb. 45: Massenspektrum des Peaks bei 1,9 min, der im EIC von  $m/z = 282$  detektiert wurde,  $m/z = 282$  ist nur als untergeordnetes Signal zu sehen, wie in der Vergrößerung dargestellt ist. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Nitrazepam handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DIP-EESI für Clonazepam nicht geeignet ist, da sich Clonazepam nur schlecht mit ESI ionisieren lässt. Dies wurde durch die Untersuchung mit HPLC-ESI und HPLC-APCI bestätigt. Mit der DIP-APCI konnten ohne langwierige Methodenentwicklung drei wirkstoffverwandte Substanzen in der Probe nachgewiesen werden, die mit der Ph. Eur. Methode nicht detektiert werden konnten. Zum Nachweis dieser Substanzen muss erst noch eine chromatographische Methode entwickelt werden, was nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Es muss aber auch festgehalten werden, dass es durch Reduktion mittels Koronaentladung zur Bildung von 7-Aminonitrazepam und 7-Aminoclonazepam gekommen sein kann, wodurch eine zukünftige Quantifizierung der Verunreinigung nicht ohne weiteres erfolgen kann.

<sup>4</sup> EIC: Extracted Ion Chronogram oder Extracted Ion Chromatogram bei chromatographischen Messungen

#### 4.4.1.2 Primidon

Auch Primidon zeigt, sowohl bei der Untersuchung mit DIP-APCI als auch mit DIP-EESI und HPLC-ESI-MS, eine deutliche Differenz des Wirkstoffes zwischen original- und neuverpackten halbierten Tabletten.

Mit DIP-APCI wurde eine Differenz des Wirkstoffes von ca. 20 % detektiert und mit DIP-EESI eine Abnahme von ca. 30 %. Die Abnahme des Wirkstoffes konnte mit HPLC-ESI-MS bestätigt werden, hier konnte nur eine Differenz von ca. 18 % bestimmt werden. Es muss hier berücksichtigt werden, dass nur Mischmuster aus 3 Tabletten hergestellt werden konnten, die den erlaubten Schwankungen, die in Kapitel 1.3.1 beschrieben wurden, unterliegen. Hinzu kommt, dass die DIP-APCI-Werte einer größeren Schwankung unterliegen als die DIP-EESI-Werte, siehe Abb. 37 und Tabelle 27. So lässt sich der Unterschied zwischen den DIP-APCI und DIP-EESI Ergebnissen erklären. Aufgrund der kleineren Standardabweichung wird von den beiden Verfahren die DIP-EESI als vertrauenswürdiger eingestuft.

Mit keinem der drei Verfahren konnten Verunreinigungen in der Menge detektiert werden, dass 20 % Wirkstoffverlust erklärt werden können. Mit DIP-EESI und mit DIP-APCI wurden jeweils sechs  $m/z$ -Werte detektiert, die einen signifikanten Unterschied in ihrer Intensität zwischen original- und neuverpackten Tabletten besaßen. Es konnten keine übereinstimmenden Werte zwischen DIP-APCI und DIP-EESI detektiert werden. Von den sechs  $m/z$  Werten die als signifikant über die Intensität ermittelt wurden, wurden EICs angefertigt und die Fläche unter dem Verdampfungsbereich integriert. Die bestimmten Flächen wurden erneut mit dem Mittelwert-t-Test überprüft. Über die Flächenauswertung fiel der Mittelwert-t-Test für alle ermittelten Substanzen negativ aus, d.h. es konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, bei dem von den untersuchten Substanzen mehr in der neuverpackten als in der originalverpackten Tablette vorlag. Bei den DIP-EESI Messungen zeigte der Flächenvergleich der sechs ermittelten Substanzen ( $m/z = 220, 241, 335, 394, 395$  und  $416$ ) ca. 20 – 35 % weniger Substanz in der neuverpackten Tablette. Diese Werte hatten die gleiche Tendenz wie der Wirkstoff. Um den Verlust des Wirkstoffes erklären zu können, hätten aber Substanzen gefunden werden müssen, die in höherer Konzentration in der neuverpackten Tablette vorliegen. Dies war nicht der Fall.

Bei den DIP-APCI Messungen wurde beim Vergleich der Intensitäten für die Werte  $m/z = 176, 164, 148, 135, 119$  und  $91$  ein signifikanter Unterschied beobachtet. Sie waren bereits bei der Untersuchung der Chromogramme aufgefallen, da sie zu einer anderen Zeit im Chromogramm detektiert wurden als der Wirkstoff (Abb. 46). Außer dem Signal von  $m/z = 164$ , konnten keiner der sechs  $m/z$ -Werte einer bekannten Verunreinigung zugeordnet werden. Die Strukturen der bekannten Verunreinigungen sind in Abb. 48 gezeigt. Von den oben genannten Massen zeigten die Flächen von  $m/z = 176, 164$  und  $91$  zwar die Tendenz, dass sie intensiver in der neuverpackten Tablette als in der originalverpackten Tablette vorhanden sind. Diese Differenz von 2-3 % liegt aber innerhalb der relativen Standardabweichung von ca. 6 % (Abb. 47). Wie auch bei Ph. Eur. Methoden kann auch bei den DIP-Methoden nicht ausgeschlossen werden, dass die potentiellen Abbauprodukte nicht oder nur in geringen Teilen in Methanol löslich sind und so der Analyse nicht zugänglich sind. Ein anderes Lösungsmittel wurde nicht verwendet, um sich möglichst eng an die Vorgaben der Ph. Eur. zu halten.

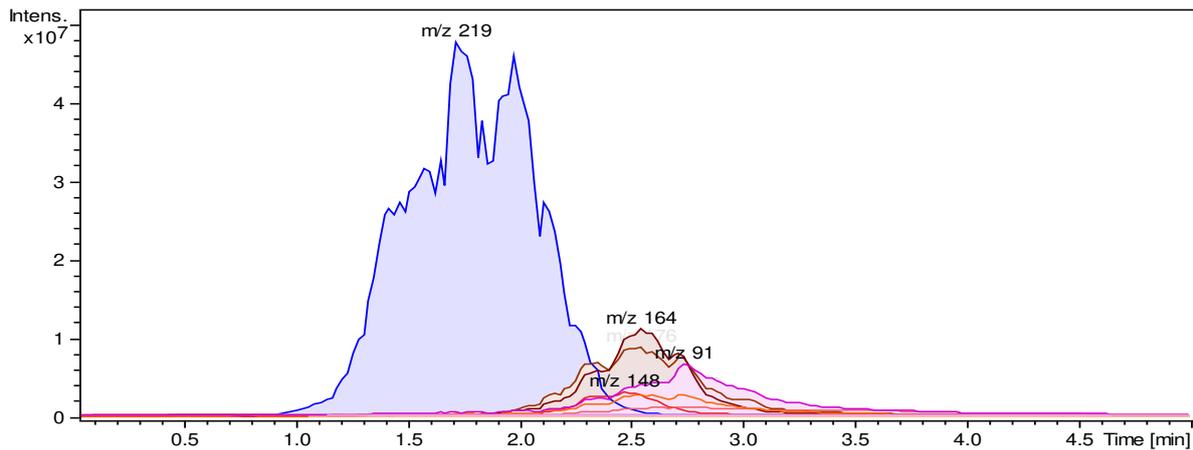


Abb. 46: Chronogramm von Primidon Tabletten. Blau  $m/z = 219$  entspricht dem  $[M+H]^+$  des Wirkstoffes, rot bis braun auffällige Massen aus dem Average Mass Spectrum, die nicht dem Wirkstoff oder einer bekannten Verunreinigung zugeordnet werden konnten ( $m/z = 176, 164, 148, 135, 119$  und  $91$ ).

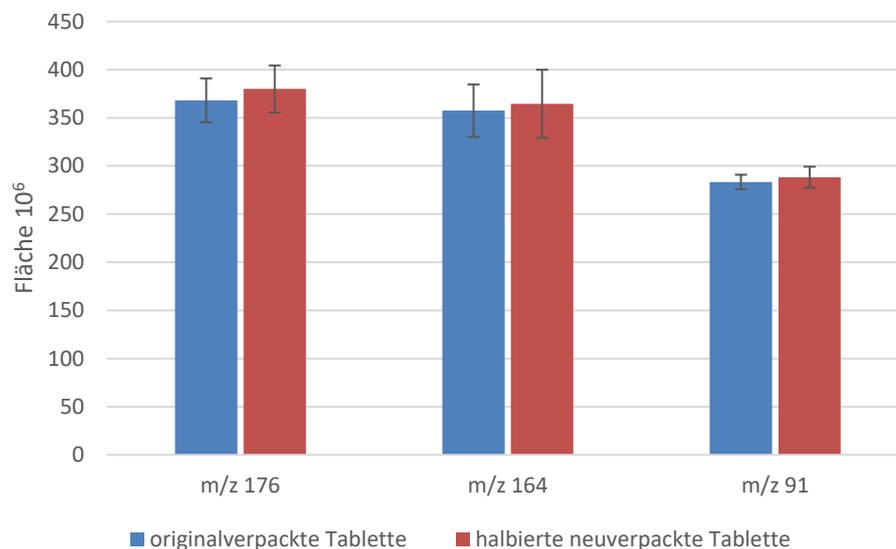


Abb. 47: Flächenunterschiede der drei  $m/z$ -Verhältnisse, die eine Tendenz der Konzentrationszunahme in der neuverpackten Tablette zeigen, wie sie mit DIP-APCI erhalten wurden

Eine weitere Möglichkeit, neben der Bildung von Abbauprodukten des Wirkstoffes, die die geringere Konzentration an Wirkstoff in den neuverpackten Tabletten erklären kann, ist die, dass die neuverpackten Tabletten nicht ausreichend vor Feuchtigkeit geschützt waren und Wasser gezogen haben. Für eine Abnahme von 20 % müsste aber eine Tablette, die 250 mg Wirkstoff enthält ca. 50 mg Wasser gezogen haben. Das Durchschnittsgewicht einer original verpackten Tablette betrug 284,0 mg ( $n = 5$ ). Eine halbierte Tablette wog durchschnittlich 142,0 mg ( $n = 10$ ). Es konnte keine Gewichtszunahme durch Wasser festgestellt werden, die den Wirkstoffverlust erklärt.

#### 4.4.2 Vergleich DIP-APCI, DIP-EESI, HPLC-MS und HPLC-UV

Neben den vergleichenden Analysen von originalverpackten und neuverpackten halbierten Tabletten wurden die Ergebnisse der DIP-APCI und DIP-EESI mit denen verglichen, die mittels HPLC-UV und HPLC-ESI-MS, erhalten wurden.

##### 4.4.2.1 Primidon

Wie bereits in Kapitel 4.4.1.2 Primidon beschrieben, wurden mit DIP-APCI als auch mit DIP-EESI die auffälligen  $m/z$ -Verhältnisse 176, 164, 148, 119 und 91 untersucht sowie nach den bekannten Verunreinigungen<sup>5</sup>, die in Abb. 48 dargestellt sind, gesucht.

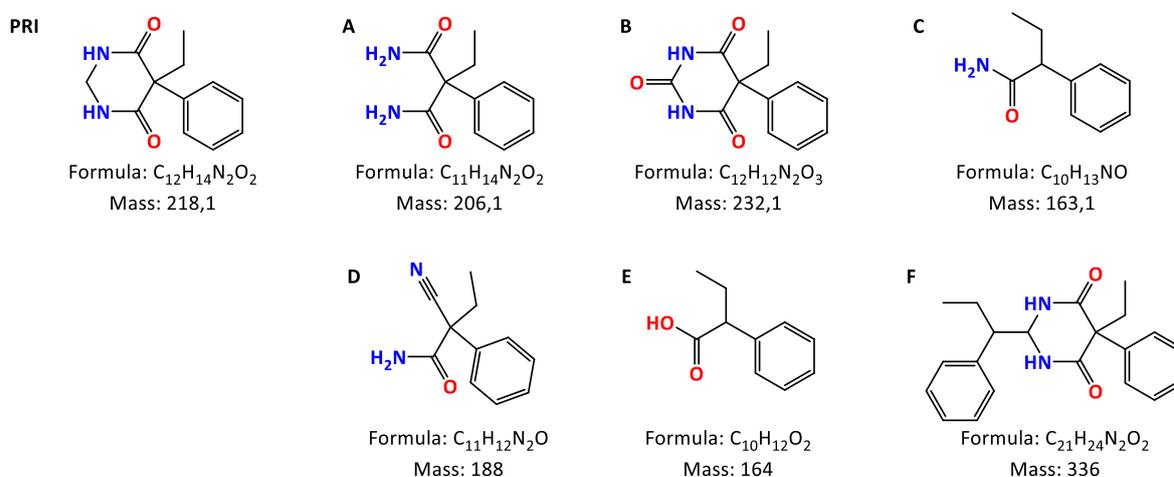


Abb. 48: Primidon (5-Ethyl-5-phenyldihydropyrimidin-4,6-(1H,5H)-dion; PRI) und seinen sechs bekannten in Ph. Eur. genannten Verunreinigungen A bis F (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.8 zusammengefasst)

Bei der Untersuchung der Primidon-Tabletten mit HPLC-ESI-MS konnten nur die Verunreinigungen A, B und F detektiert werden. Die Retentionszeiten der Verunreinigungen stimmt mit denen in Ph. Eur. theoretischen Retentionszeiten überein. Die Chromatogramme und Massenspektren von Primidon und seinen Verunreinigungen sind im Anhang 6.2.8 dargestellt.

Mit DIP-APCI konnte für jede bekannte Verunreinigung im Chronogramm ein Verdampfungsbereich detektiert werden (die Chronogramme sind im Anhang 6.2.8 dargestellt). Die Verunreinigungen A, C und E können jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Durch Fragmentierung der vergleichsweise kleinen Moleküle mit 206 Da, 163 Da und 164 Da, konnten jeweils nur 2 bis 3 intensive Fragmente erhalten werden, die zwar den Molekülen zugeordnet werden können, aber nicht für eine Identifizierung

<sup>5</sup> Die im europäischen Arzneibuch und dem US-amerikanischen Arzneibuch beschriebenen Substanzen werden als bekannten Verunreinigungen bezeichnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für Substanzen, die in beiden Arzneibüchern gelistet sind, entsprechen den Bezeichnungen des europäischen Arzneibuches. Ansonsten wird die Bezeichnung des jeweiligen Arzneibuches verwendet.

ausreichen. Verunreinigung B, D und F lieferten ausreichend Fragmente, um eine Identifizierung zu ermöglichen. Die entsprechenden Spektren und möglichen Fragmentierungswege aller Verunreinigungen sind im Anhang 6.2.8 ab Seite 221 dargestellt.

Mit der DIP-EESI, die wie bereits beschrieben, weniger intensive Chronogramme bzw. Spektren liefert, konnten von den kleinen Molekülen ebenfalls die Verunreinigung A, C und E detektiert werden. Während A und C die gleichen Spektren zeigen, wie sie auch mit der DIP-APCI detektiert wurden, weichen die Spektren, die für Verunreinigung E erhalten wurden, voneinander ab. Dies kann an der geringeren Intensität des DIP-EESI-Spektrums liegen, wodurch Hintergrundmassen stärker in den Vordergrund rücken als bei der DIP-APCI und das Spektrum verfälschen. Es konnten alle erhaltenen Fragmente mit der Verunreinigung E begründet werden.

Da die Verunreinigungen C und E nicht mit HPLC-ESI-MS detektiert werden konnten, kann das Ergebnis der ambienten Ionisationsverfahren nicht bestätigt werden. Das Spektrum, der bei 2,8 min detektierten Verunreinigung A stimmt mit denen der ambienten Ionisationsverfahren überein.

Die Verunreinigung D konnte mit DIP-EESI und HPLC-ESI-MS nicht detektiert werden. Eine Verifizierung bzw. ein Vergleich mit dem DIP-APCI Ergebnis ist daher nicht möglich.

Für die Verunreinigungen B konnte mit der DIP-EESI ein Fragmentspektrum, das neben mehreren kleinen Signalen nur ein intensives Signal aufwies, detektiert werden. Das Signal war trotzdem zu klein für eine weitere Fragmentierung (s. Anhang 6.2.8, Abb. 227, Seite 222). Daher konnte die Verunreinigung B nicht identifiziert werden.

Das HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der Verunreinigung B besteht lediglich aus drei Massen ( $m/z = 215, 188$  und  $177$ ), jeweils 2 Fragmente stimmen mit dem DIP-APCI-Spektrum ( $m/z = 215$  und  $177$ ) sowie dem DIP-EESI-Spektrum ( $m/z = 215$  und  $188$ ) überein (s. Anhang 6.2.8, Abb. 227, Seite 222). Eine Wertung mit welcher Ionisierungsmethode die Verunreinigung B besser oder sicherer detektiert wurde, kann auf Grundlage dieser Daten nicht erfolgen.

Die Verunreinigung F konnte ebenfalls mit der DIP-EESI detektiert und fragmentiert werden (s. Anhang 6.2.8, Abb. 237, Seite 227). Alle beobachteten Fragmente konnten mit der Struktur für Verunreinigung F erklärt werden.

Die Spektren, der DIP-APCI, DIP-EESI und HPLC-ESI-MS zeigen hier jedoch große Unterschiede. Das DIP-APCI MS<sup>2</sup>-Spektrum besteht aus sehr vielen überwiegend schwachen Signalen. Das HPLC-ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum besteht nur aus fünf Fragmenten, von denen lediglich drei mit dem DIP-APCI MS<sup>2</sup>-Spektrum übereinstimmen. Zwischen dem HPLC-ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum und dem DIP-EESI MS<sup>2</sup>-Spektrum gibt es hingegen keine Übereinstimmungen. Auch hier ist eine Wertung mit welcher Ionisierungsmethode die Verunreinigung F besser oder sicherer detektiert werden kann, auf Grundlage dieser Daten nicht möglich. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Zusammenfassung des Vergleichs der Ergebnisse von DIP-APCI, DIP-EESI und HPLC-ESI-MS

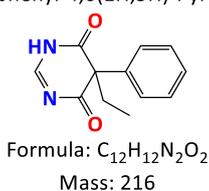
Verunreinigung		A	B	C	D	E	F
[M+H] <sup>+</sup>		207	233	164	189	165	337
Detektion und Identifikation der Verunreinigung mit HPLC-MS bei		2,8 min	6,0 min				15,8 min
Anzahl der Verunreinigung zuordbarer Fragmente (hier nur MS/MS berücksichtigt)	DIP-APCI	2	9	2	11	4	18
	DIP-EESI	3	5	2	---	5	7
Ist eine Identifikation ausschließlich über die erhaltenen Fragmente möglich	DIP-APCI	nein	ja	nein	ja	nein	ja
	DIP-EESI	nein	nein	nein	nein	nein	ja
Wurden vergleichbare Spektren mit DIP-APCI und DIP-EESI gefunden		ja	nein	ja	---	nein	nein
Anzahl der Übereinstimmungen: Mit der ambienten Ionisationsmethode gefundenen Fragment / der mit HPLC-ESI-MS gefundenen Fragmente	DIP-APCI	2/4	2/3	---	---	---	3/5
	DIP-EESI	3/4	2/3	---	---	---	0/5

Wie zu Beginn des Kapitels 4.4.2.1 beschrieben, wurden mit beiden Methoden (DIP-APCI und DIP-EESI) m/z-Verhältnisse im Spektrum detektiert, die nicht dem Wirkstoff oder den bekannten Verunreinigungen zugeordnet werden konnten.

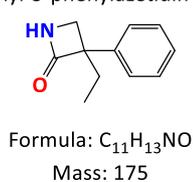
Hierbei handelt es sich um m/z = 217, das mit dem Wirkstoff verdampft und um m/z = 176, 148, 135, 119 und 91, die anschließend verdampfen. Diese Substanzen wurden alle bei Untersuchungen der Tabletten mit der DIP-APCI detektiert. Ein weiteres Signal bei m/z = 394 wurde bei Untersuchungen mit DIP-EESI detektiert. Da keine dieser m/z-Verhältnisse mit HPLC-ESI-MS detektiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Verbindungen bei der Verdampfung oder der Ionisierung bilden. Alle Fragmentspektren und möglichen Fragmentierungswege der ermittelten Moleküle sind im Anhang 6.2.8 ab Seite 231 dargestellt.

Die im Folgenden im Detail beschriebenen Moleküle sind in Abb. 49 dargestellt.

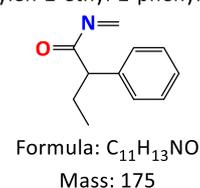
5-Ethyl-5-phenyl-4,6(1H,5H)-Pyrimidindion



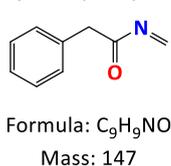
3-Ethyl-3-phenylazetidin-2-on



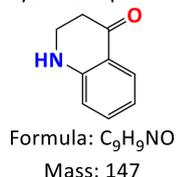
N-Methylen-2-ethyl-2-phenylacetamid



N-Methylen-2-phenylacetamid



2,3-Dihydro-1H-quinolin-4-on



1-Phenylprop-2-en-1-ol



Phenylacetaldehyd



Propylbenzol

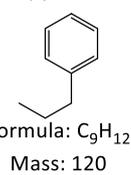


Abb. 49: Mögliche Strukturen der unbekannteten Substanzen.

Für m/z = 217, das eine Massendifferenz von -2 Da zum Wirkstoff aufweist, wurde als wahrscheinlichste Substanz 5-Ethyl-5-phenyl-4,6(1H,5H)-Pyrimidindion ermittelt. Das MS<sup>2</sup>-Spektrum sowie der Fragmentierungsweg von 5-Ethyl-5-phenyl-4,6(1H,5H)-Pyrimidindion für die MS<sup>2</sup>-Fragmentierung sind in Abb. 50 zu

sehen. Die weiteren Spektren der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung sowie der vollständige Fragmentierungsweg befinden sich in Anhang 6.2.8 in Abb. 241, Seite 231.

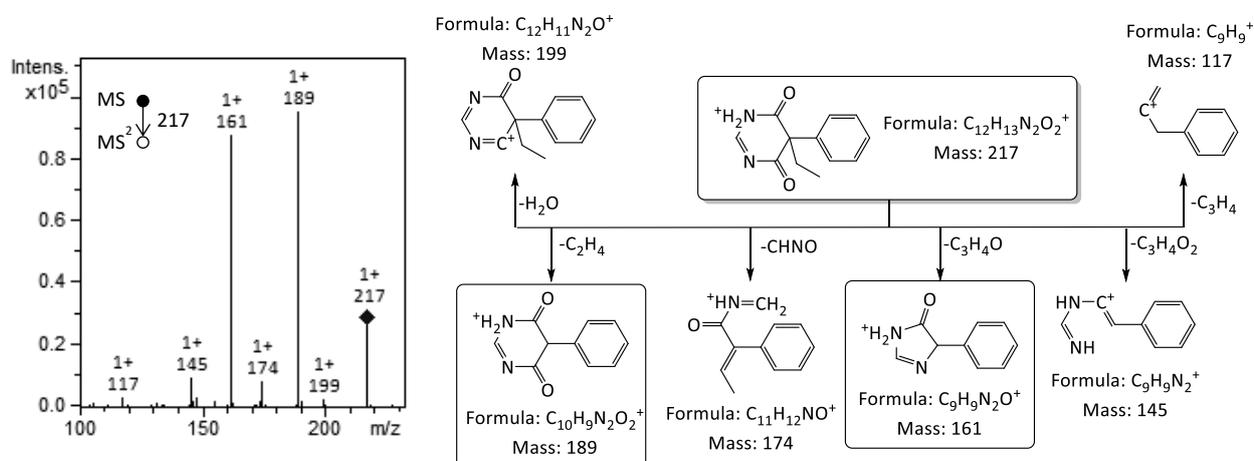


Abb. 50: Links: MS<sup>2</sup>-Fragmentierung des unbekannten Signals bei  $m/z = 217$ , ionisiert mit DIP-APCI; Rechts: Mögliche Struktur und Fragmentierungsweg der unbekannten Substanz

Das Signal  $m/z = 176$  hat eine Massendifferenz von  $-43$  Da im Vergleich zum Wirkstoff. Hierbei kann es sich um den Verlust von CHNO also der Peptidbindung handeln. Ob sich dabei *3-Ethyl-3-phenylazetidin-2-on* bildet oder eine verwandte Struktur, wie *N-Methylen-2-ethyl-2-phenylacetamid* kann nicht beantwortet werden, da beide Strukturen dieselben Fragmente bilden können. Ebenso kann nicht beantwortet werden, ob die Substanz bereits in der Tablette vorlag, oder erst durch den Analyseprozess entstanden ist, da sie prinzipiell aus dem Wirkstoff entstehen kann. Das MS<sup>2</sup>-Spektrum sowie der mögliche Fragmentierungsweg von *3-Ethyl-3-phenylazetidin-2-on* und *N-Methylen-2-ethyl-2-phenylacetamid* für die MS<sup>2</sup>-Fragmentierung sind in Abb. 51 gezeigt. Die weiteren Spektren der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung sowie der vollständige Fragmentierungsweg sind in Anhang 6.2.8 in Abb. 243, Seite 232 dargestellt.

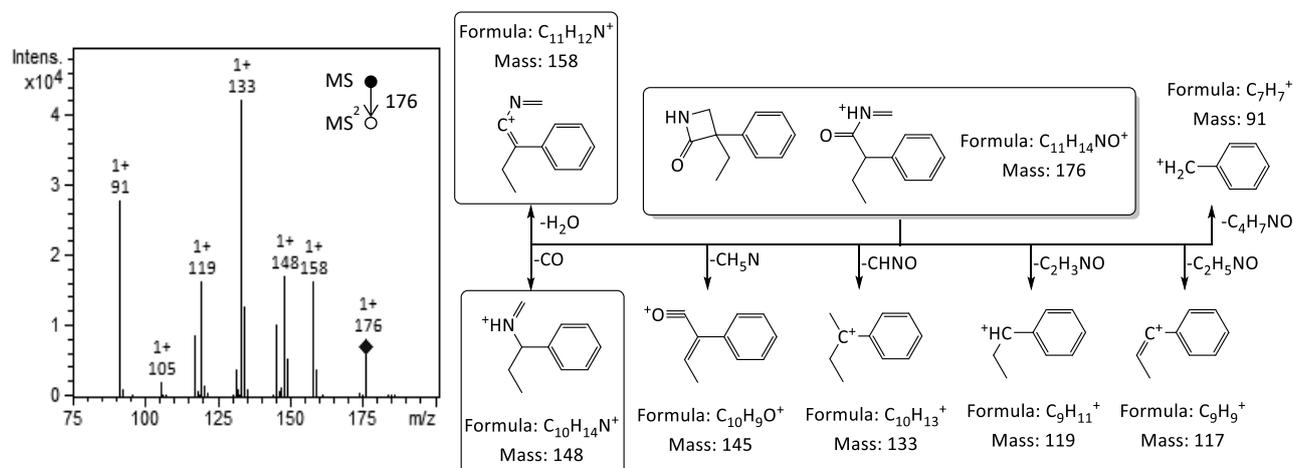


Abb. 51: Links: Fragmentierung des unbekannten Signals bei  $m/z = 176$ , ionisiert mit DIP-APCI; Rechts: Mögliche Strukturen und möglicher Fragmentierungsweg der unbekannten Substanz.

Das Signal  $m/z = 148$  zeigt eine Massendifferenz von  $-71$  Da zum Wirkstoff und ist damit bereits weit entfernt von einer wirkstoffverwandten Substanz. Über die Fragmentierungsuntersuchungen ließ sich für diese Substanz *2,3-Dihydro-1H-quinolin-4-on* oder *N-Methylen-2-phenylacetamid* als mögliche Strukturen ermitteln. Wobei *2,3-Dihydro-1H-quinolin-4-on* aufgrund der Fragmentspektren als wahrscheinlicher erachtet wird. So lässt sich  $m/z = 107$  nur durch den Verlust von  $C_2H_3N$  (41 Da) erklären, um diese Masse aus *N-Methylen-2-phenylacetamid* zu abstrahieren, müsste neben bzw. nach dem Verlust von HCN (27 Da)  $CH_2$  (14 Da) aus dem Molekül entfernt werden. Der Verlust von  $CH_2$  könnte aus der Kette zwischen dem Benzolring und der Alkoholgruppe erfolgen oder aus dem Benzolring selbst erfolgen. Wahrscheinlicher wäre bei *N-Methylen-2-phenylacetamid* eine  $\alpha$ -Spaltung zwischen der Aminomethylcarbonyl-Gruppe und der Benzylgruppe, wodurch  $m/z = 91$  als intensiveres Signal beobachtet werden müsste. Auch für die Bildung des intensiven Fragments  $m/z = 92$  aus  $m/z = 130$ , wie es bei den  $MS^3$ -Untersuchungen beobachtet wurde, müsste sich zunächst aus der Kette und dem Benzolring Quinolin bilden, aus dem dann Propynyliden ( $C_3H_2$ ) abstrahiert wird. Auch hier wird eher die schrittweise Abstraktion von HCN gefolgt von CH erwartet, wodurch  $m/z = 91$  entsteht oder aber der vollständige Verlust der Kette ( $C_3H_3N$ , 53 Da), was zu dem Fragment  $m/z = 77$  führt. Beide Fragmente werden nur mit sehr geringer Intensität im  $MS^3$ -Spektrum beobachtet.

Das  $MS^2$ -Spektrum sowie der mögliche Fragmentierungsweg von *2,3-Dihydro-1H-quinolin-4-on* für die  $MS^2$ -Fragmentierung sind in Abb. 52 dargestellt. Die weiteren Spektren der  $MS^3$ -Fragmentierung sowie der vollständige Fragmentierungsweg befinden sich in Anhang 6.2.8 in Abb. 247, Seite 233.

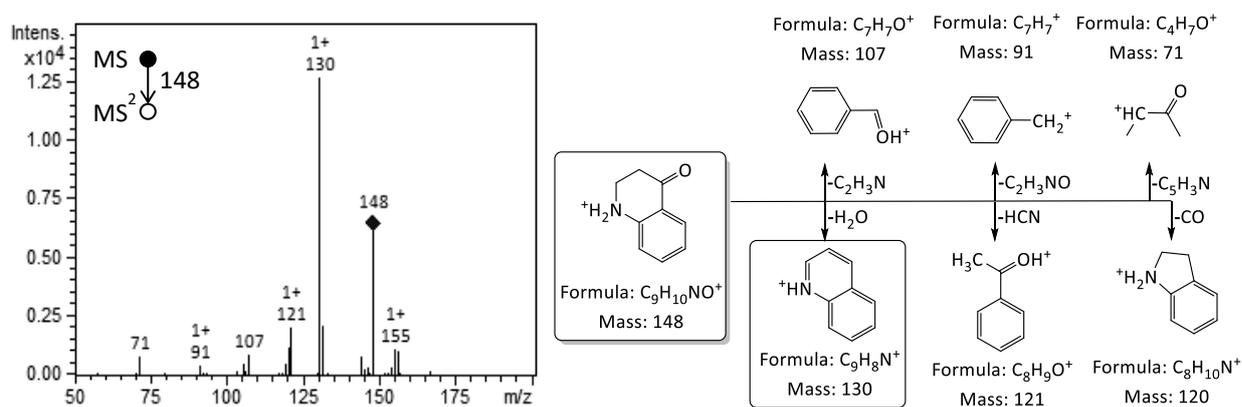


Abb. 52: Links: Fragmentierung der unbekannt  $m/z = 148$  ionisiert mit DIP-APCI.; Rechts mögliche Struktur und möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Substanz

Das Signal  $m/z = 135$  hat eine Massendifferenz von  $-84$  Da zum Wirkstoff und ist damit ebenfalls weit entfernt von einer wirkstoffverwandten Substanz. Da das erhaltene Fragmentspektrum aufgrund der Größe des Moleküls von 134 Da nur wenig Informationen liefern konnte, wurde *1-Phenylprop-2-en-1-ol* als wahrscheinlichste Struktur ausgehend von der Wirkstoffstruktur ermittelt. Das  $MS^2$ -Spektrum sowie der mögliche Fragmentierungsweg von *1-Phenylprop-2-en-1-ol* sind in Abb. 53 gezeigt.

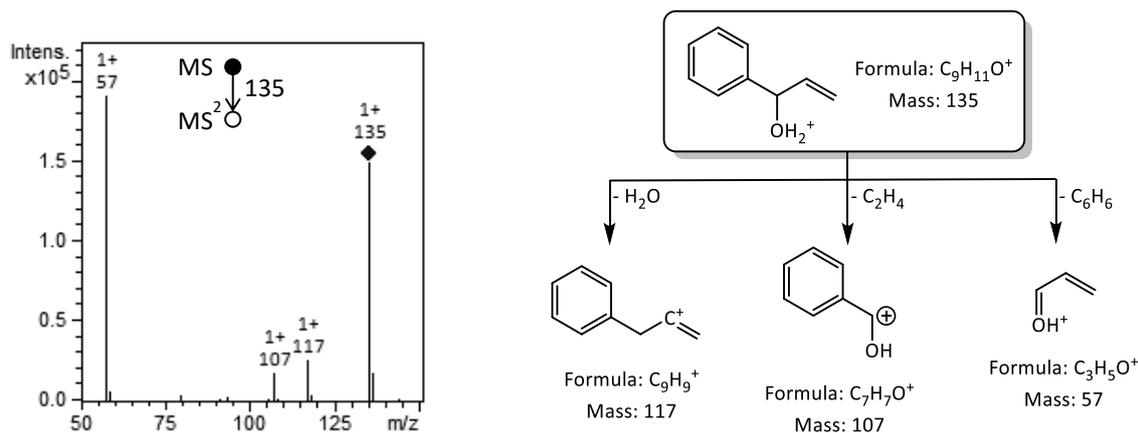


Abb. 53: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekanntes Substanz mit  $m/z = 135$ , ionisiert mittels DIP-APCI

Bei den Signalen  $m/z = 119$  und  $91$  handelt es sich wahrscheinlich um Fragmente, die durch thermische Zersetzung oder Ionisierung des Wirkstoffes oder einer der anderen beschriebenen Substanzen, die nach dem Wirkstoff verdampfen, entstehen. So ist es denkbar, dass dem Wirkstoff oder einer wirkstoffverwandten Substanz während der Verdampfung, ab einer Temperatur von ca.  $280\text{ °C}$  (ab ca. 2 min) genügend Energie zugeführt wird, so dass er bereits vor oder während der Ionisierung fragmentiert, und dann nur noch die Fragmente detektiert werden.

So wurde ein Signal bei  $m/z = 119$  im  $MS^2$ -Spektrum des Wirkstoffes (s. Anhang 6.2.8, Abb. 221, Seite 217) und in den  $MS^2$ -Spektren von  $m/z = 176$  und  $m/z = 148$  sowie in den Spektren der Verunreinigungen B, C, D und E gefunden. Für  $m/z = 119$  kommen vor allem zwei Strukturen, *Phenylacetaldehyd* und *Propylbenzol*, in Betracht. Aus ihnen kann dann auch  $m/z = 91$  (Benzyl-Ion) entstehen (Abb. 54).

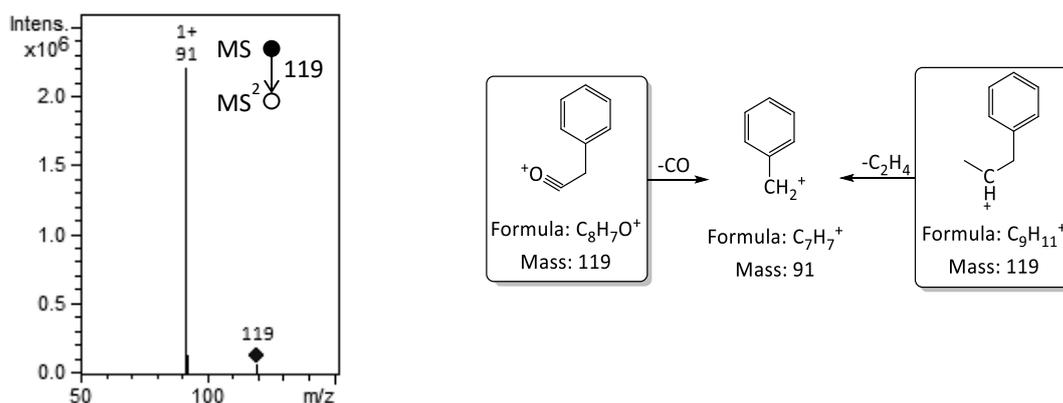


Abb. 54: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekanntes  $m/z = 119$  ionisiert mittels DIP-APCI

Das Signal mit  $m/z = 394$  wurde mittels DIP-EESI untersucht. Es wurde zwar auch mittels DIP-APCI detektiert, aber hier aufgrund der geringen Intensität nicht weiter betrachtet. Mit  $m/z = 394$  ist die unbekanntes Substanz deutlich größer als der Wirkstoff und hat eine Massendifferenz von  $+175$  Da. Somit

ist es möglich, dass die unbekannte Substanz sich aus einem Primidonmolekül und dem Fragment  $m/z = 176$  ( $C_{11}H_{14}NO^+$ ) zusammensetzt (Abb. 55).

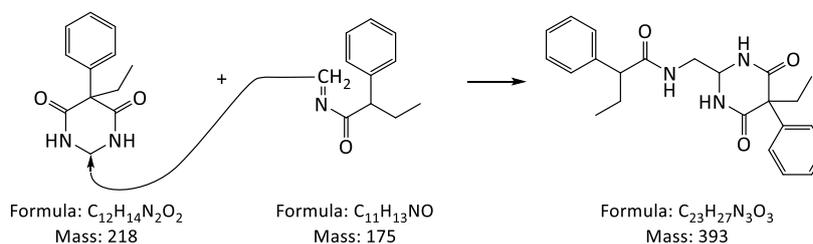


Abb. 55: Schematische Darstellung der Addition des Fragments  $C_{11}H_{13}NO$  ( $m = 175$ ) an ein Primidonmolekül

Zum Primidon-Dimer liegt die Massendifferenz bei - 43 Da. Diese Differenz deutet darauf hin, dass sich die unbekannte Substanz und das Primidon-Dimer um eine Peptidgruppe ( $CHNO = 43$  Da) unterscheiden. Zur größten bekannten Verunreinigung F zeigt die unbekannte Substanz eine Massendifferenz von -57 Da. Hierbei kann es sich um die Differenz von  $C_2H_3NO$  handeln. Da die Fragmentspektren der Übergänge  $m/z = 337 \rightarrow 231$ ,  $m/z = 337 \rightarrow 203$  und  $m/z = 337 \rightarrow 174$  (s. Abb. 237 unten im Anhang 6.2.8 Seite 227) bis auf geringe Intensitätsschwankungen identisch mit den Fragmentspektren aus  $m/z = 394 \rightarrow 231$ ,  $m/z = 394 \rightarrow 203$  und  $m/z = 394 \rightarrow 174$  sind (s. Abb. 248 im Anhang 6.2.8 Seite 234), ist davon auszugehen, dass diese Fragmente identisch sind und somit eine ähnliche Struktur zu Grunde liegen muss. Dasselbe trifft auf das Spektrum aus  $m/z = 394 \rightarrow 219$  zu, das mit dem Fragmentspektrum des Wirkstoffes identisch ist (Tabelle 30). Anhand dieser Annahmen sowie der weiteren erhaltenen Daten aus den Fragmentspektren, die im Anhang 6.2.8 dargestellt sind, konnte die Struktur aus Abb. 56 über den gezeigten Fragmentierungsweg postuliert werden.

Tabelle 30: Übersicht der erhaltenen  $MS^3$ -Fragmente aus  $m/z = 394$ , Substanz F ( $m/z = 337$ ) und  $MS^2$ -Fragmente des Wirkstoffes ( $m/z = 219$ ) (fett: Übereinstimmende Fragmente der unbekannten Substanz  $m/z = 394$  und der Substanz F oder des Wirkstoffes, nicht fett: keine Übereinstimmung der unbekannten Substanz mit einer bekannten Verbindung)

Mutterion	$MS^2$ -Fragment	$MS^3$ -Fragmente											
F 337 →	231 →		203		188	174		146	145				
F 337 →	203 →			201		174		146	145				91
F 337 →	174 →							146	145	131			
394 →	231 →		203		188	174		146	145				
394 →	203 →			201		174		146	145				91
394 →	174 →							146	145	131		117	
394 →	219 →	208				174	162				119		
Pri 219 →		208				174	162				119		

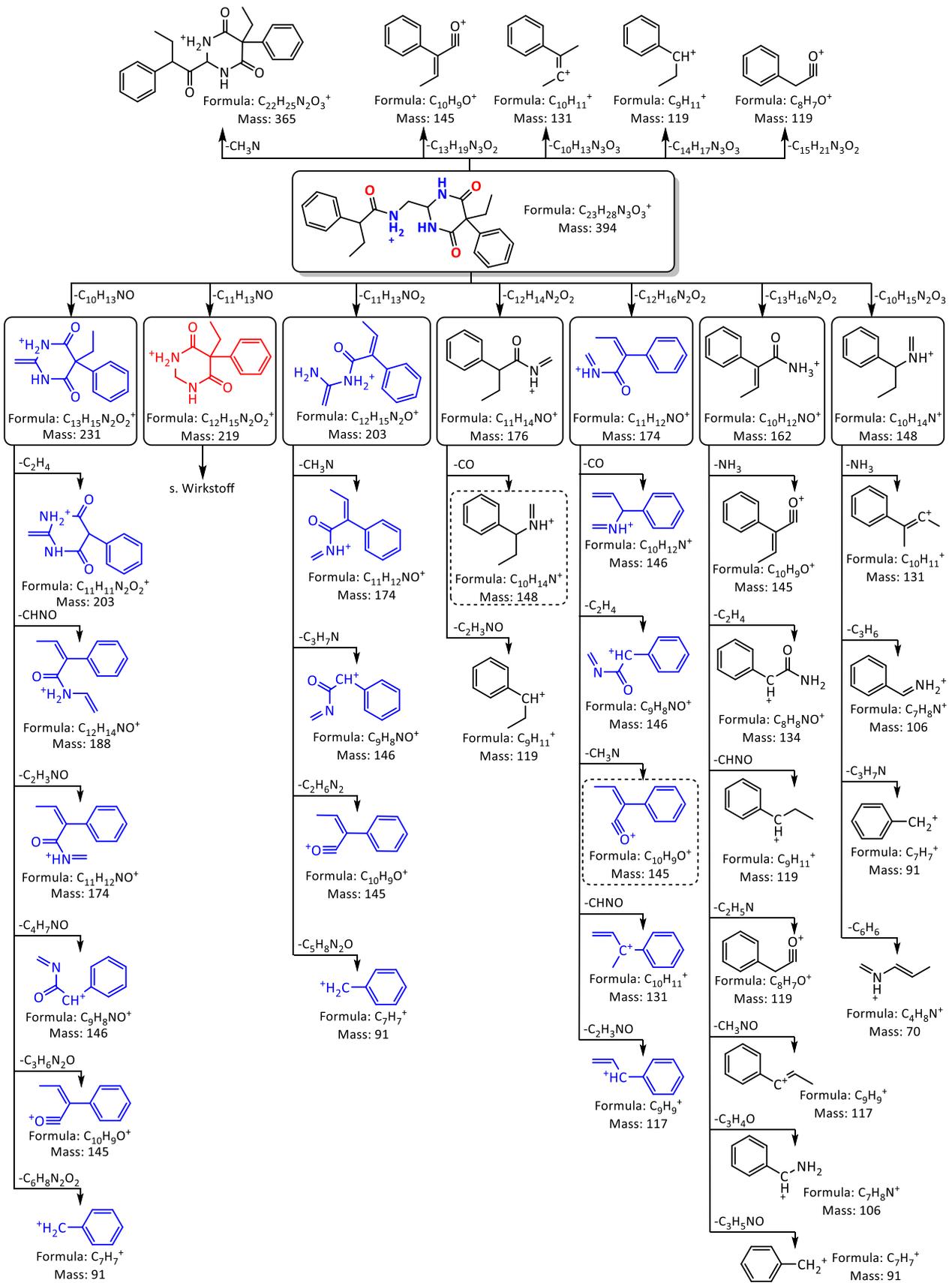


Abb. 56: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntes Substanz mit  $m/z = 394$ , wie sie der postulierten Substanz zugeordnet werden können. Die blauen Strukturen sind mit den Fragmenten, die aus der Verunreinigung F erhalten wurden identisch. Die rote Struktur ist gleich dem Wirkstoff, der weitere Fragmentierungsweg des Wirkstoffes ist im Anhang 6.2.8 beschrieben und identisch mit den hier gefundenen Fragmenten. Von den umrandeten

Fragmenten wurden  $MS^3$ -Untersuchungen durchgeführt, von den zwei Fragmenten mit gestrichelter Umrandung wurden  $MS^4$ -Spektren erhalten. Der weitere Fragmentierungsweg der  $MS^4$ -Fragmente ist nicht gezeigt. Die entsprechenden Fragmentspektren sind im Anhang 6.2.8 Seite 234 abgebildet.

#### 4.4.2.2 Piracetam

Bei der Analyse von Piracetam mittels HPLC-UV wurde zusätzlich zu der geforderten Detektion bei 205 nm auch das Spektrum von 190 bis 400 nm aufgenommen, um mögliche Verunreinigungen, die bei einer anderen Wellenlänge absorbieren, ebenfalls detektieren zu können. Gemäß der Ph. Eur. Monographie sollte Piracetam eine Retentionszeit von 3,5 min und die bekannten Verunreinigungen relativ zum Piracetampeak folgende theoretische Retentionszeiten aufweisen:

- Verunreinigung A, 4,0 min;
- Verunreinigung B, 9,8 min;
- Verunreinigung C, 22,0 min;
- Verunreinigung D, 2,8 min.

Die Strukturen von Piracetam und seinen Verunreinigungen sind in Abb. 57 dargestellt.

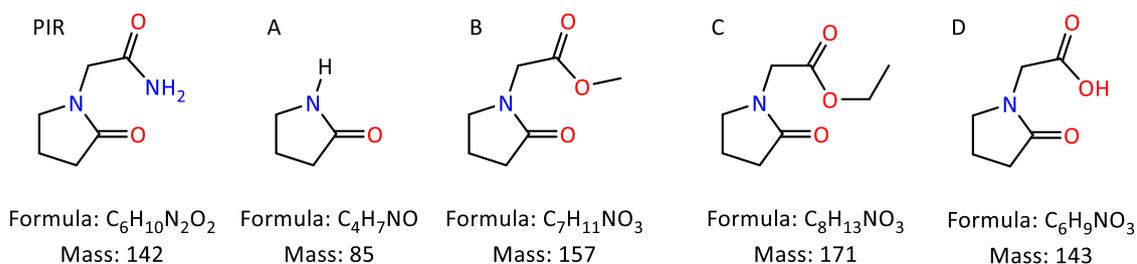


Abb. 57: Piracetam 2-Oxo-pyrrolidin-1-yl)-acetamid (PIR) und seine vier in Ph. Eur. genannten Verunreinigungen A bis D (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.7 zusammengefasst)

In Abb. 58 b) ist zu sehen, dass das System empfindlich genug ist, um 0,5 mg/L Piracetam (Retentionszeit 3,46 min) nachzuweisen und somit die Ph. Eur.-Bedingungen für die Sensitivität erfüllt. Das System sollte somit auch empfindlich genug sein, um die Verunreinigungen in den geforderten Grenzen von 0,1 % zu detektieren. Wie in Abb. 58 a) zu sehen ist, konnten die vier bekannten Verunreinigungen allerdings nicht nachgewiesen werden.

Um das System auf HPLC-ESI-MS Bedingungen umzustellen, wurde der Phosphatpuffer durch eine Ammoniumformiat-Lösung mit demselben pH-Wert ausgetauscht. Die Retentionszeit von Piracetam blieb gleich. Obwohl auch hier keine der bekannten Verunreinigungen nachgewiesen werden konnten (Abb. 58 c)), wurde davon ausgegangen, dass auch die Retentionszeiten der Verunreinigungen, sofern sie vorhanden sind, sich nicht oder nur geringfügig geändert haben. Nach erfolgreicher Umstellung des Systems auf HPLC-ESI-MS-Bedingungen, wurde unmittelbar nach dem UV-Detektor der Fluss 1:1,2 gesplittet und das ESI-Spray mit dem kleineren Fluss von 400  $\mu$ L/min erzeugt. In den resultierenden EIC-Chromatogrammen, die aus den  $m/z$ -Werten für die jeweils protonierte Verunreinigung erstellt wurden, konnte für die Verunreinigungen A ( $m/z = 86$ ; RT: 4,6 min) und B ( $m/z = 158$ ; RT: 8,2 min) jeweils ein Peak

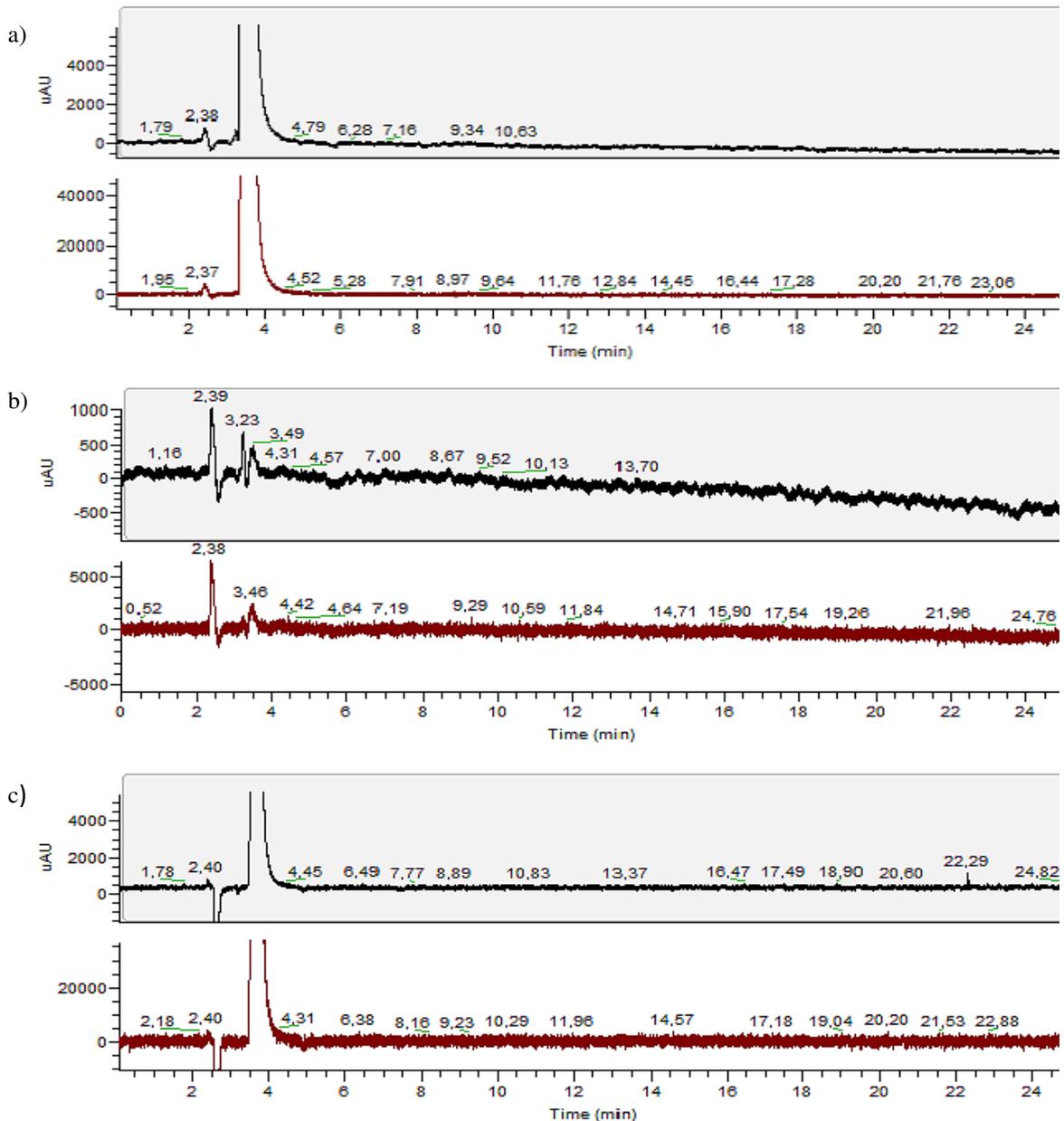


Abb. 58: HPLC-UV Chromatogramme von Piracetam-Tabletten (die oberen schwarzen Chromatogramme zeigen den Scan zwischen 190 und 400 nm, die unteren roten Chromatogramme die Aufnahme der einzelnen Wellenlänge bei 205 nm) a) Konzentration Piracetam 500 mg/L, Eluent Methanol: Phosphatpuffer; b) Konzentration Piracetam 0,5 mg/L, Eluent Methanol: Phosphatpuffer; c) Konzentration Piracetam 500 mg/L, Eluent Methanol: Ammoniumformiat [176]

detektiert werden (Abb. 59). Der Peak, der als Verunreinigung A bezeichnet wurde, konnte aufgrund der geringen Konzentration nicht fragmentiert werden. Nur das isolierte  $[M+H]^+$ -Signal wurde beobachtet (Abb. 60 unten links). Für den Peak, der als Verunreinigung B bezeichnet wurde, konnten MS<sup>2</sup>-Experimente durchgeführt und zwei Fragmente erhalten werden. Die Fragmente konnten der Verunreinigung B zugeordnet werden (Abb. 60 unten rechts und Abb. 61).

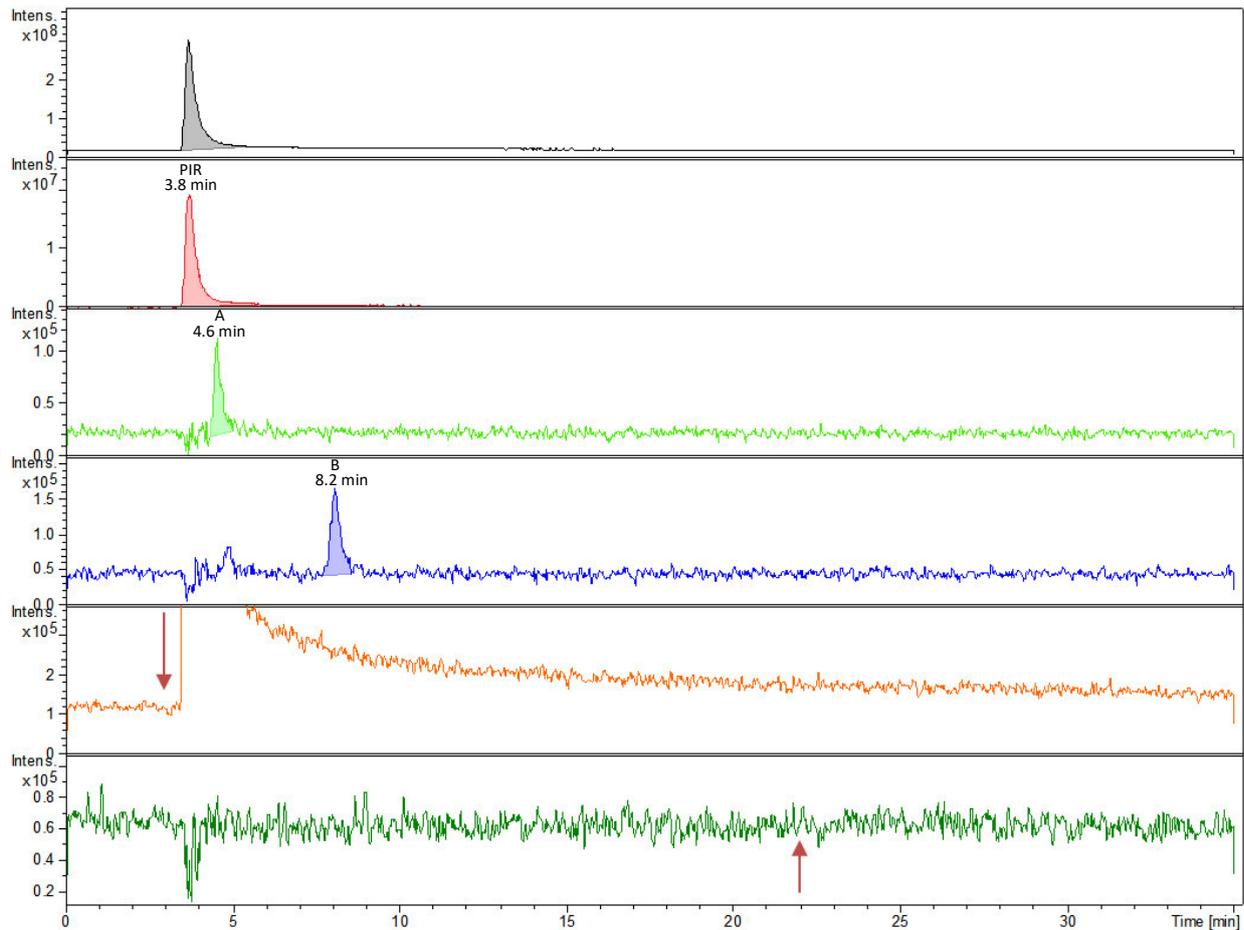


Abb. 59: HPLC-ESI-MS- Chromatogramme von Piracetam-Tabletten: schwarz: TIC; rot: EIC des protonierten Piracetams ( $m/z = 143$ ; RT: 3,8 min); grün: EIC der protonierten Verunreinigung A ( $m/z = 86$ ; RT: 4,6 min); blau: EIC der protonierten Verunreinigung B ( $m/z = 158$ ; RT: 8,2 min); orange: EIC der protonierten Verunreinigung D sowie des  $C^{13}$ -Isotops von Piracetam ( $m/z = 144$ : Verunreinigung D sollte vor dem Isotop-Peak des Piracetams eluieren, wurde nicht detektiert); dunkel grün: EIC der protonierten Verunreinigung C ( $m/z = 172$ : Verunreinigung C sollte bei 22 min eluieren) [176]. Die Strukturen des Wirkstoffes und der Verunreinigungen sind in Abb. 57 dargestellt.

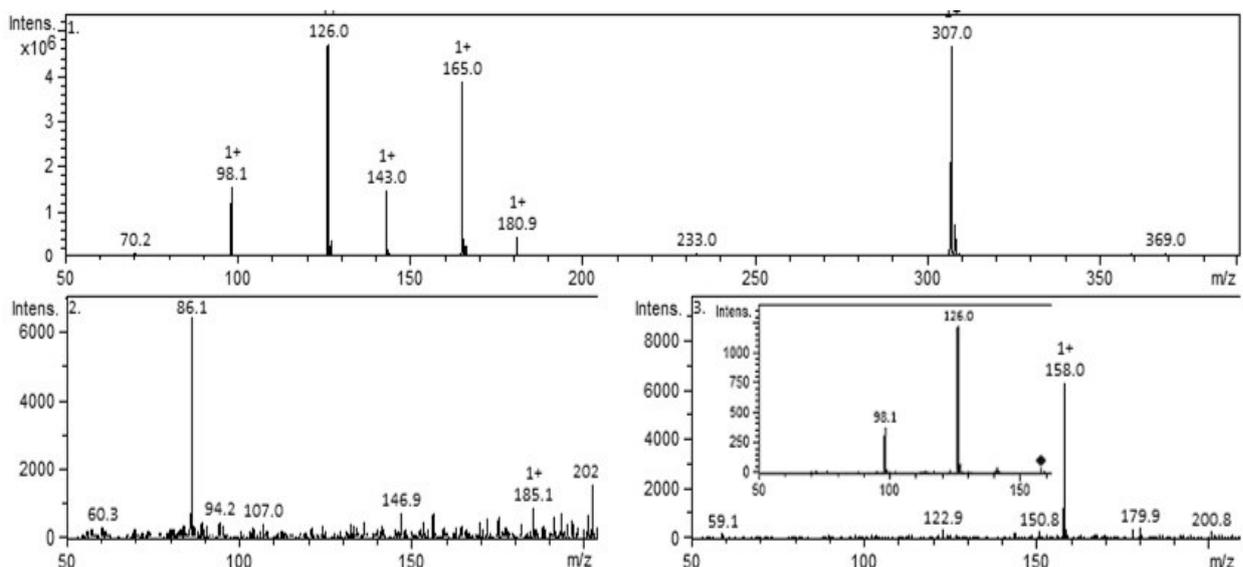


Abb. 60: Oben: MS-Spektrum von Piracetam bei 3,8 min ( $m/z = 50 - 400$ ); unten links: MS-Spektrum der Verunreinigung A bei 4,6 min ( $m/z = 50 - 200$ ); unten rechts: MS-Spektrum der Verunreinigung B bei 4,6 min ( $m/z = 50 - 200$ ) und eingefügt das Fragmentspektrum von  $m/z = 158$

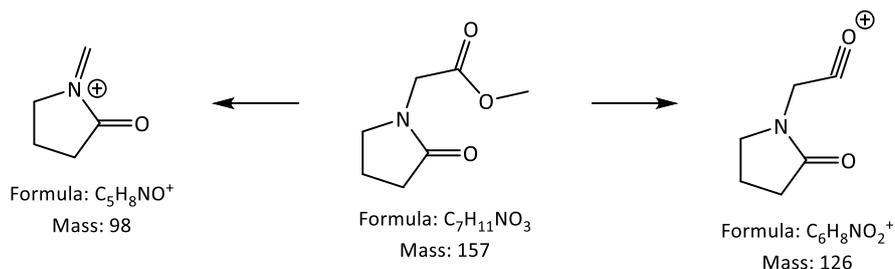


Abb. 61: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B von Piracetam, wie sie nach  $MS^2$ -Untersuchungen detektiert wurden

Auch mit der HPLC-ESI-MS Methode konnten die Verunreinigungen C und D nicht nachgewiesen werden (Abb. 59). Zum einen ist es möglich, dass auch die HPLC-ESI-MS Methode nicht sensitiv genug ist, die Verunreinigungen zu detektieren, da sie nur in den Grenzen der Ph. Eur. überprüft wurde und die Konzentration der Verunreinigungen durchaus niedriger sein kann. Zum anderen handelt es sich um kommerzielle Arzneimittel, die nach Möglichkeit keine der bekannten Verunreinigungen enthalten sollten. Daher wurde angenommen, dass diese Verunreinigungen nicht vorhanden oder nicht nachweisbar sind.

Die Untersuchungen von Piracetam mit der DIP-APCI zeigten, dass, obwohl es sich bei der APCI um eine schonende Ionisierungsmethode handelt, neben dem protonierten Piracetams, drei Fragmente beobachtet werden konnten ( $m/z = 126$ ;  $98$  und  $70$ ) vgl. Abb. 63, wie auch bei den HPLC-ESI-MS Messungen. Daneben konnte auch ein Signal für die protonierte Verunreinigung A ( $m/z = 86$ ) beobachtet werden. Durch  $MS^2$ -Untersuchungen konnten ausreichend Daten erhalten werden, die bestätigen, dass es sich um die Verunreinigung A handelt (Abb. 64 a). Dass es sich um ein weiteres Fragment des Piracetams handelt, wird hingegen ausgeschlossen, da durch Fragmentierung des Signals  $m/z = 143$  kein Signal mit  $m/z = 86$  beobachtet werden konnte.

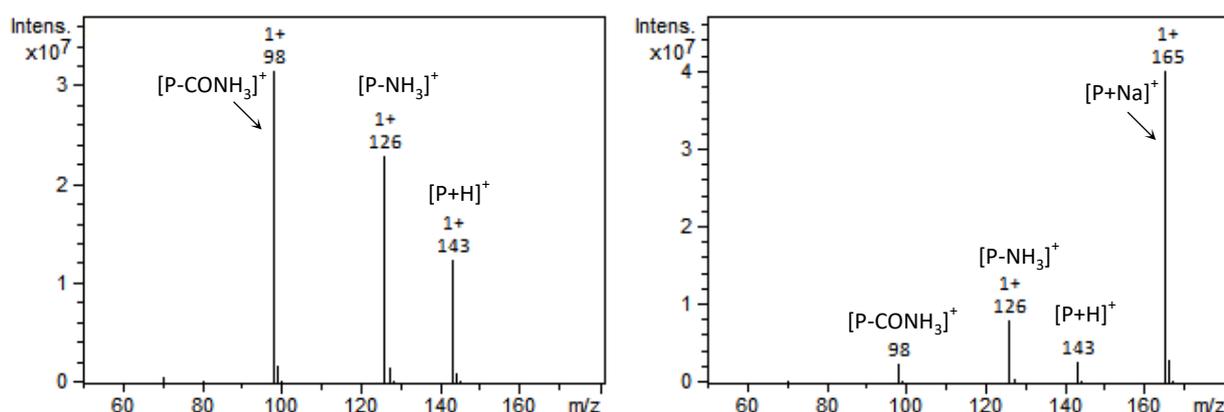


Abb. 62: Massenspektren von Piracetam, die mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts) erhalten wurde. Piracetam ( $[M+H]^+$ ,  $m/z = 143$ ) mit seinen Fragmenten ( $m/z = 126$ ,  $98$  und  $70$ ) wird in beiden Spektren detektiert sowie im DIP-EESI Spektrum das Natrium-Addukt ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z = 165$ ) von Piracetam. [176]

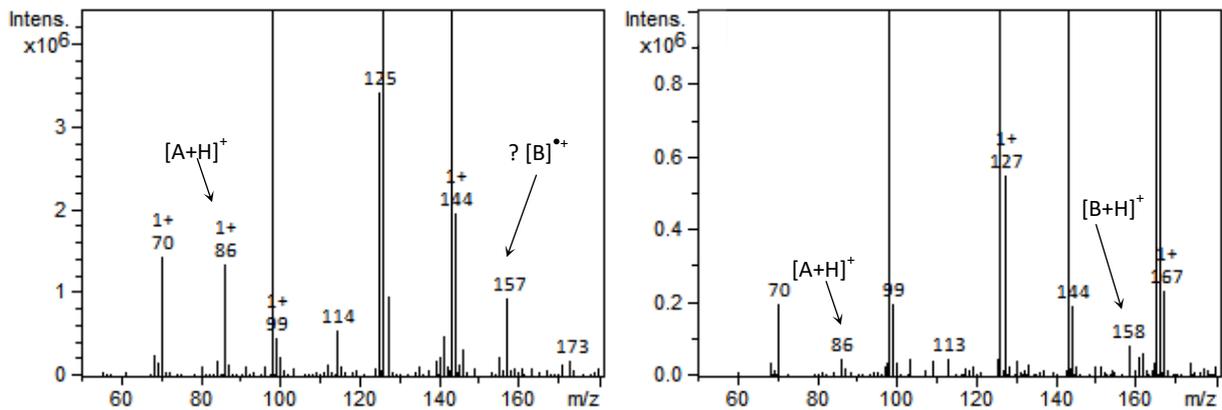


Abb. 63: Vergrößerte Massenspektrum der Spektren aus Abb. 62 von Piracetam, die mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts) erhalten wurden. Die Verunreinigung A ( $[M+H]^+$ ,  $m/z = 86$ ) kann in beiden Spektren detektiert werden. Verunreinigung B ( $[M+H]^+$ ,  $m/z = 158$ ) wird nur im DIP-EESI Spektrum detektiert. [176]

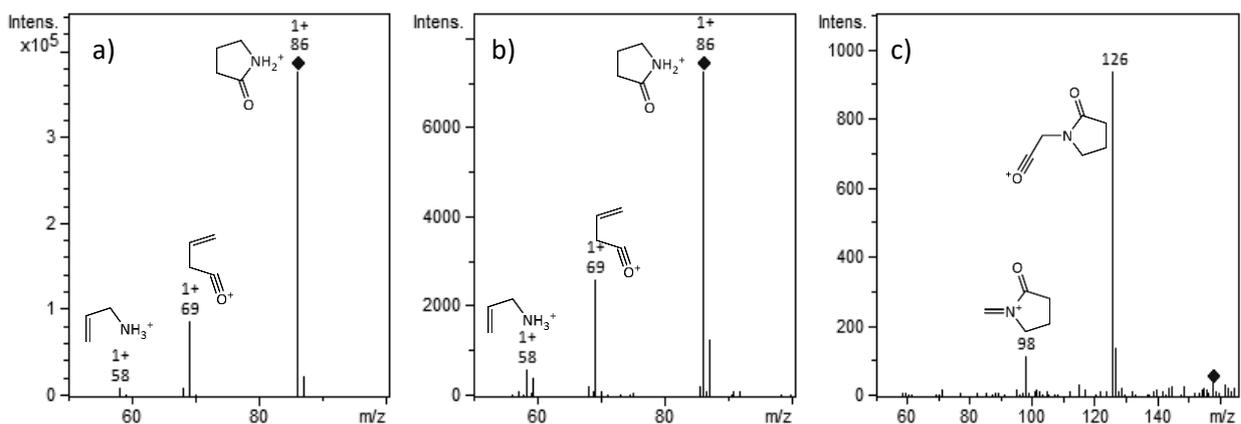


Abb. 64:  $MS^2$ -Spektren der Verunreinigung A ionisiert mit a) DIP-APCI und b) DIP-EESI; sowie c)  $MS^2$ -Spektren der Verunreinigung B ionisiert mittels DIP-EESI jeweils mit möglichen Strukturen der detektierten Fragmente [176]

Die protonierte Verunreinigung B wurde mittels DIP-APCI nicht beobachtet. Es wurde aber ein Signal mit  $m/z = 157$ , welches das Radikalkation der Verunreinigung B sein könnte, detektiert. Dies konnte mit  $MS^n$ -Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 65).

Mit der DIP-EESI konnte Piracetam in seiner protonierten Form und als Natrium-Addukt sowie die drei bekannten Fragmente ( $m/z = 126$ , 98 und 70) nachgewiesen werden. Ebenso konnten für die Verunreinigungen A und B Signale für ihre protonierte Form detektiert werden (Abb. 63). Mit  $MS^2$ -Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass es sich um beide Verunreinigungen handelt (Abb. 64 b und c). Die  $MS^2$ -Spektren der Verunreinigung A, die mittels DIP-APCI und DIP-EESI erzeugt wurden, zeigen die gleichen Fragmente. Dies gilt auch für die  $MS^2$ -Spektren der Verunreinigung B, die mittels HPLC-ESI und DIP-EESI erzeugt wurden. Die Verunreinigungen C und D konnten sowohl mit der DIP-APCI, als auch mit der DIP-EESI nicht gefunden werden.

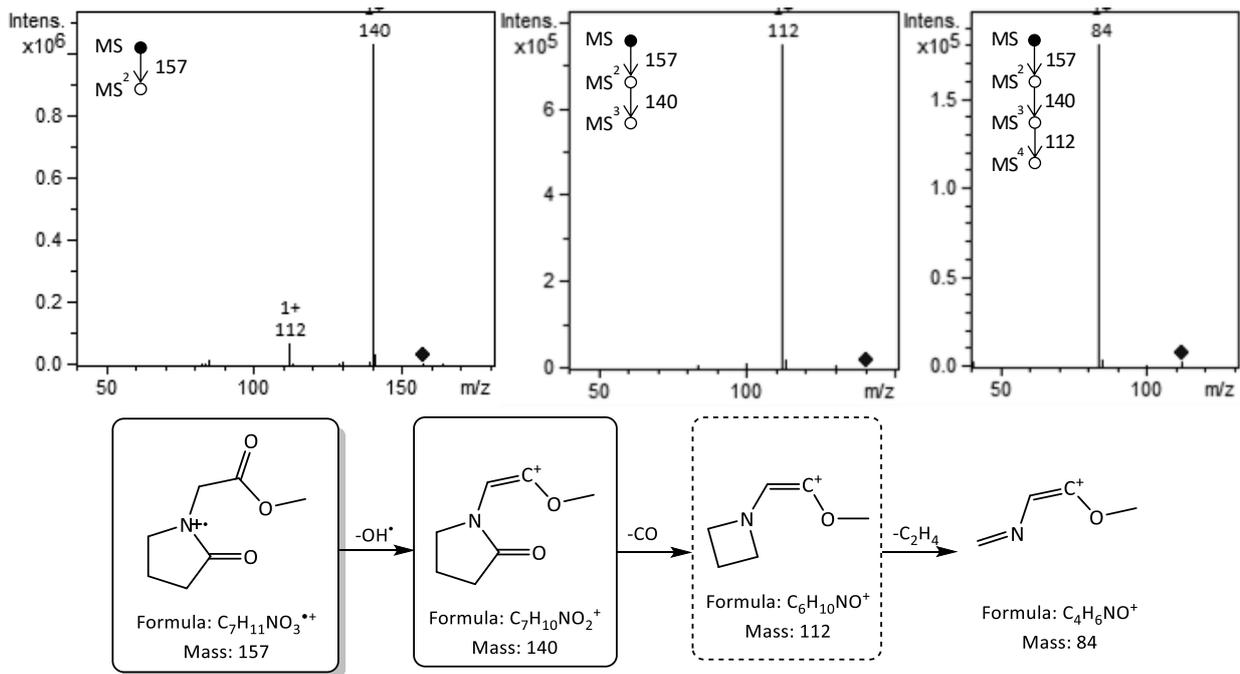


Abb. 65: Fragmentierung von  $m/z = 157$  nach DIP-APCI Ionisierung. Potentielles Radikalkation der Verunreinigung B

Somit stimmen die Ergebnisse der DIP-EESI und DIP-APCI mit den chromatographischen Ergebnissen überein. Generell kann die Verunreinigung D nicht mit der DIP-APCI oder DIP-EESI mit der Massenauflösung des verwendeten Systems nachgewiesen werden, da sie das gleiche Masse-Ladungs-Verhältnis wie das  $C^{13}$ -Isotop von Piracetam aufweist. Durch Verwenden eines anderen Massenanalysator wie z.B. einem Q-ToF, das eine höhere Auflösung bietet, könnte die Verunreinigung D vom Wirkstoffisotop unterschieden werden.

Theoretisch ist zwar eine Trennung von Substanzen auf Grundlage ihrer Dampfdrücke durch die temperaturprogrammierte Schubstange der DIP möglich, jedoch sind die erwarteten Unterschiede der Dampfdrücke von Piracetam und den Verunreinigungen nicht groß genug, um sie effektiv vom Piracetam Signal zu trennen.

In den DIP-APCI- und DIP-EESI-Experimenten wurden 0,8 bzw. 1,6  $\mu\text{g}$  injiziert. In beiden Fällen konnte keine höhere Konzentration aufgrund eines Sättigungseffekts der Ionenfalle analysiert werden. Diese Mengen sind kleiner als die Menge an Piracetam auf der Säule in den HPLC-Analysen. 4,6  $\mu\text{g}$  Piracetam auf der Säule wurde für HPLC-ESI-MS (nach dem Split) und 10  $\mu\text{g}$  für HPLC-UV (vor dem Split) verwendet.

Es scheint, dass die Verunreinigung B weniger polar als Piracetam (Verlust einer Aminogruppe) ist und besser mit DIP-EESI als mit DIP-APCI ionisiert werden kann. Die Polarität ist aber nur ein Indikator für die vorgeschlagene Ionisationseffizienz einer Ionenquelle und andere Parameter wie Verdampfung und Protonenaffinität sind ebenfalls wichtig.

## 4.4.2.3 Amlodipin Besilat

Die USP-Methoden (2011) und Ph. Eur.-Methoden (5.0 2004-2005), die zum Zeitpunkt der Messung zur Verfügung gestanden haben, verwendeten alle Triethylamin (TEA) als Puffersalz in den HPLC-UV Methoden. TEA ist zwar prinzipiell MS-gängig, aber auch dafür bekannt, aufgrund der hohen Protonenaffinität Ionensuppressionen sowie ein dominantes Signal bei  $m/z = 102$  im positiven Elektrospray zu erzeugen [198, 199]. Daher wurde das TEA, wie 2013 im Pharmacopeia Forum der USP-NF (PF-USP) diskutiert wurde, durch Ammoniumacetat ersetzt. Dies sollte laut Diskussion keinen Einfluss auf die Retentionszeiten von Amlodipin und seinen Verunreinigungen haben. [181] Dieser Vorschlag wurde in einer späteren Version der European Pharmacopoeia (7.0) [157] mit einigen anderen Änderungen am chromatographischen System, wie Fluss und Säulendimensionen, umgesetzt.

Bei der Analyse von Amlodipin mittels HPLC-UV wurde zusätzlich zu der geforderten Detektion bei 237 nm auch das Spektrum von 200 bis 600 nm aufgenommen. Dieser Bereich wurde ebenfalls im PF-USP diskutiert, um einige Verunreinigungen, wie Verunreinigung F (Abb. 66) besser detektieren zu können [181]. Da die verwendete Methode keiner der Ph. Eur.-Methoden gleicht, kann kein Vergleich mit den theoretischen Retentionszeiten erfolgen. In der USP-Methode ist lediglich für die Benzolsulfonsäure eine relative Retentionszeit von 0,2 (ca. 1,4 min), für Verunreinigung D eine relative Retentionszeit von 0,5 (3,5 min) und für Amlodipin eine Retentionszeit von ca. 7 min angegeben. [165] Die Strukturen von Amlodipin und seinen Verunreinigungen sind in Abb. 66 dargestellt.

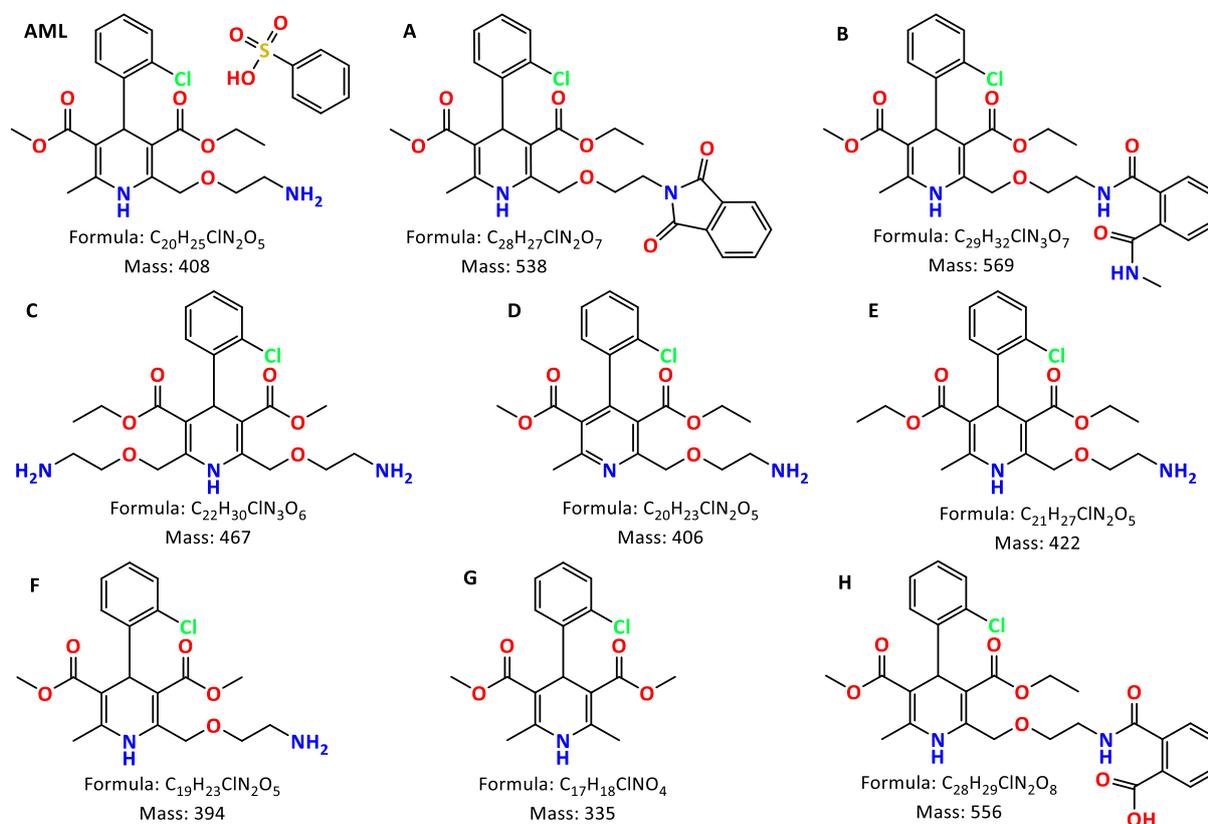


Abb. 66: Amlodipin Besilat 3-Ethyl-5-methyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridindicarboxylat Benzolsulfonsäure, (AML) und seine acht in Ph. Eur. beschriebenen Verunreinigungen A bis H (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.1 zusammengefasst)

Zunächst wurde auch bei Amlodipin die Empfindlichkeit des Systems geprüft. Gemäß Ph. Eur 5.0 soll eine 3 mg/L Amlodipinlösung quantifizierbar sein. Wie in Abb. 67 a) zu sehen ist, kann der Peak für 3 mg/L Amlodipin (Retentionszeit 6,3 min) deutlich detektiert werden. Das verwendete System ist somit ausreichend sensitiv und ist somit auch sensitiv genug, um die Verunreinigungen in den geforderten Grenzen von 0,3 % zu detektieren.

Abb. 67 b) zeigt die eigentliche Probelösung von 1 g/L Amlodipin. Mit einer Retentionszeit von 1,6 min eluiert wahrscheinlich die Benzolsulfonsäure, da zu dieser Zeit weder ein Signal im MS detektiert wurde, noch Benzolsulfonsäure einzeln injiziert wurde, kann die Vermutung nicht bestätigt werden. Die Identifizierung der Benzolsulfonsäure war hier nicht nötig. Es ging vorrangig um die Umstellung der HPLC-UV Methode auf MS-Bedingungen sowie die Überprüfung, ob das verwendete System sowohl als HPLC-UV-Methode wie auch als HPLC-ESI-MS-Methode sensitiv genug war, um die Verunreinigungen in den geforderten Grenzen zu detektieren.

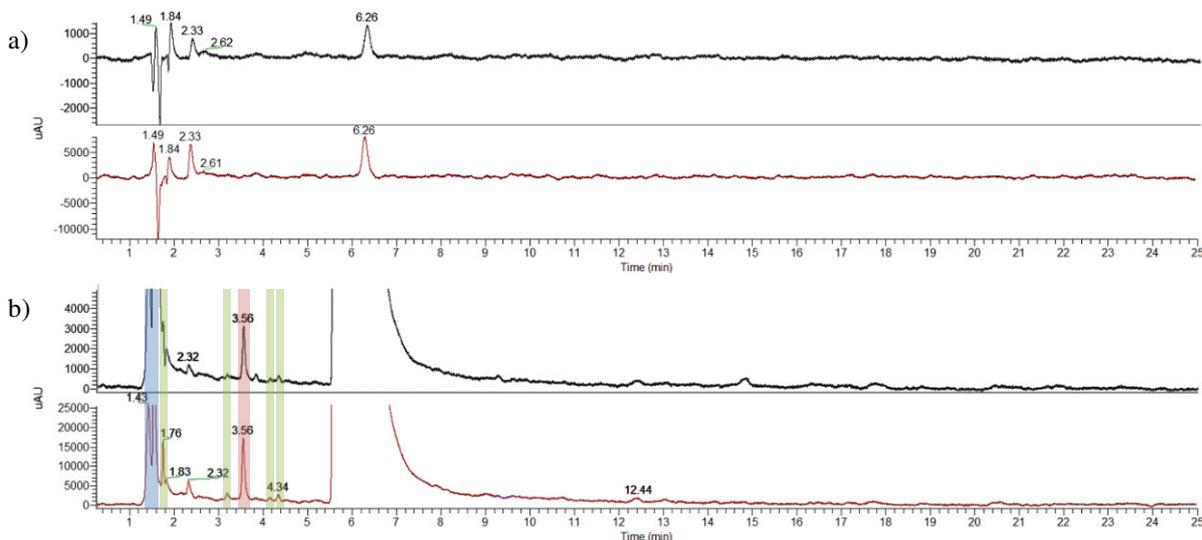


Abb. 67: HPLC-UV Chromatogramme von Amlodipin-Tabletten (die oberen schwarzen Chromatogramme zeigen den Scan zwischen 200 und 600 nm, die unteren roten Chromatogramme die Aufnahme der einzelnen Wellenlänge bei 237 nm) a) Konzentration Amlodipin 3 mg/L (Amlodipin 6,26 min); b) Konzentration Amlodipin 1000 mg/L (Verunreinigung D 3,56 min (rot), vermutete Benzolsulfonsäure 1,55 min (blau), weitere nicht identifizierte Peaks (grün))

Der nächste dominante Peak bei 3,6 min wurde als Verunreinigung D identifiziert. Die Identifizierung erfolgte über die Fragmente, die bei MS und MS<sup>2</sup> Untersuchungen erhalten wurden sowie über das [M+H]<sup>+</sup>. Das Fragmentspektrum befindet sich im Anhang 6.2.1 in Abb. 159 Seite 173. Weitere Verunreinigungen konnten nicht identifiziert werden. Es konnten aber weitere sehr kleine Peaks vor dem Amlodipin-Peak detektiert werden. Zudem lässt die „unruhige“ Basislinie nach dem Amlodipin-Peak vermuten, dass noch weitere Substanzen eluierten, für die das System nicht empfindlich genug war. Diskrete Peaks konnten aufgrund des Rauschens nicht erkannt werden.

Diese Vermutung wurde durch die HPLC-ESI-MS-Messungen bestätigt. Wie im BPC-Chromatogramm (Abb. 68) zu sehen ist, eluieren nach Amlodipin noch mindestens sieben weitere Substanzen. Vor dem Amlodipin-Peak sind im BPC nur vergleichbar kleine Peaks sichtbar, außer dem Peak bei 3,6 min der als Verunreinigung D identifiziert wurde.

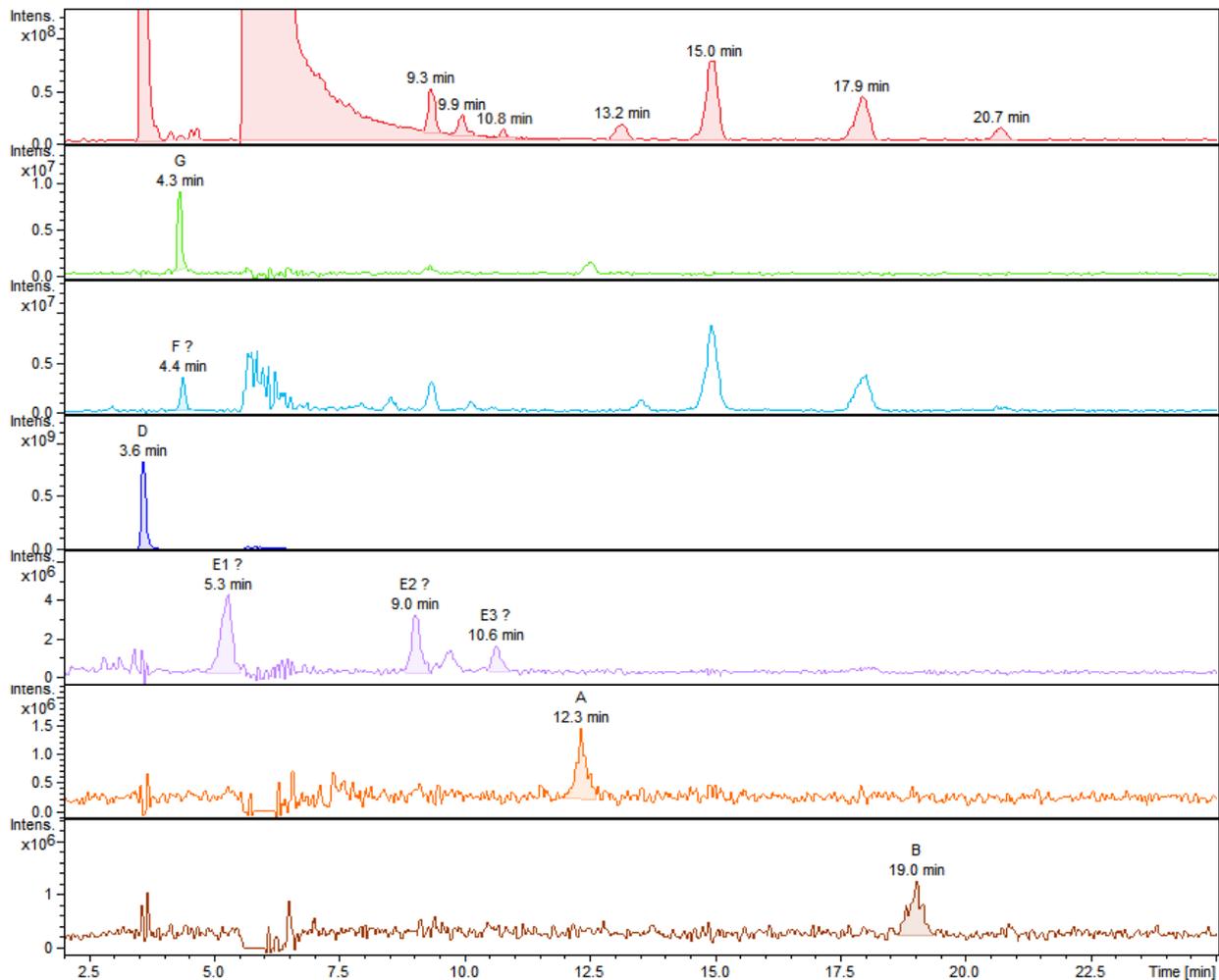


Abb. 68: HPLC-ESI-MS- Chromatogramme von Amlodipin-Tabletten: rot: BPC<sup>6</sup> (gezoomt) gefolgt von den EIC für die protonierten Verunreinigungen grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ; RT: 4,3 min); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ; RT: 4,4 min); blau: Verunreinigung D ( $m/z = 407$ ; RT: 3,6 min); violett: Verunreinigung E ( $m/z = 423$  Identifizierung nicht möglich); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ; RT: 12,3 min); braun: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ ; RT: 19,0 min)

Durch gezielte Suche nach den acht in Ph. Eur. beschriebenen Verunreinigungen, konnten die Verunreinigungen A, B, D und G in MS-Chromatogramm detektiert und mittels MS<sup>2</sup>-Untersuchungen über ihre Fragmente identifiziert werden. Die Massenspektren sind in Anhang 6.2.1 ab Seite 169 gezeigt. Für die Verunreinigung E wurden im MS-Chromatogramm drei Peaks detektiert. Durch Fragmentierung des  $[M+H]^+$  konnte kein Peak eindeutig der Verunreinigung E zugeordnet oder ausgeschlossen werden. Die

<sup>6</sup> BPC: Base peak Chronogram oder Base peak Chromatogram bei chromatographischen Messungen

Fragmentspektren sind im Anhang 6.2.1 auf Seite 174 gezeigt. Bei der Verunreinigung F handelt es sich wahrscheinlich um den Peak bei 4,4 min. Über die erhaltenen Fragmente war eine eindeutige Identifizierung jedoch nicht möglich. Die Verunreinigungen C und H konnten nicht detektiert werden. Keiner dieser Verunreinigungen erklärt die Peaks, die im BPC zwischen 9 und 21 min sichtbar sind. Eine Identifizierung dieser Peaks war im Rahmen dieser Arbeit nicht nötig.

Bei den Untersuchungen der Amlodipin-Besilat Tabletten mit der DIP-APCI wurde neben dem Wirkstoff Amlodipin ( $m/z = 409$ ) mit fast der gleichen Intensität ein oder mehrere Hilfsstoffe aus der Tablette gefunden. Ein Massenspektrum, das für eine solche Messung erhalten wurde, ist in Abb. 69 dargestellt. Alle Massen, die dem Wirkstoff durch  $MS^2$ -Untersuchungen zugeordnet werden konnten, sind blau markiert. Aufgrund der intensiven Ionisierung der Hilfsstoffe wird die Detektion der bekannten Verunreinigungen, die kleiner 0,3 % der Tablette ausmachen dürfen, erschwert. So konnte für die acht oben genannten Verunreinigungen jeweils ein EIC des  $[M+H]^+$  erzeugt werden (Abb. 70). Mittels  $MS^2$ -Untersuchungen konnten anschließend die vier Verunreinigungen A, D, E und G, ohne Berücksichtigung der HPLC-Daten, identifiziert werden. Im Folgenden wird der Befund diskutiert.

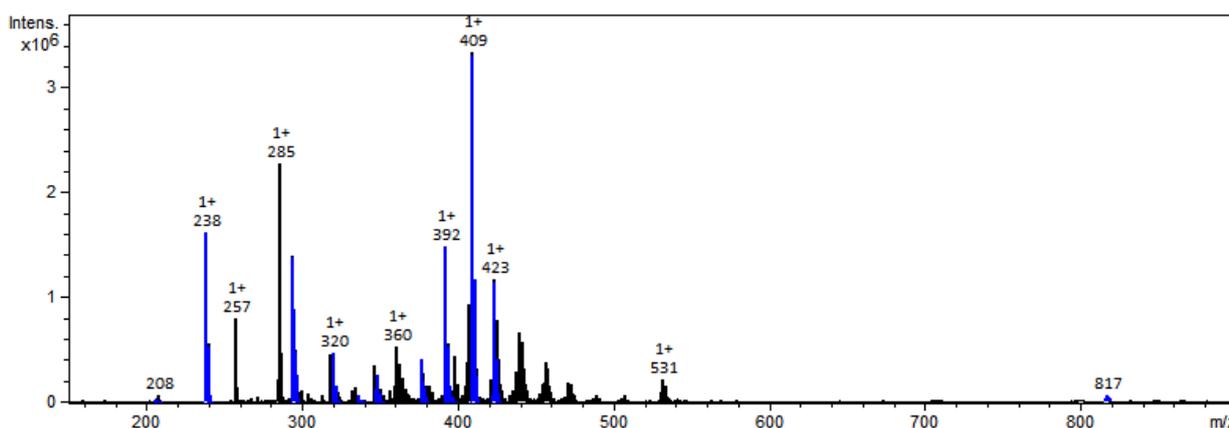


Abb. 69: Average Mass Spektrum von Amlodipin-Besilat Tabletten ionisiert mittels DIP-APCI nach Hintergrundabzug. Blau markiert alle  $m/z$ -Verhältnisse, die mittels  $MS^2$ -Untersuchungen dem Wirkstoff Amlodipin zugeordnet werden konnten

Im Vergleich mit den HPLC-ESI-MS Daten ist es allerdings fraglich, ob Verunreinigung E korrekt identifiziert wurde, da für Verunreinigung E drei Peaks im Chromatogramm in Betracht kommen. Beim Vergleich der  $MS^2$ -Spektren von  $m/z = 423$  (Verunreinigung E), die für die drei Peaks (mit HPLC-ESI-MS) und die DIP-APCI-Messung erhalten wurden, besteht das DIP-APCI-Spektrum aus der Summe der Signale, die für die drei Peaks detektiert wurden. Zusätzlich zeigt das DIP-APCI-Spektrum noch weitere zum Teil intensive  $m/z$ -Verhältnisse (Abb. 71). Dies kann mehrere Gründe haben, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnten.

Zum einen können bei der APCI-Ionisierung andere Substanzen, die ebenfalls ein Signal bei  $m/z = 423$  besitzen, stärker ionisiert worden sein, als mittels ESI. Zum anderen können auch andere Substanzen bereits in der Quelle durch thermische Energie oder Coronaentladung fragmentiert worden sein, wodurch

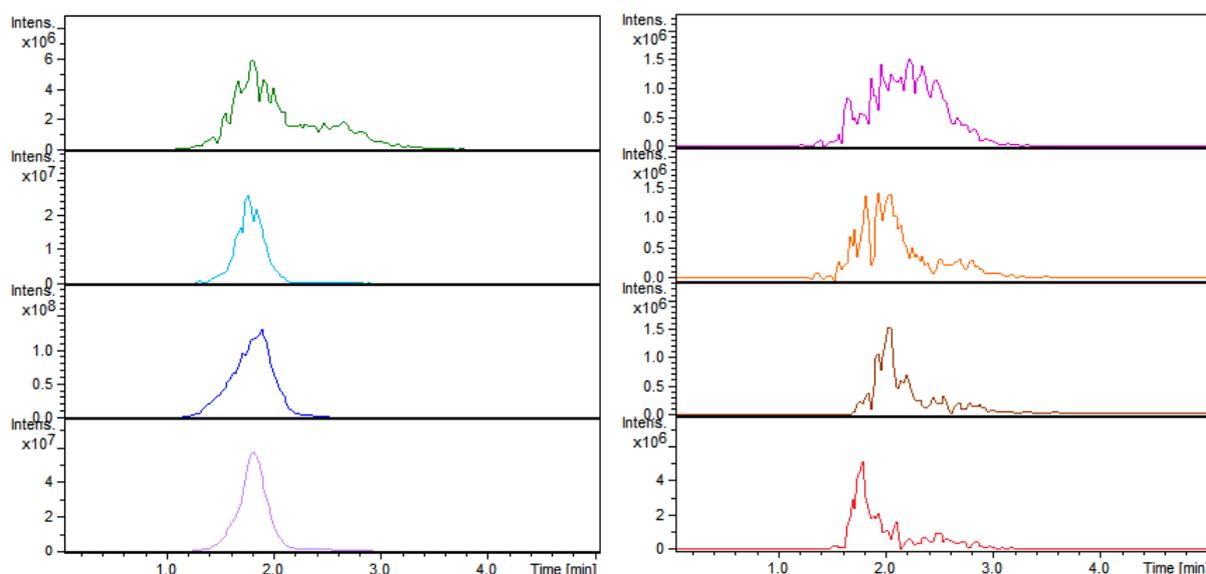


Abb. 70: EICs der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-APCI-MS; grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ); blau: Verunreinigung E ( $m/z = 423$ ); violett Verunreinigung D ( $m/z = 407$ ); pink Verunreinigung C ( $m/z = 468$ ); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ); braun: Verunreinigung H ( $m/z = 557$ ); rot: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ )

Fragmente mit  $m/z = 423$  entstehen, die dann im  $MS^2$ -Spektrum weiter fragmentiert werden und als zusätzliche  $m/z$ -Verhältnisse detektiert werden.

Aufgrund der fehlenden Trennung der drei Verbindungen ist die DIP-APCI nicht dafür geeignet, die Verunreinigung E zweifelsfrei zu identifizieren.

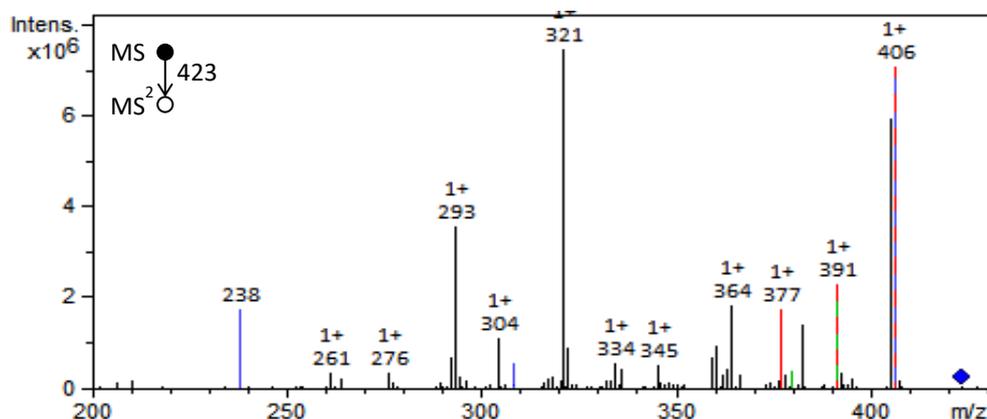


Abb. 71: Fragmentierung von  $m/z = 423$  der potentiellen Verunreinigung E nach Ionisierung mit DIP-APCI. Farbig markiert wurden die  $m/z$ -Signale, die bei der Untersuchung von Amlodipin mit der HPLC-ESI-MS nach Fragmentierung von  $m/z = 423$  erhalten wurden. Rot: Fragmente des Peaks bei 5,3 min, blau: Fragmente des Peaks bei 9,0 min und grün: Fragmente des Peaks bei 10,6 min. Schwarz: alle weiteren Signale, die nicht als dominante Fragmente in den HPLC-ESI-MS Untersuchungen detektiert wurden oder zusätzlich im DIP-APCI Spektrum detektiert wurden. Die detaillierten HPLC-ESI-MS Spektren sind im Anhang 6.2.1, Abb. 161 Seite 174 dargestellt.

Verunreinigung F konnte nicht identifiziert werden, da das Signal für das  $[M+H]^+$ ,  $m/z = 395$  vom Isotop eines Wirkstofffragments ( $C_{19}^{13}CH_{23}^{37}ClNO_5^+$ ) überlagert wird. So bildet  $m/z = 395$  die Fragmente  $m/z = 363$  und

349 (Abb. 72). Das entsprechende Fragment des Wirkstoffes ohne  $^{13}\text{C}$  und  $^{37}\text{Cl}$  Isotop hat die Masse 392. Dieses Fragment zeigt in  $\text{MS}^3$ -Untersuchungen die Fragmente  $m/z = 360$  und  $346$  (Strukturen sind in Abb. 73 abgebildet). Zusätzlich wurde im  $\text{MS}^2$ -Spektrum von  $m/z = 395$  jeweils ein kleines Signal bei  $m/z = 362$  und  $m/z = 348$  detektiert. Diese Signale haben eine Intensität von ca. 6 % bzw. 12 % im Vergleich zu ihren benachbarten Signalen. Unter der Annahme, dass es sich um das oben beschriebene Fragment des Wirkstoffes handelt, wird von  $m/z = 395$  nach  $m/z = 363$   $\text{CH}_4\text{O}$  abgespalten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Kohlenstoffatom um ein  $^{13}\text{C}$ -Atom handelt beträgt 5 %. Bei der Fragmentierung von  $m/z = 395$  nach  $m/z = 349$  wird  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  abgespalten, hier liegt die Wahrscheinlichkeit also doppelt so hoch, dass das  $^{13}\text{C}$ -Atom abgespalten wird. Dies entspricht annähernd den beobachteten Intensitäten.

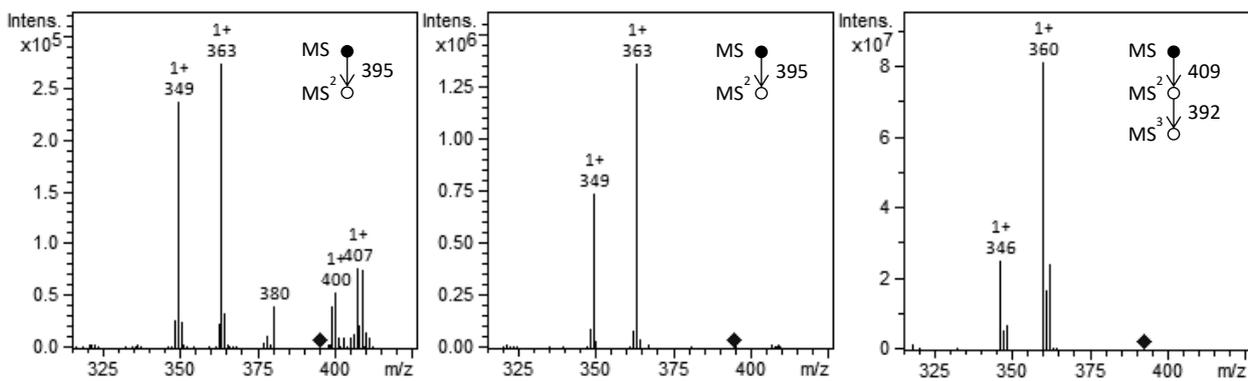


Abb. 72:  $\text{MS}^2$ -Spektrum von  $m/z = 395$  wie es nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (Mitte) erhalten wurde. Zum Vergleich ist rechts das  $\text{MS}^3$ -Fragmentspektrum von  $m/z = 409 \rightarrow 392$  ionisiert mit DIP-EESI dargestellt.

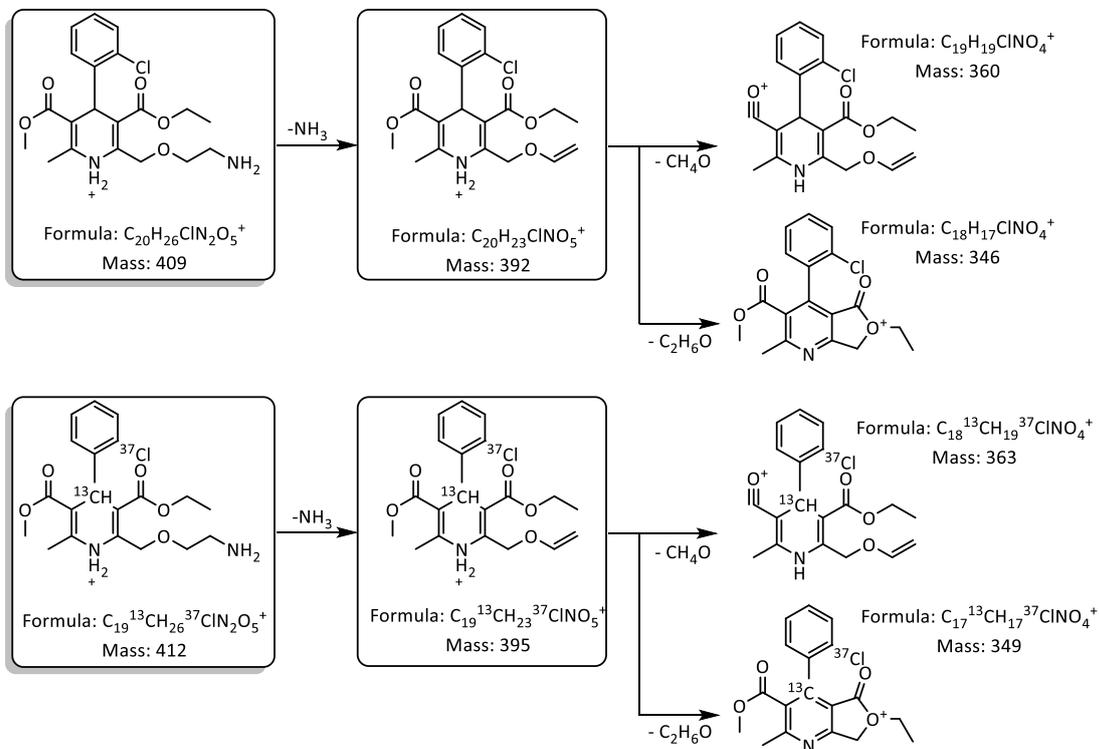


Abb. 73: Teil des Fragmentierungsweges von Amlodipin. Oben ohne Isotope, unten mit einem wahllos gesetzten  $^{13}\text{C}$ -Atom und einem  $^{37}\text{Cl}$ -Atom

Die Überlagerung kann nicht nur durch das Wirkstofffragment hervorgerufen werden, sondern auch durch andere Substanzen bzw. deren Fragmente. So wurden weitere sieben Peaks (RT: 7,9 min, 8,5 min, 9,4 min, 10,1 min, 15,0 min, 17,9 min und 20,7 min) mit der HPLC-ESI-MS mit  $m/z = 392$  detektiert, die ein Chloratom enthalten und so auch  $m/z = 395$  bilden können (Abb. 74 und im Anhang 6.2.1 in Abb. 169 Seite 180).

Die Spektren der Verunreinigung D von DIP-APCI und HPLC-ESI-MS stimmen überein (Abb. 159 im Anhang 6.2.1 Seite 173). Die Verunreinigung D hatte von den detektierten Verunreinigungen die höchste Konzentration in der Tablette.

Die Spektren der Verunreinigungen A und G stimmen hingegen von DIP-APCI und HPLC-ESI-MS nicht überein (Abb. 154 bzw. Abb. 165 im Anhang 6.2.1 Seite 170 bzw. 177). Wahrscheinlich werden diese Massen von Hilfsstoff-Signalen bei der DIP-APCI überlagert. Hinzu kommt, dass beide Verunreinigungen mit der HPLC-ESI-MS nur in geringer Konzentration gefunden wurden.

Für die restlichen Verunreinigungen (B, C und H) waren die Signale, die mit der DIP-APCI erzeugt wurden, entweder zu schwach oder wurden vom Füllstoff überlagert, so dass eine Fragmentierung nicht zielführend war. Ein Screening auf unbekannte Verunreinigungen war nicht möglich.

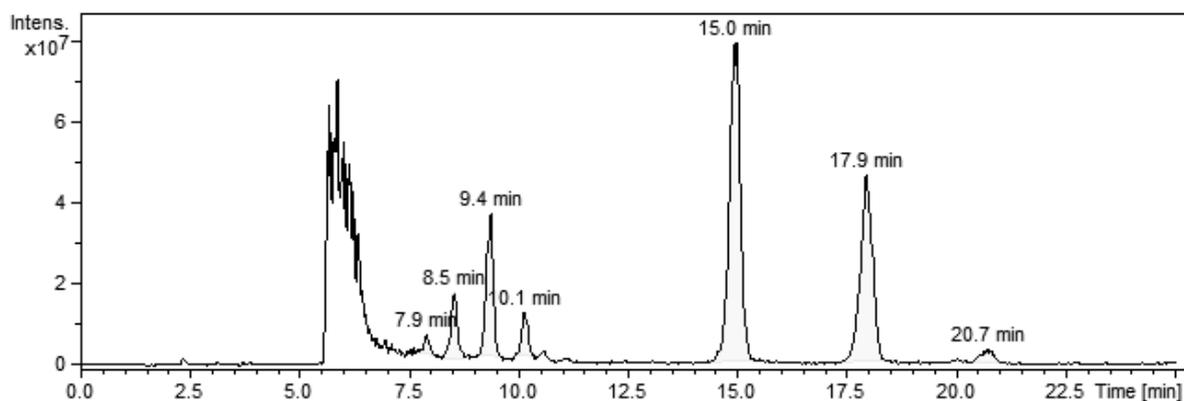


Abb. 74: EIC von  $m/z = 392$ . Zu sehen sind neben dem Wirkstoffpeak zwischen 5,5 und 6,8 min sieben weitere Peaks. Die Massenspektren sind in Anhang 6.2.1 in Abb. 133 Seite 171 gezeigt

Mit der DIP-EESI konnte der protonierte Wirkstoff Amlodipin sowie seine Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 75). Von den acht oben aufgeführten Verunreinigungen konnten mit der DIP-EESI und  $MS^2$ -Untersuchungen fünf Verunreinigungen A, C, D, E und G detektiert und identifiziert werden. Die Massenspektren sind in Anhang 6.2.1 ab Seite 169 gezeigt. Neben den Verunreinigungen B und H konnte auch die Verunreinigung F, wegen der Überlagerung mit den Isotopen, nicht nachgewiesen werden (Abb. 72).

Verunreinigung A wurde mit der DIP-EESI nur mit geringer Intensität beobachtet, was mit den HPLC-ESI-MS Daten übereinstimmt. Weiter konnten alle mit HPLC-ESI- $MS^2$  erzeugten Fragmente auch im DIP-EESI- $MS^2$ -Spektrum wiedergefunden werden (Abb. 153 im Anhang 6.2.1 Seite 169).

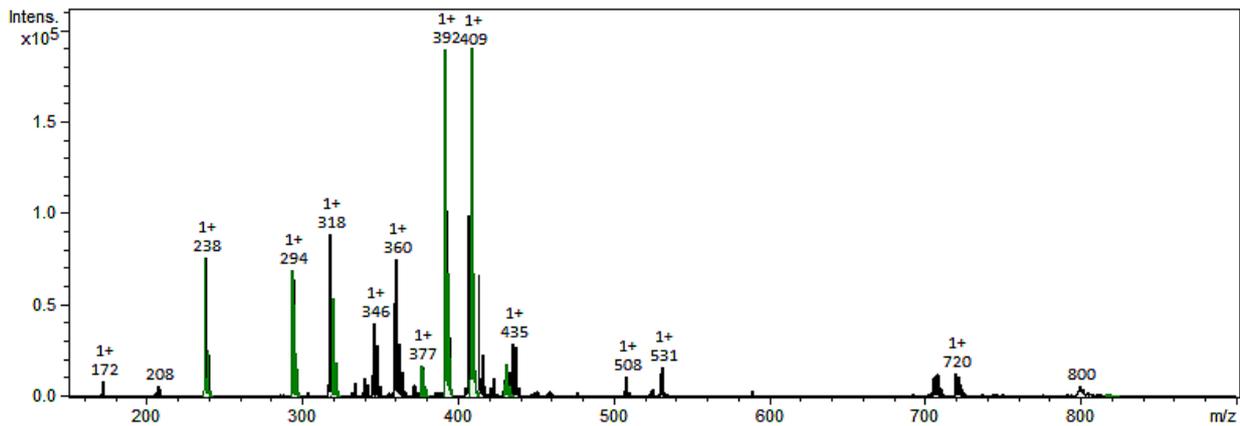


Abb. 75: Average Massenspektrum von Amlodipin-Besilat Tabletten ionisiert mittels DIP-EESI nach Hintergrundabzug. Grün markiert alle  $m/z$ -Verhältnisse, die dem Wirkstoff Amlodipin mittels  $MS^n$ -Untersuchungen zugeordnet werden konnten.

Ob es sich bei  $m/z = 468$ , die hier als Verunreinigung C identifiziert wurde, tatsächlich um die Verunreinigung C handelt, konnte anhand der HPLC-ESI-MS Messungen nicht bestätigt werden, da mit der HPLC die Verunreinigung nicht detektiert wurde. Da die Konzentration der Verunreinigung C nicht ermittelt werden kann, kann nicht bestimmt werden, ob das HPLC-System sensitiv genug ist, die Verbindung zu detektieren.

Die Spektren der Verunreinigung D von DIP-EESI, DIP-APCI und HPLC-ESI-MS stimmen überein.

Weiterhin ist es fragwürdig, wie bereits bei den DIP-APCI-Messungen diskutiert, ob die Verunreinigung E korrekt bestimmt worden ist. Auch hier besteht das Fragmentspektrum aus der Summe der Fragmente für die drei HPLC-Peaks. Zusätzlich wurden auch hier weitere  $m/z$ -Verhältnisse detektiert, die mittels HPLC-ESI-MS nicht erklärt werden können. Zum Teil sind diese  $m/z$ -Verhältnisse mit denen der DIP-APCI identisch (Abb. 76).

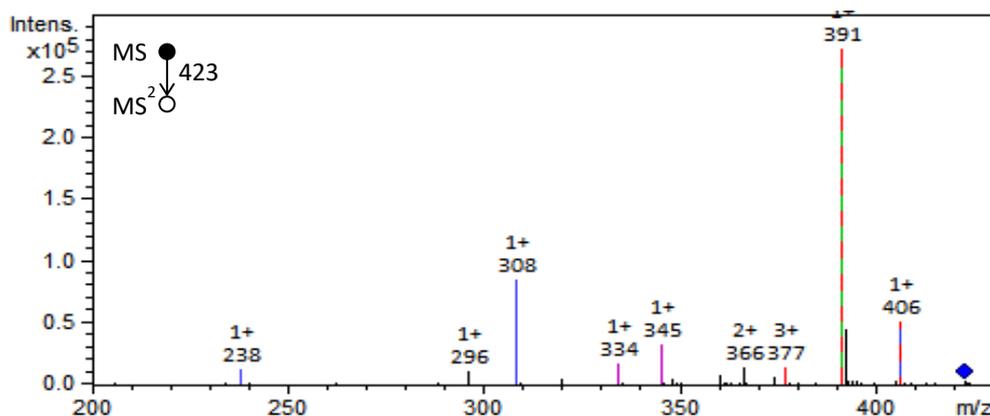


Abb. 76: Fragmentierung von  $m/z = 423$  der potentiellen Verunreinigung E nach Ionisierung mit DIP-EESI. Farbig markiert wurden die  $m/z$ -Signale, die bei der Untersuchung von Amlodipin mit der HPLC-ESI-MS und DIP-APCI nach Fragmentierung von  $m/z = 423$  erhalten wurden. Rot: Fragmente des Peaks bei 5,3 min, blau: Fragmente des Peaks bei 9,0 min und grün: Fragmente des Peaks bei 10,6 min. Violett: Fragmente, die zusätzlich mit der DIP-APCI erhalten wurden. Schwarz: alle weiteren Signale, die nicht als dominante Fragmente in den HPLC-ESI-MS Untersuchungen detektiert wurden oder zusätzlich im DIP-APCI Spektrum detektiert wurden. Die detaillierten HPLC-ESI-MS Spektren sind im Anhang 6.2.1, Abb. 161 Seite 174 dargestellt.

Eine eindeutige Identifizierung ist bei allen drei verwendeten Methoden nur durch Vergleich mit einer Reinsubstanz möglich, die unter den gleichen Bedingungen analysiert wurde. Ein Vergleichsstandard stand allerdings nicht zur Verfügung.

Im Vergleich zur DIP-APCI zeigt die DIP-EESI hier den Vorteil, dass sie die gelösten unpolaren Hilfsstoffe nur in geringem Maße ionisiert. Dadurch konnten neben den fünf Verunreinigungen und den m/z-Verhältnissen, die dem Wirkstoff Amlodipin zugeordnet wurden, zahlreiche m/z-Verhältnisse detektiert werden, die nicht den bekannten Amlodipin-verwandten Substanzen zuzuordnen sind.

Von den detektierten unbekannt Substanzen wurden die intensivsten Substanzen mit den m/z-Verhältnisse 318, 346, 360, 414, 435, 508, 531, 706 und 720 weiter untersucht. Dass es sich bei diesen Signalen um Fragmente des Amlodipin-Dimers handeln könnte, wurde ausgeschlossen, da die Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten im Chromogramm detektiert wurden. Aufgrund des Zeitunterschiedes lassen sich die m/z-Verhältnisse in drei Gruppen einteilen (Abb. 77).

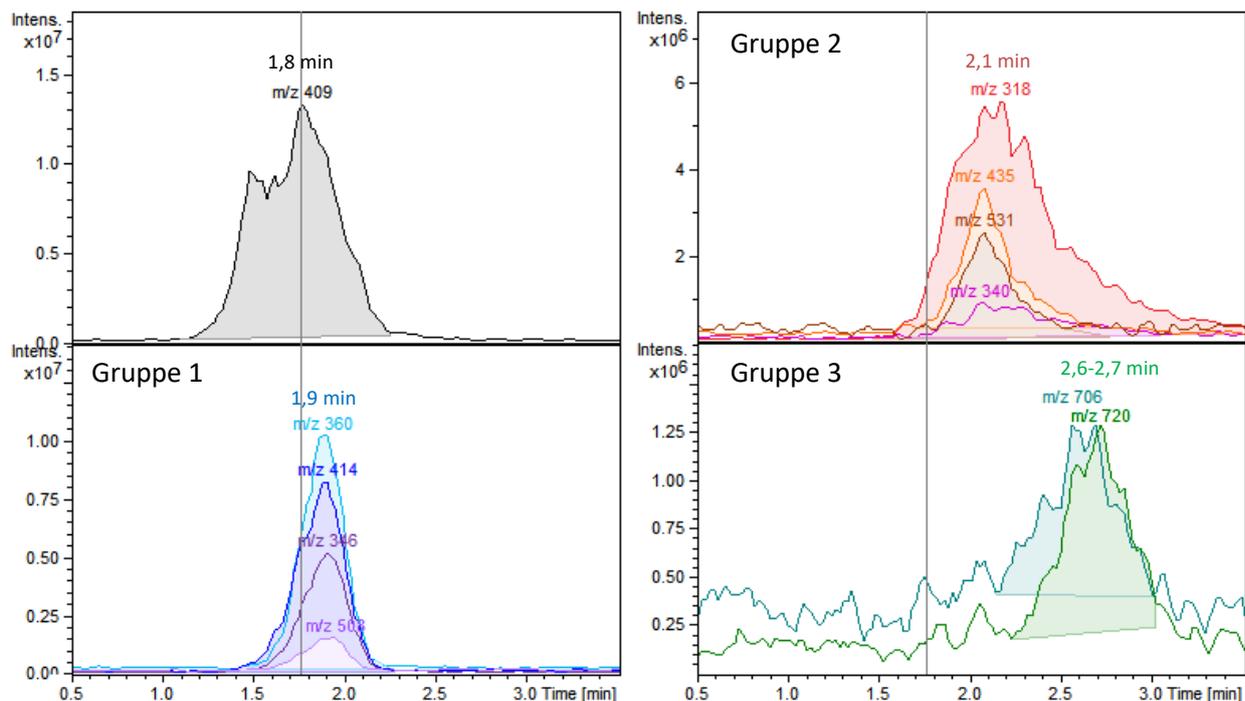


Abb. 77: Zeitliche Unterschiede der unbekannt m/z-Verhältnisse unterteilt in drei Gruppen (blau:  $t = 1,9$  min,  $m/z = 346, 360, 414, 508$ ; rot:  $t = 2,1$  min,  $m/z = 318, 340, 435, 531$ ; grün:  $t = 2,6-2,7$  min,  $m/z = 706, 720$ ) im Vergleich zu Amlodipin (schwarz:  $t = 1,8$  min  $m/z = 409$ )

Die Gruppe 1, bestehend aus  $m/z = 346, 360, 414$  und  $508$ , verdampft im hinteren Bereich des Amlodipin-Peaks zwischen  $1,3$  und  $2,3$  min und zeigt eine deutlich andere Peak-Form als der Amlodipin-Peak und seine Fragmente. Alle vier  $m/z$ -Werte besitzen das charakteristische  $^{35}/^{37}\text{Cl}$ -Isotopenmuster, das auf das Vorhandensein eines Chloratoms in seiner Struktur hinweist. Nachfolgend werden die Fragmentierungsuntersuchungen und Vergleiche mit den HPLC-ESI-MS Daten diskutiert. Die Ergebnisse sind am Ende dieses Abschnittes in Tabelle 31 (Seite 114) zusammengefasst.

Durch Fragmentierung von  $m/z = 508$  bzw.  $508 \rightarrow 360$  sowie  $360$  konnte belegt werden, dass es sich bei  $m/z = 360$  bereits um ein Fragment von  $m/z = 508$  handelt (Abb. 78). Das Signal  $m/z = 346$  wurde ebenfalls aus  $m/z = 508$  erhalten. Aufgrund der geringen Intensität konnte aber kein  $MS^3$ -Spektrum von  $m/z = 508 \rightarrow 346$  produziert werden, um zu belegen, dass es sich um die gleiche Substanz handelt. Da  $m/z = 346$  nicht aus  $m/z = 360$  erhalten wurde und ihre Fragmente z. T. andere Massen zeigen, wurde es bei der Struktursuche von  $m/z = 508$  und  $360$  nicht berücksichtigt. Auch  $m/z = 414$  (Abb. 78), das nach Fragmentierung im Wesentlichen nur in 2 Fragmente zerlegt wird ( $m/z = 386$  und  $368$ ), wurde nicht weiter berücksichtigt, da zu wenig Informationen vorlagen.

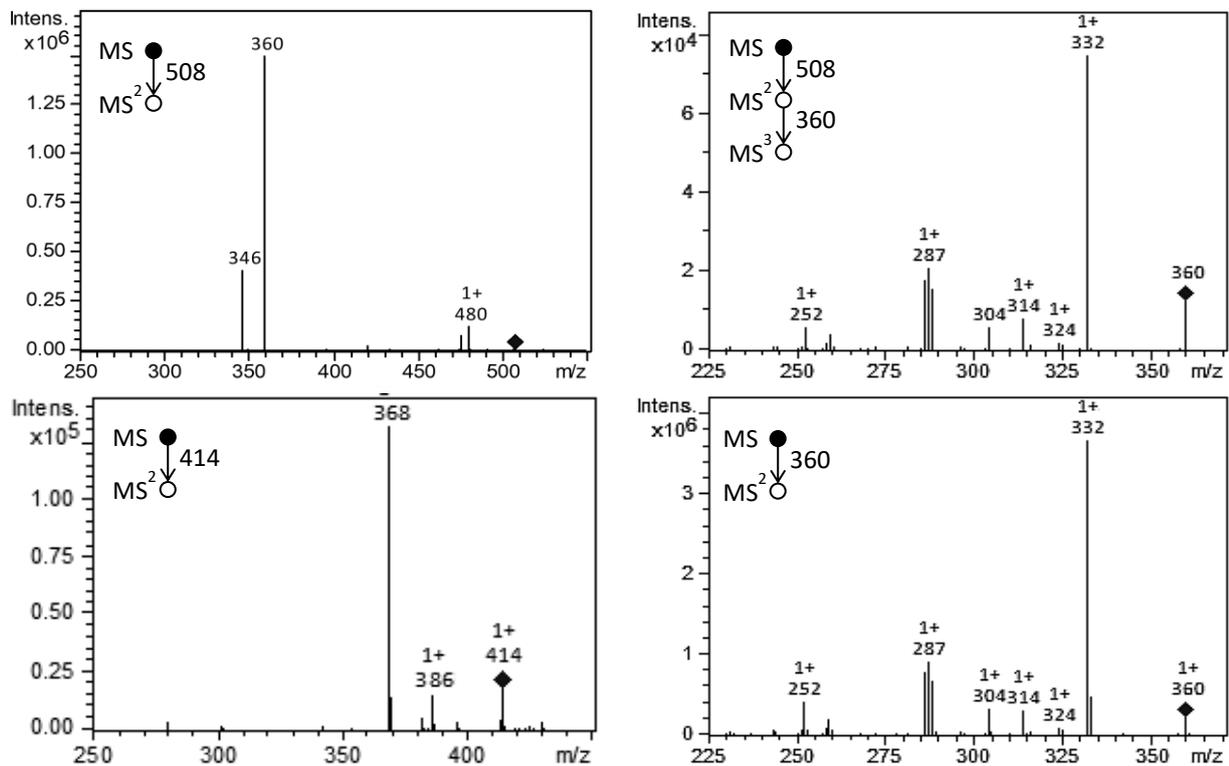


Abb. 78: Links oben:  $MS^2$ -Spektrum der Masse 508; Links unten:  $MS^2$ -Spektrum der Masse 414; Rechts:  $MS^3$ -Spektrum  $508 \rightarrow 360$  zeigt dieselben Massen wie das  $MS^2$ -Spektrum unten rechts

Aus den Fragmenten von  $m/z = 360$ , die mittels  $MS^n$ -Untersuchungen detektiert wurden, konnte eine Amlodipin-verwandte Struktur postuliert werden (Abb. 79).

Über  $m/z = 508$  liegen nur wenig Daten vor. Hier kann eine Struktur nur unter weiteren Annahmen gemacht werden. Wie aus der Literatur bekannt [200], geht Amlodipin Reaktionen mit den in der Tablette vorhandenen Hilfsstoffen (Zuckern) ein. Die Reaktionsprodukte aus Amlodipin und den Hilfsstoffen werden mittels Maillard-Reaktion gebildet [200], die durch die Temperaturen der DIP begünstigt werden. Unter Annahme einer solchen Reaktion konnte eine Struktur für  $m/z = 508$  erstellt werden, s. Abb. 79.

Beim Vergleichen der Struktur von  $m/z = 360$  mit der Amlodipin-Struktur fällt auf, dass sich leicht eine Struktur für  $m/z = 346$  bilden lässt, vor allem unter der Annahme, dass  $m/z = 346$  und  $m/z = 360$  den

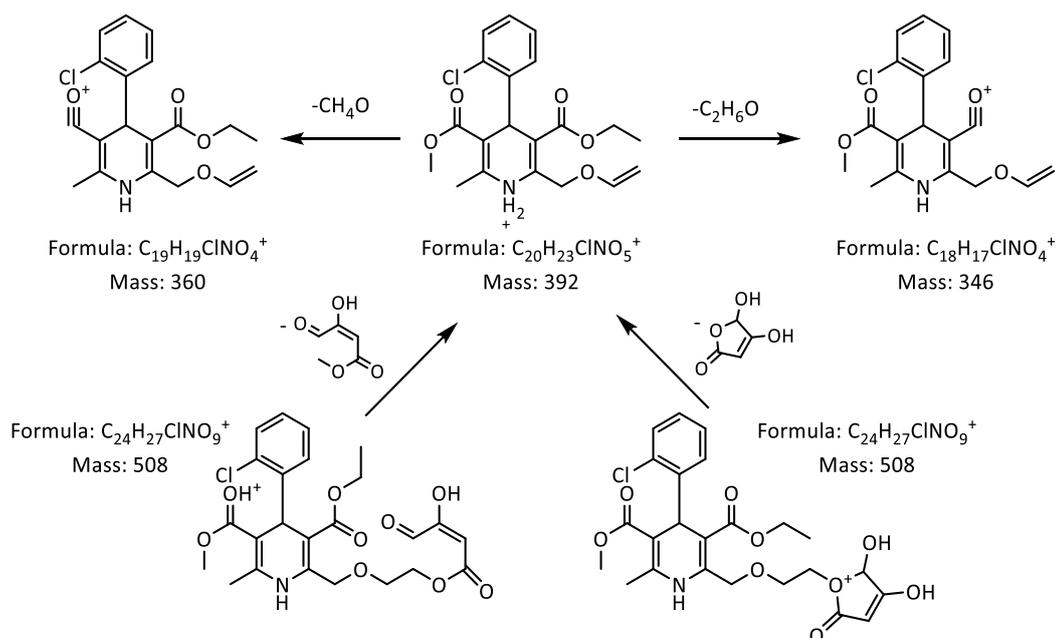


Abb. 79: Mögliche Strukturen für  $m/z = 360$ ,  $346$  und  $508$ , gebildet anhand der Fragmente, die mittels DIP-EESI erhalten wurden, sowie ihre Verbindung zu  $m/z = 392$ , das mittels HPLC-ESI-MS erhalten wurde.

gleichen Ursprung haben, s. Abb. 79. Mit dieser Struktur können alle detektierten Fragmente der  $MS^n$ -Untersuchungen von  $m/z = 346$  erklärt werden. Der Fragmentierungsweg ist in Anhang 6.2.1 Abb. 168 Seite 179 dargestellt. Für einige der Fragmente ( $m/z = 287$ ,  $259$  und  $251$ ) sind jedoch aufwendige Umlagerungen notwendig, um sie der postulierten Struktur zuzuordnen. Bei diesen Fragmenten ist es wahrscheinlicher, dass sie nicht aus derselben Substanz stammen. Da viele der Substanzen zeitgleich bzw. überlappend verdampfen, konnte das erwartet werden. Die drei Fragmente  $m/z = 287$ ,  $259$  und  $251$  waren nicht intensiv genug, um  $MS^3$ -Untersuchungen durchzuführen und weitere Informationen über ihre Struktur zu erhalten.

Die HPLC-ESI-MS Daten zeigen, dass  $m/z = 346$  als intensives Signal in den Peaks bei  $17,9$  min und  $20,7$  min detektiert wird (Abb. 80). Weniger intensiv wurde  $m/z = 346$  bei  $3,5$  min (Verunreinigung D),  $8,5$  min und  $9,3$  min beobachtet. Die HPLC-ESI-MS Analyse bestätigt somit das DIP-EESI-Resultat, dass es sich um mehr als eine Substanz handelt.

Vergleicht man das DIP-EESI- $MS^2$ -Spektrum von  $m/z = 346$  (Abb. 81) mit den beiden Spektren, die für die Peaks bei  $17,9$  min und  $20,7$  min erhalten wurden, wird deutlich, dass das DIP-EESI- $MS^2$ -Spektrum eine Mischung der beiden Spektren zeigt. So lässt sich die aus dem DIP-EESI-Daten postulierte Substanz für  $m/z = 346$  dem Peak bei  $20,7$  min zuordnen. Bestätigt werden konnte auch die Vermutung, dass es sich um mindestens zwei Substanzen im DIP-EESI-Spektrum handelt und die Fragmente  $m/z = 287$ ,  $259$  und  $251$  nicht zur postulierten Substanz gehören, da sie im Peak bei  $17,9$  min gefunden wurden.

Der Vergleich der DIP-EESI Ergebnisse mit den HPLC-ESI-MS Ergebnissen für  $m/z = 360$  macht deutlich, dass es sich nicht, wie aus den DIP-EESI-Resultaten angenommen, um eine Substanz, sondern um drei Substanzen handelt. So wurde  $m/z = 360$  bei  $7,9$  min als sehr kleiner Peak und sehr intensiv bei  $15,0$  min

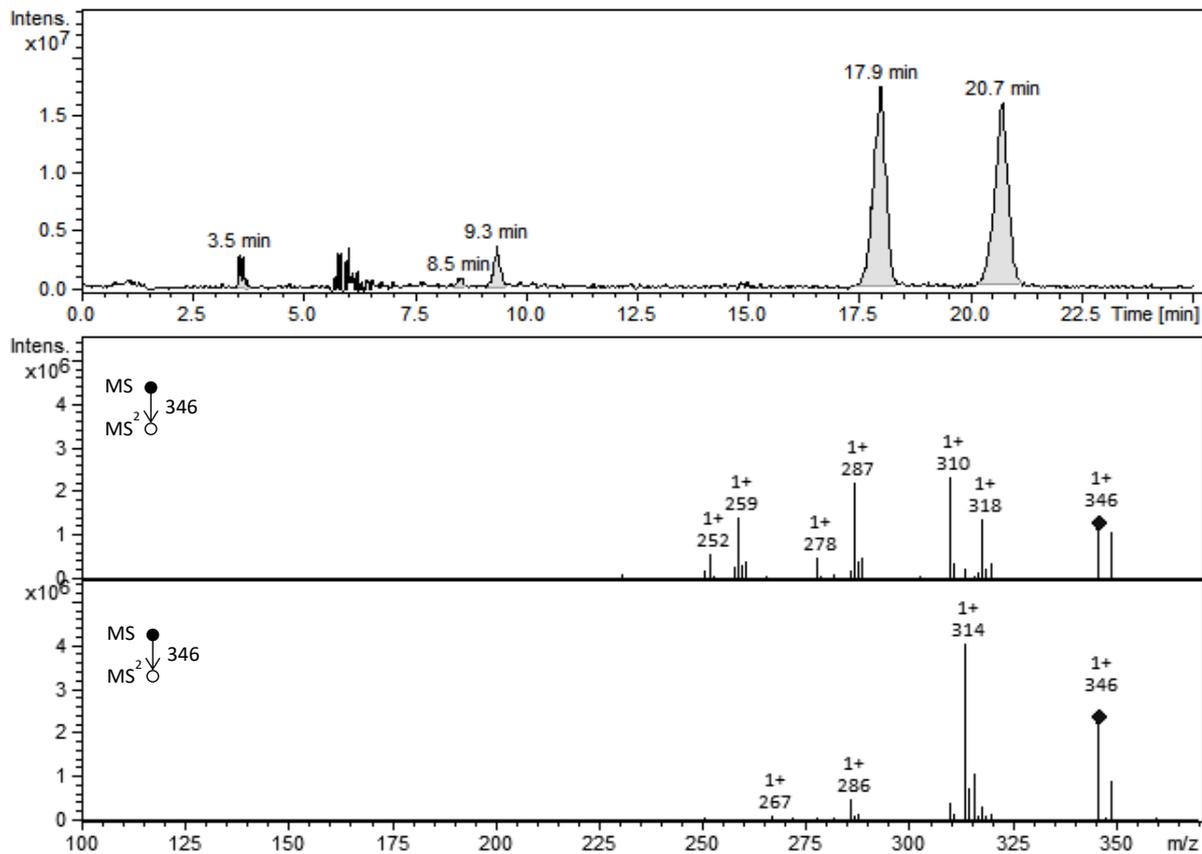


Abb. 80: EIC von  $m/z = 346$  nach Analyse mit HPLC-ESI-MS (oben) und Fragmentspektren der Peaks bei 17,9 min (Mitte) und 20,7 min (unten)

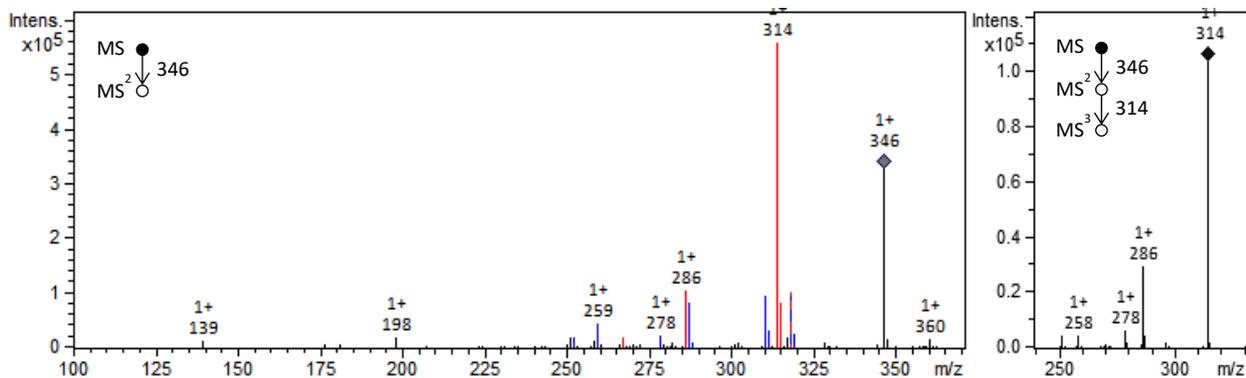


Abb. 81: Fragmentspektren (links MS<sup>2</sup>-, rechts MS<sup>3</sup>-Spektrum) von  $m/z = 346$  nach Ionisierung mit DIP-EESI. Rot markiert wurden die Massen, die identisch sind mit den Fragmenten, die im HPLC-ESI-MS Peak bei 20,7 min detektiert wurden. Blau markiert wurden die Massen, die identisch sind mit den Fragmenten, die bei 17,9 min detektiert wurden.

sowie 20,7 min detektiert. Die erhaltenen MS<sup>2</sup>-Spektren für  $m/z = 360$  der Peaks 15,0 min und 20,7 min zeigen, bis auf kleine Intensitätsunterschiede, das gleiche Spektrum (Abb. 82), das identisch mit dem der DIP-EESI ist (Abb. 78). Der Peak bei 7,9 min war nicht intensiv genug, um ihn weiter zu untersuchen. Hier wird deutlich, dass bei Untersuchungen mit der DIP keine ausreichende Unterscheidung strukturell verwandter Substanzen möglich ist und es zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse kommen kann.

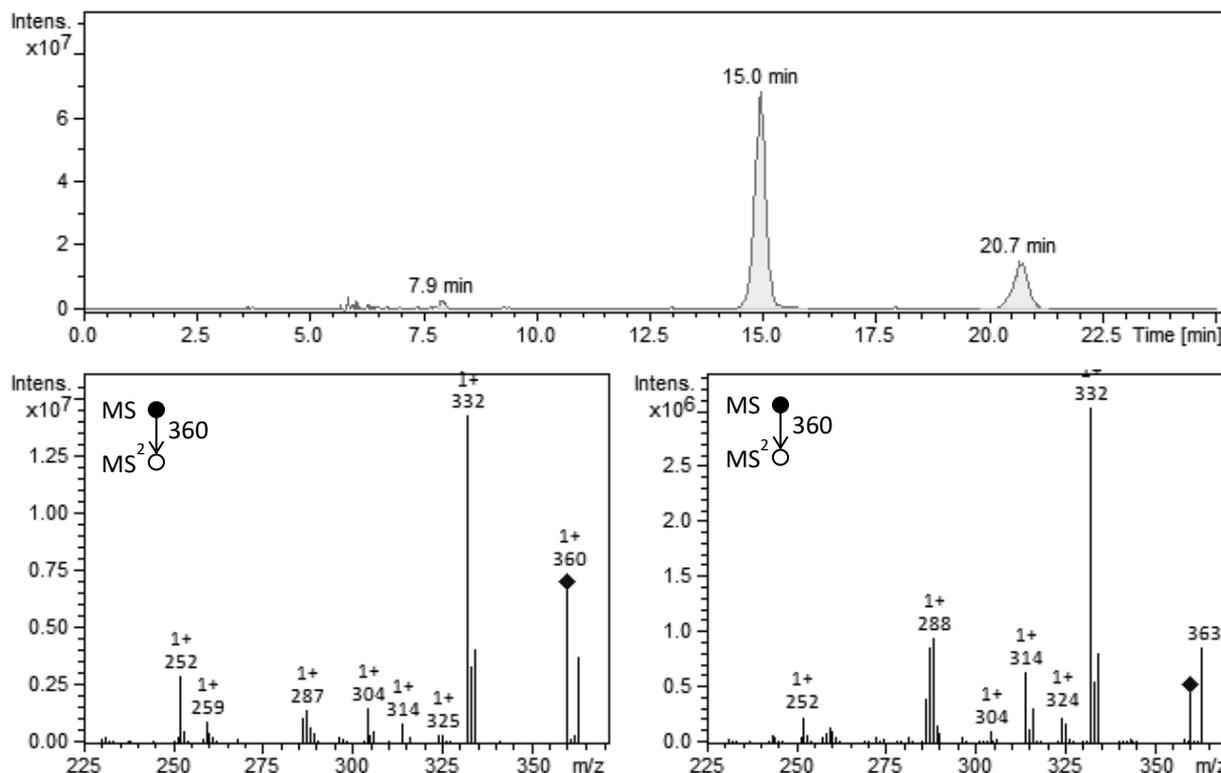


Abb. 82: Oben: EIC-Chromatogramm von  $m/z = 360$ . Unten: MS<sup>2</sup>-Spektren von  $m/z = 360$  nach HPLC-ESI-MS Analyse. Links aus dem Peak bei 15,0 min und rechts aus dem Peak bei 20,7 min. Die Spektren sind gleich dem Spektrum, das mit DIP-EESI erhalten wurde.

Aufgrund der Intensität der gefundenen Substanzen mittels HPLC-ESI-MS dürften vor allem die Substanzen bei 15,0 min ( $m/z = 360$ ), 17,9 min ( $m/z = 346$ ) und 20,7 min ( $m/z = 346$  und  $360$ ) für das DIP-EESI-Resultat verantwortlich sein. Keiner der drei Peaks zeigt jedoch  $m/z = 508$ . Es ist davon auszugehen, dass wie eingangs beschrieben, die Substanz mit  $m/z = 508$  das Produkt bzw. Zwischenprodukt einer Maillard-Reaktion ist, das in der DIP gebildet wird. Es entsteht in so hoher Konzentration, dass es mit DIP-EESI detektiert wird. Da die Proben der HPLC-ESI-MS nicht so hohen Temperaturen ausgesetzt sind, kann das Zwischenprodukt mit  $m/z = 508$  nicht detektiert werden. Es wird nur das Endprodukt der Reaktion, das in den Tabletten bereits vorliegt und über den Lagerungszeitraum gebildet worden war, mit HPLC-ESI-MS mit  $m/z = 392$  detektiert.

Alle drei Peaks, die mit dem DIP-EESI Ergebnis konform sind, weisen hingegen ein Signal bei  $m/z = 392$  auf, das in den DIP-EESI und DIP-APCI Messungen dem Amlodipin-Fragment ( $[M+H-NH_3]^+$ ) zugeordnet und nicht weiter untersucht wurde. Rückwirkend betrachtet zeigt  $m/z = 392$  im Vergleich mit  $m/z = 346$  und  $m/z = 360$  die gleiche Form im DIP-EESI Chronogramm und eine andere Form als der Wirkstoff (Abb. 83). Daher hätte  $m/z = 392$  einer genaueren Untersuchung bedurft, vor allem auch, da sich  $m/z = 392$  aus den überschneidenden Strukturen von  $m/z = 360$  und  $346$  ergibt, wie in Abb. 79 bereits dargestellt.

Ausgehend von  $m/z = 392$  kann auch  $m/z = 414$  mit einer Differenz von  $\Delta m 22$  erklärt werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das Natrium-Addukt der Masse 391.

Tabelle 31: Übersicht der erhaltenen MS<sup>n</sup>-Fragmente die aus den dominanten Signalen der Gruppe 1 erhalten wurden. Oben: Fragmente wie sie nach Ionisierung mit DIP-EESI gefunden wurden. Mitte: Übersicht der Peaks im HPLC-ESI-MS Chromatogramm, die die dominanten m/z-Signale zeigen. Bei 15,0 min, 17,9 min und 20,7 min traten die intensivsten Peaks auf. Unten: Fragmente der relevanten m/z-Signale der intensivsten Peaks.

**Gruppe 1 Ionisierung mit DIP-EESI**

m/z = 346 →						360	346				318	314	310			287	286	278	259	252	251	139	
m/z = 360 →								332			324	314		304	288	287	286			259	258	252	
m/z = 508 →	480					360	346																
m/z = 414 →						360 →		332			324	314		304	288	287	286			259	258	252	
						386	368																

**HPLC-ESI-MS**

m/z = 346						3,5 min*	8,5 min	9,3 min												17,9 min	20,7 min	
m/z = 360	ist enthalten in den Peaks bei						7,9 min															
m/z = 392							7,9 min	9,3 min	10,1 min	10,5 min	15,0 min									17,9 min	20,7 min	

m/z = 508 wurde nicht mit HPLC-ESI-MS detektiert  
 \* Verunreinigung D

**MS2- Untersuchung der drei intensivsten Peaks bei**

RT	m/z																						
15,0 min	392 →					360																	
	360 →						334	332	325	324	314		304	288	287	286				259	252		
	346 →										318	310								259	252	251	
17,9 min	392 →					360																	
	360 →						334	332	325	324	314		304	288	287	286				259	252		
20,7 min	392 →					360																	
	346 →											314								267			

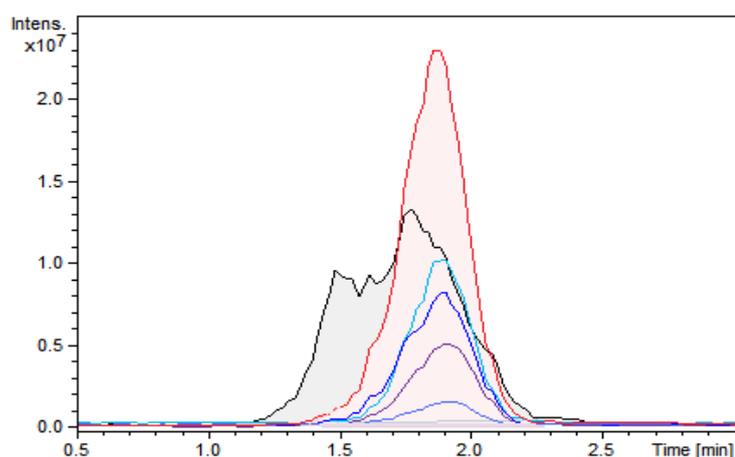


Abb. 83: Overlay der EIC für die  $m/z$ -Werte der Gruppe 1 in Blautönen ( $m/z = 508, 414, 360$  und  $346$ ), für  $m/z = 392$  in rot und  $m/z = 409$  (protonierter Wirkstoff) in schwarz

In der Literatur werden für  $m/z = 392$  drei mögliche thermische Abbauprodukte (ABP) beschrieben, die mittels MS, NMR und Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurden (Abb. 84):

ABP-1: 9-Ethyl-7-methyl-8-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,3,4,8,-tetrahydropyrido[2,1-c][1,4]oxazin-7,9-dicarboxylat

ABP-2: 9-Ethyl-7-methyl-8-(2-chlorophenyl)-6-methyl-3,4,8,9-tetrahydropyrido[2,1-c][1,4]oxazin-7,9-dicarboxylat

ABP-3: 5-Ethyl-7-methyl-6-(2-chlorophenyl)-8-methyl-3,4,6,7-tetrahydro-2H-1,4-benzoxazin-5,7-dicarboxylat.

Diese Verbindungen können laut Lakshmi Devi et al. bereits als Verunreinigungen im pharmazeutischen Wirkstoff auftreten. [201] Das ABP-1 unterscheidet sich von der postulierten Struktur nur durch den Ringschluss. Was zeigt, dass durchaus nur auf Grundlage der DIP-EESI-MS Daten gute Strukturvorschläge gemacht werden können. Eine Unterscheidung dieser drei Strukturen anhand der MS-Daten ist jedoch nicht möglich. Weiter stimmen die mittels DIP-EESI gewonnenen Daten mit dem MS und MS<sup>2</sup> Daten von Reddy et al. [202] für ABP-3 überein.

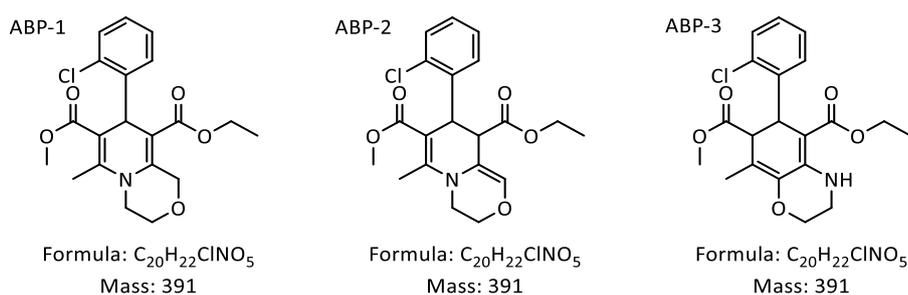


Abb. 84: Thermische Abbauprodukte von Amlodipin nach [201]

Die Substanzen aus Gruppe 2, bestehend aus den  $m/z$ -Verhältnissen 318, 340, 435 und 531 (Tabelle 32), werden hauptsächlich nach dem Amlodipin-Peak zwischen 1,7 und 3,0 min detektiert (Abb. 77 Seite 109). Das Signal bei  $m/z = 340$  war zu gering konzentriert, um ein aussagekräftiges Fragmentspektrum zu erhalten und konnte auch nicht mittels HPLC-ESI-MS detektiert werden. Die anderen drei  $m/z$ -Verhältnisse konnten fragmentiert werden. Hierbei war zu erkennen, dass das Signal bei  $m/z = 435$  aus zwei, wenn nicht sogar aus drei Substanzen A ( $t = 2,15$  min), B ( $t = 2,3$  min) und C ( $t = 2,5$  min) besteht, die zu leicht unterschiedlichen

Zeiten im Chronogramm detektiert wurden (Abb. 85). In der gleichen Abbildung ist erkennbar, dass auch für  $m/z = 318$  zwei Substanzen D ( $t = 1,8$  min) und E ( $t = 2,3$  min) detektiert werden konnten. Eine bessere Trennung konnte durch einen flacheren Temperaturgradienten nicht erreicht werden, die Signale wurden nur breiter, wodurch die weniger intensiven Signale im Rauschen ganz verschwanden. Dies konnte auch nicht durch eine höhere Konzentration der Amlodipinlösung kompensiert werden, da das Amlodipin die Detektion der Verunreinigungen unterdrückte.

Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Fragmentation der  $m/z$ -Signale, die der Gruppe 2 zugeordnet wurden

$m/z = 318$	Nach Fragmentierung Detektion von 2 Substanzen D und E
$m/z = 340$	Fragmentierung nicht möglich, zu gering konzentriert
$m/z = 435$	Nach Fragmentierung Detektion von 3 Substanzen A, B und C
$m/z = 531$	Nach Fragmentierung Detektion von einer Substanz

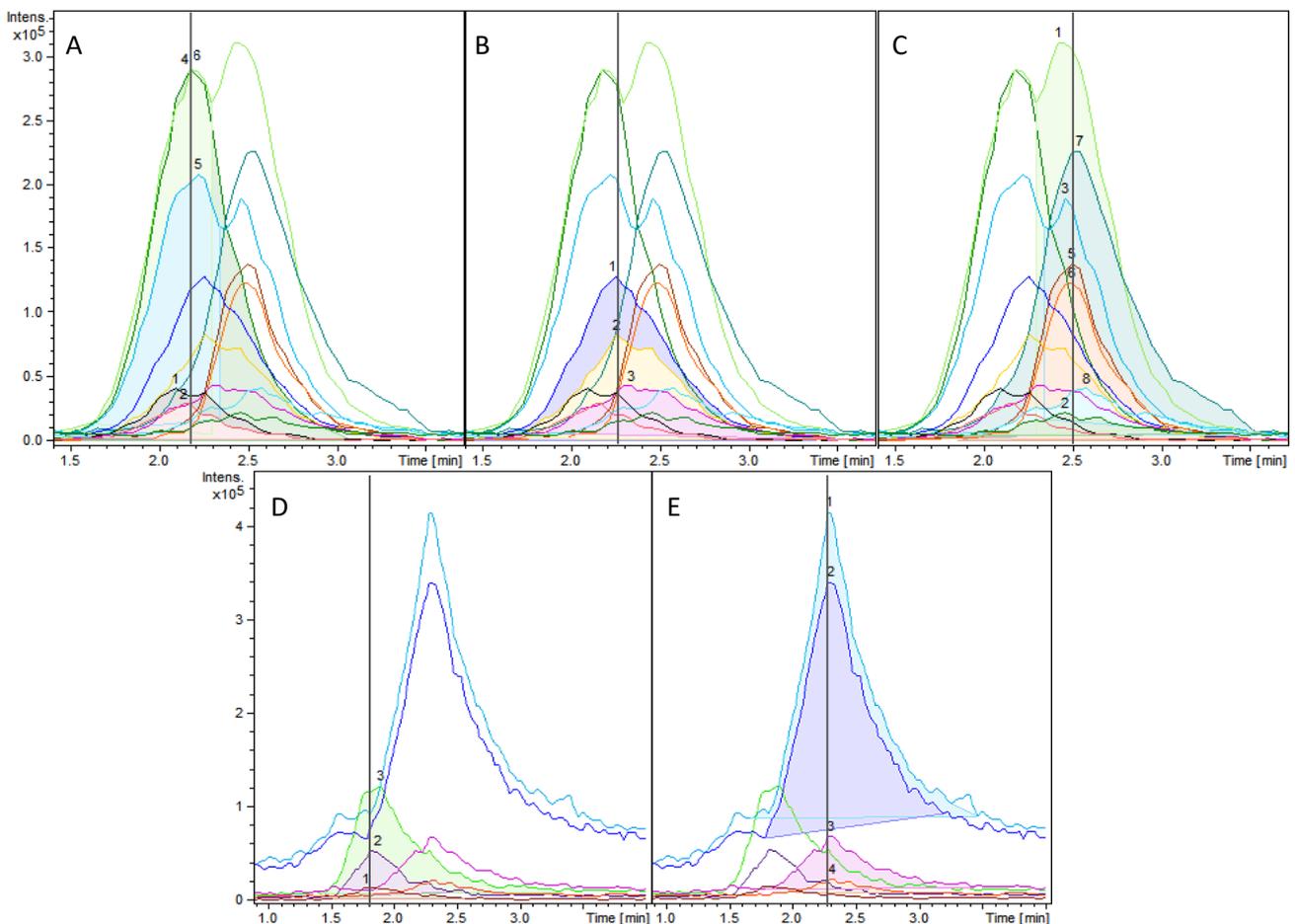


Abb. 85: Chronogramme der erhaltenen Fragmente.

Oben aus  $m/z = 435$ :

A:  $t = 2,15$  min (1:  $m/z = 294$ ; 2:  $m/z = 357$ ; 3:  $m/z = 238$ ; 4:  $m/z = 364$ ; 5:  $m/z = 403$ ; 6:  $m/z = 389$ )

B:  $t = 2,3$  min (1:  $m/z = 346$ ; 2:  $m/z = 318$ ; 3:  $m/z = 286$ )

C:  $t = 2,5$  min (1:  $m/z = 403$ ; 2:  $m/z = 407$ ; 3:  $m/z = 389$ ; 4:  $m/z = 260$ ; 5:  $m/z = 348$ ; 6:  $m/z = 320$ ;  
7:  $m/z = 288$ ; 8:  $m/z = 287$ )

Unten aus  $m/z = 318$ :

D:  $t = 2,0$  min (1:  $m/z = 244$ ; 2:  $m/z = 272$ ; 3:  $m/z = 290$ )

E:  $t = 2,6$  min (1:  $m/z = 286$ ; 2:  $m/z = 282$ ; 3:  $m/z = 251$ ; 4:  $m/z = 304$ )

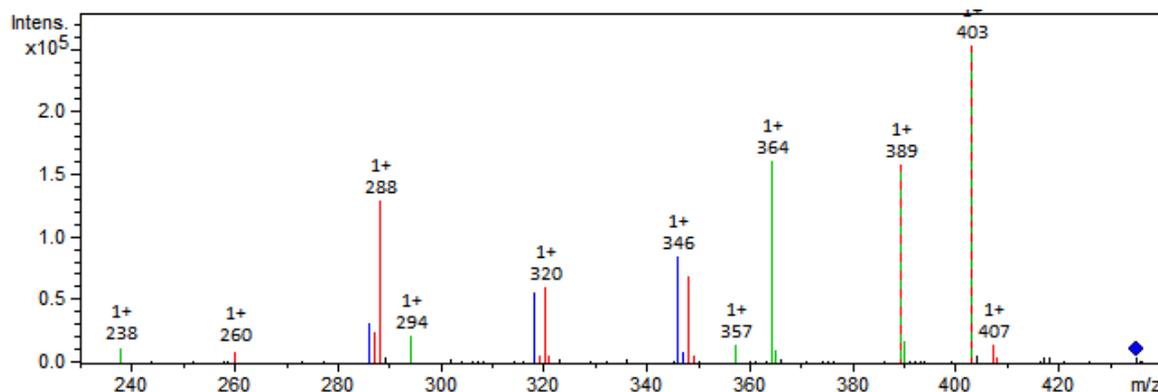


Abb. 86: Massenspektrum des in Abb. 85 oben gezeigten Chromogramms. Grün eingefärbt alle  $m/z$ -Verhältnisse, die der Substanz A zugeordnet werden konnten. Blau eingefärbt alle  $m/z$ -Verhältnisse, die der Substanz B zugeordnet werden konnten. Rot eingefärbt alle  $m/z$ -Verhältnisse, die der Substanz C zugeordnet werden konnten. Die Signale  $m/z = 389$  und  $403$  können sowohl Substanz A als auch C zugeordnet werden.

Auf Grundlage der  $MS^2$ -Spektren aus  $m/z = 435$  (Abb. 86), sowie der  $MS^3$ -Spektren aus  $m/z = 403$  und  $389$  (Abb. 87 und Abb. 88) konnte für Substanz C ( $m/z = 435$ ,  $t = 2,5$  min) anhand der erhaltenen Fragmente, eine dehydrierte Form der bekannten N-Formyl-Amlodipin-Verunreinigung postuliert werden (Abb. 89). Eine zweifelsfreie Identifizierung ist ausgehend von den Massenspektren nicht möglich, da die exakte Position der Doppelbindung nicht bestimmt werden kann. Weitere Informationen könnte hier die Untersuchung einer Standardsubstanz liefern. Dies war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich. Dass es sich bei den Substanzen A und B ebenfalls um ein N-Formyl-dehydro-amlodipin handeln könnte, kann nicht ausgeschlossen werden. Die detektierten Fragmente von Substanz A und B lassen sich ebenfalls dem N-Formyl-dehydro-amlodipin zuordnen, obwohl sie sich in den meisten Fragmenten grundlegend unterschieden (Tabelle 33). Dies macht deutlich, dass mittels DIP-EESI-MS hier nicht genügend Informationen erhalten werden, um anhand der wenigen Fragmente zuverlässig eine Struktur zu postulieren.

Tabelle 33: Übersicht der erhaltenen  $MS^2$ -Fragmente aus  $m/z = 435$ , sowie deren Zuordnung zu den unbekannt Substanzen A, B und C.

Substanz A		403	389	364	357								294				238	
Substanz B		403	389	364				347	346			318				286		
Substanz C	407	403	389	364		349	348			320	319			288	287		260	

Denkbar ist auch, dass es sich bei  $m/z = 435$  lediglich um ein Fragment handelt und die eigentliche Substanz nicht stabil genug ist, um detektiert zu werden.

Diese Ergebnisse können anhand der HPLC-ESI-MS Daten nicht überprüft werden. So konnten für  $m/z = 435$  im Chromatogramm zwar zwei Peaks detektiert werden. Diese lagen jedoch unter dem Amlodipin-Peak, wodurch keine  $MS$ -Spektren der Peaks erhalten werden konnte. Auch  $MS^2$ -Untersuchungen brachten keine aussagekräftigen Ergebnisse, da die Konzentration zu gering war.

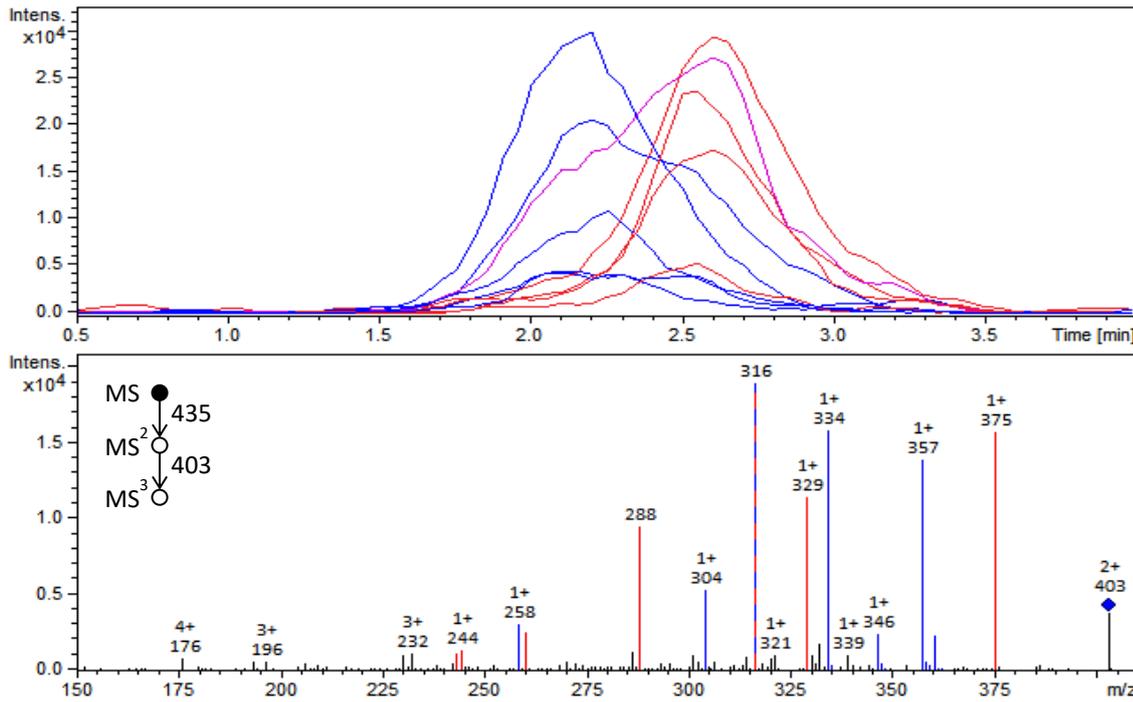


Abb. 87: Oben: Chronogramm der erhaltenen Fragmente aus  $m/z = 435 \rightarrow 403$ . Unten: Massenspektrum des obigen Chronogramms. Blau:  $m/z$ -Verhältnisse können der Substanz A oder B zugeordnet werden. Rot:  $m/z$ -Verhältnisse können der Substanz C zugeordnet werden.

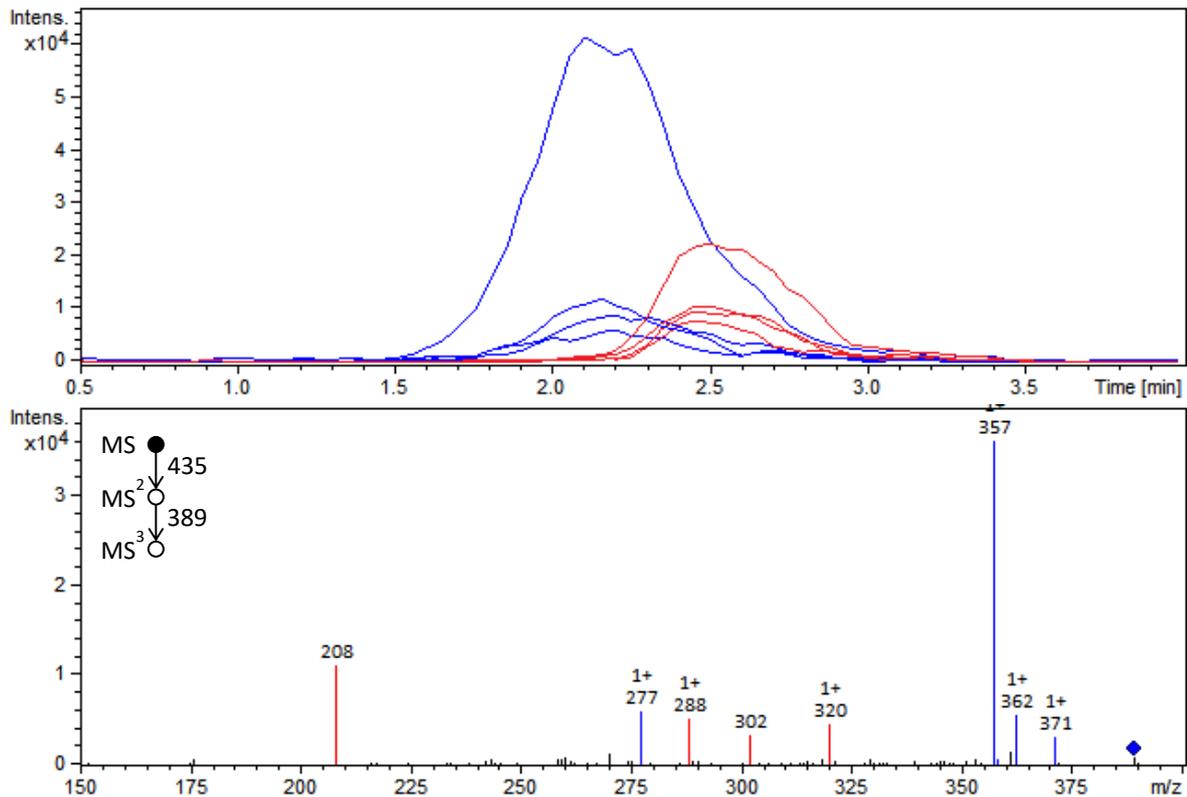


Abb. 88: Oben: Chronogramm der erhaltenen Fragmente aus  $m/z = 435 \rightarrow 389$ . Unten: Massenspektrum des obigen Chronogramms. Blau:  $m/z$ -Verhältnisse können der Substanz A oder B zugeordnet werden. Rot:  $m/z$ -Verhältnisse können der Substanz C zugeordnet werden.

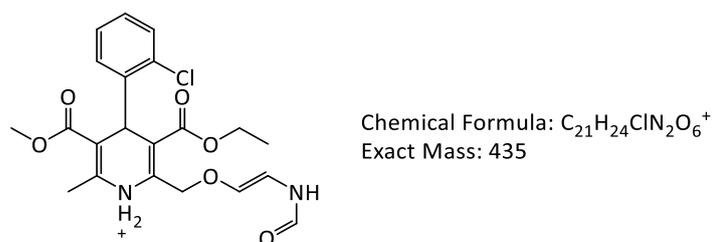


Abb. 89: Dehydrierte Form des N-Formyl-Amlodipin, als mögliche Struktur der unbekanntes Substanz C ( $m/z = 435$  t = 2,5 min)

Für Substanz D ( $m/z = 318$  t = 1,8 min), bei der aus den DIP-EESI-Messungen nur drei Fragmente zugeordnet werden konnten, konnte keine Struktur postuliert werden. Jede Struktur ist bei dieser Datenlage rein spekulativ. Auch für die Substanz E (t = 2,3 min) konnte keine verlässliche Struktur postuliert werden, da hier etliche theoretische Strukturen aus der Amlodipin-Struktur möglich sind. Einige dieser Strukturen sind in Abb. 90 zu sehen. Zeitgleich mit Substanz E wurden auch Substanz B sowie  $m/z = 531$  detektiert. Hierbei wurde beobachtet, dass sechs der zehn Fragmente, die aus  $m/z = 531$  erhalten wurden und kleiner  $m/z = 435$  sind, mit denen, die aus Substanz B ( $m/z = 435$ ) erhalten wurden übereinstimmten. Dies gilt auch für zwei Fragmente der Substanz E (vgl. Tabelle 34). Das Fragmentspektrum von  $m/z = 531$  ist in Anhang 6.2.1, Abb. 170 Seite 181 gezeigt. Die Übereinstimmung der Fragmente legt nahe, dass es sich bei den drei Substanzen um dieselbe Substanz handelt. Da jedoch keine Struktur postuliert werden konnte, lässt sich diese Theorie nicht überprüfen.

Auch diese Ergebnisse lassen sich anhand der HPLC-ESI-MS Daten nicht verifizieren. So wurde für  $m/z = 318$  nur ein Peak mit sehr geringer Intensität detektiert, wobei es sich wahrscheinlich um ein Fragment von  $m/z = 408$  handelt. Ein Signal für  $m/z = 531$  wurde nur zeitgleich mit dem Injektionspeak gefunden, enthielt aber nicht  $m/z = 318$ .

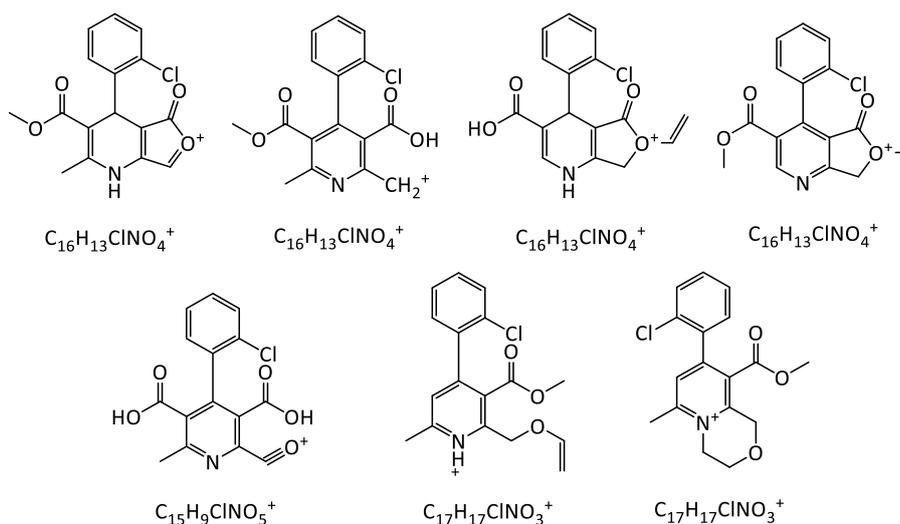


Abb. 90: Mögliche Strukturen des Signals  $m/z = 318$ , abgeleitet von Amlodipin

Tabelle 34: Übersicht der erhaltenen MS<sup>2</sup>-Fragmente aus  $m/z = 531$ , Substanz B ( $m/z = 435$ ) und Substanz E ( $m/z = 318$ )

531 →	513	503	499	485	453	390			364	346	348	320	318		294	286	238	168
435 →							403	389	364	346	348	320	318			286		
E													318 →	304		286		

Gruppe 3, bestehend aus den  $m/z$ -Verhältnissen 720 und 706, verdampft im Bereich 2,4 bis 3,1 min und ist klar von den anderen beiden Gruppen getrennt (Abb. 77, Seite 109). Das Isotopenmuster (Abb. 91) von  $m/z = 720$  deutet stark daraufhin, dass zwei Chloratome vorhanden sind. Die ermittelte Isotopenverteilung für  $m/z = 720$  sowie für je ein theoretisches Molekül mit zwei Chloratomen bzw. einem Chlor und einem Bromatom ist in Tabelle 35 dargestellt. Geringe Abweichungen zwischen der theoretischen Isotopenverteilung und der gemessenen Isotopenverteilung können durch den Hintergrundabzug sowie durch Messungenauigkeiten infolge der geringen Signalintensität entstehen.

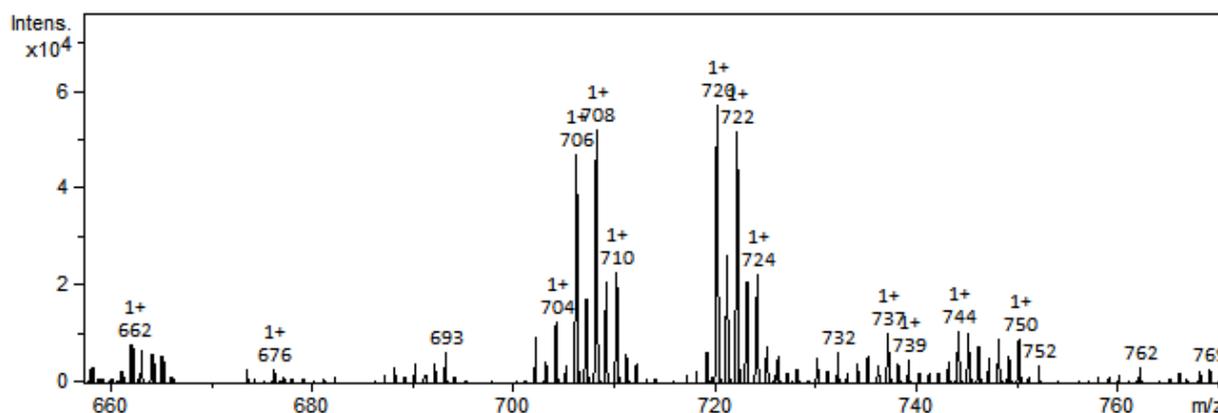


Abb. 91: Isotopenmuster von  $m/z = 706$  und  $m/z = 720$  wie es im Bereich 2,4 bis 3,1 min der Amlodipin DIP-EESI Messung detektiert wurde.

Tabelle 35: Gemessene Intensitätsverteilung von  $m/z = 720$  bis  $m/z = 725$  und die daraus ermittelte Isotopenverteilung sowie die theoretische Isotopenverteilung für je ein theoretisches Molekül mit zwei Chloratomen bzw. einem Chlor und einem Bromatom

$m/z$	Intensität	Isotopenverteilung [%]	Isotopenverteilung theoretisches Molekül mit 2 Cl [%]	Isotopenverteilung theoretisches Molekül mit ClBr [%]
720	55012	37	37	26
721	24179	16	16	10
722	48907	33	28	35
723	17291	12	11	14
724	18657	13	6	11
725	5812	4	2	4

Für  $m/z = 706$  ist dies nicht so eindeutig, da  $m/z = 708$  für ein Chlorisotop zu intensiv ist. Das Isotopenmuster deutet hier eher auf ein Bromisotop hin, das als Verunreinigung bei der Chlorierung der Verbindung bei der Herstellung eingeschleppt worden sein könnte (Tabelle 36).

Da aber beide Massen zeitgleich verdampfen und  $m/z = 706$  bis auf zwei Ausnahmen die gleichen Fragmentmassen zeigt (Tabelle 37), wie  $m/z = 720$ , ist anzunehmen, dass  $m/z = 708$  überlagert wird und dadurch intensiver ist. Bei  $m/z = 706$  handelt es sich jedoch nicht, wie leicht zu vermuten ist, um ein Fragment von  $m/z = 720$ , da bei der gezielten Fragmentierung von  $m/z = 720$  das  $m/z$ -Verhältnis 706 nicht erzeugt werden konnte. Das Fragmentspektrum von  $m/z = 720$  ist in Abb. 92 dargestellt. Die beiden

Tabelle 36: Gemessene Intensitätsverteilung von  $m/z = 706$  bis  $m/z = 711$  und die daraus ermittelte Isotopenverteilung sowie die theoretische Isotopenverteilung für je ein theoretisches Molekül mit zwei Chloratomen bzw. einem Chlor und einem Bromatom

$m/z$	Intensität	Isotopenverteilung [%]	Isotopenverteilung theoretisches Molekül mit 2 Cl [%]	Isotopenverteilung theoretisches Molekül mit ClBr [%]
706	42920	29	37	26
707	14864	10	15	10
708	49664	33	28	35
709	16857	11	10	13
710	20658	14	6	11
711	3501	2	2	4

Tabelle 37: Übersicht der erhaltenen  $MS^2$ -Fragmente aus  $m/z = 706$  und  $m/z = 720$

706 →		688	674	660				346	343				318	311		286	270	258	
720 →	702	688	674		642	357	355	346	343	329	325	321	318	311	298	286		258	230

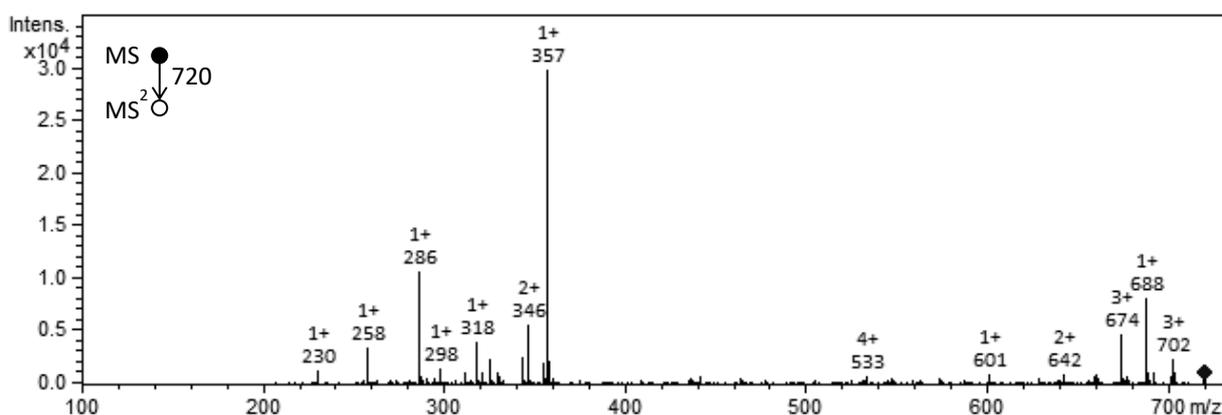


Abb. 92: Fragmentspektrum von  $m/z = 720$

Substanzen scheinen sehr ähnlich zu sein und sich nur um eine  $CH_2$ -Gruppe (14 Da) zu unterscheiden. Zur Struktursuche wurde daher angenommen, dass die Substanzen aus einem Amlodipin-Molekül und einem der in der Tablette enthaltenen Hilfsstoffen oder aus zwei Amlodipin-Molekülen gebildet wurden.

Mit Hilfe der Daten aus den  $MS^2$  und  $MS^3$ -Untersuchungen konnte sowohl für  $m/z = 720$  also auch  $m/z = 706$  je eine Struktur abgeleitet werden, bei denen die Grundstruktur zweier Amlodipin-Moleküle möglichst wenig verändert wurde. Die erhaltenen Strukturen sind in Abb. 93, die Fragmentspektren in Abb. 92 sowie in Anhang 6.2.1, Abb. 171 und Abb. 172 ab Seite 181 gezeigt. Da keine weiteren Daten zur Struktur, wie exakte Masse oder andere spektroskopische Daten vorlagen, ist auch diese Struktur nur eine von mehreren Möglichkeiten, jedoch weichen die anderen zusammengesetzten Strukturen deutlich mehr von der ursprünglichen Amlodipin-Struktur ab, oder es lassen sich nicht alle Fragmente erklären.

Auch in den HPLC-ESI-MS Messungen konnten diese  $m/z$ -Verhältnisse detektiert werden. Beide Peaks sind jedoch so klein, dass weder ein MS noch ein Fragmentspektrum erhalten werden konnte.

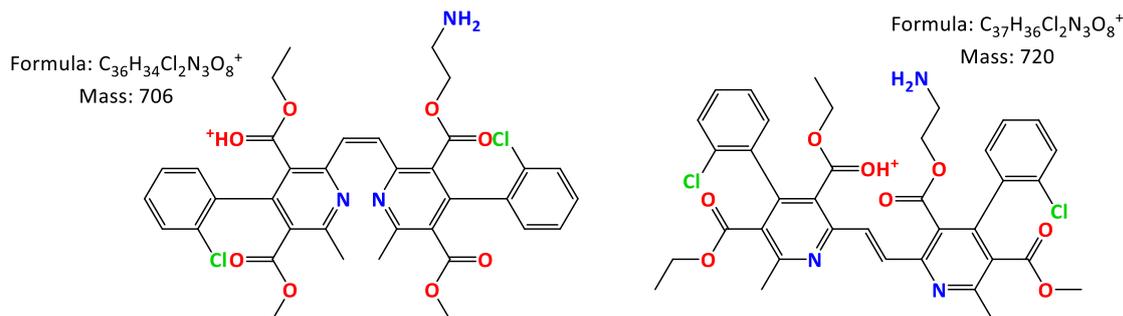


Abb. 93: Mögliche Strukturen für  $m/z = 706$  und  $720$ , wie sie aus den erhaltenen  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Untersuchungen abgeleitet wurden

Da die untersuchten Substanzen der Gruppen 2 und 3 nicht oder nur in sehr geringer Konzentration mittels HPLC-ESI-MS detektiert werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um thermische Abbauprodukte des Amlodipins handeln könnte. Dafür spricht auch, dass ihre Signale in vergleichsweise hoher Konzentration im DIP-EESI-Spektrum gefunden worden sind, was gegen die Erwartungen für Verunreinigungen in Arzneimitteln spricht. Es konnten keine Daten zu den beobachteten  $m/z$ -Werten in der Literatur gefunden werden, weder als  $[M+H]^+$  noch als Fragment einer der 66 bis zum Jahr 2016 beschriebenen Verbindungen. An dem Beispiel Amlodipin werden die Schwächen der DIP-EESI für ein mögliches Screening nach Verunreinigungen deutlich. Sind in der Probe mehrere Substanzen mit der gleichen Masse vorhanden, lassen sich diese nicht immer durch das Temperaturprogramm trennen, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, wie bei Verunreinigung E. Sind die gesuchten Verunreinigungen nur in geringer Konzentration vorhanden, können sie durch andere Substanzen überlagert werden. Von Vorteil ist dagegen, dass Überlagerungen, die von einem Isotop verursacht worden sind, meist durch Fragmentierungsexperimente nachweisen werden können. In dem Fall, dass es sich um eine Substanz mit einem  $^{13}C$ -Isotop handelt, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass das  $^{13}C$ -Atom bei der Fragmentierung abgespalten wird. Dadurch entsteht ein Hauptsignal, welches durch das Fragment mit  $^{13}C$ -Isotop entsteht und ein zweites kleineres Signal, das um 1 Da kleiner ist und nur noch  $^{12}C$ -Kohlenstoffatome besitzt. Da so alle Signale, die von der Überlagerung hervorgerufen werden, zugeordnet werden können, können diese von den Signalen der unbekanntem Verunreinigung getrennt werden. So können falsch positive Resultate vermieden werden. Haben die Substanzen ähnliche Strukturen, können sie gleiche Fragmente bilden. Man kann bei der anschließenden Analyse jedoch nicht sagen, aus welcher Substanz die Fragmente gebildet worden sind, obwohl die Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten verdampfen und ggf. unterschiedlichen  $MS^n$ -Spektren zeigen. Das trifft z.B. bei der bekannten Verunreinigung E und den unbekanntem Substanzen A, B und C zu. Hierdurch wird deutlich, dass für die DIP-EESI, wie auch für andere etablierte Verfahren wie die HPLC, für eine genauere Verifizierung der Verunreinigungen Vergleichsstandards benötigt werden. Ebenso kann die DIP-APCI sowie die DIP-EESI nicht für die Quantifizierung von Verunreinigungen eingesetzt werden, wenn sich mehrere Substanzen mit derselben Masse in der Probe befinden, da ohne Trennung die Summe der Verunreinigungen detektiert wird. Gemäß Arzneibuch müssen aber alle Verunreinigungen einzeln quantifiziert werden.

## 4.4.2.4 Metoprololtartrat

Ebenso wie bereits für Amlodipin und Piracetam gezeigt, wurde auch das Medikament Metoprololtartrat mittels DIP-EESI, DIP-APCI, HPLC-ESI-MS und HPLC-UV untersucht. Hier richtete sich das Hauptaugenmerk, wie bei den anderen untersuchten Medikamenten zunächst auf die Detektion der bekannten Verunreinigungen. In Ph. Eur. 7.0 sind 12 bekannte Verunreinigungen gelistet, die in Abb. 94 dargestellt sind und nach denen aktiv gesucht wurde.

Bereits durch Vergleich der Verunreinigung wird deutlich, dass nicht alle Verunreinigungen einwandfrei mittels DIP-APCI bzw. DIP-EESI detektiert werden können. So besitzen die Verunreinigungen A und H die gleiche Masse. Hier ist eine Identifizierung der einzelnen Verunreinigungen nur möglich, wenn sie sich in ihren Fragmenten signifikant unterscheiden. Wie die HPLC-ESI-MS Untersuchungen gezeigt haben, ist das nicht der Fall. Die Spektren der Verunreinigungen A und H nach HPLC-ESI-MS Analyse sind in Anhang 6.2.4 in Abb. 188 Seite 193 dargestellt.

Die Verunreinigung E kann hingegen gar nicht mit den beiden DIP-Techniken detektiert werden. Sie besitzt die gleiche Masse wie der Wirkstoff und ist selbst durch Fragmentierung nicht detektierbar, da der Wirkstoff in jedem Fall das Massenspektrum dominiert.

Während mittels HPLC-UV keine dieser Verunreinigungen detektiert werden konnte, wurden mittels HPLC-ESI-MS sechs der 12 Verunreinigung nachgewiesen (Abb. 102). Obwohl sich der Wirkstoff Metoprolol mit DIP-EESI im Vergleich zu anderen Arzneimitteln gut ionisieren ließ, konnten nur zwei

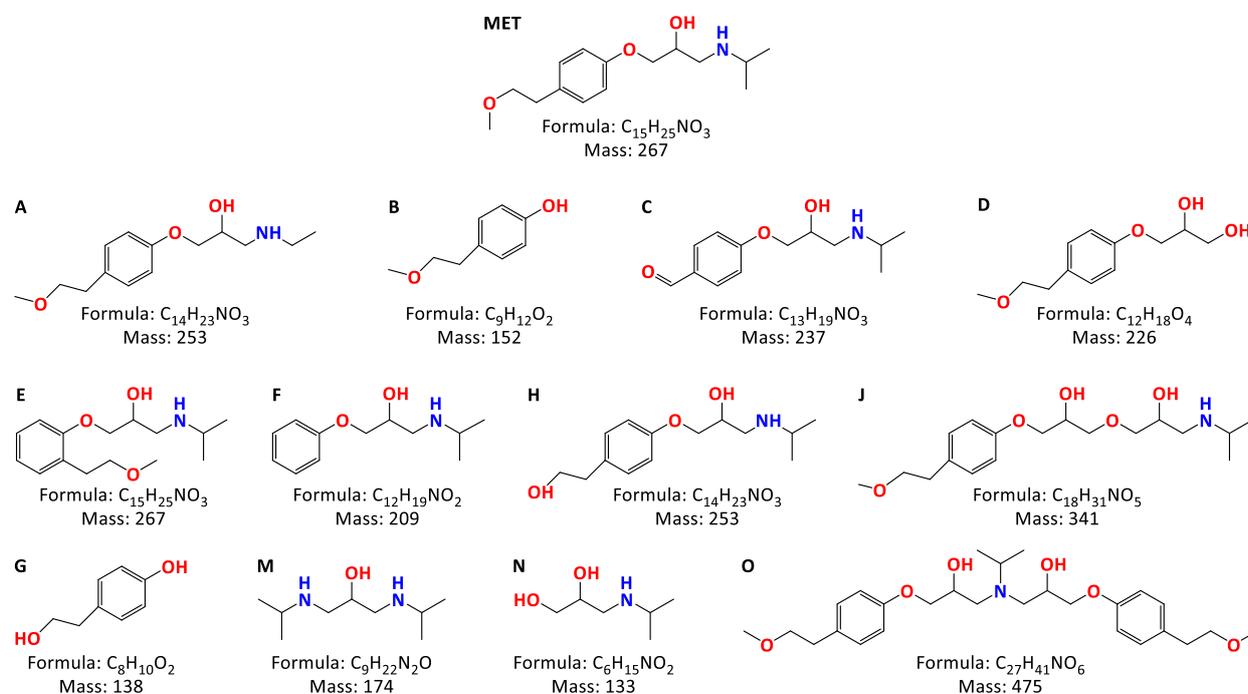


Abb. 94: Metoprolol, Bis[(2RS)-1-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]-3-[[1-methylethyl]amino]propan-2-ol] (MET) und seine 12 in Ph. Eur. 7.0 beschriebenen Verunreinigungen A bis J, M bis O (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.3 zusammengefasst)

Verunreinigungen, J und M, identifiziert werden. Die Spektren der Verunreinigung J, ionisiert durch DIP-EESI, sind in Abb. 95 zu sehen.

Der Fragmentierungsweg für die MS<sup>2</sup>-Fragmentierung ist in Abb. 96, die weiteren Fragmentierungswege für die MS<sup>3</sup>-Untersuchungen sind im Anhang 6.2.4 in Abb. 203 Seite 204 dargestellt.

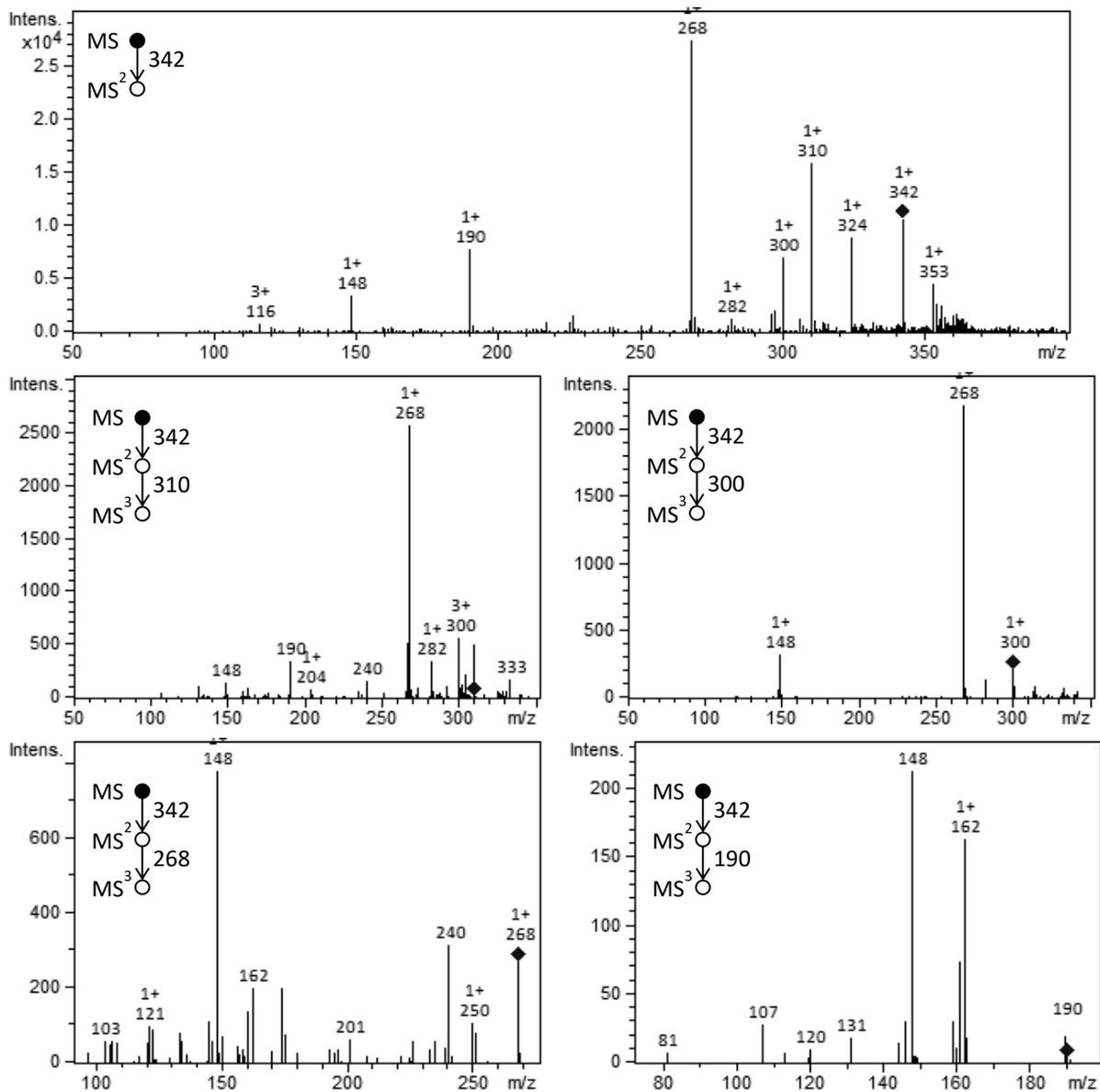


Abb. 95: Fragmentierung von  $m/z = 342$  potentielle Verunreinigung J ionisiert mit DIP-EESI-MS

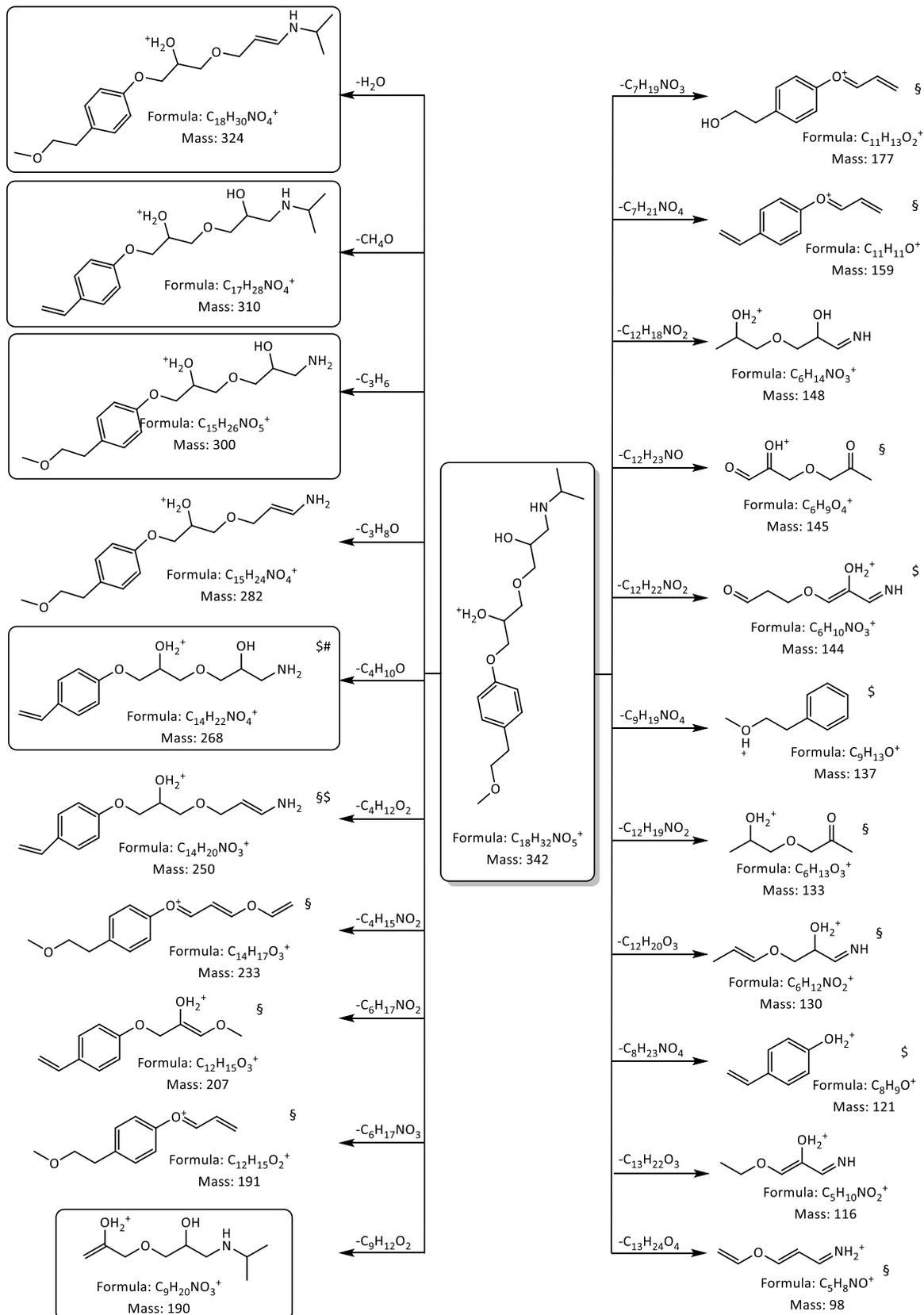


Abb. 96: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (§ nur mit HPLC; §\$ nur mit DIP-APCI; # nur mit DIP-EESI detektiert)

Die Spektren der Verunreinigung M, ionisiert durch DIP-EESI, sind in Abb. 97, der Fragmentierungsweg für die MS<sup>2</sup>-Fragmentierung in Abb. 98 gezeigt.

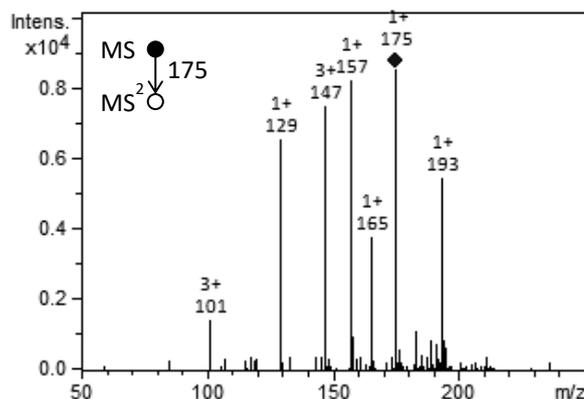


Abb. 97: Fragmentierung von  $m/z = 175$  potentielle Verunreinigung M ionisiert mit DIP-EESI

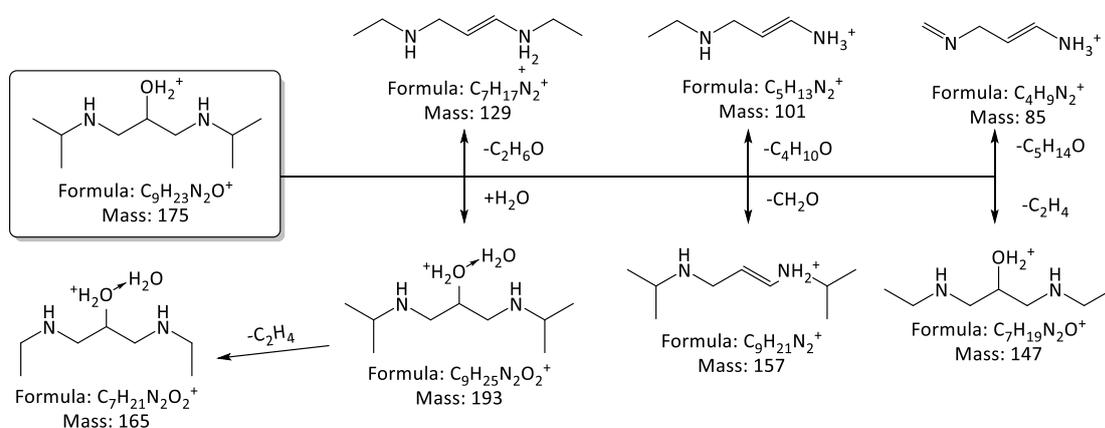


Abb. 98: Mögliche Fragmente der Verunreinigung M mit DIP-EESI detektiert

Hierbei sei angemerkt, dass Verunreinigung M nicht mit HPLC-ESI detektiert wurde. Für die Verunreinigung J wurden mit der HPLC-ESI-MS zwei Peaks detektiert, die die gleichen Fragmente in unterschiedlichen Intensitäten aufwiesen (die Spektren sind in Anhang 6.2.4 in Abb. 199 Seite 200 gezeigt). Eine Unterscheidung dieser zwei Substanzen war weder mittels DIP-EESI noch mit DIP-APCI möglich, da es für beide Ionisierungsmethoden keine Hinweise gab, dass es sich um zwei Substanzen handeln könnte. Zusätzlich wurden drei weitere potentielle Verunreinigungen mit DIP-EESI detektiert, die aufgrund ihrer Intensität im DIP-EESI-Spektrum keine ausreichenden Daten lieferten, die eine Identifizierung zuließen, da keine  $MS^3$ -Spektren angefertigt werden konnten. Die Spektren der drei Verunreinigungen B, D und G sind im Folgenden in Abb. 99 bis Abb. 101 dargestellt.

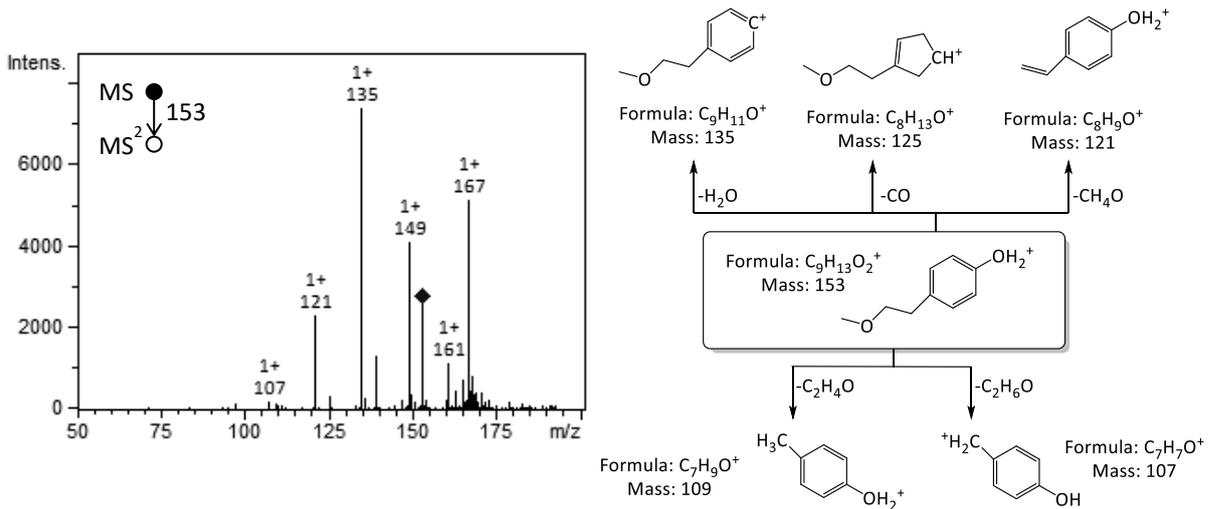


Abb. 99: Fragmentierung von  $m/z = 153$  nach Ionisierung mit DIP-EESI, sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung B

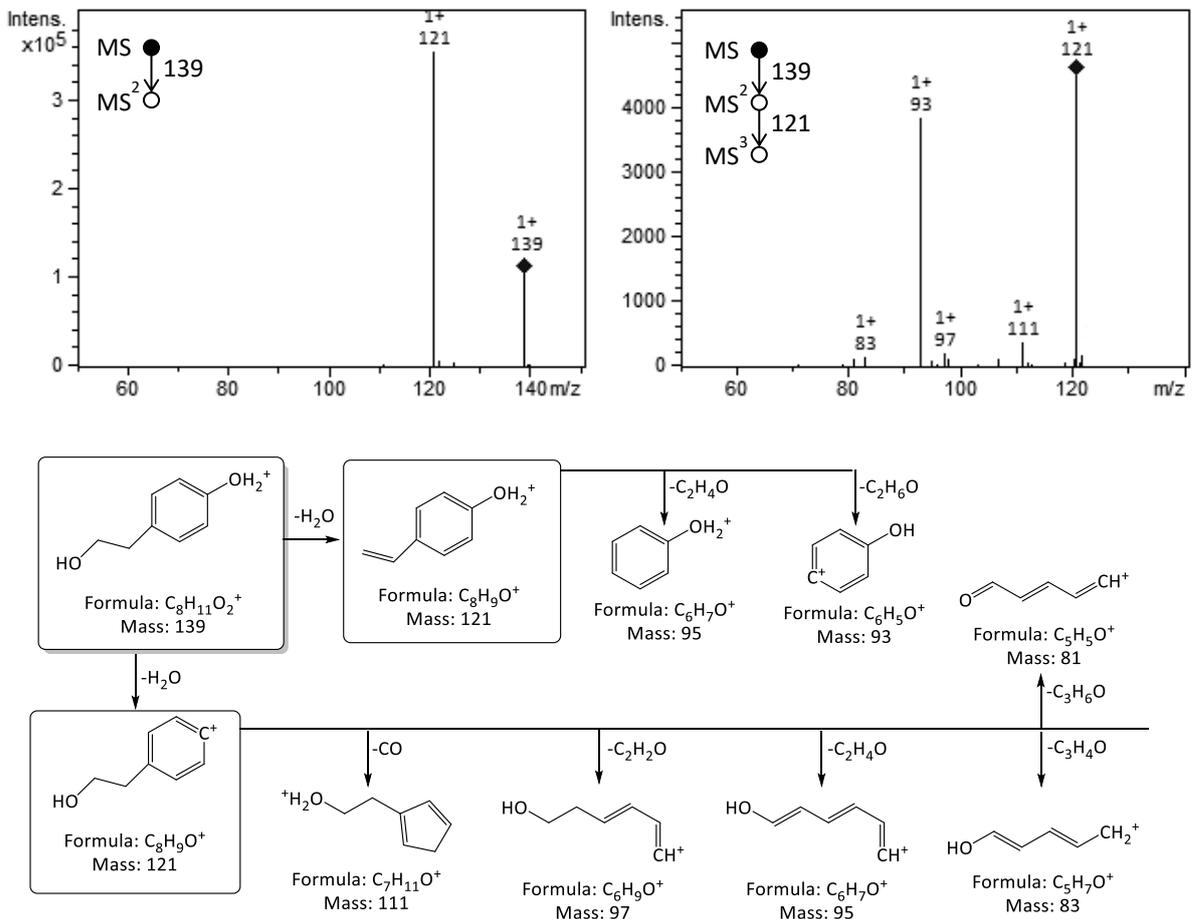


Abb. 100: Fragmentierung von  $m/z = 139$  nach Ionisierung mit DIP-EESI (oben), sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung G (unten)

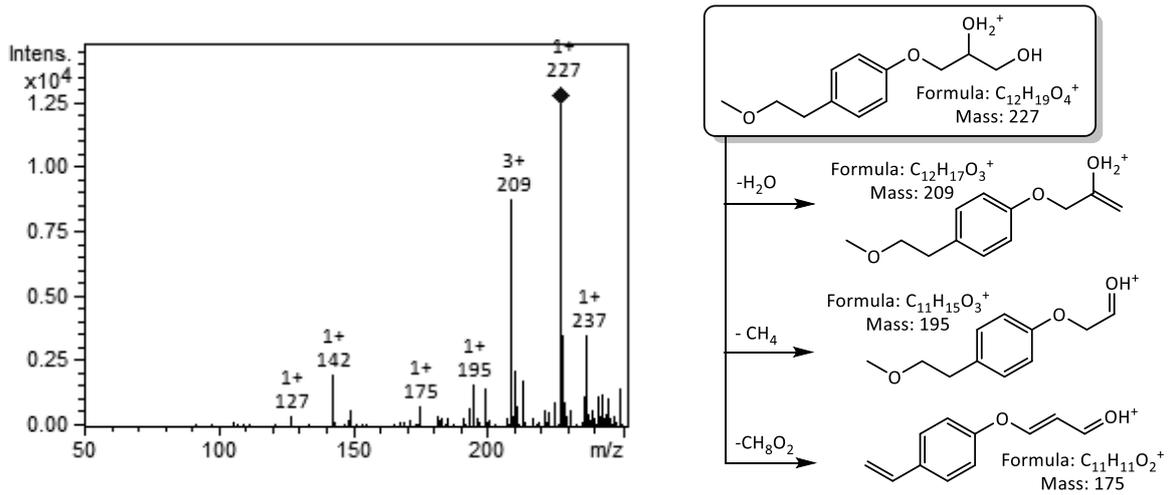


Abb. 101: Fragmentierung von  $m/z = 227$  nach Ionisierung mit DIP-EESI, sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung D

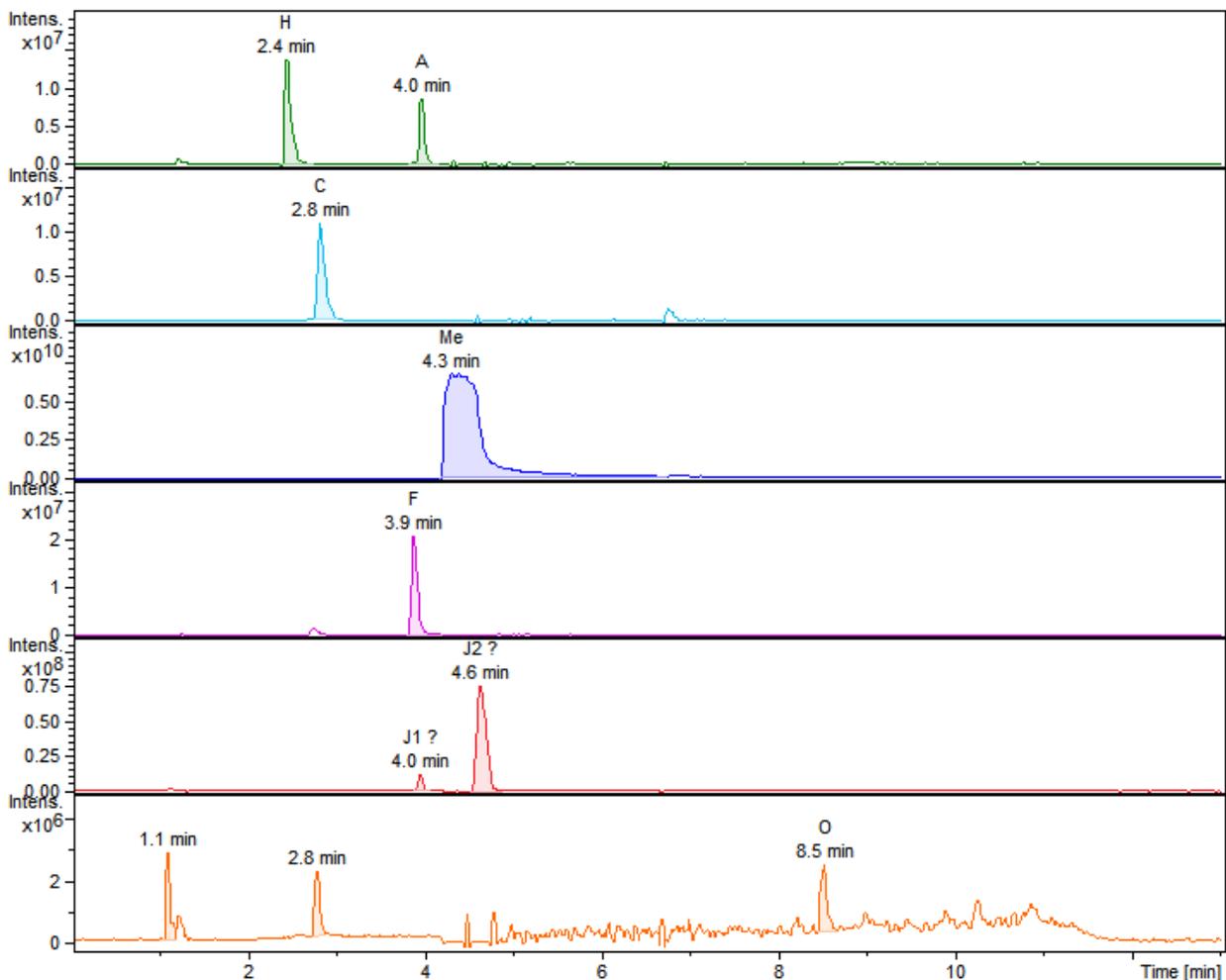


Abb. 102: HPLC-ESI-MS Chromatogramme von Metoprolol-Tabletten. Dargestellt sind die EICs für die protonierten Verunreinigungen sowie für den Wirkstoff: Grün: Verunreinigung A und H ( $m/z = 254$ ; RT: 2,4 min bzw. 4,0 min); türkis: Verunreinigung C ( $m/z = 238$ ; RT: 2,8 min); blau: Metoprolol ( $m/z = 268$ ; RT: 4,3 min); pink: Verunreinigung F ( $m/z = 210$ ; RT: 3,9 min); rot: Verunreinigung J ( $m/z = 342$ ; eindeutige Identifizierung nicht möglich); orange: Verunreinigung O ( $m/z = 476$ ; RT: 8,5 min)

Die Untersuchung von Metoprolol zeigte, wie auch die der anderen Arzneimittel, eine bessere Ionisierung mittels DIP-APCI als mit DIP-EESI aufgrund des Ionisierungsmechanismus der EESI. Mit der DIP-APCI konnten ohne Berücksichtigung der HPLC-ESI-MS-Daten, fünf Verunreinigungen (B, C, J, M und O) identifiziert werden, sowie Verunreinigung A und/oder H, die aufgrund der gleichen Masse und ähnlicher Struktur, ohne weitere Informationen, nicht unterschieden werden konnten. Die Spektren und möglichen Fragmentierungswege sind in Anhang 6.2.4 dargestellt.

Bezieht man die HPLC-Daten mit ein, so weist das Fragmentspektrum der DIP-APCI von  $m/z = 254$ , wie erwartet Fragmente der Verunreinigungen A und H auf. Da sich die Spektren der Verunreinigungen A und H zum Teil unterscheiden, wie aus den HPLC-ESI-MS Untersuchungen bekannt, konnten die bekannten Fragmente im DIP-APCI-Spektrum jeweils der Verunreinigung A bzw. H zugeordnet werden. Hierbei wurde beobachtet, dass die Fragmente der Verunreinigung H intensiver waren als die der Verunreinigung A, was mit den HPLC-Daten übereinstimmt (die Spektren sind im Anhang 6.2.4 in Abb. 188 Seite 193 dargestellt). Bei den HPLC-Messungen wurde Verunreinigung H in höherer Konzentration gefunden als Verunreinigung A (Abb. 102).

Während es, wie bereits beschrieben, für Verunreinigung J keine Hinweise darauf gab, dass es sich um zwei Substanzen handeln könnte, konnte bei Verunreinigung O für einige  $m/z$ -Werte eine zeitliche Unterscheidung der Fragmente von  $m/z = 476$  beobachtet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den HPLC-Ergebnissen, da mittels HPLC-ESI-MS für  $m/z = 476$  drei Peaks bzw. vier Peaks im  $MS^2$ -Chromatogramm detektiert wurden (Abb. 103).

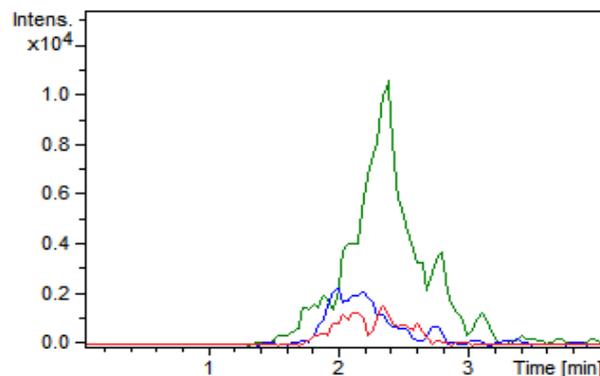


Abb. 103: EICs der Fragmente  $m/z = 434$  (grün),  $m/z = 292$  (blau) und  $m/z = 294$  (rot) die durch Fragmentierung von  $m/z = 476$  nach Ionisierung mit DIP-APCI entstanden sind und zu unterschiedlichen Zeiten im Chromatogramm detektiert wurden.

Durch gezielte Fragmentierung der intensivsten Massen ( $m/z = 476 \rightarrow m/z = 458; 444; 324$  und  $268$ ), die zum gleichen Zeitpunkt detektiert wurden sowie weiterer  $MS^3$ -Untersuchungen, war es möglich die Verunreinigung zu identifizieren. Da die erzeugten Fragmente aus  $m/z = 476$  nur eine geringe Intensität aufweisen oder die Fragmente aus mehreren Substanzen erzeugt wurden, besitzt auch die nachfolgende Fragmentierung eine hohe Hintergrundbelastung, d.h. viele Signale, die wahrscheinlich nicht einer Substanz, sondern mehreren zugeordnet werden müssen. Die Spektren der DIP-APCI Messungen sind in Abb. 104 gezeigt. Im Falle von  $m/z = 476 \rightarrow 458$  wird dies ebenfalls durch die HPLC-Ergebnisse gestützt, da in jedem der vier Peaks im  $MS^2$ -Chromatogramm  $m/z = 458$  detektiert wurde (vgl. Anhang 6.2.4 Abb. 206 Seite 206). Daher wurden auch bei den  $MS^3$ -Spektren nur die intensivsten  $m/z$ -Verhältnisse zur Identifizierung der Verunreinigung herangezogen.

Da alle so ausgewählten m/z-Verhältnisse durch Fragmente der Verunreinigung O erklärt werden konnten, wurde die Verunreinigung O als identifiziert gewertet.

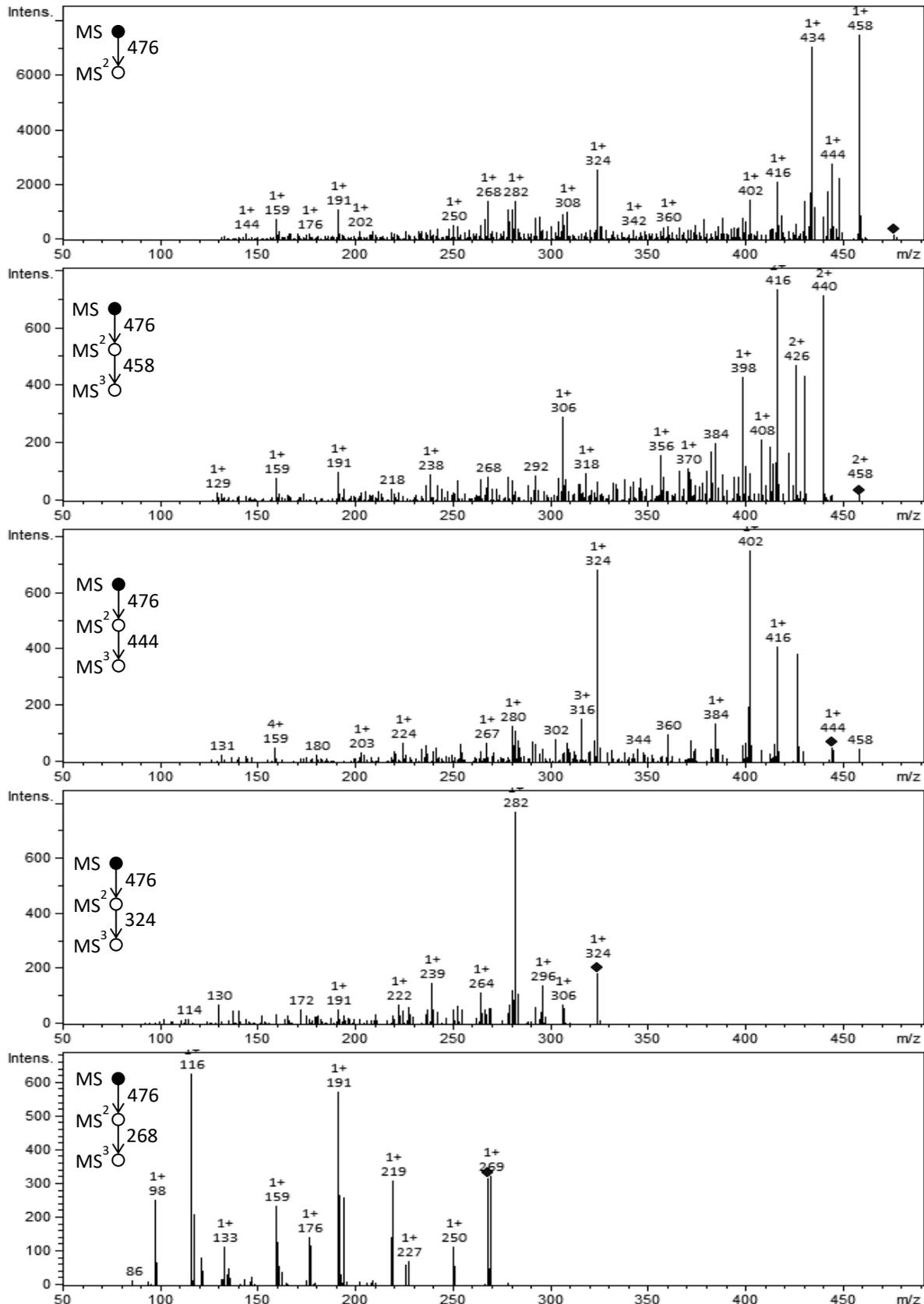


Abb. 104: Fragmentierung von m/z = 476 ionisiert mit DIP-APCI

Bei den Verunreinigungen B und M, die nach Ionisierung mit DIP-APCI identifiziert wurden, jedoch mit der HPLC-ESI-MS nicht nachweisbar waren, handelte es sich um vergleichsweise kleine Moleküle ( $m/z = 153$  und  $175$ ), dargestellt in Abb. 94. Die mit DIP-APCI detektierten Fragmente (Anhang 6.2.4 Abb. 191 Seite 195 und Abb. 204 Seite 205,) konnten den jeweiligen Verunreinigungen B und M zugeordnet werden. Die Fragmentierungswege sind unter den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Ebenso konnte mit DIP-APCI die Verunreinigung C identifiziert werden. Die Spektren der DIP-APCI, sind im Anhang 6.2.4 in Abb. 193 Seite 196 dargestellt und sind identisch mit den ebenfalls im Anhang gezeigten Spektren, die für den Peak der Verunreinigung C mit HPLC-ESI-MS erhalten wurden.

#### 4.4.2.5 Midodrin

Die Midodrinlösung weist sowohl bei der Ionisierung mittels DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI ein Spektrum mit nur wenigen  $m/z$ -Verhältnissen auf, wie in Abb. 105 zu sehen ist. Die beobachteten  $m/z$ -Verhältnisse lassen sich, wie zu erwarten war, dem Wirkstoff und seinen Fragmenten sowie der einzigen in der USP gelisteten Verunreinigung A (Abb. 106) zuordnen. In Ph. Eur. 7.0 wird Midodrin nicht beschrieben. Mit DIP-APCI konnten zusätzlich noch  $m/z = 223$  und  $207$  detektiert werden, die nicht durch Fragmentierungen des Wirkstoffes erklärt werden konnten. Mit der DIP-EESI wurde  $m/z = 325$  detektiert, das in der Literatur ebenfalls nicht beschrieben wird.

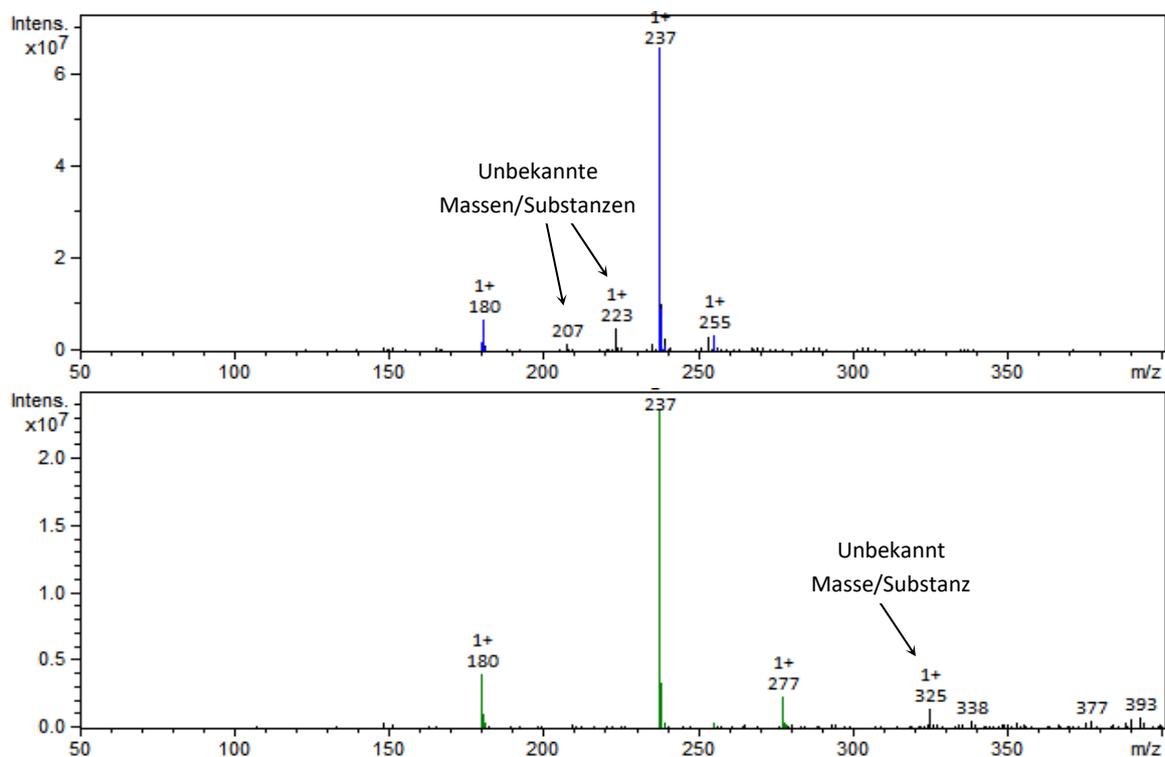


Abb. 105: Average Mass Spektrum von Midodrin Hydrochlorid Tabletten ionisiert mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten) nach Hintergrundabzug. Blau bzw. grün markiert alle Massen, die dem Wirkstoff Midodrin zugeordnet werden konnten

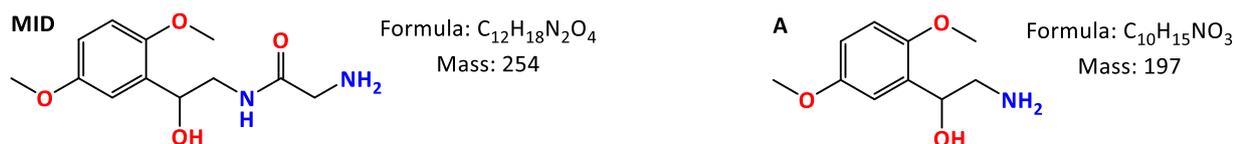


Abb. 106: Midodrin, 2-Amino-N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]acetamid (MID) und seine in der USP beschriebenen Verunreinigung A Desglymidodrin

Während für  $m/z = 223$  und  $207$  keine bzw. nur wenig Informationen durch  $MS^2$ -Untersuchungen gewonnen wurden, konnten für  $m/z = 325$  ausreichend Daten gesammelt werden, um eine Struktur zu postulieren, die in Abb. 107 gezeigt ist. Diese Struktur konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Es ist aber möglich, dass sie durch ein Syntheseintermediat der Wirkstoffherstellung entsteht. Bei der Synthese von Midodrin wird das Amin meist durch Di-tert-butylidicarbonat (BOC) geschützt [203–205]. Das Intermediat 1-(2',5'-Dimethoxyphenyl)-2-(N-carbo-t-butoxyglycine-amido)-ethanol (Wirkstoff mit Schutzgruppe) besitzt eine ähnliche Struktur wie die postulierte Substanz. Ausgehend von der postulierten Substanz wird vermutet, dass die Schutzgruppe nicht vollständig entfernt wurde. Das Syntheseintermediat sollte sich dann als  $m/z = 355$   $[M+H]^+$  bzw. als  $m/z = 377$   $[M+Na]^+$  im MS zeigen. Ein Signal mit  $m/z = 355$  konnte im Gegensatz zu  $m/z = 377$  nicht detektiert werden. Aufgrund der geringen Signalintensität konnte letztere nicht weiter fragmentiert werden, weshalb sich diese These nicht bestätigt lässt.

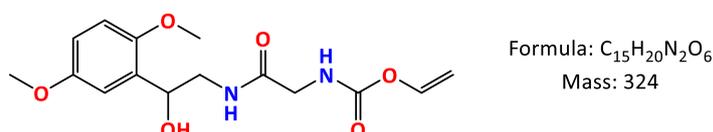


Abb. 107: Mögliche Struktur der unbekannt Masse  $m/z = 325$ .

Möglicherweise zersetzt sich die Schutzgruppe dann bei der Ionisierung, wodurch nur noch  $m/z = 325$  mit der vorgeschlagenen Struktur (Abb. 107) detektiert wurde. Über diese Struktur lassen sich alle detektierten Massen der  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Untersuchungen (Anhang 6.2.5, Abb. 213 Seite 211) erklären. Der Fragmentierungsweg ist in Anhang 6.2.5 in Abb. 214 Seite 211 dargestellt.

Auch wenn alle Fragmente über diese Struktur erklärt werden können, bleibt die Frage, warum in diesem Falle die OH-Gruppe nicht genauso leicht abgespalten wird, wie beim Wirkstoff, wodurch auch  $m/z = 307$  deutlich im MS-Spektrum detektiert werden müsste.

Über die HPLC-EIS-MS Untersuchungen konnte die Struktur nicht bestätigt werden, da  $m/z = 325$  nur in sehr geringer Konzentration, ca. 0,05 % des Wirkstoffes, detektiert wurde und direkt unter dem Wirkstoffpeak liegt (Abb. 108).

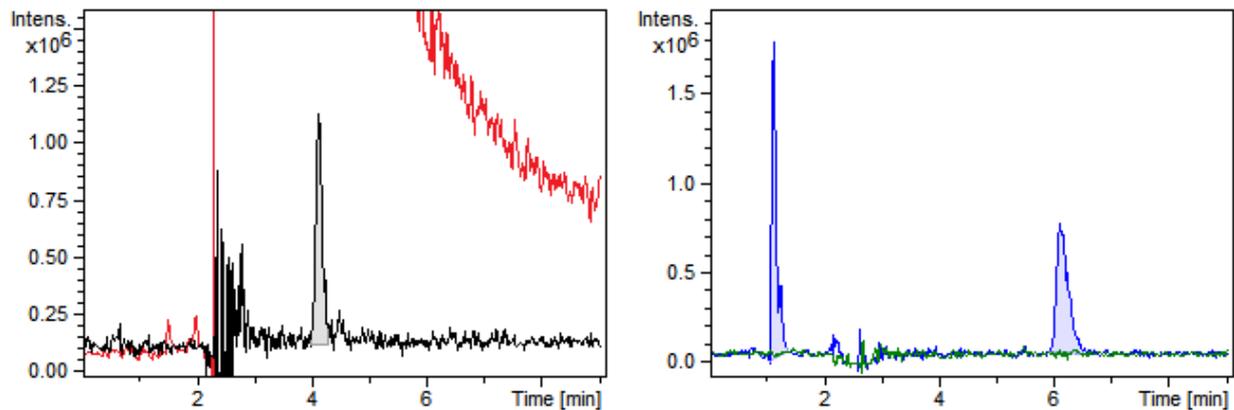


Abb. 108: Links: EIC von  $m/z = 325$  (schwarz) nach HPLC-ESI-MS Messung im Vergleich zum Wirkstoffpeak von Midodrin ( $m/z = 255$ ; rot); Rechts: EIC von  $m/z = 223$  (blau) und  $m/z = 207$  (grün)

Das Signal  $m/z = 325$  der DIP-EESI Messung entspricht hingegen einer relativen Konzentration von ca. 6 %, bezogen auf den Wirkstoff (Wirkstoffsignal: 23850 kct., Signal der Verunreinigung  $m/z = 325$ : 1450 kct., Abb. 105). Dies legt nahe, dass sich die vermeintliche Verunreinigung in der DIP-EESI-Quelle gebildet hat und nicht bereits in der Tablette vorhanden war.

Die Substanzen mit  $m/z = 223$  und  $m/z = 207$ , die mit DIP-APCI gefunden wurden, wurden ebenfalls mit HPLC-ESI-MS gesucht. Während ein Signal mit  $m/z = 207$  nicht mit HPLC-ESI-MS detektiert werden konnte, wurden für  $m/z = 223$  zwei Peaks detektiert, mit einer relativen Konzentration von jeweils 0,06 %. Dieser Wert liegt ebenfalls weit unter der relativen Konzentration von ca. 20 %, die mit DIP-APCI jeweils für beide Substanzen ermittelt wurde. Hierbei wird es sich ebenfalls, um thermische Zersetzungsprodukte des Wirkstoffs handeln, die bei der Verdampfung der Substanz in der DIP entstehen.

Im Gegensatz dazu wurden mittels HPLC-ESI-MS etliche andere Verunreinigungen detektiert (Abb. 109 oben), die nicht mit DIP-APCI oder mit DIP-EESI nachgewiesen wurden. Zum Teil waren diese Verunreinigungen bereits in der UV-Spur zu sehen (Abb. 109 unten). Ein möglicher Grund hierfür kann sein, dass sich diese Verunreinigungen in der Quelle zersetzten und nicht mehr das ursprüngliche  $m/z$ -Verhältnis, das mittels HPLC-ESI-MS detektiert wurde, sichtbar ist. So weisen bereits drei der fünf intensivsten Verunreinigungen bei 4,2 min, 4,7 min und 6,1 min das Fragment  $m/z = 180$  auf, das auch mittels DIP-APCI bzw. DIP-EESI detektiert wurde. Da der Wirkstoff sowie die Verunreinigung A beide dieses Fragment bilden, kann mittels DIP-APCI bzw. DIP-EESI nicht bestimmt werden, ob sich die unbekanntenen Verunreinigungen der HPLC-ESI-MS Messungen in diesem Fragment widerspiegeln. Die Theorie wird dadurch gestützt, dass sowohl mit DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI die relative Konzentration von  $m/z = 180$  bei ca. 20 % lag. Mit HPLC-ESI-MS konnte für  $m/z = 180$ , das aus Verunreinigung A und dem Wirkstoff gebildet wird, eine relative Konzentration von ca. 14,5 % und für alle zusätzlichen Verunreinigungen eine relative Konzentration von ca. 0,5 % ermittelt werden. Es bleibt eine Differenz von ca. 5 %, die einen Hinweis darauf gibt, dass vermehrt  $m/z = 180$  bei der Analyse mit DIP-APCI und DIP-EESI gebildet wurde.

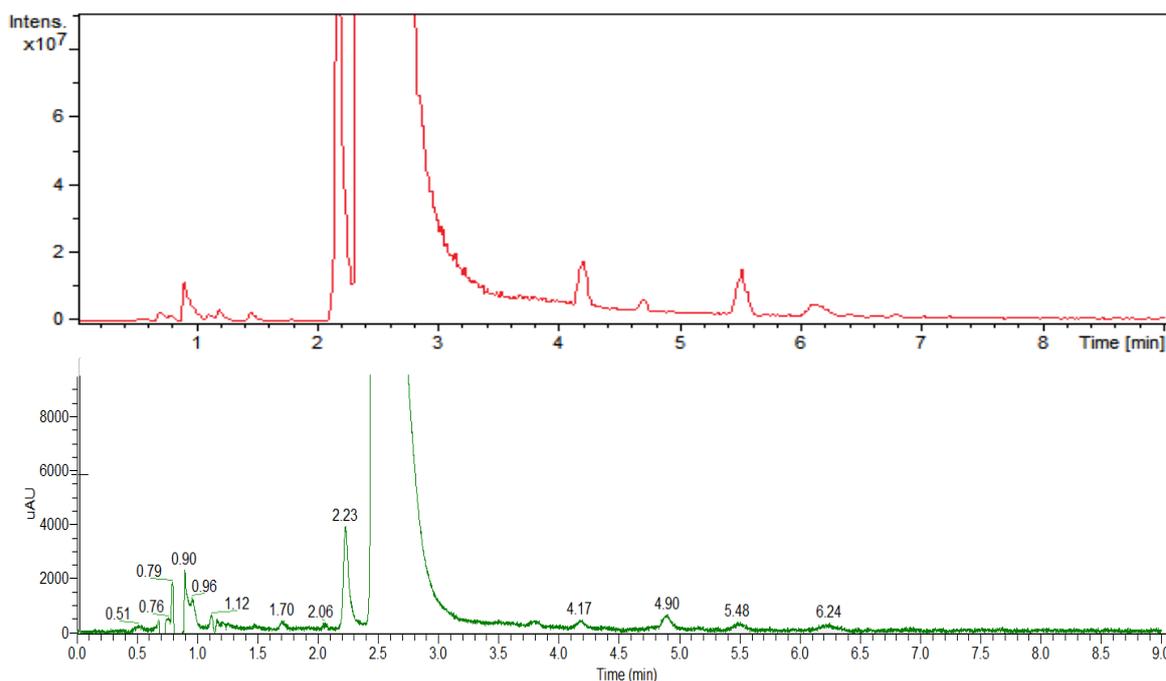


Abb. 109: BPC von Midodrin (oben), UV-Chromatogramm (190- 600 nm) von Midodrin (unten). Zu sehen ist in beiden Chromatogrammen die Verunreinigung A bei 2,2 min gefolgt vom Wirkstoffpeak. Daneben sind zahlreich weitere kleine Peaks zu erkennen.

Die unbekannt Verunreinigungen konnten mit HPLC-ESI-MS in einer relativen Konzentration von max. 0,5 % detektiert werden. In Summe konnten die unbekannt Verunreinigungen mit 1,8 % bestimmt werden. Aufgrund der geringen Konzentration liegen sie hier unterhalb der Nachweisgrenze der DIP-EESI und DIP-APCI.

#### 4.4.2.6 Mirtazapin

Das  $[M+H]^+$  von Mirtazapin (Struktur s. Abb. 110) mit  $m/z = 266$  wurde sehr dominant sowohl mittels DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI detektiert (Abb. 111). Die nächst intensivsten Massen wurden nur noch mit einer Intensität von  $\leq 2\%$  der  $[M+H]^+$  Masse nachgewiesen. Eine Überprüfung der Ergebnisse mit HPLC-ESI-MS war nicht möglich. Die HPLC-UV-Methode, die in Ph. Eur. 7.0 beschrieben ist, verwendet das nicht MS-gängige Ionenpaarreagenz Tetramethylammoniumhydroxyd (TMAH) mit 11,7 g/L im Fließmittel. Aufgrund seiner Eigenschaften als Ionenpaarreagenz lässt es sich nicht einfach durch andere MS-gängige Lösungsmittel ersetzen. Andere MS-gängige Methoden, wie die von Rao et al. [206] oder die Applikationsmitteilung von Waters [207], konnten nicht adaptiert werden. So wurde bei der von Waters beschriebenen Methode keine Retention von Mirtazapin auf der verwendeten Säule beobachtet und bei dem von Rao et al. wurde Mirtazapin erst nach mehreren Blankinjektionen zum Spülen langsam von der Säule gewaschen. Mit HPLC-UV konnte lediglich Mirtazapin detektiert werden (Abb. 112).

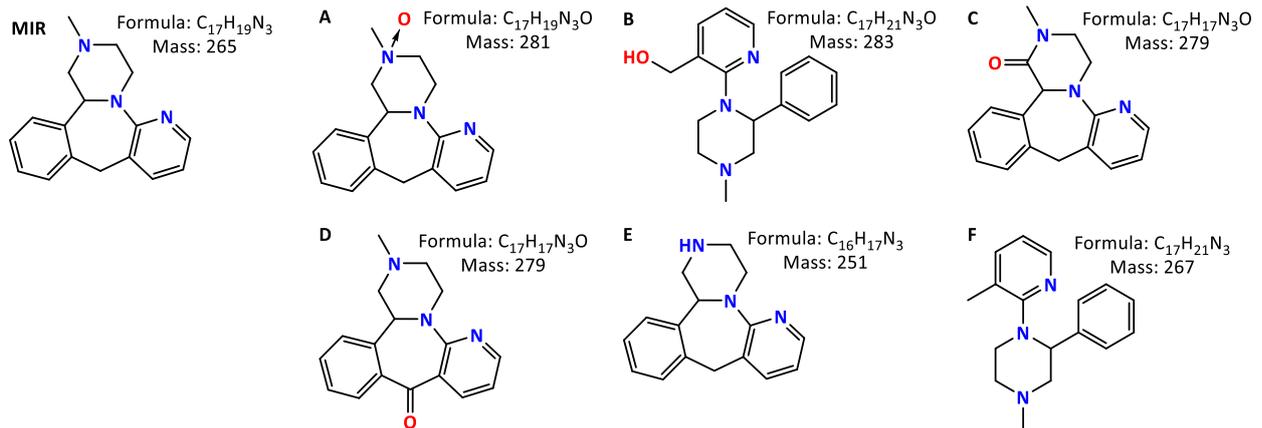


Abb. 110: Strukturen von Mirtazapin und den in Ph. Eur. beschriebenen sechs Verunreinigungen

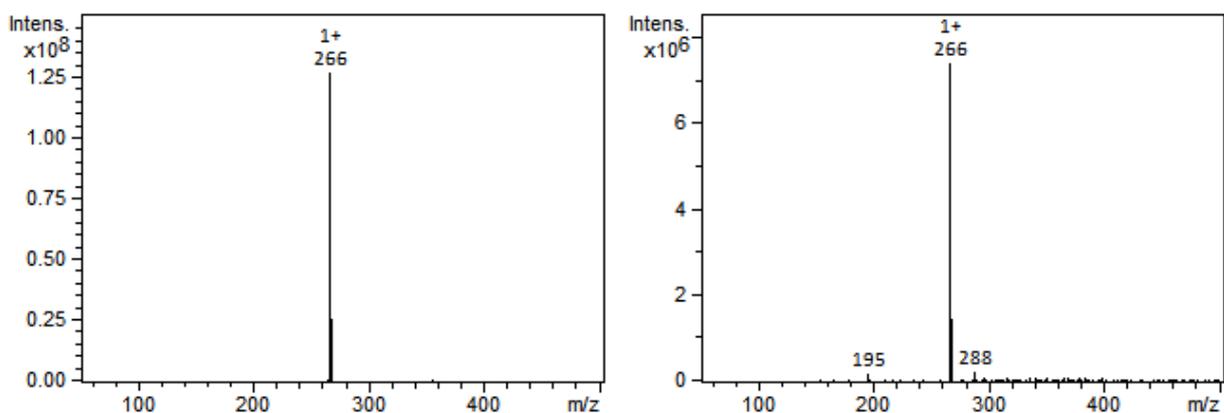


Abb. 111: Massenspektren von Mirtazapin ionisiert mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts)

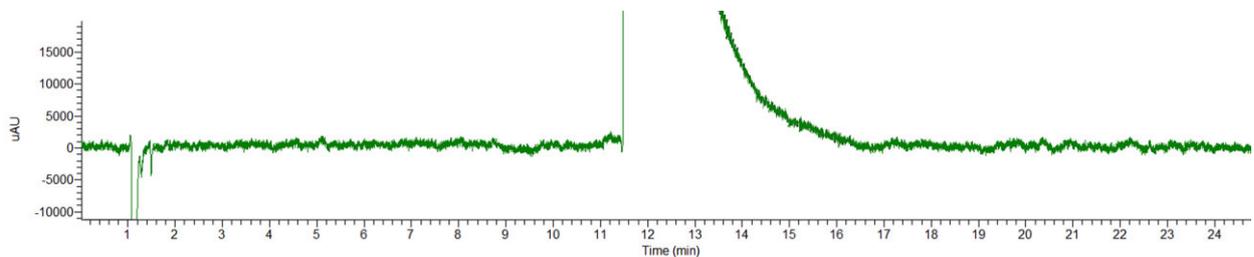


Abb. 112: UV-Chromatogramm von Mirtazapin

Mit DIP-APCI und DIP-EESI wurde ein Screening auf die bekannten Verunreinigungen, dargestellt in Abb. 110, durchgeführt. Mit beiden Methoden konnte die Verunreinigung E ( $m/z = 252$ ), Verunreinigung F ( $m/z = 268$ ), sowie die Verunreinigungen C und D ( $m/z = 280$ ), die nicht unterschieden werden konnten, detektiert werden (Abb. 113 bis Abb. 115). Eine eindeutige Identifizierung war aufgrund der geringen Intensität und der daraus resultierenden geringen Datenmenge aus den  $MS^2$ -Untersuchungen nicht möglich. Weitere Untersuchungen mit  $MS^3$ -Fragmentierung konnte nicht durchgeführt werden. Bei Verunreinigung F ( $m/z = 268$ ) kam hinzu, dass es vom Wirkstoffisotop (z.B.  $^{12}C_{15}^{13}C_2H_{19}N_3$ ) überlagert wurde und somit zur Identifizierung nur die  $m/z$ -Werte verwendet werden konnten, die nicht dem Wirkstoff zugeordnet werden konnten.

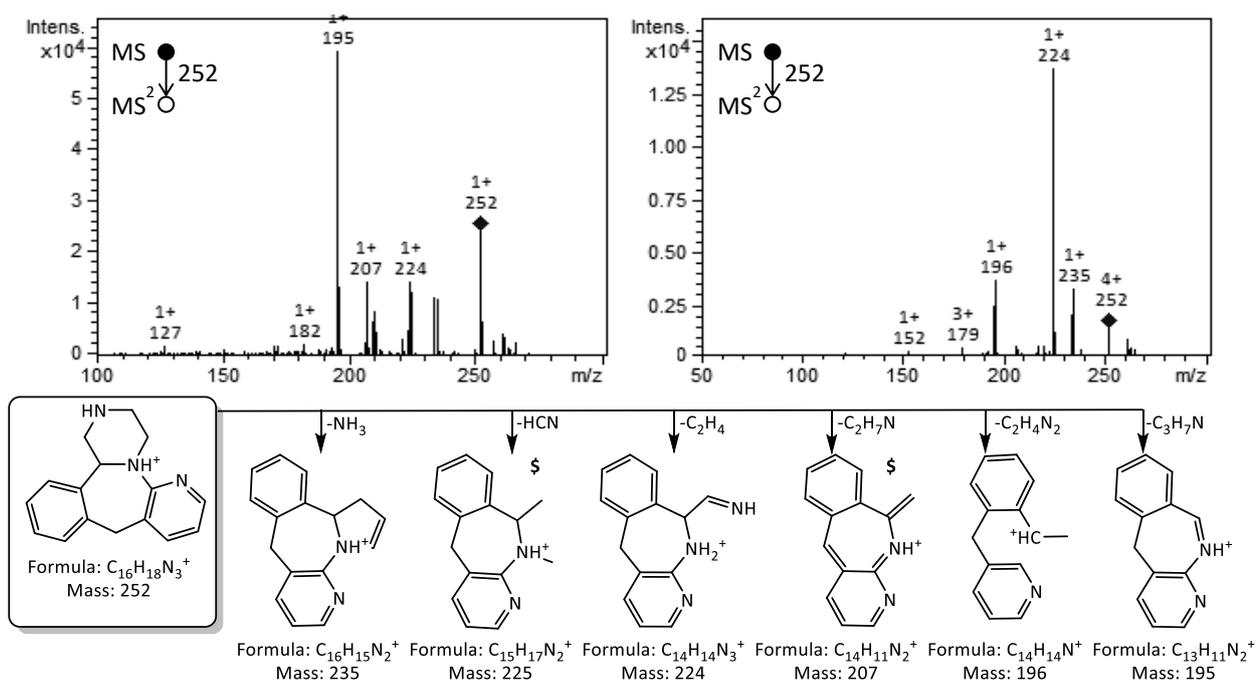


Abb. 113: Oben: Fragmentspektren von  $m/z = 252$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts),  $m/z = 252$  entspricht der Verunreinigung E; Unten: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E, wie sie den Fragmentenspektren zugeordnet werden konnten. Die mit \$ gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mittels DIP-APCI detektiert.

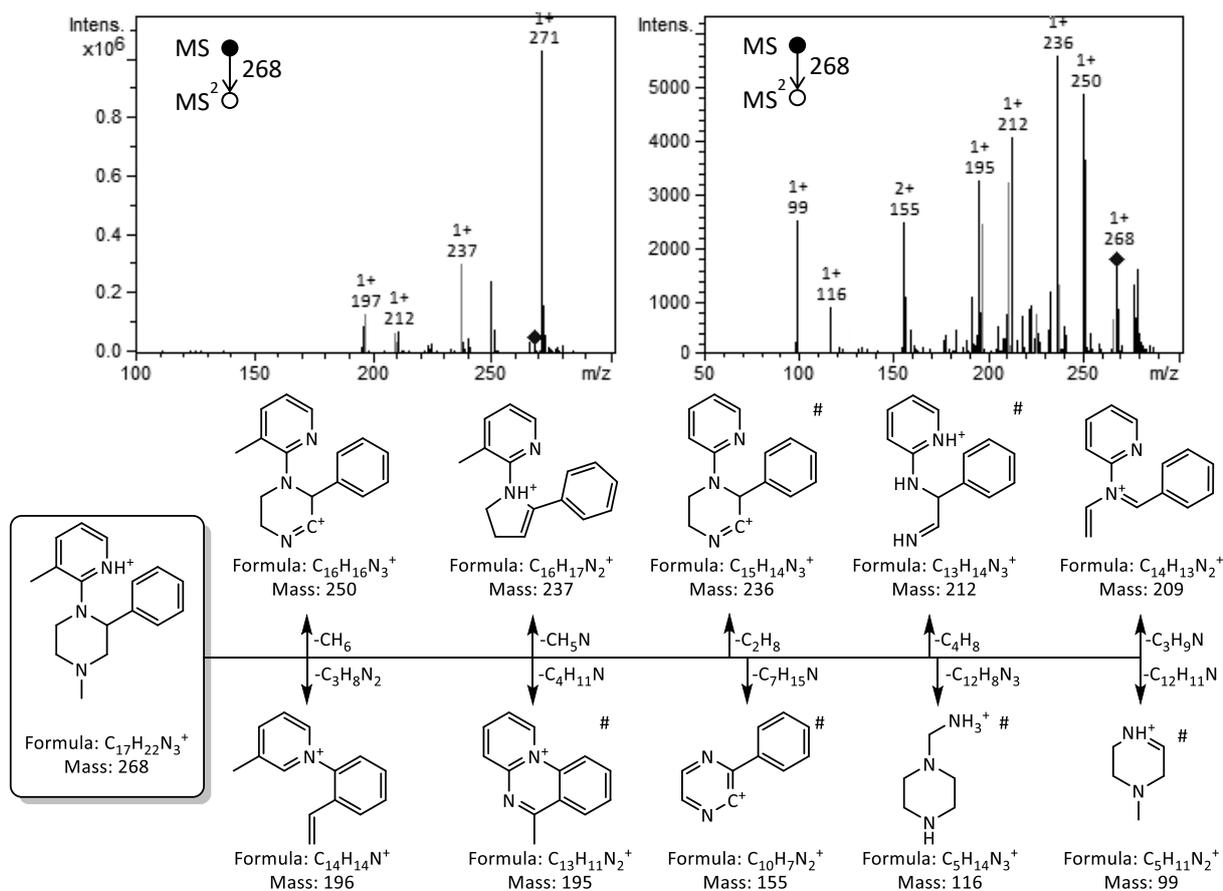


Abb. 114: Oben: Fragmentspektren von  $m/z = 268$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts),  $m/z = 268$  entspricht der Verunreinigung F (im Spektrum sind ebenfalls die Fragmente des Wirkstoffes enthalten als Isotop von  $m/z = 266$ , hier grau dargestellt); Unten: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie den Fragmentenspektren zugeordnet werden konnten. Die mit # gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mittels DIP-EESI detektiert.

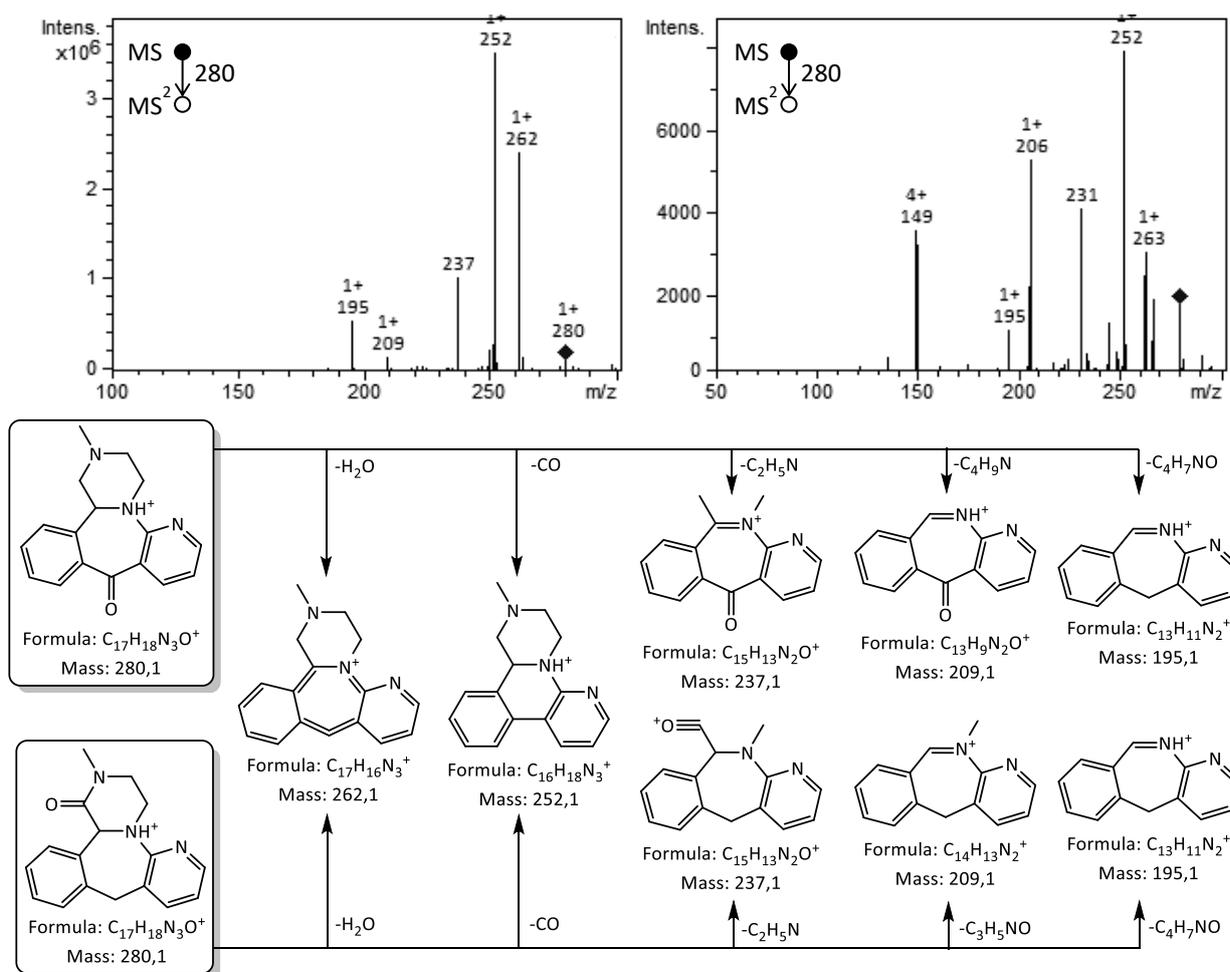


Abb. 115: Oben: Fragmentspektren von  $m/z = 280$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts),  $m/z = 280$  entspricht den Verunreinigung C und D; Mitte: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D und unten der Verunreinigung C, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten.

DIP-APCI und DIP-EESI zeigten vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Detektion und Identifizierung der bekannten Verunreinigungen. Die DIP-APCI ist aufgrund der besseren Ionisationsleistung vorzuziehen. Hierdurch werden auch die Hintergrundsignale bei  $MS^n$ -Untersuchungen unauffälliger und die Spektren einfacher zu interpretieren, wodurch weniger Fehler durch falsche Interpretation von Signalen gemacht werden.

#### 4.4.2.7 Pipamperon

Auch das Spektrum von Pipamperon wird vom  $[M+H]^+$  des Wirkstoffs für beide Ionisationsmethoden, DIP-APCI und DIP-EESI, dominiert (Abb. 114). Beim Vergleich von DIP-APCI mit DIP-EESI ist auch hier klar zu sehen, dass die DIP-APCI ein deutlich intensiveres Signal für den Wirkstoff liefert, als die DIP-EESI (ca. 30mal so intensiv, Abb. 116). Die DIP-EESI hat den Vorteil, dass mit ihr keine Massen detektiert werden, die nicht dem Wirkstoff oder einer bekannten Verunreinigung zuzuordnen sind. Hingegen zeigt das DIP-APCI Spektrum einige weitere Massen, die auf einen oder mehrere gelöste Hilfsstoffe der Tablettenformulierung zurückzuführen sind und nicht weiter untersucht wurden.

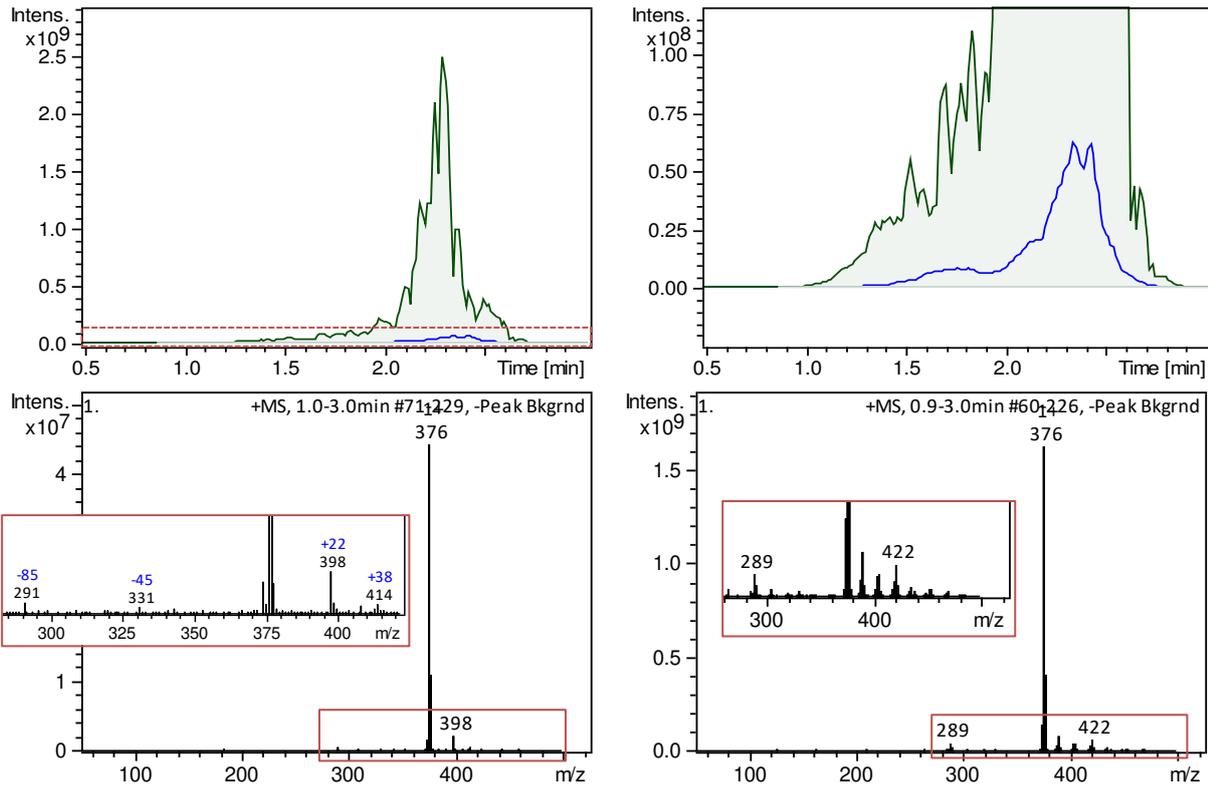


Abb. 116: Vergleich der Pipamperonmessungen mittels DIP-APCI und DIP-EESI. Oben in grün dargestellt das Chronogramm von  $m/z = 376$  (Pipamperon  $[M+H]^+$ ) ionisiert mit DIP-APCI und in blau ionisiert mit DIP-EESI (rechts: vergrößerte Darstellung). Unten: Average Mass Spectrum der Pipamperonmessung. Rechts: Ionisierung mit DIP-APCI, links mit DIP-EESI, sowie jeweils eine vergrößerte Darstellung zwischen 280 und 500  $m/z$ . DIP-EESI zeigt die Addukte  $[M+Na]^+$  (+22 Da) und  $[M+K]^+$  (+38 Da) während im DIP-APCI Spectrum eine Polymerverteilung eines Hilfsstoffes zu sehen ist.

Mit beiden Verfahren wurde ein Screening auf die bekannten Verunreinigungen (Abb. 117) durchgeführt.

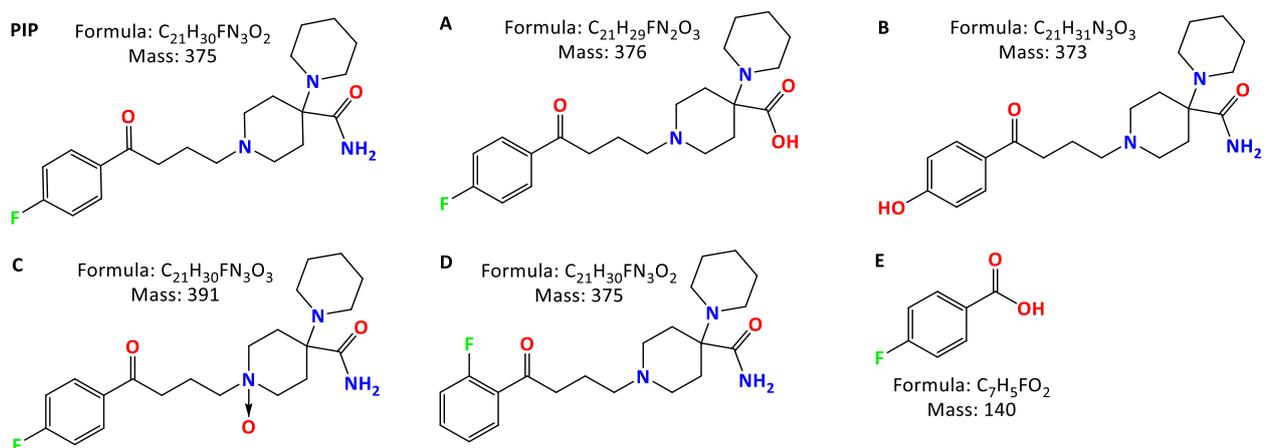


Abb. 117: Pipamperon, 1'-[4-(4-Fluorphenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carbamid (PIP) und seine fünf von Trabelsi et al. [184] beschriebenen Verunreinigung A bis E (die Namen der Verunreinigung sind in Anhang 6.1.6 zusammengefasst)

Die Verunreinigung E kann, da sie dieselbe Masse wie der Wirkstoff besitzt, nicht nachgewiesen werden. Die Verunreinigung A kann ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da die Masse nur um 1 Da erhöht ist und damit gleich dem  $^{13}\text{C}$ -Isotop des Wirkstoffs. Die Verunreinigung B konnte mit beiden Ionisierungsmethoden detektiert werden. Mit beiden Methoden wurden die gleichen Spektren erhalten. Lediglich im DIP-APCI-Spektrum wurden zusätzlich noch einige weniger intensive Massen detektiert. Die entsprechenden Spektren, die mit DIP-EESI erhalten wurden, sind in Abb. 118 dargestellt. In Abb. 119 ist der postulierte Fragmentierungsweg für die  $\text{MS}^2$ -Untersuchungen der Verunreinigung B, der zur Identifizierung genutzt wurde, gezeigt. Der weitere Fragmentierungsweg für die  $\text{MS}^3$ -Untersuchungen ist im Anhang 6.2.7 dargestellt.

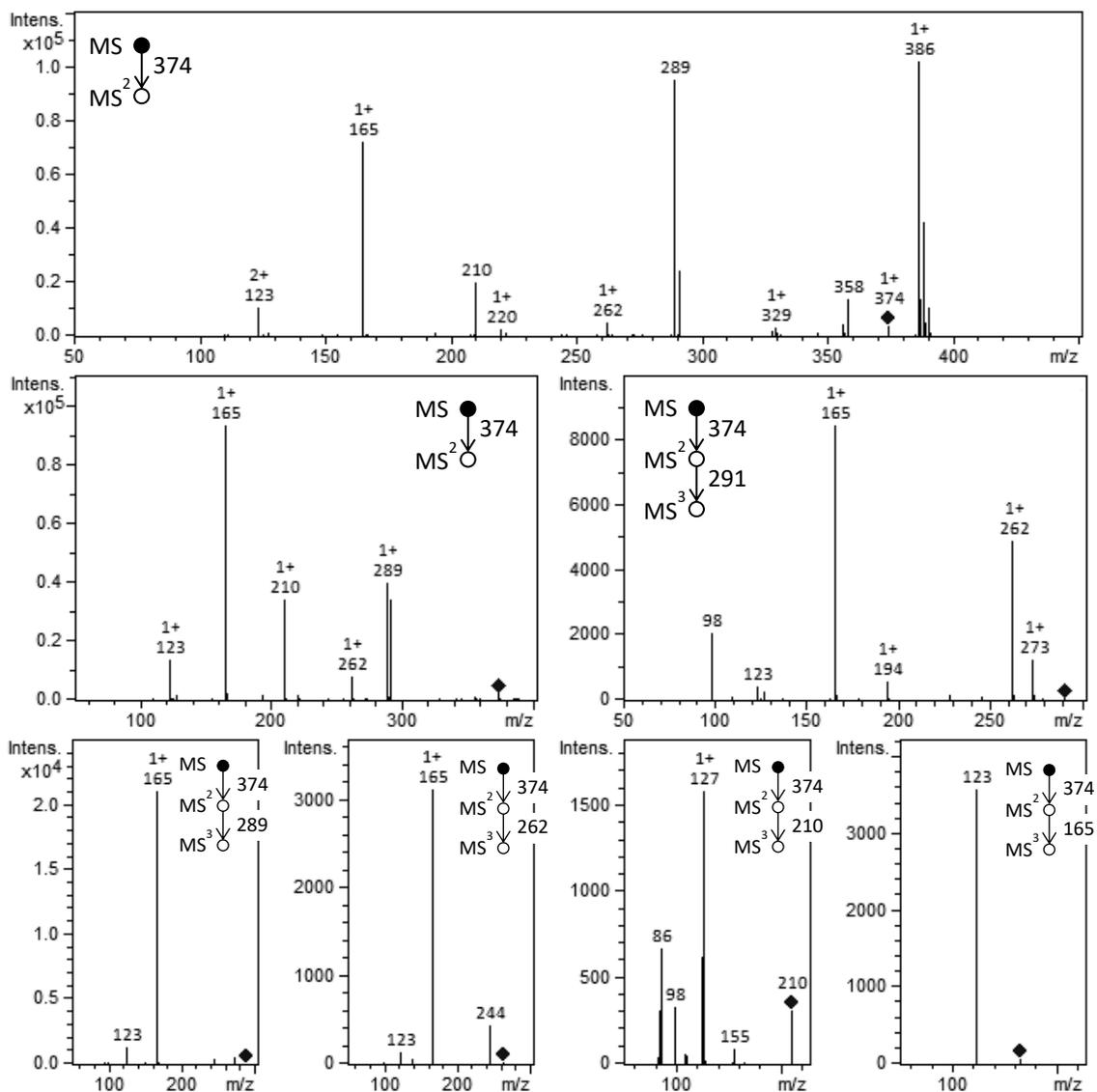


Abb. 118: Fragmentspektren von  $m/z = 374$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (Mitte und unten),  $m/z = 374$  entspricht der Verunreinigung B (Die Ionisierung der Fragmentspektren erfolgte mit DIP-EESI, diese sind identisch mit denen für DIP-APCI, nicht gezeigt)

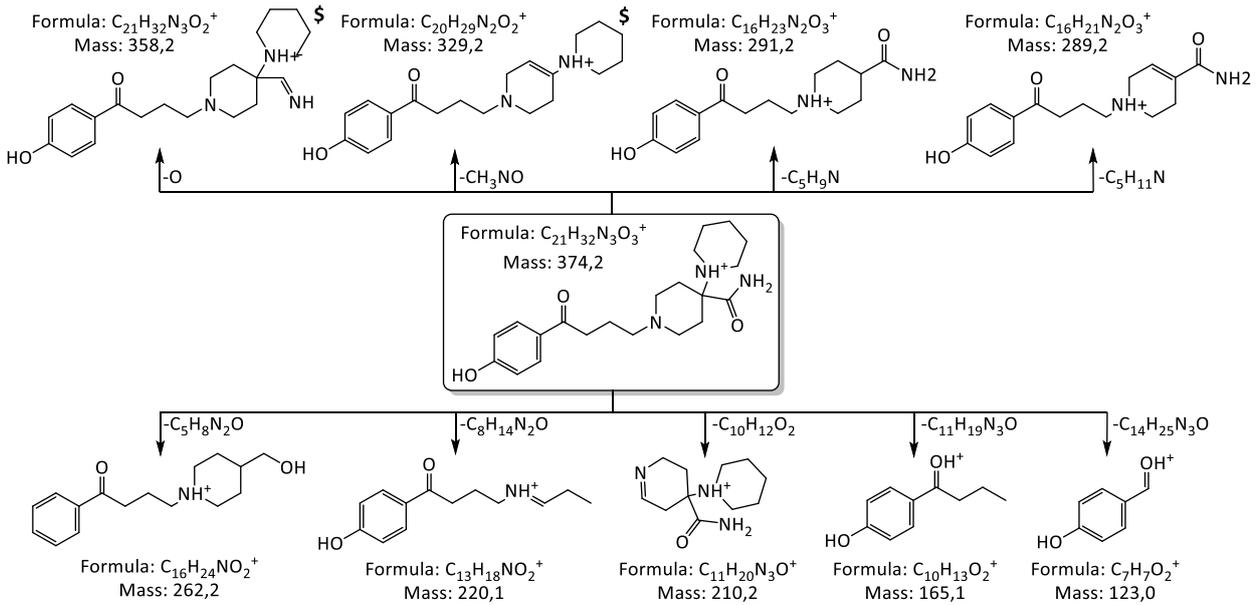


Abb. 119: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten. Die mit \$ gekennzeichneten Fragmente wurden nur mittels DIP-APCI detektiert.

Auch Verunreinigung C konnte mit beiden Ionisationsmethoden detektiert werden. Während bei der Ionisierung mittels DIP-APCI auch eine Identifizierung möglich war, war die Intensität der Verunreinigung mittels DIP-EESI zu gering. Die Spektren sind im Folgenden (Abb. 120) gezeigt sowie der postulierte Fragmentierungsweg (Abb. 121) für die MS<sup>2</sup>-Untersuchungen der Verunreinigung C, der zur Identifizierung genutzt wurde.

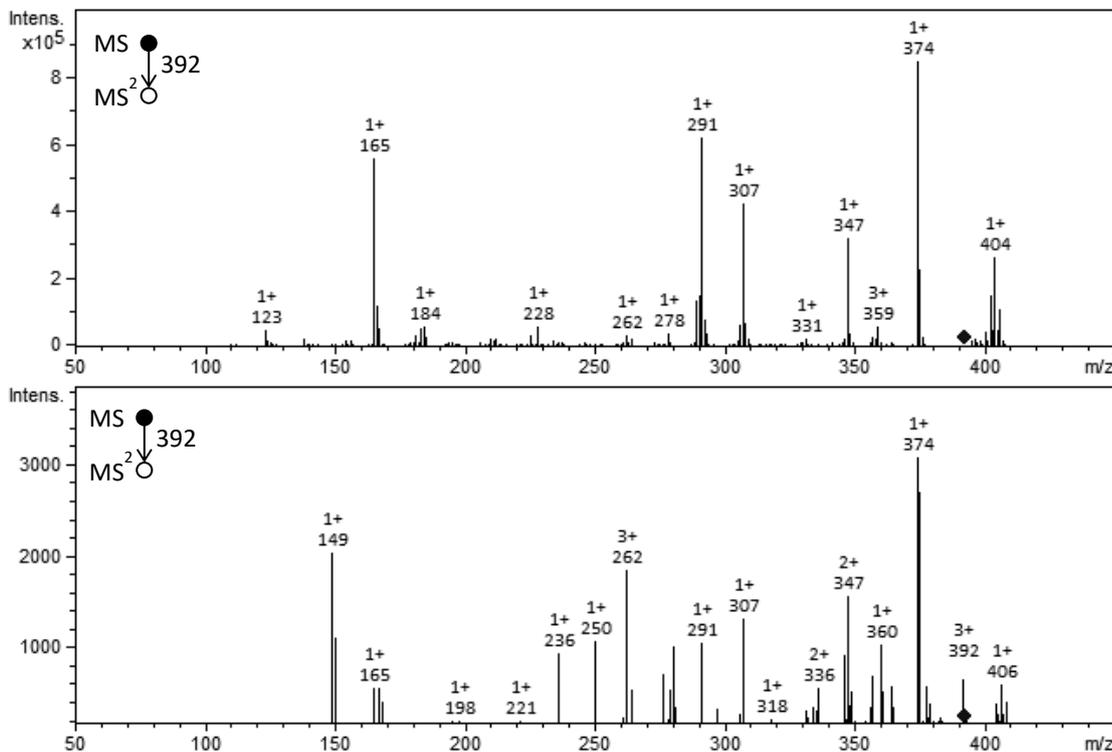


Abb. 120: Fragmentspektren von  $m/z = 392$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten),  $m/z = 392$  entspricht der Verunreinigung C

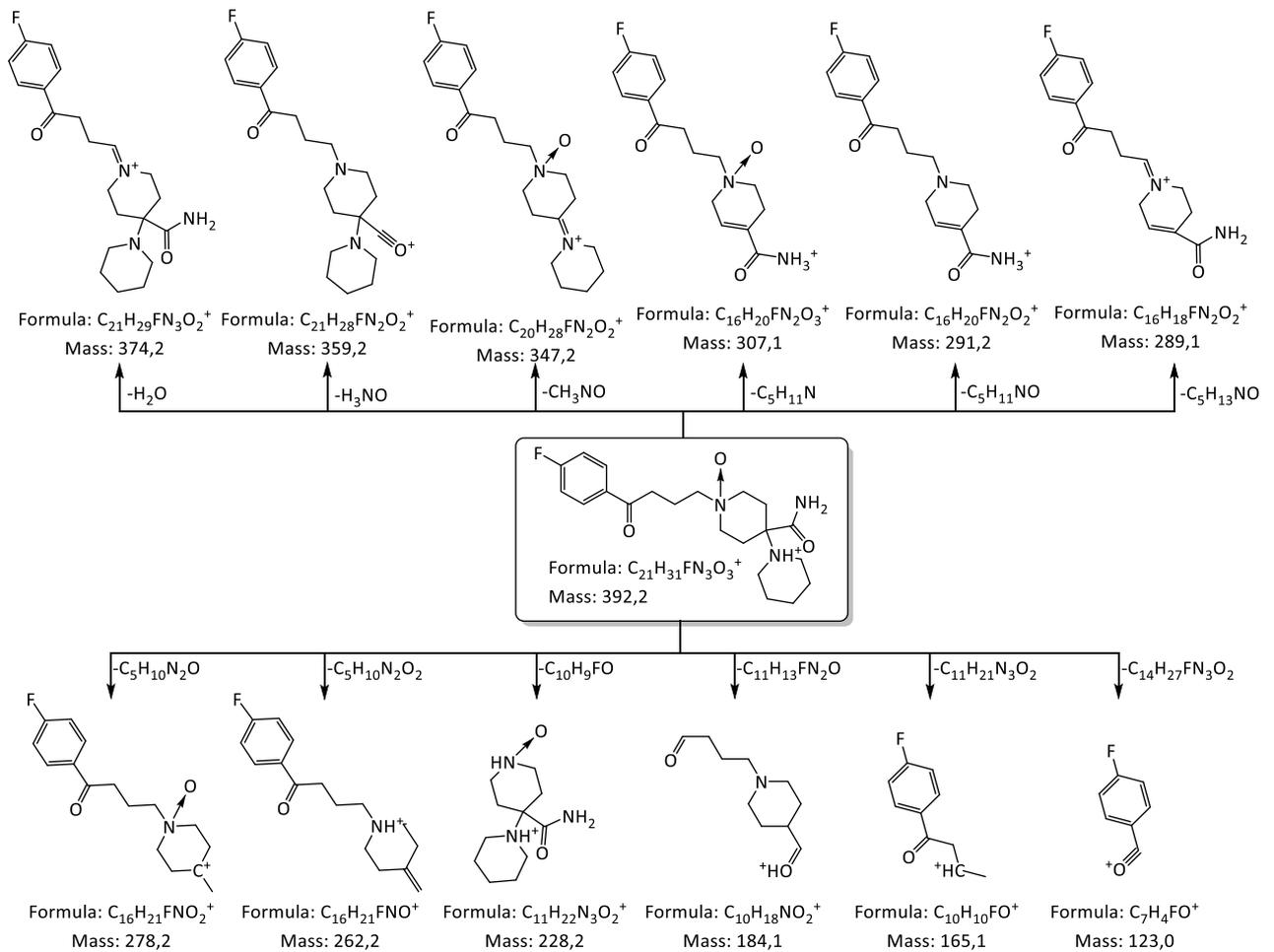


Abb. 121: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C, wie sie dem DIP-APCI Fragmentspektrum zugeordnet werden konnten.

Die Verunreinigung D konnte nur mit DIP-APCI detektiert werden. Da es sich hierbei um ein kleines Molekül mit  $m/z = 141$  handelt, konnten nur wenige Fragmente detektiert werden. Alle Fragmente konnten auf die Fragmentierung der Carboxylgruppe zurückgeführt werden. Daher ist fraglich, ob man hier von einer Identifizierung des Moleküls sprechen kann. Das erhaltene Spektrum sowie die postulierten Fragmente sind in Abb. 122 gezeigt.

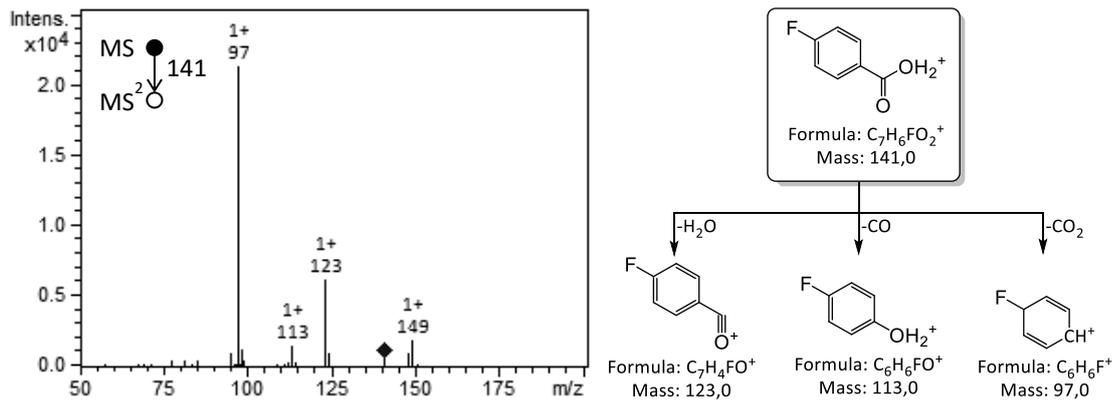


Abb. 122: Links: Fragmentspektren von  $m/z = 141$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI,  $m/z = 141$  entspricht der Verunreinigung E; Rechts: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E, wie sie dem Fragmentspektrum zugeordnet werden konnten.

Eine Bestätigung der Verunreinigungen mit HPLC-ESI-MS kann nur für die Verunreinigung B erfolgen, da keine weiteren bekannten Verunreinigungen detektiert wurden (Abb. 123). Der Peak bei 3,9 min, der als Verunreinigung B identifiziert wurde, zeigt das gleiche MS<sup>2</sup>-Spektrum, das auch mit DIP-EESI für  $m/z = 374$  erhalten wurde (Abb. 123 unten und Abb. 118).

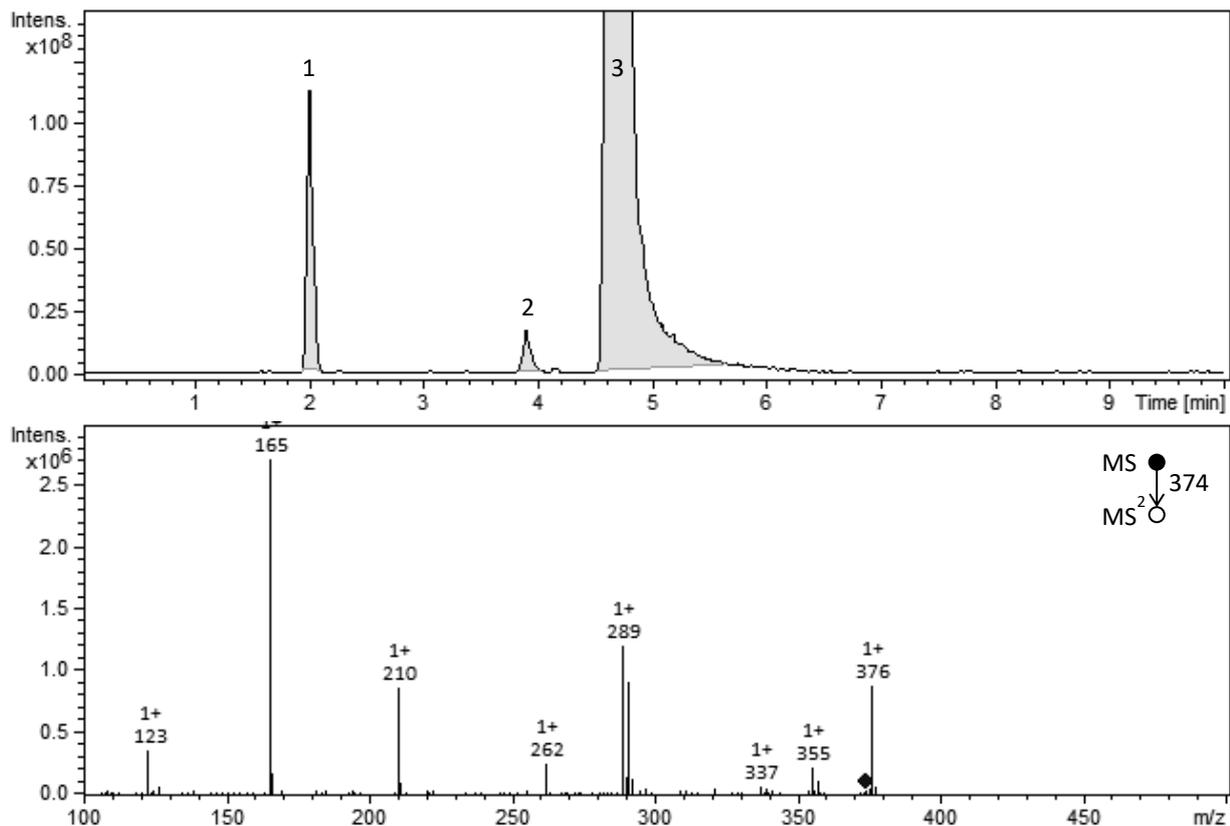


Abb. 123: Oben: HPLC-ESI-MS Base-Peak-Chromatogram (BPC) von Pipamperon. Peak 1 (RT = 2,0 min) konnte keiner bekannten Verunreinigung zu geordnet werden. Peak 2 (RT = 3,9 min) wurde als Verunreinigung B identifiziert. Peak 3 (RT = 4,7 min) ist der Wirkstoff. Unten: MS<sup>2</sup>-Spektrum von  $m/z = 374$  des Peaks 2 bei 3,9 min.

## 4.4.2.8 Trazodon

Das  $[M+H]^+$  von Trazodon mit  $m/z = 372$  wurde sehr dominant sowohl mittels DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI detektiert. Mittels DIP-EESI konnte zusätzlich noch das  $[M+Na]^+$  nachgewiesen werden. Die nächst intensivsten Massen, die nicht dem Wirkstoff zuzuordnen waren, wurden mit einer Intensität von  $\leq 2\%$  detektiert, vgl. hierzu Abb. 124.

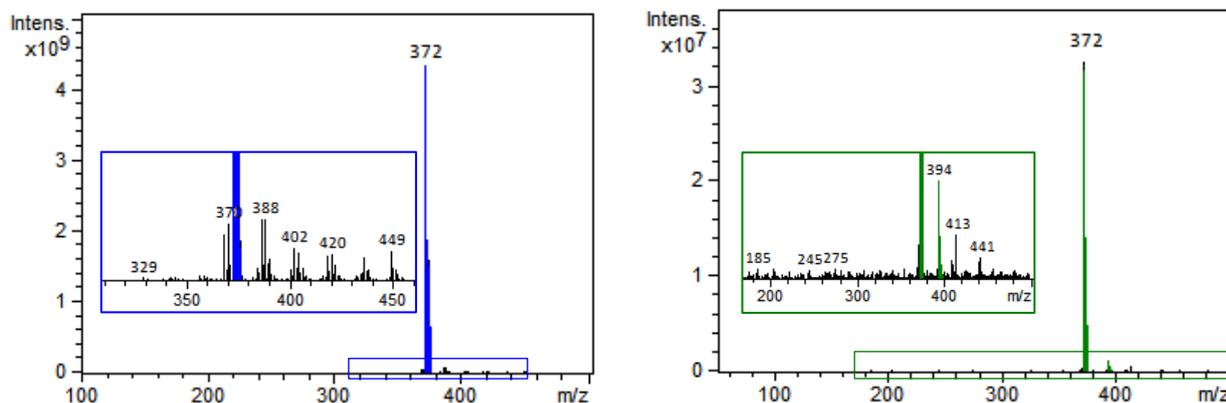


Abb. 124: Average Mass Spectrum je einer Trazodonmessung ( $[M+H]^+$   $m/z = 372$ ). Links Ionisierung mit DIP-APCI, rechts mit DIP-EESI sowie jeweils eine vergrößerte Darstellung. DIP-EESI zeigt die Addukte  $[M+Na]^+$  ( $m/z = 394$ ) während im DIP-APCI Spektrum eine Polymerverteilung eines Hilfsstoffes sowie ggf. bereits Verunreinigung B ( $m/z = 388$ ) zusehen ist.

Obwohl die Tablette in Methanol suspendiert und anschließend durch einen  $0,45\ \mu\text{m}$  PTFE-Filter filtriert wurde, konnte bei den DIP-APCI-Messungen noch immer ein Teil der Hilfsstoffe detektiert werden (Abb. 124). Hierdurch war es nicht möglich, die bekannten Verunreinigungen B ( $m/z = 338$ ), D ( $m/z = 416$ ), E ( $m/z = 400$ ), G ( $m/z = 311$ ) und H ( $m/z = 433$ ), dargestellt in Abb. 125, zu identifizieren, da sie von den Hilfsstoffen überlagert wurden.

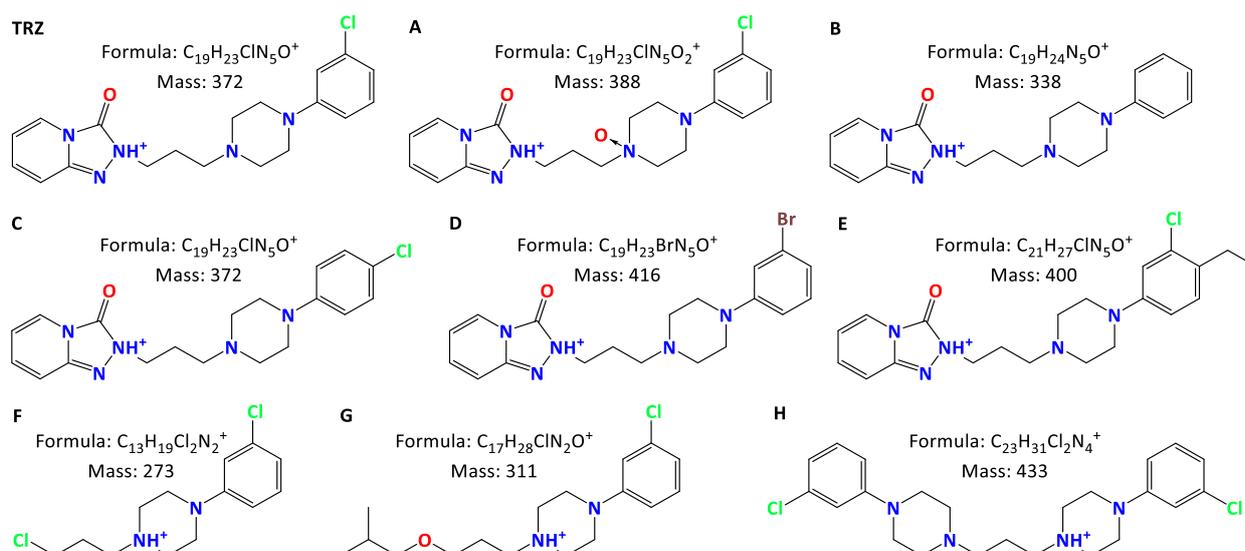


Abb. 125: Trazodon 2-[3-[4-(3-Chlorphenyl)-1-piperazinyl]propyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]-pyridin-3(2H)-on (TRZ) und seine acht in der USP beschriebenen Verunreinigungen A bis H (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.9 zusammengefasst)

Die Verunreinigung F ( $m/z = 273$ ) wurde nicht durch einen der Hilfsstoffe überlagert, konnte jedoch auch nicht detektiert werden. Die Masse der Verunreinigung C ist identisch mit der des Wirkstoffes und kann daher nicht mittels DIP-APCI oder DIP-EESI untersucht werden und wird nicht weiter betrachtet.

Die Fragmentierung von  $m/z = 388$ , Masse der protonierten Verunreinigung A, zeigte ein Spektrum mit einer überschaubaren Menge an Fragmenten, vgl. hierzu Abb. 126. Daher war davon auszugehen, dass hier nur eine geringe Störung durch die Überlagerung mit dem Hilfsstoff vorlag. Die intensiveren Massen konnten der Verunreinigung A zugeordnet werden, wie der postulierte Fragmentierungsweg in Abb. 127 dargestellt. Eine Überprüfung der Ergebnisse mittels HPLC-ESI-MS ergab lediglich drei Fragmente ( $m/z = 278, 176, 148$ ) für die Verunreinigung A, vgl. Abb. 254 in Anhang 6.2.9, Seite 239. Diese Fragmente wurden auch mittels DIP-APCI-MS detektiert. Die restlichen detektierten Massen konnten mit HPLC-ESI-MS nicht nachgewiesen werden.

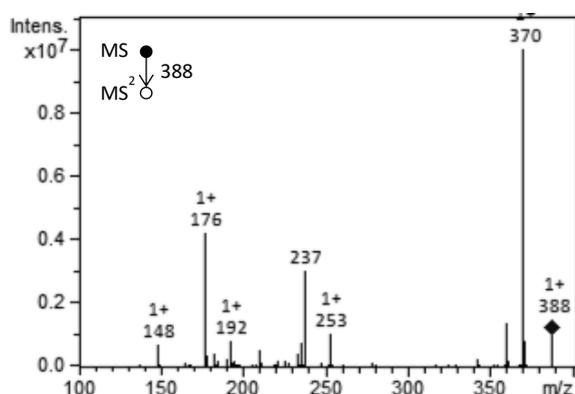


Abb. 126:  $MS^2$ -Spektren von  $m/z = 388$  der potentiellen Verunreinigung A, nach Ionisierung mit DIP-APCI.

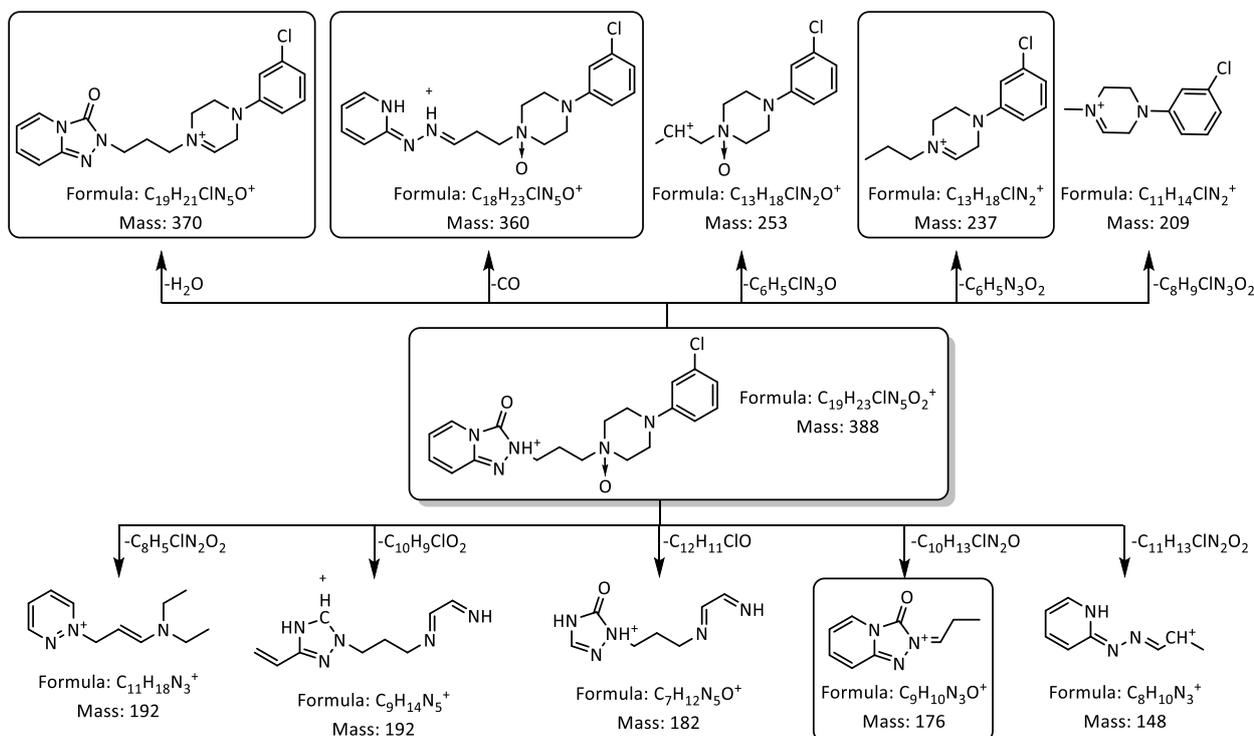


Abb. 127: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A, die den Massen aus dem  $MS^2$ -Fragmentspektren aus Abb. 126 zugeordnet werden konnten.

Durch den Vergleich mit den HPLC-ESI-MS-Spektren, die für die Verunreinigung E erhalten wurden, konnten Übereinstimmungen in den DIP-APCI-Spektren gefunden werden ( $m/z = 265, 176, 148$ ). Da die Verunreinigung E alleine aus den DIP-APCI-Spektren nicht identifiziert wurde, aufgrund der Überlagerung mit dem Hilfsstoff, wurden diese weniger intensiven Massen nicht weiter untersucht. Dadurch ist eine nachträgliche Identifizierung über den Vergleich mit den HPLC-ESI-MS -Spektren nicht möglich. Weiter konnte, nachdem bekannt war welche Fragmente der Verunreinigung E zuzuordnen waren, der Verdampfungsbereich der Verunreinigung E von 1,0 – 4,0 min (grün und blau unterlegt) auf 2,5 – 4,0 min (blau unterlegt) eingegrenzt werden (Abb. 128). In diesem Bereich sind die bekannten Massen der Verunreinigung E (in blau und rot dargestellt) intensiver als im Bereich, in dem vor allem der Hilfsstoff verdampft (in grün dargestellt). Durch Eingrenzen des Verdampfungsbereichs konnte das blau dargestellte Spektrum erhalten werden, das die Fragmente der Verunreinigung E intensiver zeigte, als das Spektrum über den größeren Verdampfungsbereich (Abb. 128).

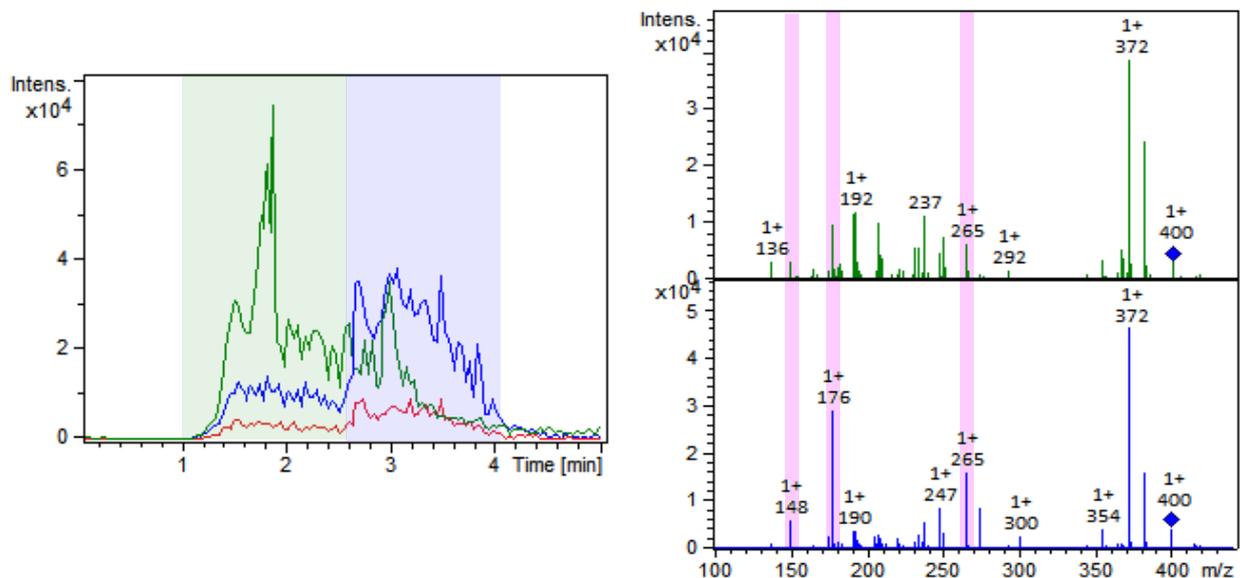


Abb. 128: Links: EIC-Chronogramm der Fragmentmassen:  $m/z = 382$  grün, gehört nicht zur Verunreinigung E,  $m/z = 176$  blau und  $m/z = 265$  rot sind potentielle Fragmente der Verunreinigung E. Rechts: oben Spektrum über den grünen Bereich des Chronogramms, unten Spektrum über den blauen Bereich des Chronogramms, wahrscheinlich der Verdampfungsbereich der Verunreinigung E, rosa markiert die  $m/z$ -Signale, die mittels HPLC-ESI-MS für die Verunreinigung E detektiert wurden.

Die Verunreinigungen D, F, G und H konnten auch mit HPLC-ESI-MS nicht detektiert werden, lediglich die Verunreinigungen A, B und E. Die Spektren zeichnen sich, wie in Anhang 6.2.9 zu sehen ist, dadurch aus, dass vor allem die Signale mit  $m/z = 176$  und  $148$  detektiert werden. Diese Massen wurden auch schon bei der Fragmentierung des Wirkstoffes beobachtet.

Bei den DIP-EESI-Messungen wurde im Gegensatz zu den DIP-APCI Messungen kein Hilfsstoff detektiert, wie in der Vergrößerung in Abb. 124 zu sehen ist. Dies kann daran liegen, dass der Hilfsstoff im Vergleich mit dem Wirkstoff mit EESI nicht oder nur sehr schlecht ionisiert wird. Hierdurch ist es möglich, Spektren

der bekannten Verunreinigungen zu erhalten, die nicht vom Hilfsstoff überlagert werden, sofern sie in ausreichender Konzentration in der Probe vorhanden sind.

Es konnte lediglich für Verunreinigung A ( $m/z = 388$ ) über  $MS^2$ -Untersuchungen ein Verdampfungsbereich detektiert werden. Die anderen Verunreinigungen waren entweder nicht in der Probe vorhanden oder in einer zu geringen Konzentration, um sie nachweisen zu können.

Da die Verunreinigung A, ebenso wie der Wirkstoff, nur wenige Fragmente bei  $MS^2$  und  $MS^3$ -Untersuchungen zeigte (vgl. Abb. 129) war eine eindeutige Identifizierung nicht möglich.

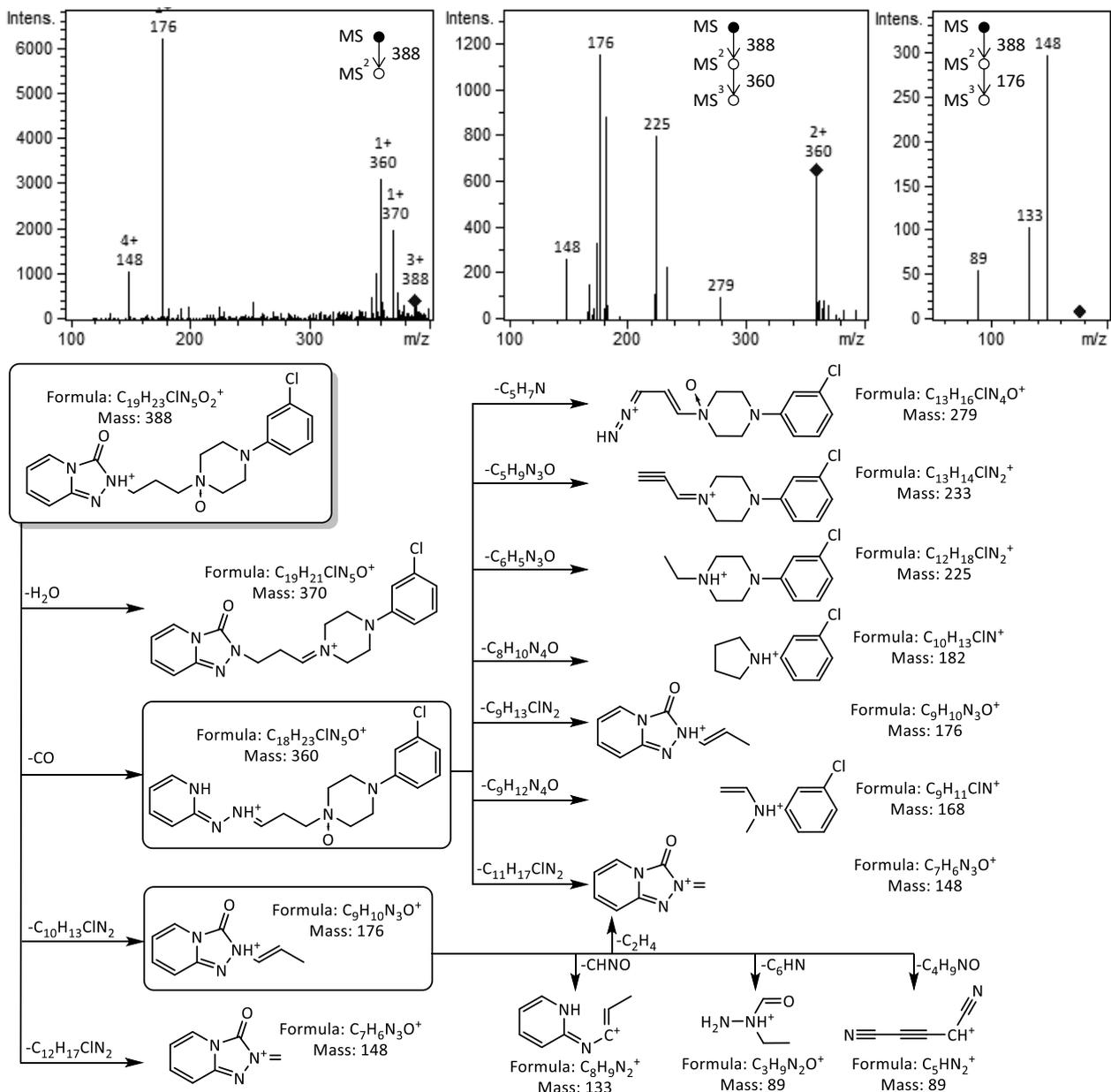


Abb. 129:  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels DIP-EESI-MS, sowie unten mögliche Fragmente

#### 4.4.3 Einschränkungen der Medikamentenanalyse mit DIP-APCI oder DIP-EESI

##### 4.4.3.1 Aspirin

Einige Grenzen und mögliche Probleme bei der Untersuchung von Wirkstoffen in Medikamenten mit der DIP zeigen sich besonders deutlich am Beispiel der Analyse von Acetylsalicylsäure-Tabletten.

Die Acetylsalicylsäure-Tabletten enthalten neben dem eigentlichen Wirkstoff, der hier 50 mg/Tablette  $\pm 10\%$  beträgt, noch ca. 14,5 mg Hilfsstoffe. Die genaue Zusammensetzung ist, wie auch bei allen anderen untersuchten Arzneimitteln, nicht bekannt, da die Tabletten nicht direkt vom Hersteller bezogen wurden. Bei den untersuchten Acetylsalicylsäure-Tabletten handelt es sich um nicht überzogene Tabletten, d.h. die Hilfsstoffe sind in der Tablette homogen verteilt.

Nach der Analyse der Aspirin-Tablettenlösung mit DIP-APCI konnten zwei Bereiche im Chromogramm detektiert werden (Abb. 130).

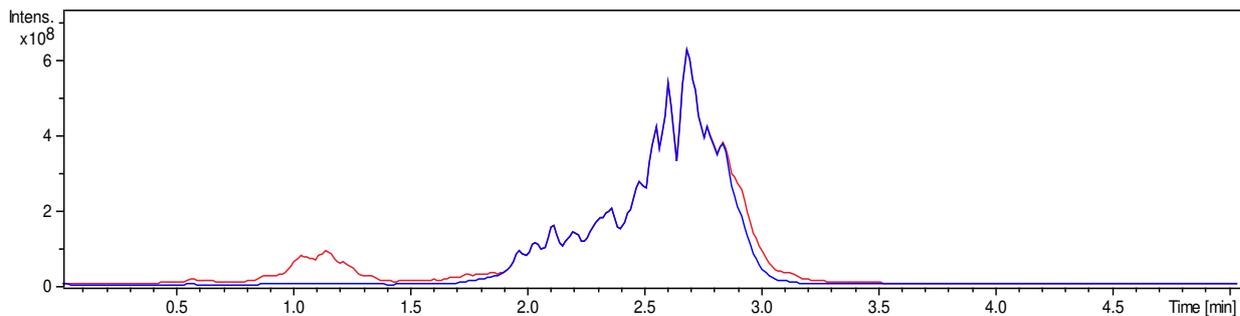


Abb. 130: Chromogramm einer Acetylsalicylsäure-Tablette gelöst in Methanol (Konzentration ca. 50 mg/L). Die rote Linie stellt den BPC-Verlauf dar und markiert den 1. Bereich, während die blaue Linie das EIC  $m/z = 361$  zeigt, das den 2. Bereich des Chromogramms kennzeichnet.

Im 1. Bereich des Chromogramms zwischen 0 und 1,5 min (ca. 40 – 220°C) können vor allem die Signale mit  $m/z = 121, 139, 153, 163,$  und 195 detektiert werden. Das Spektrum über diesen Bereich ist in Abb. 131 dargestellt. Das Signal bei  $m/z = 181$ , das für das  $[M+H]^+$  von Acetylsalicylsäure erwartet wird, wurde nur mit sehr geringer Intensität beobachtet. Die Signale  $m/z < 181$  lassen sich, in Übereinstimmung mit Willams et al. [208], den Fragmenten, der Acetylsalicylsäure zuordnen. Die Strukturen der Fragmente sind in Abb. 132 dargestellt. Das Signal bei  $m/z = 195$  kann durch eine Veresterung mit dem Lösungsmittel Methanol, erklärt werden. Das Signal bei  $m/z = 195$  konnte sowohl im Tablettenpulver als auch bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel nicht detektiert werden, ebenfalls in Abb. 131 gezeigt.

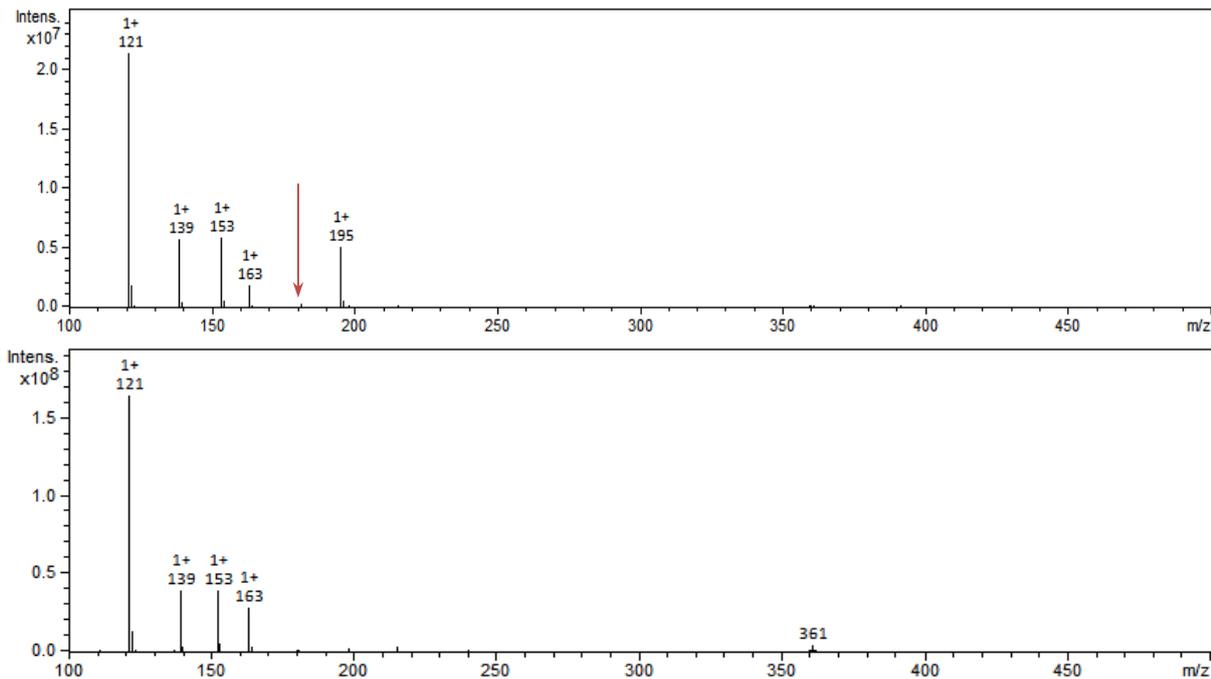


Abb. 131: Massenspektrum des Acetylsalicylsäure-Chronogramms im Bereich von 0 – 1,5 min. Der Pfeil zeigt das  $m/z = 181$ , das für das  $[M+H]^+$  von Acetylsalicylsäure erwartet wird. Oben wurde Methanol, unten Wasser als Lösungsmittel verwendet

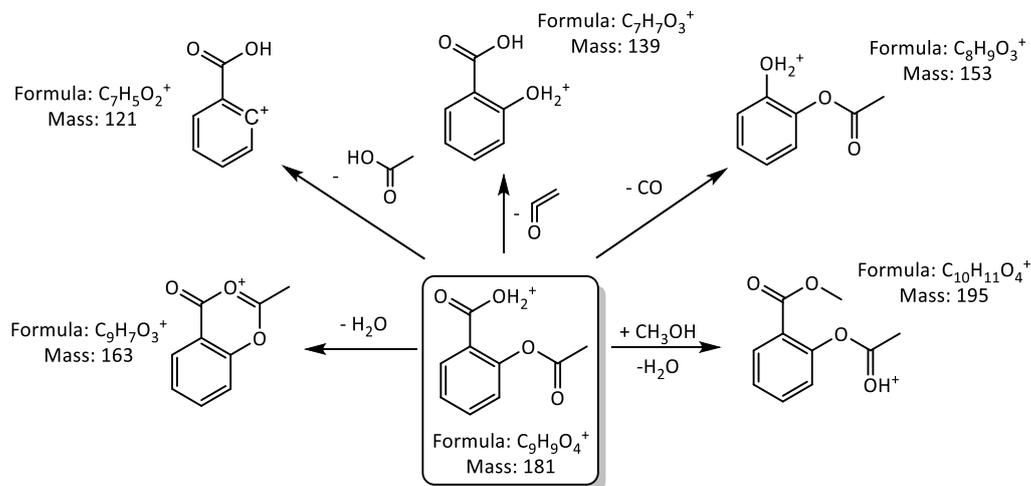


Abb. 132: Mögliche Fragmente von Acetylsalicylsäure (s. Kasten), wie sie im 1. Bereich des Chronogramms detektiert wurden, z.T. in Übereinstimmung mit [208]

Der 2. Bereich des Chronogramms zwischen 1,5 und 3,2 min (ca. 220 – 400°C) wird von Signalen mit äquidistantem Abstand von  $\Delta 120$  dominiert, wie in Abb. 133 zu sehen ist. Messungen bis  $m/z = 1000$  zeigten, dass diese Reihe bis zu  $m/z = 961$  weiter fortgesetzt wird. Hierbei handelt es sich nicht um einen polymeren Hilfsstoff der Acetylsalicylsäure-Tablette, sondern um die thermischen Zersetzungsprodukte der Acetylsalicylsäure, welche von Long et al. 2002 [209] beschrieben wurden und in Abb. 134 dargestellt sind.

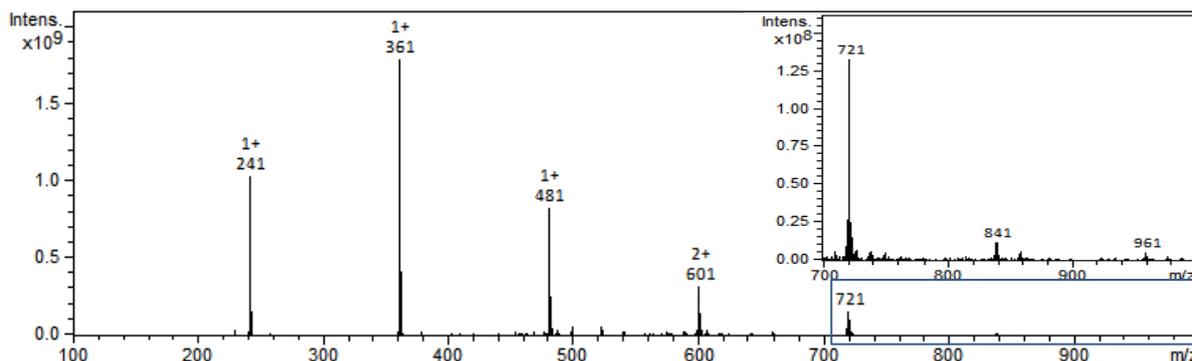


Abb. 133: Massenspektrum des Acetylsalicylsäure-Chronogramms im Bereich von 1,5 – 3,5 min. Der Bereich zwischen  $m/z = 700$  und  $1000$  ist vergrößert dargestellt.

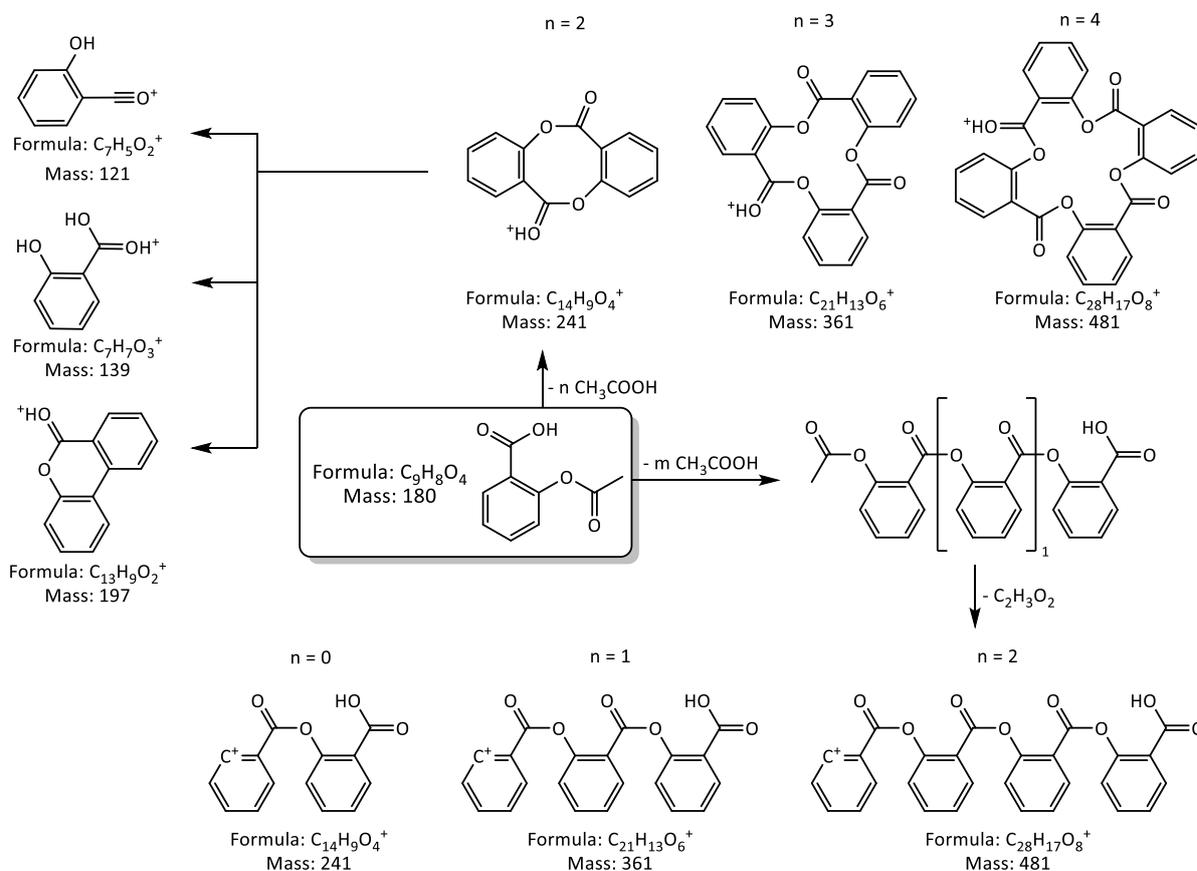


Abb. 134: Mögliche Fragmente von Acetylsalicylsäure (s. Kasten), wie sie im 2. Bereich des Chronogramms detektiert wurden, z.T. beschrieben in [209]

Bei  $m/z = 241$  handelt es sich wahrscheinlich um das Kondensationsprodukt von zwei ASS-Molekülen und dem Verlust von zwei Essigsäuremolekülen und bei  $m/z = 361$  um das entsprechende Kondensationsprodukt von drei ASS-Molekülen und dem Verlust von drei Essigsäuremolekülen. Long et al. [209] vermuten, dass sich zwischen ca.  $165^\circ\text{C}$  und  $300^\circ\text{C}$  lineare Oligomere und zwischen ca.  $230^\circ\text{C}$  und  $360^\circ\text{C}$  cyclische Oligomere der Acetylsalicylsäure bildeten. Aufgrund der Temperatur der DIP von ca.  $220^\circ\text{C}$  bis  $400^\circ\text{C}$  sollten überwiegend die cyclischen Oligomere entstehen. Bei  $m/z = 481$ ,  $m/z = 361$  und  $m/z = 241$

kann es sich aber auch um Fragmente einer Kette aus kondensierten ASS-Molekülen handeln (Abb. 134). Die Fragmente  $m/z = 121$  und  $m/z = 139$  wurden bereits in Abb. 132 gezeigt und können ebenfalls aus den Kondensationsprodukten entstehen. Bei  $m/z = 197$  mit einer vergleichsweise geringen Intensität handelt es sich um ein weiteres Fragment der Kondensationsprodukte. Alle genannten Fragmente konnten auch durch  $MS^2$ -Untersuchungen von  $m/z = 241$ ,  $m/z = 361$  und  $m/z = 481$  erhalten werden.

Aufgrund der Fragmentierung und der thermischen Zersetzung des Wirkstoffes ist es nicht möglich, Verunreinigungen, die in der Tablette vorhanden sein können, zu identifizieren. So lassen sich selbst mit  $MS^n$ -Untersuchungen die bekannten Verunreinigungen, die gemäß Ph. Eur. mit 0,15% im Wirkstoff enthalten sein dürfen [157], nicht nachweisen, da sie von Wirkstofffragmenten bzw. Fragmenten der Kondensationsprodukte überlagert werden, vgl. hierzu Tabelle 38. Außerdem ist nicht bekannt, ob die bekannten Verunreinigungen thermisch stabil sind, oder was aufgrund ihrer Struktur wahrscheinlicher ist, sich ähnlich wie ASS verhalten.

Tabelle 38: Liste der bekannten Verunreinigungen von Acetylsalicylsäure gemäß Ph. Eur. 7.0 [157]

Bekannte Verunreinigung*	Masse [Da]	Bemerkungen
A: 4-Hydroxybenzoesäure	138	[M+H] <sup>+</sup> : 139 besitzt die selbe Masse wie ein ASS Fragment, daher ist die Anwesenheit der Verunreinigung nicht bestimmbar
B: 4-Hydroxyphthalsäure	182	[M+H] <sup>+</sup> : 183 wurde nicht detektiert - H <sub>2</sub> O: 165 nur das ASS Isotop (C <sub>7</sub> <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) kann detektiert werden.
C: Salicylsäure	138	[M+H] <sup>+</sup> : 139 besitzt die selbe Masse wie ein ASS Fragment, daher ist die Anwesenheit der Verunreinigung nicht bestimmbar
D: Acetylsalicylsäure	300	[M+H] <sup>+</sup> : 301 wurde nicht detektiert - H <sub>2</sub> O: 283 wurde in der ganzen Tablette detektiert (im Bereich 160–280 °C), da Long et al. [209] Zersetzungsprodukte des ASS mit dieser Masse beschreibt, wurde $m/z = 283$ nicht weiter untersucht.
E: Salicylsalicylsäure	258	[M+H] <sup>+</sup> : 259 wurde nicht detektiert - H <sub>2</sub> O: 241 hat die gleiche Masse wie ein Zersetzungsprodukt von ASS
F: Acetylsalicylsäureanhydrid	342	[M+H] <sup>+</sup> : 343 wurde nicht detektiert - H <sub>2</sub> O: 325 wurde in der ganzen Tablette im Bereich 350–400 °C detektiert. Aufgrund der hohen Temperatur handelt es sich wahrscheinlich um ein Zersetzungsprodukt oder Fragment eines Zersetzungsproduktes. $MS^2$ -Untersuchungen brachten keine weiteren Erkenntnisse.

\*Nummerierung gemäß Ph. Eur. 7.0

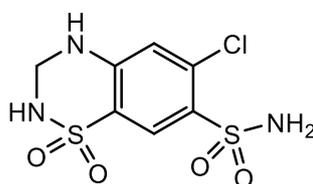
Der Nachweis unbekannter Verunreinigungen ist in diesem Fall nicht möglich. Unbekannte Verunreinigungen dürfen im Wirkstoff lediglich mit einer Konzentration von maximal 0,025% enthalten sein [157]. Theoretisch könnten sie bei guter Ionisierung mit ca. 20 ng bei einer Einwaage von 100 µg Tablettenpulver noch mit der DIP-APCI nachgewiesen werden, jedoch überlagert der Wirkstoff und seine thermischen Zersetzungsprodukte bei der Analyse des reinen Tablettenpulvers, wie anfangs erwähnt, das Spektrum, so dass keine Massen in diesem Konzentrationsbereich mehr detektiert werden können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass thermisch stabile Substanzen untersucht werden können. Thermisch labile Substanzen lassen sich unterhalb ihrer Zersetzungstemperatur untersuchen, wenn sie bei dieser Temperatur in ausreichendem Maße in die Gasphase übergehen. Dies ist bei ASS, das einen Schmelzpunkt von 138 °C und eine Zersetzungstemperatur von ca. 140 °C besitzt [209], nicht der Fall, da für ASS keine Sublimation bei Atmosphärendruck beobachtet wird. Eine Änderung des Temperaturprogramms war daher nicht zielführend.

Verunreinigungen lassen sich nachweisen, wenn sie in ausreichenden Mengen in der Tablette vorhanden sind und sich ihre Masse von der Masse des Wirkstoffes bzw. seinen Fragmenten deutlich unterscheiden. Das Screening nach unbekanntem Verunreinigungen ist bei Substanzen, die sich während der Ionisierung zersetzen, dann zielführend, wenn zwischen Substanzen unterschieden werden kann, die aufgrund der Zersetzung in der Quelle entstehen und denen, die durch die Lagerung entstehen.

#### 4.4.3.2 Hydrochlorothiazid

Auch von Hydrochlorothiazid (HCT), gezeigt in Abb. 135, ist bekannt, dass es thermisch nicht stabil ist. Durch Differentialthermoanalyse (DTA), Thermogravimetrie (TG) und Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) wurde als Zersetzungstemperatur  $310 \pm 4$  °C für HCT ermittelt [210–212]. Da die Zersetzungstemperatur vergleichsweise hoch ist und unter der Voraussetzung, dass HCT unterhalb der Zersetzungstemperatur in ausreichenden Mengen verdampft, sollte es möglich sein, dieses Medikament mittels DIP-APCI bzw. DIP-EESI zu analysieren.



Chemical Formula:  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Exact Mass: 297

Abb. 135: Struktur von Hydrochlorothiazid

Das Signal des protonierten Wirkstoffes konnte jedoch nur in untergeordneter Intensität detektiert werden (Abb. 136 unten). Die intensivsten Signale im Massenspektrum waren  $m/z = 219$  und  $217$ . Hierbei handelt es sich nicht, wie die Differenz vermuten lässt, um eine Substanz, die ein Chlor oder Brom enthält, sondern, wie aus dem Chronogramm (Abb. 136 oben links) ersichtlich ist, um zwei zeitlich getrennte Substanzen. Beide Substanzen enthalten jeweils ein Chlor-Atom. Aufgrund einiger Publikationen [213, 214], die HCT mit HPLC-ESI-MS im negativen Ionisationsmodus untersucht haben, wurde HCT auch im negativen Modus mit der DIP-EESI analysiert. Auch hierbei konnte der protonierte Wirkstoff nur in sehr geringer Intensität detektiert werden. Es wurden nur Signale für  $m/z = 215$  und  $217$  detektiert (Abb. 136 oben rechts), die den Signalen bei  $m/z = 217$  und  $219$  im positiven Modus entsprechen.

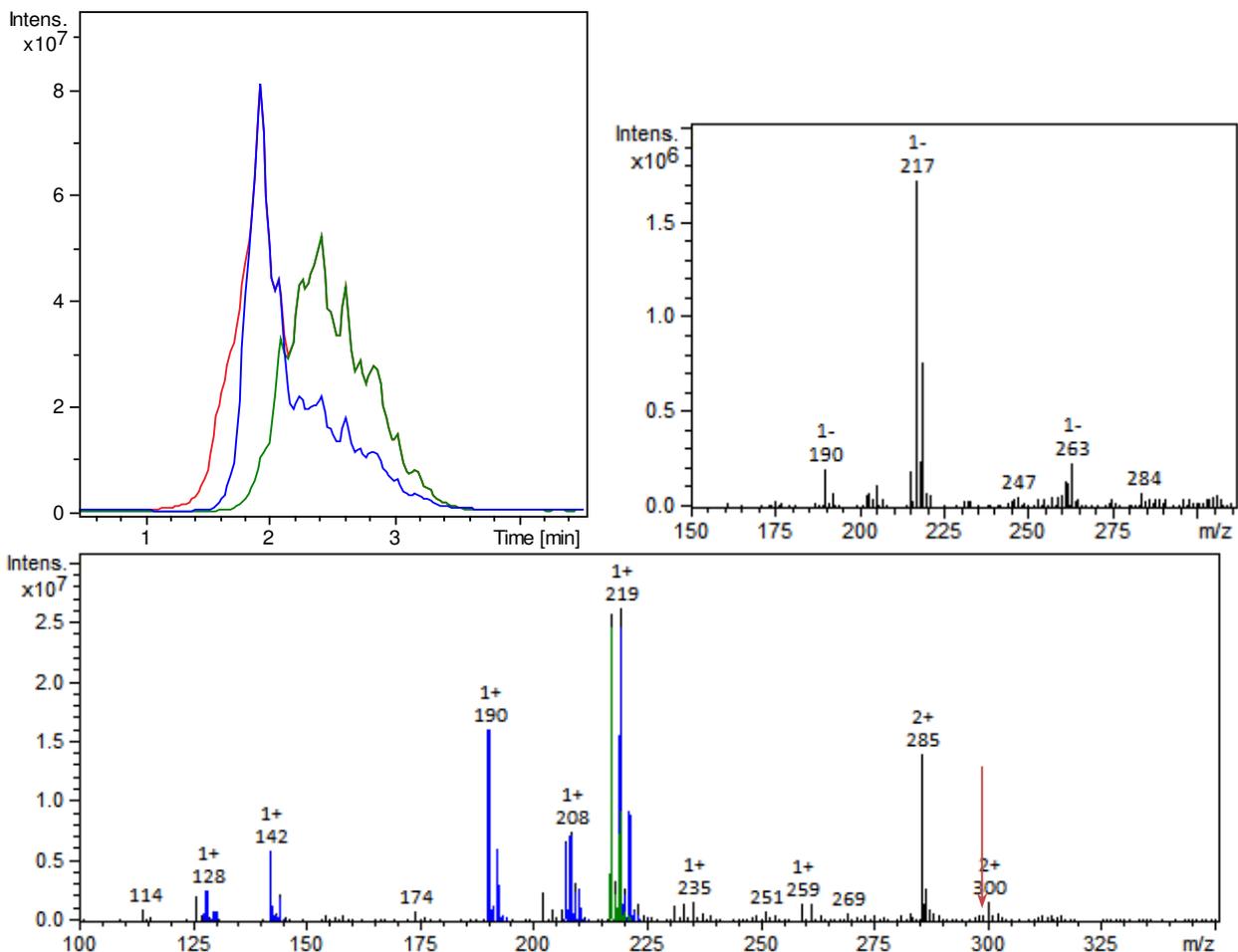


Abb. 136: Oben links: Chronogramm einer 0,5 g/L HCT-Tablettenlösung in Methanol, rot: BPC, blau:  $m/z = 219$ , grün:  $m/z = 217$ ; Oben rechts: Massenspektrum von 1,0 bis 3,5 min im negativen Modus ( $m/z =$  Bereich 150 – 325); unten: Massenspektrum im positiven Modus von 1,0 bis 3,5 min, blau markiert alle Massen, die zeitgleich mit  $m/z = 219$  verdampfen, grün alle Massen, die zeitgleich mit  $m/z = 217$  verdampfen. Der Pfeil markiert die Stelle, an der das Signal für das  $[M+H]^+$  des Wirkstoffes auftreten müsste.

Mögliche Zersetzungsprodukte sind in Abb. 137 oben dargestellt. Sie wurden nur anhand der detektierten Masse und aus der Grundstruktur von HCT abgeleitet. Obwohl sie in hoher Konzentration detektiert

wurden, konnte nur das Signal von  $m/z = 219$  fragmentiert werden ( $m/z = 219 \rightarrow 192 \rightarrow 128$ ). Bei den anderen Zersetzungsprodukten  $m/z = 217$ , 208 und 190 wurde bei  $MS^2$ -Untersuchungen nur die isolierte Masse detektiert. Durch Erhöhen der Fragmentierungsenergie wurde zunächst ein Rückgang der Signalintensität des jeweiligen Precursor-Ions beobachtet. Durch weitere Erhöhung der Fragmentierungsenergie wurde ein stark verrauschtes Spektrum erhalten mit Intensitäten kleiner 200 Counts, die nicht mehr auszuwerten waren. Wahrscheinlich entsteht das erste Zersetzungsprodukt mit  $m/z = 219$  durch den Verlust der  $SO_2NH_2$ -Gruppe. Das zweite Zersetzungsprodukt könnte die dehydrierte Form des ersten Zersetzungsprodukts sein. Diese Theorien werden durch Valladao et al. [210] gestützt, die zu demselben Schluss kamen.

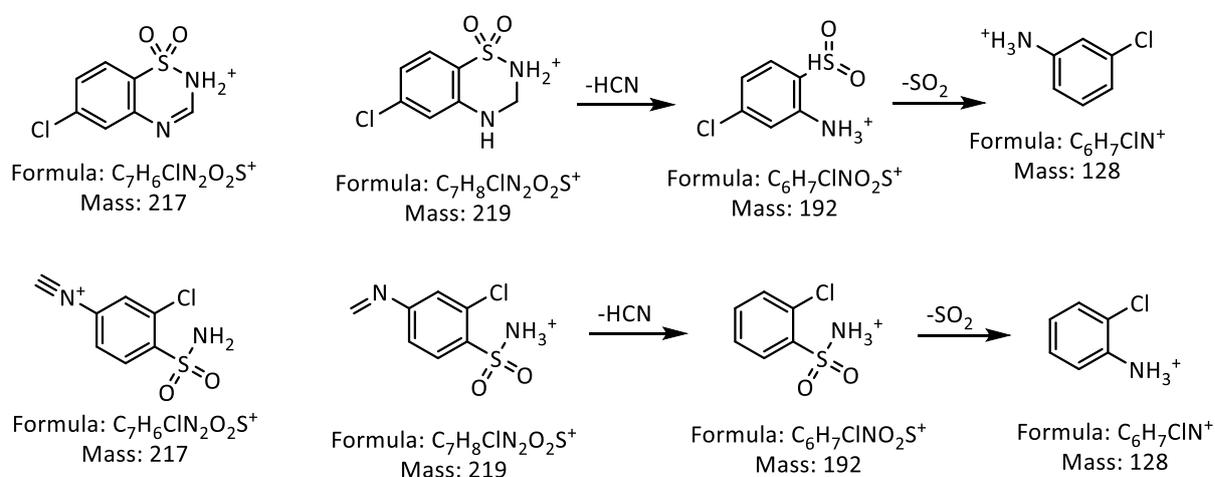


Abb. 137: Mögliche thermische Zersetzungsprodukte von HCT, sowie mögliche Fragmente, die aus  $m/z = 219$  erhalten wurden. Oben wurden die Strukturen anhand der detektierten Massen und der HCT-Struktur abgeleitet, die Ergebnisse sind mit denen von Valladao et al. [210] konform. Unten wurden die Strukturen anhand möglicher Maillard-Reaktionsprodukte abgeleitet.

Um eine Verdampfung des Wirkstoffes in größerer Menge zu ermöglichen, bevor die Zersetzung eintritt, wurde mit Methode 6 (s. Kapitel 3.3.2.4 Seite 53) geprüft, ob dies mit einem flacheren Temperaturgradienten realisiert werden kann. Doch auch ein flacherer Temperaturanstieg zeigte keine Verbesserung. In jedem Fall wurde zeitgleich mit Erscheinen des protonierten Wirkstoffsignals, vgl. Abb. 138, bei einer Temperatur von ca.  $220^\circ C$  auch das Zersetzungsprodukt mit  $m/z = 219$  detektiert. Die zweite Zersetzungssubstanz mit  $m/z = 217$  wurde kurz darauf bei einer Temperatur der DIP von ca.  $240^\circ C$  detektiert.

Diese Werte sind überraschend, da die Zersetzungsprodukte mittels DIP bereits unter dem Schmelzpunkt von  $270^\circ C$  [157] detektiert werden. In der Literatur wird beschrieben, dass der Schmelzpunkt herabgesetzt wird oder es bereits bei niedrigen Temperaturen von  $> 165^\circ C$  zur direkten Zersetzung des Wirkstoffes kommen kann, wenn Lactose und/oder Stärke in der Formulierung vorhanden sind, wie es

hier der Fall ist. Dies ist auf eine Maillard-Rektion der Amin-Gruppen des Wirkstoffes mit den Zuckermolekülen zurückzuführen. [211, 212]

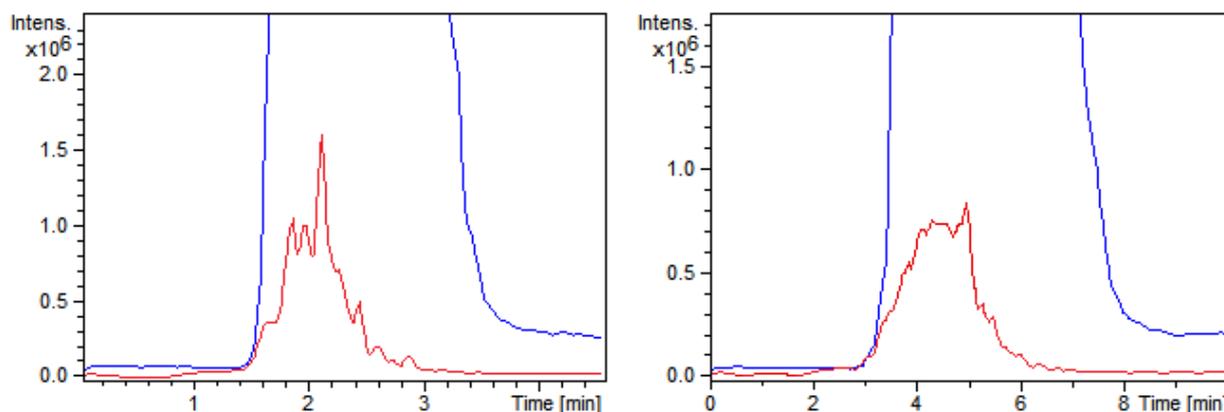


Abb. 138: Links: vergrößertes Chronogramm einer 0,5 g/L HCT-Tablettenlösung in Methanol, blau:  $m/z = 219$ , rot:  $m/z = 298$  entspricht dem Signal des protonierten Wirkstoffes; rechts: Chronogramm mit verlängertem Temperaturgradienten.

Während bei der TG und DSC die Formulierungen in Pulverform untersucht wurden, wurde für die DIP-Untersuchungen die Tablette in Methanol suspendiert und der Rückstand durch Zentrifugation entfernt. Da sowohl Stärke als auch Lactose praktisch unlöslich in Methanol sind, sollte der Einfluss durch Reaktionen mit diesen Substanzen gering sein. Was aber zu einer Reduktion der Zersetzungstemperatur geführt haben kann, müsste in weiterführenden Arbeiten untersucht werden und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

HCT lässt sich, wie durch die obigen Untersuchungen gezeigt, durch thermische Desorption nicht unzersetzt in die Gasphase überführen. Da dies wahrscheinlich auch für die möglichen Verunreinigungen, die in Ph. Eur. und USP beschrieben sind, zutrifft, sowie für mögliche Verunreinigungen, die sich während der Lagerung bilden, ist ein Screening nach diesen Substanzen nicht möglich, da es keine Anhaltspunkte gibt, zu welchen Zersetzungsprodukten sie werden könnten. Die beschriebenen Verunreinigungen aus Ph. Eur. und USP konnten weder mit DIP-APCI noch mit DIP-EESI gefunden werden.

#### 4.4.3.3 Irbesartan

Ein sehr ähnliches Problem ist auch bei Irbesartan zu beobachten. Der Schmelzpunkt von Irbesartan liegt bei ca. 180 °C [191]. Die Zersetzung tritt bereits zwischen 201 und 205 °C ein [215]. Somit liegen Zersetzungstemperatur und Schmelzpunkt noch näher beieinander, als beim HCT. Wie in Abb. 139 zu sehen ist, konnte mittels DIP-EESI und DIP-APCI der Wirkstoff ab ca. 1,3 min, entsprechend ca. 190 °C, detektiert werden, während das Hauptzersetzungsprodukt mit  $m/z = 386$  erst ab ca. 230 °C detektiert wurde. Da, wenn auch nur für einen kleinen Bereich, der Wirkstoff ohne das Zersetzungsprodukt verdampft, wurde der Temperaturgradient abgeflacht (mit Methode 6a; s. Kapitel 3.3.2.4 Seite 53). Der Wirkstoff wurde mit dem flacheren Temperaturgradienten erst mit Eintreten der Zersetzung bei ca. 280 °C detektiert. Des Weiteren

ist in Abb. 139 zu erkennen, dass trotz gleicher Konzentration der Lösung, der Wirkstoffpeak, der zeitgleich mit dem Zersetzungsprodukt detektiert wird, kleiner ist, als unter Verwendung des steileren Temperaturgradienten, während die Fläche des Zersetzungsproduktes etwa gleich blieb.

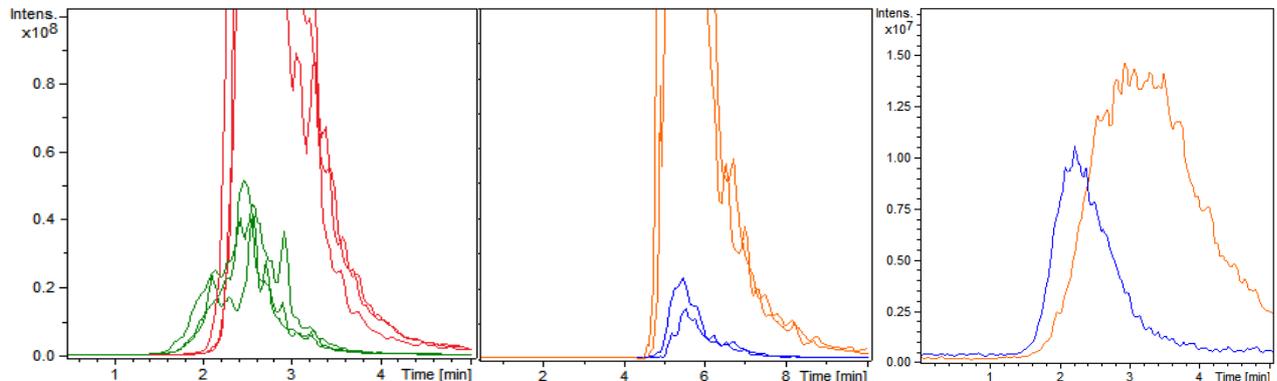


Abb. 139: DIP-APCI Chronogramme von Irbesartan. Links: Temperaturanstieg mit 2°/s ( $n=3$ ); Mitte: Temperaturanstieg mit 1°/s ( $n=2$ ); Rechts: DIP-EESI Chronogramm Temperaturanstieg mit 2,9°/s. Rot und orange  $m/z = 386$  entspricht dem intensivsten Zersetzungsprodukt von Irbesartan; grün und blau  $m/z = 429$  entspricht dem protonierten Irbesartan

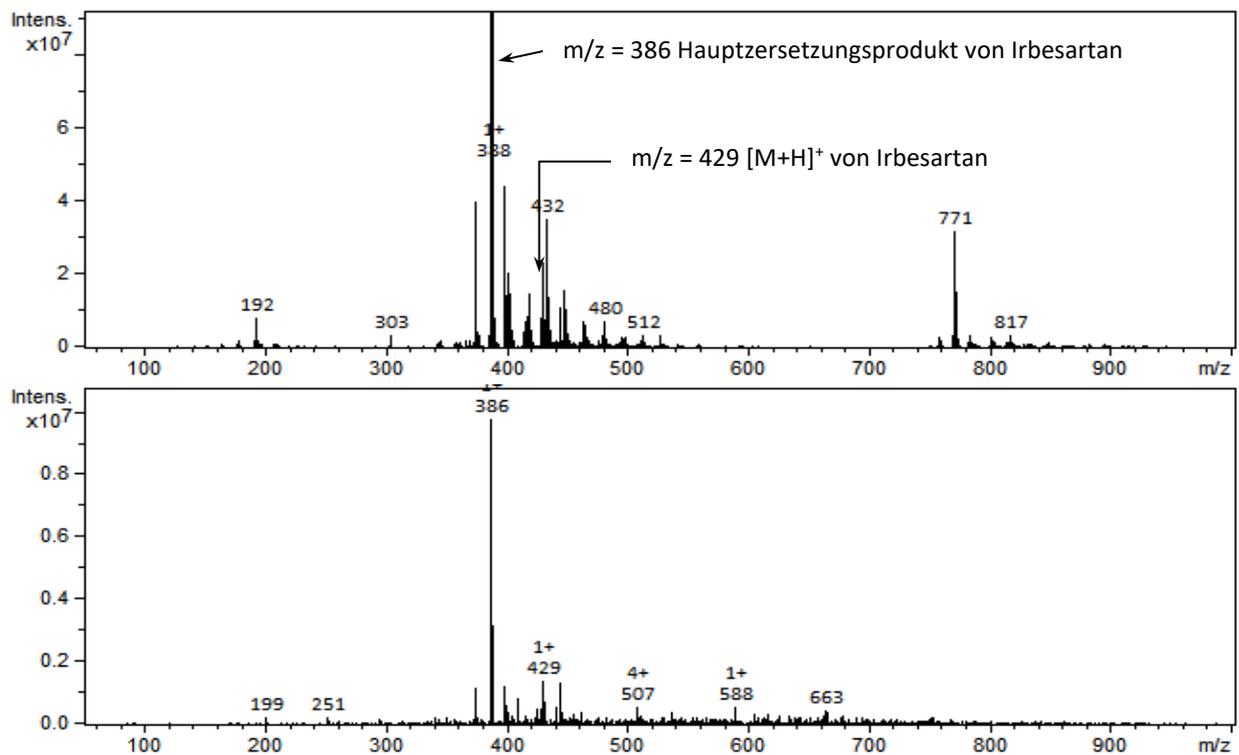


Abb. 140: Average Mass Spektren von Irbesartan-Tabletten nach Ionisierung mit DIP-APCI oben (vergrößert) und DIP-EESI unten.

Die Untersuchung mittels DIP-EESI zeigte das gleiche Bild. Auch hier wurde zunächst der Wirkstoff, gefolgt vom Zersetzungsprodukt detektiert (Abb. 139 rechts). Wie bereits bei anderen Medikamenten beobachtet, ist die Intensität des Wirkstoffes und des Zersetzungsproduktes nicht so hoch, wie bei den DIP-APCI

Messungen. Besonders das Zersetzungsprodukt  $m/z = 386$  wird mit DIP-EESI mit einer 100mal niedrigeren Intensität beobachtet, während der nicht zersetzte Wirkstoff nur etwa halb so intensiv ist. Dies ist auch in den Spektren in Abb. 140 zu sehen. Neben dem Hauptzersetzungsprodukt  $m/z = 386$  ist in Abb. 140 erkennbar, dass sich bei der Ionisierung mit DIP-EESI weniger Zersetzungsprodukte bilden als mit DIP-APCI. Wenn die DIP-EESI weniger energiereich ist als die DIP-APCI, werden weniger Zersetzungsprodukte entstehen, was für die Verwendung der DIP-EESI spricht. Die Bildung thermischer Zersetzungsprodukte kann nicht unterbunden werden. Für Substanzen, die sich aufgrund der Energiezufuhr durch die Koronaentladung des APCI-Prozesses zersetzen, stellt die DIP-EESI eine Alternative dar.

Nach dem das beobachtete Hauptzersetzungsprodukt des Wirkstoffs mit  $m/z = 386$  bei den DIP-APCI Messungen, weitestgehend im Chronogramm abgeklungen war, wurden noch zwei weitere Massen detektiert, die nicht als bekannte Verunreinigungen in der Literatur beschrieben sind,  $m/z = 786$  und  $m/z = 801$  (Abb. 141). Aus  $m/z = 786$  konnten keine brauchbaren Fragmente erhalten werden.

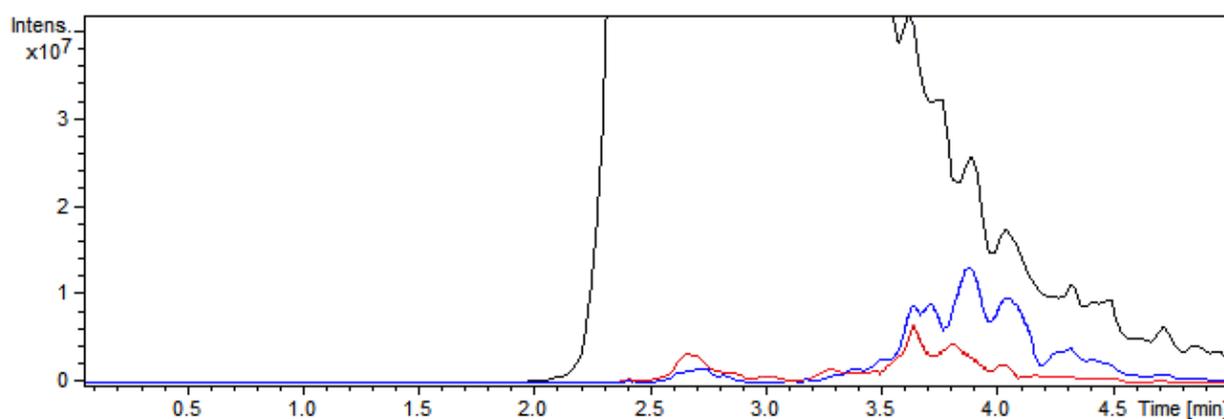


Abb. 141: Chronogramm der detektierten Zersetzungsprodukte  $m/z = 386$  (schwarz),  $m/z = 786$  (rot) und  $m/z = 801$  (blau)

Für  $m/z = 386$  und  $m/z = 801$  wurden  $MS^n$ -Untersuchungen erfolgreich durchgeführt und die entsprechenden Fragmentspektren sind in Abb. 142 und Abb. 143 dargestellt. Anhand der Fragmentspektren und ausgehend von der Struktur von Irbesartan konnten Strukturformeln rekonstruiert werden. Für  $m/z = 386$  ist die postulierte Substanz in Abb. 142 unten dargestellt.

Die für  $m/z = 386$  vorgeschlagene Struktur stimmte mit der postulierten Substanz von You et al. [215] überein. You et al. fanden durch ihre Experimente heraus, dass sich Irbesartan in drei Stufen zersetzt und sich in der ersten und zweiten Stufe vier Hauptprodukte bilden, mit den Massen 385, 400, 785 und 800 Da [215]. Auch bei den DIP-Untersuchungen konnten die entsprechenden  $m/z$ -Werte als Peaks im Chronogramm detektiert werden. Das Signal für  $m/z = 401$  wurde nicht weiter untersucht, da es im Fragmentspektrum von  $m/z = 447$  detektiert wurde und als Fragment einer bekannten Verunreinigung von  $m/z = 447$  zunächst identifiziert worden war.

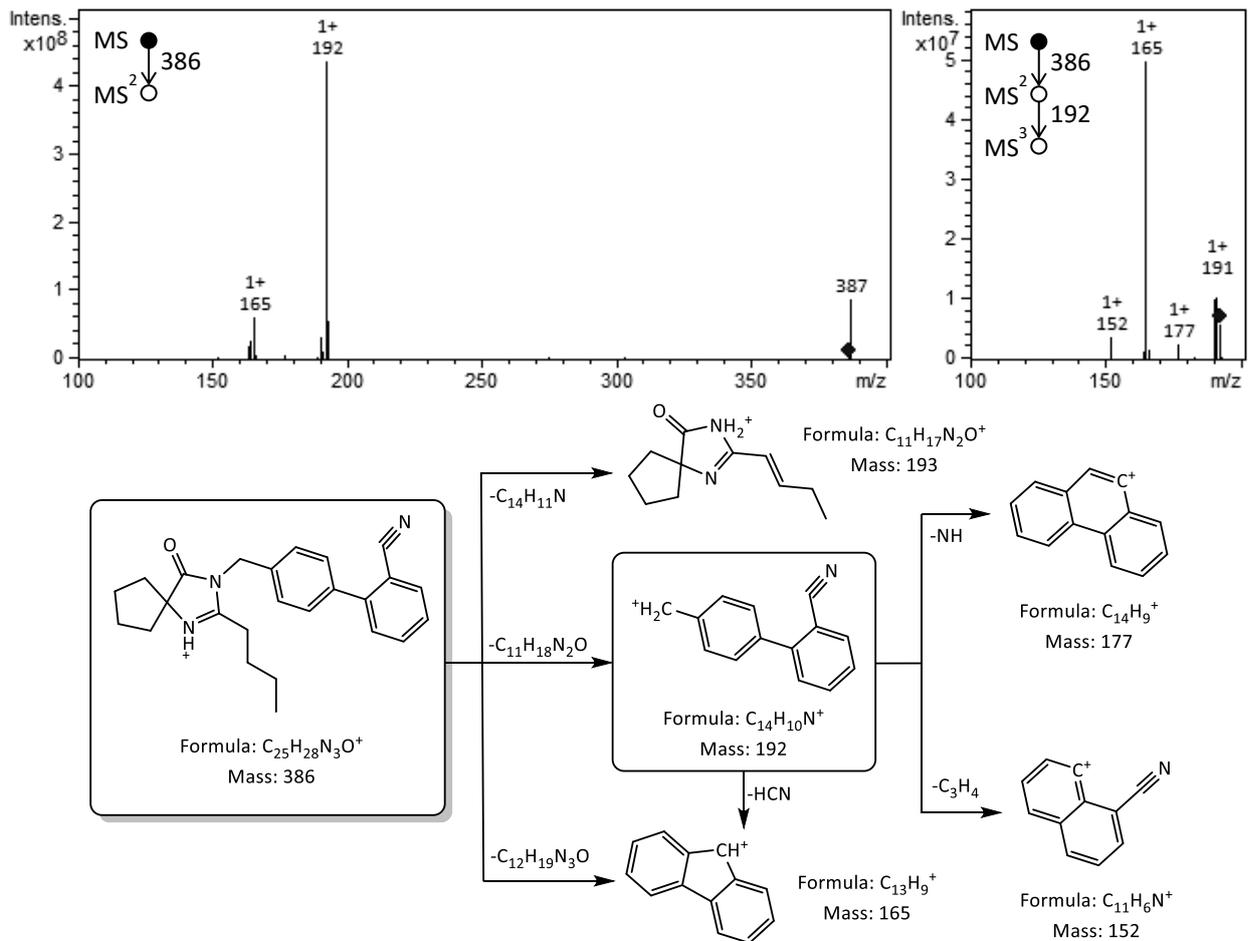


Abb. 142: Oben Fragmentspektren von  $m/z = 386$  wie sie nach Ionisierung mit DIP-APCI erhalten wurden. Unten Fragmentierungsweg der postulierten Struktur für  $m/z = 386$ .

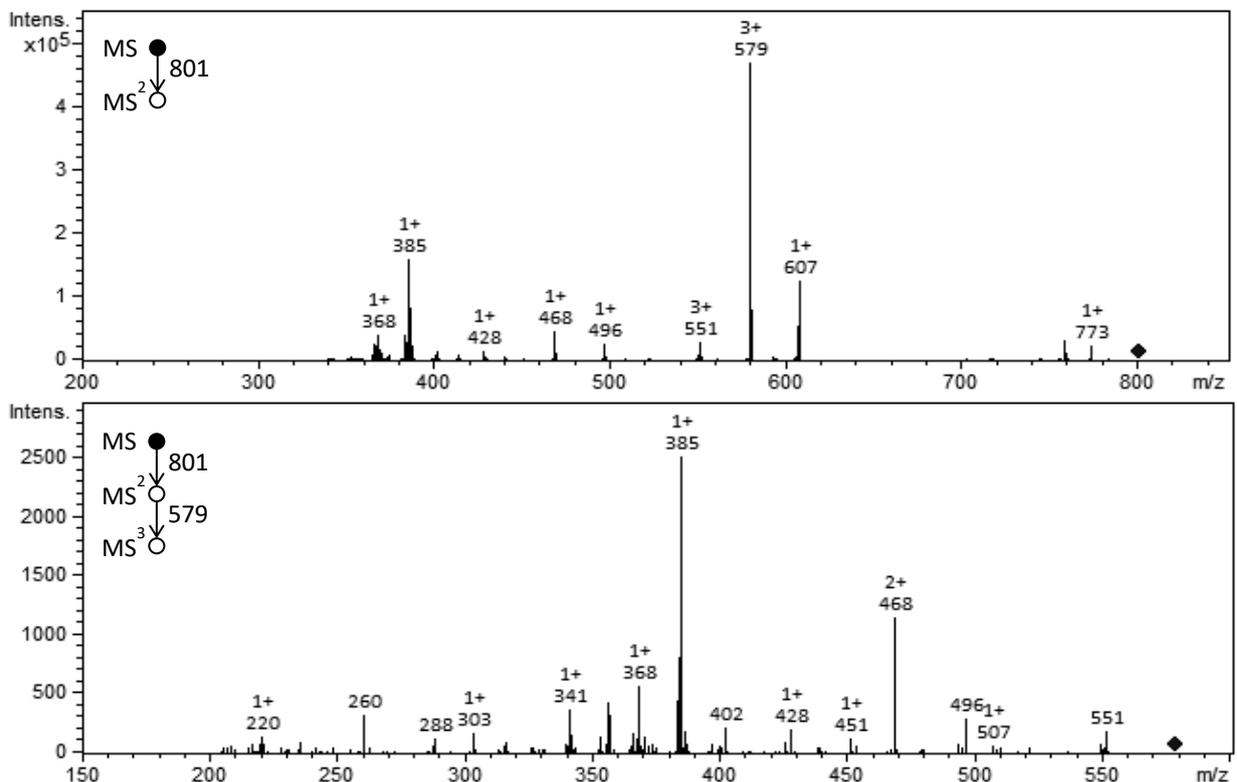


Abb. 143: Fragmentspektren von  $m/z = 801$  wie sie nach Ionisierung mit DIP-APCI erhalten wurden

Für die Substanzen mit 785 und 800 Da konnten You et al. keine Struktur bestimmen. Mit der DIP-APCI und MS<sup>3</sup>-Untersuchungen war es möglich für  $m/z = 801$  eine Struktur zu postulieren. Diese ist in Abb. 144 dargestellt, sowie die intensivsten Fragmente. Der vollständige Fragmentierungsweg ist in Anhang 6.2.3 in Abb. 186 und Abb. 187 dargestellt. Neben der gezeigten Struktur kamen weitere Strukturen mit  $m/z = 801$  in Betracht. Da ihnen aber nicht alle Fragmente zugeordnet werden konnten, konnten sie ausgeschlossen werden.

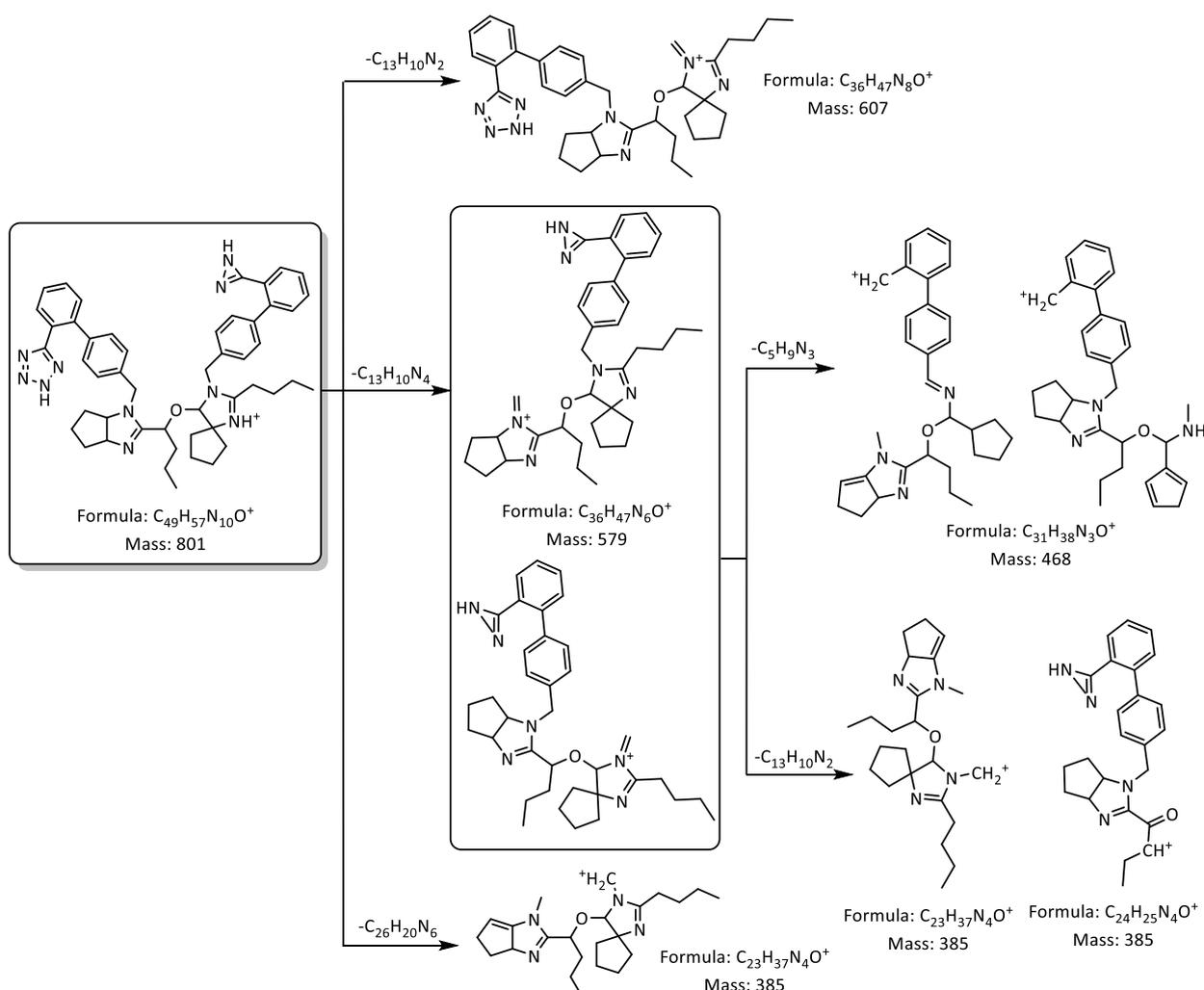


Abb. 144: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt Substanz mit  $m/z = 801$  (es sind nur die Strukturen der intensivsten Fragmente gezeigt, der vollständige Fragmentierungsweg ist im Anhang 6.2.3 dargestellt).

Da Irbesartan deutliche Zersetzungsprodukte zeigt, ist ein Screening nach unbekannt Verunreinigungen nicht möglich. Ein Screening nach den bekannten Verunreinigungen, die in Abb. 145 dargestellt sind, konnte durchgeführt werden, da die Massen der Verunreinigungen bekannt sind. Es konnte gezielt nach diesen Massen gesucht und sie anschließend fragmentiert werden, um zu überprüfen, ob es sich um die Verunreinigung oder ein Zersetzungsprodukt handelt. Da die Verunreinigungen zum Teil höhere Schmelzpunkte besitzen als der Wirkstoff, war es möglich, dass sie sich erst bei höheren Temperaturen zersetzen.

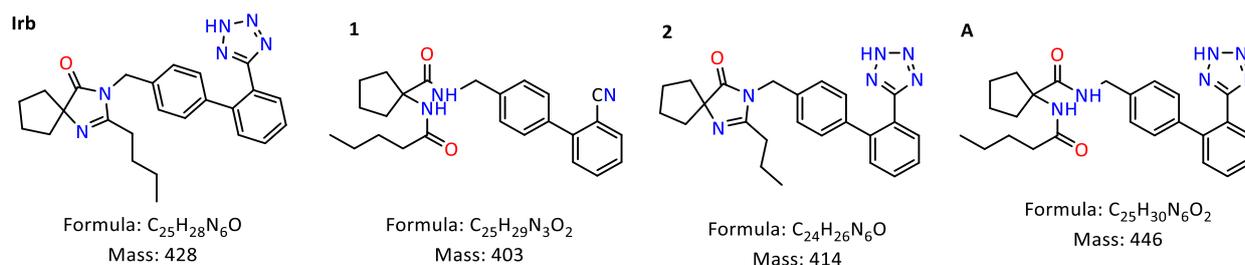


Abb. 145: Strukturformeln von Irbesartan (Irb, 2-Butyl-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]phenyl]methyl]-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on), sowie den drei untersuchten bekannten Verunreinigungen von Irbesartan (Verunreinigung 1, 2 beschrieben in [216–219] und Verunreinigung A beschrieben in Ph. Eur., die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.2 zusammengefasst)

Sowohl mittels DIP-APCI als auch mittels DIP-EESI konnten Fragmentspektren für  $m/z = 404$ ,  $415$ , und  $447$  erhalten werden. Aufgrund der geringen Intensität von  $m/z = 415$  und  $447$  mittels DIP-EESI waren die erhaltenen Fragmentspektren jedoch nicht vertrauenswürdig (Abb. 146). Die erhaltenen Fragmentensignale hatten z.T. eine niedrigere Intensität als die Hintergrundsignale, wodurch es leicht zu Fehlinterpretationen der Fragmentspektren kommen konnte. Daher wurde davon ausgegangen, dass die gesuchte Verunreinigung A (beschrieben in Ph. Eur.) und Verunreinigung 2 (Abb. 145) nicht in der Tablette enthalten sind.

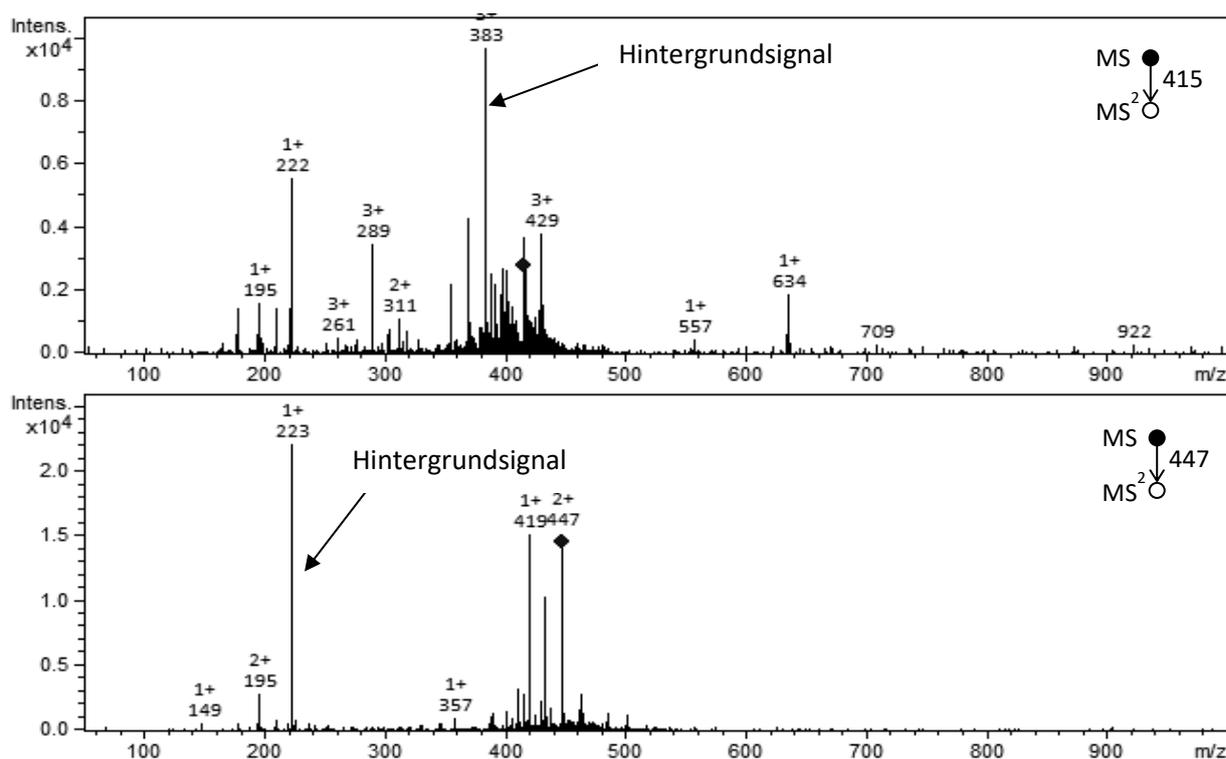


Abb. 146: Fragmentspektren von  $m/z = 415$  und  $447$ , wie sie nach der Ionisierung mit DIP-EESI detektiert wurden.

Die Spektren der DIP-EESI und die intensiveren Spektren der DIP-APCI für die beiden Substanzen unterscheiden sich stark, da die DIP-APCI-Spektren weniger durch Hintergrundsignale dominiert werden (Vergleiche Abb. 146 oben mit Abb. 147). Die Fragmente, die aus  $m/z = 447$ , ionisiert mit DIP-APCI, gewonnen werden konnten, waren ausreichend intensiv, um weitere Fragmentierungen durchzuführen. Die MS<sup>3</sup>- und

MS<sup>4</sup>-Spektren sind ebenfalls in Abb. 147 gezeigt. Aus den erhaltenen Fragmenten konnte aber weder für die Verunreinigung A noch für weitere in der Literatur [220] beschriebenen Verunreinigungen ein Fragmentierungsweg postuliert werden. Die Verunreinigung konnten, wie bei DIP-EESI nicht identifiziert werden und bestätigt die Vermutung, dass die Verunreinigungen A und 2 nicht in der Tablette enthalten sind.

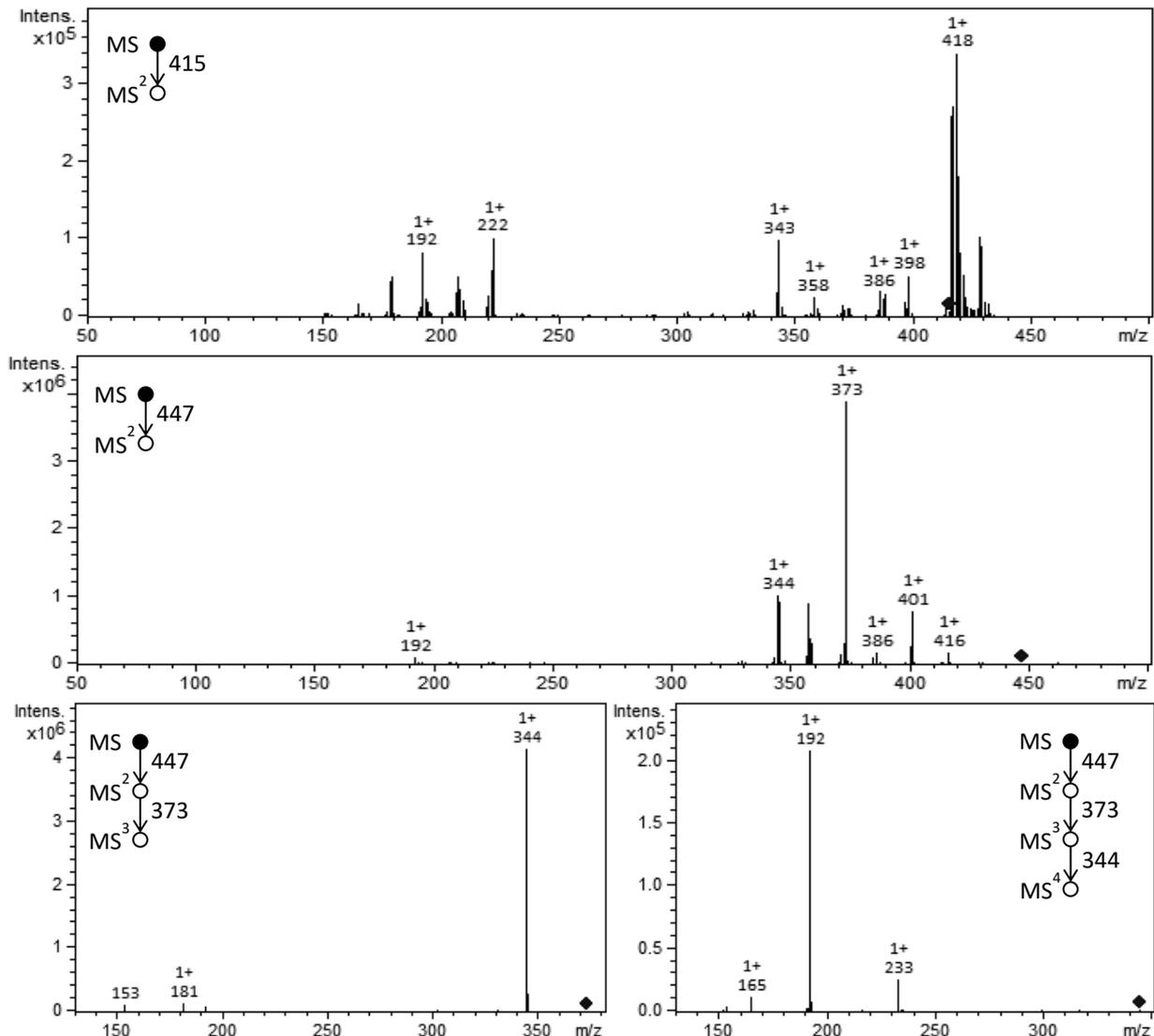


Abb. 147: Oben: Fragmentspektren von  $m/z = 415$ ; Mitte: Fragmentspektren von  $m/z = 447$ ; Unten: Fragmentspektren von  $m/z = 447$  jeweils nach Ionisierung mit DIP-APCI

Es ist wahrscheinlicher, dass es sich bei den beiden Substanzen, die mit DIP-APCI detektiert wurden, um Zersetzungsprodukte handelt, die während des Desorptions-/Ionisierungsprozesses entstehen. Hierfür spricht, dass auch bei den HPLC-ESI-MS Untersuchungen, bei der die Probe keiner thermischen Belastung ausgesetzt war, keine Hinweise auf diese beiden Substanzen gefunden wurden.

Entgegen den Ergebnissen mit DIP-EESI und DIP-APCI konnten aber mit der HPLC-ESI-MS jeweils ein Peak für  $m/z = 415$  und  $447$  detektiert werden, bei dem es sich um die beiden bekannten Verunreinigungen A und 2 handelt (Abb. 148). Mögliche Verunreinigungen eines temperaturlabilen Wirkstoffs lassen sich aufgrund der hohen Anzahl der Zersetzungsprodukte des Wirkstoffs nicht immer nachweisen.

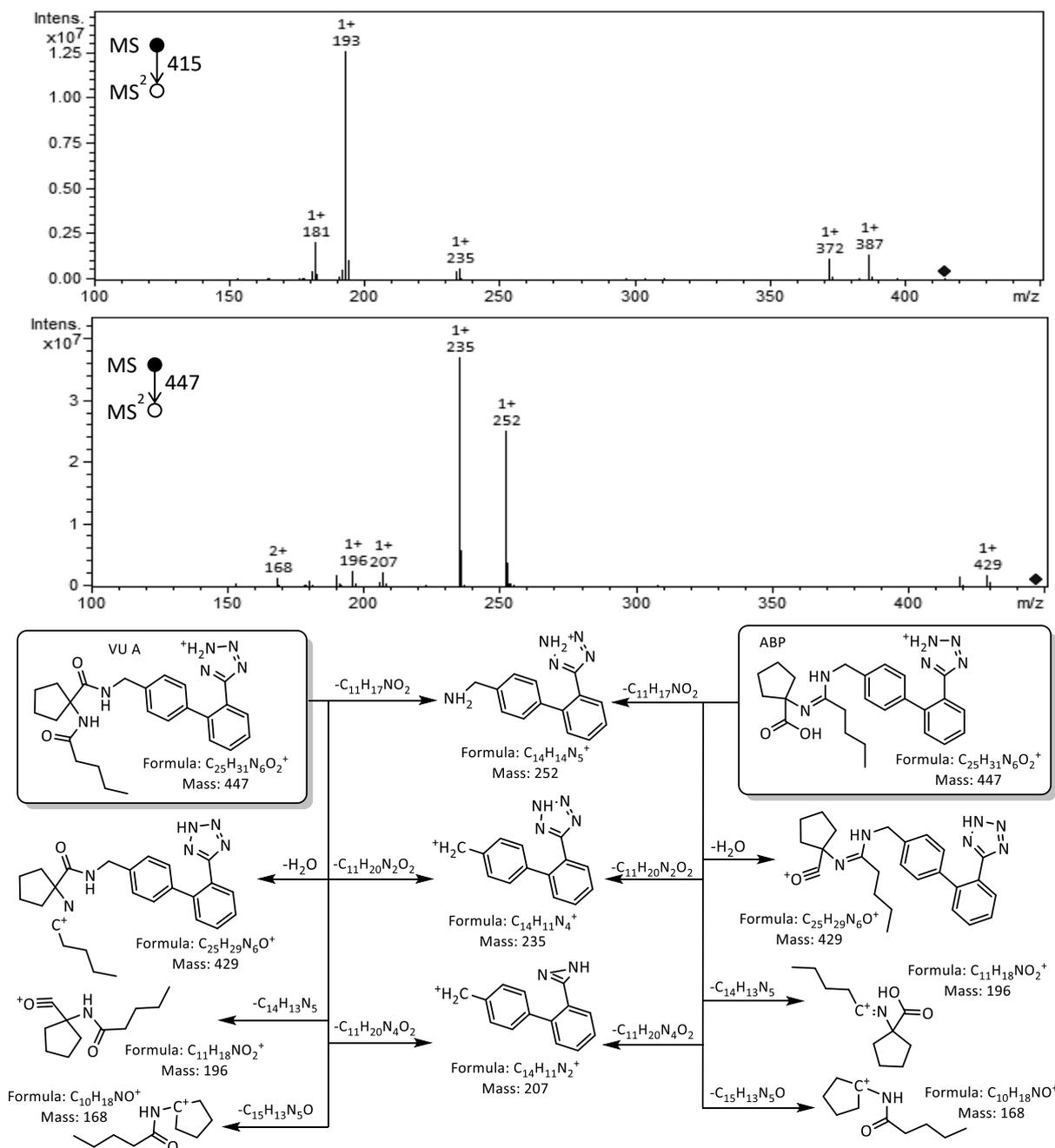


Abb. 148: Fragmentierung von  $m/z = 415$  (oben) und  $m/z = 447$  (Mitte) nach Analyse mit HPLC-ESI-MS. Die Fragmente für  $m/z = 447$  stimmen mit dem von Shah et al. [220] postuliertem Abbauprodukt (ABP) überein, die Fragmente können auch Verunreinigung A zugeordnet werden (unten).

Das Signal bei  $m/z = 404$ , das der protonierten Verunreinigung 1 entspricht, wurde mit DIP-EESI von den drei Verunreinigungen am intensivsten detektiert. Die Substanz konnte in ausreichender Menge mit DIP-EESI ionisiert werden, um  $MS^n$ -Untersuchungen durchzuführen. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 149 dargestellt. Mit Hilfe der detektierten Fragmente konnte ein Fragmentierungsweg für Verunreinigung 1 postuliert werden (Abb. 150). Auch mit DIP-APCI konnte ein Signal bei  $m/z = 404$  detektiert und fragmentiert werden (s. Anhang 6.2.3, Abb. 185). Es wurden die gleichen Fragmente wie mit der DIP-EESI erhalten. Ebenso konnte ein Peak für  $m/z = 404$  durch HPLC-ESI-MS Untersuchungen von Irbesartan detektiert werden. Die Substanz war jedoch zu gering konzentriert, um sie weiter zu fragmentieren.

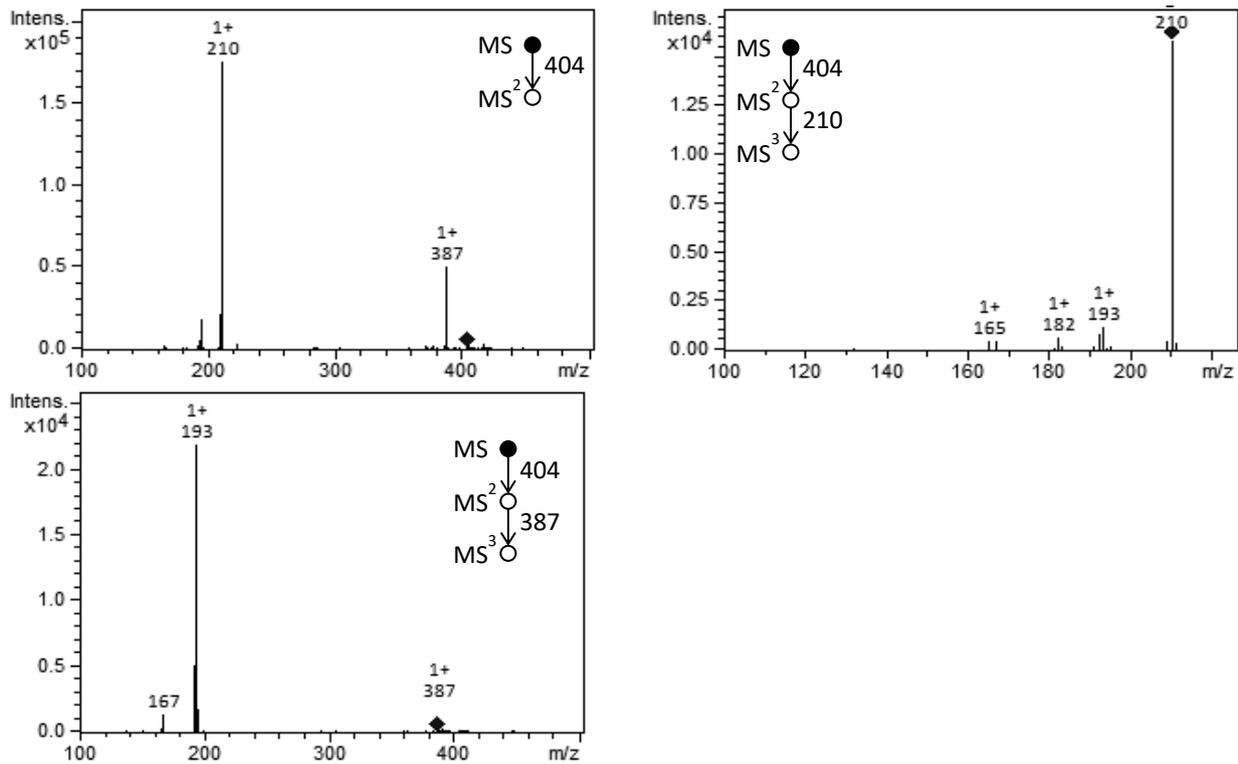


Abb. 149: Fragmentspektren von  $m/z = 404$  sowie die MS<sup>n</sup>-Spektren aus  $m/z = 404$ , wie sie nach der Ionisierung mit DIP-EESI detektiert wurden.

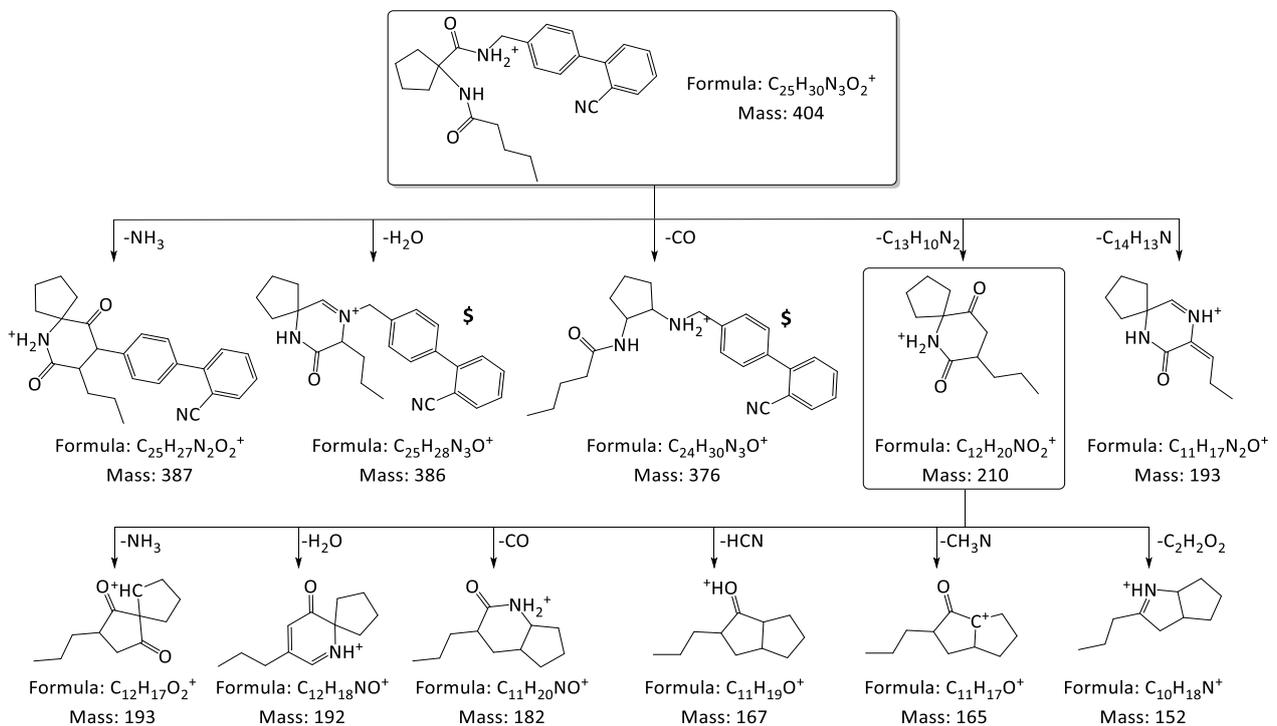


Abb. 150: Mögliche Fragmente der Verunreinigung 1, wie sie den Fragmentspektren, erzeugt mit DIP-EESI und DIP-APCI, zugeordnet werden konnten. Die mit \$ gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mit DIP-APCI detektiert.

## 5 Zusammenfassung/Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde das Einsatzgebiet der Direkt Inlet Probe um die ambiante Ionisationsmethode der DIP-EESI erweitert, so dass nun alle drei Ionisationsmethoden (ESI, APCI und APPI) genutzt werden können. Die entwickelte DIP-EESI-Ionenquelle wurde mit Hilfe der Multipropose-Quelle an ein Ion Trap-Massenspektrometer (Bruker Daltonik) gekoppelt. Für diese Kopplung wurden die Position des Sprayers, die verschiedenen Gas- und Flüssigkeitsströme, die anliegende Spannung und die Länge der Sprayerkapillare des handelsüblichen ESI-Sprayers (Bruker Daltonik) optimiert. Durch den Einsatz der DIP-EESI ist es möglich auch Substanzen zu analysieren, die mit der DIP-APCI oder DIP-APPI nur schlecht oder gar nicht zugänglich sind. So ließen sich mit der DIP-EESI unter Verwendung von Reinsubstanzen, die sich gut mit der DIP-EESI ionisieren ließen, niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermitteln, als mit der DIP-APCI bzw. DIP-APPI. Das ESI-Spray erzeugte nur eine geringe Hintergrundbelastung, wodurch eine mit der DIP-APCI vergleichbare Basislinienhöhe beobachtet wurde. Die DIP-EESI ist mit einem Arbeitsbereich für die quantitative Analyse zwischen ca. 20 und 100 ng/μL als genauso leistungsstark einzuordnen, wie die DIP-APCI oder DIP-APPI. Auch im Vergleich mit verwandten Verfahren, die den gleichen Ionisationsmechanismus nutzen und in der Literatur [1–3] beschrieben wurden, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der geringeren Heizleistung der DIP-EESI gegenüber der DIP-APCI und DIP-APPI ließen sich bessere Ergebnisse für Substanzen mit niedrigen Siedepunkten erreichen.

Mit der DIP-EESI und der DIP-APCI ließ sich eine schnelle Methode entwickeln, mit der temperaturstabile Medikamente untersucht und ein Screening auf unbekannte Verunreinigungen durchgeführt werden konnte. Die genutzte Methode konnte mit geringen Modifikationen für Substanzen mit einem höheren Siedepunkt auf alle untersuchten Arzneimittel angewendet werden. Auf eine Probenvorbereitung bzw. Verdünnung konnte nicht verzichtet werden, da selbst bei der kleinstmöglichen Einwaage der Wirkstoff noch nach mehrstündigem Ausheizen der Quelle nachgewiesen werden konnte.

Die quantitative Analyse von temperaturlabilen Substanzen wie Acetylsalicylsäure und das Screening auf Verunreinigungen dieser Substanzen ist mit der DIP-EESI nicht möglich. Allerdings können die thermischen Zersetzungsprodukte in situ nachgewiesen und strukturell aufgeklärt werden. Für Medikamente, deren Verdampfungs- und Zersetzungstemperatur weit genug auseinander liegen, wird nicht ausgeschlossen, dass sie durch Anpassen der DIP-EESI Methode untersucht werden können.

Mit der DIP-EESI wurden halbierte und für die patientenindividuelle Zweitverblisterung umverpackte Tabletten, die bei Tageslicht in einem durchsichtigen Kunststoffbehälter bis zu 3 Jahre lang gelagert wurden sowie original verpackte Tabletten auf Unterschiede untersucht. Für Clonazepam und Primidon wurde eine signifikante Abnahme der Wirkstoffkonzentration in den umverpackten Tabletten festgestellt. Für die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration der untersuchten Medikamente wurden mit der DIP-EESI relative Standardabweichungen von 1,2 % bis 9,4 % und der DIP-APCI von 1,0 % bis 16,7 % erhalten. Zum

Teil liegen die Werte bereits innerhalb der vom Arzneibuch geforderten Grenze von 4,2 %. Durch Automatisieren des Systems können die Schwankungen minimiert werden, wodurch eine arzneibuchkonforme Gehaltsbestimmung des Wirkstoffes möglich wird.

Darüber hinaus wurde ein Screening auf bekannte und unbekannte Verunreinigungen in den Tabletten durchgeführt. Durch Isolierung der Verunreinigung können je nach Medikament die im Arzneibuch geforderten Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen eingehalten werden. Viele der bekannten Verunreinigungen konnten mit DIP-EESI sowie mit DIP-APCI detektiert werden. Aufgrund des Ionisationsmechanismus wurden in den meisten Fällen die bekannten Verunreinigungen mit der DIP-APCI besser ionisiert, als mit der DIP-EESI. Erwartungsgemäß wurden mit der DIP-EESI die unpolaren Hilfsstoffe wie Stärke, Stearat oder Povidon gar nicht oder nur in geringen Maße ionisiert, wodurch eine Störung dieser Stoffe minimiert und ein Screening auf unbekannte Verunreinigungen sowie die Identifizierung bekannter Verunreinigungen ermöglicht wurde. In diesem Fall wurden die Verunreinigungen besser mit der DIP-EESI detektiert. Eine Identifizierung über MS<sup>n</sup>-Untersuchungen war mit beiden Ionisationsmethoden bei ausreichend hoher Konzentration der ionisierten Verunreinigungen möglich. Bei der Untersuchung von unbekanntem Substanzen mit der DIP-EESI konnten mit Hilfe des Temperaturgradienten der DIP die Substanzen mit gleicher Masse soweit getrennt werden, dass sie einzeln voneinander fragmentiert und untersucht werden konnten. Hier konnte z.T. eine ausreichende Menge an Fragmenten erzeugt werden, um eine Struktur zu postulieren. Andere sich überlagernde Verunreinigungen, auch mit dem Wirkstoff, konnten nicht oder nur unzureichend getrennt werden. Eine Identifizierung dieser Substanzen war z.T. möglich, wenn das Fragmentierungsmuster bekannt war, oder gezielt die Verunreinigung oder ein bekanntes Fragment der Verunreinigung fragmentiert werden konnte. In anderen Situationen könnte die Kopplung an ein MS mit besserer Auflösung die Identifizierung der Verunreinigungen erleichtern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob die beobachteten Verunreinigungen in der Tablette selbst vorlagen, oder ob sie durch thermische Reaktionen bei der Untersuchung entstanden sind. Dadurch könnten Abbauprodukte fälschlicherweise als Wirkstofffragmente identifiziert werden. Diese Substanzen können nur vom Wirkstoff unterschieden werden, wenn sich die EICs des Wirkstoffs und der potentiellen Verunreinigung ausreichend unterscheiden.

Insgesamt konnte mit der DIP-EESI ein schnelles Verfahren zur Analyse von Arzneimitteln entwickelt und das Potential der Methode gezeigt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Namensverzeichnis der Verunreinigungen

#### 6.1.1 Amlodipin

Verunreinigung A	3-Ethyl-5-methyl-4-(2-chlorophenyl)-2-[2-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-2-isoindol-yl)-ethoxymethyl]-6-methyl-1,4-dihydro-3,5-pyridindicarboxylat
Verunreinigung B	5-Ethyl-3-methyl-4-(2-chlorophenyl)-2-methyl-6-[2-(2-methylcarbamoylphenyl-carboxamido)-ethoxymethyl]-1,4-dihydro-3,5-pyridindicarboxylat
Verunreinigung C	3-Ethyl-5-methyl-(4RS)-2,6-bis[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat
Verunreinigung D	3-Ethyl-5-methyl-2-[(2-aminoethoxy)-methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat
Verunreinigung E	Diethyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydro-3,5-Pyridindicarboxylat
Verunreinigung F	Dimethyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydro-3,5-pyridindicarboxylat
Verunreinigung G	3-Methyl-5-methyl-4-(2-chlorophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat
Verunreinigung H	3-Ethyl-5-methyl-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-2-[2-[(2-carboxybenzoyl)-aminoethoxy]]methyl]-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat

#### 6.1.2 Irbesartan

Verunreinigung A	2-Butyl-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]phenyl]methyl]-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on
Verunreinigung 1	N-((2'-cyanobiphenyl-4-yl)methyl)-1-pentanamidocyclopentancarboxamid [216–219]
Verunreinigung 2	Demethyl Irbesartan; 3-((2'-(1H-Tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-2-propyl-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on [218, 219]

**6.1.3 Metoprolol**

Verunreinigung A	(2 <i>RS</i> )-1-(Ethylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol
Verunreinigung B	4-(2-Methoxyethyl)phenol
Verunreinigung C	4-[(2 <i>RS</i> )-2-Hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]benzaldehyd
Verunreinigung D	(2 <i>RS</i> )-3-[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]propan-1,2-diol
Verunreinigung E	(2 <i>RS</i> )-1-[2-(2-Methoxyethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]propan-2-ol
Verunreinigung F	(2 <i>RS</i> )-1-[(1-Methylethyl)amino]-3-phenoxypropan-2-ol
Verunreinigung G	2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol
Verunreinigung H	(2 <i>RS</i> )-1-[4-(2-Hydroxyethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]propan-2-ol
Verunreinigung J	1-[2-Hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol
Verunreinigung M	1,3-Bis[(1-methylethyl)amino]propan-2-ol
Verunreinigung N	(2 <i>RS</i> )-3-[(1-Methylethyl)amino]propan-1,2-diol
Verunreinigung O	1,1'-[(1-Methylethyl)imino]bis[3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol]

**6.1.4 Midodrin**

Verunreinigung A	1-(2',5'-Dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol
------------------	--

**6.1.5 Mirtazapin**

Verunreinigung A	2-Oxo-(14 <i>bRS</i> )-2-methyl-1,2,3,4,10,14 <i>b</i> -hexahydropyrazino[2,1- <i>a</i> ]pyrido[2,3- <i>c</i> ][2]benzazepin
Verunreinigung B	[2-[(2 <i>RS</i> )-4-Methyl-2-phenylpiperazin-1-yl]pyridin-3-yl]methanol
Verunreinigung C	(14 <i>bRS</i> )-2-Methyl-3,4,10,14 <i>b</i> -tetrahydropyrazino[2,1- <i>a</i> ]pyrido[2,3- <i>c</i> ][2]benzazepin-1(2 <i>H</i> )-on
Verunreinigung D	(14 <i>bRS</i> )-1,2,3,4,10,14 <i>b</i> -Hexahydropyrazino[2,1- <i>a</i> ]pyrido[2,3- <i>c</i> ][2]benzazepin
Verunreinigung E	(2 <i>RS</i> )-4-Methyl-1-(3-methylpyridin-2-yl)-2-phenylpiperazin
Verunreinigung F	(14 <i>bRS</i> )-2-Methyl-1,3,4,14 <i>b</i> -tetrahydropyrazino[2,1- <i>a</i> ]pyrido[2,3- <i>c</i> ][2]benzazepin-10(2 <i>H</i> )-on

**6.1.6 Pipamperon**

Verunreinigung A	1'-[4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carboxylsäure
Verunreinigung B	1'-[4-(4-Hydroxyphenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carbamid
Verunreinigung C	<i>cis</i> -1'-Oxo-[1'-[4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carbamid
Verunreinigung D	1'-[4-(2-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carbamid
Verunreinigung E	4-Fluorobenzoessäure

**6.1.7 Piracetam**

Verunreinigung A	Pyrrolidin-2-on
Verunreinigung B	Methyl-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetat
Verunreinigung C	Ethyl-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetat
Verunreinigung D	2-Oxopyrrolidin-1-ylelessigsäure

**6.1.8 Primidon**

Verunreinigung A	2-Ethyl-2-phenylmalonamid
Verunreinigung B	Phenobarbital
Verunreinigung C	2-Phenylbutanamid
Verunreinigung D	2-Cyano-2-phenylbutanamid
Verunreinigung E	2-Ethyl-2-phenylelessigsäure
Verunreinigung F	5-Ethyl-5-phenyl-2-(1-phenylpropyl)dihydropyrimidin-4,6(1H,5H)-dion

**6.1.9 Trazodon**

Verunreinigung A	4-(3-chlorophenyl)-1-(3-(3-oxo-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-2(3H)-yl)propyl)piperazin-1-oxid
Verunreinigung B	2-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-on
Verunreinigung C	2-[3-[4-(4-Chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]-pyridin-3(2H)-on
Verunreinigung D	2-[3-[4-(3-bromophenyl)piperazin-1-yl]propyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-on
Verunreinigung E	2-(3-(4-(3-chloro-4-ethylphenyl)piperazin-1-yl)propyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-on
Verunreinigung F	1-(3-chlorophenyl)-4-(3-chloropropyl)piperazin
Verunreinigung G	1-(3-chlorophenyl)-4-(3-isobutoxypropyl)piperazin
Verunreinigung H	1,3-bis(4-(3-chlorophenyl)piperazin-1-yl)propan

## 6.2 Chronogramme, Spektren und mögliche Fragmente

### 6.2.1 Amlodipin

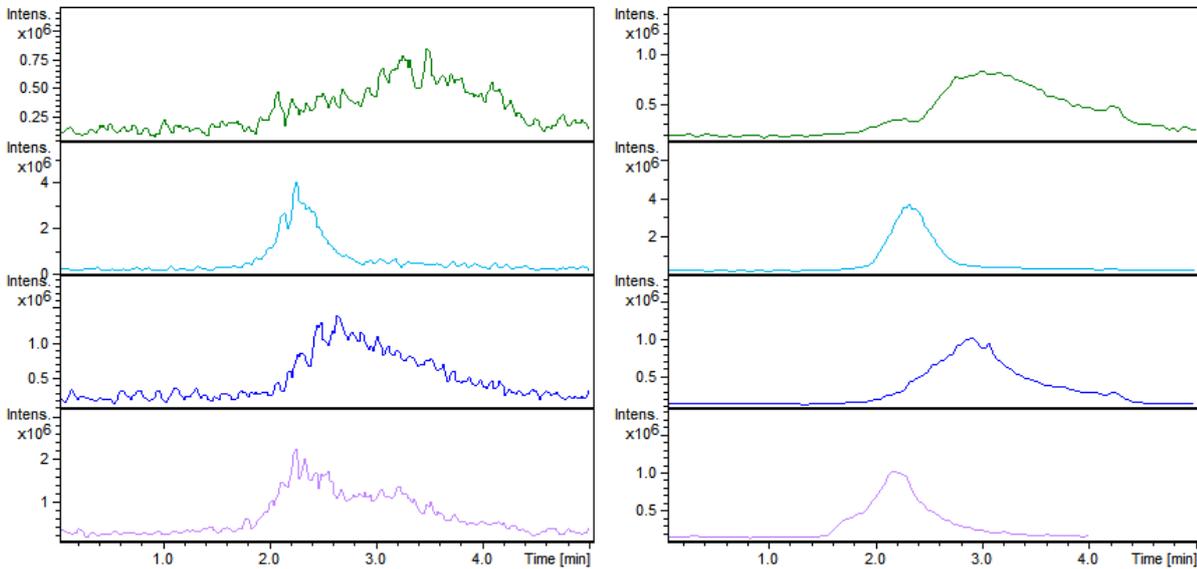


Abb. 151: EICs (links) und Chronogramme im SIM-Modus (rechts) der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-EESI-MS; grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ); blau: Verunreinigung E ( $m/z = 423$ ); violett Verunreinigung D ( $m/z = 407$ )

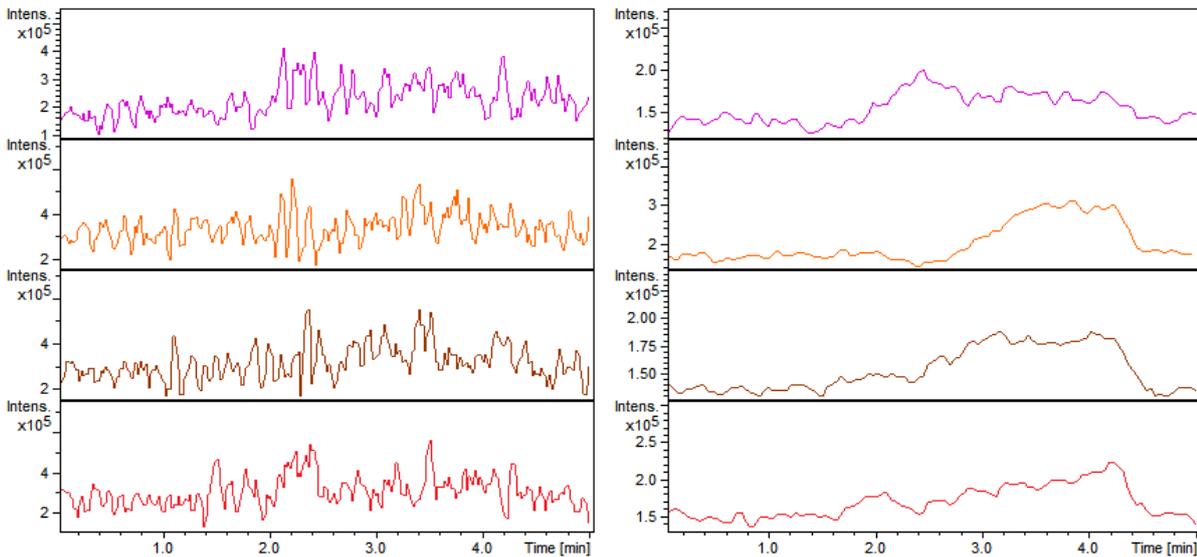


Abb. 152: EICs (links) und Chronogramme im SIM-Modus (rechts) der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-EESI-MS; pink Verunreinigung C ( $m/z = 468$ ); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ); braun: Verunreinigung H ( $m/z = 557$ ); rot: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ )

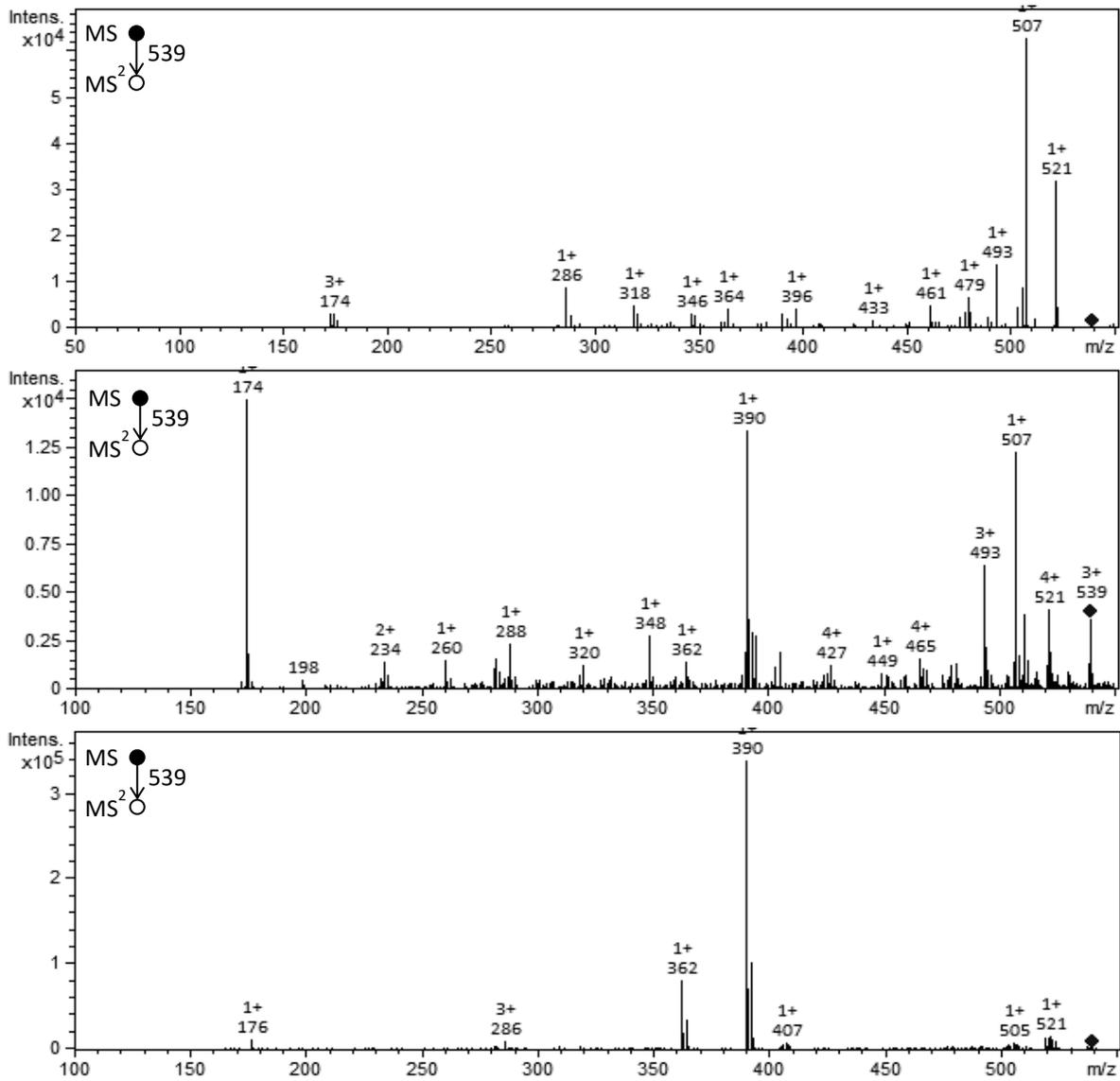


Abb. 153: Fragmentierung von  $m/z = 539$  potentielle Verunreinigung A. Ionisierung mit DIP-APCI (oben), DIP-EESI (Mitte) und HPLC-ESI-MS (unten, RT = 12,3 min)

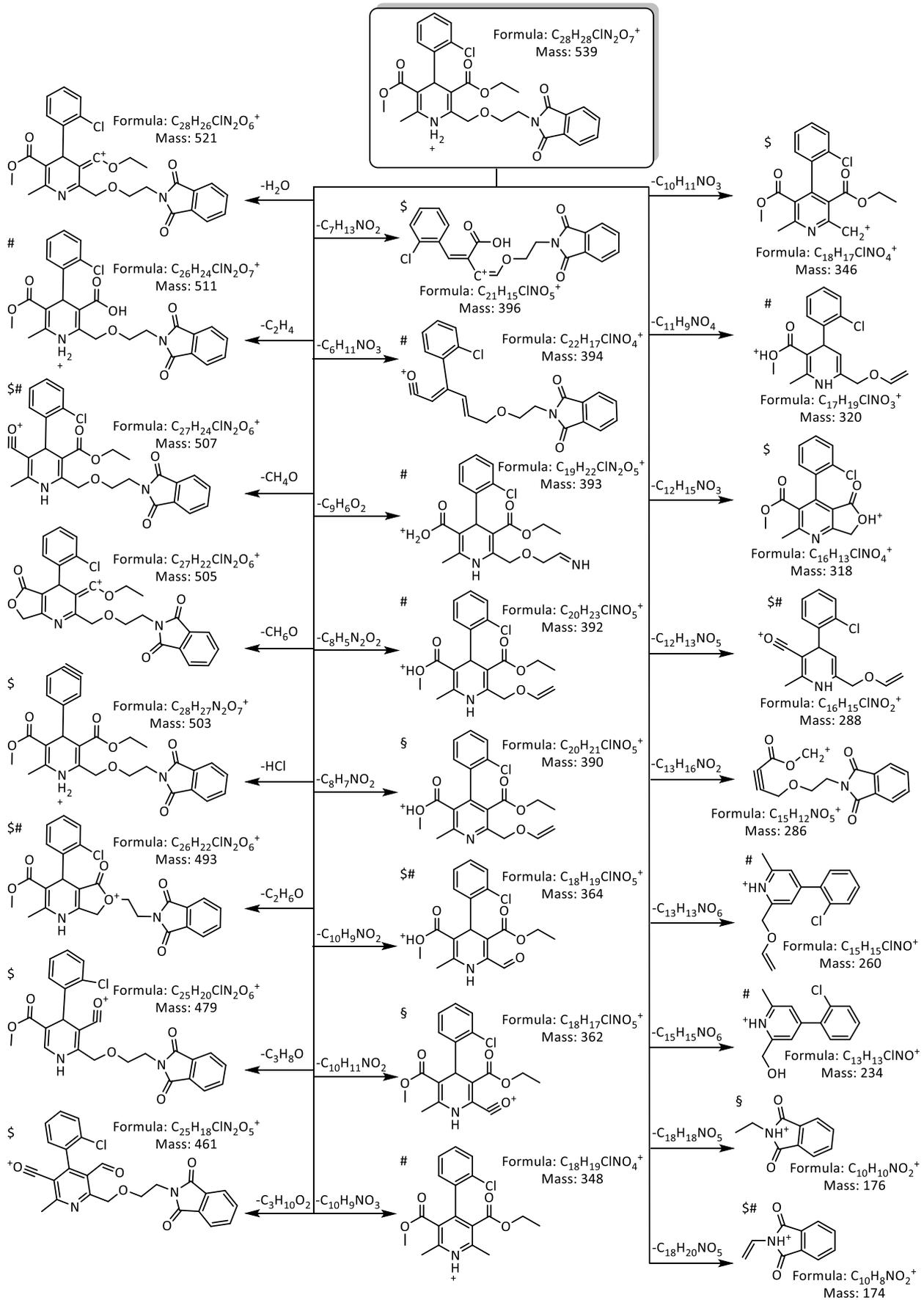


Abb. 154: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A (§ mit HPLC; \$ mit DIP-APCI; # mit DIP-EESI detektiert)

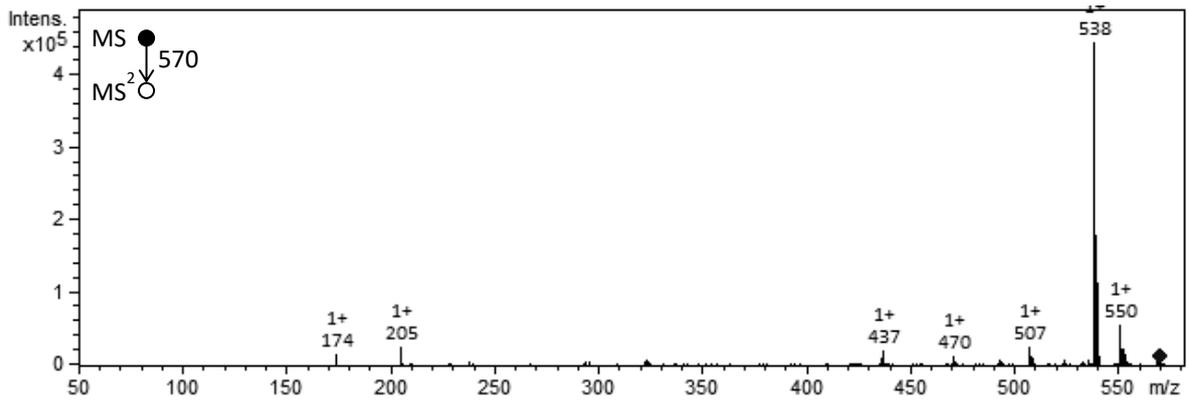


Abb. 155: Fragmentierung von  $m/z = 570$  potentielle Verunreinigung B. Ionisierung mit HPLC-ESI-MS (RT = 19,0 min)

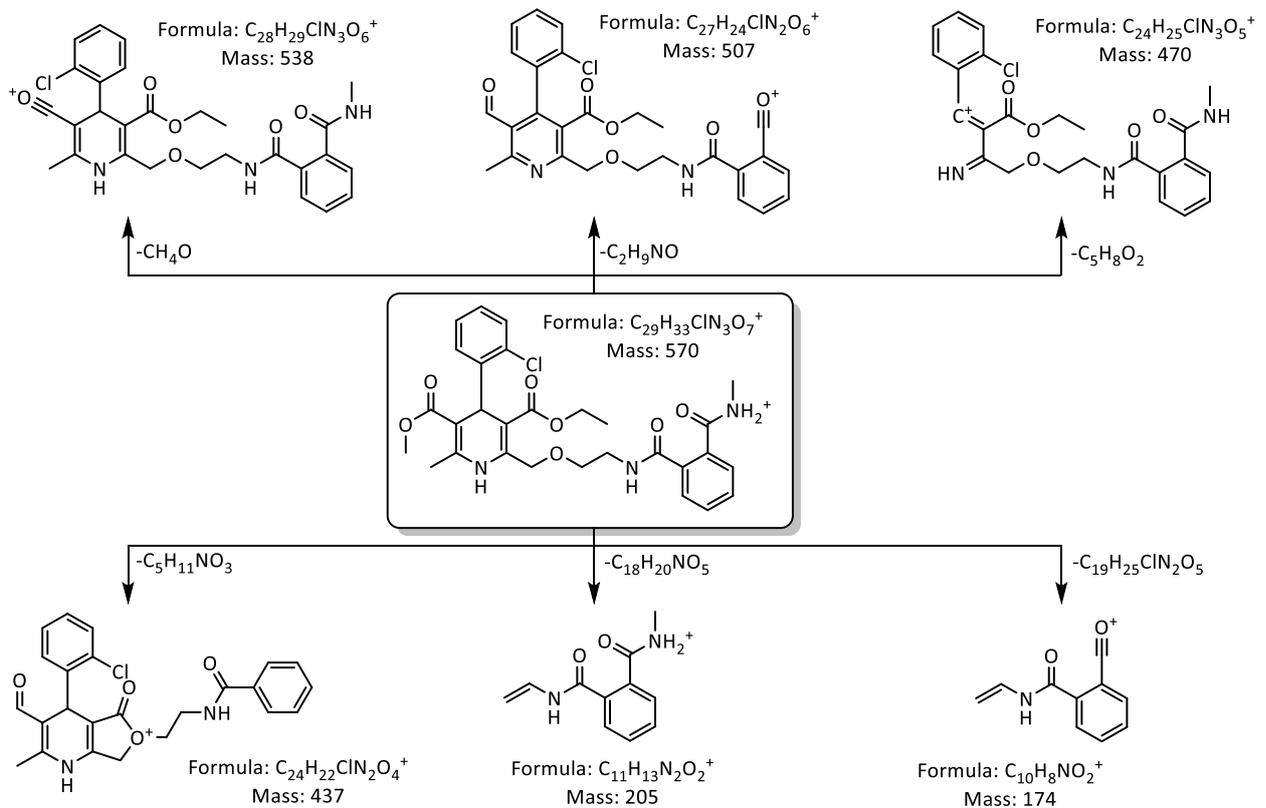


Abb. 156: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B

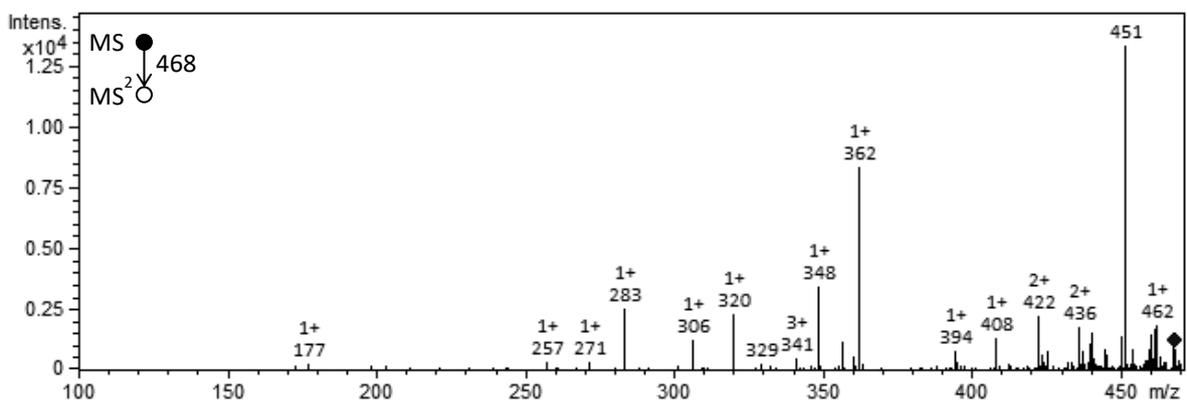


Abb. 157: Fragmentierung von  $m/z = 468$  potentielle Verunreinigung C. Ionisierung mit DIP-EESI

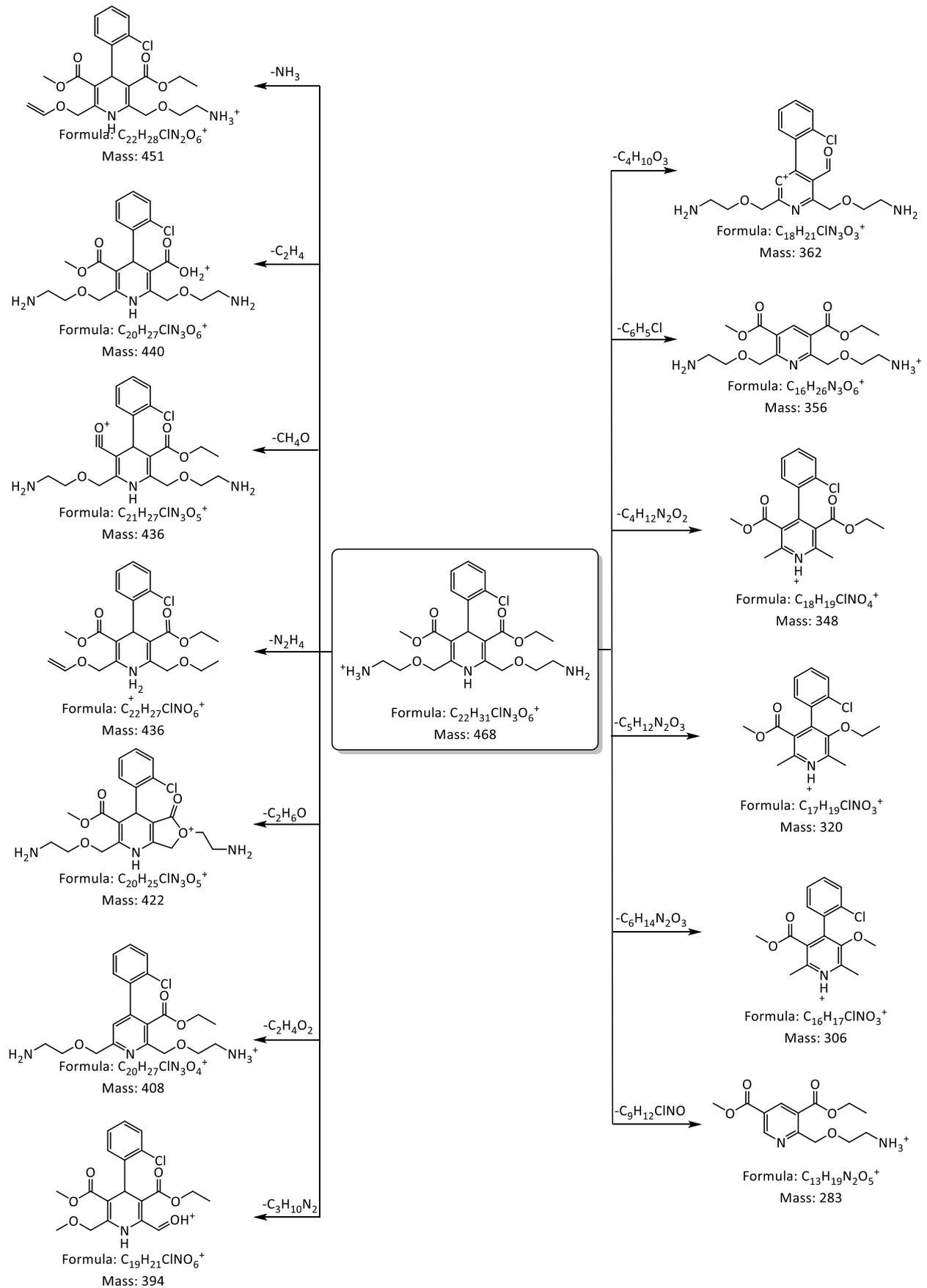


Abb. 158: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C

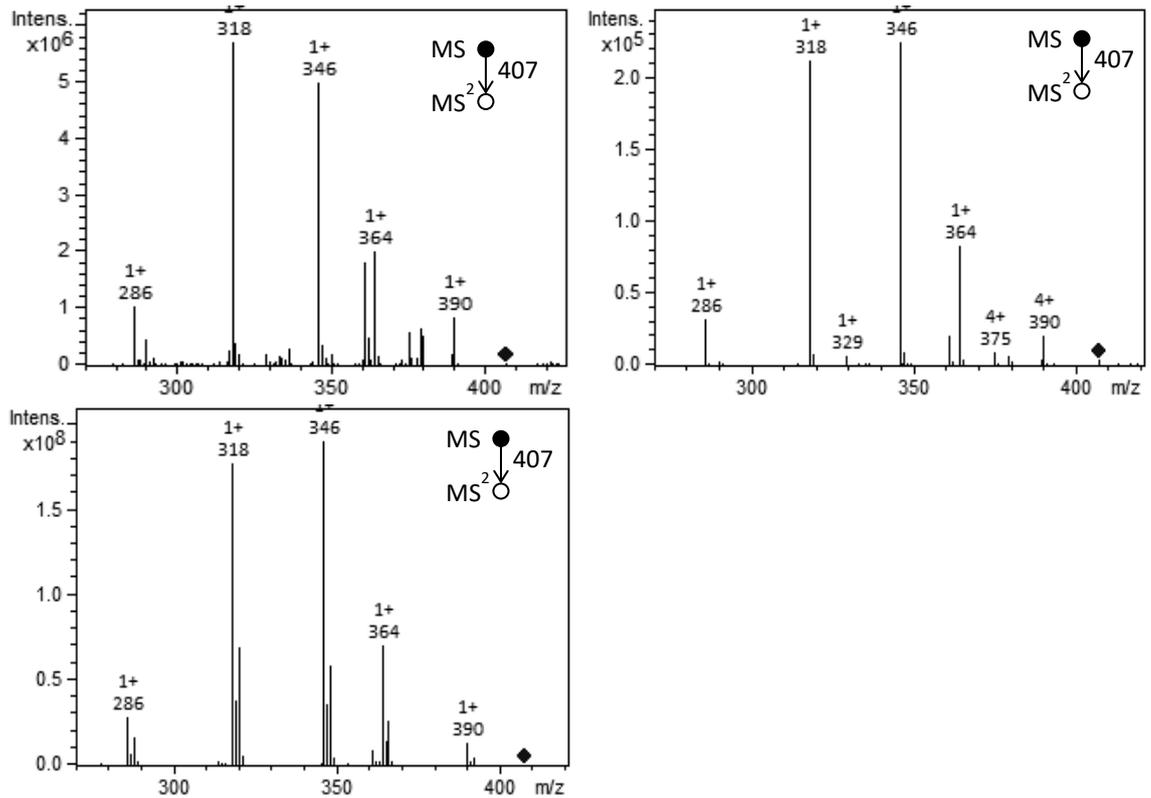


Abb. 159: Fragmentierung von  $m/z = 407$  potentielle Verunreinigung D. Ionisierung mit DIP-APCI (oben links), DIP-EESI (oben rechts) und HPLC-ESI-MS (unten, RT = 3,6 min)

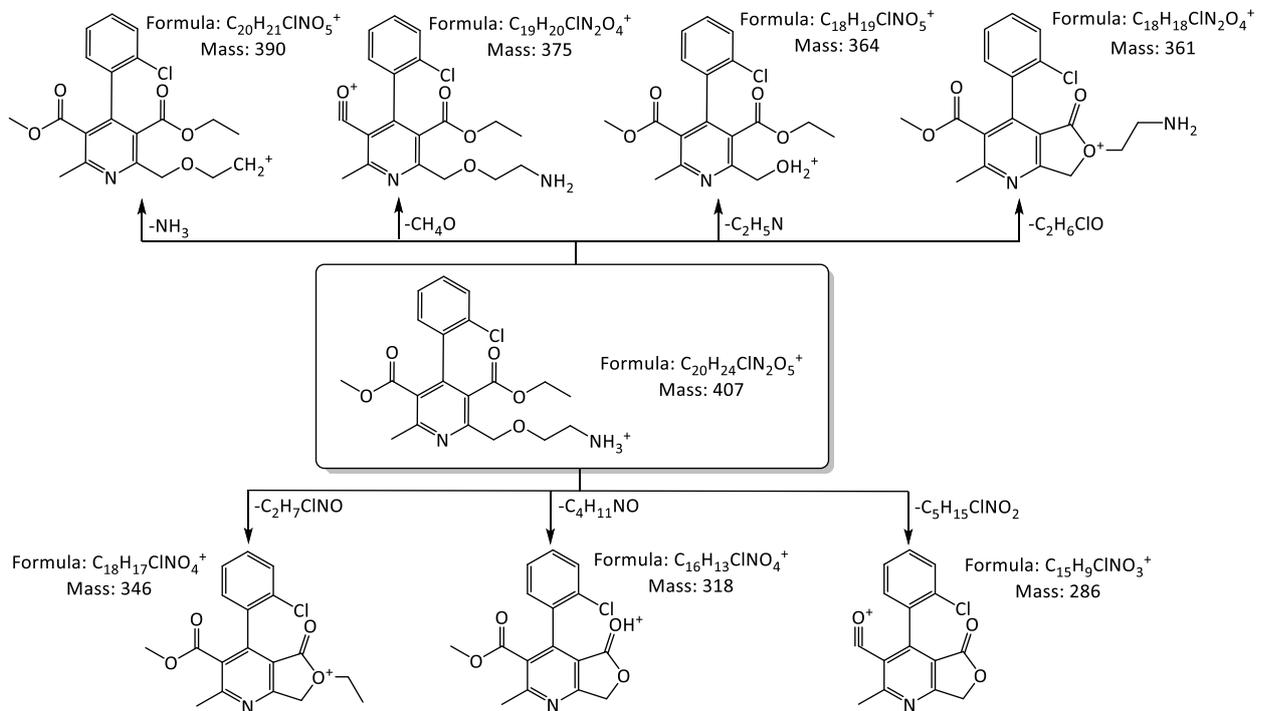


Abb. 160: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D

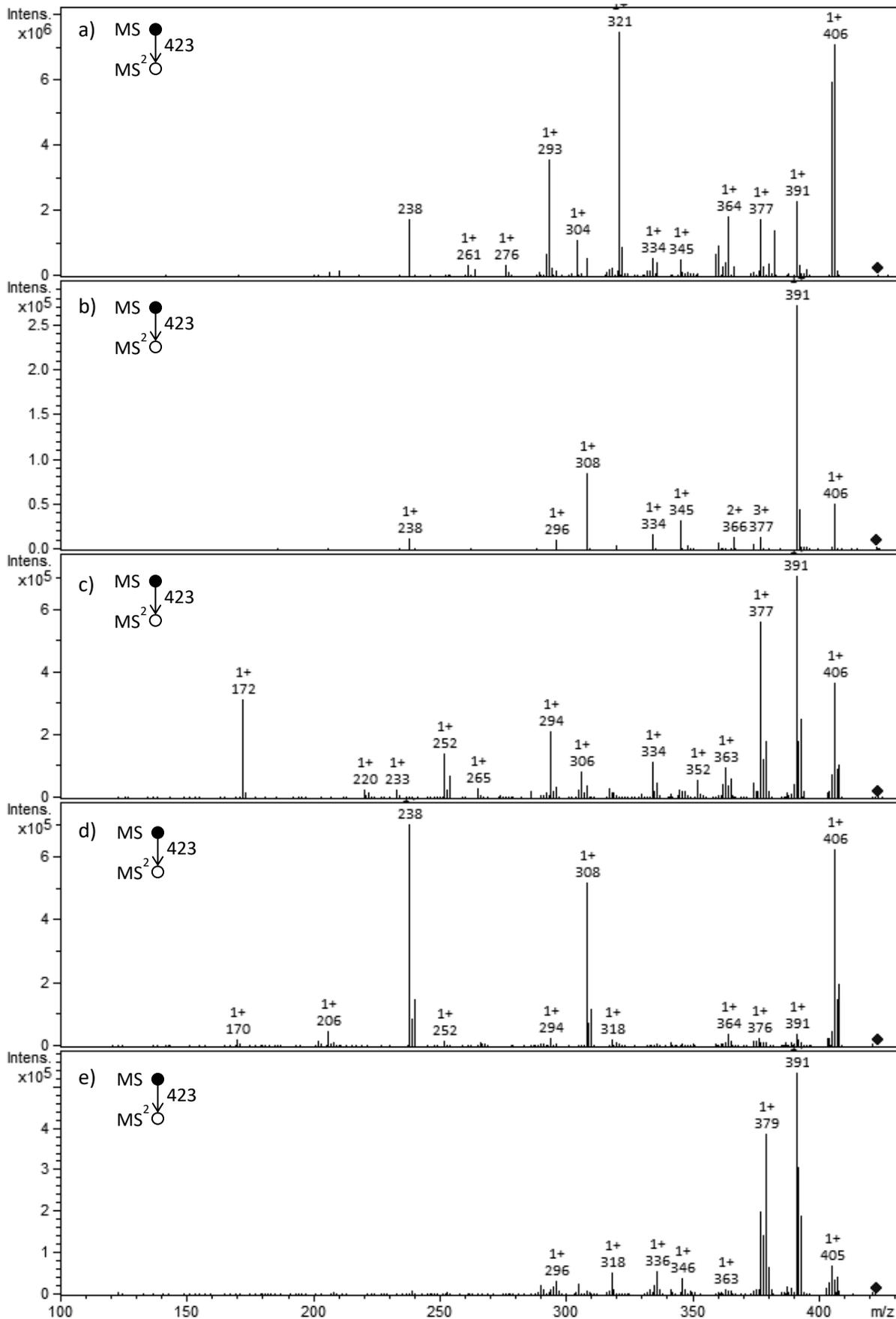


Abb. 161: Fragmentierung von  $m/z = 423$  potentielle Verunreinigung E. Ionisierung mit a) DIP-APCI, b) DIP-EESI und c – e) HPLC-ESI-MS (RT = 5,3 min, 9,0 min bzw. 10,6 min)

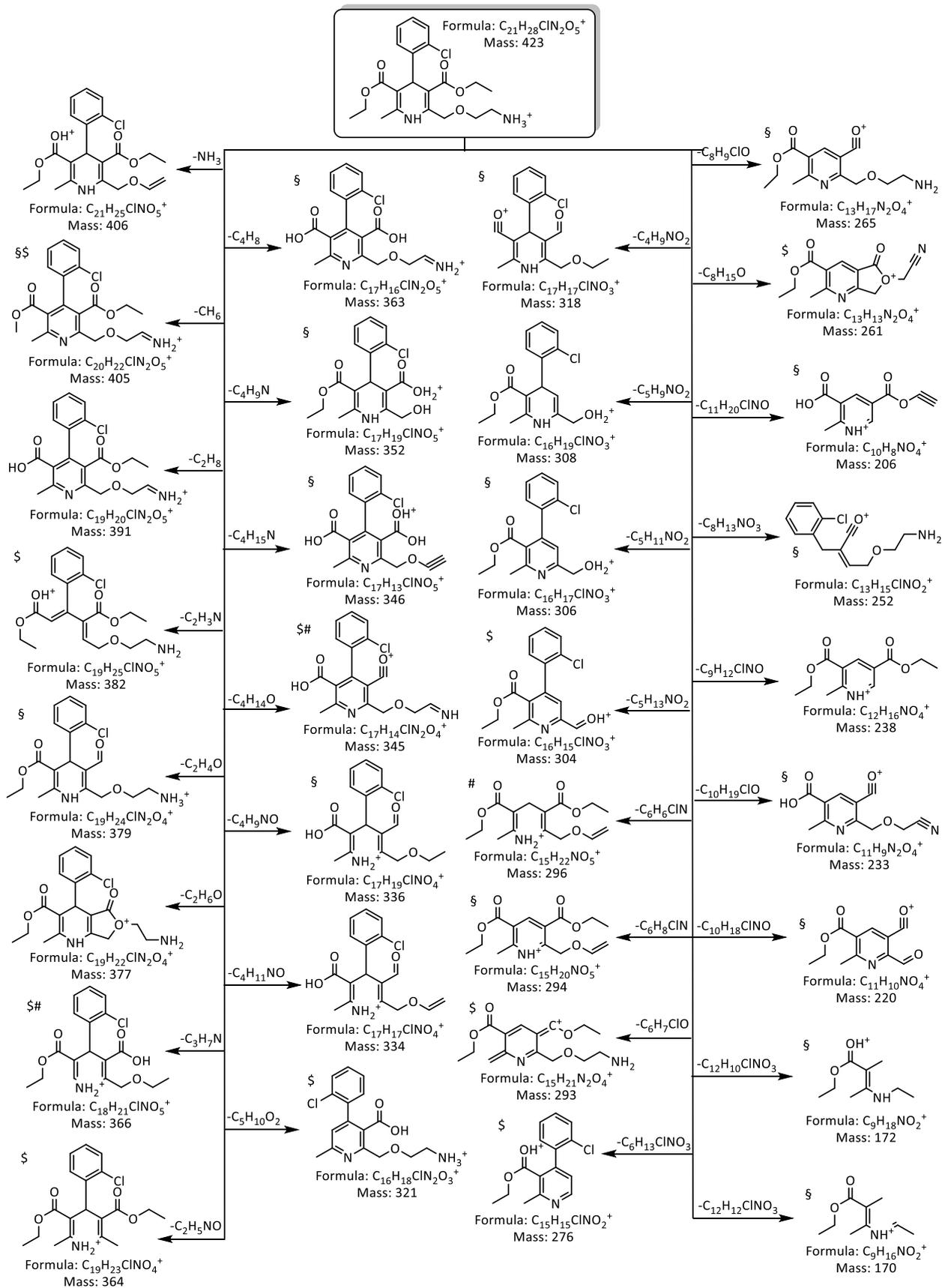


Abb. 162: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E (§ mit HPLC; §§ mit DIP-APCI; # mit DIP-EESI detektiert)

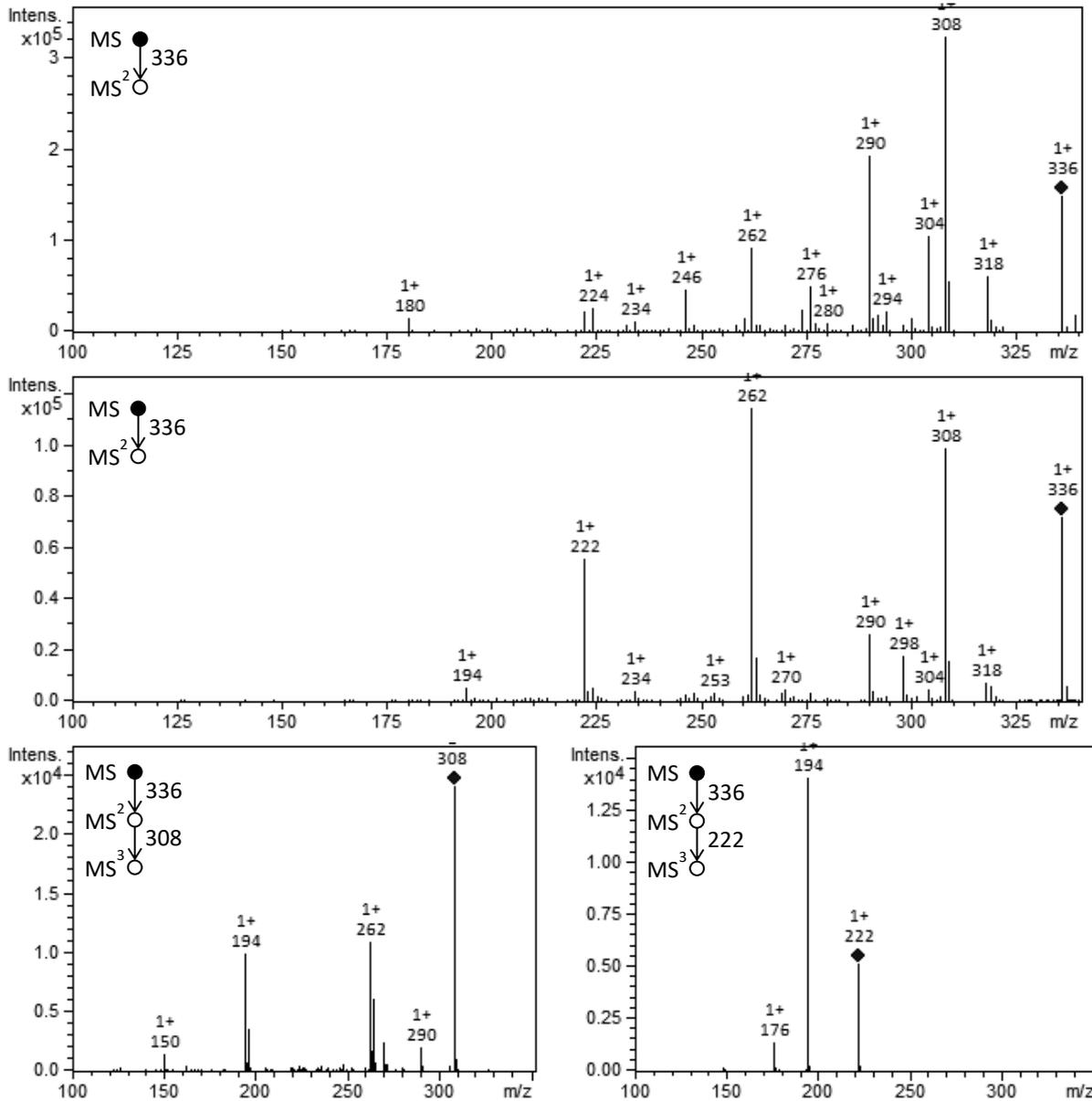


Abb. 163: Fragmentierung von  $m/z = 336$  potentielle Verunreinigung G. Ionisierung mit DIP-APCI (oben), DIP-EESI (Mitte) MS<sup>3</sup>-Fragmentierung mit DIP-EESI (unten)

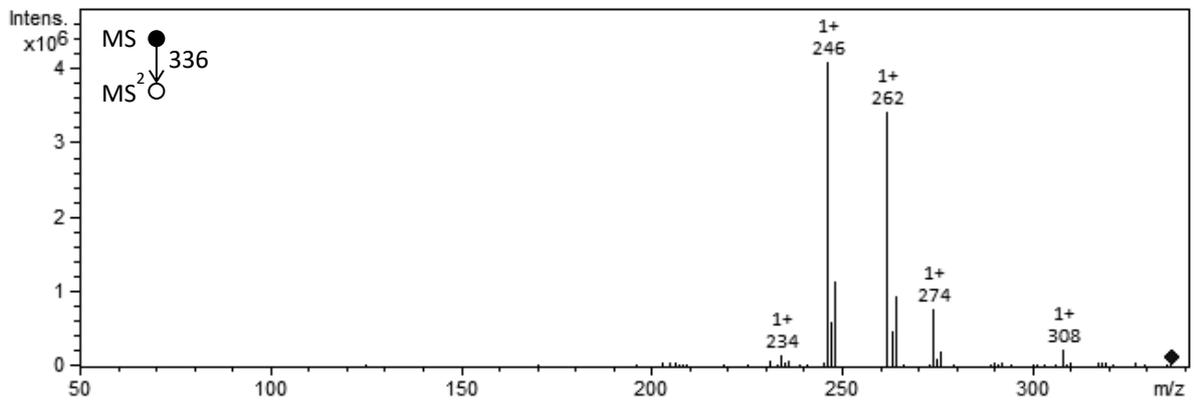


Abb. 164: Fragmentierung von  $m/z = 336$  potentielle Verunreinigung G nach Analyse mit HPLC-ESI-MS (RT = 4.3 min)

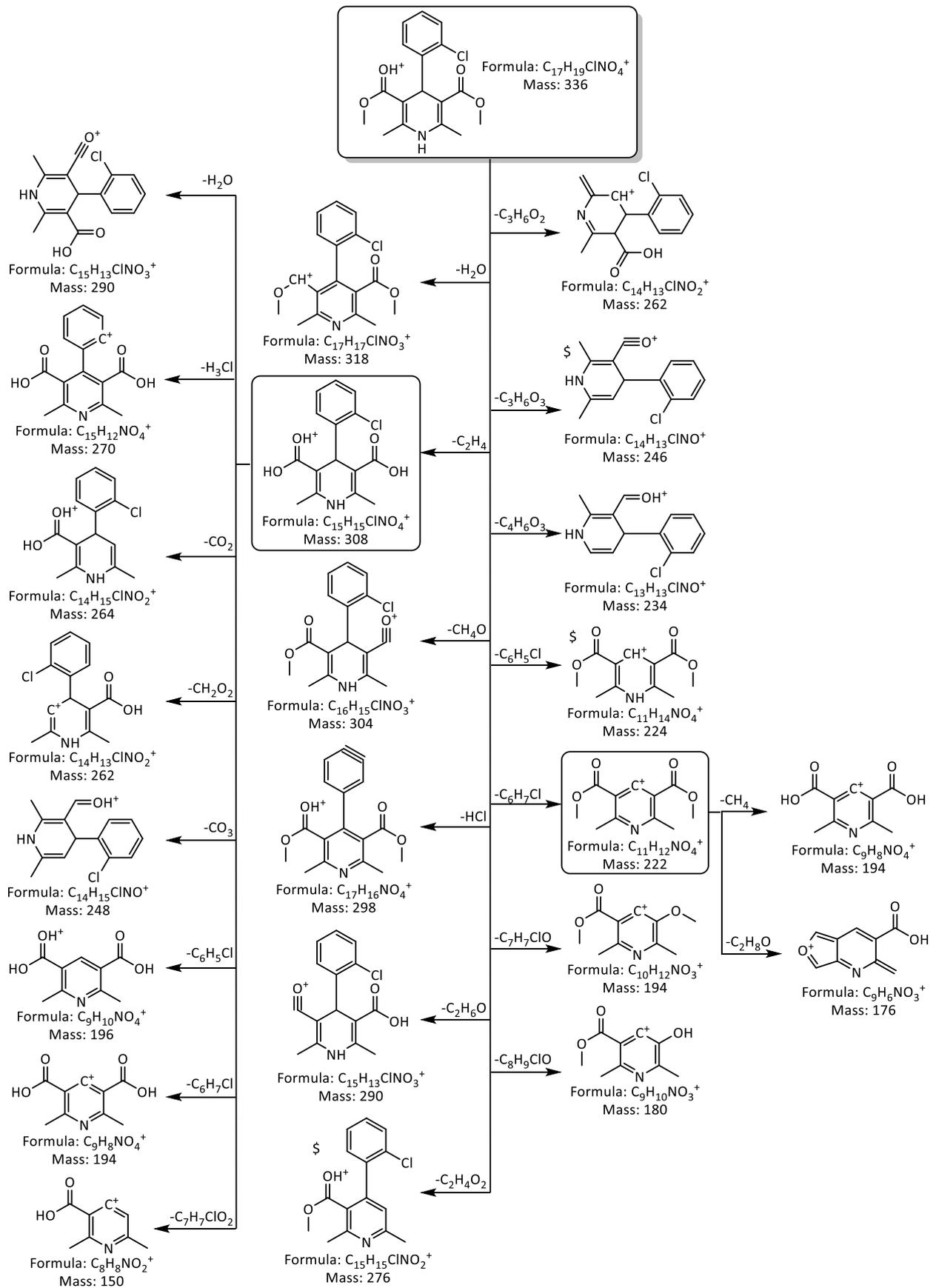


Abb. 165: Mögliche Fragmente der Verunreinigung G (§ nur mit DIP-APCI detektiert)

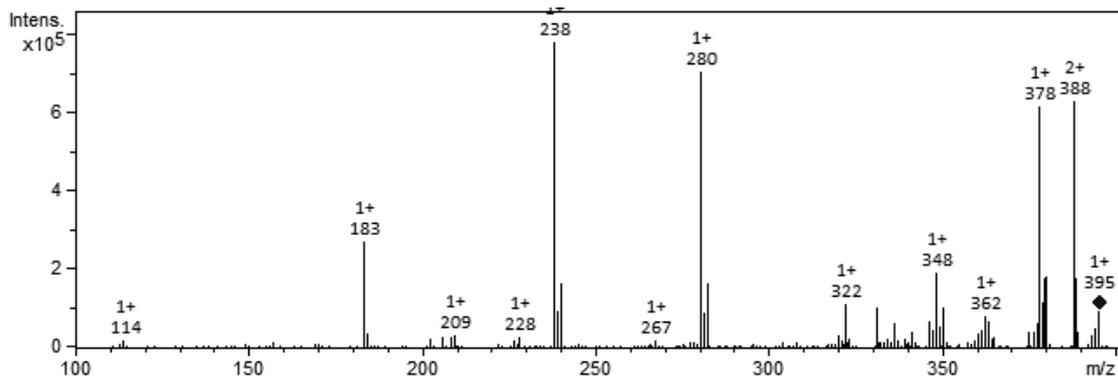


Abb. 166: Fragmentierung von  $m/z = 395$  potentielle Verunreinigung F detektiert mit HPLC-ESI-MS (RT = 4,4 min)

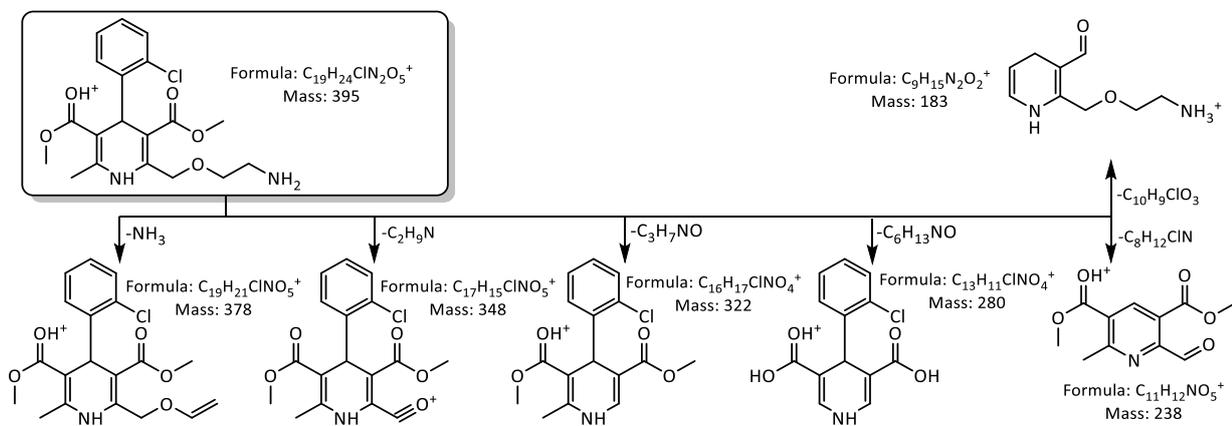


Abb. 167: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F

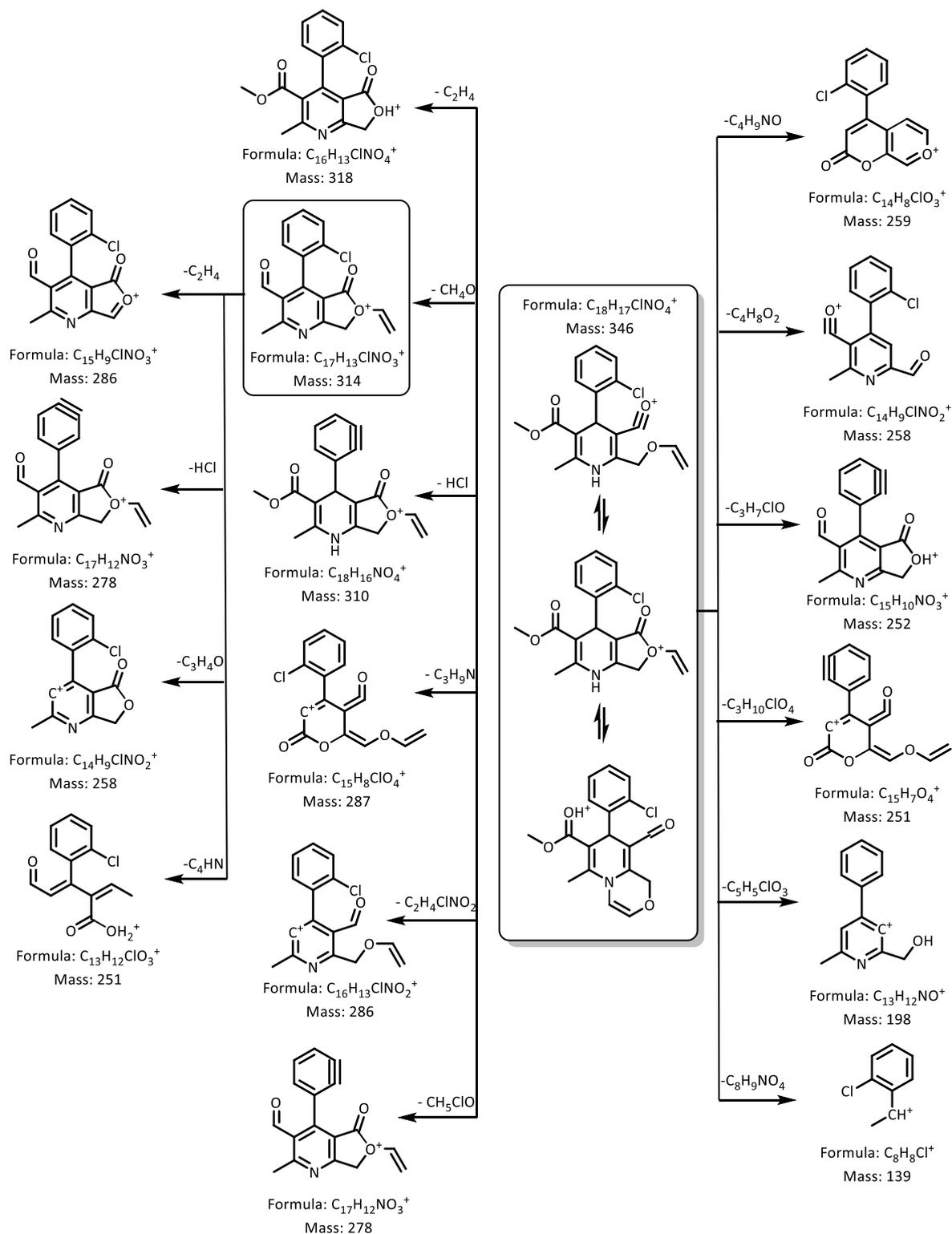


Abb. 168: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Verunreinigung  $m/z = 346$  (das Fragmentspektrum ist in Kapitel 4.4.2.3 Abb. 81 Seite 112 gezeigt)

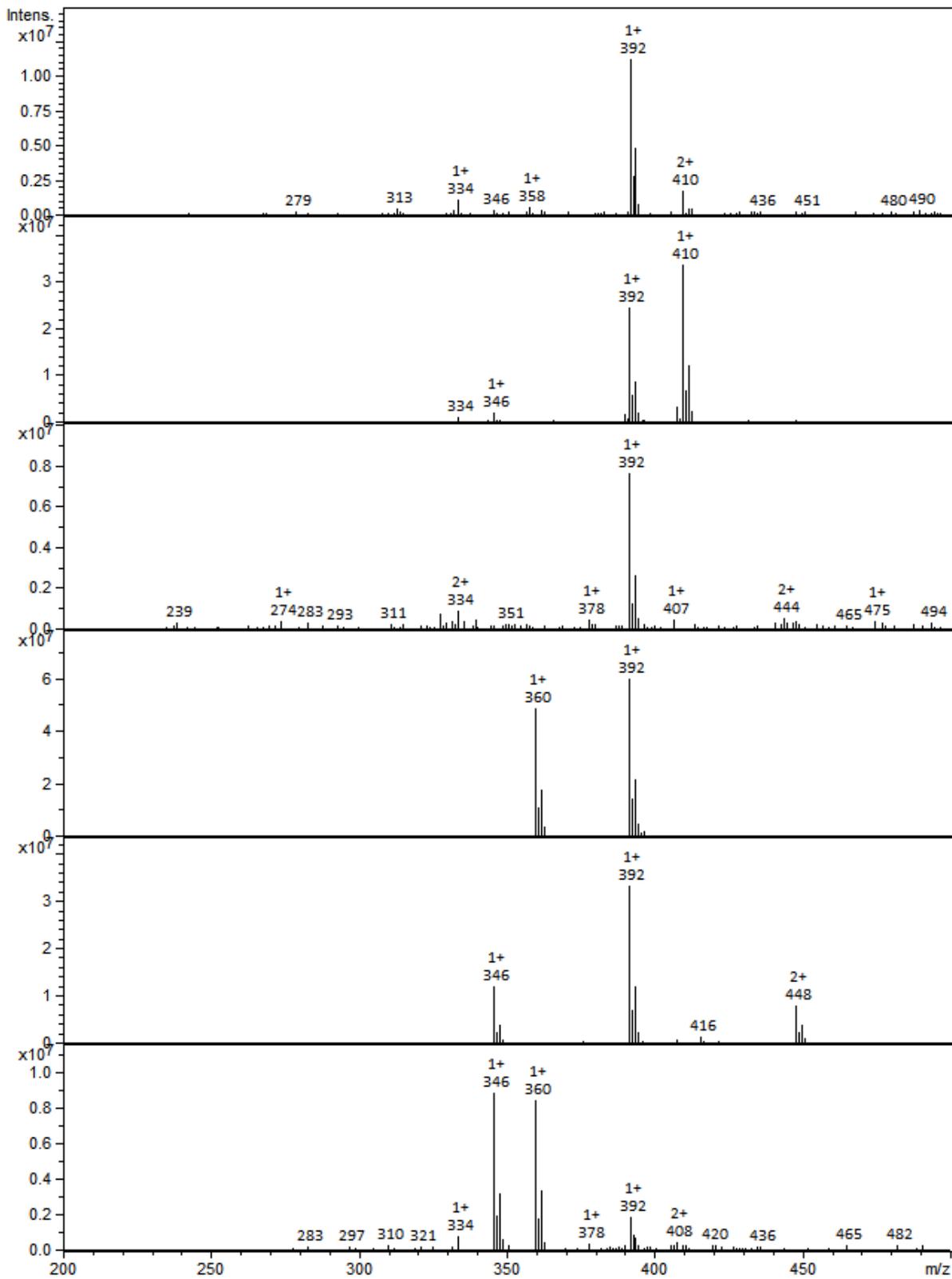


Abb. 169: Massenspektren der Peak bei 8,5 min, 9,4 min, 10,1 min, 15,0 min, 17,9 min und 20,7 min (von oben nach unten) nach HPLC-ESI-MS Analyse

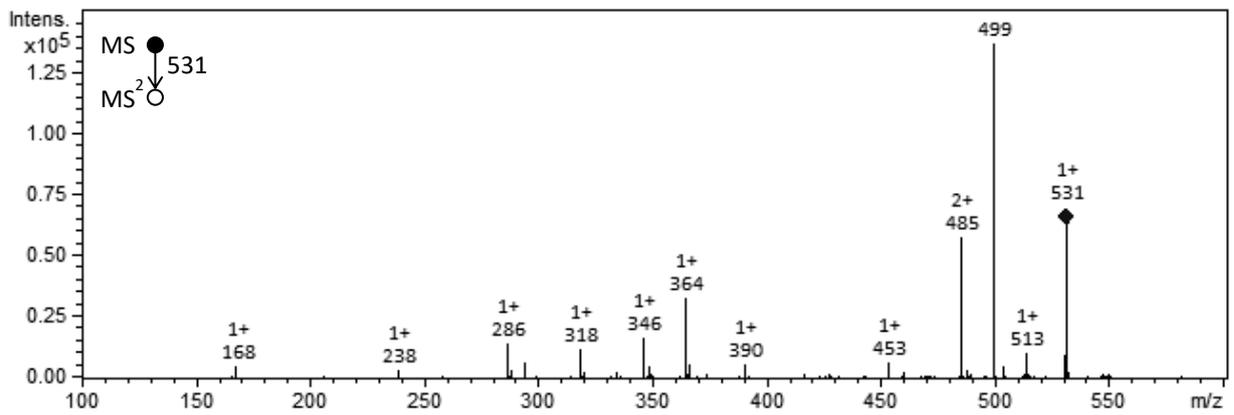


Abb. 170: Fragmentspektrum von  $m/z = 531$  ionisiert mit DIP-EESI

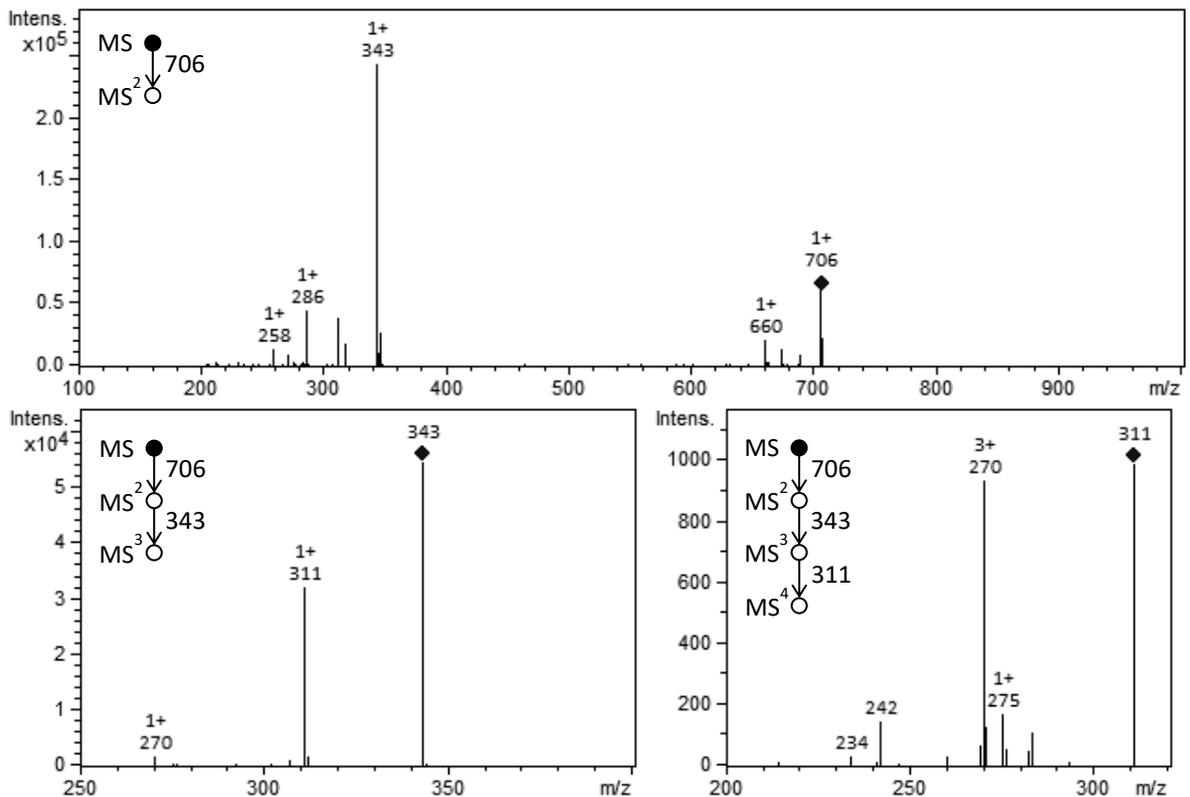


Abb. 171: Fragmentspektrum von  $m/z = 706$  ionisiert mit DIP-EESI (oben), MS<sup>3</sup>-Spektrum von  $m/z = 706 \rightarrow 343$  (Mitte) und MS<sup>4</sup>-Spektrum von  $m/z = 706 \rightarrow 343 \rightarrow 311$  (unten)

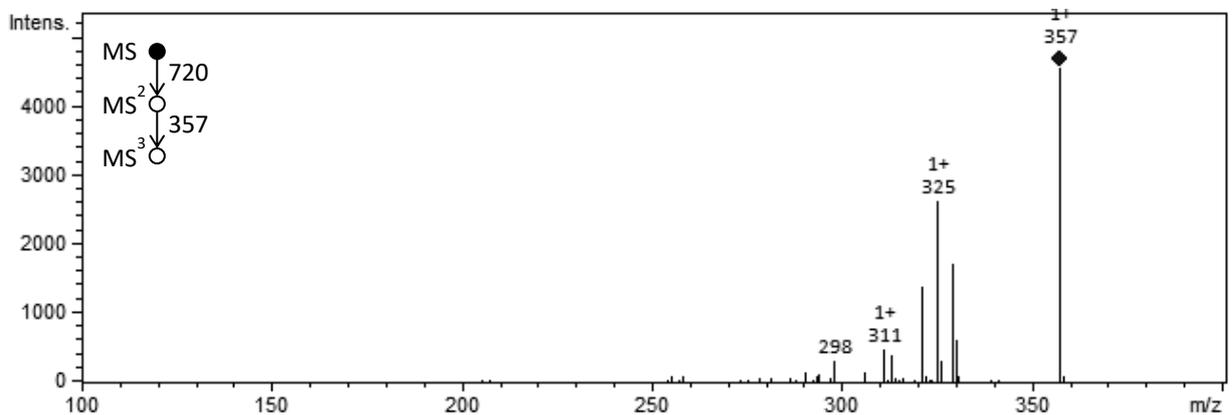


Abb. 172: MS<sup>3</sup>-Spektrum von  $m/z = 720 \rightarrow 357$  ionisiert mit DIP-EESI

## 6.2.2 Clonazepam

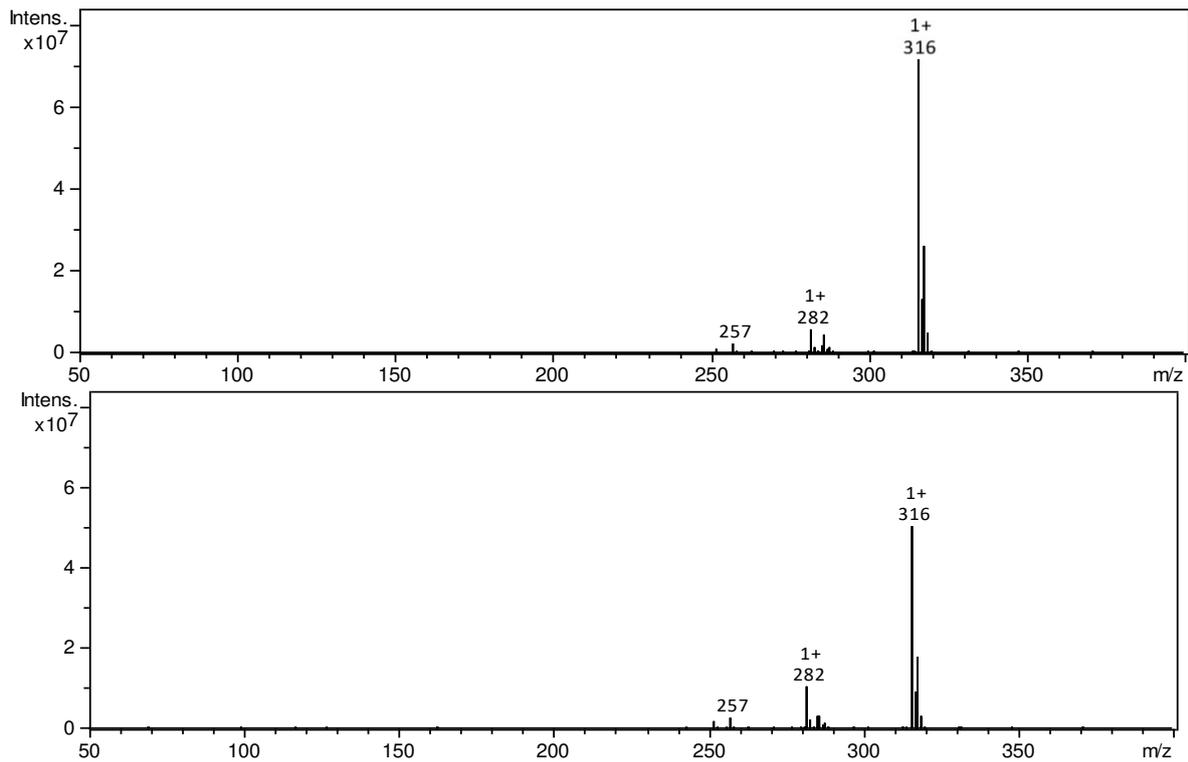


Abb. 173: Linienspektrum ( $m/z = 50-400$ ) von Clonazepam Tabletten, oben originalverpackt, unten halbiert und neuverpackt

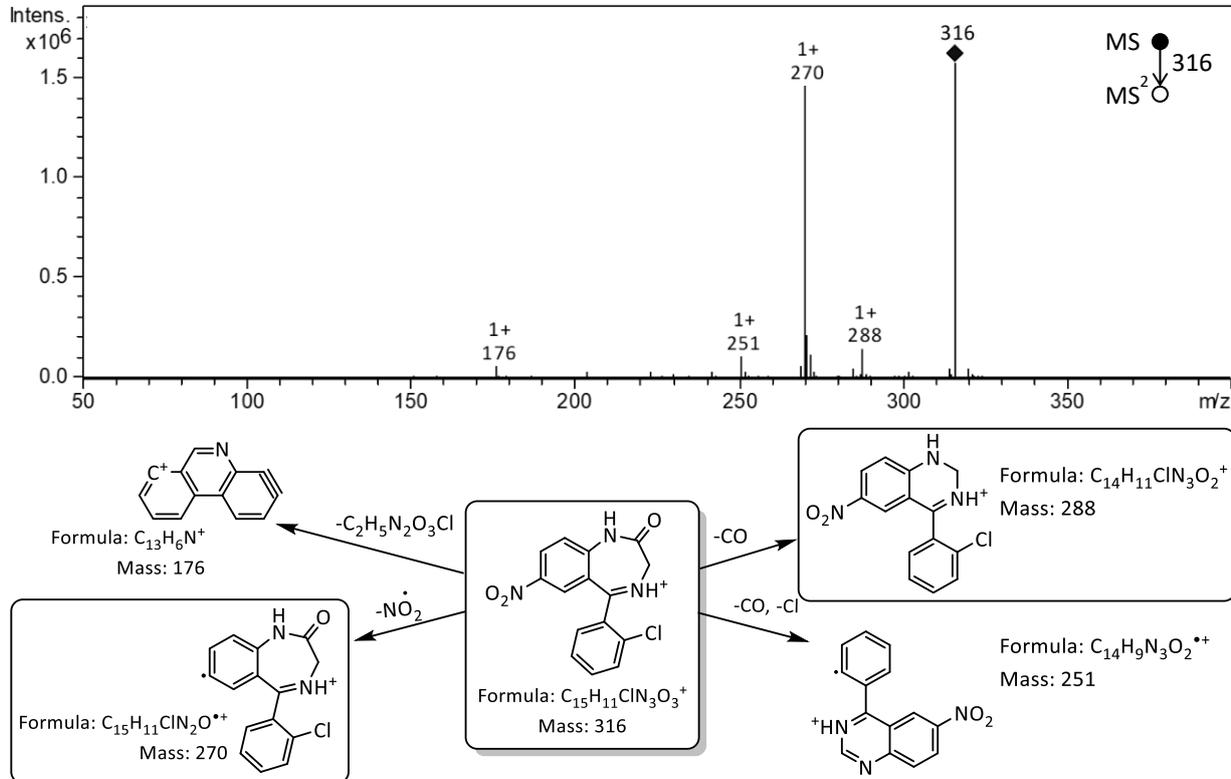
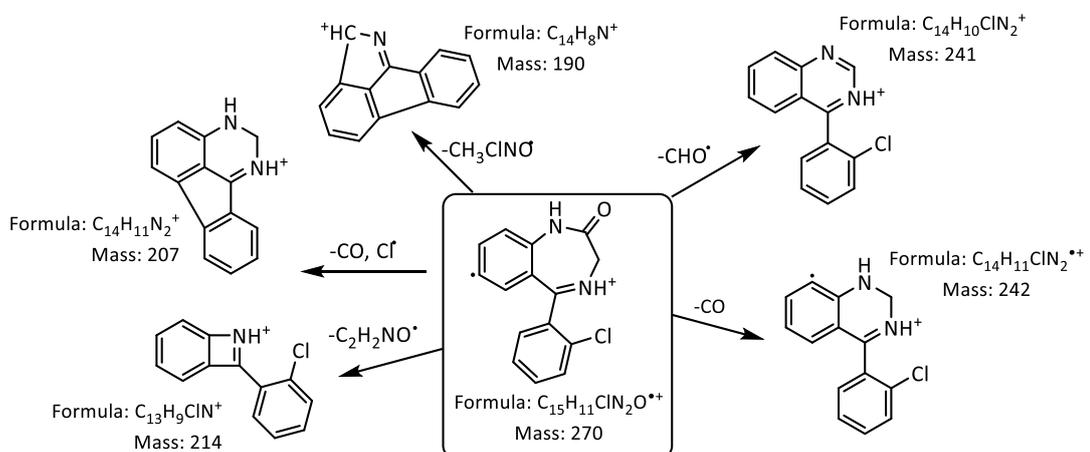
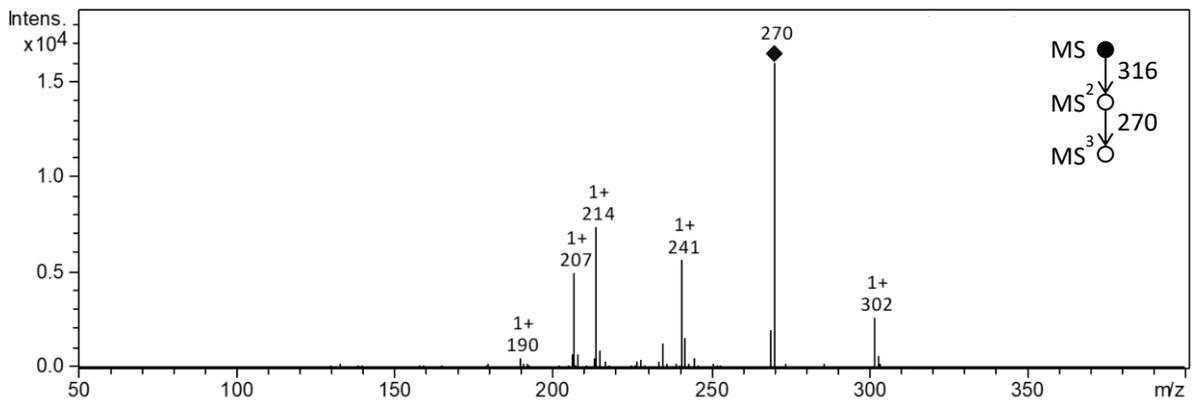
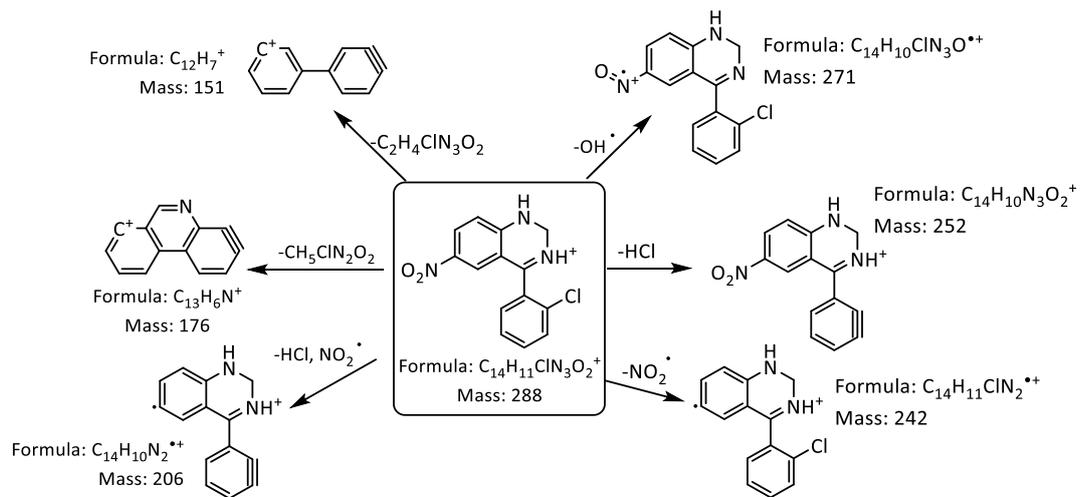
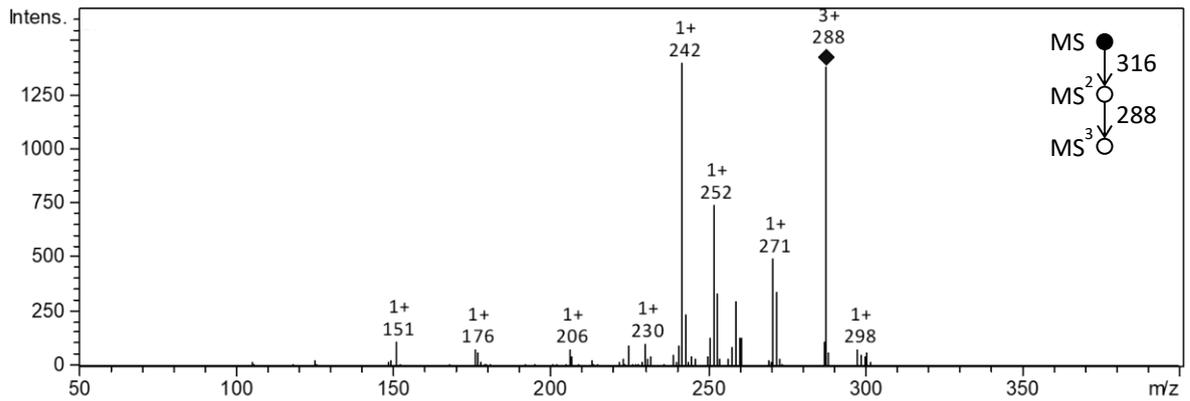


Abb. 174: MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren des Wirkstoffes Clonazepam sowie mögliche Fragmente (Fragmentierung für  $m/z 316 \rightarrow 270$  in Übereinstimmung mit Grześkowiak et al. [221])

Fortsetzung von Abb. 174



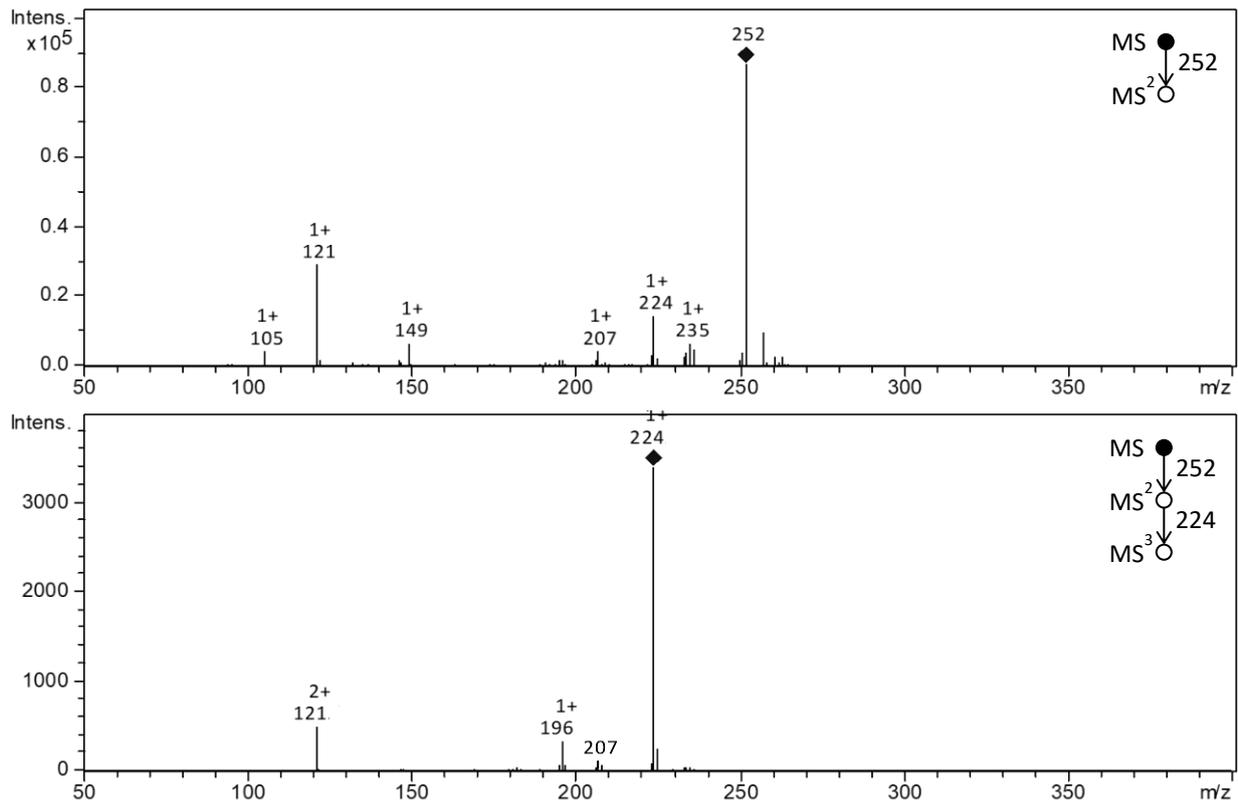


Abb. 175: Fragmentierung von  $m/z = 252$  (7-Aminonitrazepam)

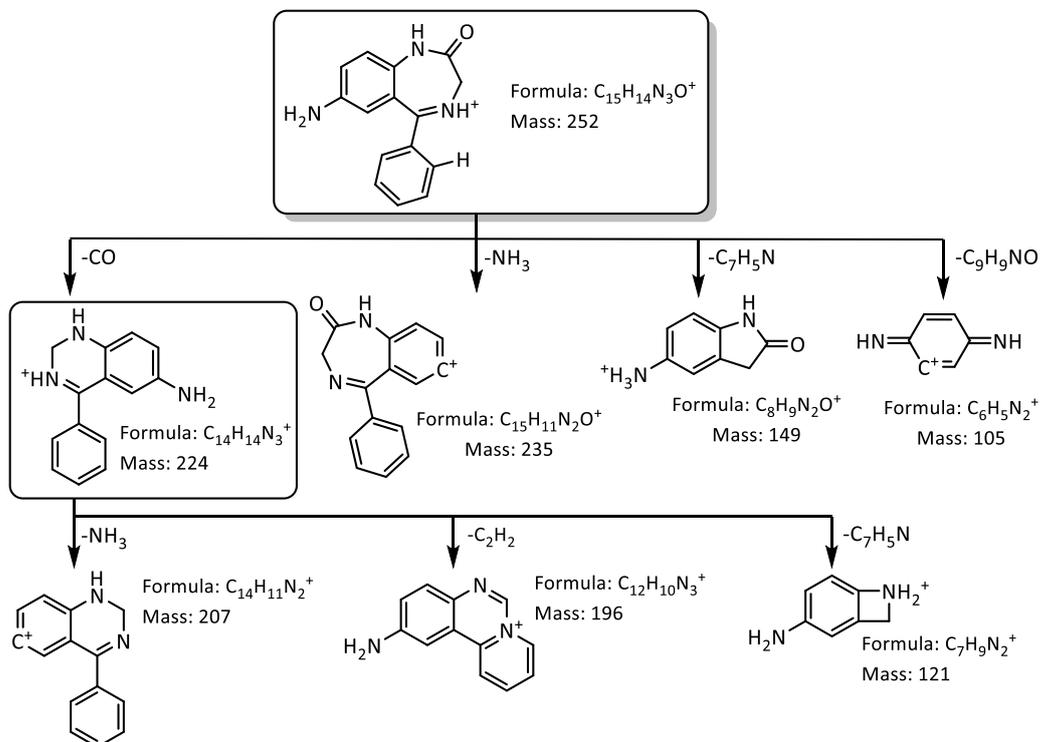


Abb. 176: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Verunreinigung  $m/z = 252$

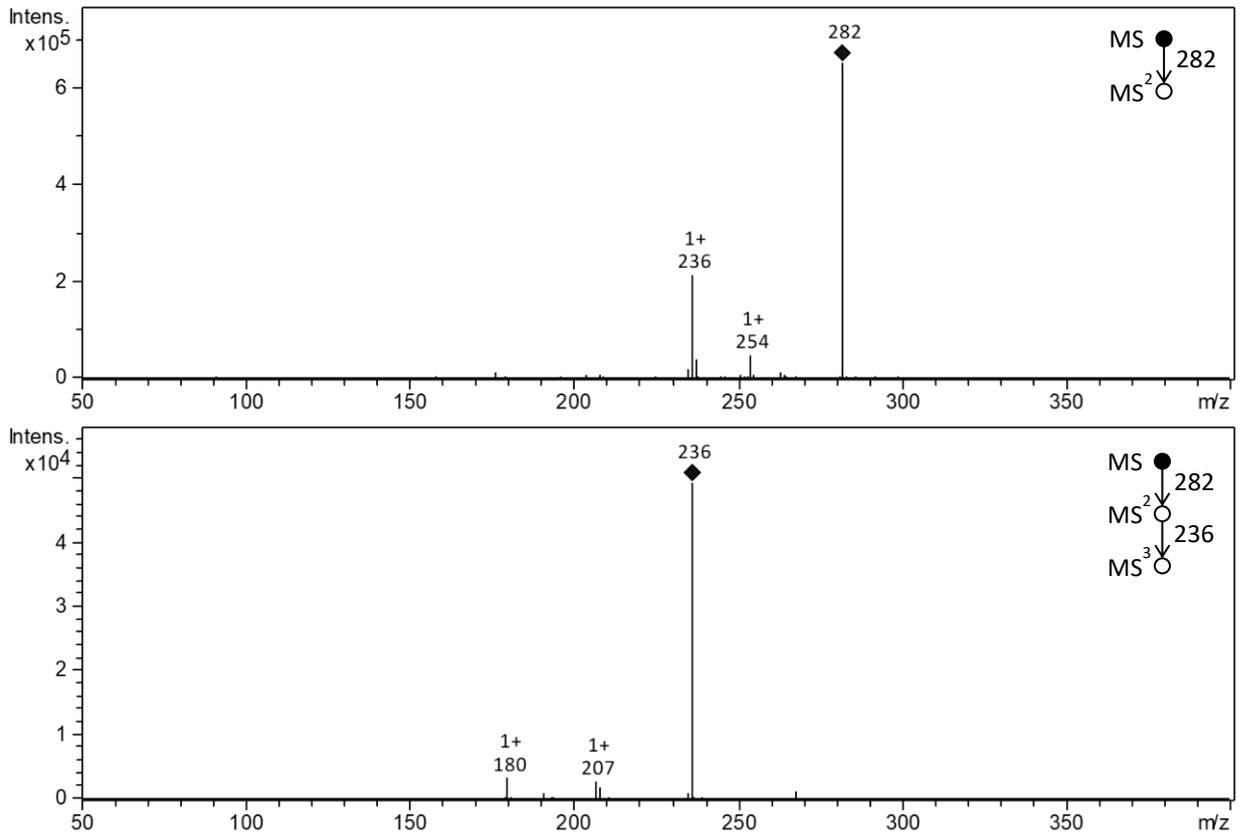


Abb. 177: Fragmentierung von  $m/z = 282$  (Nitrazepam)

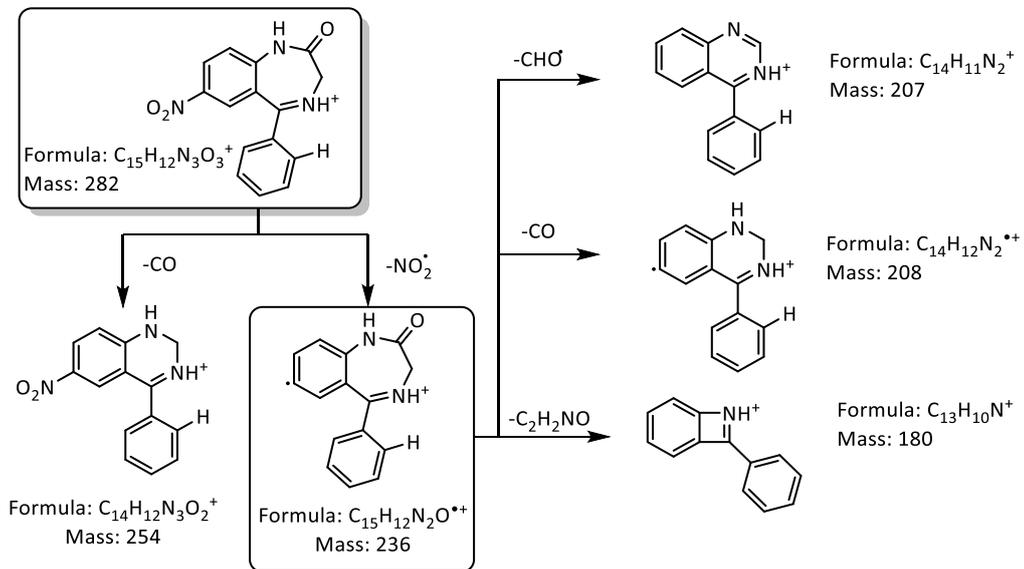


Abb. 178: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Verunreinigung  $m/z = 282$

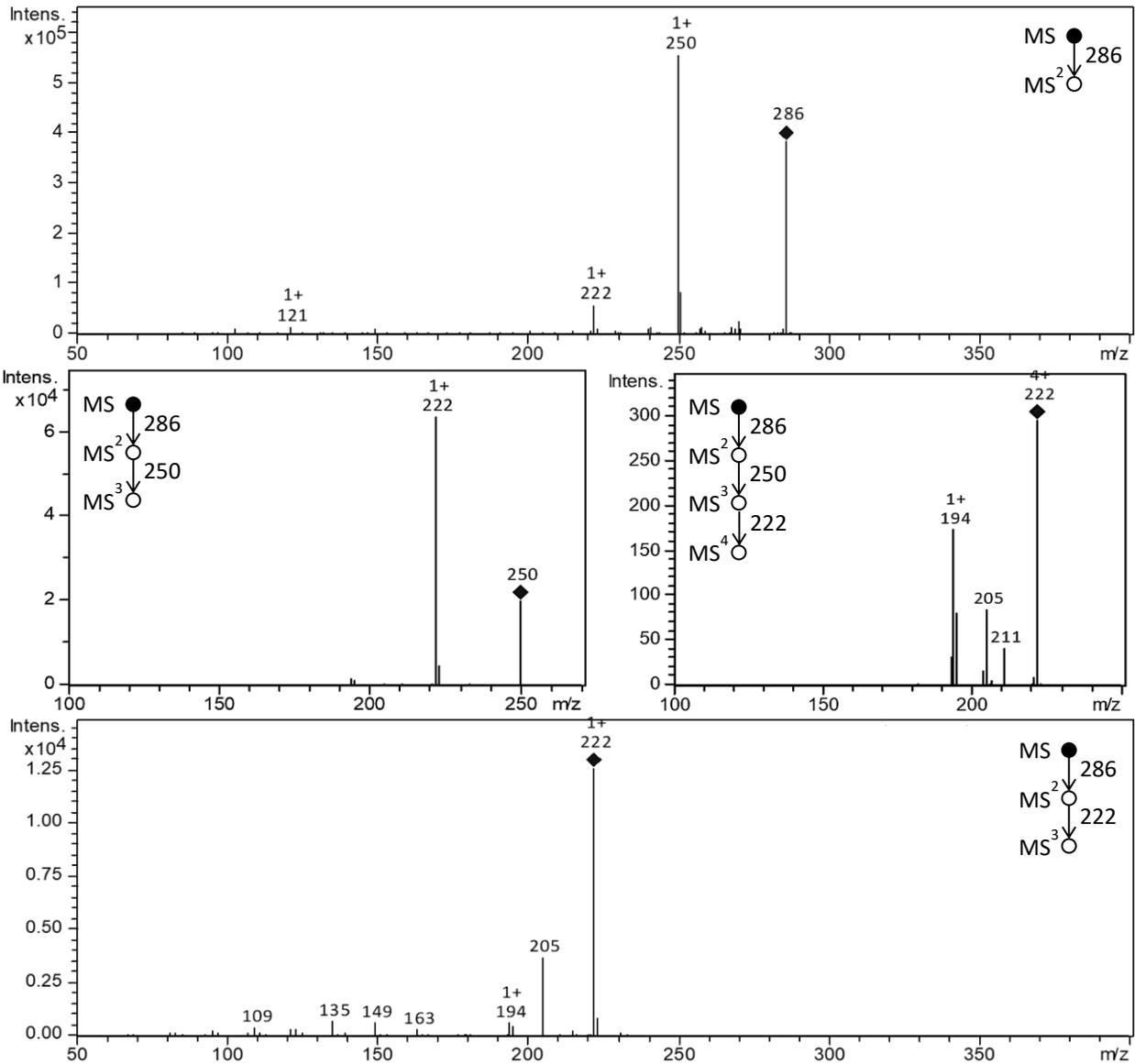


Abb. 179: Fragmentierung von  $m/z = 286$  (7-Aminoclonazepam)

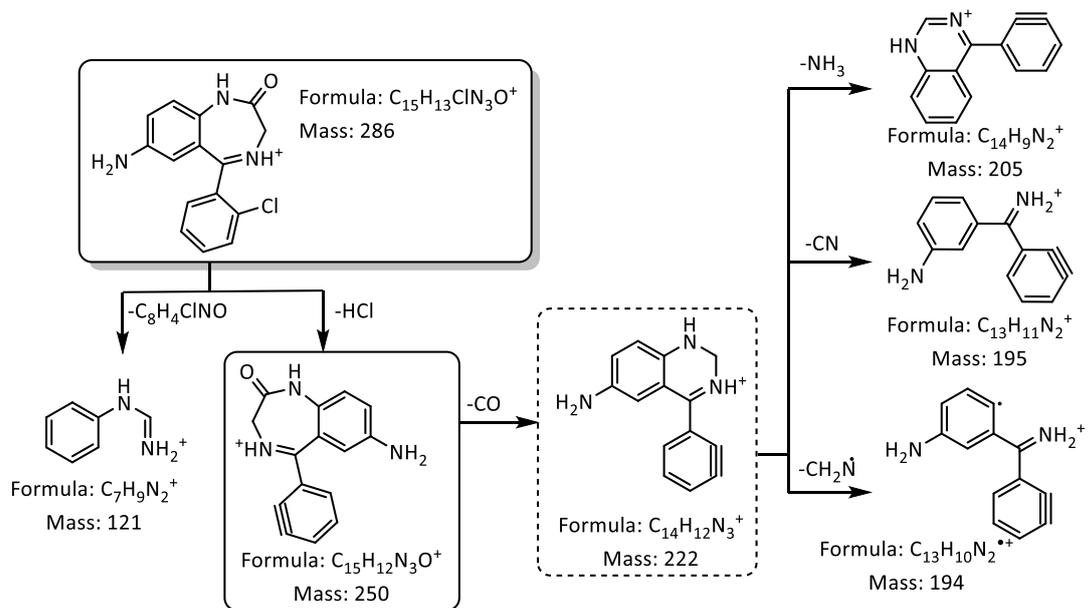


Abb. 180: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekanntes Verunreinigung  $m/z = 286$

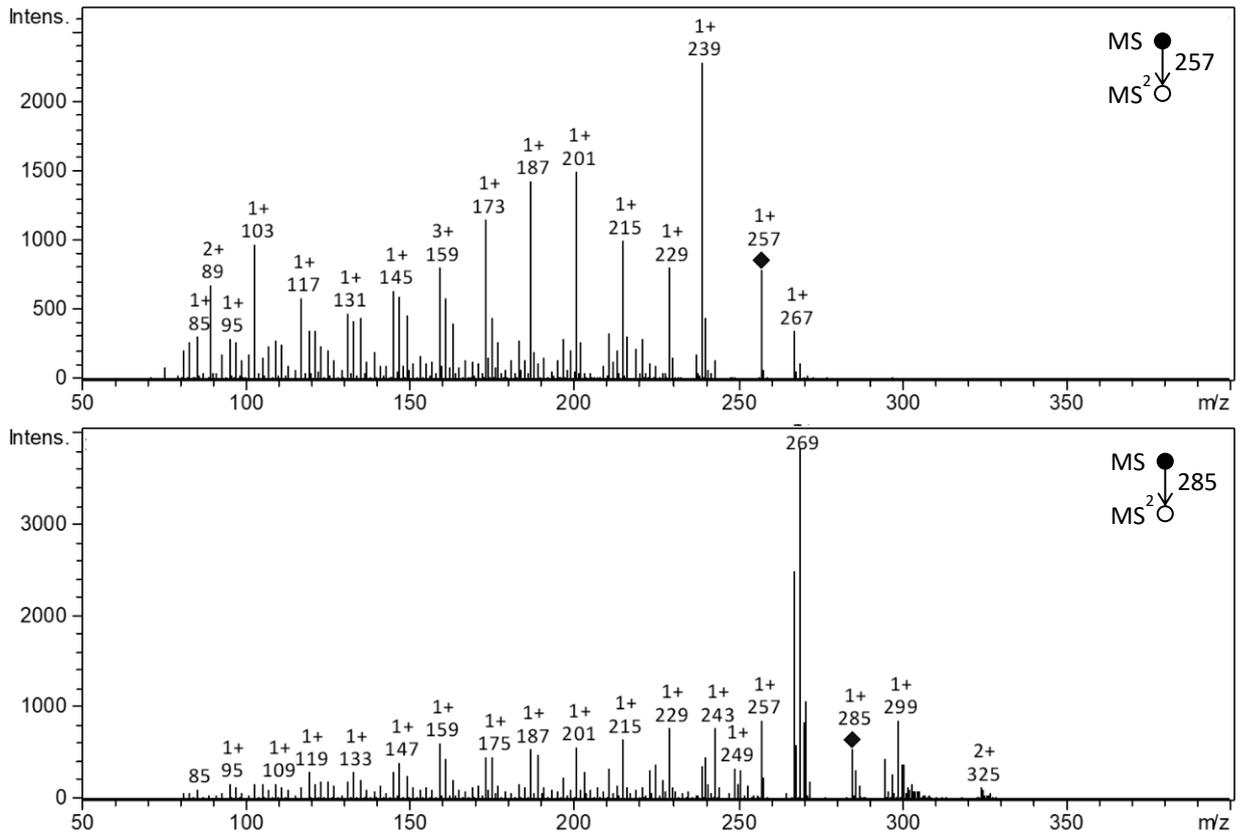


Abb. 181: Fragmentierung vom  $m/z = 257$  (Palmitat) und  $m/z = 285$  (Stearat) beides Fragmente des Magnesiumstearates, das als Hilfsstoff in der Formulierung verwendet wird.

6.2.3 Irbesartan

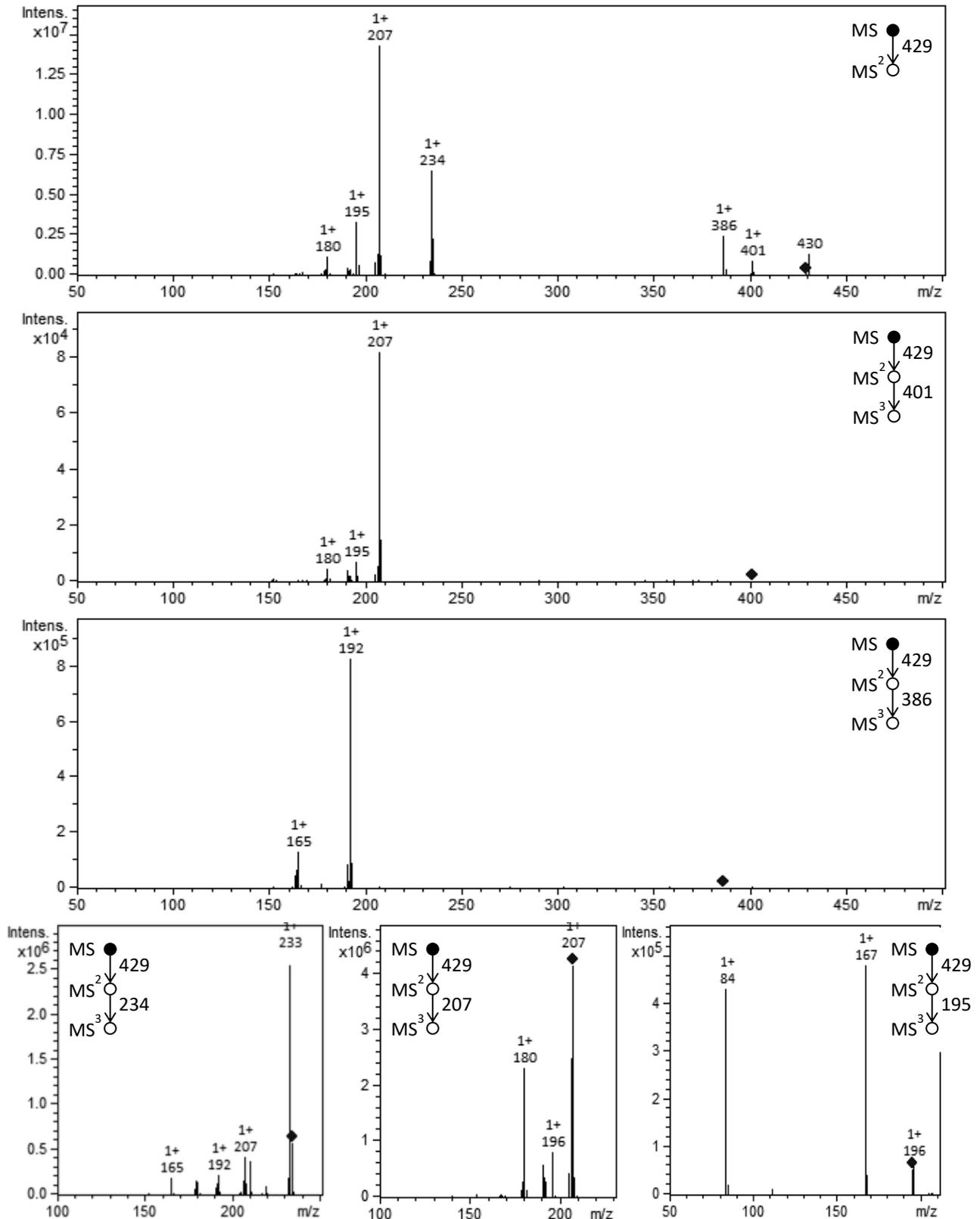


Abb. 182: DIP-APCI MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren des Wirkstoffes Irbesartan

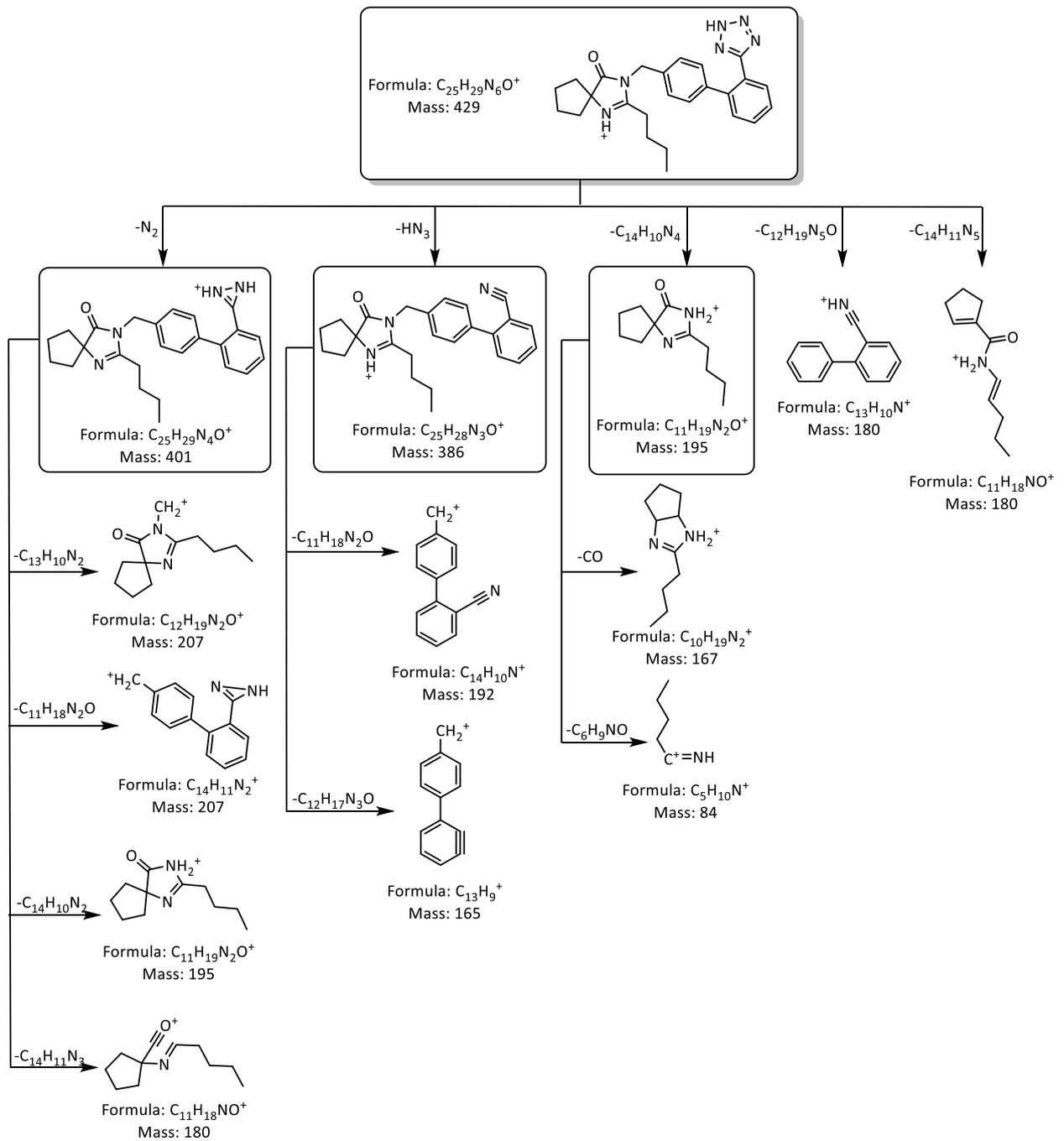


Abb. 183: Mögliche Fragmente des Wirkstoffs Irbesartan (z.T. in Übereinstimmung mit Shah et al. [220])

Fortsetzung von Abb. 183

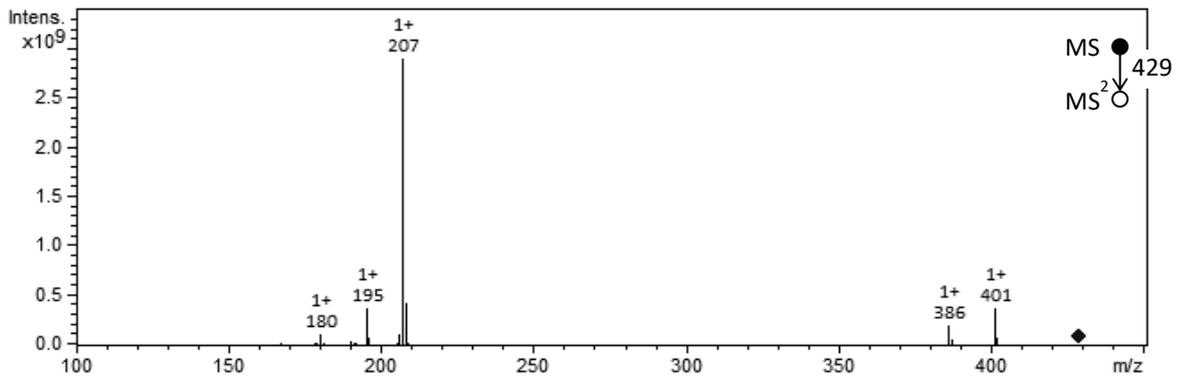
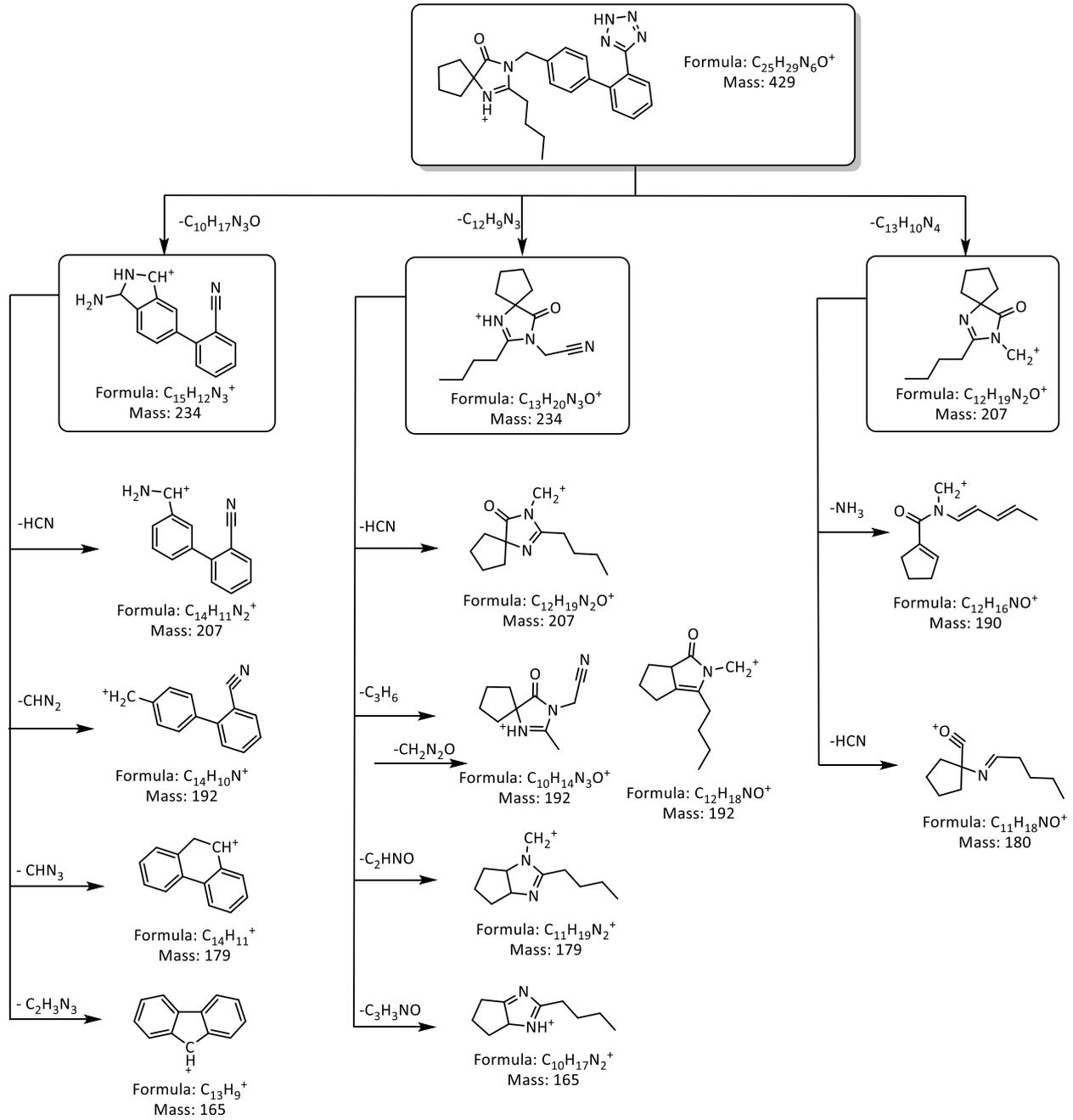


Abb. 184: HPLC-ESI MS<sup>2</sup> Spektren des Wirkstoffes Irbesartan die Fragmente stimmen mit den mit DIP-APCI gefundenen überein s.o.

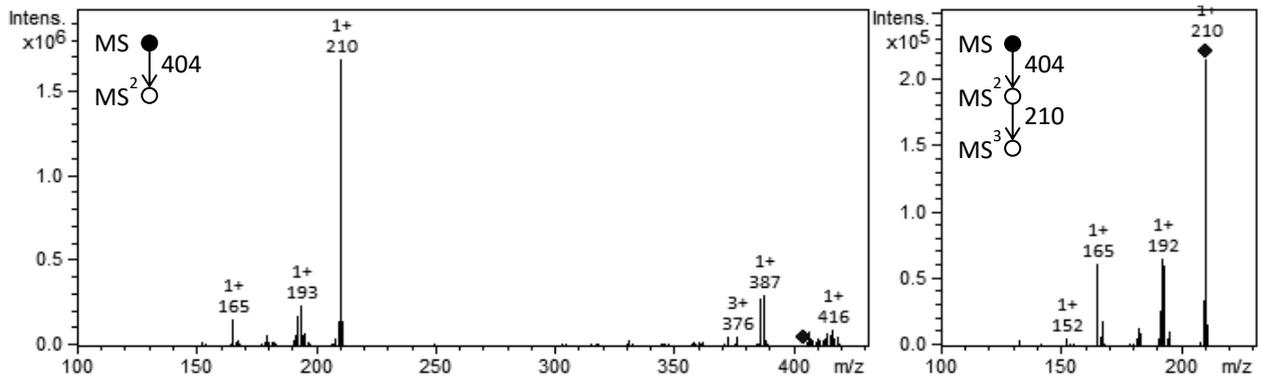


Abb. 185: Fragmentierung von  $m/z = 404$  nach Ionisierung mit DIP-APCI

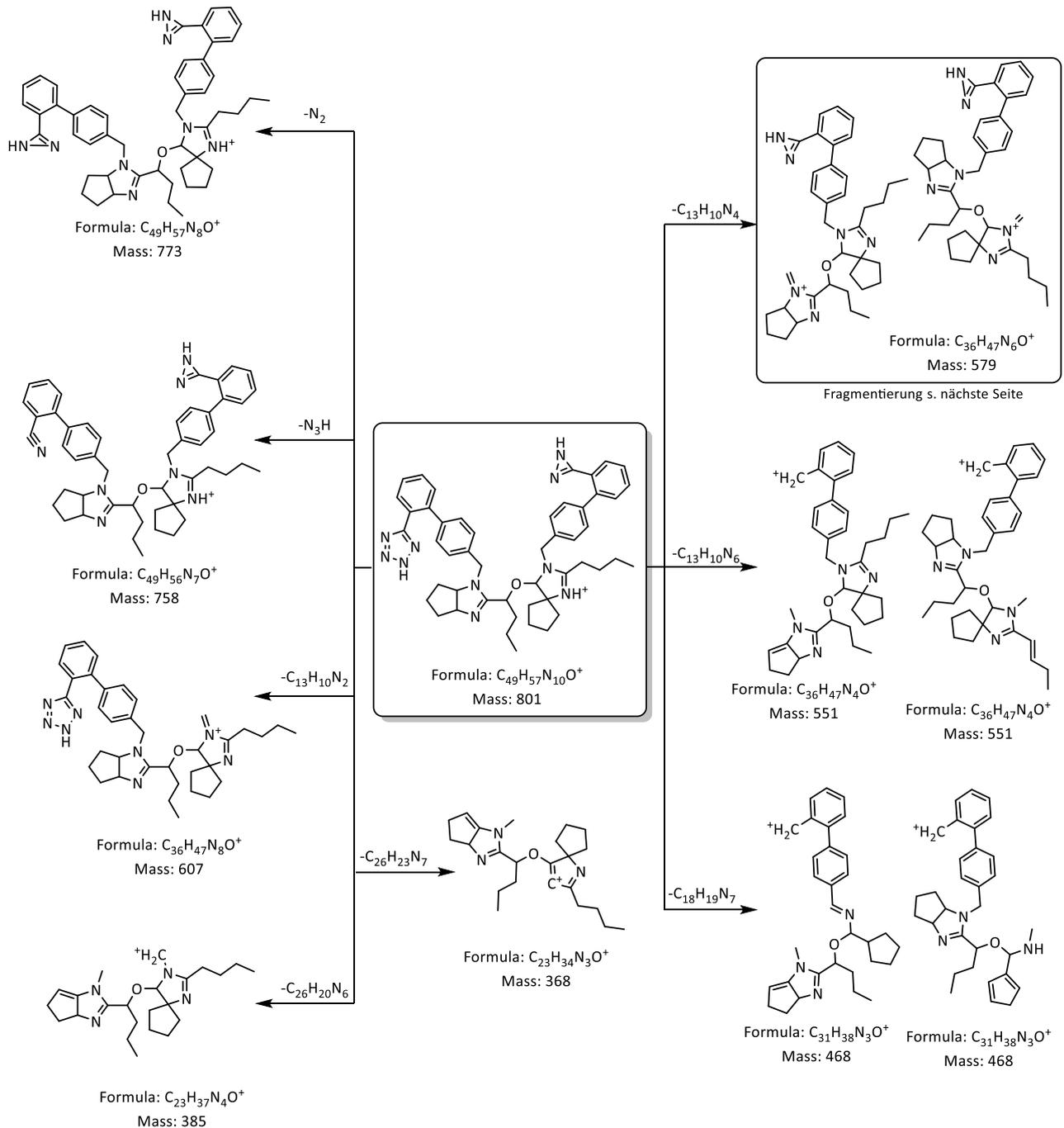


Abb. 186 Mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntes Substanz mit  $m/z = 801$

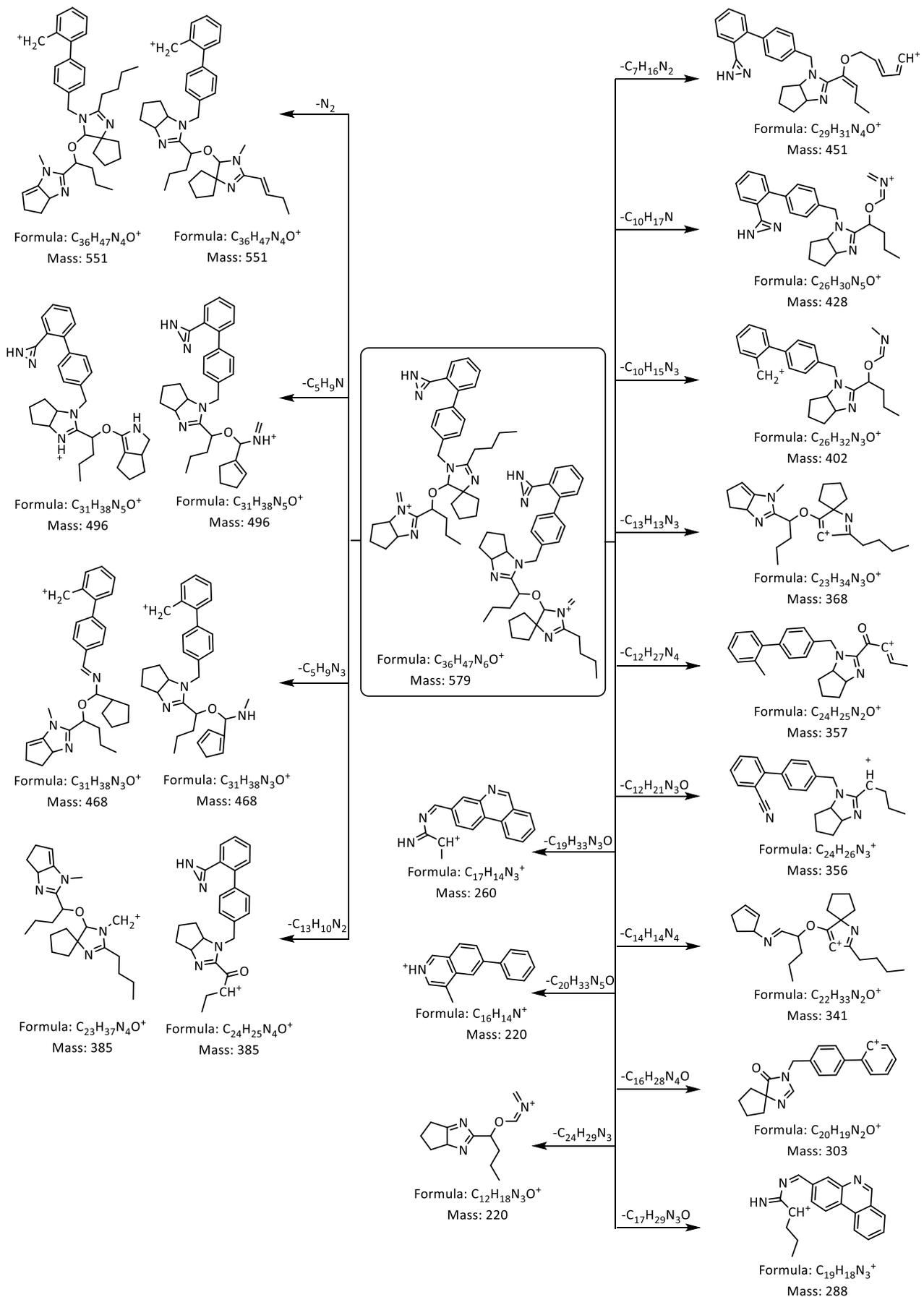


Abb. 187 Fortsetzung der Fragmente der unbekanntes Substanz mit  $m/z = 801$  ( $MS^3$ -Fragmente)

## 6.2.4 Metoprolol

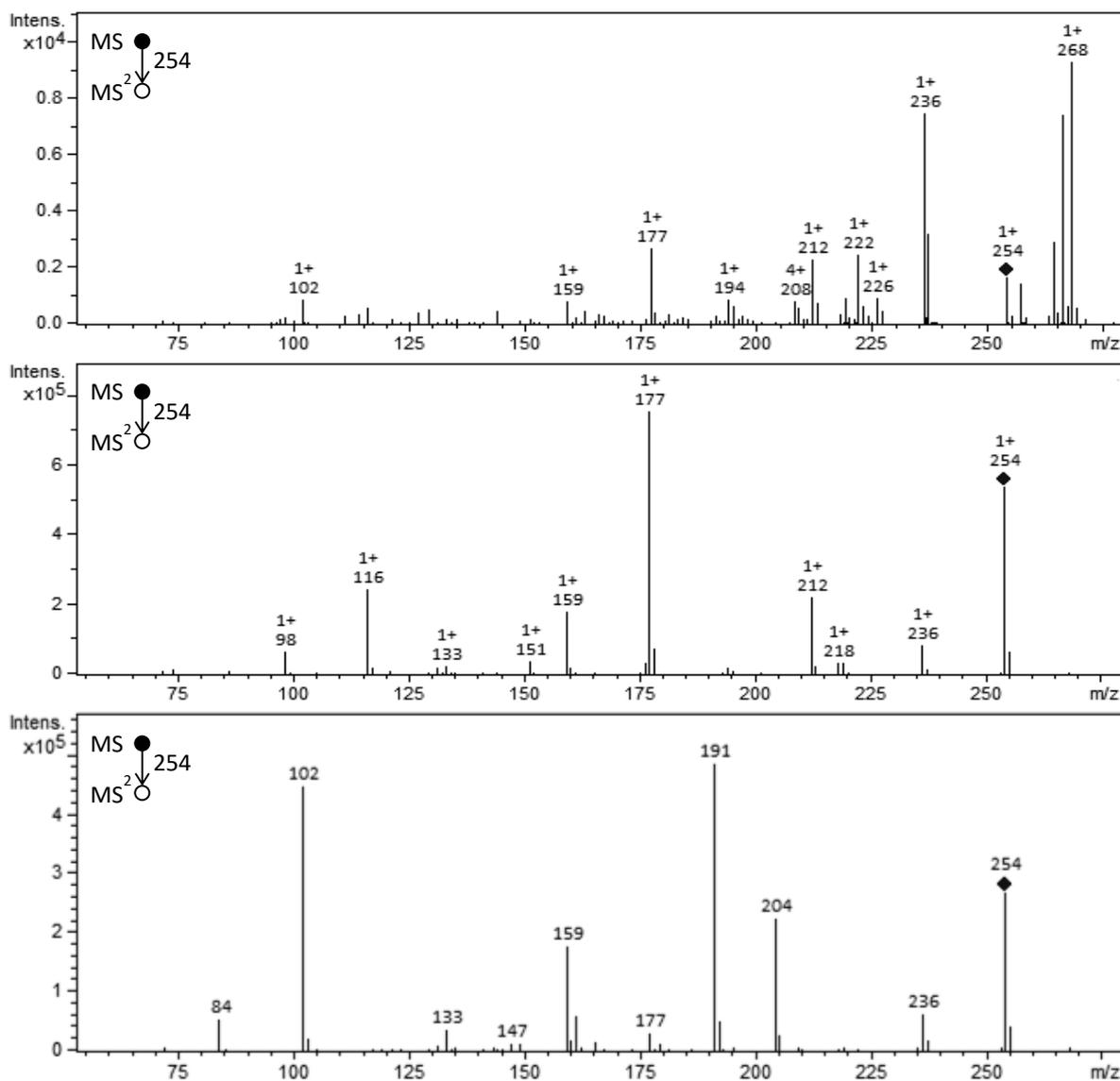


Abb. 188: Fragmentierung von  $m/z = 254$ . Oben DIP-APCI; Mitte HPLC-ESI-MS,  $RT=2,4$  min identifiziert als Verunreinigung H; unten HPLC-ESI-MS,  $RT=4,0$  min identifiziert als Verunreinigung A

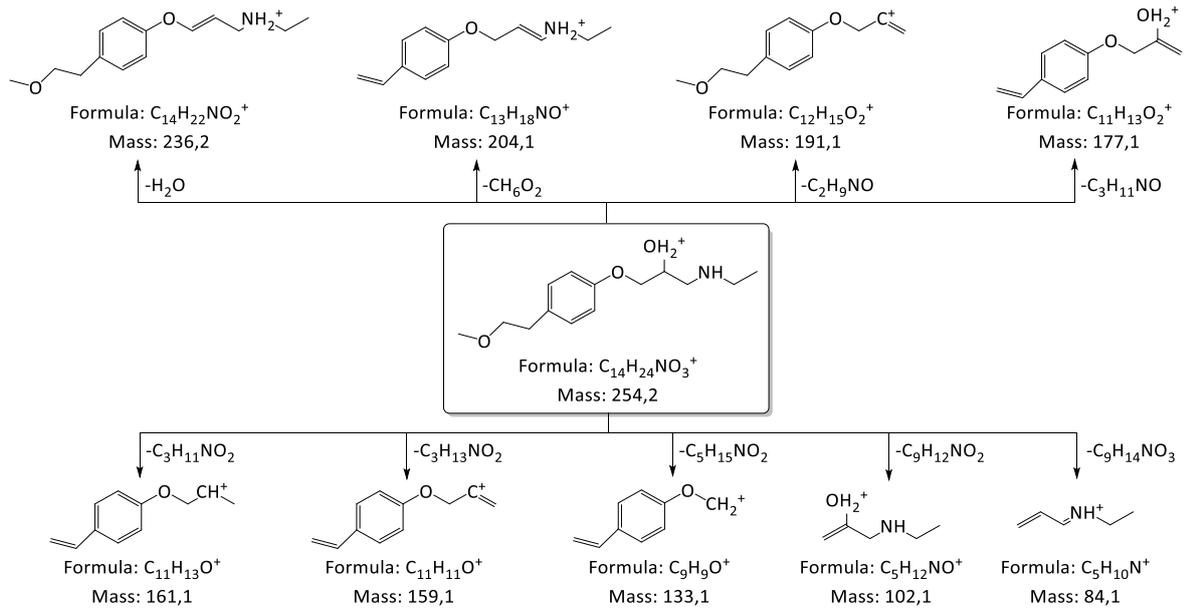


Abb. 189: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A

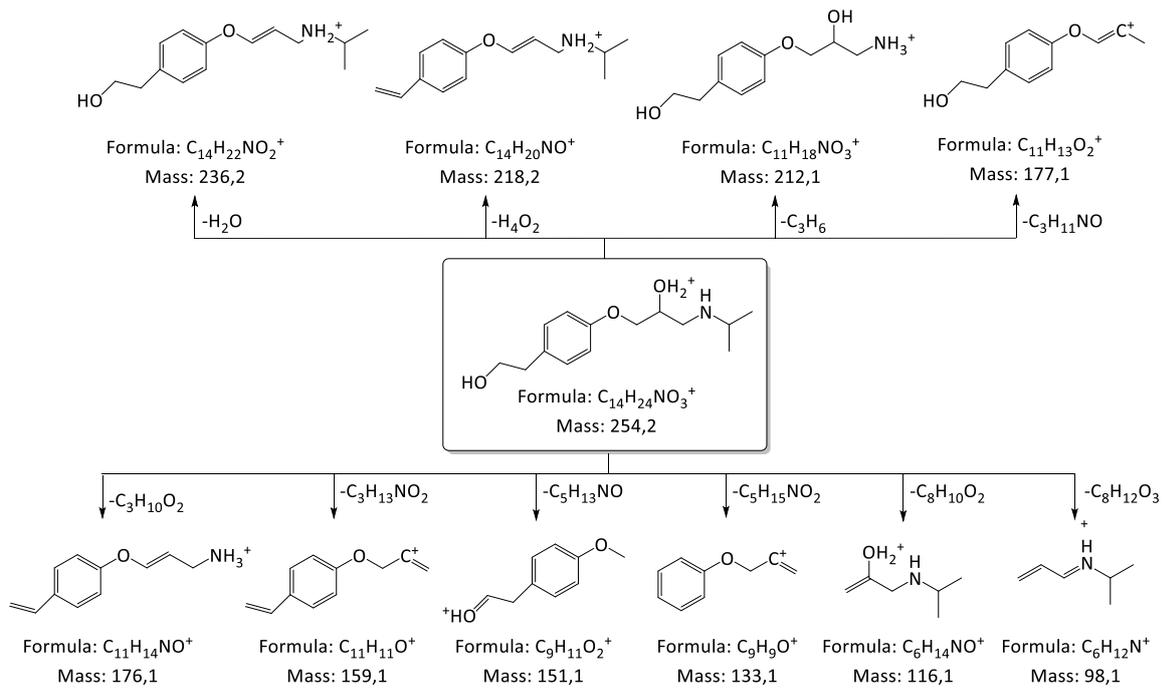


Abb. 190: Mögliche Fragmente der Verunreinigung H

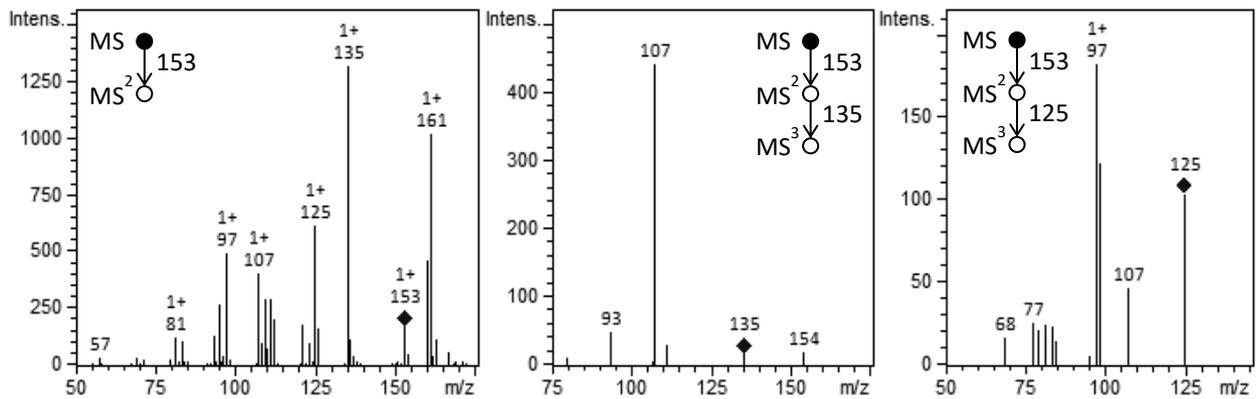


Abb. 191: Fragmentierung von  $m/z = 153$  nach Ionisierung mit DIP-APCI potentielle Verunreinigung B

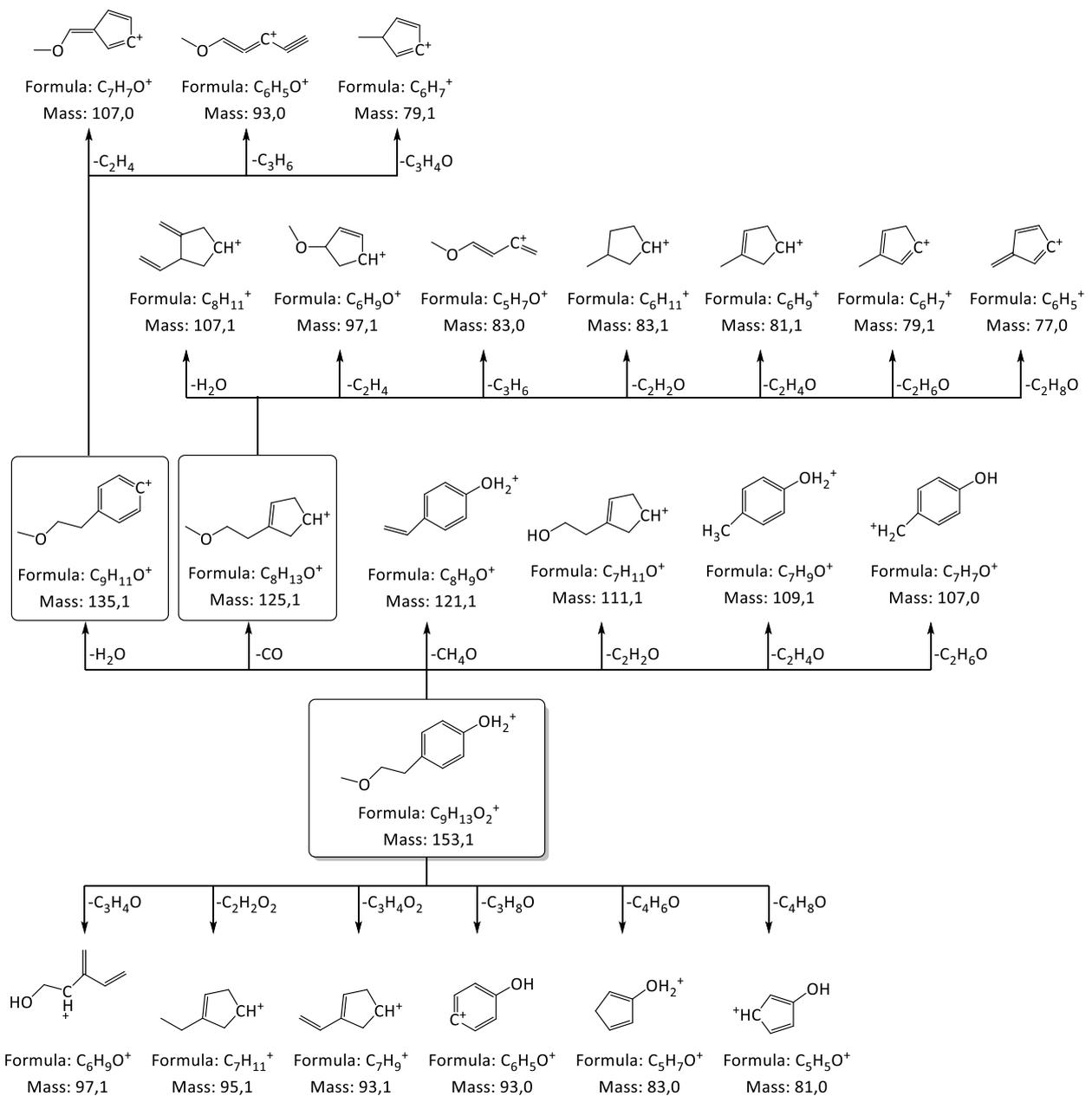


Abb. 192: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B

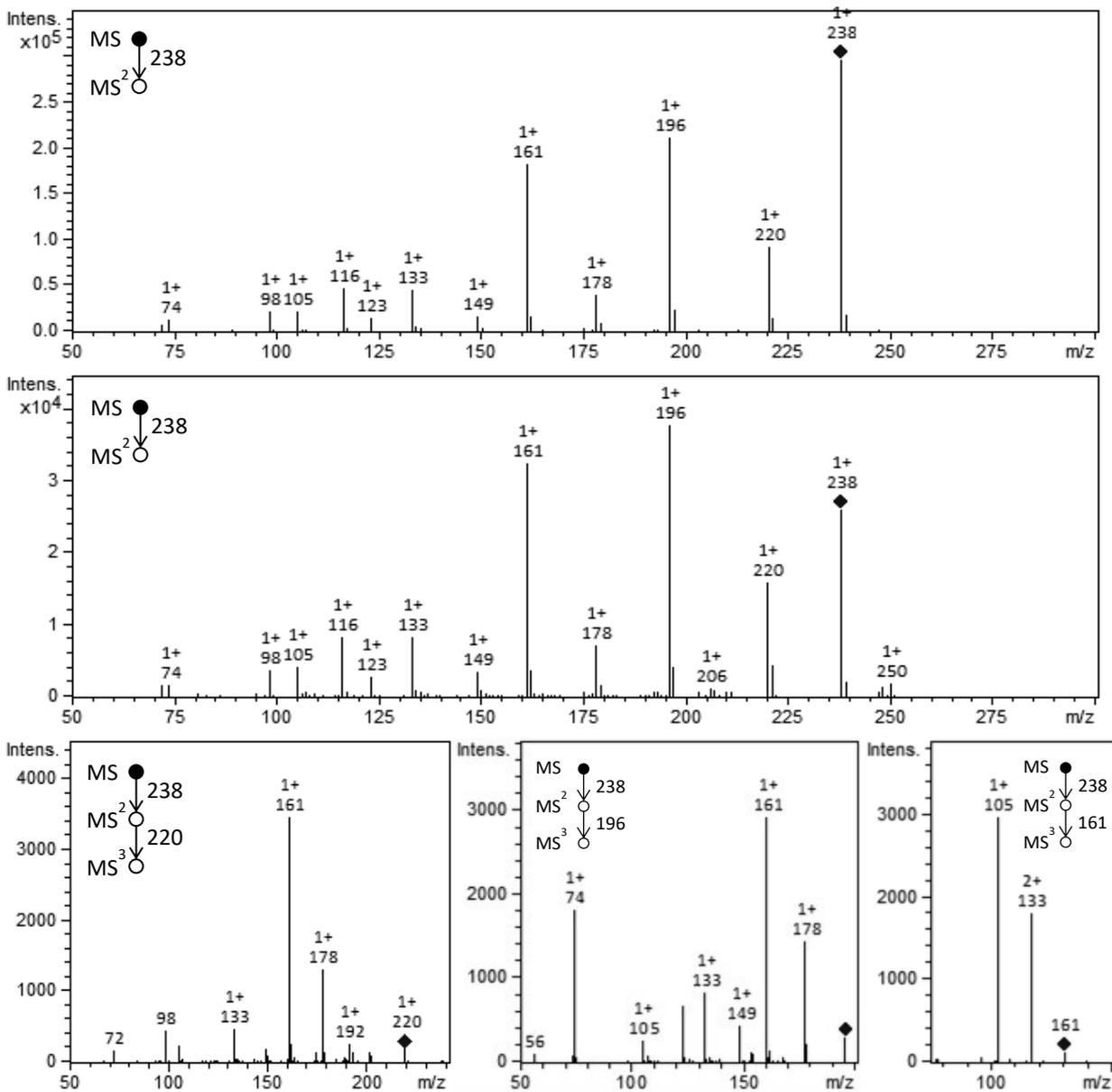


Abb. 193: Fragmentierung von  $m/z = 238$ . Oben HPLC-ESI-MS, RT=2,8 min identifiziert als Verunreinigung C; Mitte und unten DIP-APCI

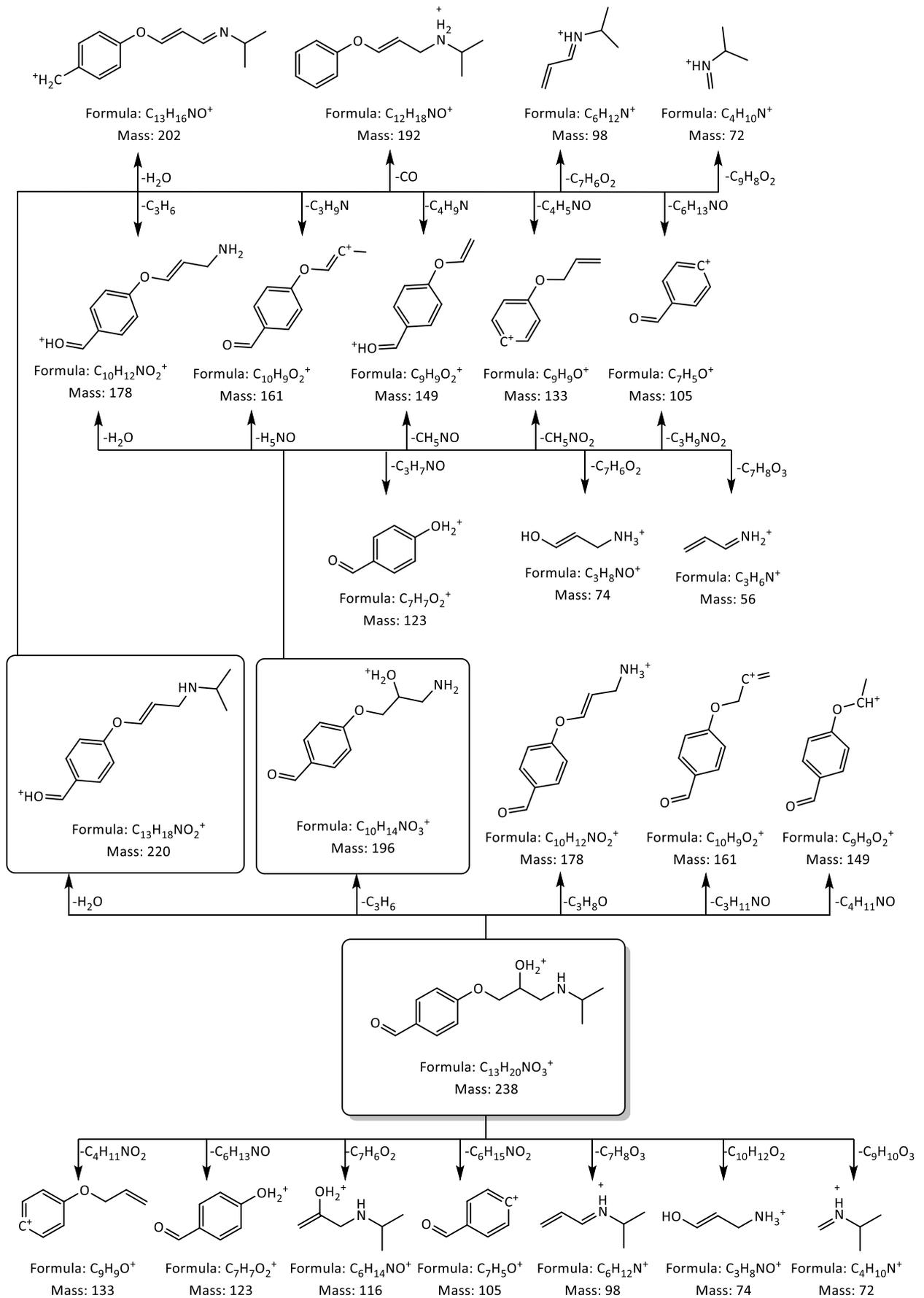


Abb. 194: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C

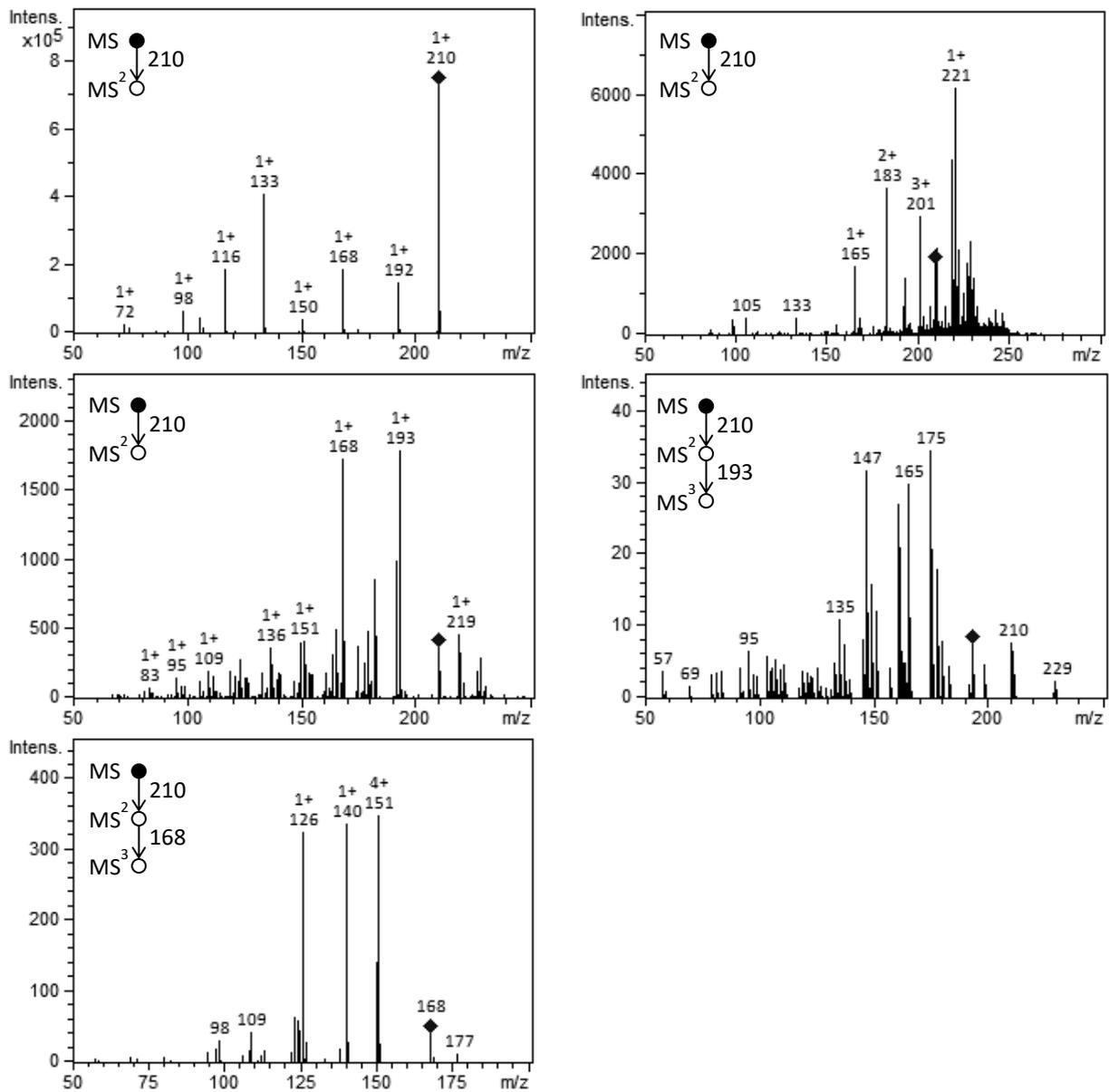


Abb. 195: Fragmentierung von  $m/z = 210$ . Oben links HPLC-ESI-MS, RT=3,9 min identifiziert als Verunreinigung F; oben rechts DIP-EESI; Mitte und unten DIP-APCI (mit DIP-EESI und DIP-APCI konnte die Verunreinigung F nicht identifiziert werden aufgrund zu starker Interferenzen)

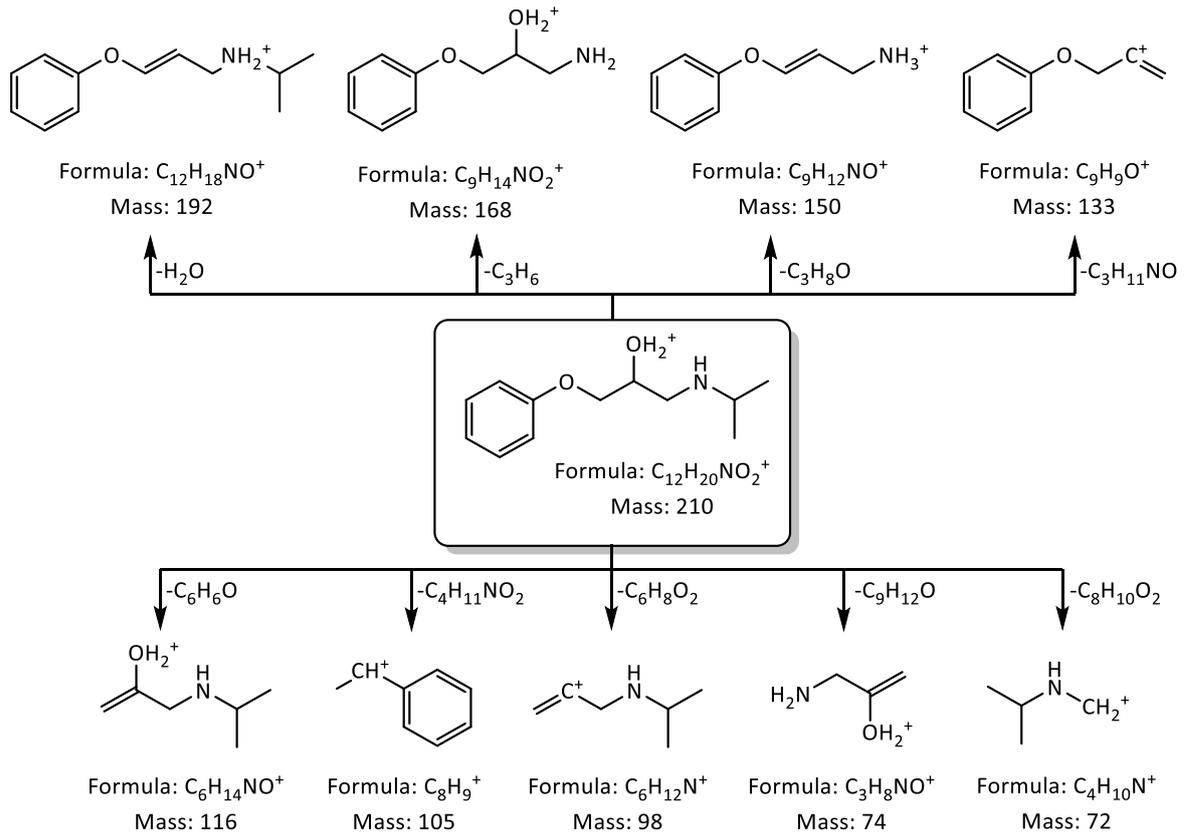
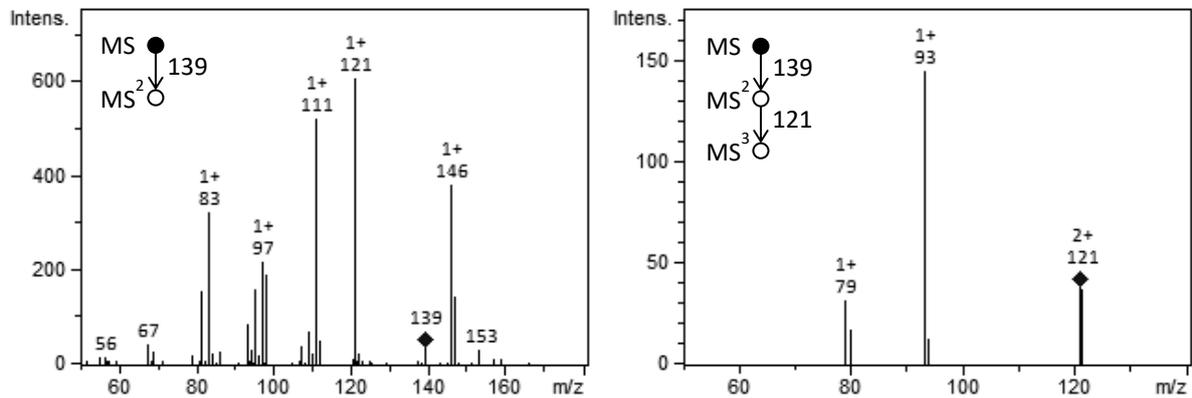


Abb. 196: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F

Abb. 197: Fragmentierung von  $m/z = 139$  nach Ionisierung mit DIP-APCI potentielle Verunreinigung G

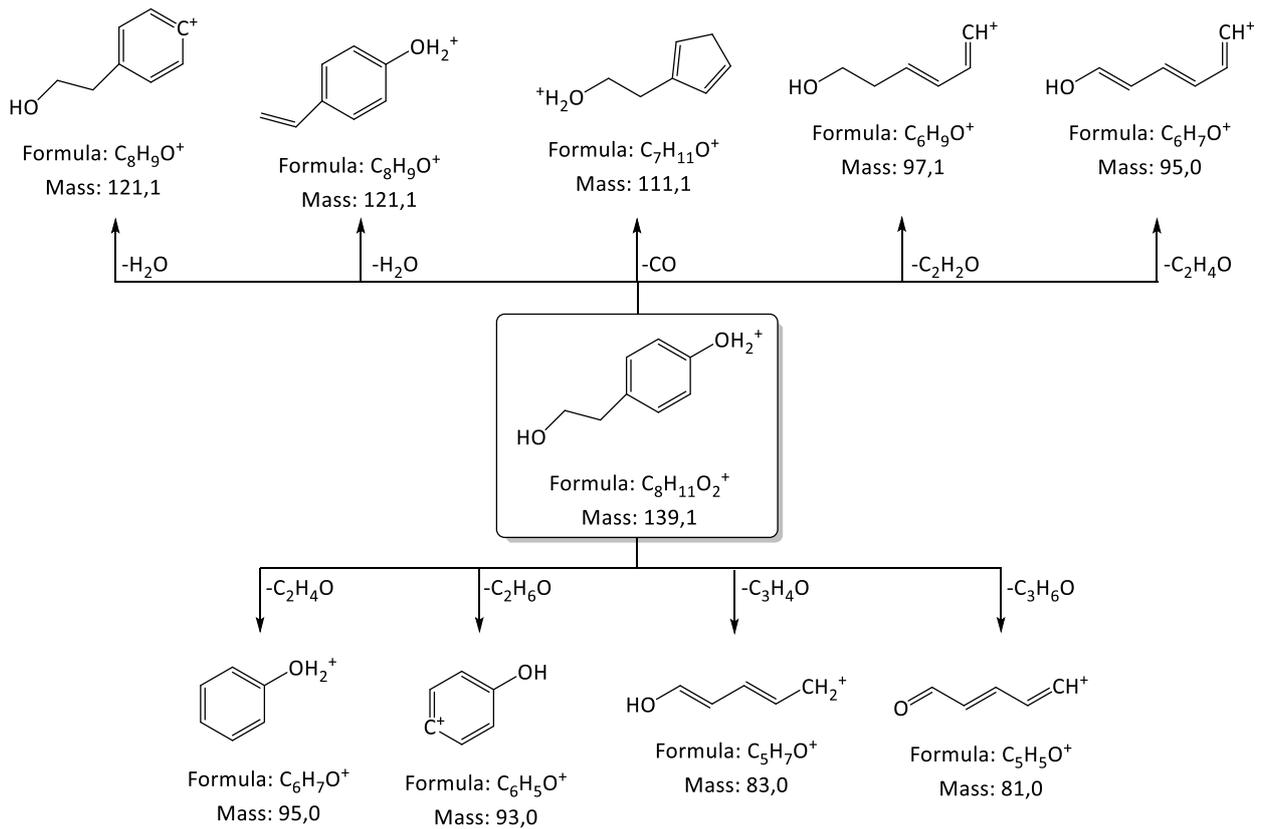
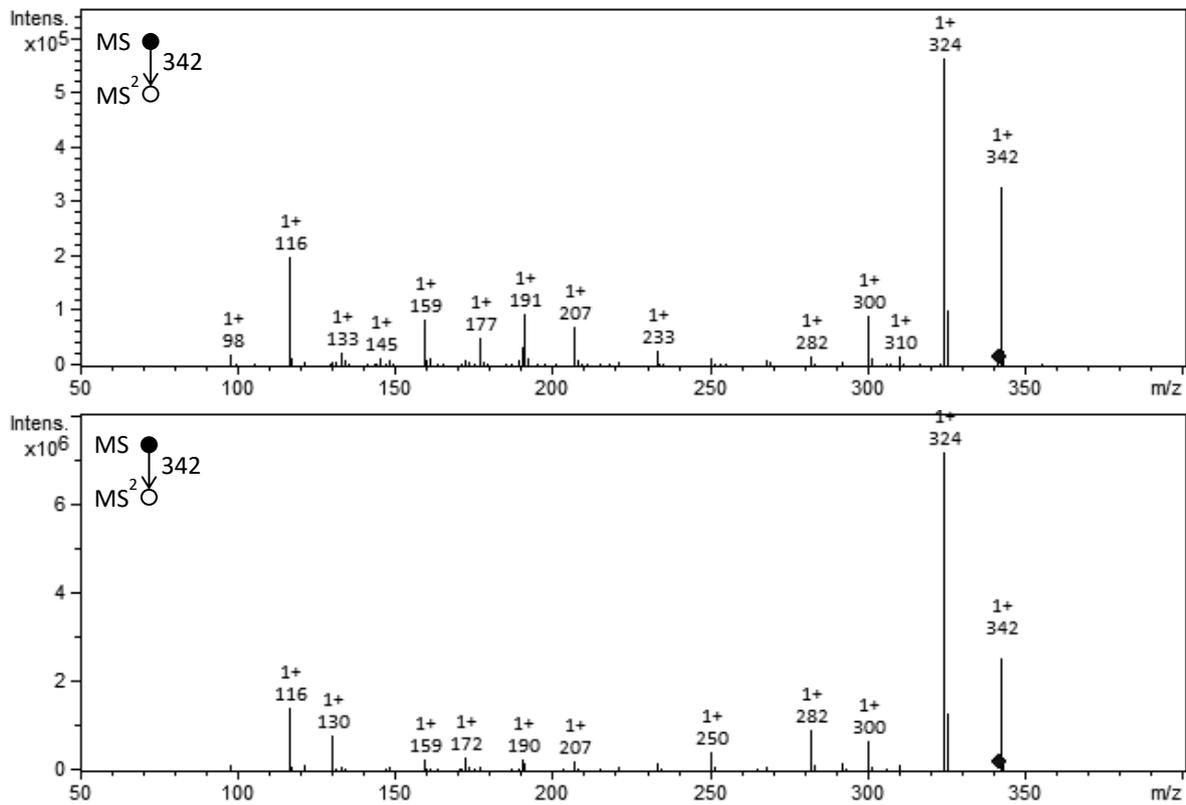


Abb. 198: Mögliche Fragmente der Verunreinigung G

Abb. 199. Fragmentierung von  $m/z = 342$  potentielle Verunreinigung J mittels HPLC-ESI-MS. Oben RT = 4,0 min; unten RT = 4,6 min

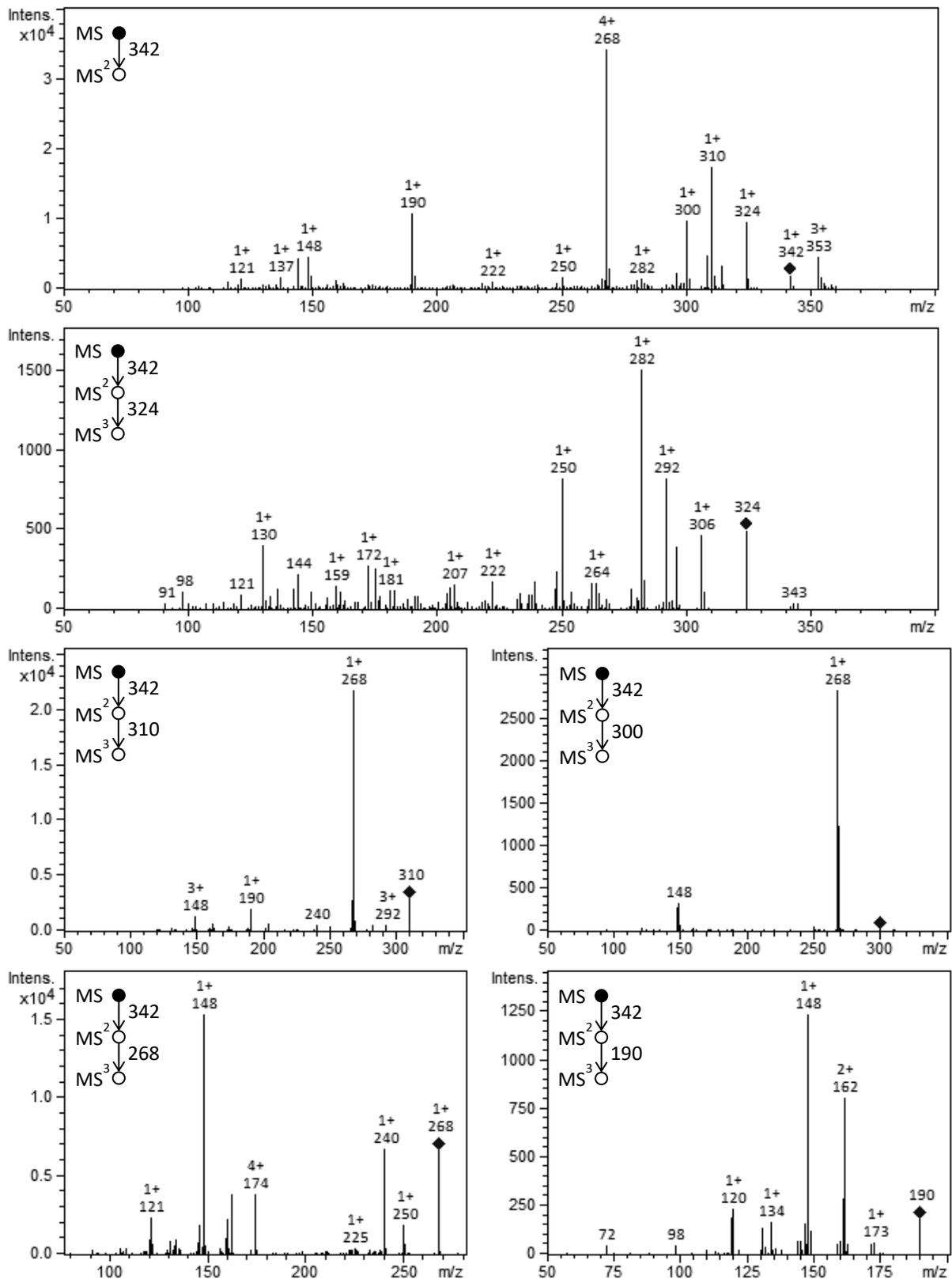


Abb. 200. Fragmentierung von  $m/z = 342$  ionisiert mit DIP-APCI-MS potentielle Verunreinigung J



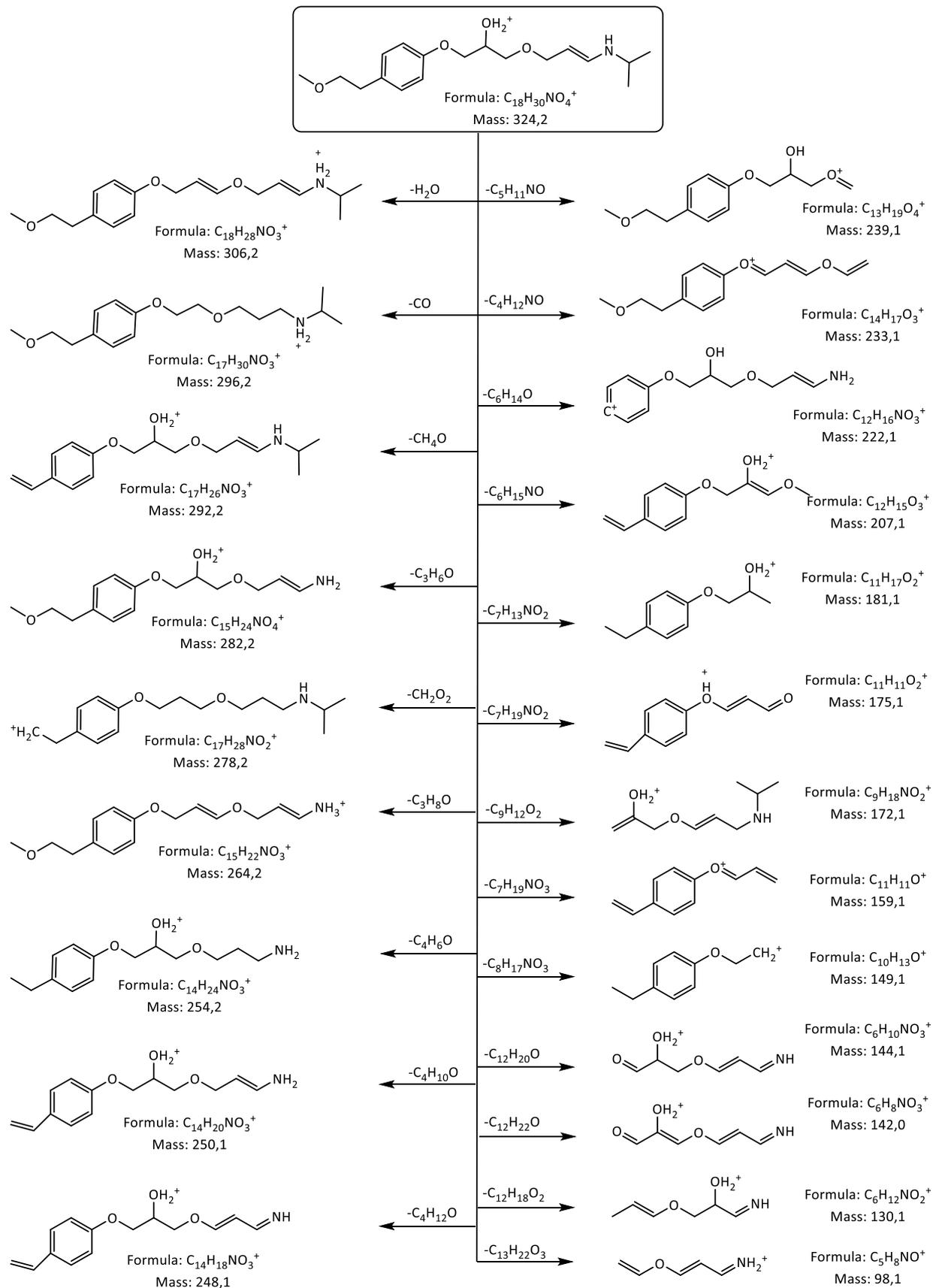


Abb. 202: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J ( $m/z = 342 \rightarrow 324$ ) mittels DIP-APCI detektiert

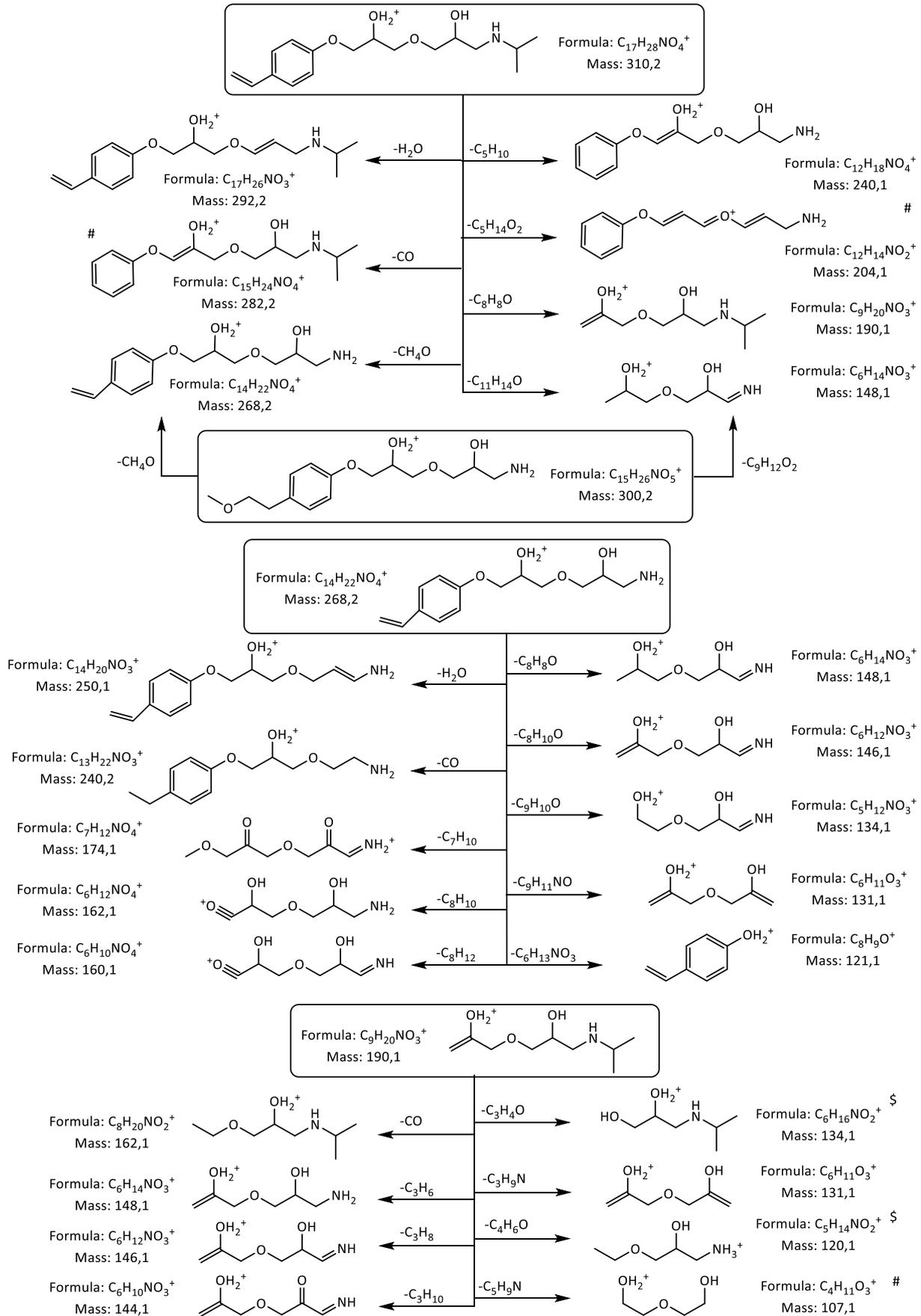


Abb. 203: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (Oben: m/z = 342 → 310; m/z = 342 → 300; Mitte: m/z = 342 → 268; Unten: m/z = 342 → 190) mittels DIP-APCI und DIP-EESI detektiert (# nur mittels DIP-EESI; \$ nur mittels DIP-APCI detektiert)

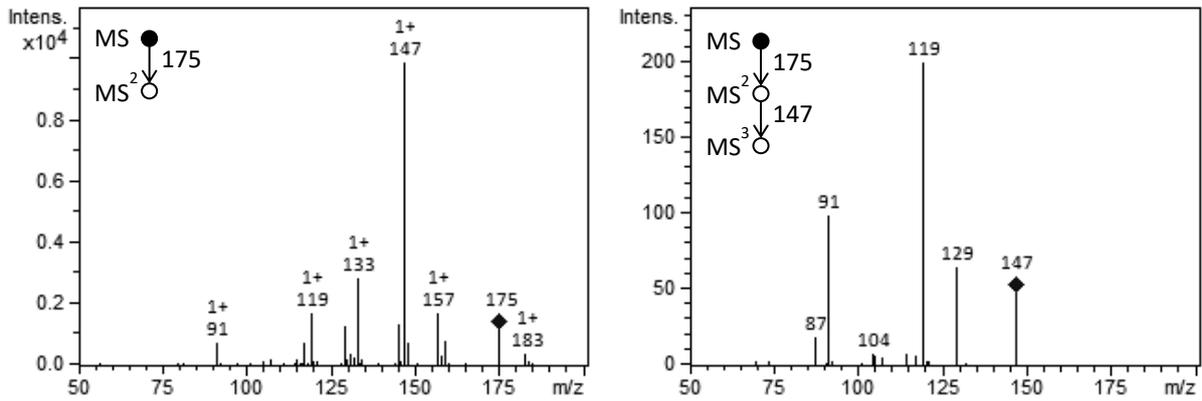


Abb. 204: Fragmentierung von  $m/z = 175$  nach Ionisierung mit DIP-APCI (potentielle Verunreinigung M)

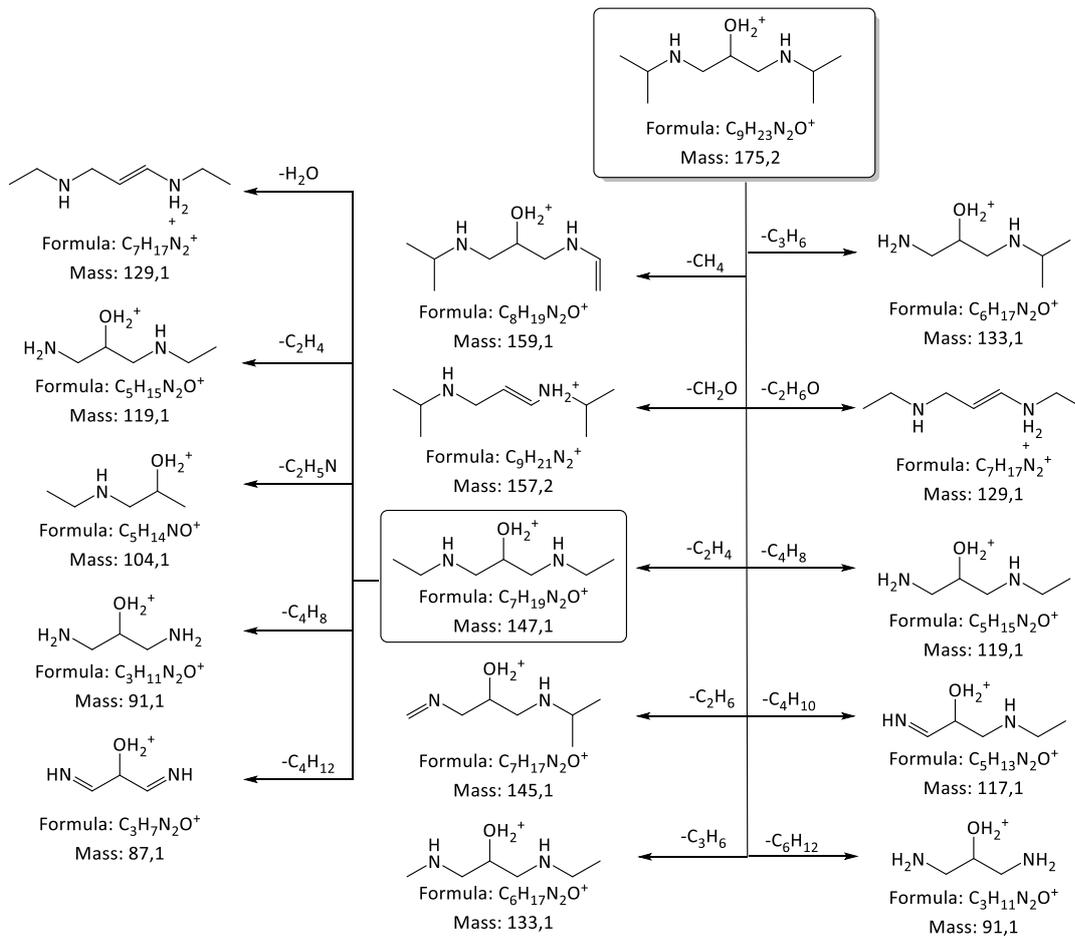


Abb. 205: Mögliche Fragmente der Verunreinigung M mittels DIP-APCI detektiert

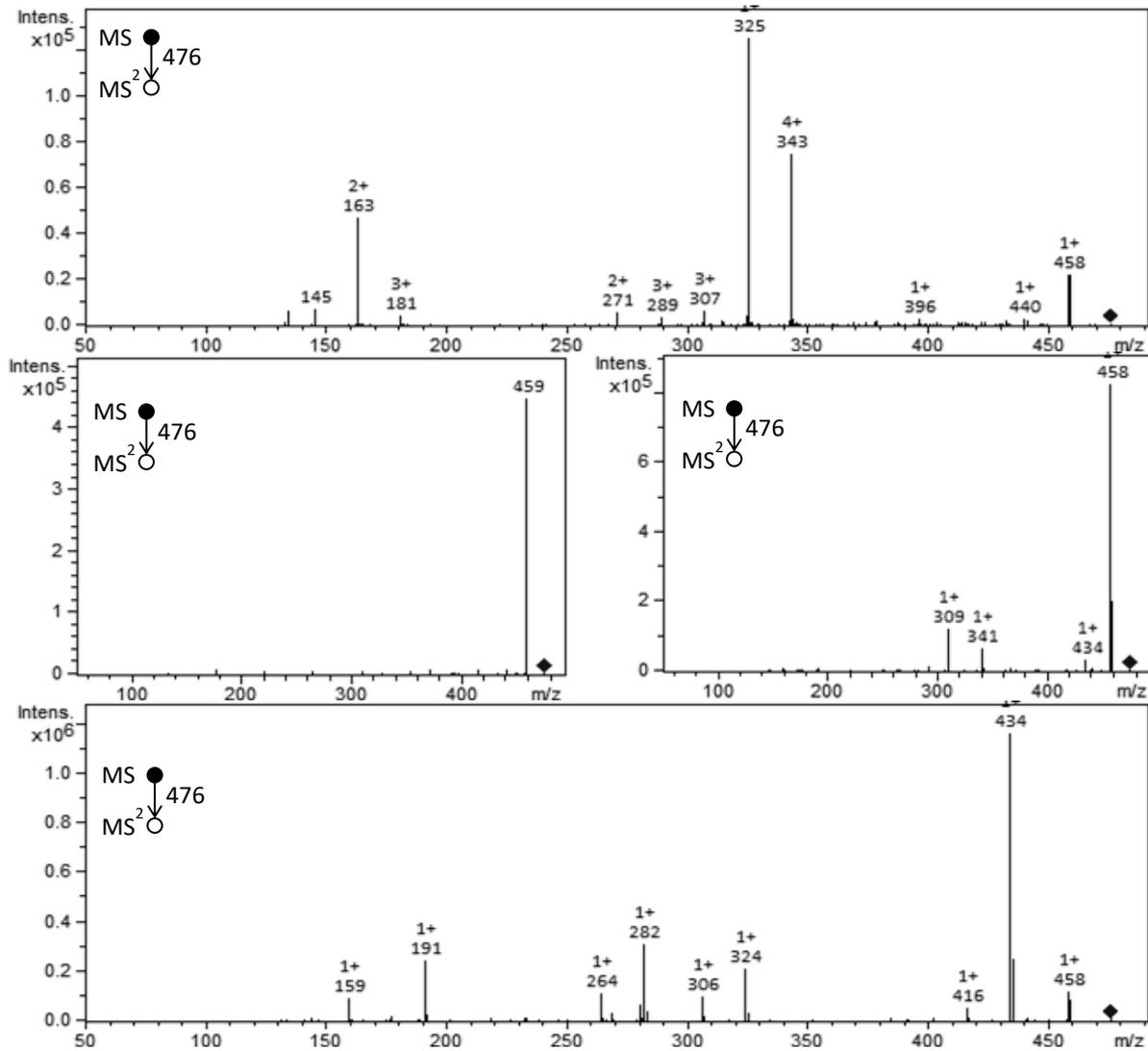


Abb. 206. Fragmentierung von  $m/z = 476$  mittels HPLC-ESI-MS. Oben  $RT = 1,1$  min; Mitte links  $RT = 2,8$  min, Mitte rechts  $RT = 9,7$  min; unten  $RT = 8,5$  min identifiziert als Verunreinigung O

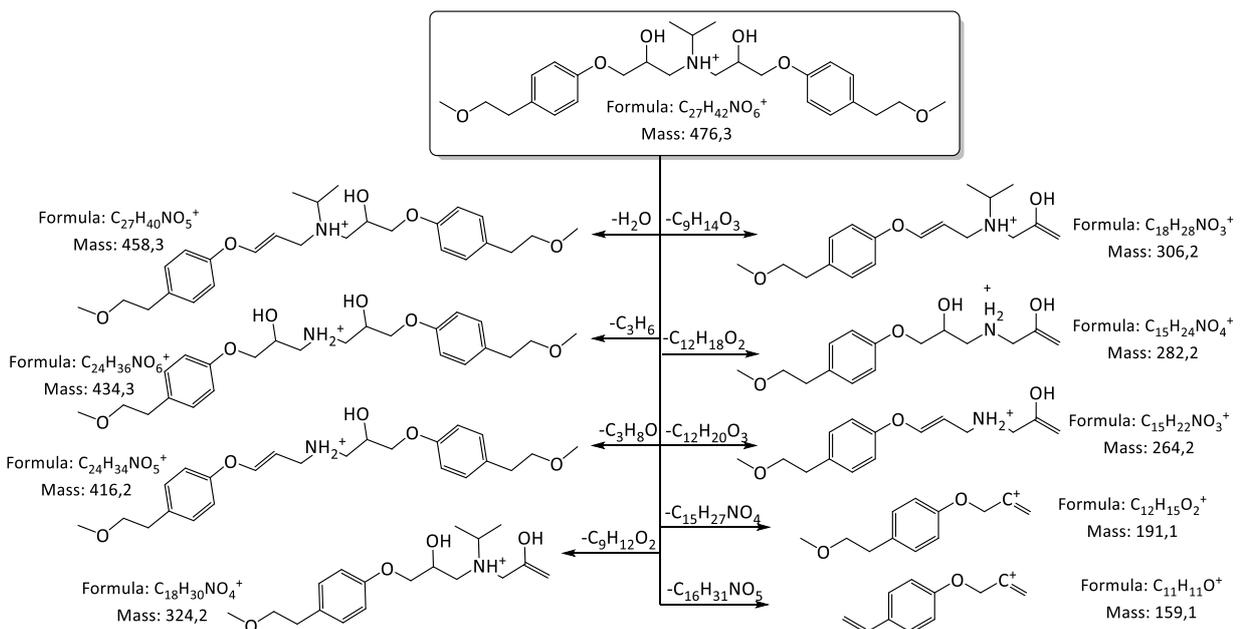


Abb. 207: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels HPLC-ESI-MS detektiert

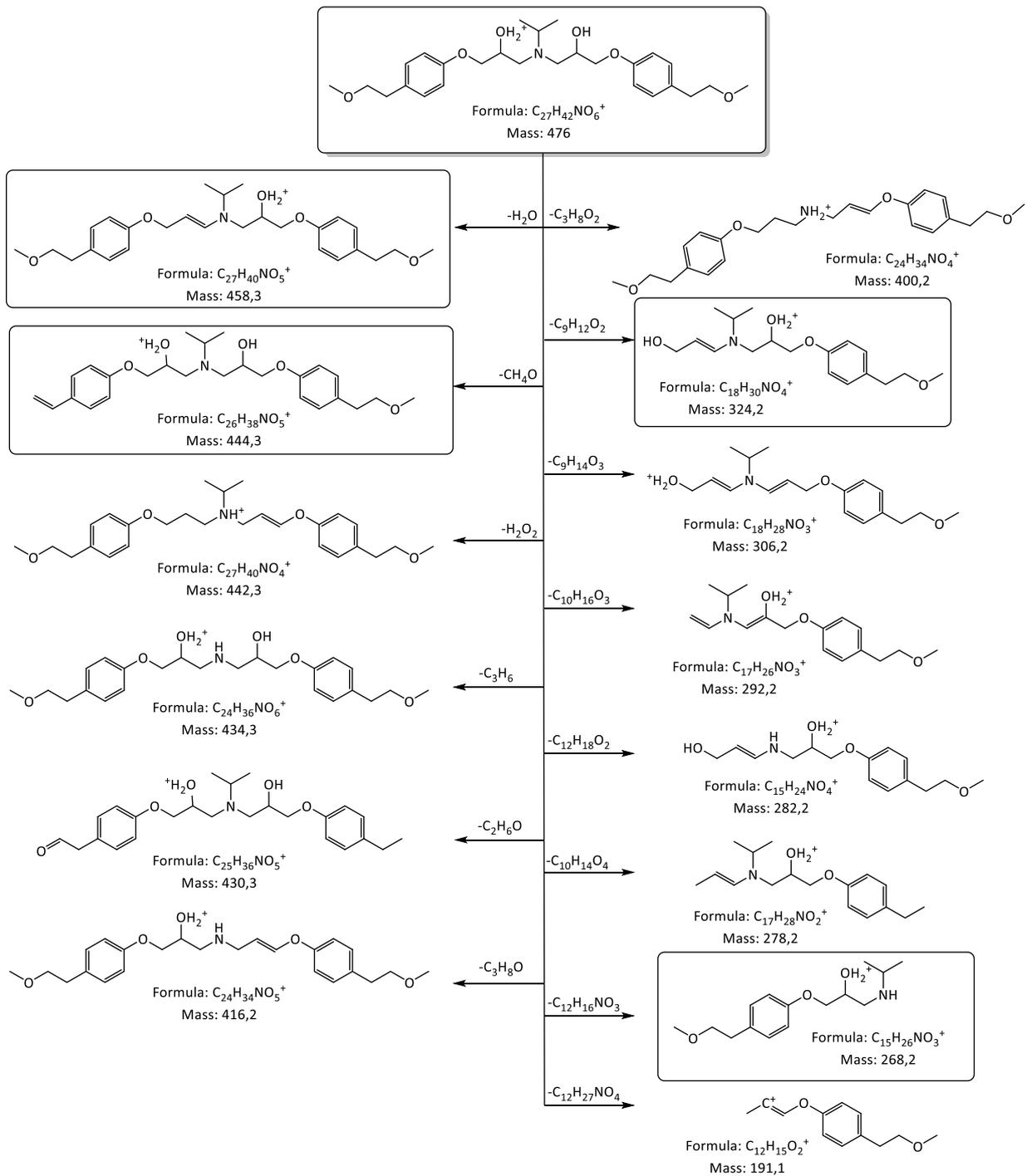


Abb. 208: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert ( $MS^2$   $m/z = 476$ )

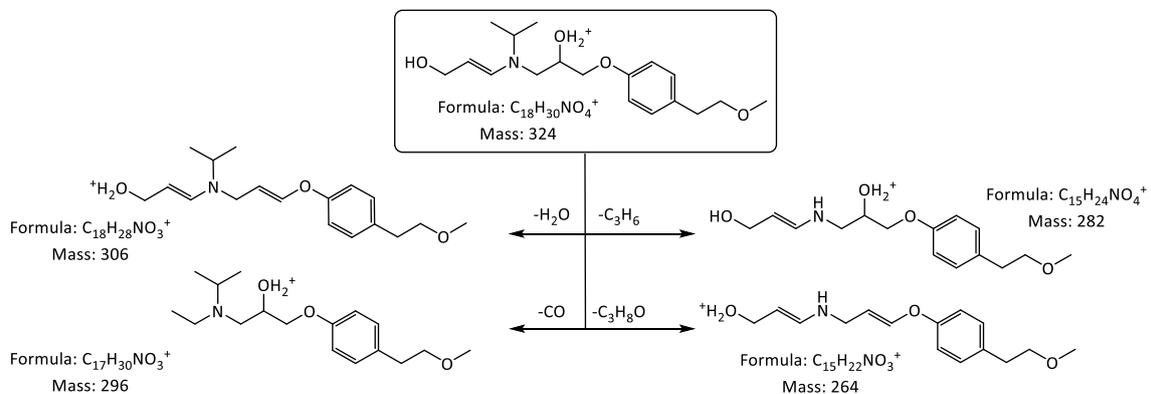
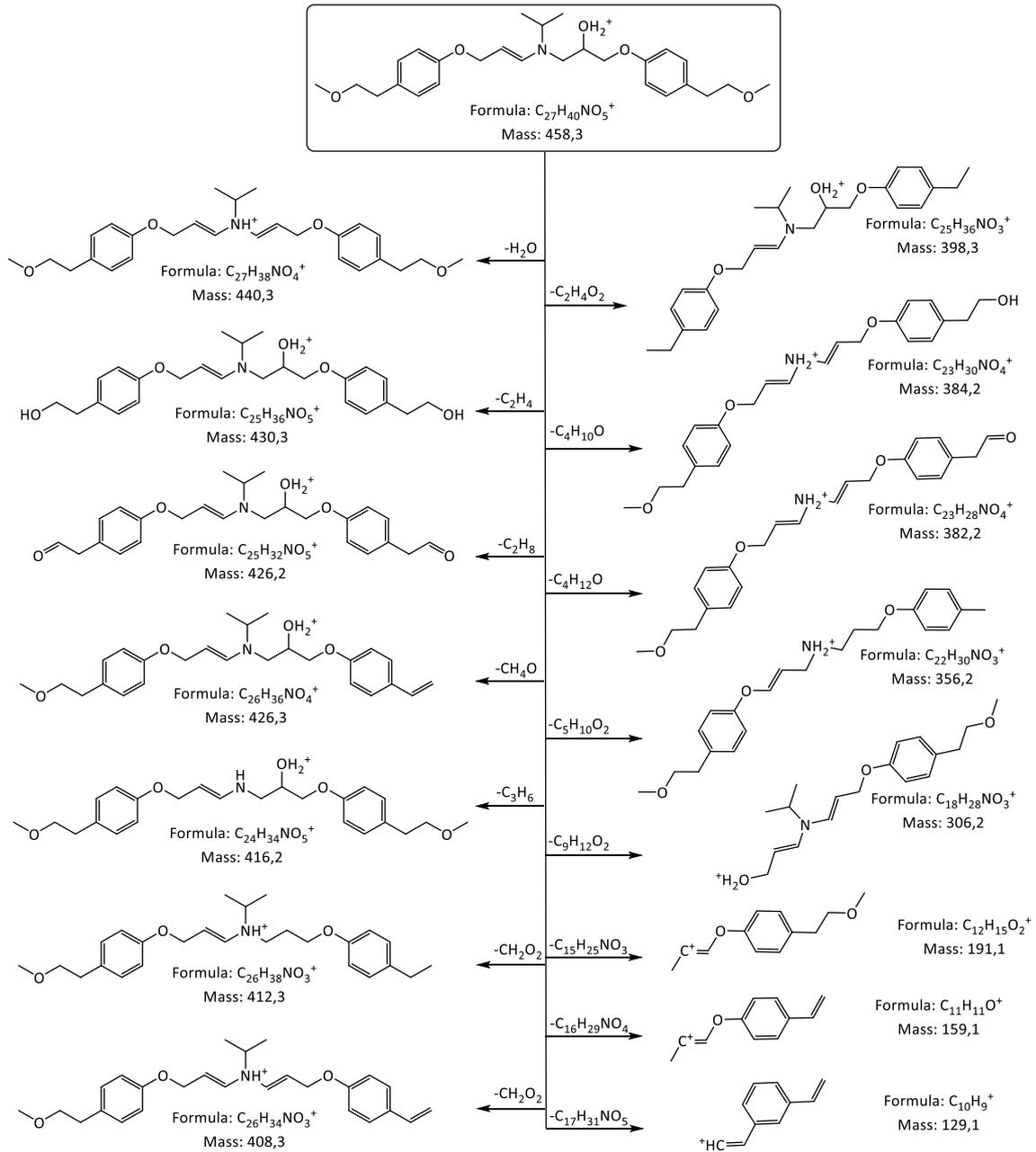


Abb. 209: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert (oben:  $m/z = 476 \rightarrow 458$ ; unten:  $m/z = 476 \rightarrow 324$ )

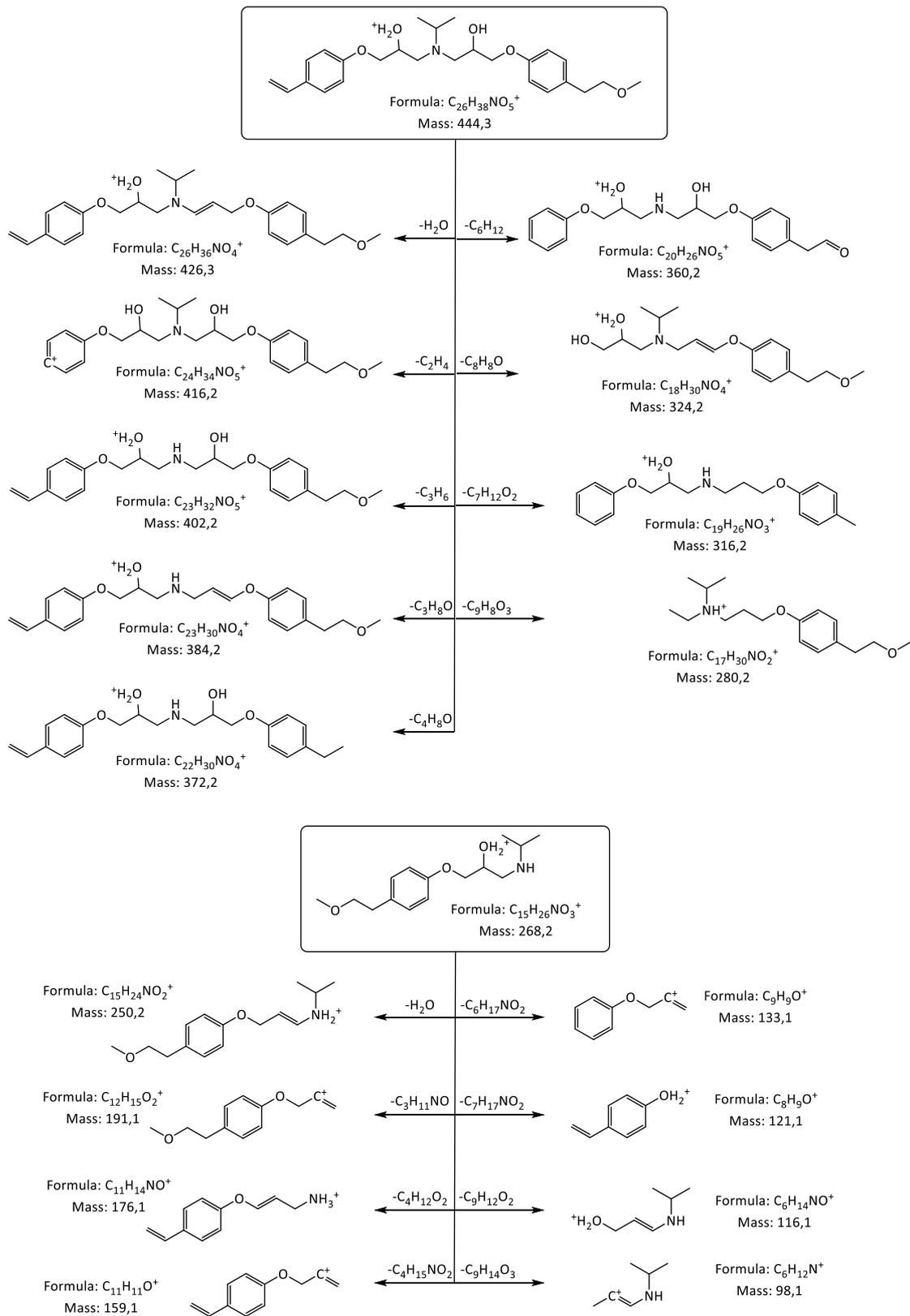
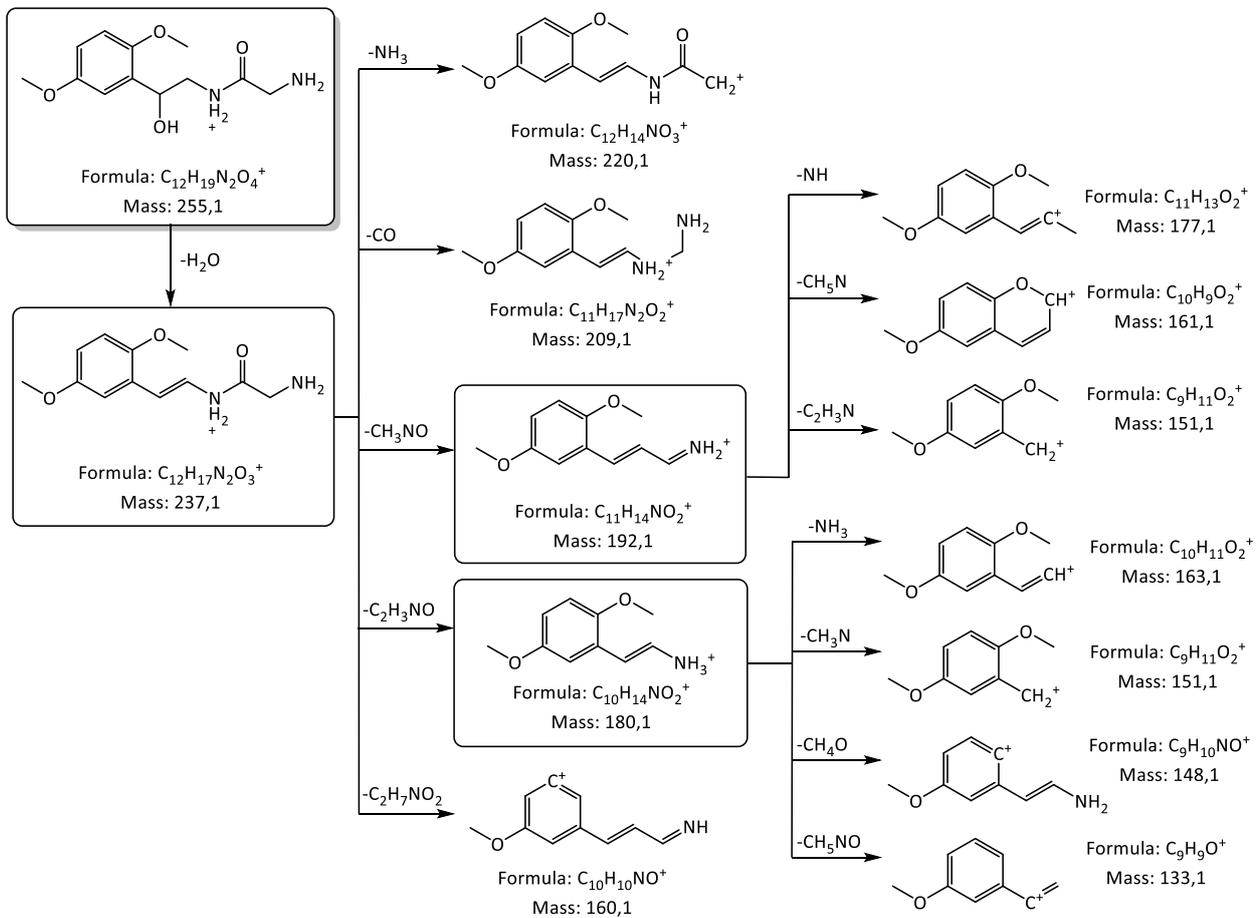
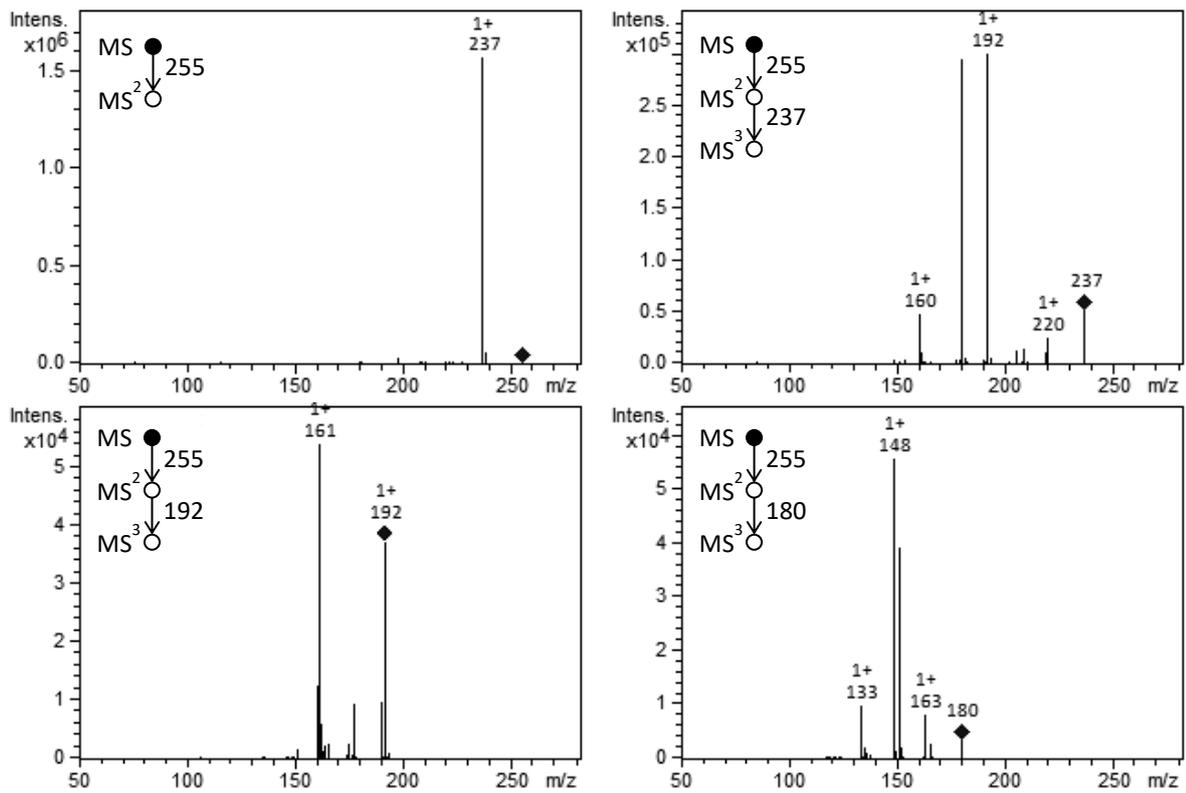
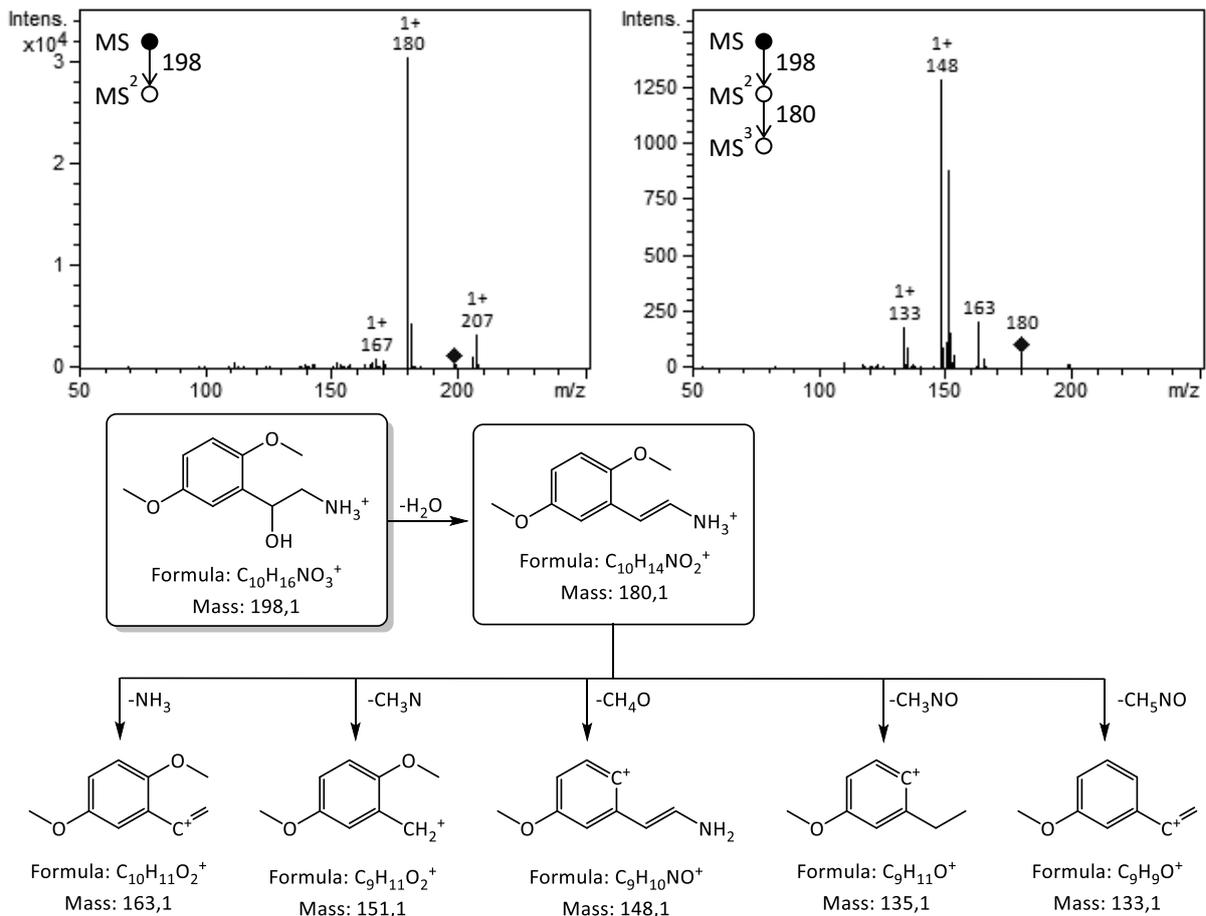
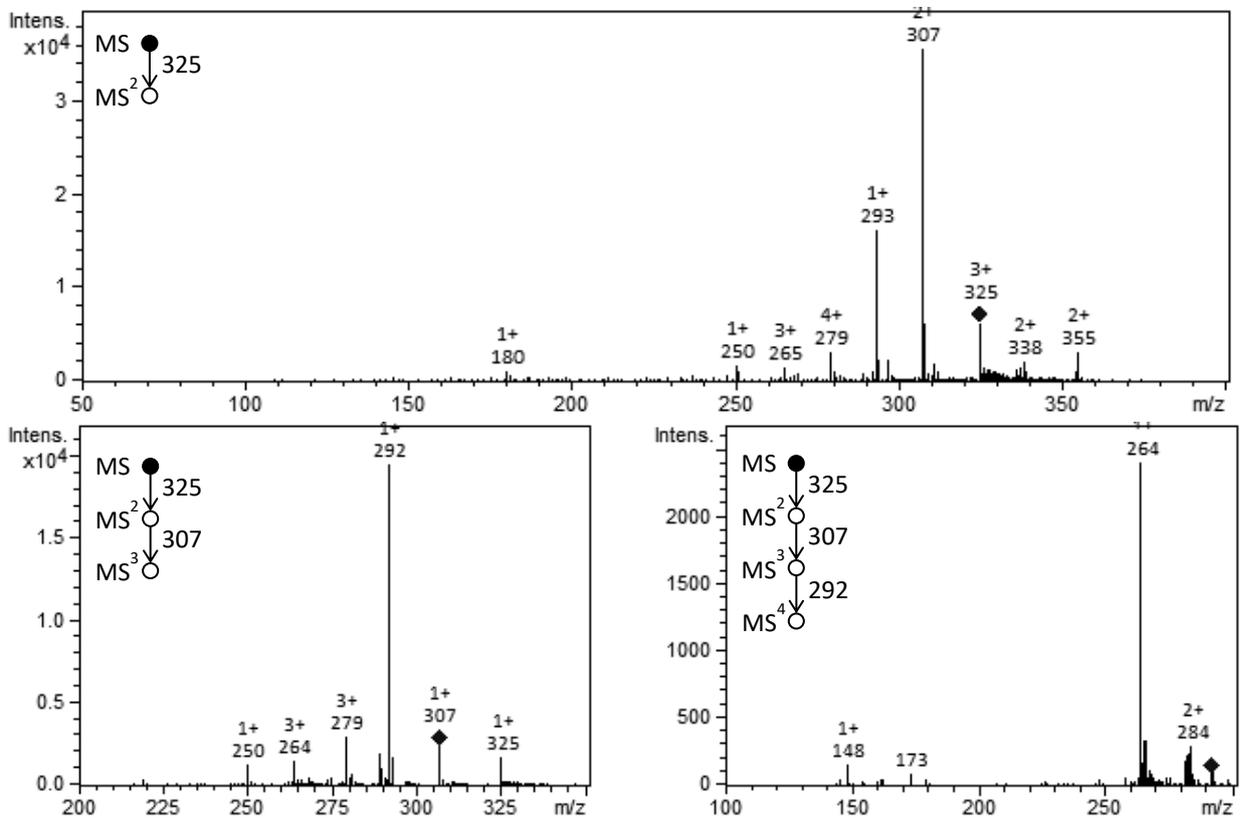


Abb. 210: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert (oben:  $m/z = 476 \rightarrow 444$ ; unten:  $m/z = 476 \rightarrow 268$ )

## 6.2.5 Midodrin

Abb. 211: DIP-APCI  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren des Wirkstoffes Midodrin sowie mögliche Fragmente

Abb. 212: Fragmentierung von  $m/z = 198$  potentielle Verunreinigung AAbb. 213: MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren der unbekannte Verunreinigung  $m/z = 325$  detektiert mit DIP-EESI

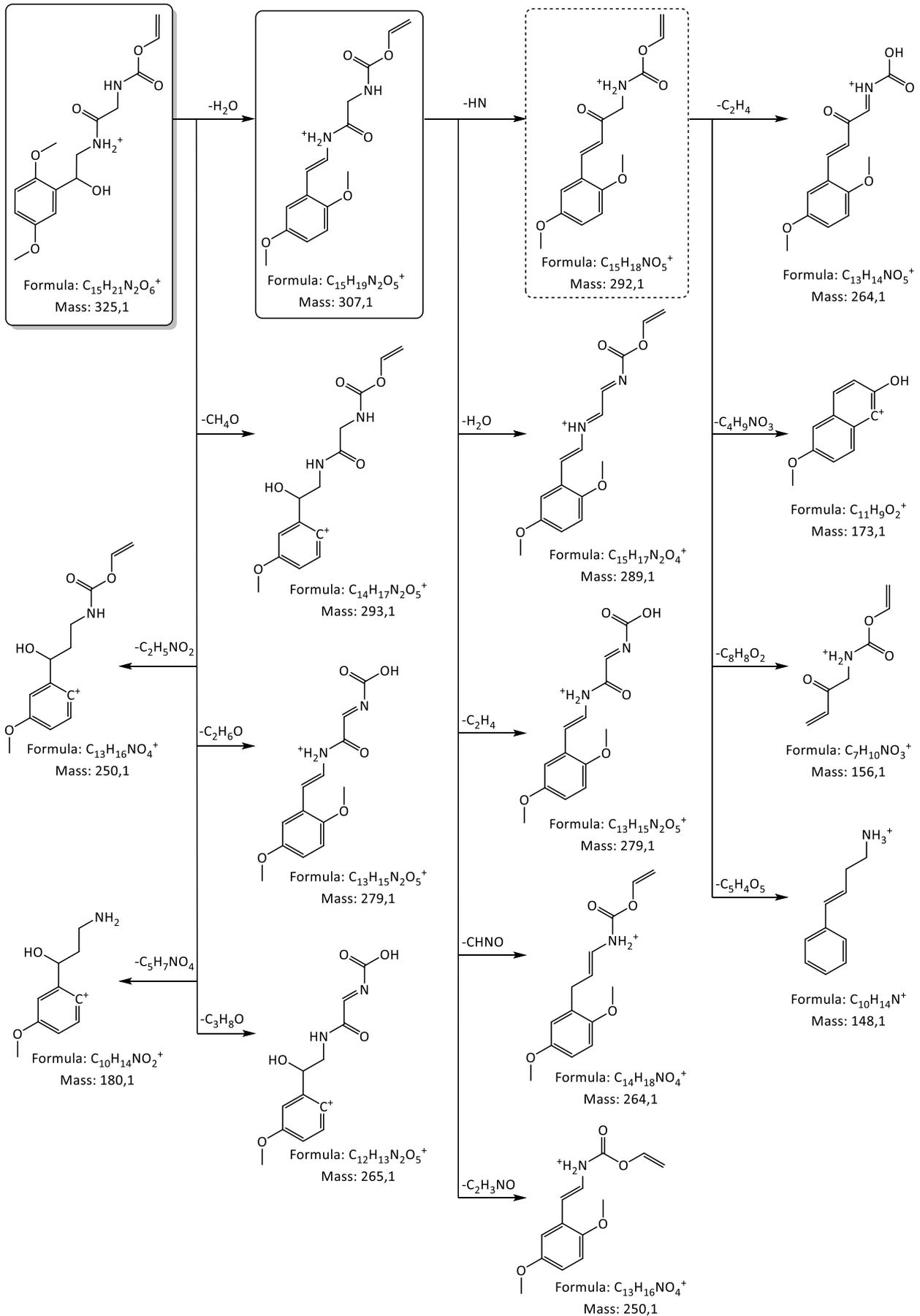


Abb. 214: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntem Verunreinigung mit  $m/z = 325$  detektiert mit DIP-EESI

## 6.2.6 Mirtazapin

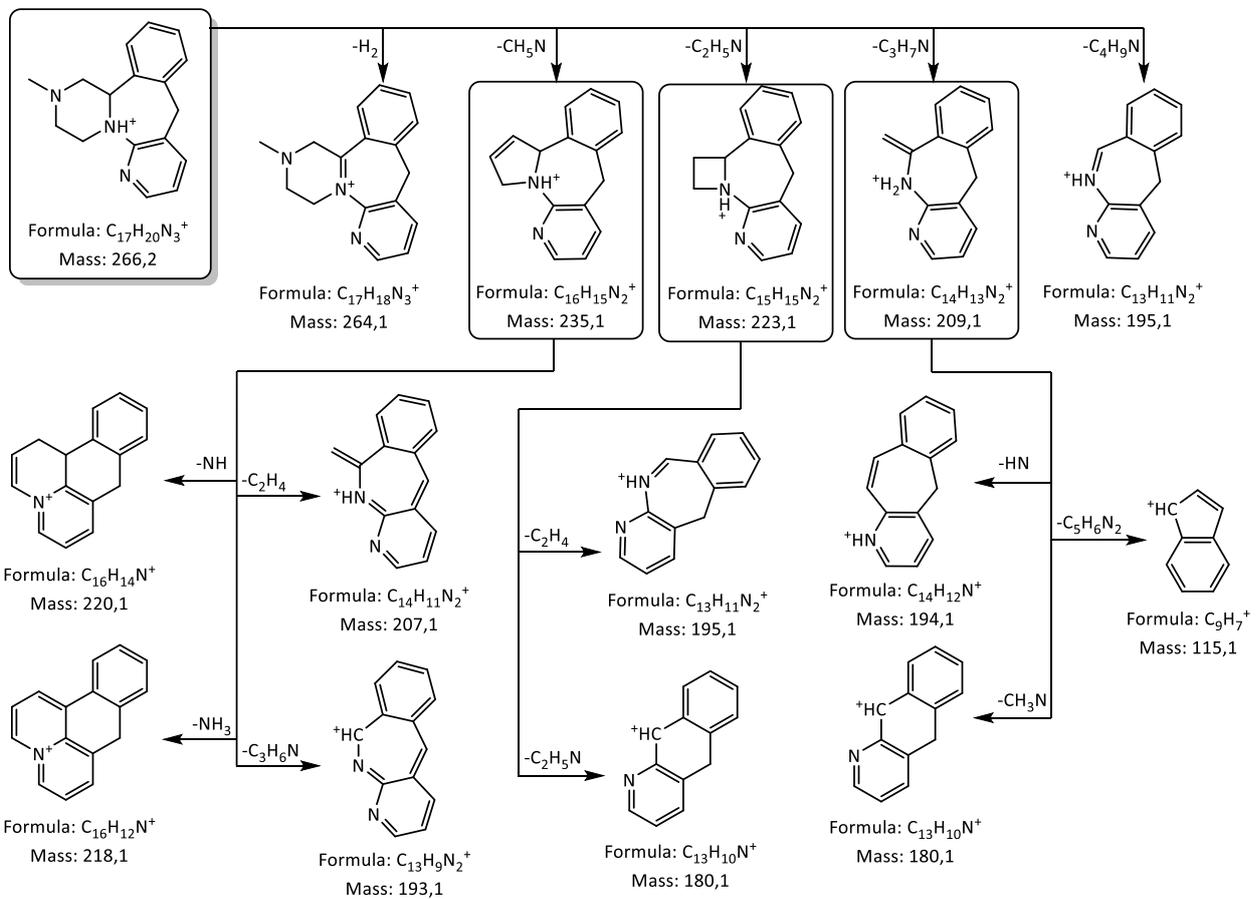
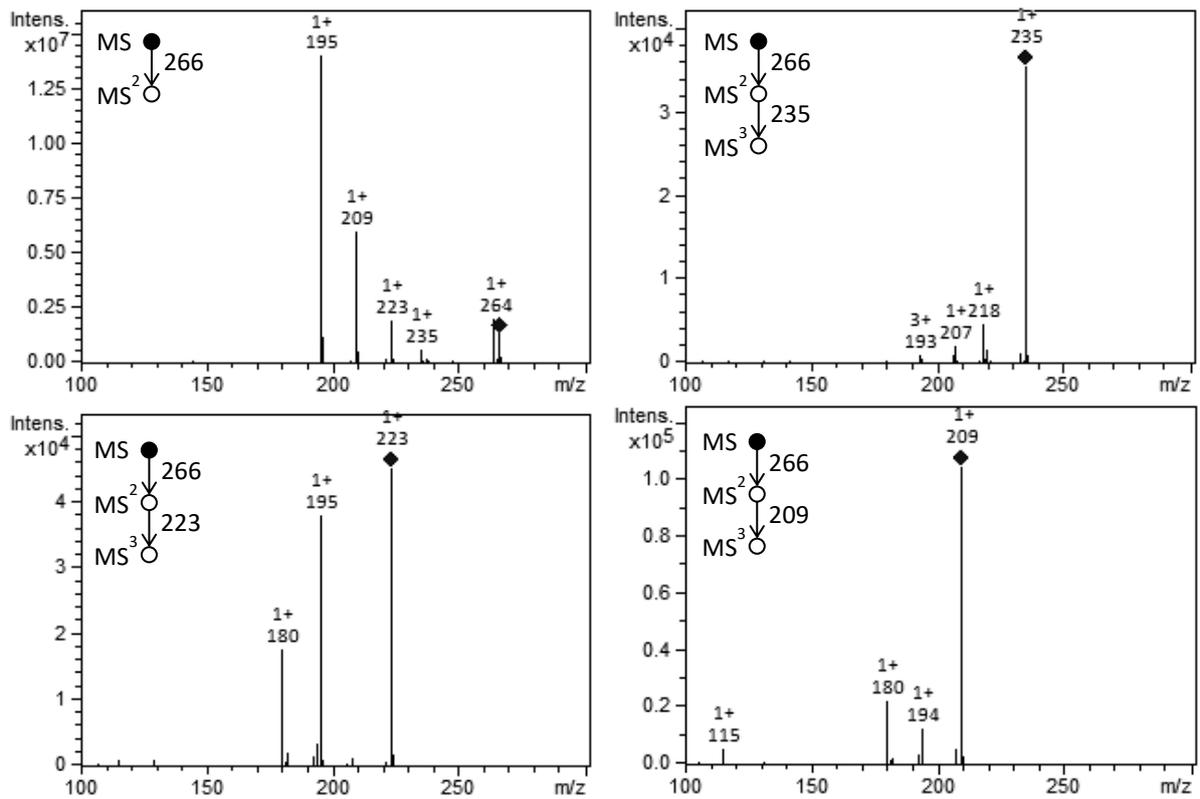


Abb. 215: DIP-EESI MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren des Wirkstoffes Mirtazapin sowie unten mögliche Fragmente (in Übereinstimmung mit Smyth et al. [222] (mit DIP-APCI wurde dieselben Spektren detektiert; nicht gezeigt)

## 6.2.7 Pipamperon

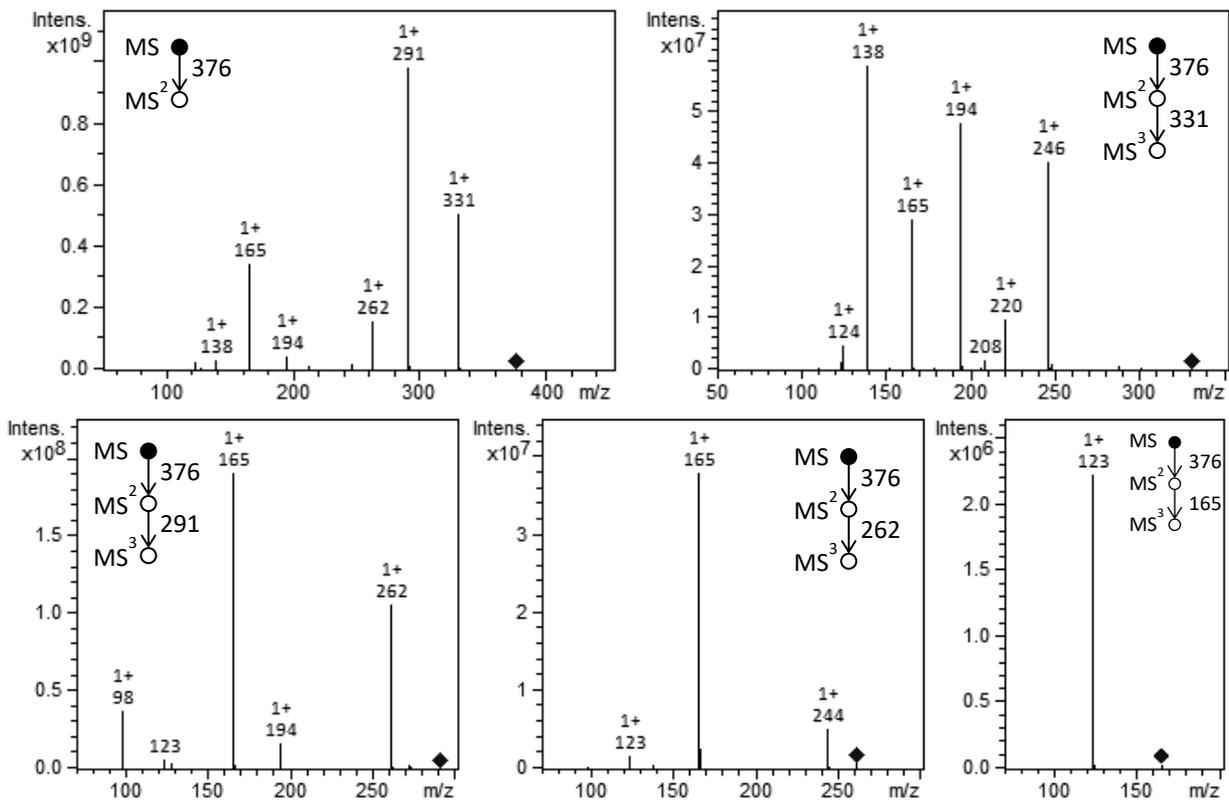


Abb. 216: DIP-APCI MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren des Wirkstoffes Pipamperon (mittels DIP-EESI wurde dieselben Spektren detektiert; nicht gezeigt)

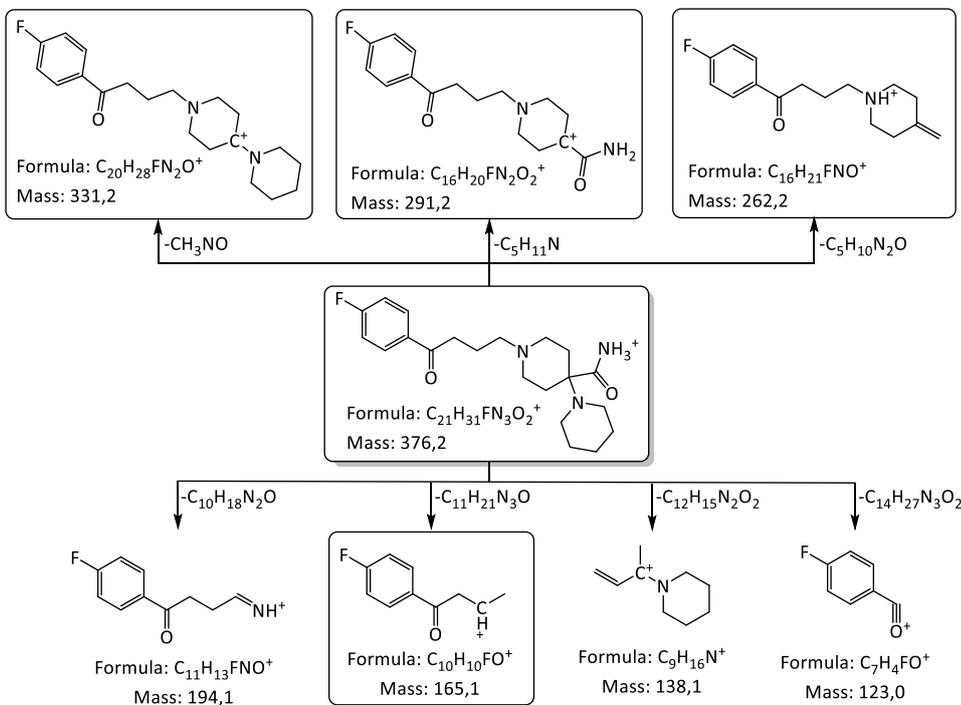
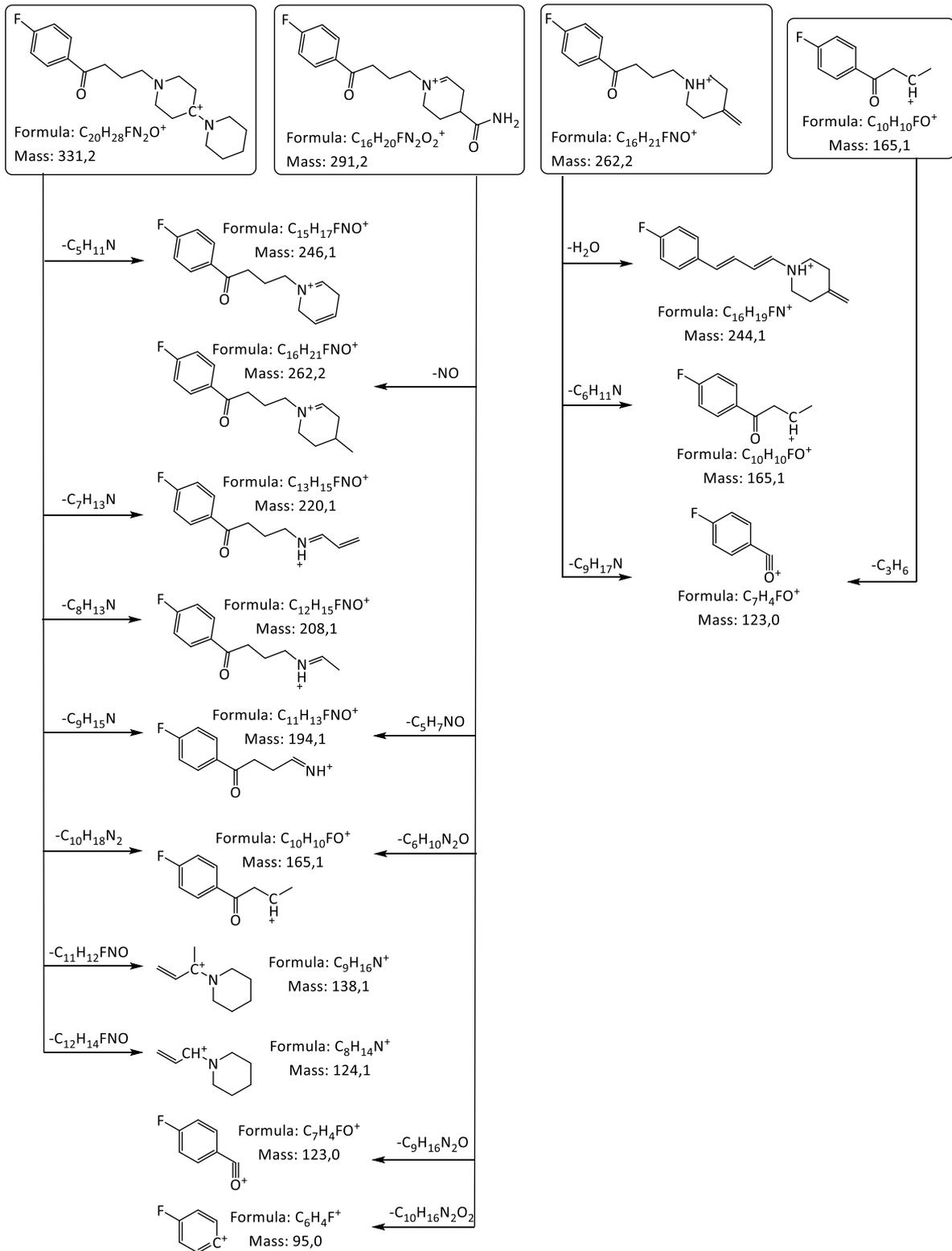


Abb. 217: Mögliche Fragmente des Wirkstoffes Pipamperon, wie sie durch MS<sup>2</sup>-Fragmentierung erhalten wurden


 Abb. 218: Mögliche Fragmente des Wirkstoffes Pipamperon durch MS<sup>3</sup>-Fragmentierung

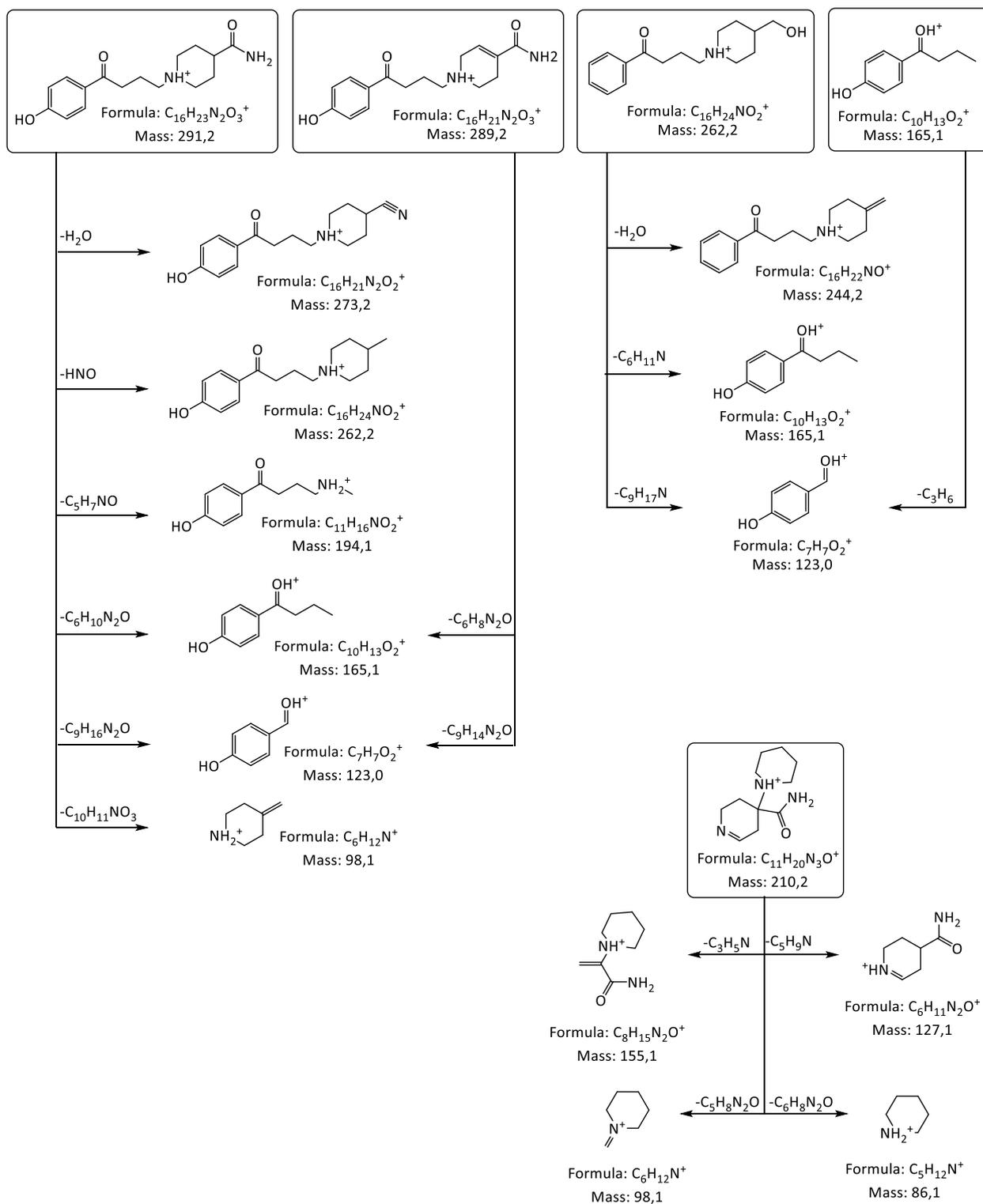


Abb. 219: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B durch  $MS^3$ -Fragmentierung.

## 6.2.8 Primidon

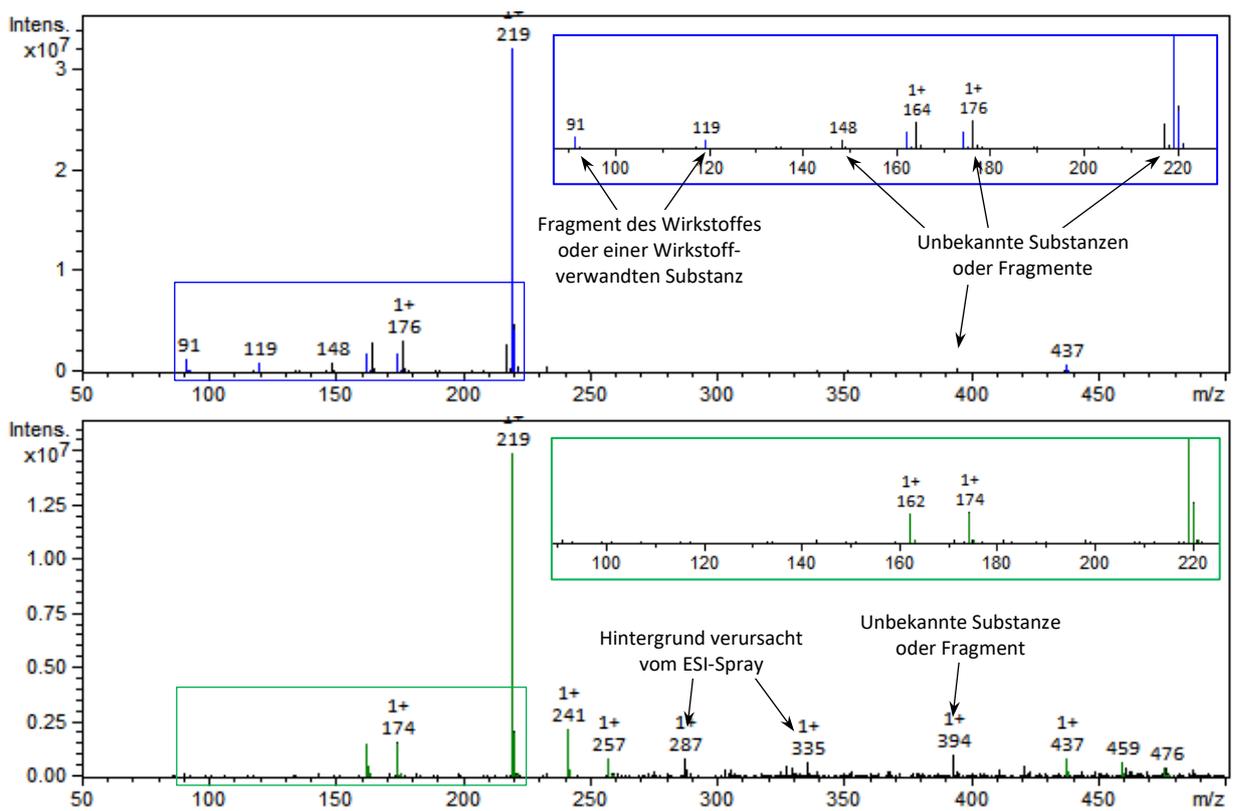


Abb. 220: Average Mass Spectrum von Primidon-Tabletten. Oben Ionisierung mittels DIP-APCI. Unten Ionisierung mittels DIP-EESI. Jeweils oben rechts dargestellt die Vergrößerung des  $m/z$ -Bereich 90 – 225. Blau bzw. grün markiert das  $[M+H]^+$   $m/z$  = 219 sowie die identifizierten Fragmente des Wirkstoffes

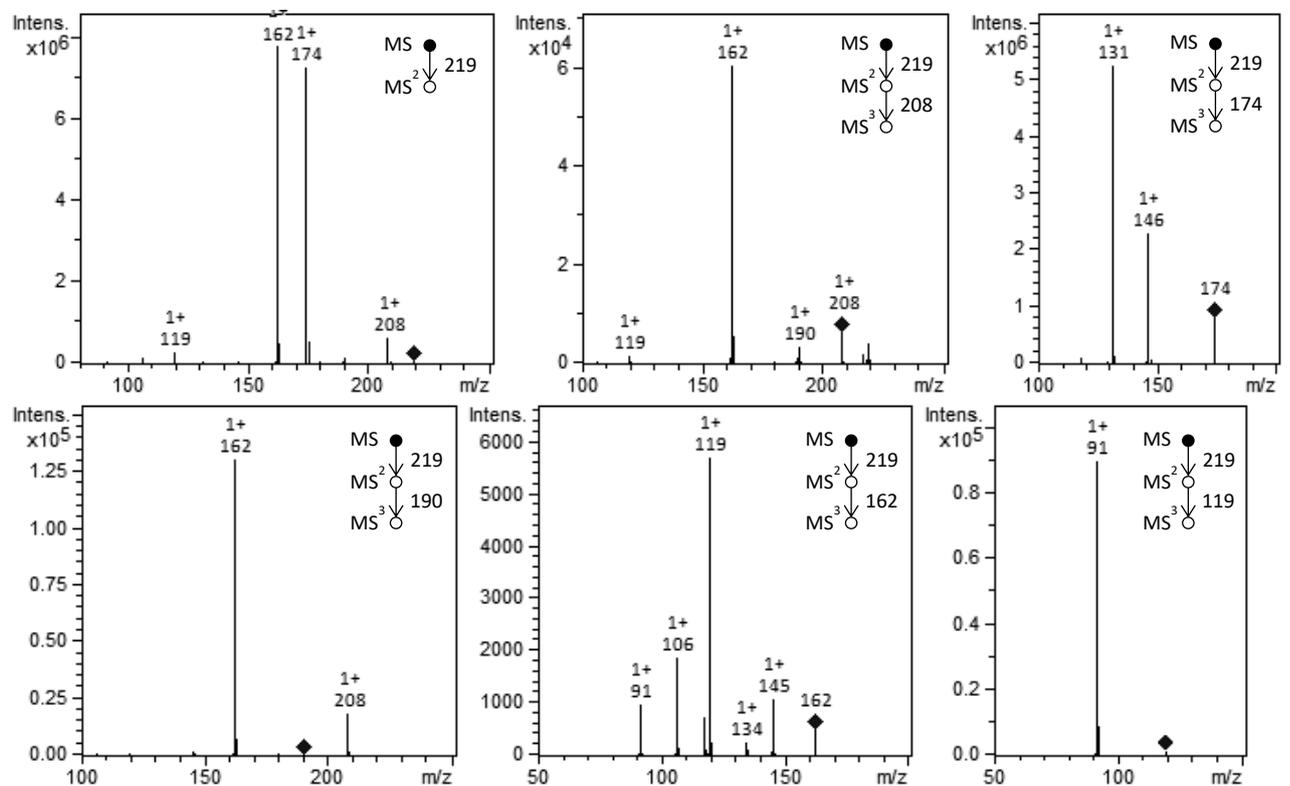


Abb. 221: DIP-APCI  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren des Wirkstoffes Pipamperon (mittels DIP-EESI wurde die gleichen Spektren detektiert; nicht gezeigt)

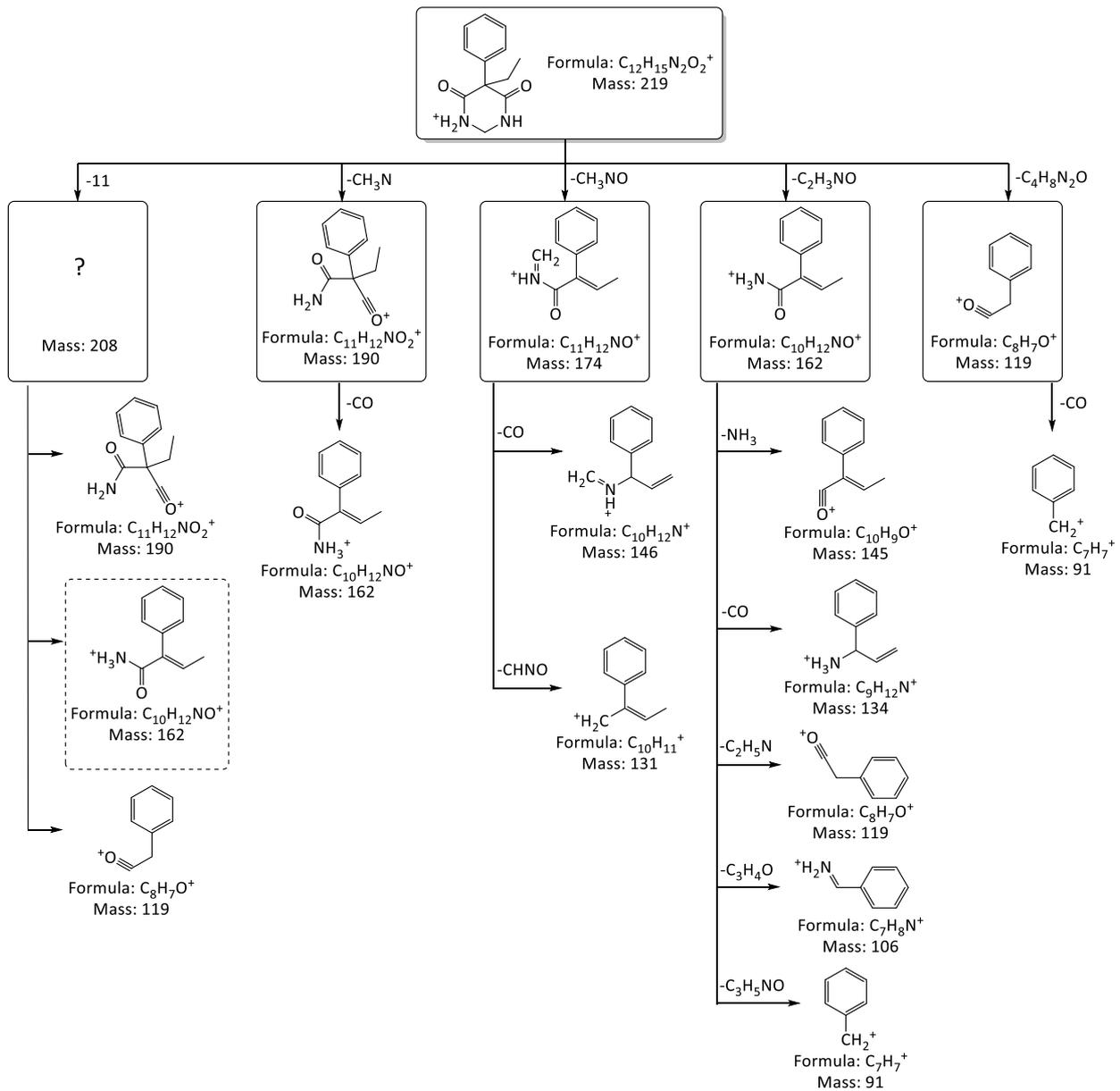


Abb. 222: Mögliche Fragmente des Wirkstoffs Pipamperon, wie sie durch  $MS^2$  und  $MS^3$ -Fragmentierung erhalten wurden

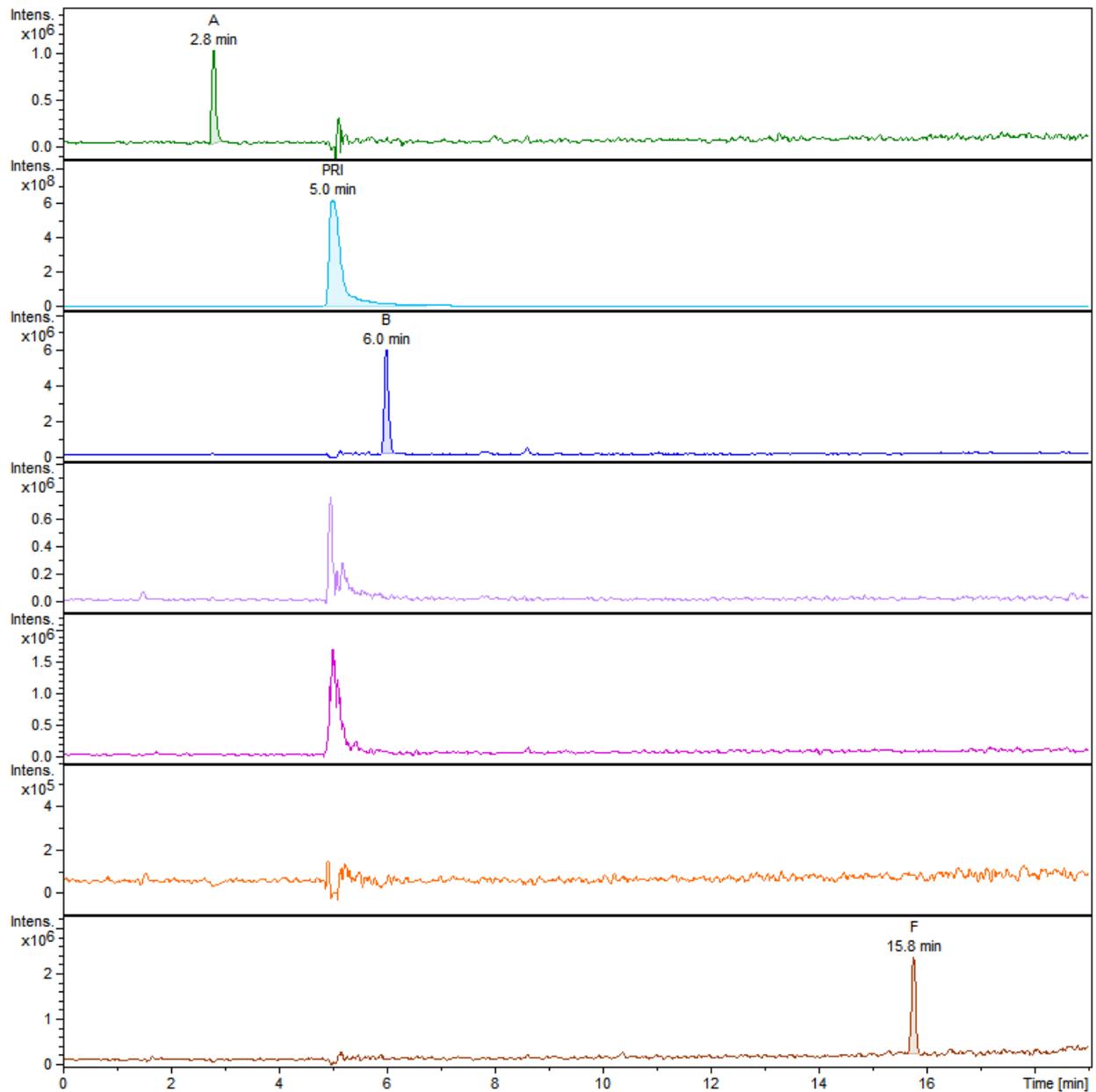


Abb. 223: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme von Primidon-Tabletten: grün: EIC der protonierten Verunreinigung A ( $m/z = 207$ ; RT: 2,8 min); hellblau: EIC des Wirkstoffs Primidon ( $m/z = 219$ ; RT: 5,0 min), blau: EIC der protonierten Verunreinigung B ( $m/z = 233$ ; RT: 6,0 min); violett EIC der protonierten Verunreinigung C ( $m/z = 164$ , wurde nicht detektiert), pink EIC der protonierten Verunreinigung D ( $m/z = 189$ , wurde nicht detektiert), orange: EIC der protonierten Verunreinigung E ( $m/z = 165$ , wurde nicht detektiert), braun: EIC der protonierten Verunreinigung F ( $m/z = 337$ ; RT: 15,8 min)

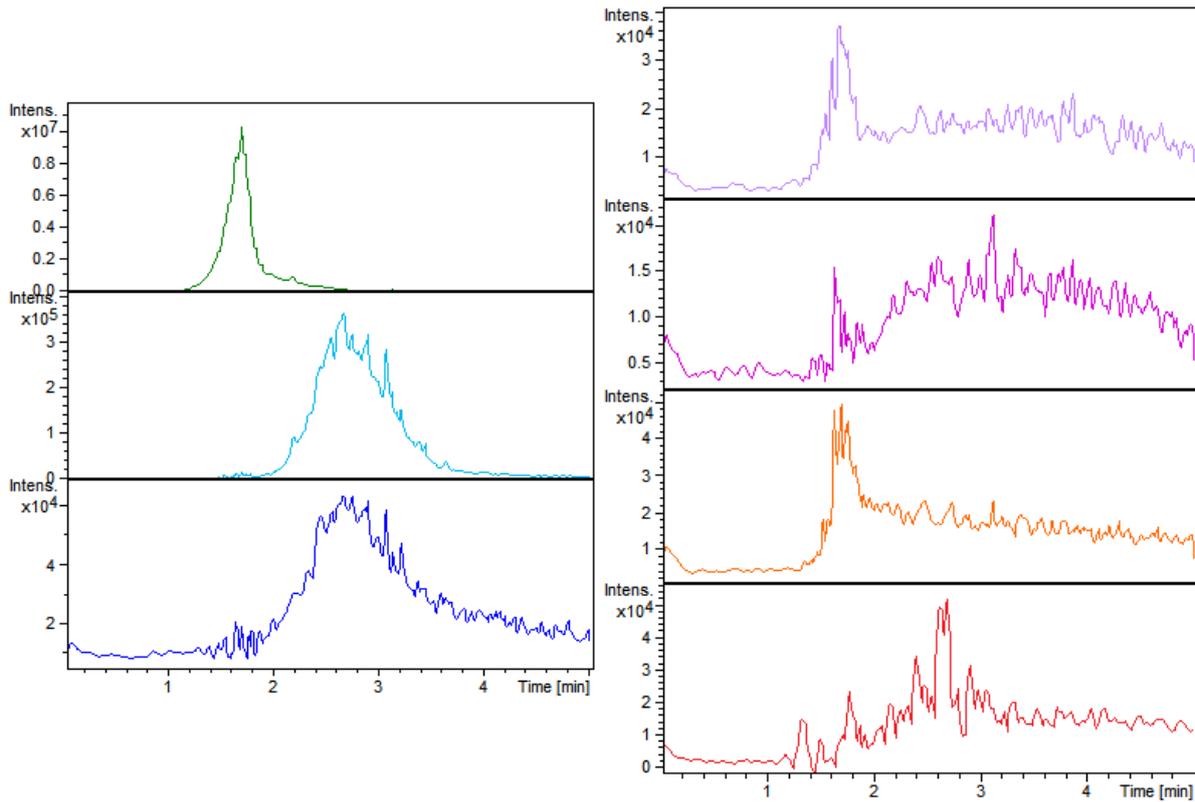


Abb. 224: DIP-APCI-MS-Chronogramme von Primidon-Tabletten: grün: EIC des Wirkstoffs Primidone ( $m/z = 219$ ), hellblau: EIC der protonierten Verunreinigung C ( $m/z = 164$ ), blau: EIC der protonierten Verunreinigung E ( $m/z = 165$ ), violett: EIC der protonierten Verunreinigung D ( $m/z = 189$ ), pink: EIC der protonierten Verunreinigung A ( $m/z = 207$ ), orange: EIC der protonierten Verunreinigung B ( $m/z = 233$ ), rot: EIC der protonierten Verunreinigung F ( $m/z = 337$ )

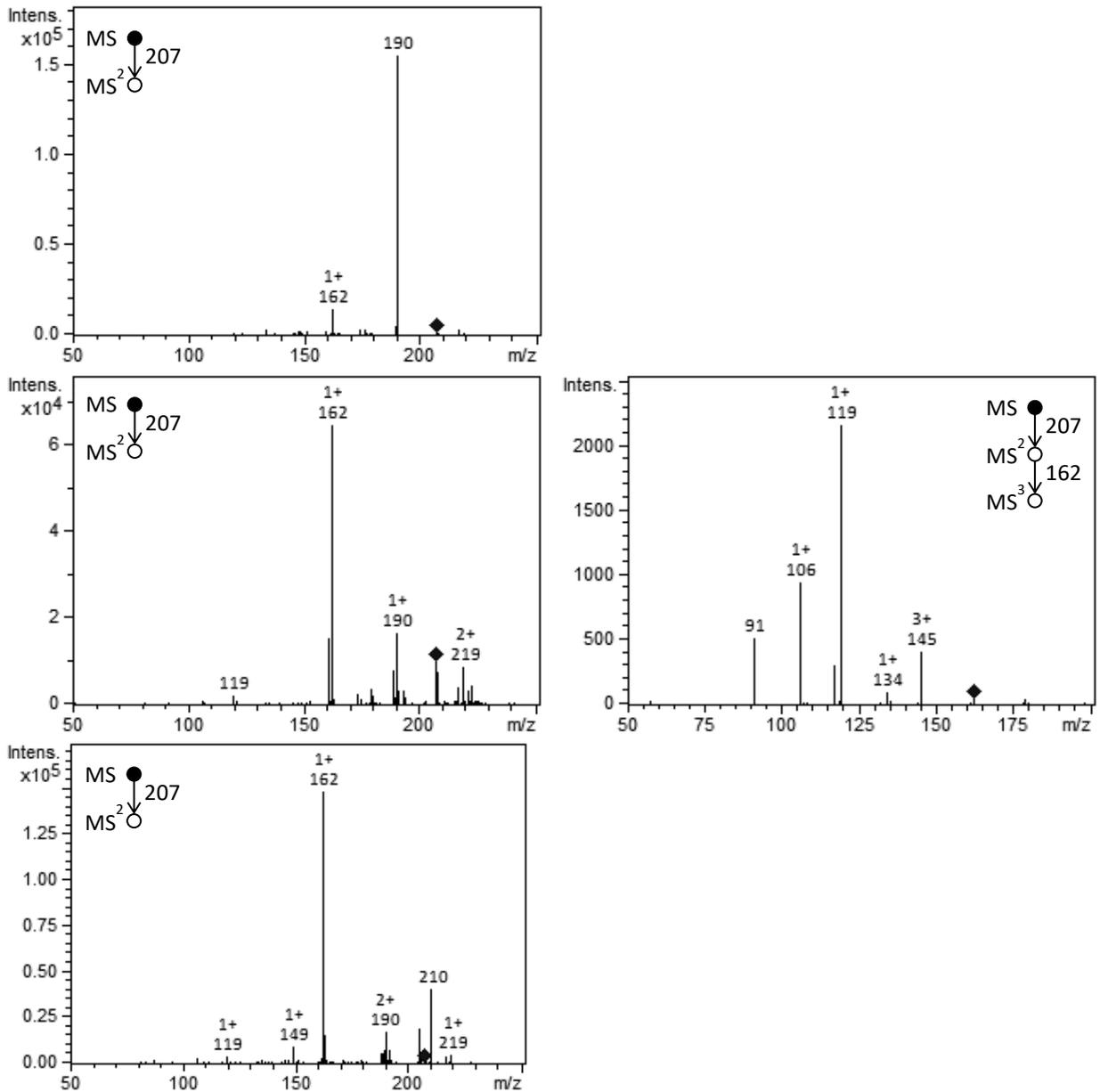


Abb. 225: Fragmentierung von  $m/z = 207$  potentielle Verunreinigung A. Oben DIP-APCI; Mitte DIP-EESI (Die Ionisierung der Fragmentspektren erfolgte mit DIP-EESI) und unten HPLC-ESI-MS (RT: 2,8 min)

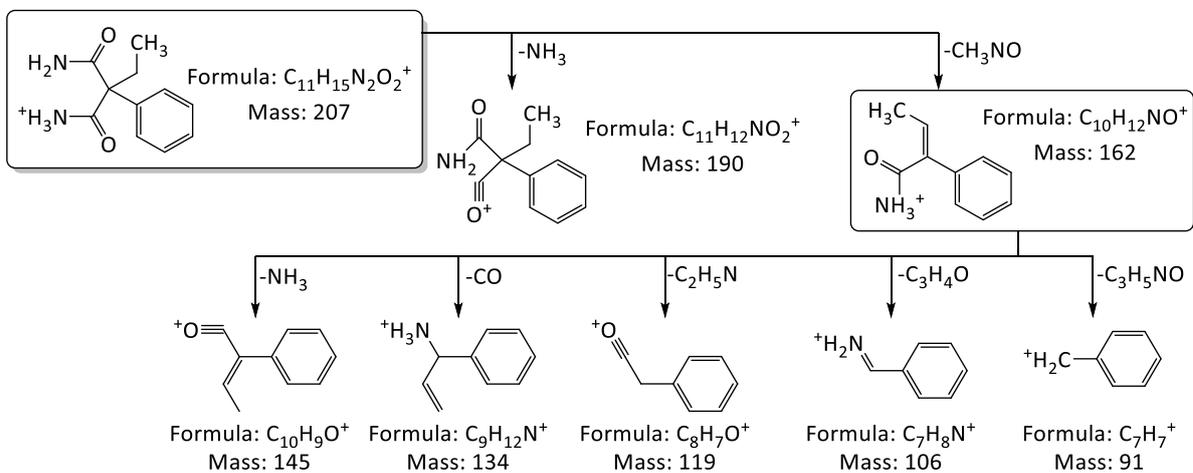


Abb. 226: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A.

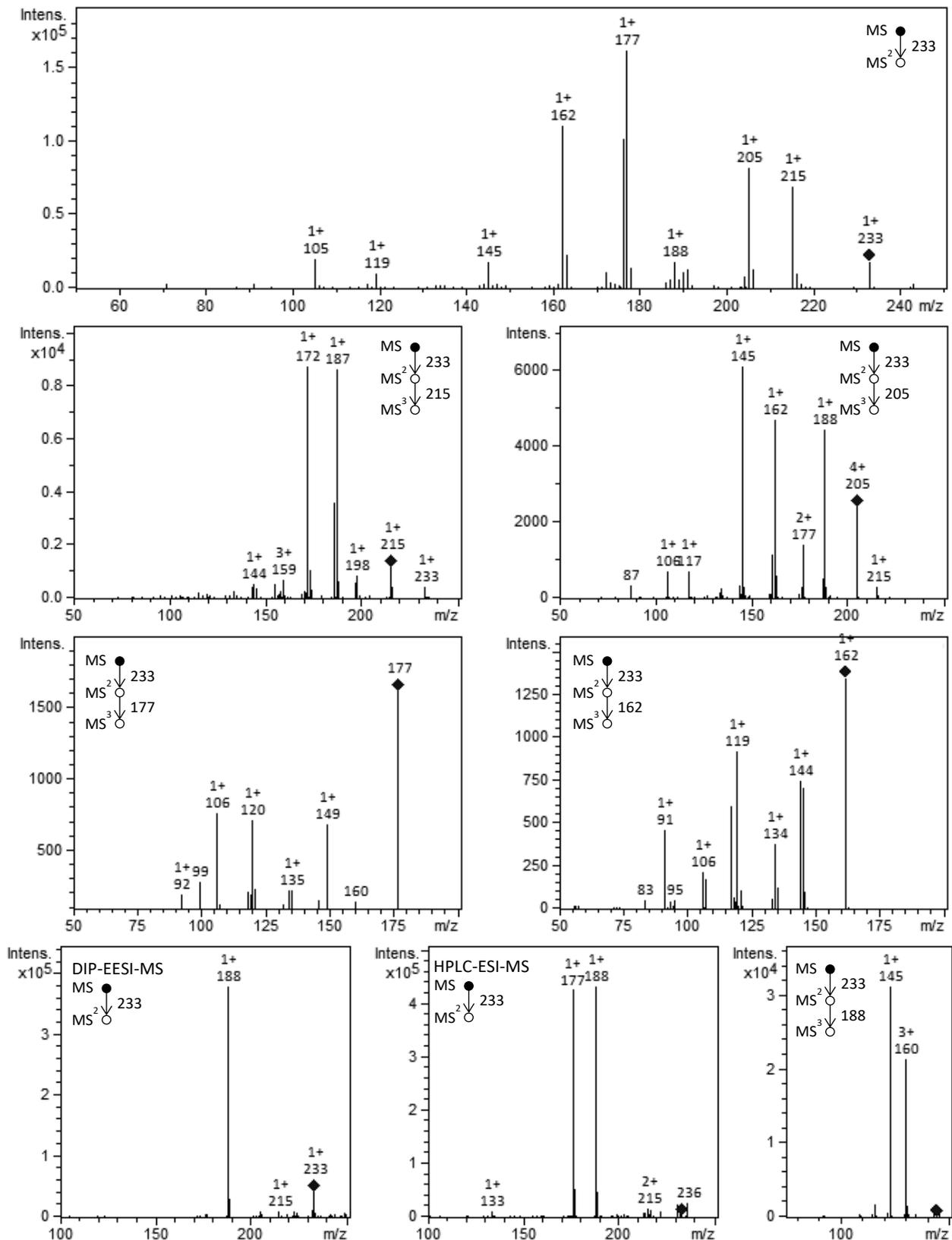


Abb. 227: Fragmentierung von  $m/z = 233$  potentielle Verunreinigung B. Oben DIP-APCI gefolgt von den MS<sup>3</sup>-Spektren; unten links DIP-EESI; unten Mitte und unten rechts HPLC-ESI-MS (RT: 6,0 min)

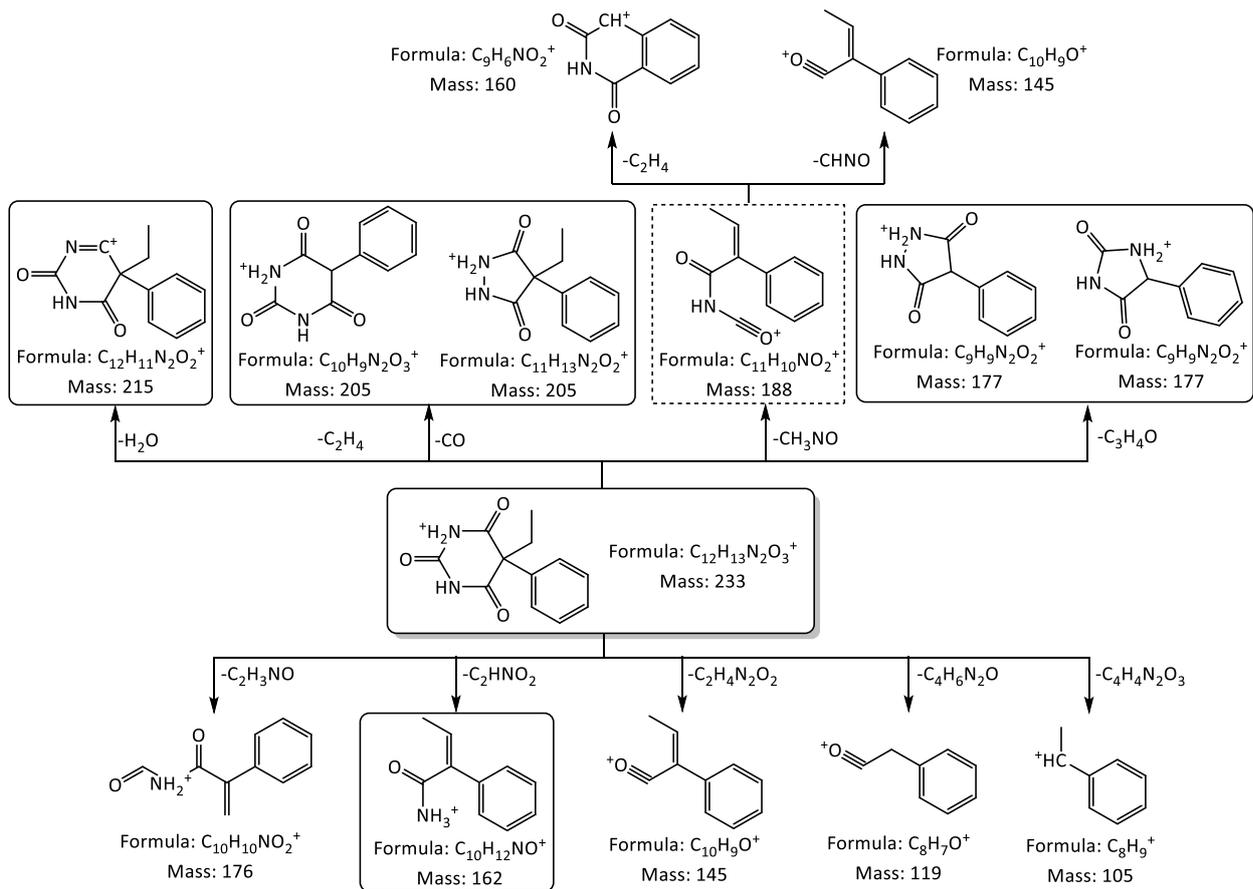


Abb. 228: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B. wie sie durch  $MS^3$ -Fragmentierung erhalten wurden. Die Ionisierung erfolgte ausschließlich mit DIP-APCI.

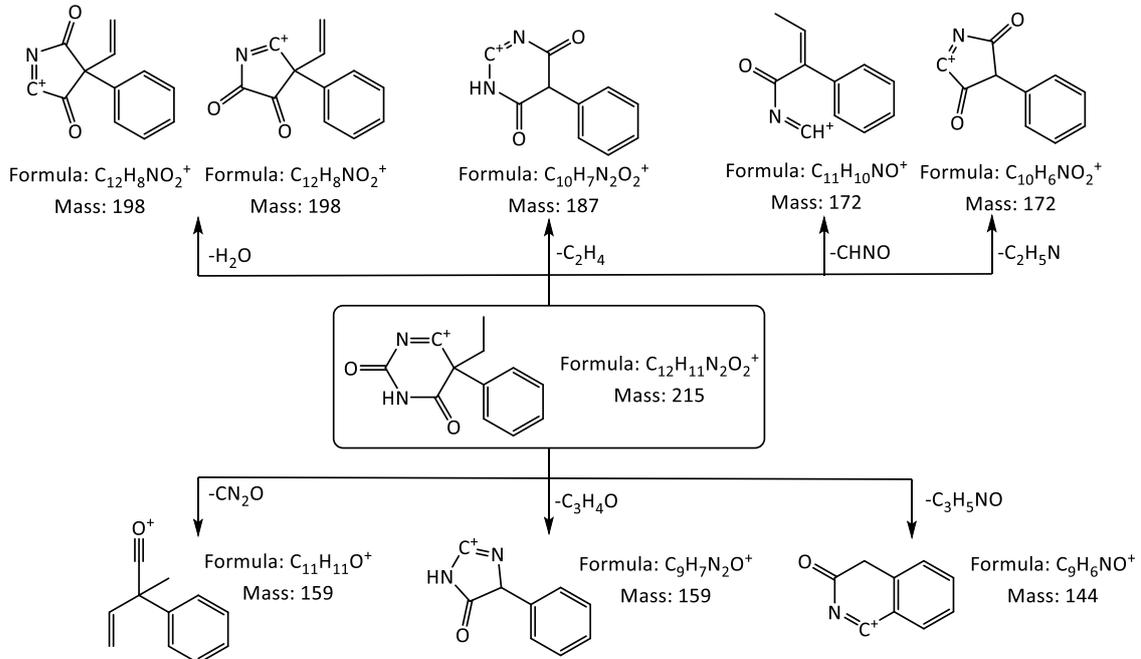


Abb. 229: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B. wie sie durch  $MS^2$ -Fragmentierung mittels DIP-APCI erhalten wurden. Die Fragmentierung von  $m/z = 188$  ( $MS^3$ ) erfolgte ausschließlich nach LC-Trennung mit ESI.

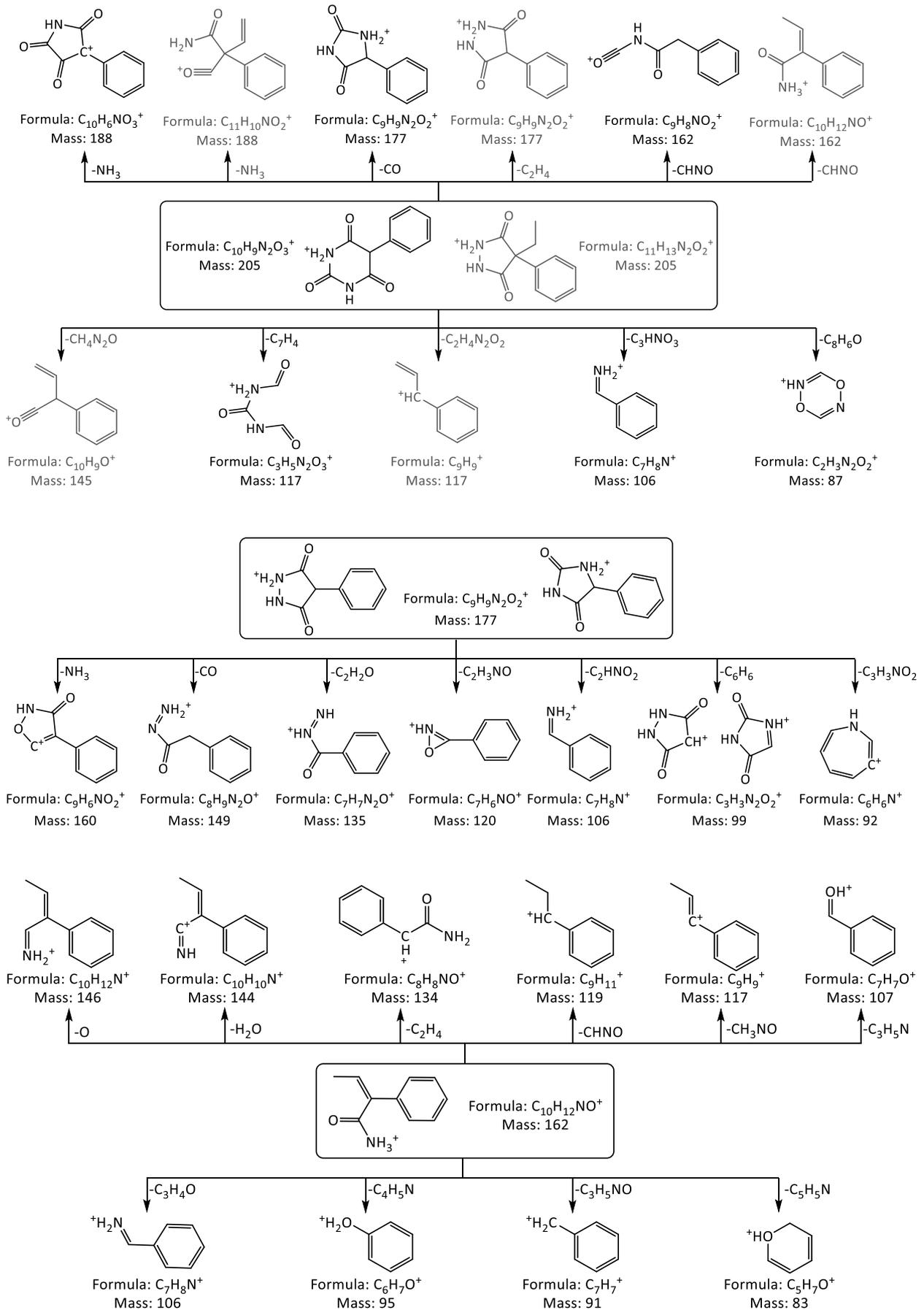


Abb. 230: Fortsetzung: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B, wie sie durch  $MS^3$ -Fragmentierung erhalten wurden

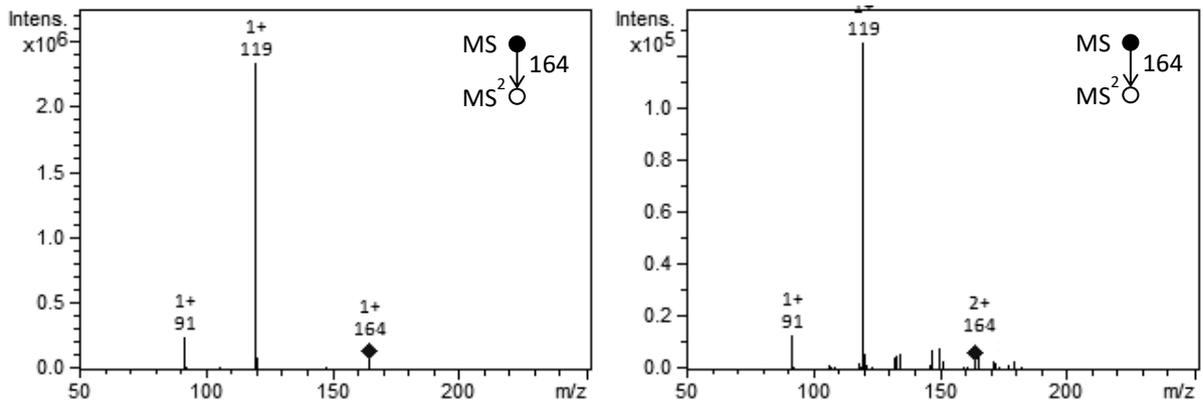


Abb. 231: Fragmentierung von  $m/z = 164$  potentielle Verunreinigung C. Links DIP-APCI; rechts DIP-EESI

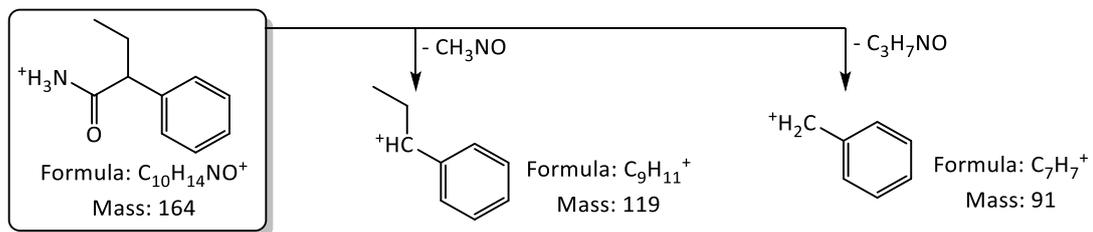


Abb. 232: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C.

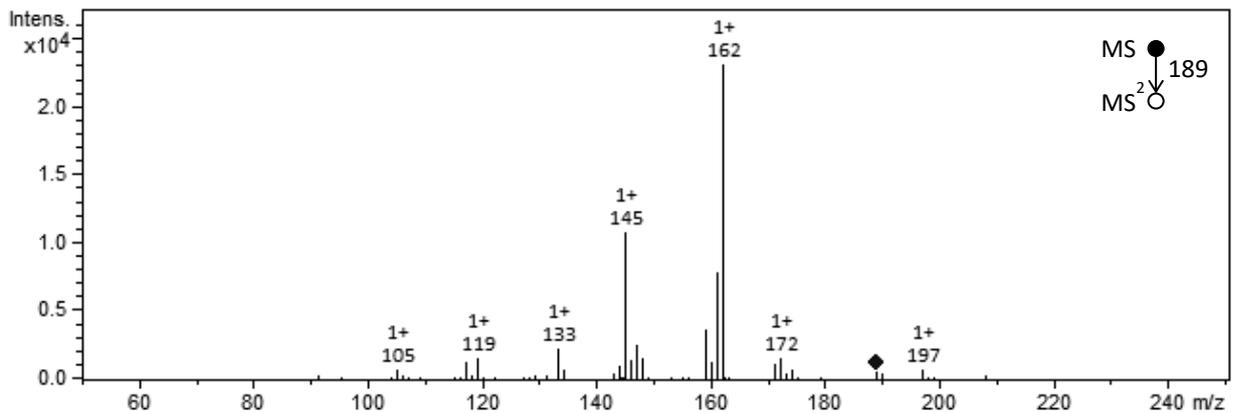


Abb. 233: Fragmentierung von  $m/z = 189$  potentielle Verunreinigung D (nur mittels DIP-APCI detektiert).

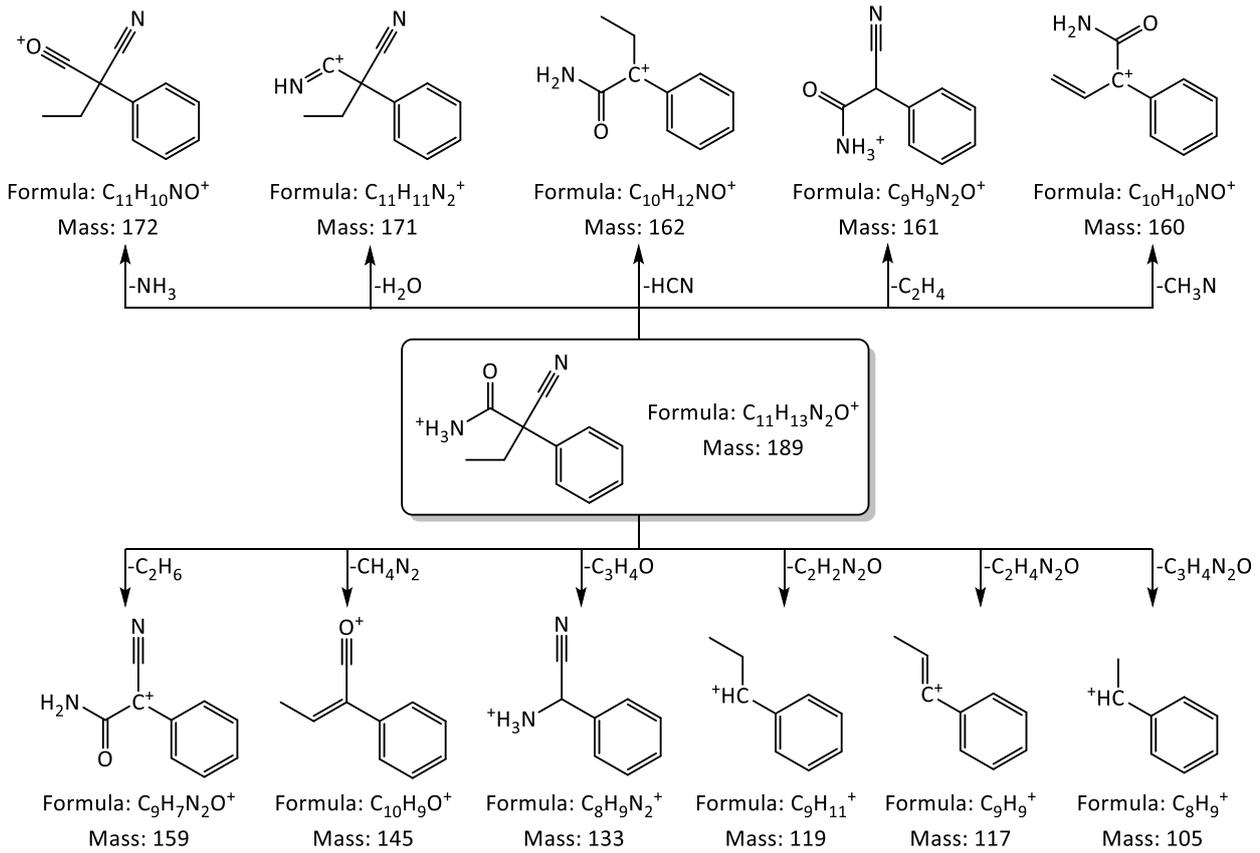


Abb. 234: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D.

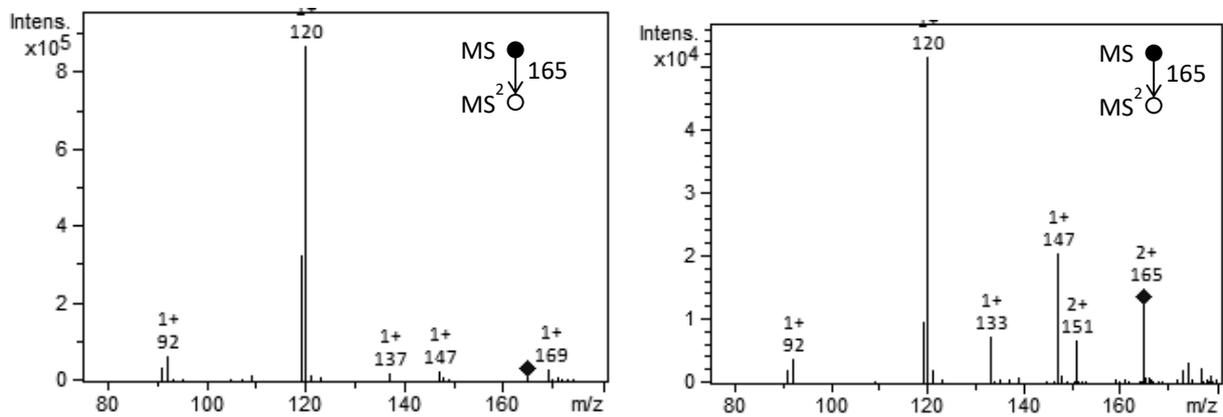


Abb. 235: Fragmentierung von  $m/z = 165$  potentielle Verunreinigung E. Links DIP-APCI; rechts DIP-EESI ( $m/z = 120$  und  $92$  werden durch das  $^{13}C$ -Isotop der Verunreinigung C ebenfalls  $m/z = 165$  verursacht)

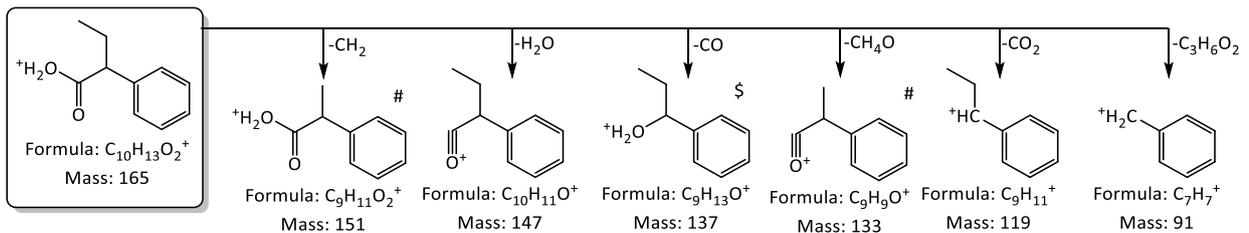


Abb. 236: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E. (§ nur mit DIP-APCI; # nur mit DIP-EESI; ohne mit beiden detektiert)

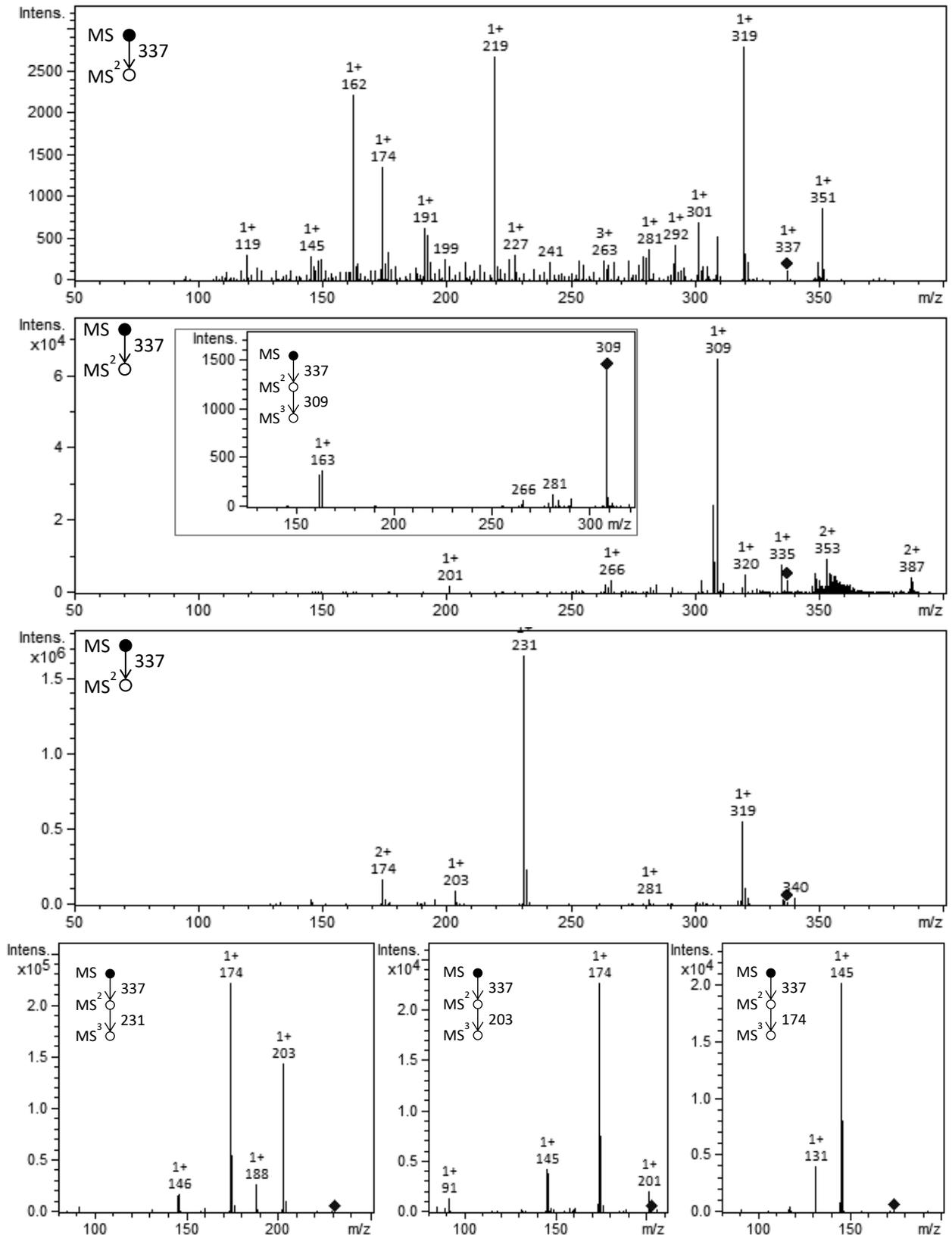


Abb. 237: Fragmentierung von  $m/z = 337$  potentielle Verunreinigung F. Oben DIP-APCI, Mitte DIP-EESI und unten HPLC-ESI-MS (RT: 15,8 min)

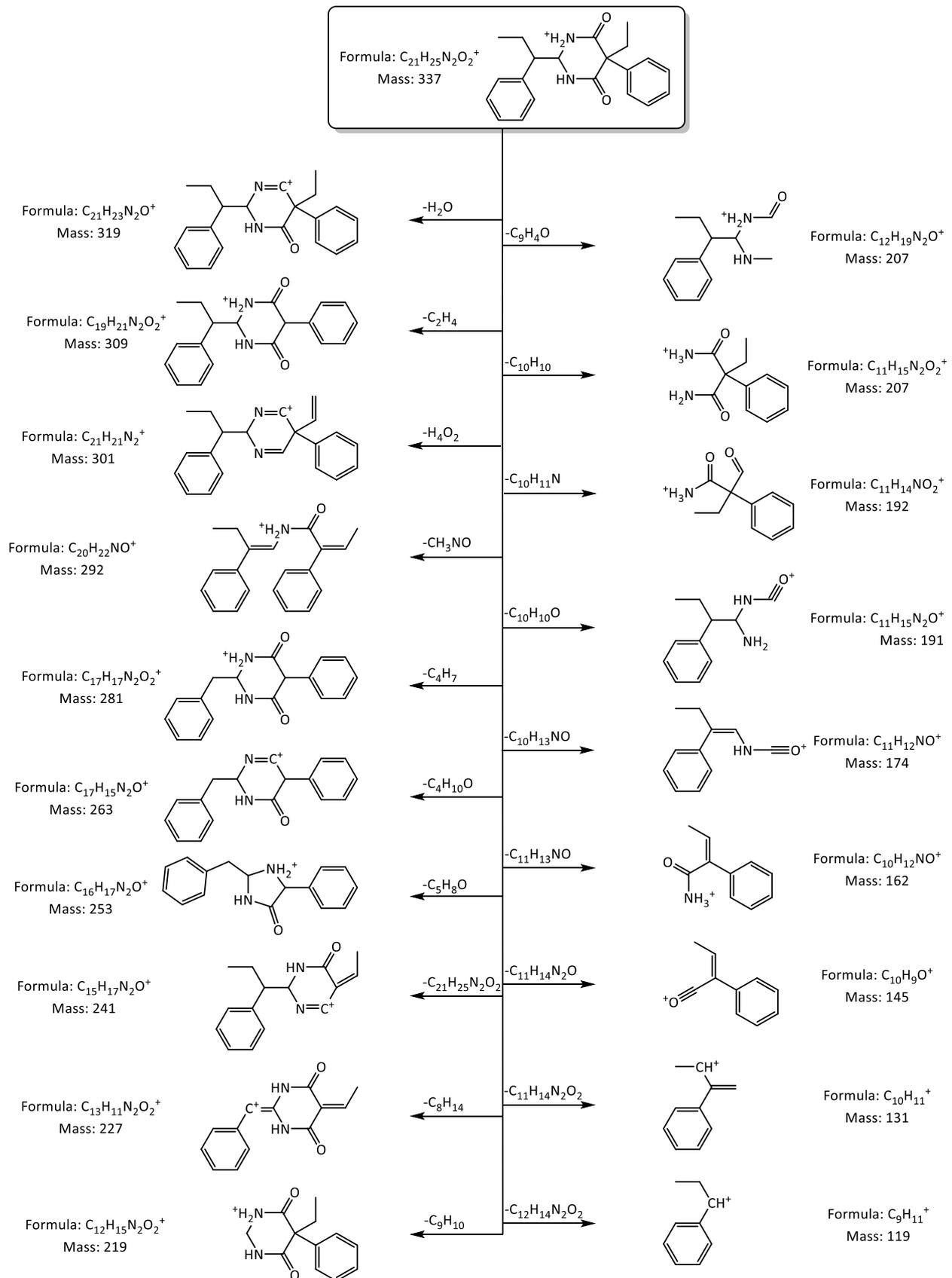


Abb. 238: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit DIP-APCI erhalten wurden.

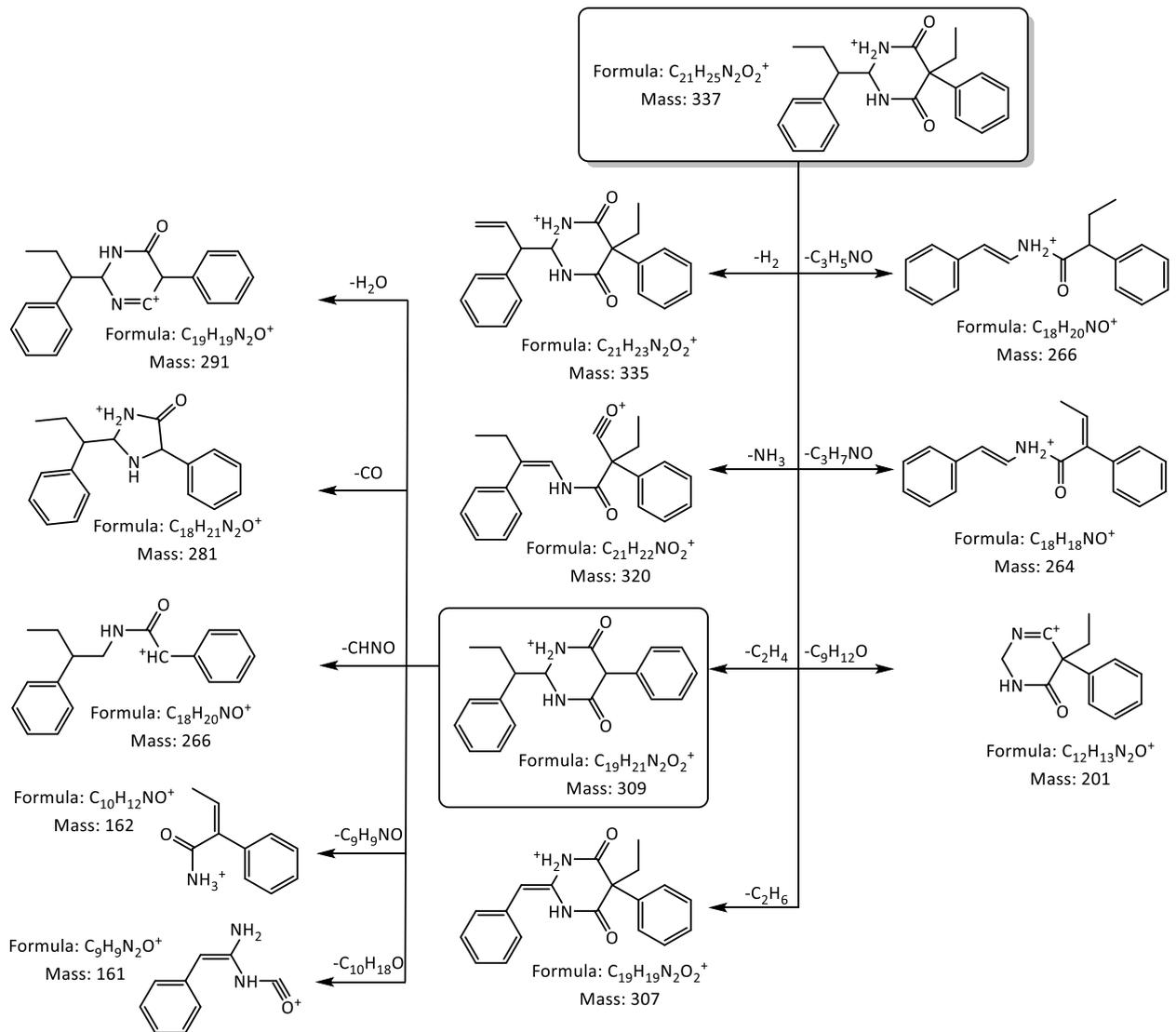


Abb. 239: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit DIP-EESI erhalten wurden.

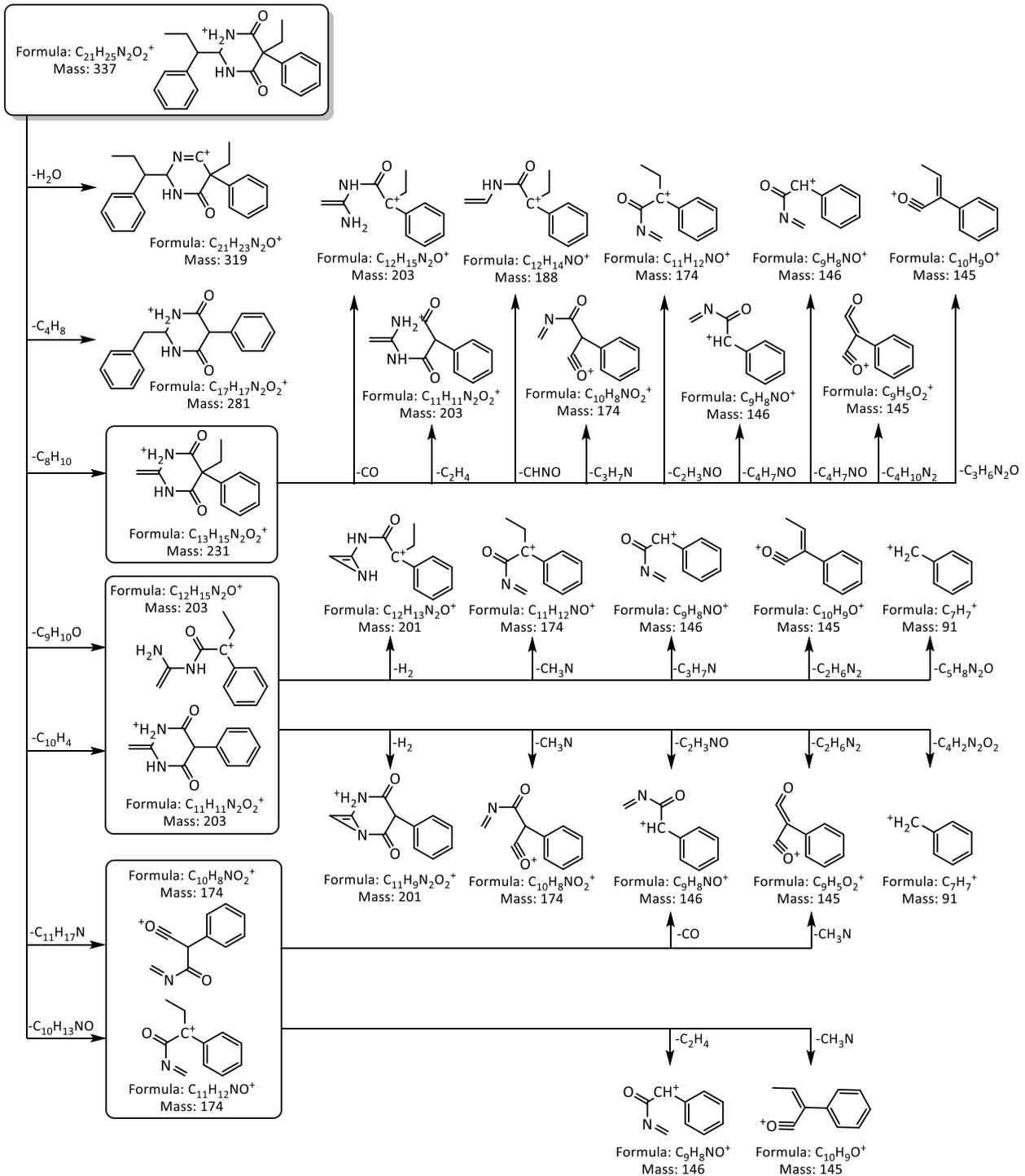


Abb. 240: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit HPLC-ESI-MSI erhalten wurden.

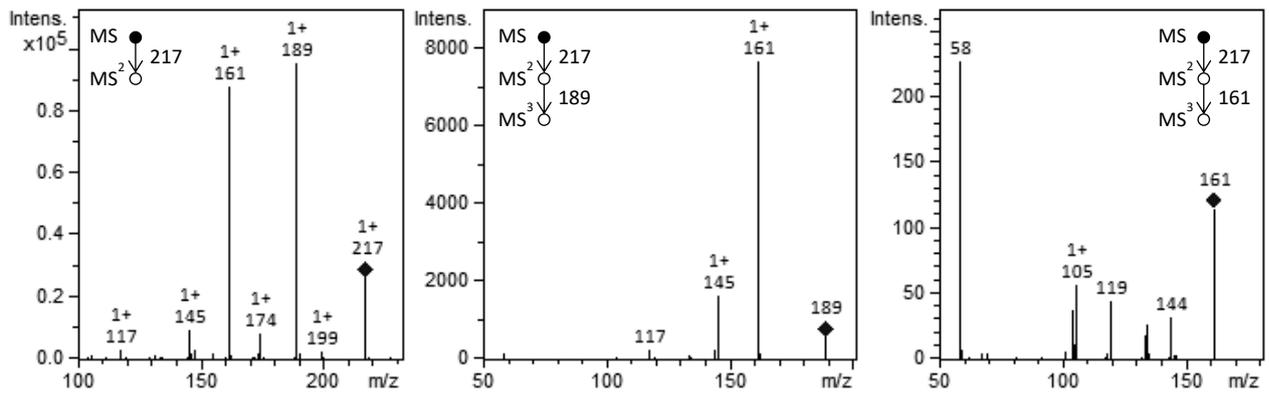


Abb. 241: Fragmentierung der unbekanntes  $m/z = 217$  ionisiert mit DIP-APCI

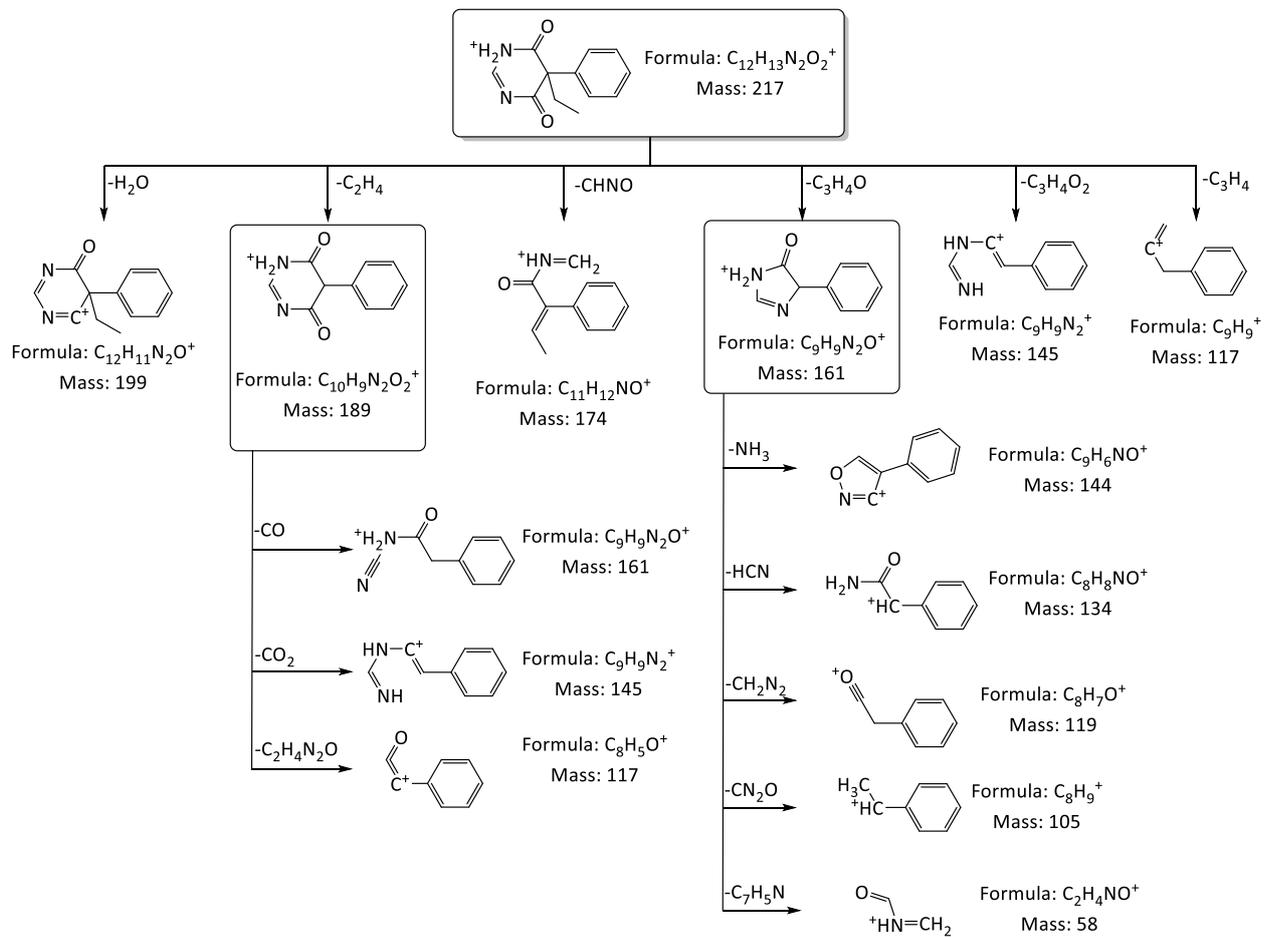


Abb. 242: Eine mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntes  $m/z = 217$

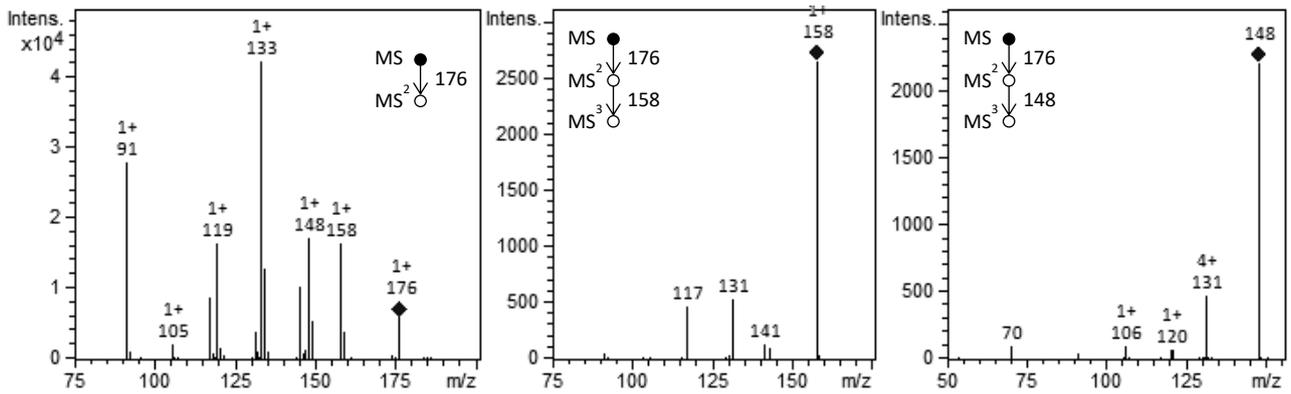


Abb. 243: Fragmentierung der unbekanntes  $m/z = 176$  ionisiert mit DIP-APCI.

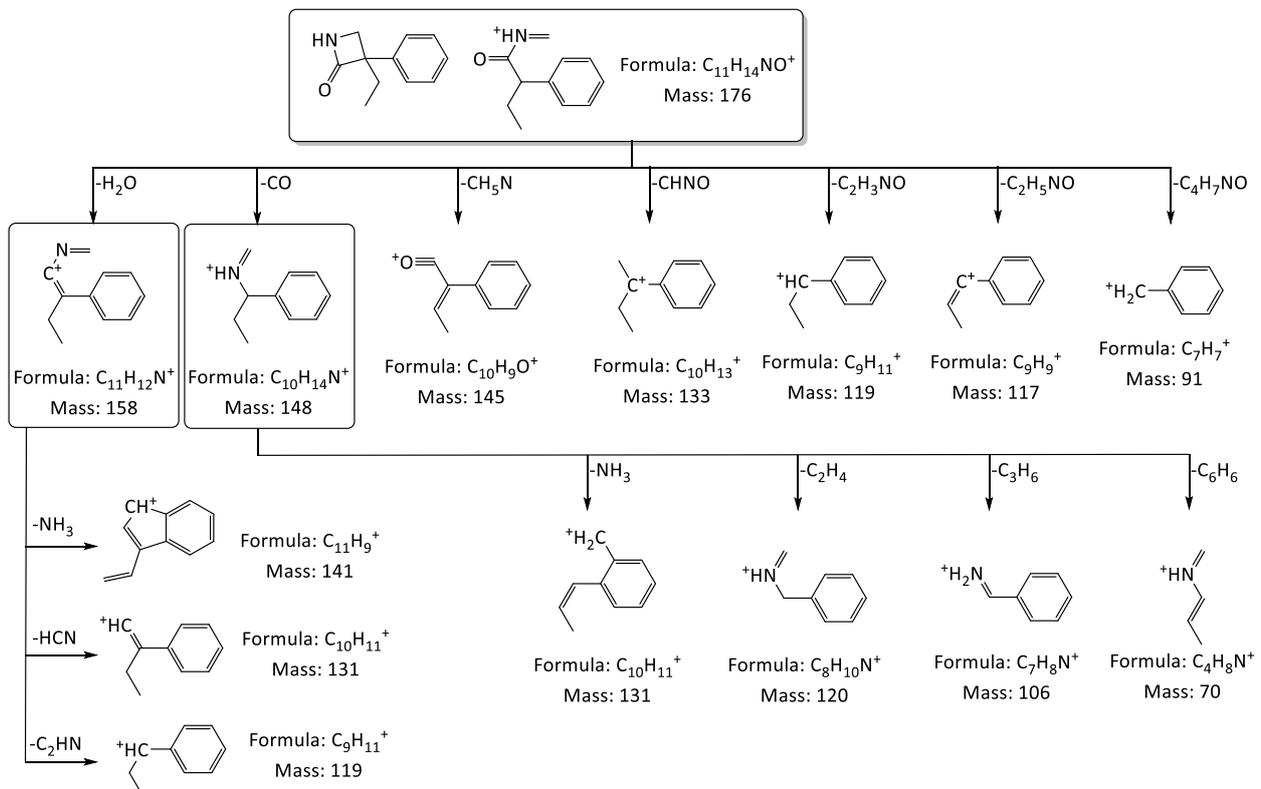


Abb. 244: Mögliche Strukturen und Fragmente der unbekanntes  $m/z = 176$  ionisiert mit DIP-APCI.

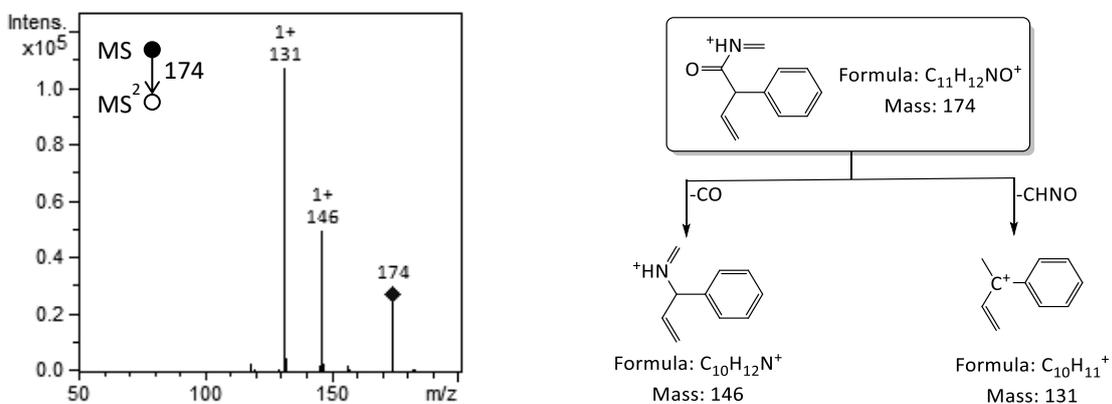


Abb. 245: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekanntes  $m/z = 174$  ionisiert mit DIP-APCI.

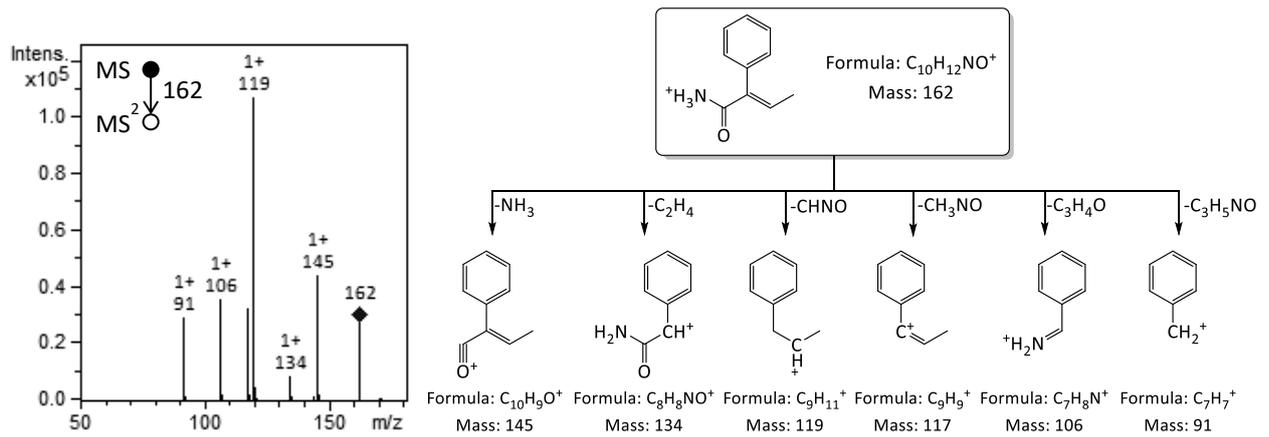


Abb. 246: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 162 ionisiert mit DIP-APCI.

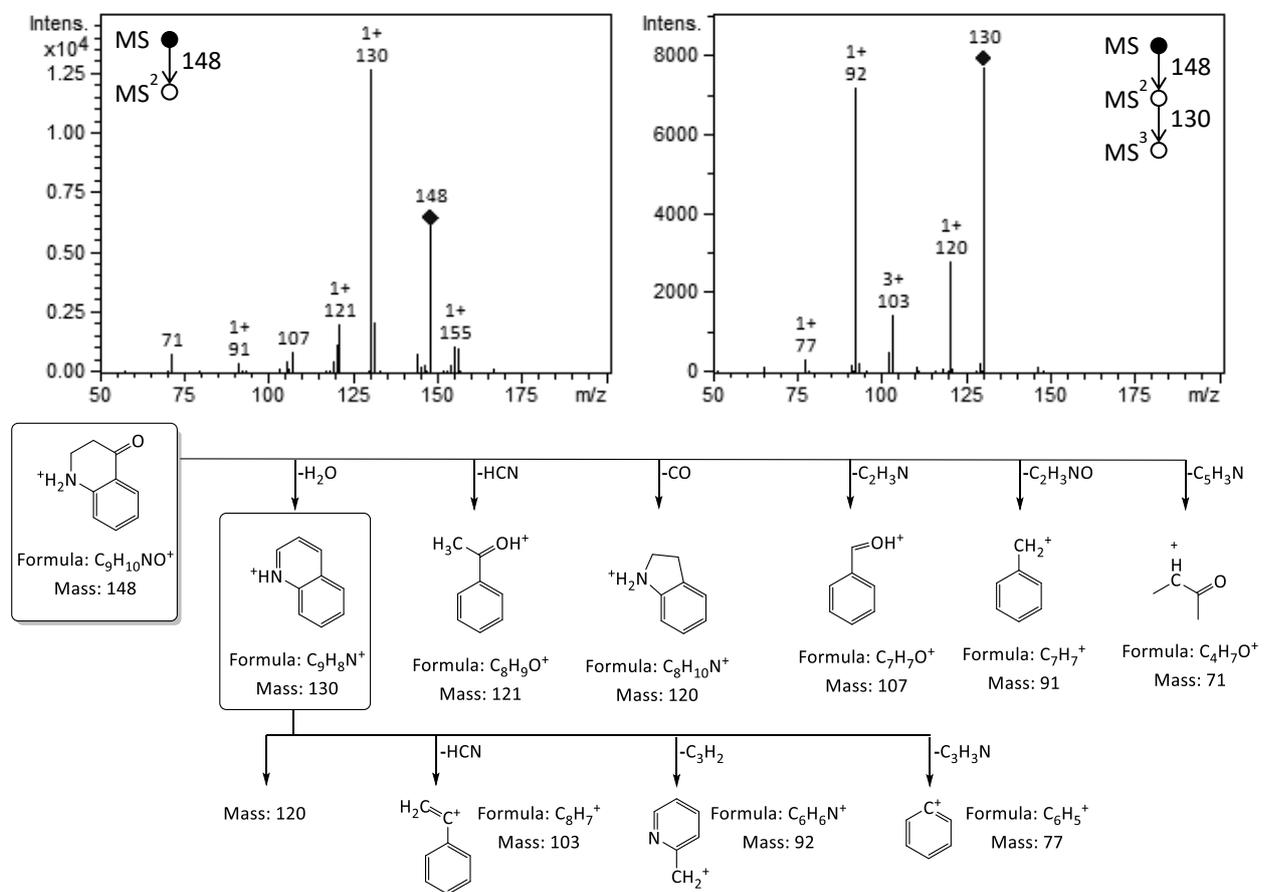


Abb. 247: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 148 ionisiert mit DIP-APCI.

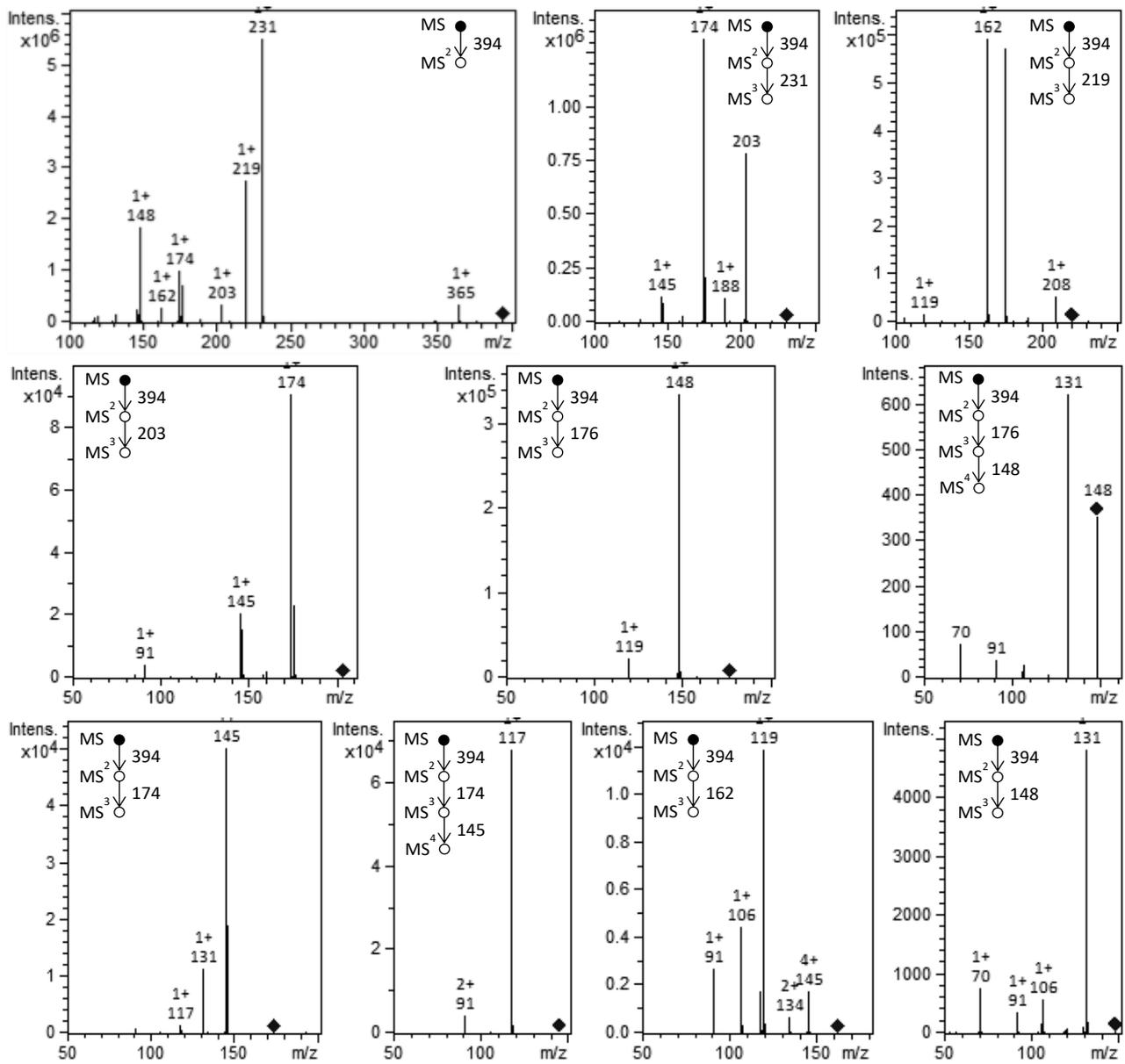
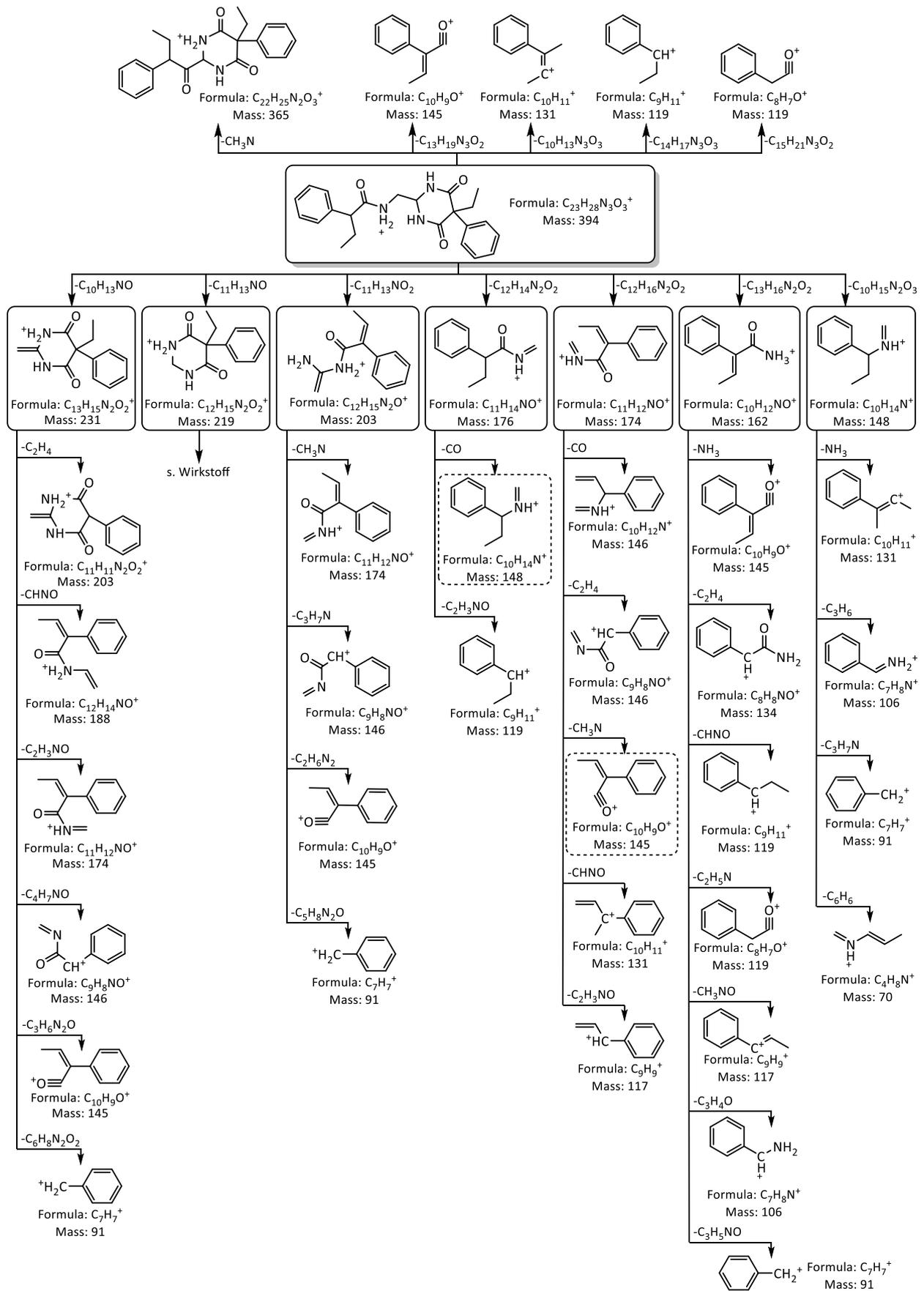


Abb. 248: Fragmentierung der unbekannt  $m/z = 394$  ionisiert mittels DIP-EESI


 Abb. 249: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntens  $m/z = 394$  (Kasten:  $MS^3$ , gestrichelter Kasten  $MS^4$ )

## 6.2.9 Trazodon

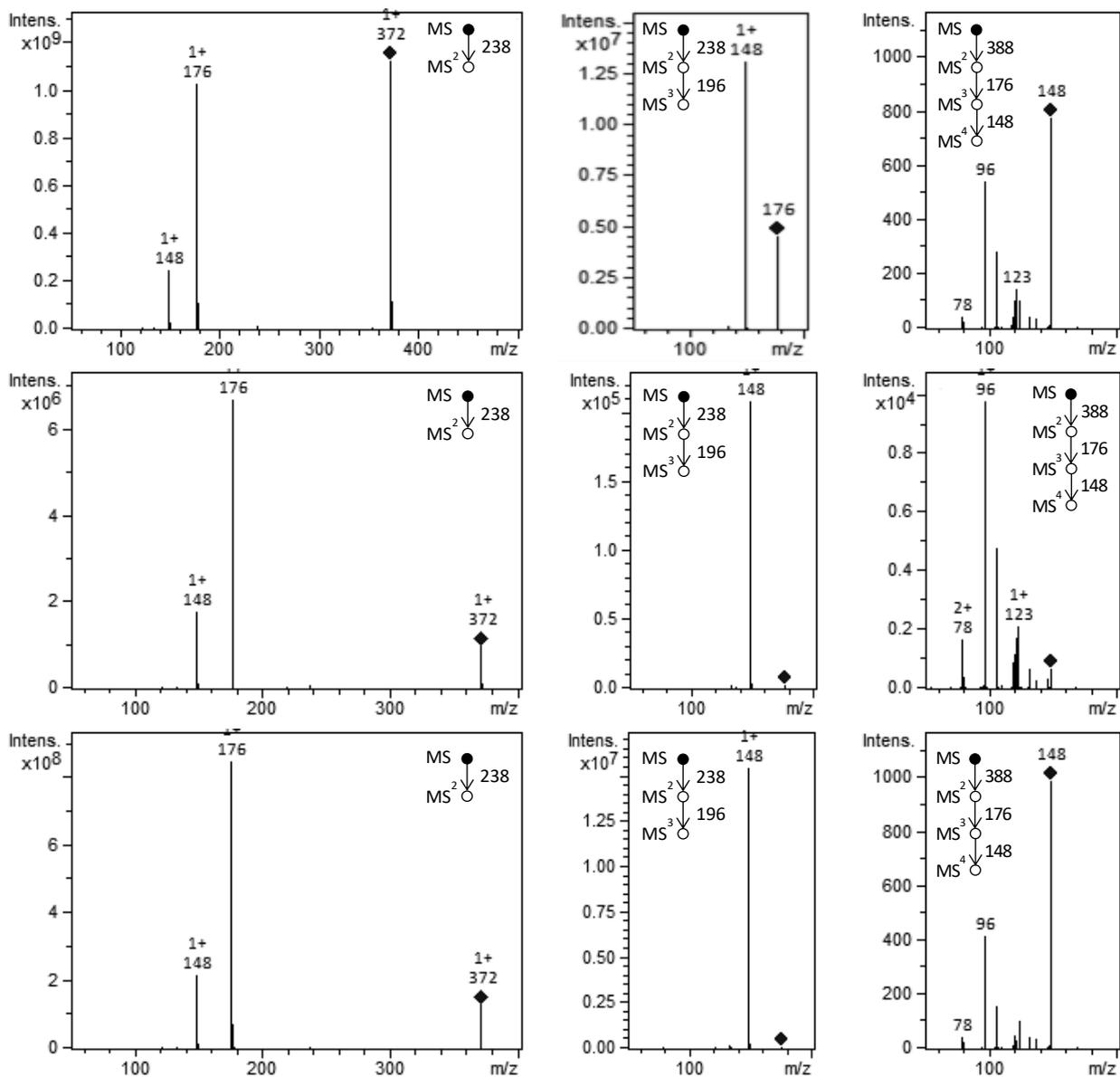


Abb. 250: DIP-APCI MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren des Wirkstoffes Trazodon (Oben: DIP-APCI, Mitte DIP-EESI, unten: HPLC-ESI-MS RT:8,2 min)

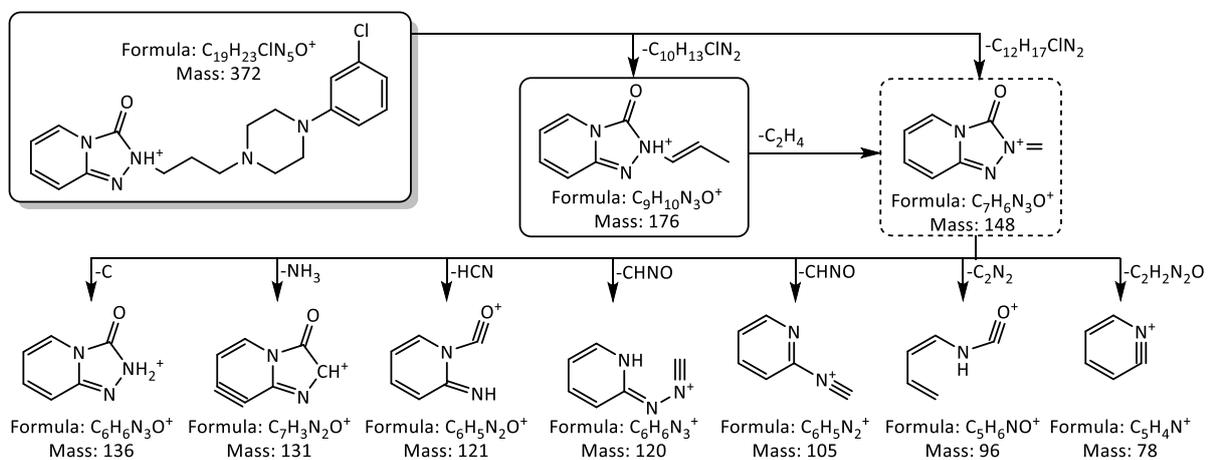


Abb. 251: Mögliche Fragmente von Trazodon wie sie mit DIP-APCI, DIP-EESI und HPLC-ESI-MS erhalten wurden

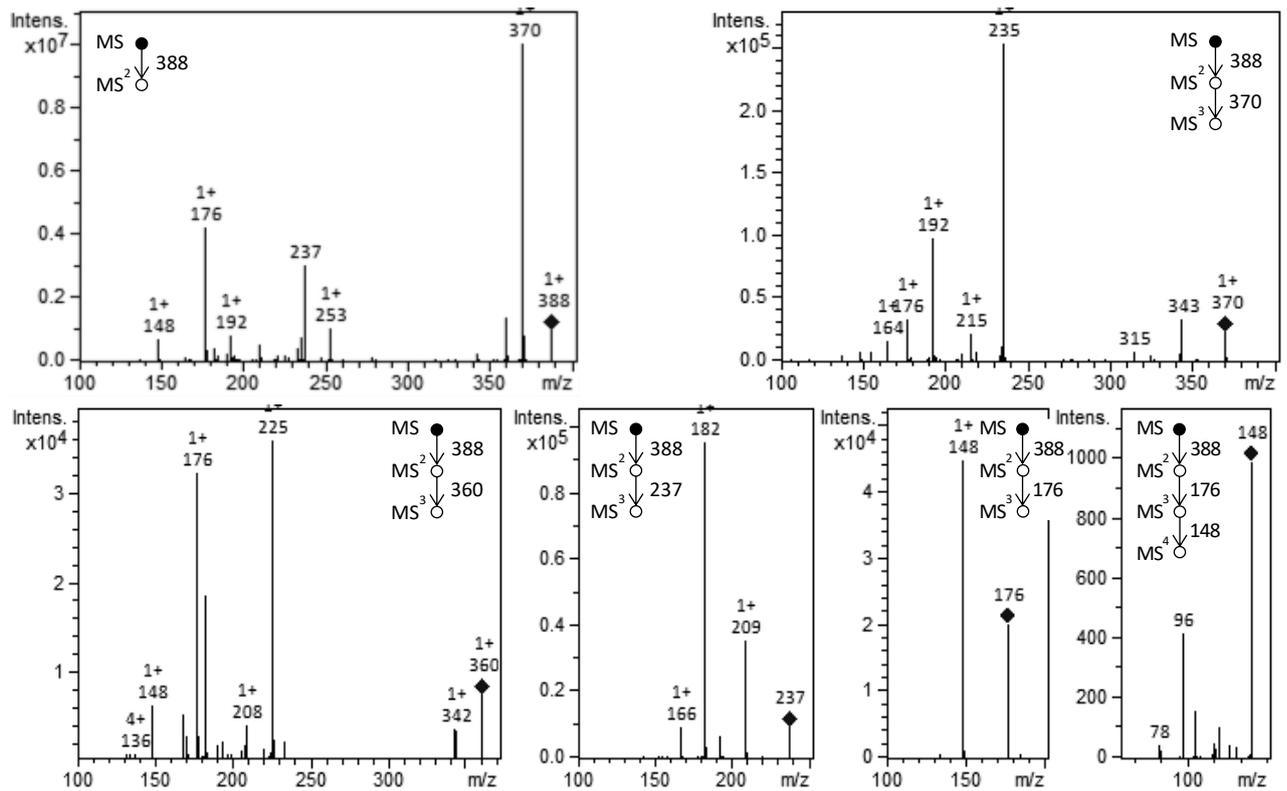


Abb. 252: MS<sup>n</sup>-Spektren von  $m/z = 388$  der potentiellen Verunreinigung A, nach Ionisierung mit DIP-APCI.

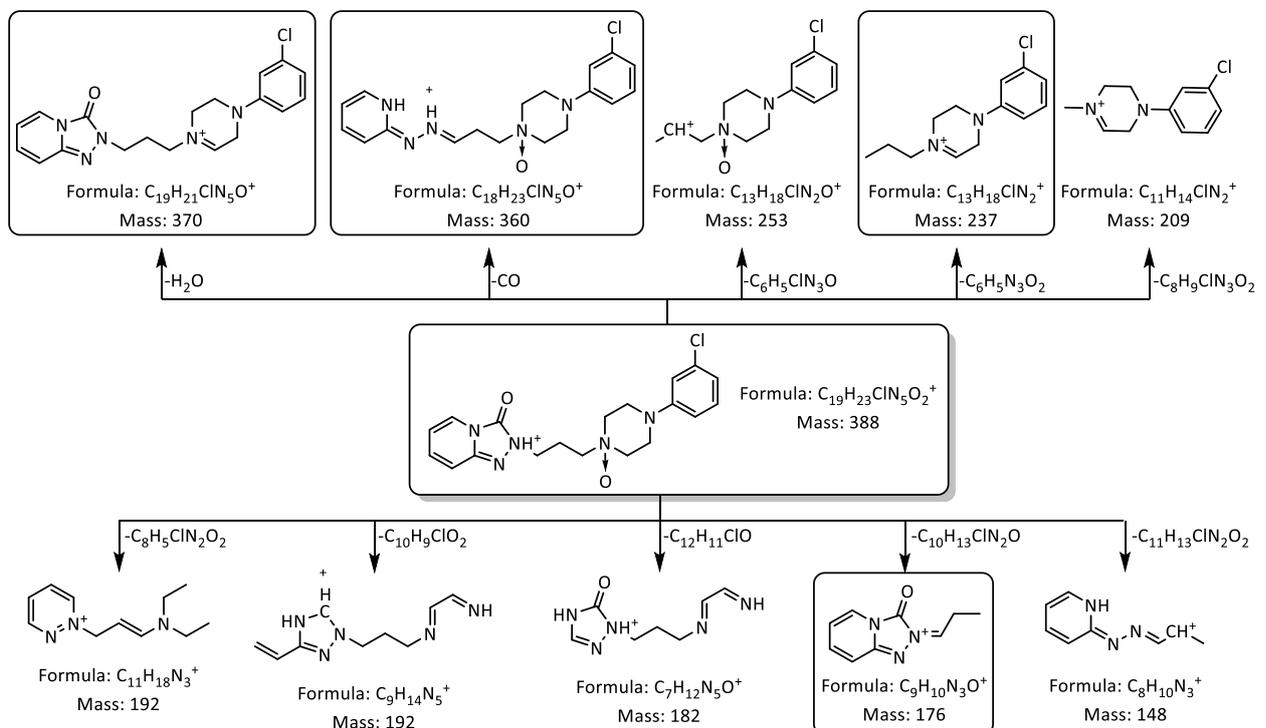
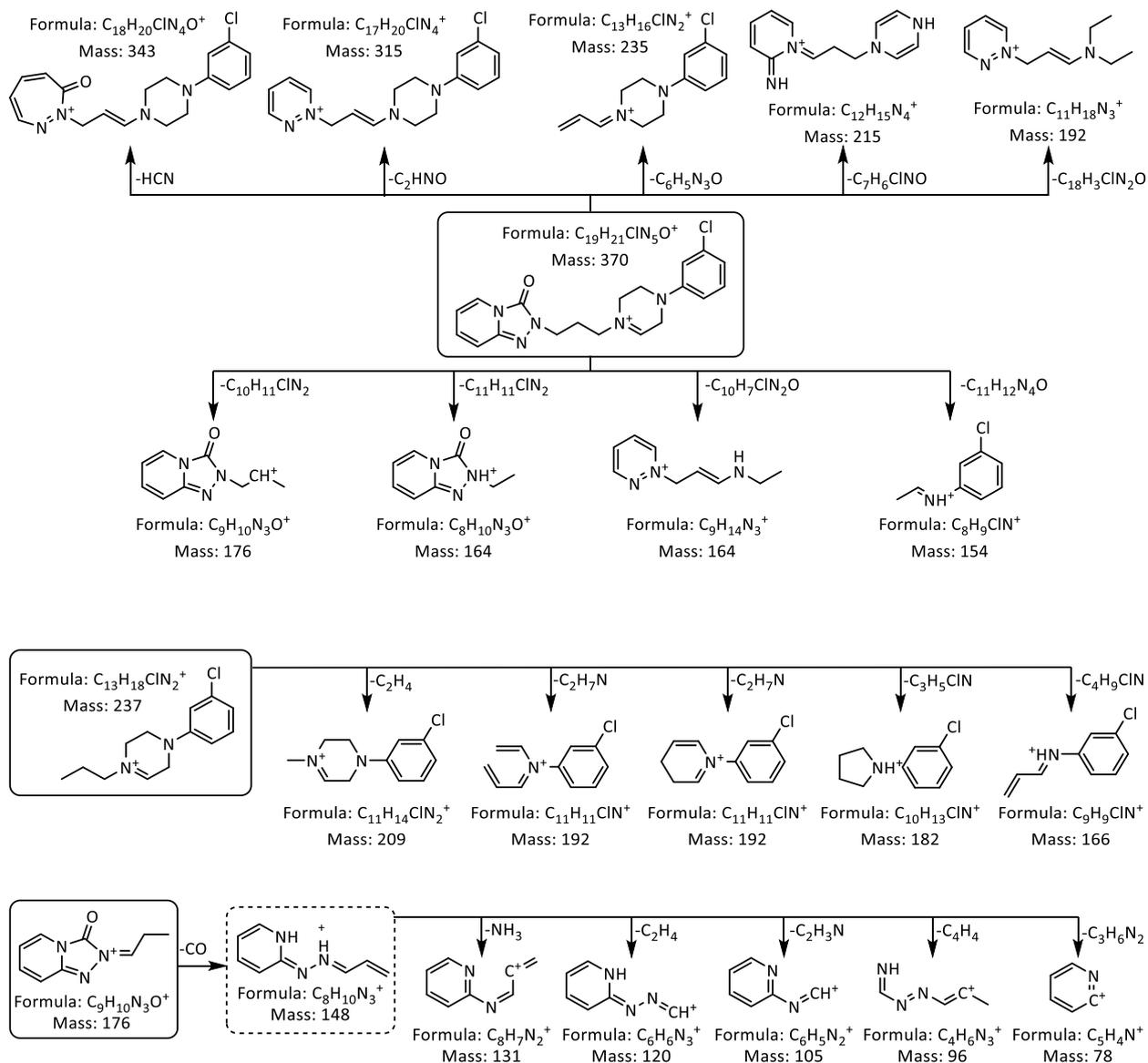
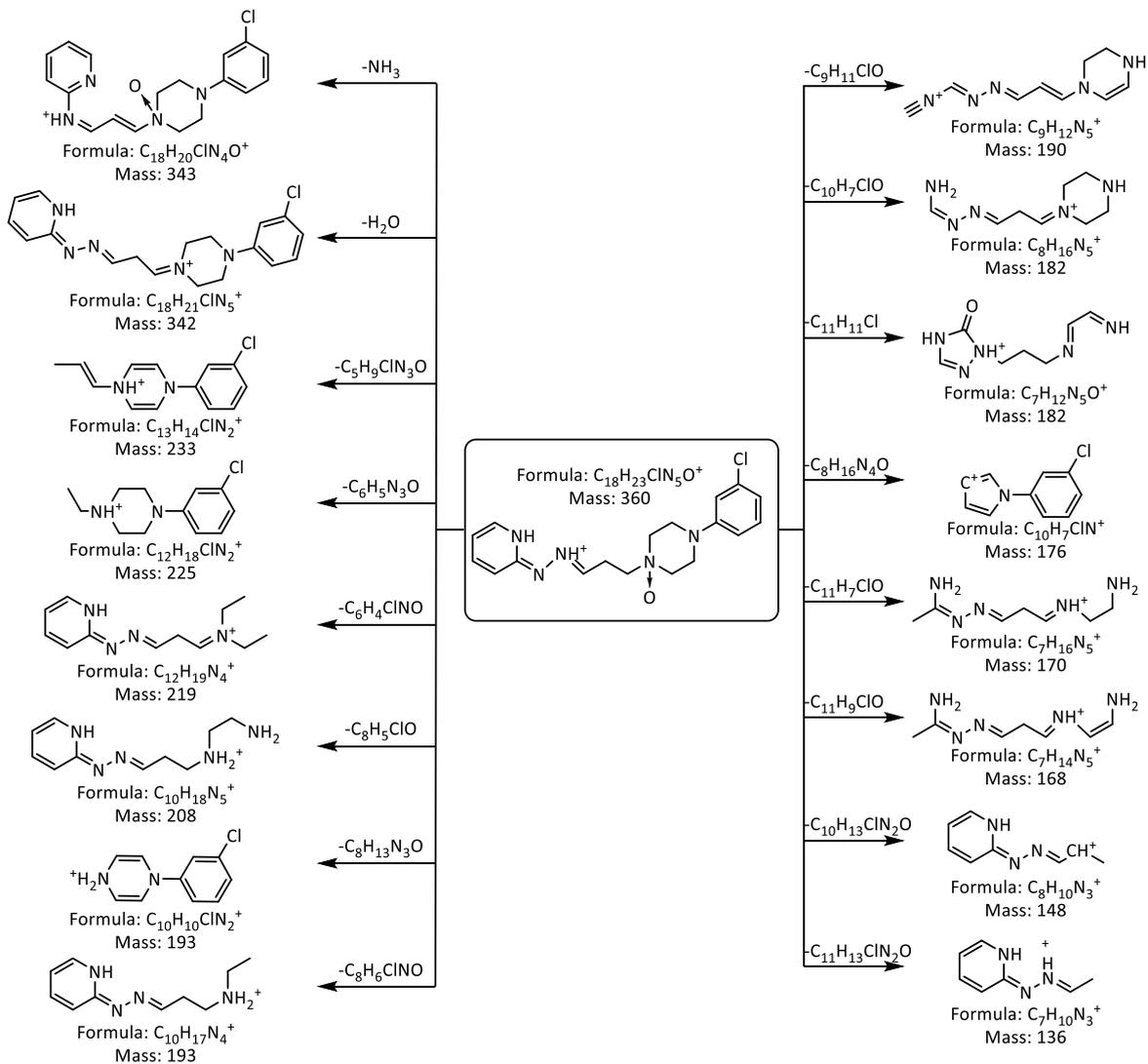


Abb. 253: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A, die den Massen aus den Fragmentspektren aus Abb. 252 zugeordnet werden konnten.



Fortsetzung von Abb. 253



Fortsetzung von Abb. 253

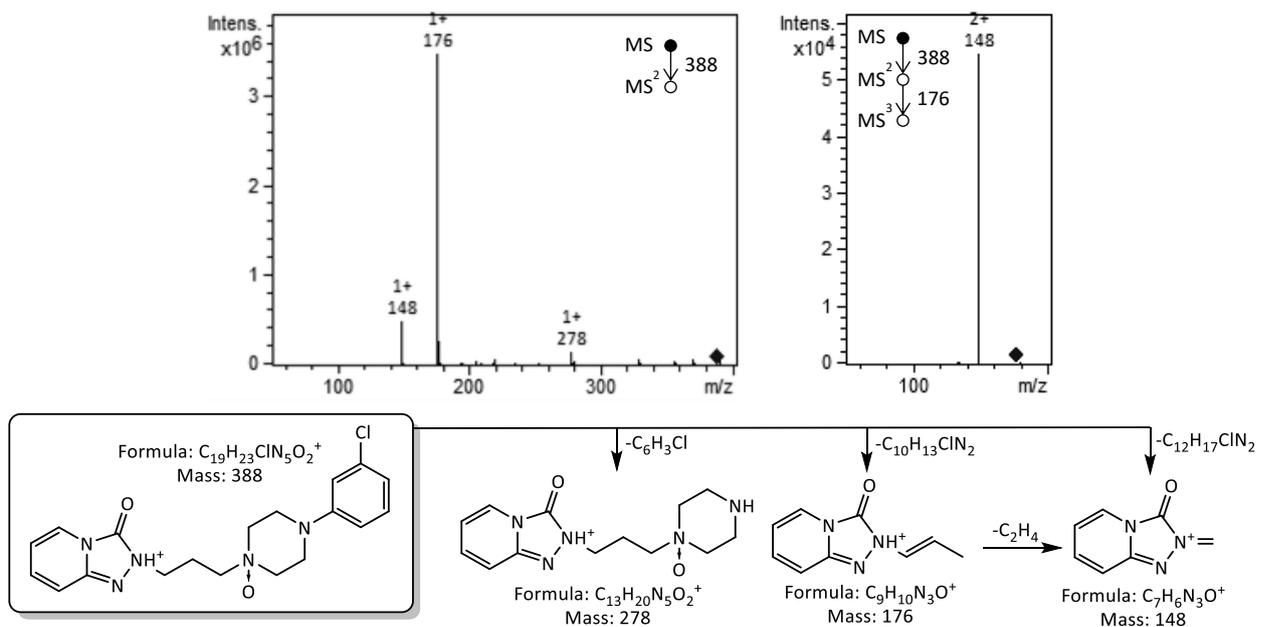


Abb. 254:  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 4,7 min), sowie unten mögliche Fragmente

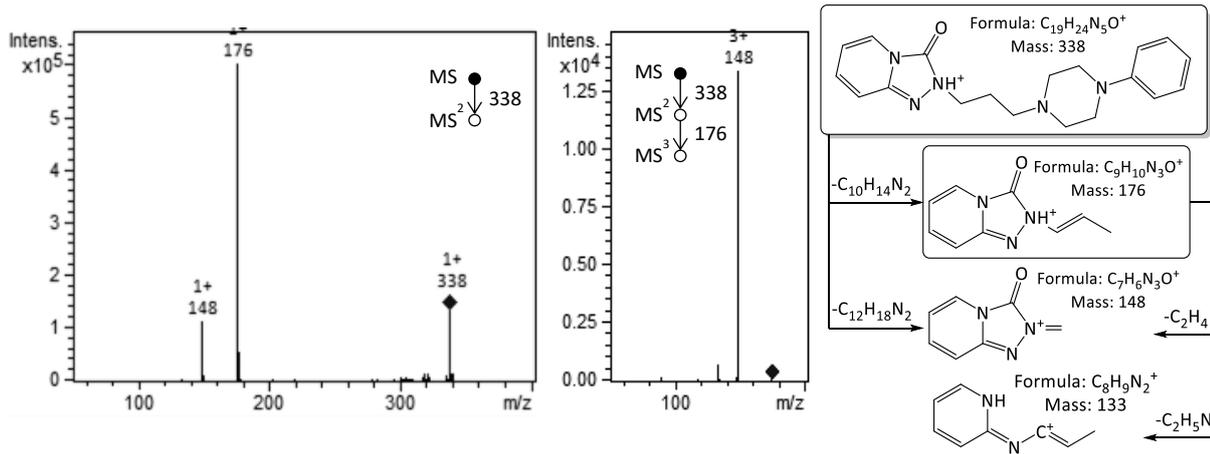


Abb. 255: MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren der potentiellen Verunreinigung B detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 4,5 min), sowie rechts mögliche Fragmente

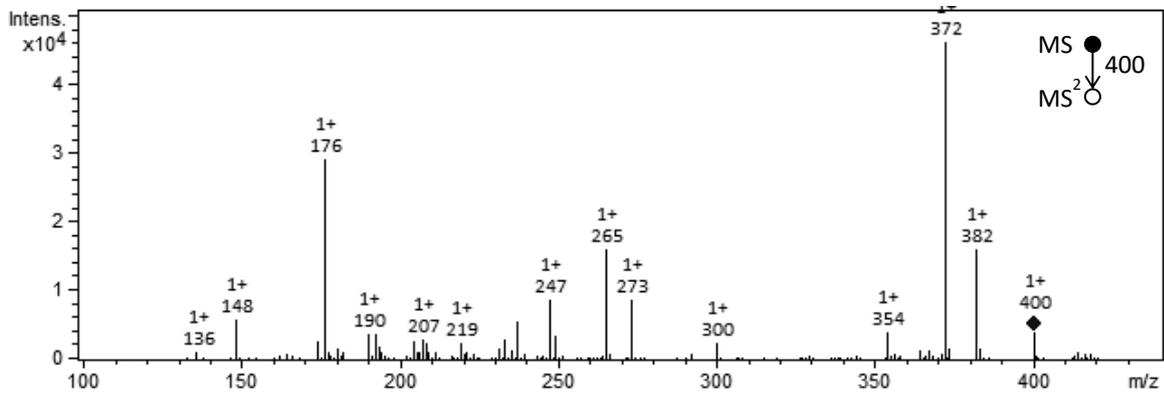


Abb. 256: MS<sup>2</sup>-Spektrum der potentiellen Verunreinigung E detektiert mit DIP-APCI-MS, nachdem der Verdampfungsbereich über die mittels HPLC-ESI-MS bestimmten Fragmente herausgefunden wurde. Fragmente der Verunreinigung E sind m/z = 148, 176 und 265, der Rest konnte nicht zugeordnet werden.

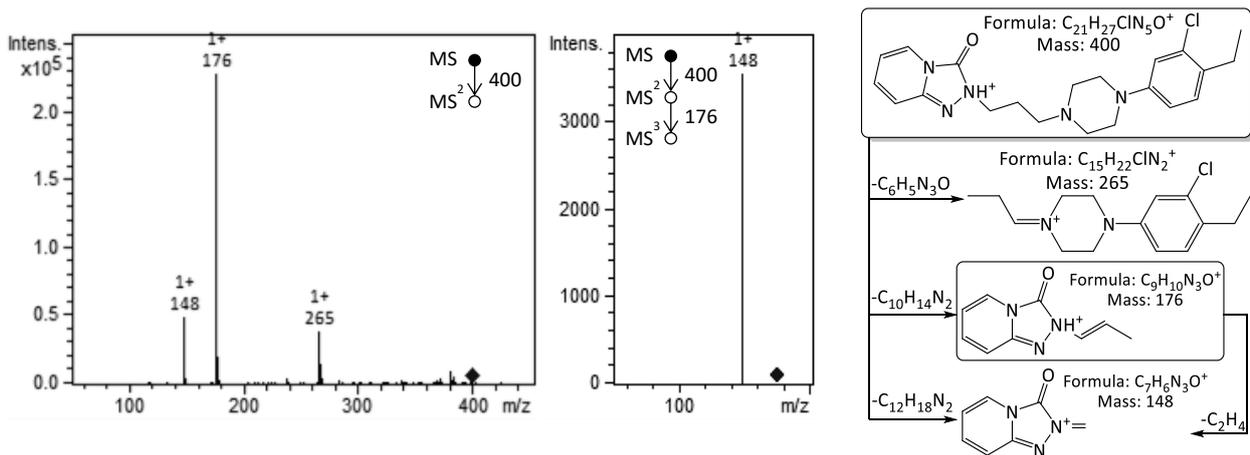


Abb. 257: MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren der potentiellen Verunreinigung E detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 3,3 min), sowie unten mögliche Fragmente

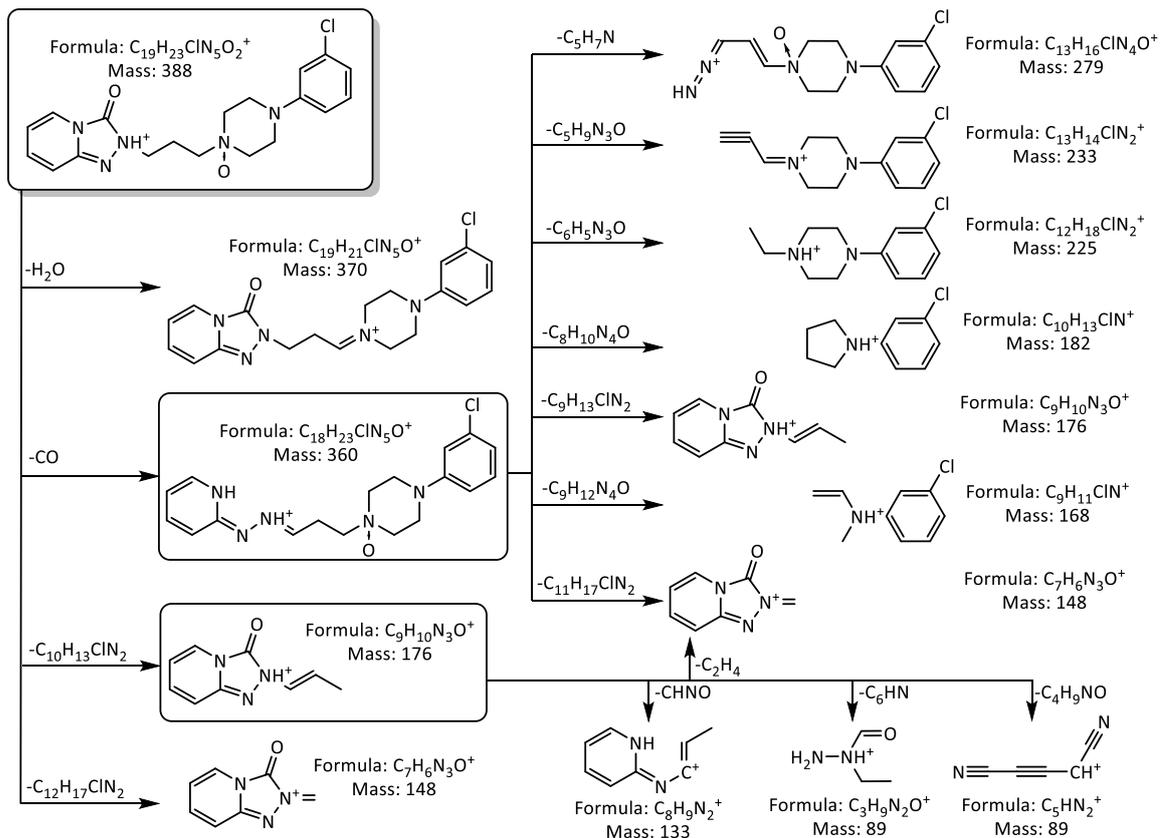
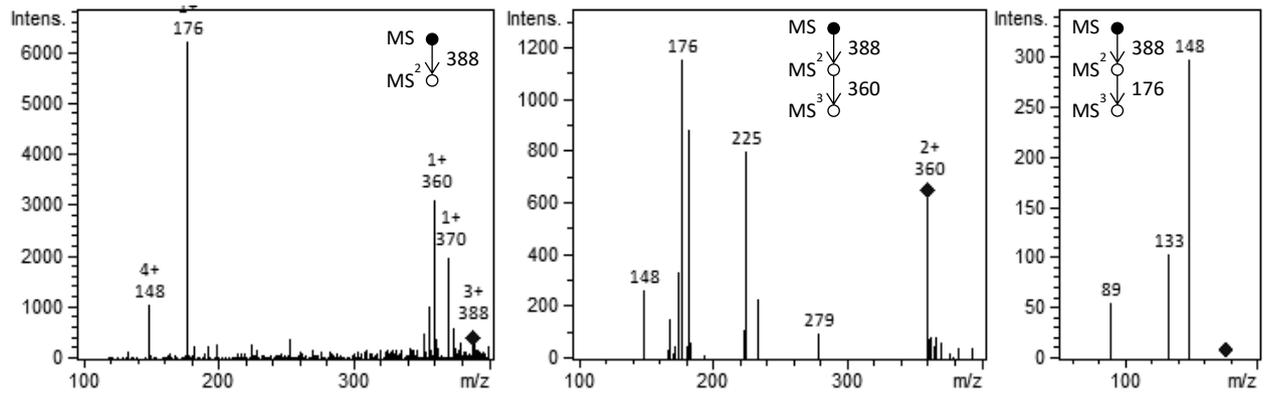


Abb. 258:  $MS^2$  und  $MS^3$ -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels DIP-EESI-MS, sowie unten mögliche Fragmente

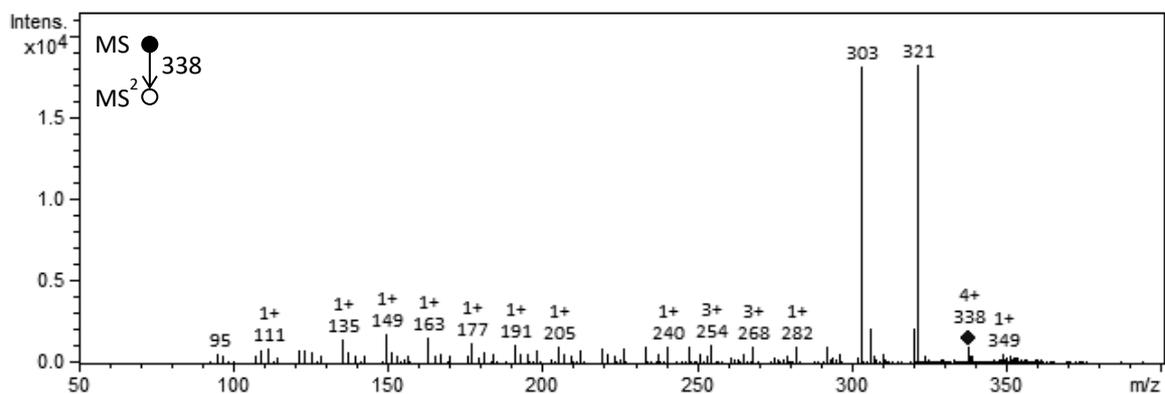


Abb. 259: Fragmentierung von  $m/z = 338$  potentielle Verunreinigung B, Ionisierung mittels DIP-EESI, hier nur Hilfsstoff sichtbar

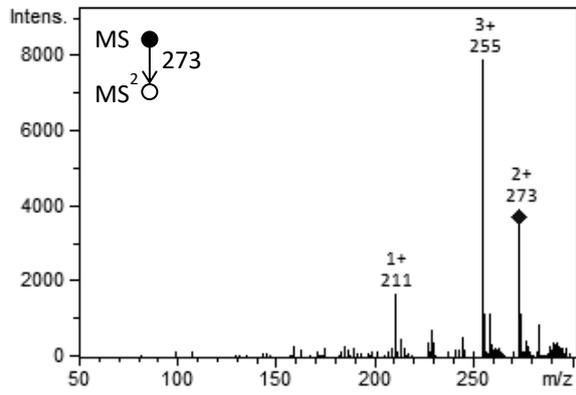


Abb. 260: Fragmentierung von  $m/z = 273$  potentielle Verunreinigung F, Ionisierung mittels DIP-EESI

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung ESI-Anordnung, sowie des Taylor-Konus (unten links (1)) und der Nasenbildung der Muttertropfen (unten rechts (2)) (Markierung 3 ist in Abb. 2 dargestellt).....	3
Abb. 2:	Darstellung des Ion Evaporation Model (IEM, oben), des Charge Residue Model (CRM, Mitte) und des Chain Ejection Model (CEM, unten). (genauere Erläuterungen s. Text) Abbildung modifiziert aus [49].....	5
Abb. 3:	Schematische Darstellung der DESI, und der wichtigsten geometrischen Parameter $\alpha$ und $\beta$ sowie $d_1$ und $d_2$ .....	7
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Tröpfchen-Aufnahme-Mechanismus (Droplet pickup mechanism) (links) und des zweiten DESI-Mechanismus, wie von Takáts et al. [53] beschrieben (rechts).....	8
Abb. 5:	Schematische Darstellung des dritten DESI-Mechanismus, wie er von Takáts et al. beschrieben wurde [53] .....	9
Abb. 6:	Schematische Darstellung des EESI-Systems.....	10
Abb. 7:	Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen eines ESI-Tröpfchens (blau) und eines Proben-tröpfchens (orange). Modifiziert aus [88].....	12
Abb. 8:	Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen eines ESI-Tröpfchens (blau) und eines Probenpartikels (orange) mit einer äußeren Schicht (grün). Modifiziert aus [82] .....	13
Abb. 9:	Schematische Darstellung der AP/TD-EESI, wie sie von Devenport et al. [2] beschrieben wurde .....	14
Abb. 10:	Schematische Darstellung der AP-TD/ESI, wie sie von Basile et al. [1] beschrieben wurde.....	15
Abb. 11:	Schematische Darstellung der TD-ESI, wie sie von Huang et al. [91] beschrieben wurde.....	16
Abb. 12:	Schematische Darstellung der ASAP, wie sie von McEwen et al. [125] beschrieben wurde.....	20
Abb. 13:	Links: Schematische Darstellung der DIP-APCI, wie sie von Krieger et al. [141] beschrieben wurde. Rechts: Blick in die Multipurpose ion source (MPIS), die bereits mit den drei möglichen Vorrichtungen zur Ionisation ausgerüstet ist. Zu sehen ist der ESI-Sprayer (1), die Corona-Nadel (2), die VUV-Lampe (3) und die Spitze der Schubstange mit eingesetztem Tiegel (4).....	22
Abb. 14:	Schematische Darstellung eines Quadrupol-Ionenfallen-Querschnittes. Modifiziert aus [149, 150] .....	23
Abb. 15:	Links: Positionierung des ESI-Sprayers in x-Richtung, Mitte: Positionierung in z-Richtung mit Hilfe von Metallscheiben (rechts), die unter den Sprayer montiert wurden. Rechts unten einzelne Metallscheibe. ....	56
Abb. 16:	Schematische Darstellung der DIP-EESI .....	56
Abb. 17:	Simulierte Kurven des Programms Minitap <sup>®</sup> 17 für die optimierten Parameter im 1. Versuchsplan a) Position in x-Richtung (zwischen dem MS-Einlass und der Oberseite der Schubstange, Bereich: 27,5 – 43 mm optimierter Wert: 32 mm), b) Zerstäubergasdruck (Bereich: 10- 80 psi optimierter Wert: 34 psi), c) ESI-Spray-Fluss (Bereich: 0,05 – 0,3 mL/min optimierter Wert: 0,2 mL/min), d) Hilfgasfluss (Bereich: 60-180 L/h optimierter Wert: 180 L/h), e) Dry-Gas-Temperatur (Bereich: 200- 350 °C optimierter Wert: 350 °C) .....	57
Abb. 18:	Simulierte Kurven des Programms Minitap <sup>®</sup> 17 für die optimierten Parameter im 2.Versuchsplan a) Formiatkonzentration (Bereich:0,1- 1,0 % optimierter Wert: 0,9%), b) Hilfgasfluss (Bereich: 60-180 L/h optimierter Wert: 125 L/h), c) Position in x-Richtung (zwischen dem MS-Einlass und der Oberseite der Schubstange, Bereich: 27,5 – 43 mm optimierter Wert: 27,5 mm), d) ESI-Spray-Fluss (Bereich: 0,05 – 0,3 mL/min optimierter Wert: 0,1 mL/min), e) Zerstäubergasdruck (Bereich: 10- 80 psi optimierter Wert: 26 psi), f) Position in z-Richtung (Abstand zum oberen Ende der Schubstange, Bereich: 6 – 20 mm optimierter Wert: 18 mm) aus dem 3. Versuchsplan.....	58
Abb. 19:	Signalverlust hervorgerufen durch Verschließen des Abfallsammelgefäßes, das zwischen Laborabsaugung und Ionenquelle eingebaut war.....	59
Abb. 20:	Overlay-Chromatogramm eines Blanks (schwarz) und einer 25 mg/mL Koffeinlösung (rot) analysiert mit DIP-EESI. Das ESI-Spray wurde mit der HPLC mit einem Fluss von 100 $\mu$ L/min gefördert. Die Druckimpulse, die von der HPLC verursacht werden sind deutlich zu sehen. ....	60
Abb. 21:	Einfluss von kleineren Flussraten auf die Signalintensität des Kampfer-Signals. Getestet wurden die Flussraten 25 $\mu$ L/min, 50 $\mu$ L/min und 100 $\mu$ L/min mit der HPLC. Die größere Schwankung der Messpunkte bei kleineren Flussraten kommt wahrscheinlich durch die nicht reproduzierbaren HPLC-Bedingungen zustande. ....	60
Abb. 22:	Beispiele für die Änderung der mittleren Intensität (n=3) durch Neufüllen der Spritze; gezeigt an zwei Messpunkten (1 und 2) für drei Spritzenfüllungen (blau, grün und rot).....	61
Abb. 23:	Schematische Darstellung, wie die Teilung des HPLC-Flusses aussehen könnte .....	62
Abb. 24:	Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten (n=3) der Optimierung der Kapillarspannung und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.....	63

Abb. 25:	Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten (n=3) der Optimierung des Zerstäuberdruckes und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.....	63
Abb. 26:	Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten (n=3) der Überprüfung der x- und z-Position des Sprayers (links) und der z-Position in Abhängigkeit des ESI-Flusses (rechts). Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.....	64
Abb. 27:	Vergleich der Sprayer-Kapillarlänge (blau: 0,4 mm; rot: 0,25 mm) bei verschiedenen ESI-Flüssen.....	65
Abb. 28:	Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignal-Intensitäten (n=3) der Überprüfung des Zerstäuberdruckes und des ESI-Flusses. Der rote Bereich zeigt die höchste Intensität.....	65
Abb. 29:	Kontur-Farbabbildung der mittleren Massensignalintensitäten (n=3, links), der mittleren signal-to-noise Verhältnisse (n=3, rechts) zur Bestimmung des Dry-Gasflusses und des Hilfsgasfluss. Die Markierung des Hilfsgasflusses bei 120 L/h gibt den höchsten Hilfsgasfluss an, mit dem die DIP ihre maximale Temperatur von 400 °C z.T. noch erreichen konnte.....	66
Abb. 30:	Frontansicht der DIP-Multipropose-Quelle. Markiert sind die möglichen Bohrungen/Positionen zur Installation einer Heizung des Querkörpers, welche durch die Motoren und Scharniere der DIP blockiert werden.....	67
Abb. 31:	Überprüfung der Kapillarspannung nach iterativer Optimierung.....	68
Abb. 32:	Positive quadratische Kalibrationskurve von Koffein (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes- bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190]).....	69
Abb. 33:	Positive quadratische Kalibrationskurve von Kampfer (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes- bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190]).....	70
Abb. 34:	Positive quadratische Kalibrationskurve von Colchicin (schwarz: Regressionskurve, blau und rot: oberes- bzw. unteres Vertrauensband berechnet nach Zscheppank et al. [190]).....	70
Abb. 35:	Vergleich der Verdampfungsprofile von Kampfer (rot) und Colchicin (blau).....	71
Abb. 36:	Massenspektrum von je 1 µL Methanol. Ionisiert mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten). Mit DIP-EESI werden mehr Hintergrundsignale beobachtet als mit DIP-APCI, die weniger, dafür intensivere Signale liefert. ....	73
Abb. 37:	Vergleich der Konzentration an Wirkstoff in der originalverpackten Tablette und der neuverpackten halbierten Tablette für die neun untersuchten Medikamente. Zur leichteren Darstellung wurde angenommen, dass für die originalverpackten Tabletten jeweils 100 % Wirkstoff gefunden wurde. (Blau: Ionisierung mit DIP-APCI, Grün: Ionisierung mit DIP-EESI; dunkel: originalverpackte Tablette; hell: neuverpackte Tablette).....	77
Abb. 38:	Chronogramme von originalverpackten Midodrin-Tabletten gelöst in Methanol, ionisiert mit DIP-APCI. Es konnten keine reproduzierbaren Chronogramme erhalten werden. ....	79
Abb. 39:	Beispiele für Chronogramme von Clonazepam Tabletten (EIC für m/z = 316). Rot: originalverpackte Tablette; Schwarz neuverpackte Tablette; Ionisierung mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (Rechts).....	80
Abb. 40:	Average Mass Spektrum von Clonazepam nach Analyse mit DIP-EESI. Oben ohne Hintergrundabzug, unten nach Hintergrundabzug. Das [M+H] <sup>+</sup> von Clonazepam mit m/z = 316 kann nur in untergeordneter Form detektiert werden.....	80
Abb. 41:	Ausschnitte der Massenspektren der originalverpackten Clonazepam Tablette (rot) und der halbierten neuverpackten Tablette (schwarz) im Overlay. Rechts das Signal für den protonierten Wirkstoff. Links die Signale für die unbekannteren Verunreinigungen (m/z = 252 und 282), die in der halbierten neuverpackten Tablette deutlich intensiver sind als in der halben Tablette (Zoom 6x).....	81
Abb. 42:	Fragmentierung vom m/z = 257 (Palmitat) und m/z = 285 (Stearat) beides Fragmente des Magnesiumstearates, das als Hilfsstoff in der Formulierung verwendet wird. ....	81
Abb. 43:	Strukturformeln der Substanzen Clonazepam, 7-Aminoclonazepam, Nitrazepam und 7-Aminonitrazepam.....	82
Abb. 44:	Chromatogramme der Analyse von Clonazepam Tabletten mit HPLC-ESI-MS (links) und mit HPLC-APCI-MS (rechts); schwarz: EIC von m/z = 316 entspricht dem protonierten Wirkstoff; rot: EIC von m/z = 252; blau EIC von m/z = 282; grün: EIC von m/z = 286.....	84
Abb. 45:	Massenspektrum des Peaks bei 1,9 min, der im EIC von m/z = 282 detektiert wurde, m/z = 282 ist nur als untergeordnetes Signal zu sehen, wie in der Vergrößerung dargestellt ist. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Nitrazepam handelt.....	84
Abb. 46:	Chronogramm von Primidon Tabletten. Blau m/z = 219 entspricht dem [M+H] <sup>+</sup> des Wirkstoffes, rot bis braun auffällige Massen aus dem Average Mass Spectrum, die nicht dem Wirkstoff oder einer bekannten Verunreinigung zugeordnet werden konnten (m/z = 176, 164, 148, 135, 119 und 91).....	86
Abb. 47:	Flächenunterschiede der drei m/z-Verhältnisse, die eine Tendenz der Konzentrationszunahme in der neuverpackten Tablette zeigen, wie sie mit DIP-APCI erhalten wurden.....	86

- Abb. 48: Primidon (5-Ethyl-5-phenyldihydropyrimidin-4,6-(1H,5H)-dion; PRI) und seinen sechs bekannten in Ph. Eur. genannten Verunreinigungen A bis F (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.8 zusammengefasst) ... 87
- Abb. 49: Mögliche Strukturen der unbekannt Substanzen..... 89
- Abb. 50: Links: MS<sup>2</sup>-Fragmentierung des unbekannt Signals bei m/z = 217, ionisiert mit DIP-APCI; Rechts: Mögliche Struktur und Fragmentierungsweg der unbekannt Substanz ..... 90
- Abb. 51: Links: Fragmentierung des unbekannt Signals bei m/z = 176, ionisiert mit DIP-APCI; Rechts: Mögliche Strukturen und möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Substanz. .... 90
- Abb. 52: Links: Fragmentierung der unbekannt m/z = 148 ionisiert mit DIP-APCI.; Rechts mögliche Struktur und möglicher Fragmentierungsweg der unbekannt Substanz..... 91
- Abb. 53: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt Substanz mit m/z = 135, ionisiert mittels DIP-APCI ..... 92
- Abb. 54: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 119 ionisiert mittels DIP-APCI ..... 92
- Abb. 55: Schematische Darstellung der Addition des Fragments C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO (m = 175) an ein Primidonmolekül ..... 93
- Abb. 56: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt Substanz mit m/z = 394, wie sie der postulierten Substanz zugeordnet werden können. Die blauen Strukturen sind mit den Fragmenten, die aus der Verunreinigung F erhalten wurden identisch. Die rote Struktur ist gleich dem Wirkstoff, der weitere Fragmentierungsweg des Wirkstoffes ist im Anhang 6.2.8 beschrieben und identisch mit den hier gefundenen Fragmenten. Von den umrandeten Fragmenten wurden MS<sup>3</sup>-Untersuchungen durchgeführt, von den zwei Fragmenten mit gestrichelter Umrandung wurden MS<sup>4</sup>-Spektren erhalten. Der weitere Fragmentierungsweg der MS<sup>4</sup>-Fragmente ist nicht gezeigt. Die entsprechenden Fragmentspektren sind im Anhang 6.2.8 Seite 233 abgebildet ..... 94
- Abb. 57: Piracetam 2-Oxo-pyrrolidin-1-yl)-acetamid (PIR) und seine vier in Ph. Eur. genannten Verunreinigungen A bis D (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.7 zusammengefasst) ..... 95
- Abb. 58: HPLC-UV Chromatogramme von Piracetam-Tabletten (die oberen schwarzen Chromatogramme zeigen den Scan zwischen 190 und 400 nm, die unteren roten Chromatogramme die Aufnahme der einzelnen Wellenlänge bei 205 nm) a) Konzentration Piracetam 500 mg/L, Eluent Methanol: Phosphatpuffer; b) Konzentration Piracetam 0,5 mg/L, Eluent Methanol: Phosphatpuffer; c) Konzentration Piracetam 500 mg/L, Eluent Methanol: Ammoniumformiat [176]..... 96
- Abb. 59: HPLC-ESI-MS- Chromatogramme von Piracetam-Tabletten: schwarz: TIC; rot: EIC des protonierten Piracetams (m/z = 143; RT: 3,8 min); grün: EIC der protonierten Verunreinigung A (m/z = 86; RT: 4,6 min); blau: EIC der protonierten Verunreinigung B (m/z = 158; RT: 8,2 min); orange: EIC der protonierten Verunreinigung D sowie des C<sup>13</sup>-Isotops von Piracetam (m/z = 144: Verunreinigung D sollte vor dem Isotop-Peak des Piracetams eluieren, wurde nicht detektiert); dunkel grün: EIC der protonierten Verunreinigung C (m/z = 172: Verunreinigung C sollte bei 22 min eluieren) [176]. Die Strukturen des Wirkstoffes und der Verunreinigungen sind in Abb. 57 dargestellt. .... 97
- Abb. 60: Oben: MS-Spektrum von Piracetam bei 3,8 min (m/z = 50 – 400); unten links: MS-Spektrum der Verunreinigung A bei 4,6 min (m/z = 50 – 200); unten rechts: MS-Spektrum der Verunreinigung B bei 4,6 min (m/z = 50 – 200) und eingefügt das Fragmentspektrum von m/z = 158 ..... 97
- Abb. 61: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B von Piracetam, wie sie nach MS<sup>2</sup>-Untersuchungen detektiert wurden ..... 98
- Abb. 62: Massenspektren von Piracetam, die mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts) erhalten wurde. Piracetam ([M+H]<sup>+</sup>, m/z = 143) mit seinen Fragmenten (m/z = 126, 98 und 70) wird in beiden Spektren detektiert sowie im DIP-EESI Spektrum das Natrium-Addukt ([M+Na]<sup>+</sup>, m/z = 165) von Piracetam. [176] ..... 98
- Abb. 63: Vergrößerte Massenspektrum der Spektren aus Abb. 62 von Piracetam, die mittels DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts) erhalten wurden. Die Verunreinigung A ([M+H]<sup>+</sup>, m/z = 86) kann in beiden Spektren detektiert werden. Verunreinigung B ([M+H]<sup>+</sup>, m/z = 158) wird nur im DIP-EESI Spektrum detektiert. [176] ..... 99
- Abb. 64: MS<sup>2</sup>-Spektren der Verunreinigung A ionisiert mit a) DIP-APCI und b) DIP-EESI; sowie c) MS<sup>2</sup>-Spektren der Verunreinigung B ionisiert mittels DIP-EESI jeweils mit möglichen Strukturen der detektierten Fragmente [176] ..... 99
- Abb. 65: Fragmentierung von m/z = 157 nach DIP-APCI Ionisierung. Potentielles Radikalkation der Verunreinigung B ..... 100
- Abb. 66: Amlodipin Besilat 3-Ethyl-5-methyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridindicarboxylat Benzolsulfonsäure, (AML) und seine acht in Ph. Eur. beschriebenen Verunreinigungen A bis H (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.1 zusammengefasst)..... 101
- Abb. 67: HPLC-UV Chromatogramme von Amlodipin-Tabletten (die oberen schwarzen Chromatogramme zeigen den Scan zwischen 200 und 600 nm, die unteren roten Chromatogramme die Aufnahme der einzelnen Wellenlänge bei

	237 nm) a) Konzentration Amlodipin 3 mg/L (Amlodipin 6,26 min); b) Konzentration Amlodipin 1000 mg/L (Verunreinigung D 3,56 min (rot), vermutete Benzolsulfonsäure 1,55 min (blau), weitere nicht identifizierte Peaks (grün)) .....	102
Abb. 68:	HPLC-ESI-MS- Chromatogramme von Amlodipin-Tabletten: rot: BPC (gezoomt) gefolgt von den EIC für die protonierten Verunreinigungen grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ; RT: 4,3 min); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ; RT: 4,4 min); blau: Verunreinigung D ( $m/z = 407$ ; RT: 3,6 min); violett: Verunreinigung E ( $m/z = 423$ Identifizierung nicht möglich); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ; RT: 12,3 min); braun: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ ; RT: 19,0 min) .....	103
Abb. 69:	Average Mass Spektrum von Amlodipin-Besilat Tabletten ionisiert mittels DIP-APCI nach Hintergrundabzug. Blau markiert alle $m/z$ -Verhältnisse, die mittels $MS^n$ - Untersuchungen dem Wirkstoff Amlodipin zugeordnet werden konnten .....	104
Abb. 70:	EICs der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-APCI-MS; grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ); blau: Verunreinigung E ( $m/z = 423$ ); violett Verunreinigung D ( $m/z = 407$ ); pink Verunreinigung C ( $m/z = 468$ ); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ); braun: Verunreinigung H ( $m/z = 557$ ); rot: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ ) .....	105
Abb. 71:	Fragmentierung von $m/z = 423$ der potentiellen Verunreinigung E nach Ionisierung mit DIP-APCI. Farblich markiert wurden die $m/z$ -Signale, die bei der Untersuchung von Amlodipin mit der HPLC-ESI-MS nach Fragmentierung von $m/z = 423$ erhalten wurden. Rot: Fragmente des Peaks bei 5,3 min, blau: Fragmente des Peaks bei 9,0 min und grün: Fragmente des Peaks bei 10,6 min. Schwarz: alle weiteren Signale, die nicht als dominante Fragmente in den HPLC-ESI-MS Untersuchungen detektiert wurden oder zusätzlich im DIP-APCI Spektrum detektiert wurden. Die detaillierten HPLC-ESI-MS Spektren sind im Anhang 6.2.1, Abb. 161 Seite 173 dargestellt. ....	105
Abb. 72:	$MS^2$ -Spektrum von $m/z = 395$ wie es nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (Mitte) erhalten wurde. Zum Vergleich ist rechts das $MS^3$ -Fragmentspektrum von $m/z = 409 \rightarrow 392$ ionisiert mit DIP-EESI dargestellt. ....	106
Abb. 73:	Teil des Fragmentierungsweges von Amlodipin. Oben ohne Isotope, unten mit einem wahllos gesetzten $^{13}C$ -Atom und einem $^{37}Cl$ -Atom .....	106
Abb. 74:	EIC von $m/z = 392$ . Zu sehen sind neben dem Wirkstoffpeak zwischen 5,5 und 6,8 min sieben weitere Peaks. Die Massenspektren sind in Anhang 6.2.1 in Abb. 133 Seite 171 gezeigt .....	107
Abb. 75:	Average Massenspektrum von Amlodipin-Besilat Tabletten ionisiert mittels DIP-EESI nach Hintergrundabzug. Grün markiert alle $m/z$ -Verhältnisse, die dem Wirkstoff Amlodipin mittels $MS^n$ -Untersuchungen zugeordnet werden konnten.....	108
Abb. 76:	Fragmentierung von $m/z = 423$ der potentiellen Verunreinigung E nach Ionisierung mit DIP-EESI. Farblich markiert wurden die $m/z$ -Signale, die bei der Untersuchung von Amlodipin mit der HPLC-ESI-MS und DIP-APCI nach Fragmentierung von $m/z = 423$ erhalten wurden. Rot: Fragmente des Peaks bei 5,3 min, blau: Fragmente des Peaks bei 9,0 min und grün: Fragmente des Peaks bei 10,6 min. Violett: Fragmente, die zusätzlich mit der DIP-APCI erhalten wurden. Schwarz: alle weiteren Signale, die nicht als dominante Fragmente in den HPLC-ESI-MS Untersuchungen detektiert wurden oder zusätzlich im DIP-APCI Spektrum detektiert wurden. Die detaillierten HPLC-ESI-MS Spektren sind im Anhang 6.2.1, Abb. 161 Seite 173 dargestellt.....	108
Abb. 77:	Zeitliche Unterschiede der unbekanntenen $m/z$ -Verhältnisse unterteilt in drei Gruppen (blau: $t = 1,9$ min, $m/z = 346, 360, 414, 508$ ; rot: $t = 2,1$ min, $m/z = 318, 340, 435, 531$ ; grün: $t = 2,6-2,7$ min, $m/z = 706, 720$ ) im Vergleich zu Amlodipin (schwarz: $t = 1,8$ min $m/z = 409$ ).....	109
Abb. 78:	Links oben: $MS^2$ -Spektrum der Masse 508; Links unten: $MS^2$ -Spektrum der Masse 414; Rechts: $MS^3$ -Spektrum $508 \rightarrow 360$ zeigt dieselben Massen wie das $MS^2$ -Spektrum unten rechts .....	110
Abb. 79:	Mögliche Strukturen für $m/z = 360, 346$ und $508$ , gebildet anhand der Fragmente, die mittels DIP-EESI erhalten wurden, sowie ihre Verbindung zu $m/z = 392$ , das mittels HPLC-ESI-MS erhalten wurde. ....	111
Abb. 80:	EIC von $m/z = 346$ nach Analyse mit HPLC-ESI-MS (oben) und Fragmentspektren der Peaks bei 17,9 min (Mitte) und 20,7 min (unten) .....	112
Abb. 81:	Fragmentspektren (links $MS^2$ -, rechts $MS^3$ -Spektrum) von $m/z = 346$ nach Ionisierung mit DIP-EESI. Rot markiert wurden die Massen, die identisch sind mit den Fragmenten, die im HPLC-ESI-MS Peak bei 20,7 min detektiert wurden. Blau markiert wurden die Massen, die identisch sind mit den Fragmenten, die bei 17,9 min detektiert wurden.....	112
Abb. 82:	Oben: EIC-Chromatogramm von $m/z = 360$ . Unten: $MS^2$ -Spektren von $m/z = 360$ nach HPLC-ESI-MS Analyse. Links aus dem Peak bei 15,0 min und rechts aus dem Peak bei 20,7 min. Die Spektren sind gleich dem Spektrum, das mit DIP-EESI erhalten wurde. ....	113

Abb. 83: Overlay der EIC für die m/z-Werte der Gruppe 1 in Blautönen (m/z = 508, 414, 360 und 346), für m/z = 392 in rot und m/z = 409 (protonierter Wirkstoff) in schwarz .....	115
Abb. 84: Thermische Abbauprodukte von Amlodipin nach [201] .....	115
Abb. 85: Chronogramme der erhaltenen Fragmente. ....	116
Abb. 86: Massenspektrum des in Abb. 85 oben gezeigten Chronogramms. Grün eingefärbt alle m/z-Verhältnisse, die der Substanz A zugeordnet werden konnten. Blau eingefärbt alle m/z-Verhältnisse, die der Substanz B zugeordnet werden konnten. Rot eingefärbt alle m/z-Verhältnisse, die der Substanz C zugeordnet werden konnten. Die Signale m/z = 389 und 403 können sowohl Substanz A als auch C zugeordnet werden. ....	117
Abb. 87: Oben: Chronogramm der erhaltenen Fragmente aus m/z = 435 → 403. Unten: Massenspektrum des obigen Chronogramms. Blau: m/z-Verhältnisse können der Substanz A oder B zugeordnet werden. Rot: m/z-Verhältnisse können der Substanz C zugeordnet werden. ....	118
Abb. 88: Oben: Chronogramm der erhaltenen Fragmente aus m/z = 435 → 389. Unten: Massenspektrum des obigen Chronogramms. Blau: m/z-Verhältnisse können der Substanz A oder B zugeordnet werden. Rot: m/z-Verhältnisse können der Substanz C zugeordnet werden. ....	118
Abb. 89: Dehydrierte Form des N-Formyl-Amlodipin, als mögliche Struktur der unbekannt Substanz C (m/z = 435 t = 2,5 min).....	119
Abb. 90: Mögliche Strukturen des Signals m/z = 318, abgeleitet von Amlodipin.....	119
Abb. 91: Isotopenpattern von m/z = 706 und m/z = 720 wie es im Bereich 2,4 bis 3,1 min der Amlodipin DIP-EESI Messung detektiert wurde. ....	120
Abb. 92: Fragmentspektrum von m/z = 720 .....	121
Abb. 93: Mögliche Strukturen für m/z = 706 und 720, wie sie aus den erhaltenen MS <sup>2</sup> - und MS <sup>3</sup> -Untersuchungen abgeleitet wurden .....	122
Abb. 94: Metoprolol, Bis[[2RS)-1-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]propan-2-ol] (MET) und seine 12 in Ph. Eur. 7.0 beschriebenen Verunreinigungen A bis J, M bis O (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.3 zusammengefasst) .....	123
Abb. 95: Fragmentierung von m/z = 342 potentielle Verunreinigung J ionisiert mit DIP-EESI-MS.....	124
Abb. 96: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (§ nur mit HPLC; § nur mit DIP-APCI; # nur mit DIP-EESI detektiert).....	125
Abb. 97: Fragmentierung von m/z = 175 potentielle Verunreinigung M ionisiert mit DIP-EESI .....	126
Abb. 98: Mögliche Fragmente der Verunreinigung M mit DIP-EESI detektiert .....	126
Abb. 99: Fragmentierung von m/z = 153 nach Ionisierung mit DIP-EESI, sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung B .....	127
Abb. 100: Fragmentierung von m/z = 139 nach Ionisierung mit DIP-EESI (oben), sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung G (unten).....	127
Abb. 101: Fragmentierung von m/z = 227 nach Ionisierung mit DIP-EESI, sowie möglicher Fragmente der Verunreinigung D .....	128
Abb. 102: HPLC-ESI-MS Chromatogramme von Metoprolol-Tabletten. Dargestellt sind die EICs für die protonierten Verunreinigungen sowie für den Wirkstoff: Grün: Verunreinigung A und H (m/z = 254; RT: 2,4 min bzw. 4,0 min); türkis: Verunreinigung C (m/z = 238; RT: 2,8 min); blau: Metoprolol (m/z = 268; RT: 4,3 min); pink: Verunreinigung F (m/z = 210; RT: 3,9 min); rot: Verunreinigung J (m/z = 342; eindeutige Identifizierung nicht möglich); orange: Verunreinigung O (m/z = 476; RT: 8,5 min).....	128
Abb. 103: EICs der Fragmente m/z = 434 (grün), m/z = 292 (blau) und m/z = 294 (rot) die durch Fragmentierung von m/z = 476 nach Ionisierung mit DIP-APCI entstanden sind und zu unterschiedlichen Zeiten im Chronogramm detektiert wurden. ....	129
Abb. 104: Fragmentierung von m/z = 476 ionisiert mit DIP-APCI .....	130
Abb. 105: Average Mass Spektrum von Midodrin Hydrochlorid Tabletten ionisiert mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten) nach Hintergrundabzug. Blau bzw. grün markiert alle Massen, die dem Wirkstoff Midodrin zugeordnet werden konnten .....	131
Abb. 106: Midodrin, 2-Amino-N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]acetamid (MID) und seine in der USP beschriebenen Verunreinigung A Desglymidodrin .....	132
Abb. 107: Mögliche Struktur der unbekannt Masse m/z = 325. ....	132
Abb. 108: Links: EIC von m/z = 325 (schwarz) nach HPLC-ESI-MS Messung im Vergleich zum Wirkstoffpeak von Midodrin (m/z = 255; rot); Rechts: EIC von m/z = 223 (blau) und m/z = 207 (grün).....	133

Abb. 109: BPC von Midodrin (oben), UV-Chromatogramm (190- 600 nm) von Midodrin (unten). Zu sehen ist in beiden Chromatogrammen die Verunreinigung A bei 2,2 min gefolgt vom Wirkstoffpeak. Daneben sind zahlreich weitere kleine Peaks zu erkennen. ....	134
Abb. 110: Strukturen von Mirtazapin und den in Ph. Eur. beschriebenen sechs Verunreinigungen .....	135
Abb. 111: Massenspektren von Mirtazapin ionisiert mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts).....	135
Abb. 112: UV-Chromatogramm von Mirtazapin .....	135
Abb. 113: Oben: Fragmentspektren von $m/z = 252$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts), $m/z = 252$ entspricht der Verunreinigung E; Unten: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten. Die mit \$ gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mittels DIP-APCI detektiert. ....	136
Abb. 114: Oben: Fragmentspektren von $m/z = 268$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts), $m/z = 268$ entspricht der Verunreinigung F (im Spektrum sind ebenfalls die Fragmente des Wirkstoffes enthalten als Isotop von $m/z = 266$ , hier grau dargestellt); Unten: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten. Die mit # gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mittels DIP-EESI detektiert. ....	136
Abb. 115: Oben: Fragmentspektren von $m/z = 280$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (links) und DIP-EESI (rechts), $m/z = 280$ entspricht den Verunreinigung C und D; Mitte: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D und unten der Verunreinigung C, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten. ....	137
Abb. 116: Vergleich der Pipamperonmessungen mittels DIP-APCI und DIP-EESI. Oben in grün dargestellt das Chronogramm von $m/z = 376$ (Pipamperon $[M+H]^+$ ) ionisiert mit DIP-APCI und in blau ionisiert mit DIP-EESI (rechts: vergrößerte Darstellung). Unten: Average Mass Spectrum der Pipamperonmessung. Rechts: Ionisierung mit DIP-APCI, links mit DIP-EESI, sowie jeweils eine vergrößerte Darstellung zwischen 280 und 500 $m/z$ . DIP-EESI zeigt die Addukte $[M+Na]^+$ (+22 Da) und $[M+K]^+$ (+38 Da) während im DIP-APCI Spectrum eine Polymerverteilung eines Hilfsstoffes zu sehen ist. ....	138
Abb. 117: Pipamperon, 1'-[4-(4-Fluorphenyl)-4-oxobutyl]-[1,4'-bipiperidin]-4'-carbamid (PIP) und seine fünf von Trabelsi et al. [184] beschriebenen Verunreinigung A bis E (die Namen der Verunreinigung sind in Anhang 6.1.6 zusammengefasst) .....	138
Abb. 118: Fragmentspektren von $m/z = 374$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (Mitte und unten), $m/z = 374$ entspricht der Verunreinigung B (Die Ionisierung der Fragmentspektren erfolgte mit DIP-EESI, diese sind identisch mit denen für DIP-APCI, nicht gezeigt) .....	139
Abb. 119: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B, wie sie den Fragmentspektren zugeordnet werden konnten. Die mit \$ gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mittels DIP-APCI detektiert. ....	140
Abb. 120: Fragmentspektren von $m/z = 392$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI (oben) und DIP-EESI (unten), $m/z = 392$ entspricht der Verunreinigung C.....	140
Abb. 121: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C, wie sie dem DIP-APCI Fragmentspektrum zugeordnet werden konnten.....	141
Abb. 122: Links: Fragmentspektren von $m/z = 141$ , nach Ionisierung mit DIP-APCI, $m/z = 141$ entspricht der Verunreinigung E; Rechts: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E, wie sie dem Fragmentspektrum zugeordnet werden konnten.....	142
Abb. 123: Oben: HPLC-ESI-MS Base-Peak-Chromatogram (BPC) von Pipamperon. Peak 1 (RT = 2,0 min) konnte keiner bekannten Verunreinigung zu geordnet werden. Peak 2 (RT = 3,9 min) wurde als Verunreinigung B identifiziert. Peak 3 (RT = 4,7 min) ist der Wirkstoff. Unten: MS <sup>2</sup> -Spektrum von $m/z = 374$ des Peaks 2 bei 3,9 min. ....	142
Abb. 124: Average Mass Spectrum je einer Trazodonmessung ( $[M+H]^+$ $m/z = 372$ ). Links Ionisierung mit DIP-APCI, rechts mit DIP-EESI sowie jeweils eine vergrößerte Darstellung. DIP-EESI zeigt die Addukte $[M+Na]^+$ ( $m/z = 394$ ) während im DIP-APCI Spektrum eine Polymerverteilung eines Hilfsstoffes sowie ggf. bereits Verunreinigung B ( $m/z = 388$ ) zusehen ist. ....	143
Abb. 125: Trazodon 2-[3-[4-(3-Chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]-pyridin-3(2H)-on (TRZ) und seine acht in der USP beschriebenen Verunreinigungen A bis H (die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.9 zusammengefasst) .....	143
Abb. 126: MS <sup>2</sup> -Spektrn von $m/z = 388$ der potentiellen Verunreinigung A, nach Ionisierung mit DIP-APCI. ....	144
Abb. 127: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A, die den Massen aus dem MS <sup>2</sup> -Fragmentspektren aus Abb. 126 zugeordnet werden konnten. ....	144

Abb. 128: Links: EIC-Chronogramm der Fragmentmassen: $m/z = 382$ grün, gehört nicht zur Verunreinigung E, $m/z = 176$ blau und $m/z = 265$ rot sind potentielle Fragmente der Verunreinigung E. Rechts: oben Spektrum über den grünen Bereich des Chronogramms, unten Spektrum über den blauen Bereich des Chronogramms, wahrscheinlich der Verdampfungsbereich der Verunreinigung E, rosa markiert die $m/z$ -Signale, die mittels HPLC-ESI-MS für die Verunreinigung E detektiert wurden. ....	145
Abb. 129: $MS^2$ und $MS^3$ -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels DIP-EESI-MS, sowie unten mögliche Fragmente.....	146
Abb. 130: Chronogramm einer Acetylsalicylsäure-Tablette gelöst in Methanol (Konzentration ca. 50 mg/L). Die rote Linie stellt den BPC-Verlauf dar und markiert den 1. Bereich, während die blaue Line das EIC $m/z = 361$ zeigt, dass den 2. Bereich des Chronogramms kennzeichnet. ....	147
Abb. 131: Massenspektrum des Acetylsalicylsäure-Chronogramms im Bereich von 0 – 1,5 min. Der Pfeil zeigt das $m/z = 181$ , das für das $[M+H]^+$ von Acetylsalicylsäure erwartet wird. Oben wurde Methanol, unten Wasser als Lösungsmittel verwendet.....	148
Abb. 132: Mögliche Fragmente von Acetylsalicylsäure (s. Kasten), wie sie im 1. Bereich des Chronogramms detektiert wurden, z.T. in Übereinstimmung mit [208].....	148
Abb. 133: Massenspektrum des Acetylsalicylsäure-Chronogramms im Bereich von 1,5 – 3,5 min. Der Bereich zwischen $m/z = 700$ und 1000 ist vergrößert dargestellt. ....	149
Abb. 134: Mögliche Fragmente von Acetylsalicylsäure (s. Kasten), wie sie im 2. Bereich des Chronogramms detektiert wurden, z.T. beschrieben in [209].....	149
Abb. 135: Struktur von Hydrochlorothiazid.....	151
Abb. 136: Oben links: Chronogramm einer 0,5 g/L HCT-Tablettenlösung in Methanol, rot: BPC, blau: $m/z = 219$ , grün: $m/z = 217$ ; Oben rechts: Massenspektrum von 1,0 bis 3,5 min im negativen Modus ( $m/z =$ Bereich 150 – 325); unten: Massenspektrum im positiven Modus von 1,0 bis 3,5 min, blau markiert alle Massen, die zeitgleich mit $m/z = 219$ verdampfen, grün alle Massen, die zeitgleich mit $m/z = 217$ verdampfen. Der Pfeil markiert die Stelle, an der das Signal für das $[M+H]^+$ des Wirkstoffes auftreten müsste. ....	152
Abb. 137: Mögliche thermische Zersetzungsprodukte von HCT, sowie mögliche Fragmente, die aus $m/z = 219$ erhalten wurden. Oben wurden die Strukturen anhand der detektierten Massen und der HCT-Struktur abgeleitet, die Ergebnisse sind mit denen von Valladao et al. [210] konform. Unten wurden die Strukturen anhand möglicher Maillard-Reaktionsprodukte abgeleitet.....	153
Abb. 138: Links: vergrößertes Chronogramm einer 0,5 g/L HCT-Tablettenlösung in Methanol, blau: $m/z = 219$ , rot: $m/z = 298$ entspricht dem Signal des protonierten Wirkstoffes; rechts: Chronogramm mit verlängertem Temperaturgradienten. ....	154
Abb. 139: DIP-APCI Chronogramme von Irbesartan. Links: Temperaturanstieg mit $2^\circ/s$ ( $n=3$ ); Mitte: Temperaturanstieg mit $1^\circ/s$ ( $n=2$ ); Rechts: DIP-EESI Chronogramm Temperaturanstieg mit $2,9^\circ/s$ . Rot und orange $m/z = 386$ entspricht dem intensivsten Zersetzungsprodukt von Irbesartan; grün und blau $m/z = 429$ entspricht dem protonierten Irbesartan.....	155
Abb. 140: Average Mass Spektren von Irbesartan-Tabletten nach Ionisierung mit DIP-APCI oben (vergrößert) und DIP-EESI unten. ....	155
Abb. 141: Chronogramm der detektierten Zersetzungsprodukte $m/z = 386$ (schwarz), $m/z = 786$ (rot) und $m/z = 801$ (blau).....	156
Abb. 142: Oben Fragmentspektren von $m/z = 386$ wie sie nach Ionisierung mit DIP-APCI erhalten wurden. Unten Fragmentierungsweg der postulierten Struktur für $m/z = 386$ . ....	157
Abb. 143: Fragmentspektren von $m/z = 801$ wie sie nach Ionisierung mit DIP-APCI erhalten wurden.....	157
Abb. 144: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekanntes Substanz mit $m/z = 801$ (es sind nur die Strukturen der intensivsten Fragmente gezeigt, der vollständige Fragmentierungsweg ist im Anhang 6.2.3 dargestellt).....	158
Abb. 145: Strukturformeln von Irbesartan (Irb, 2-Butyl-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]phenyl]methyl]-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on), sowie den drei untersuchten bekannten Verunreinigungen von Irbesartan (Verunreinigung 1, 2 beschrieben in [216–219] und Verunreinigung A beschrieben in Ph. Eur., die Namen der Verunreinigungen sind in Anhang 6.1.2 zusammengefasst).....	159
Abb. 146: Fragmentspektren von $m/z = 415$ und 447, wie sie nach der Ionisierung mit DIP-EESI detektiert wurden. ....	159
Abb. 147: Oben: Fragmentspektren von $m/z = 415$ ; Mitte: Fragmentspektren von $m/z = 447$ ; Unten: Fragmentspektren von $m/z = 447$ jeweils nach Ionisierung mit DIP-APCI.....	160

Abb. 148: Fragmentierung von $m/z = 415$ (oben) und $m/z = 447$ (Mitte) nach Analyse mit HPLC-ESI-MS. Die Fragmente für $m/z = 447$ stimmen mit dem von Shah et al. [220] postuliertem Abbauprodukt (ABP) überein, die Fragmente können auch Verunreinigung A zugeordnet werden (unten).....	161
Abb. 149: Fragmentspektren von $m/z = 404$ sowie die $MS^3$ -Spektren aus $m/z = 404$ , wie sie nach der Ionisierung mit DIP-EESI detektiert wurden.....	162
Abb. 150: Mögliche Fragmente der Verunreinigung 1, wie sie den Fragmentspektren, erzeugt mit DIP-EESI und DIP-APCI, zugeordnet werden konnten. Die mit § gekennzeichneten Fragmenten wurden nur mit DIP-APCI detektiert. ....	162
Abb. 151: EICs (links) und Chronogramme im SIM-Modus (rechts) der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-EESI-MS; grün: Verunreinigung G ( $m/z = 336$ ); türkis: Verunreinigung F ( $m/z = 395$ ); blau: Verunreinigung E ( $m/z = 423$ ); violett Verunreinigung D ( $m/z = 407$ ) .....	168
Abb. 152: EICs (links) und Chronogramme im SIM-Modus (rechts) der Amlodipin-Verunreinigungen gemessen mit DIP-EESI-MS; pink Verunreinigung C ( $m/z = 468$ ); orange: Verunreinigung A ( $m/z = 539$ ); braun: Verunreinigung H ( $m/z = 557$ ); rot: Verunreinigung B ( $m/z = 570$ ) .....	168
Abb. 153: Fragmentierung von $m/z = 539$ potentielle Verunreinigung A. Ionisierung mit DIP-APCI (oben), DIP-EESI (Mitte) und HPLC-ESI-MS (unten, RT = 12,3 min).....	169
Abb. 154: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A (§ mit HPLC; § mit DIP-APCI; # mit DIP-EESI detektiert) .....	170
Abb. 155: Fragmentierung von $m/z = 570$ potentielle Verunreinigung B. Ionisierung mit HPLC-ESI-MS (RT = 19,0 min).....	171
Abb. 156: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B.....	171
Abb. 157: Fragmentierung von $m/z = 468$ potentielle Verunreinigung C. Ionisierung mit DIP-EESI .....	171
Abb. 158: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C.....	172
Abb. 159: Fragmentierung von $m/z = 407$ potentielle Verunreinigung D. Ionisierung mit DIP-APCI (oben links), DIP-EESI (oben rechts) und HPLC-ESI-MS (unten, RT = 3,6 min) .....	173
Abb. 160: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D .....	173
Abb. 161: Fragmentierung von $m/z = 423$ potentielle Verunreinigung E. Ionisierung mit a) DIP-APCI, b) DIP-EESI und c – e) HPLC-ESI-MS (RT = 5,3 min, 9,0 min bzw. 10,6 min) .....	174
Abb. 162: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E (§ mit HPLC; § mit DIP-APCI; # mit DIP-EESI detektiert).....	175
Abb. 163: Fragmentierung von $m/z = 336$ potentielle Verunreinigung G. Ionisierung mit DIP-APCI (oben), DIP-EESI (Mitte) $MS^3$ -Fragmentierung mit DIP-EESI (unten) .....	176
Abb. 164: Fragmentierung von $m/z = 336$ potentielle Verunreinigung G nach Analyse mit HPLC-ESI-MS (RT = 4.3 min) .....	176
Abb. 165: Mögliche Fragmente der Verunreinigung G (§ nur mit DIP-APCI detektiert).....	177
Abb. 166: Fragmentierung von $m/z = 395$ potentielle Verunreinigung F detektiert mit HPLC-ESI-MS (RT = 4,4 min) .....	178
Abb. 167: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F.....	178
Abb. 168: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekanntes Verunreinigung $m/z = 346$ (das Fragmentspektrum ist in Kapitel 4.4.2.3 Abb. 81 Seite 112 gezeigt).....	179
Abb. 169: Massenspektren der Peak bei 8,5 min, 9,4 min, 10,1 min, 15,0 min, 17,9 min und 20,7 min (von oben nach unten) nach HPLC-ESI-MS Analyse.....	180
Abb. 170: Fragmentspektrum von $m/z = 531$ ionisiert mit DIP-EESI.....	181
Abb. 171: Fragmentspektrum von $m/z = 706$ ionisiert mit DIP-EESI (oben), $MS^3$ -Spektren von $m/z = 706 \rightarrow 343$ (Mitte) und $MS^4$ -Spektrum von $m/z = 706 \rightarrow 343 \rightarrow 311$ (unten) .....	181
Abb. 172: $MS^3$ -Spektrum von $m/z = 720 \rightarrow 357$ ionisiert mit DIP-EESI.....	181
Abb. 173: Linienspektrum ( $m/z = 50-400$ ) von Clonazepam Tabletten, oben originalverpackt, unten halbiert und neuverpackt.....	182
Abb. 174: $MS^2$ und $MS^3$ -Spektren des Wirkstoffes Clonazepam sowie mögliche Fragmente (Fragmentierung für $m/z = 316 \rightarrow 270$ in Übereinstimmung mit Grzeškowiak et al. [221]) .....	182
Abb. 175: Fragmentierung von $m/z = 252$ (7-Aminonitrazepam) .....	184
Abb. 176: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekanntes Verunreinigung $m/z = 252$ .....	184
Abb. 177: Fragmentierung von $m/z = 282$ (Nitrazepam) .....	185
Abb. 178: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekanntes Verunreinigung $m/z = 282$ .....	185
Abb. 179: Fragmentierung von $m/z = 286$ (7-Aminoclonazepam).....	186
Abb. 180: Möglicher Fragmentierungsweg der unbekanntes Verunreinigung $m/z = 286$ .....	186
Abb. 181: Fragmentierung vom $m/z = 257$ (Palmitat) und $m/z = 285$ (Stearat) beides Fragmente des Magnesiumstearates, das als Hilfsstoff in der Formulierung verwendet wird. ....	187
Abb. 182: DIP-APCI $MS^2$ und $MS^3$ -Spektren des Wirkstoffes Irbesartan .....	188

Abb. 183: Mögliche Fragmente des Wirkstoffs Irbesartan (z.T. in Übereinstimmung mit Shah et al. [220]).....	189
Abb. 184: HPLC-ESI MS <sup>2</sup> Spektren des Wirkstoffes Irbesartan die Fragmente stimmen mit den mit DIP-APCI gefundenen überein s.o. ....	190
Abb. 185: Fragmentierung von m/z = 404 nach Ionisierung mit DIP-APCI .....	191
Abb. 186 Mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt Substanz mit m/z = 801 .....	191
Abb. 187 Fortsetzung der Fragmente der unbekannt Substanz mit m/z = 801 (MS <sup>3</sup> -Fragmente) .....	192
Abb. 188: Fragmentierung von m/z = 254. Oben DIP-APCI; Mitte HPLC-ESI-MS, RT=2,4 min identifiziert als Verunreinigung H; unten HPLC-ESI-MS, RT=4,0 min identifiziert als Verunreinigung A .....	193
Abb. 189: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A .....	194
Abb. 190: Mögliche Fragmente der Verunreinigung H.....	194
Abb. 191: Fragmentierung von m/z = 153 nach Ionisierung mit DIP-APCI potentielle Verunreinigung B.....	195
Abb. 192: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B .....	195
Abb. 193: Fragmentierung von m/z = 238. Oben HPLC-ESI-MS, RT=2,8 min identifiziert als Verunreinigung C; Mitte und unten DIP-APCI .....	196
Abb. 194: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C.....	197
Abb. 195: Fragmentierung von m/z = 210. Oben links HPLC-ESI-MS, RT=3,9 min identifiziert als Verunreinigung F; oben rechts DIP-EESI; Mitte und unten DIP-APCI (mit DIP-EESI und DIP-APCI konnte die Verunreinigung F nicht identifiziert werden aufgrund zu starker Interferenzen) .....	198
Abb. 196: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F .....	199
Abb. 197: Fragmentierung von m/z = 139 nach Ionisierung mit DIP-APCI potentielle Verunreinigung G .....	199
Abb. 198: Mögliche Fragmente der Verunreinigung G.....	200
Abb. 199. Fragmentierung von m/z = 342 potentielle Verunreinigung J mittels HPLC-ESI-MS. Oben RT = 4,0 min; unten RT =4,6 min.....	200
Abb. 200. Fragmentierung von m/z = 342 ionisiert mit DIP-APCI-MS potentielle Verunreinigung J .....	201
Abb. 201: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (§ mittels HPLC; § mittels DIP-APCI; # mittels DIP-EESI detektiert) .....	202
Abb. 202: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (m/z = 342 → 324) mittels DIP-APCI detektiert .....	203
Abb. 203: Mögliche Fragmente der Verunreinigung J (Oben: m/z = 342 → 310; m/z = 342 → 300; Mitte: m/z = 342 → 268; Unten: m/z = 342 → 190) mittels DIP-APCI und DIP-EESI detektiert (# nur mittels DIP-EESI; § nur mittels DIP-APCI detektiert) .....	204
Abb. 204: Fragmentierung von m/z = 175 nach Ionisierung mit DIP-APCI (potentielle Verunreinigung M).....	205
Abb. 205: Mögliche Fragmente der Verunreinigung M mittels DIP-APCI detektiert .....	205
Abb. 206. Fragmentierung von m/z = 476 mittels HPLC-ESI-MS. Oben RT = 1,1 min; Mitte links RT =2,8 min, Mitte rechts RT = 9,7 min; unten RT = 8,5 min identifiziert als Verunreinigung O .....	206
Abb. 207: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels HPLC-ESI-MS detektiert .....	206
Abb. 208: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert (MS <sup>2</sup> m/z = 476) .....	207
Abb. 209: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert (oben: m/z = 476 → 458; unten: m/z = 476 → 324).....	208
Abb. 210: Mögliche Fragmente der Verunreinigung O mittels DIP-APCI-MS detektiert (oben: m/z = 476 → 444; unten: m/z = 476 → 268).....	209
Abb. 211: DIP-APCI MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren des Wirkstoffes Midodrin sowie mögliche Fragmente .....	210
Abb. 212: Fragmentierung von m/z = 198 potentielle Verunreinigung A.....	211
Abb. 213: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren der unbekannt Verunreinigung m/z = 325 detektiert mit DIP-EESI .....	211
Abb. 214: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt Verunreinigung mit m/z = 325 detektiert mit DIP-EESI .....	212
Abb. 215: DIP-EESI MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren des Wirkstoffes Mirtazapin sowie unten mögliche Fragmente (in Übereinstimmung mit Smyth et al. [222]) (mit DIP-APCI wurde dieselben Spektren detektiert; nicht gezeigt) .....	213
Abb. 216: DIP-APCI MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren des Wirkstoffes Pipamperon (mittels DIP-EESI wurde dieselben Spektren detektiert; nicht gezeigt).....	214
Abb. 217: Mögliche Fragmente des Wirkstoffes Pipamperon, wie sie durch MS <sup>2</sup> -Fragmentierung erhalten wurden .....	214
Abb. 218: Mögliche Fragmente des Wirkstoffes Pipamperon durch MS <sup>3</sup> -Fragmentierung.....	215
Abb. 219: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B durch MS <sup>3</sup> -Fragmentierung .....	216
Abb. 220: Average Mass Spectrum von Primidon-Tabletten. Oben Ionisierung mittels DIP-APCI. Unten Ionisierung mittels DIP-EESI. Jeweils oben rechts dargestellt die Vergrößerung des m/z-Bereich 90 – 225. Blau bzw. grün markiert das [M+H] <sup>+</sup> m/z = 219 sowie die identifizierten Fragmente des Wirkstoffes .....	217

Abb. 221: DIP-APCI MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren des Wirkstoffes Pipamperon (mittels DIP-EESI wurde die gleichen Spektren detektiert; nicht gezeigt) .....	217
Abb. 222: Mögliche Fragmente des Wirkstoffes Pipamperon, wie sie durch MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Fragmentierung erhalten wurden ...	218
Abb. 223: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme von Primidon-Tabletten: grün: EIC der protonierten Verunreinigung A (m/z = 207; RT: 2,8 min); hellblau: EIC des Wirkstoffes Primidon (m/z = 219; RT: 5,0 min), blau: EIC der protonierten Verunreinigung B (m/z = 233; RT: 6,0 min); violett EIC der protonierten Verunreinigung C (m/z = 164, wurde nicht detektiert), pink EIC der protonierten Verunreinigung D (m/z = 189, wurde nicht detektiert), orange: EIC der protonierten Verunreinigung E (m/z = 165, wurde nicht detektiert), braun: EIC der protonierten Verunreinigung F (m/z = 337; RT: 15,8 min) .....	219
Abb. 224: DIP-APCI-MS-Chronogramme von Primidon-Tabletten: grün: EIC des Wirkstoffes Primidone (m/z = 219), hellblau: EIC der protonierten Verunreinigung C (m/z = 164), blau: EIC der protonierten Verunreinigung E (m/z = 165), violett: EIC der protonierten Verunreinigung D (m/z = 189), pink: EIC der protonierten Verunreinigung A (m/z = 207), orange: EIC der protonierten Verunreinigung B (m/z = 233), rot: EIC der protonierten Verunreinigung F (m/z = 337) .....	220
Abb. 225: Fragmentierung von m/z = 207 potentielle Verunreinigung A. Oben DIP-APCI; Mitte DIP-EESI (Die Ionisierung der Fragmentspektren erfolgte mit DIP-EESI) und unten HPLC-ESI-MS (RT: 2,8 min) .....	221
Abb. 226: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A. ....	221
Abb. 227: Fragmentierung von m/z = 233 potentielle Verunreinigung B. Oben DIP-APCI gefolgt von den MS <sup>3</sup> -Spektren; unten links DIP-EESI; unten Mitte und unten rechts HPLC-ESI-MS (RT: 6,0 min) .....	222
Abb. 228: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B. wie sie durch MS <sup>3</sup> -Fragmentierung erhalten wurden. Die Ionisierung erfolgte ausschließlich mit DIP-APCI. ....	223
Abb. 229: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B. wie sie durch MS <sup>2</sup> -Fragmentierung mittels DIP-APCI erhalten wurden. Die Fragmentierung von m/z = 188 (MS <sup>3</sup> ) erfolgte ausschließlich nach LC-Trennung mit ESI.....	223
Abb. 230: Fortsetzung: Mögliche Fragmente der Verunreinigung B, wie sie durch MS <sup>3</sup> -Fragmentierung erhalten wurden .....	224
Abb. 231: Fragmentierung von m/z = 164 potentielle Verunreinigung C. Links DIP-APCI; rechts DIP-EESI .....	225
Abb. 232: Mögliche Fragmente der Verunreinigung C.....	225
Abb. 233: Fragmentierung von m/z = 189 potentielle Verunreinigung D (nur mittels DIP-APCI detektiert).....	225
Abb. 234: Mögliche Fragmente der Verunreinigung D. ....	226
Abb. 235: Fragmentierung von m/z = 165 potentielle Verunreinigung E. Links DIP-APCI; rechts DIP-EESI (m/z = 120 und 92 werden durch das <sup>13</sup> C-Isotop der Verunreinigung C ebenfalls m/z = 165 verursacht) .....	226
Abb. 236: Mögliche Fragmente der Verunreinigung E. (§ nur mit DIP-APCI; # nur mit DIP-EESI; ohne mit beiden detektiert)....	226
Abb. 237: Fragmentierung von m/z = 337 potentielle Verunreinigung F. Oben DIP-APCI, Mitte DIP-EESI und unten HPLC-ESI-MS (RT: 15,8 min) .....	227
Abb. 238: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit DIP-APCI erhalten wurden. ....	228
Abb. 239: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit DIP-EESI erhalten wurden. ....	229
Abb. 240: Mögliche Fragmente der Verunreinigung F, wie sie mit HPLC-ESI-MSI erhalten wurden. ....	230
Abb. 241: Fragmentierung der unbekannt m/z = 217 ionisiert mit DIP-APCI .....	231
Abb. 242: Eine mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt m/z = 217 .....	231
Abb. 243: Fragmentierung der unbekannt m/z = 176 ionisiert mit DIP-APCI. ....	232
Abb. 244: Mögliche Strukturen und Fragmente der unbekannt m/z = 176 ionisiert mit DIP-APCI.....	232
Abb. 245: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 174 ionisiert mit DIP-APCI.....	232
Abb. 246: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 162 ionisiert mit DIP-APCI.....	233
Abb. 247: Fragmentierung sowie eine mögliche Struktur der unbekannt m/z = 148 ionisiert mit DIP-APCI.....	233
Abb. 248: Fragmentierung der unbekannt m/z = 394 ionisiert mittels DIP-EESI .....	234
Abb. 249: Mögliche Struktur und Fragmente der unbekannt m/z = 394 (Kasten: MS <sup>3</sup> , gestrichelter Kasten MS <sup>4</sup> ).....	235
Abb. 250: DIP-APCI MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren des Wirkstoffes Trazodon (Oben: DIP-APCI, Mitte DIP-EESI, unten: HPLC-ESI-MS RT:8,2 min).....	236
Abb. 251: Mögliche Fragment von Trazodon wie sie mit DIP-APCI, DIP-EESI und HPLC-ESI-MS erhalten wurden .....	236
Abb. 252: MS <sup>n</sup> -Spektren von m/z = 388 der potentiellen Verunreinigung A, nach Ionisierung mit DIP-APCI. ....	237
Abb. 253: Mögliche Fragmente der Verunreinigung A, die den Massen aus den Fragmentspektren aus Abb. 252 zugeordnet werden konnten.....	237
Abb. 254: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 4,7 min), sowie unten mögliche Fragmente .....	239

Abb. 255: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren der potentiellen Verunreinigung B detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 4,5 min), sowie rechts mögliche Fragmente.....	240
Abb. 256: MS <sup>2</sup> -Spektrum der potentiellen Verunreinigung E detektiert mit DIP-APCI-MS, nachdem der Verdampfungsbereich über die mittels HPLC-ESI-MS bestimmten Fragmente herausgefunden wurde. Fragmente der Verunreinigung E sind m/z = 148, 176 und 265, der Rest konnte nicht zugeordnet werden.....	240
Abb. 257: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren der potentiellen Verunreinigung E detektiert mittels HPLC-ESI-MS (RT: 3,3 min), sowie unten mögliche Fragmente .....	240
Abb. 258: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> -Spektren der potentiellen Verunreinigung A detektiert mittels DIP-EESI-MS, sowie unten mögliche Fragmente.....	241
Abb. 259: Fragmentierung von m/z = 338 potentielle Verunreinigung B, Ionisierung mittels DIP-EESI, hier nur Hilfsstoff sichtbar.....	241
Abb. 260: Fragmentierung von m/z = 273 potentielle Verunreinigung F, Ionisierung mittels DIP-EESI .....	242

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Limits des Tablettengewichtes für die Bestimmung der Gleichheit des Gewichtes [157] .....	27
Tabelle 2:	Grenzwerte für Verunreinigungen abhängig von der jeweiligen maximalen Tageshöchstdosis [162] .....	29
Tabelle 3:	Methodenparameter der Amlodipin-Messungen .....	39
Tabelle 4:	Methodenparameter der Clonazepam LC-UV-Messungen .....	40
Tabelle 5:	Methodenparameter der Clonazepam LC-MS-Messungen .....	40
Tabelle 6:	Methodenparameter der Irbesartan LC-UV-Messungen .....	41
Tabelle 7:	Methodenparameter der Clonazepam LC-MS-Messungen .....	41
Tabelle 8:	Methodenparameter der Metoprolol -Messungen .....	42
Tabelle 9:	Methodenparameter der Midodrin LC-UV-Messungen .....	43
Tabelle 10:	Methodenparameter der Midodrin LC-MS-Messungen .....	43
Tabelle 11:	Methodenparameter der Mirtazapin LC-UV-Messungen .....	44
Tabelle 12:	Methodenparameter der Pipamperon LC-UV-Messungen .....	45
Tabelle 13:	Methodenparameter der Pipamperon LC-MS-Messungen .....	45
Tabelle 14:	Methodenparameter der Piracetam LC-UV-Messungen .....	46
Tabelle 15:	Methodenparameter der Piracetam LC-MS-Messungen .....	46
Tabelle 16:	Methodenparameter der Primidon LC-UV-Messungen .....	47
Tabelle 17:	Methodenparameter der Primidon LC-MS-Messungen .....	48
Tabelle 18:	Methodenparameter der Trazodon LC-UV-Messungen .....	49
Tabelle 19:	Methodenparameter der Trazodon LC-MS-Messungen .....	49
Tabelle 20:	Einwaagen (EW), Verdünnungen und Endkonzentrationen der verwendeten Tabletten Lösungen für die DIP-APCI und DIP-EESI-Messungen .....	51
Tabelle 21:	Parameter für die DIP-APCI-Messungen gemäß Krieger et al. [143] .....	52
Tabelle 22:	Weitere Parameter der Ionenfalle .....	52
Tabelle 23:	Parameter für die DIP-EESI-Messungen z.T. veröffentlicht von Lenzen et al. [176] .....	53
Tabelle 24:	Temperaturgradienten der DIP-APCI und DIP-EESI-Messungen .....	53
Tabelle 25:	Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der drei Ionisierungsmethoden DIP-EESI, DIP-APCI und DIP-APCI für verschiedenen Substanzen. ....	71
Tabelle 26:	Reporting Threshold für zwei verschiedenen Einwaagen sowie die Tablettenpulver-Einwaage mit der es möglich ist, mit einem LOQ von 30 ng den Reporting Threshold zu erreichen. ....	74
Tabelle 27:	Relative Standardabweichung [%] der Gehaltsbestimmung der Wirkstoffe .....	78
Tabelle 28:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>n</sup> -Fragmente des Wirkstoffs Clonazepam m/z = 316 und der unbekannt Substanz m/z = 282. Alle erhaltenen Fragmente zeigen zwischen der unbekannt Substanz und dem Wirkstoff die Massendifferenz von 34 Da. ....	82
Tabelle 29:	Zusammenfassung des Vergleichs der Ergebnisse von DIP-APCI, DIP-EESI und HPLC-ESI-MS .....	89
Tabelle 30:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>3</sup> -Fragmente aus m/z = 394, Substanz F (m/z = 337) und MS <sup>2</sup> -Fragmente des Wirkstoffes (m/z = 219) (fett: Übereinstimmende Fragmente der unbekannt Substanz m/z = 394 und der Substanz F oder des Wirkstoffes, nicht fett: keine Übereinstimmung der unbekannt Substanz mit einer bekannten Verbindung) .....	93
Tabelle 31:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>n</sup> -Fragmente die aus den dominanten Signalen der Gruppe 1 erhalten wurden. Oben: Fragmente wie sie nach Ionisierung mit DIP-EESI gefunden wurden. Mitte: Übersicht der Peaks im HPLC-ESI-MS Chromatogramm, die die dominanten m/z-Signale zeigen. Bei 15,0 min, 17,9 min und 20,7 min traten die intensivsten Peaks auf. Unten: Fragmente der relevanten m/z-Signale der intensivsten Peaks. ....	114
Tabelle 32:	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Fragmentation der m/z-Signale, die der Gruppe 2 zugeordnet wurden .....	116
Tabelle 33:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>2</sup> -Fragmente aus m/z = 435, sowie deren Zuordnung zu den unbekannt Substanzen A, B und C. ....	117
Tabelle 34:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>2</sup> -Fragmente aus m/z = 531, Substanz B (m/z = 435) und Substanz E (m/z = 318) .....	119
Tabelle 35:	Gemessene Intensitätsverteilung von m/z = 720 bis m/z = 725 und die daraus ermittelte Isotopenverteilung sowie die theoretische Isotopenverteilung für je ein theoretisches Molekül mit zwei Chloratomen bzw. einem Chlor und einem Bromatom .....	120
Tabelle 36:	Gemessene Intensitätsverteilung von m/z = 706 bis m/z = 711 und die daraus ermittelte Isotopenverteilung sowie die theoretische Isotopenverteilung für je ein theoretisches Molekül mit zwei Chloratomen bzw. einem Chlor und einem Bromatom .....	121
Tabelle 37:	Übersicht der erhaltenen MS <sup>2</sup> -Fragmente aus m/z = 706 und m/z = 720 .....	121
Tabelle 38:	Liste der bekannten Verunreinigungen von Acetylsalicylsäure gemäß Ph. Eur. 7.0 [157] .....	150

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Basile, F.; Zhang, S.; Shin, Y.-S.; Drolet, B.; Atmospheric pressure-thermal desorption (AP-TD)/electrospray ionization-mass spectrometry for the rapid analysis of *Bacillus* spores *The Analyst*, 135 (2010) 797–803.
- [2] Devenport, N. A.; Sealey, L. C.; Alruways, F. H.; Weston, D. J.; Reynolds, J. C.; Creaser, C. S.; Direct detection of a sulfonate ester genotoxic impurity by atmospheric-pressure thermal desorption-extractive electrospray-mass spectrometry *Anal. Chem.*, (2013) 6224–6227.
- [3] Devenport, N. A.; Blenkhorn, D. J.; Weston, D. J.; Reynolds, J. C.; Creaser, C. S.; Direct determination of urinary creatinine by reactive-thermal desorption-extractive electrospray-ion mobility-tandem mass spectrometry *Anal. Chem.*, 86 (2014) 357–361.
- [4] Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. Graham; Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization *Science*, 306 (2004) 471–473.
- [5] Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. Dupont; Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions *Anal. Chem.*, 77 (2005) 2297–2302.
- [6] Cooks, R. Graham; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Ambient mass spectrometry *Science*, 311 (2006) 1566–1570.
- [7] Chen, H.; Gamez, G.; Zenobi, R.; What can we learn from ambient ionization techniques? *J Am Soc Mass Spectrom*, 20 (2009) 1947–1963.
- [8] Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N.; Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world" *Anal Bioanal Chem*, 398 (2010) 265–294.
- [9] Huang, M.-Z.; Yuan, C.-H.; Cheng, S.-C.; Cho, Y.-T.; Shiea, J.; Ambient ionization mass spectrometry *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 3 (2010) 43–65.
- [10] Weston, D. J.; Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas *The Analyst*, 135 (2010) 661–668.
- [11] Huang, M.-Z.; Cheng, S.-C.; Cho, Y.-T.; Shiea, J.; Ambient ionization mass spectrometry: a tutorial *Analytica Chimica Acta*, 702 (2011) 1–15.
- [12] Javanshad, R.; Venter, A. R.; Ambient ionization mass spectrometry: real-time, proximal sample processing and ionization *Anal. Methods*, 9 (2017) 4896–4907.
- [13] Venter, A.; Nefliu, M.; Cooks, R. Graham; Ambient desorption ionization mass spectrometry *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 284–290.
- [14] Gross, Jürgen H.; *Massenspektrometrie – Ein Lehrbuch*. 1, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, (2013).
- [15] Zaitsu, Kei; *Ambient ionization mass spectrometry in life sciences – Principles and applications*. 1, Amsterdam, Elsevier, (2019).
- [16] Hines, R. L.; Electrostatic Atomization and Spray Painting *Journal of Applied Physics*, 37 (1966) 2730–2736.
- [17] Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B.; Molecular Beams of Macroions *J. Chem. Phys.*, 49 (1968) 2240–2249.
- [18] Yamashita, M.; Fenn, J. B.; Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 4451–4459.
- [19] Bruins, A. P.; Covey, T. R.; Henion, J. D.; Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2642–2646.

- [20] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. Kai; Wong, S. Fu; Whitehouse, C. M.; Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules *Science*, 246 (1989) 64-71.
- [21] Wang, G.; Cole, R. B.; Disparity between solution-phase equilibria and charge state distributions in positive-ion electrospray mass spectrometry *Org. Mass Spectrom.*, 29 (1994) 419-427.
- [22] Dobo, A.; Kaltashov, I. A.; Detection of Multiple Protein Conformational Ensembles in Solution via Deconvolution of Charge-State Distributions in ESI MS *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4763-4773.
- [23] Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Hemmerling, C.; Alder, L.; The influence of electrospray ion source design on matrix effects *J. Mass Spectrom.*, 47 (2012) 875-884.
- [24] Covey, T. R.; Anacleto, J. F.; Ion spray with intersecting flow, US5412208A – U.S. Patent (1995).
- [25] Henion, J. D.; Covey, T. R.; Bruins, A. P.; Ion spray apparatus and method, US4861988A – U.S. Patent (1989).
- [26] Hiraoka, K.; Fukasawa, H.; Matsushita, F.; Aizawa, K.; High-flow liquid chromatography/mass spectrometry interface using a parallel ion spray *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9 (1995) 1349-1355.
- [27] Apffel, J. A., Jr.; Werlich, M. H.; Bertsch, J. L.; Orthogonal ion sampling for electrospray LC/MS, US5495108A – U.S. Patent (1996).
- [28] Chapter B3 Z-Spray Combined Inlet/Ion Source In: Micromass UK Limited; Back to Basics – Section B: Interfaces and Ionization Techniques (1999) 181-194.
- [29] Lubin, A.; Geerinckx, S.; Bajic, S.; Cabooter, D.; Augustijns, P.; Cuyckens, F.; Vreeken, R. J.; Enhanced performance for the analysis of prostaglandins and thromboxanes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new atmospheric pressure ionization source *Journal of chromatography. A*, 1440 (2016) 260-265.
- [30] Galani, J. Hubert Yamdeu; Houbraken, M.; van Hulle, M.; Spanoghe, P.; Comparison of electrospray and UniSpray, a novel atmospheric pressure ionization interface, for LC-MS/MS analysis of 81 pesticide residues in food and water matrices *Anal Bioanal Chem*, 411 (2019) 5099-5113.
- [31] Bajic, S.; Atmospheric pressure ion source by interacting high velocity spray with a target, US8809777B2 – U.S. Patent (2012).
- [32] Lubin, A.; Bajic, S.; Cabooter, D.; Augustijns, P.; Cuyckens, F.; Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization *J Am Soc Mass Spectrom*, 28 (2017) 286-293.
- [33] Zeleny, J.; Instability of Electrified Liquid Surfaces *Physical Review*, 10 (1917) 1-6.
- [34] Taylor, G. Ingram Sir; Disintegration of water drops in an electric field *Proc. R. Soc. Lond. A (Royal Society)*, 280 (1964) 383-397.
- [35] Nemes, P.; Marginean, I.; Vertes, A.; Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3105-3116.
- [36] Grimm, R. L.; Beauchamp, J. L.; Evaporation and discharge dynamics of highly charged multicomponent droplets generated by electrospray ionization *The journal of physical chemistry. A*, 114 (2010) 1411-1419.
- [37] Gomez, A.; Tang, K.; Charge and fission of droplets in electrostatic sprays *Physics of Fluids*, 6 (1994) 404-414.
- [38] Kebarle, P.; Tang, L.; From ions in solution to ions in the gas phase *Anal. Chem.*, 65 (1993) 972-986.
- [39] Gibson, S. C.; Feigerle, C. S.; Cook, K. D.; Fluorometric measurement and modeling of droplet temperature changes in an electrospray plume *Anal. Chem.*, 86 (2014) 464-472.
- [40] Wang, R.; Zenobi, R.; Evolution of the solvent polarity in an electrospray plume *J Am Soc Mass Spectrom*, 21 (2010) 378-385.

- [41] Going, C. C.; Xia, Z.; Williams, E. R.; New supercharging reagents produce highly charged protein ions in native mass spectrometry *The Analyst*, 140 (2015) 7184–7194.
- [42] Kharlamova, A.; Prentice, B. M.; Huang, T.-Y.; McLuckey, S. A.; Electrospray droplet exposure to gaseous acids for the manipulation of protein charge state distributions *Anal. Chem.*, 82 (2010) 7422–7429.
- [43] Chen, M.; Cook, K. D.; Oxidation artifacts in the electrospray mass spectrometry of Abeta Peptide *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2031–2036.
- [44] He, F.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G.; Unequivocal determination of metal atom oxidation state in naked heme proteins: Fe(III)myoglobin, Fe(III)cytochrome c, Fe(III)cytochrome b5, and Fe(III)cytochrome b5 L47R *J Am Soc Mass Spectrom*, 11 (2000) 120–126.
- [45] Van Berkel, G. J.; Asano, K. G.; Schnier, P. D.; Electrochemical processes in a wire-in-a-capillary bulk-loaded, nano-electrospray emitter *J Am Soc Mass Spectrom*, 12 (2001) 853–862.
- [46] Znamenskiy, V.; Marginean, I.; Vertes, A.; Solvated Ion Evaporation from Charged Water Nanodroplets *J. Phys. Chem. A*, 107 (2003) 7406–7412.
- [47] Iribarne, J. V.; On the evaporation of small ions from charged droplets *J. Chem. Phys.*, 64 (1976) 2287.
- [48] Nguyen, S.; Fenn, J. B.; Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (2007) 1111–1117.
- [49] Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S.; Unraveling the mechanism of electrospray ionization *Anal. Chem.*, 85 (2013) 2–9.
- [50] La Fernandez de Mora, J.; Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism *Analytica Chimica Acta*, 406 (2000) 93–104.
- [51] Hogan, C. J.; Carroll, J. A.; Rohrs, H. W.; Biswas, P.; Gross, M. L.; Combined charged residue-field emission model of macromolecular electrospray ionization *Anal. Chem.*, 81 (2009) 369–377.
- [52] Kebarle, P.; Verkerk, U. H.; Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now *Mass spectrometry reviews*, 28 (2009) 898–917.
- [53] Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Cooks, R. Graham; Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology *J. Mass Spectrom.*, 40 (2005) 1261–1275.
- [54] Costa, A. B.; Cooks, R. Graham; Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry *Chemical Physics Letters*, 464 (2008) 1–8.
- [55] van Berkel, G. J.; Tomkins, B. A.; Kertesz, V.; Thin-layer chromatography/desorption electrospray ionization mass spectrometry: investigation of goldenseal alkaloids *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2778–2789.
- [56] Venter, A.; Sojka, P. E.; Cooks, R. Graham; Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 78 (2006) 8549–8555.
- [57] Kebarle, P.; A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 804–817.
- [58] Nefliu, M.; Smith, J. N.; Venter, A.; Cooks, R. Graham; Internal energy distributions in desorption electrospray ionization (DESI) *J Am Soc Mass Spectrom*, 19 (2008) 420–427.
- [59] Gao, L.; Li, G.; Cyriac, J.; Nie, Z.; Cooks, R. Graham; Imaging of Surface Charge and the Mechanism of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry *J. Phys. Chem. C*, 114 (2010) 5331–5337.
- [60] Vincenti, M.; Horning, S. R.; Cooks, R. Graham; Energetics of retro-Diels-Alder fragmentation in limonene as characterized by surface-induced dissociation, and energy- and angle-resolved mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 23 (1988) 585–593.

- [61] Cotte-Rodríguez, I.; Takáts, Z.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R. Graham; Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6755–6764.
- [62] Chen, H.; Venter, A.; Cooks, R. Graham; Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation *Chemical communications*, (2006) 2042–2044.
- [63] Chen, H.; Zenobi, R.; Direct Analysis of Living Objects by Extractive Electrospray Mass Ionization Spectrometry *CHIMIA*, 61 (2007) 843.
- [64] Law, W. Siang; Wang, R.; Hu, B.; Berchtold, C.; Meier, L.; Chen, H.; Zenobi, R.; On the mechanism of extractive electrospray ionization *Anal. Chem.*, 82 (2010) 4494–4500.
- [65] Chang, D.-Y.; Lee, C.-C.; Shiea, J.; Detecting Large Biomolecules from High-Salt Solutions by Fused-Droplet Electrospray Ionization Mass Spectrometry *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2465–2469.
- [66] Groenewold, G. S.; Gaumet, J.-J.; Characterization of Ce(3+) -tributyl phosphate coordination complexes produced by fused droplet electrospray ionization with a target capillary *J. Mass Spectrom.*, 46 (2011) 1273–1280.
- [67] Shieh, I.-F.; Lee, C.-Y.; Shiea, J.; Eliminating the interferences from TRIS buffer and SDS in protein analysis by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry *Journal of proteome research*, 4 (2005) 606–612.
- [68] Ma, Q.; Bai, H.; Li, W.; Wang, C.; Cooks, R. Graham; Ouyang, Z.; Rapid analysis of synthetic cannabinoids using a miniature mass spectrometer with ambient ionization capability *Talanta*, 142 (2015) 190–196.
- [69] Chen, H.; Wortmann, A.; Zhang, W.; Zenobi, R.; Rapid in vivo fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46 (2007) 580–583.
- [70] Zhu, L.; Gamez, G.; Chen, H.; Chingin, K.; Zenobi, R.; Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS) *Chemical communications*, (2009) 559–561.
- [71] Li, M.; Hu, B.; Li, J.; Chen, R.; Zhang, X.; Chen, H.; Extractive electrospray ionization mass spectrometry toward in situ analysis without sample pretreatment *Anal. Chem.*, 81 (2009) 7724–7731.
- [72] Chen, H.; Sun, Y.; Wortmann, A.; Gu, H.; Zenobi, R.; Differentiation of maturity and quality of fruit using noninvasive extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.*, 79 (2007) 1447–1455.
- [73] Hu, B.; Peng, X.; Yang, S.; Gu, H.; Chen, H.; Huan, Y.; Zhang, T.; Qiao, X.; Fast quantitative detection of cocaine in beverages using nanoextractive electrospray ionization tandem mass spectrometry *J Am Soc Mass Spectrom*, 21 (2010) 290–293.
- [74] Huang, X. Y.; Fang, X. W.; Zhang, X.; Dai, X. M.; Guo, X. L.; Chen, H. W.; Luo, L. P.; Direct detection of chloramphenicol in honey by neutral desorption-extractive electrospray ionization mass spectrometry *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 7705–7714.
- [75] Chingin, K.; Gamez, G.; Chen, H.; Zhu, L.; Zenobi, R.; Rapid classification of perfumes by extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 2009–2014.
- [76] Ding, J.; Gu, H.; Yang, S.; Li, M.; Li, J.; Chen, H.; Selective detection of diethylene glycol in toothpaste products using neutral desorption reactive extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry *Anal. Chem.*, 81 (2009) 8632–8638.
- [77] Gu, H.; Hu, B.; Li, J.; Yang, S.; Han, J.; Chen, H.; Rapid analysis of aerosol drugs using nano extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry *The Analyst*, 135 (2010) 1259–1267.

- [78] Steiner, W. E.; Clowers, B. H.; Haigh, P. E.; Hill, H. H.; Secondary ionization of chemical warfare agent simulants: atmospheric pressure ion mobility time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6068–6076.
- [79] Roscioli, K. M.; Tufariello, J. A.; Zhang, X.; Li, S. X.; Goetz, G. H.; Cheng, G.; Siems, W. F.; Hill, H. H.; Desorption electrospray ionization (DESI) with atmospheric pressure ion mobility spectrometry for drug detection *The Analyst*, 139 (2014) 1740–1750.
- [80] Tam, M.; Hill, H. H.; Secondary electrospray ionization-ion mobility spectrometry for explosive vapor detection *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2741–2747.
- [81] Martínez-Lozano, P.; Rus, J.; La Fernández de Mora, G.; Hernández, M.; La Fernández de Mora, J.; Secondary electrospray ionization (SESI) of ambient vapors for explosive detection at concentrations below parts per trillion *J Am Soc Mass Spectrom*, 20 (2009) 287–294.
- [82] Kumbhani, S.; Longin, T.; Wingen, L. M.; Kidd, C.; Perraud, V.; Finlayson-Pitts, B. J.; New Mechanism of Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Heterogeneous Solid Particles *Anal. Chem.*, 90 (2018) 2055–2062.
- [83] Chen, H.; Yang, S.; Wortmann, A.; Zenobi, R.; Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46 (2007) 7591–7594.
- [84] Shiea, J.; Chang, D.-Y.; Lin, C.-H.; Jiang, S.-J.; Generating Multiply Charged Protein Ions by Ultrasonic Nebulization/Multiple Channel-Electrospray Ionization Mass Spectrometry *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4983–4987.
- [85] Cheng, C.-Y.; Yuan, C.-H.; Cheng, S.-C.; Huang, M.-Z.; Chang, H.-C.; Cheng, T.-L.; Yeh, C.-S.; Shiea, J.; Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for continuously monitoring the states of ongoing chemical reactions in organic or aqueous solution under ambient conditions *Anal. Chem.*, 80 (2008) 7699–7705.
- [86] Cheng, S.-C.; Cheng, T.-L.; Chang, H.-C.; Shiea, J.; Using laser-induced acoustic desorption/electrospray ionization mass spectrometry to characterize small organic and large biological compounds in the solid state and in solution under ambient conditions *Anal. Chem.*, 81 (2009) 868–874.
- [87] Marquez, C. A.; Wang, H.; Fabbretti, F.; Metzger, J. O.; Electron-transfer-catalyzed dimerization of trans-anethole: detection of the distonic tetramethylene radical cation intermediate by extractive electrospray ionization mass spectrometry *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008) 17208–17209.
- [88] Wang, R.; Gröhn, A. Juhani; Zhu, L.; Dietiker, R.; Wegner, K.; Günther, D.; Zenobi, R.; On the mechanism of extractive electrospray ionization (EESI) in the dual-spray configuration *Anal Bioanal Chem*, 402 (2012) 2633–2643.
- [89] Ovchinnikova, O. S.; van Berkel, G. J.; Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using proximal probe thermal desorption with electrospray or atmospheric pressure chemical ionization *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 1721–1729.
- [90] Reynolds, J. C.; Blackburn, G. J.; Guallar-Hoyas, C.; Moll, V. H.; Bocos-Bintintan, V.; Kaur-Atwal, G.; Howdle, M. D.; Harry, E. L.; Brown, L. J.; Creaser, C. S.; Thomas, C. L. P.; Detection of volatile organic compounds in breath using thermal desorption electrospray ionization-ion mobility-mass spectrometry *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2139–2144.
- [91] Huang, M.-Z.; Zhou, C.-C.; Liu, D.-L.; Jhang, S.-S.; Cheng, S.-C.; Shiea, J.; Rapid characterization of chemical compounds in liquid and solid states using thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 85 (2013) 8956–8963.

- [92] Shiea, C.; Huang, Y.-L.; Liu, D.-L.; Chou, C.-C.; Chou, J.-H.; Chen, P.-Y.; Shiea, J.; Huang, M.-Z.; Rapid screening of residual pesticides on fruits and vegetables using thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 29 (2015) 163–170.
- [93] Lee, C.-W.; Su, H.; Chen, P.-Y.; Lin, S.-J.; Shiea, J.; Shin, S.-J.; Chen, B.-H.; Rapid identification of pesticides in human oral fluid for emergency management by thermal desorption electrospray ionization/mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 51 (2016) 97–104.
- [94] Su, H.; Yeh, I.-J.; Wu, Y.-H.; Jiang, Z.-H.; Shiea, J.; Lee, C.-W.; Rapid identification of organophosphorus pesticides on contaminated skin and confirmation of adequate decontamination by ambient mass spectrometry in emergency settings *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 34 (2020) e8562.
- [95] Cho, Y.-T.; Su, H.; Lin, S.-J.; Wu, B.-H.; Lai, C.-Y.; Huang, I.-C.; Using thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry to rapidly determine antimicrobial preservatives in cosmetics *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30 (2016) 2315–2322.
- [96] Lee, C.-W.; Su, H.; Cai, Y.-D.; Wu, M.-T.; Wu, D.-C.; Shiea, J.; Rapid Identification of Psychoactive Drugs in Drained Gastric Lavage Fluid and Whole Blood Specimens of Drug Overdose Patients Using Ambient Mass Spectrometry *Mass spectrometry (Tokyo, Japan)*, 6 (2017) S0056.
- [97] Cheng, S.-C.; Tsai, Y.-D.; Lee, C.-W.; Chen, B.-H.; Shiea, J.; Direct and rapid characterization of illicit drugs in adulterated samples using thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry *Journal of food and drug analysis*, 27 (2019) 451–459.
- [98] Chiang, C.-H.; Lee, H.-H.; Chen, B.-H.; Lin, Y.-C.; Chao, Y.-Y.; Huang, Y.-L.; Using ambient mass spectrometry and LC-MS/MS for the rapid detection and identification of multiple illicit street drugs *Journal of food and drug analysis*, 27 (2019) 439–450.
- [99] Cho, Y.-T.; Su, H.; Huang, I.-C.; Lai, C.-Y.; Tsai, Y.-D.; Rapid characterization of organic UV filters and their photoproducts in sunscreens by thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry for the photostability study *Anal. Methods*, 11 (2019) 6013–6022.
- [100] Gross, Jürgen H.; *Mass Spectrometry – A Textbook*. 3, Cham, Springer International Publishing, (2017).
- [101] Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure *Anal. Chem.*, 45 (1973) 936–943.
- [102] Dzidic, I.; Carroll, D. I.; Stillwell, R. N.; Horning, E. C.; Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry: formation of phenoxide ions from chlorinated aromatic compounds *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1308–1312.
- [103] Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Horning, E. C.; Stillwell, R. N.; Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry *Applied Spectroscopy Reviews*, 17 (1981) 337–406.
- [104] Good, A.; Durden, D. A.; Kebarle, P.; Ion–Molecule Reactions in Pure Nitrogen and Nitrogen Containing Traces of Water at Total Pressures 0.5–4 torr. Kinetics of Clustering Reactions Forming  $H + (H_2O)_n$  *The Journal of Chemical Physics*, 52 (1970) 212–221.
- [105] Shahin, M. M.; Mass-Spectrometric Studies of Corona Discharges in Air at Atmospheric Pressures *The Journal of Chemical Physics*, 45 (1966) 2600–2605.
- [106] Kebarle, P.; Hogg, A. M.; Mass-Spectrometric Study of Ions at Near Atmospheric Pressures. I. The Ionic Polymerization of Ethylene *The Journal of Chemical Physics*, 42 (1965) 668–674.
- [107] Kebarle, P.; Ion Thermochemistry and Solvation From Gas Phase Ion Equilibria *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 28 (1977) 445–476.
- [108] Sunner, J.; Nicol, G.; Kebarle, P.; Factors determining relative sensitivity of analytes in positive mode atmospheric pressure ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1300–1307.

- [109] Franklin, J. L.; Dillard, J. G.; Rosenstock, H. M.; Herron, J. T.; Draxl, K.; Field, F. H.; Ionization potentials, appearance potentials, and heats of formation of gaseous positive ions NSRDS-NBS, (1969) 1–285.
- [110] Wexler, S.; Clow, R. P.; Ion-molecule reactions in gaseous benzene and toluene *Journal of the American Chemical Society*, 90 (1968) 3940–3945.
- [111] Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; Horning, M. G.; Horning, E. C.; Subpicogram detection system for gas phase analysis based upon atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry *Anal. Chem.*, 46 (1974) 706–710.
- [112] Kostianen, R.; Kauppila, T. J.; Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 685–699.
- [113] Linstrom, Peter; NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69, National Institute of Standards and Technology,
- [114] Dzidic, I.; Carroll, D. I.; Stillwell, R. N.; Horning, E. C.; Gas phase reactions. Ionization by proton transfer to superoxide anions *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 5258–5259.
- [115] Takáts, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R. Graham; Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry *Chemical communications*, (2005) 1950–1952.
- [116] Williams, J. P.; Patel, V. J.; Holland, R.; Scrivens, J. H.; The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 1447–1456.
- [117] Chen, H.; Zheng, J.; Zhang, X.; Luo, M.; Wang, Z.; Qiao, X.; Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination *J. Mass Spectrom.*, 42 (2007) 1045–1056.
- [118] Cotte-Rodríguez, I.; Mulligan, C. C.; Cooks, R. Graham; Non-proximate detection of small and large molecules by desorption electrospray ionization and desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: instrumentation and applications in forensics, chemistry, and biology *Anal. Chem.*, 79 (2007) 7069–7077.
- [119] Yang, S.; Ding, J.; Zheng, J.; Hu, B.; Li, J.; Chen, H.; Zhou, Z.; Qiao, X.; Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 81 (2009) 2426–2436.
- [120] Chen, H.; Liang, H.; Ding, J.; Lai, J.; Huan, Y.; Qiao, X.; Rapid differentiation of tea products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (2007) 10093–10100.
- [121] Cotte-Rodríguez, I.; Hernandez-Soto, H.; Chen, H.; Cooks, R. Graham; In situ trace detection of peroxide explosives by desorption electrospray ionization and desorption atmospheric pressure chemical ionization *Anal. Chem.*, 80 (2008) 1512–1519.
- [122] Song, Y.; Cooks, R. Graham; Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 3130–3138.
- [123] Williams, J. P.; Scrivens, J. H.; Rapid accurate mass desorption electrospray ionisation tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 3643–3650.
- [124] Zhang, X.; Jia, B.; Huang, K.; Hu, B.; Chen, R.; Chen, H.; Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 82 (2010) 8060–8070.

- [125] McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S.; Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments *Anal. Chem.*, **77** (2005) 7826–7831.
- [126] Lloyd, J. A.; Harron, A. F.; McEwen, C. N.; Combination Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Ion Source *Anal. Chem.*, **81** (2009) 9158–9162.
- [127] Ahmed, A.; Cho, Y. Ju; No, M.-H.; Koh, J.; Tomczyk, N.; Giles, K.; Yoo, J. Shin; Kim, S.; Application of the Mason-Schamp equation and ion mobility mass spectrometry to identify structurally related compounds in crude oil *Anal. Chem.*, **83** (2011) 77–83.
- [128] Carrizo, D.; Domeño, C.; Nerín, I.; Alfaro, P.; Nerín, C.; Atmospheric pressure solid analysis probe coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry as a tool for screening and semi-quantitative approach of polycyclic aromatic hydrocarbons, nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons and oxo-polycyclic aromatic hydrocarbons in complex matrices *Talanta*, **131** (2015) 175–184.
- [129] Doué, M.; Dervilly-Pinel, G.; Gicquiau, A.; Pouponneau, K.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; High throughput identification and quantification of anabolic steroid esters by atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for efficient screening of drug preparations *Anal. Chem.*, **86** (2014) 5649–5655.
- [130] Petucci, C.; Diffendal, J.; Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs *J. Mass Spectrom.*, **43** (2008) 1565–1568.
- [131] M&M Mass Spec Consulting LLC; Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP®) Mass Spectrometry. <http://www.asap-ms.com/index.html>; 06.01.2018.
- [132] Pan, H.; Lundin, G.; Rapid detection and identification of impurities in ten 2-naphthalenamines using an atmospheric pressure solids analysis probe in conjunction with ion mobility mass spectrometry *Eur. J. Mass Spectrom.*, **17** (2011) 217–225.
- [133] Barrère, C.; Maire, F.; Afonso, C.; Giusti, P.; Atmospheric solid analysis probe-ion mobility mass spectrometry of polypropylene *Anal. Chem.*, **84** (2012) 9349–9354.
- [134] Smith, M. J. P.; Cameron, N. R.; Mosely, J. A.; Evaluating Atmospheric pressure Solids Analysis Probe (ASAP) mass spectrometry for the analysis of low molecular weight synthetic polymers *The Analyst*, **137** (2012) 4524–4530.
- [135] Chen, H.; Talaty, N. N.; Takáts, Z.; Cooks, R. Graham; Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment *Anal. Chem.*, **77** (2005) 6915–6927.
- [136] Snelling, J. R.; Scarff, C. A.; Scrivens, J. H.; Characterization of complex polysorbate formulations by means of shape-selective mass spectrometry *Anal. Chem.*, **84** (2012) 6521–6529.
- [137] Cossoul, E.; Hubert-Roux, M.; Sebban, M.; Churlaud, F.; Oulyadi, H.; Afonso, C.; Evaluation of atmospheric solid analysis probe ionization coupled to ion mobility mass spectrometry for characterization of poly(ether ether ketone) polymers *Analytica Chimica Acta*, **856** (2015) 46–53.
- [138] Driffield, M.; Bradley, E.; Castle, L.; Lloyd, A.; Parmar, M.; Speck, D.; Roberts, D.; Stead, S.; Use of atmospheric pressure solids analysis probe time-of-flight mass spectrometry to screen for plasticisers in gaskets used in contact with foods *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **29** (2015) 1603–1610.
- [139] McEwen, C.; Gutteridge, S.; Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method *J Am Soc Mass Spectrom*, **18** (2007) 1274–1278.
- [140] Mosely, J. A.; Stokes, P.; Parker, D.; Dyer, P. W.; Messinis, A. M.; Analysis of air-, moisture- and solvent-sensitive chemical compounds by mass spectrometry using an inert atmospheric pressure solids analysis probe *Eur. J. Mass Spectrom.*, **24** (2018) 74–80.

- [141] Krieger, S.; Trotha, A. von; Leung, K. Sze-Yin; Schmitz, O. J.; Development, optimization, and use of an APCI source with temperature-controlled vaporization of solid and liquid samples *Anal Bioanal Chem*, 405 (2013) 1373–1381.
- [142] Schiewek, R.; Lorenz, M.; Giese, R.; Brockmann, K.; Benter, T.; Gäb, S.; Schmitz, O. J.; Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS *Anal Bioanal Chem*, 392 (2008) 87–96.
- [143] Krieger, S.; Schmitz, O. J.; Non-destructive plasticizer screening using a direct inlet probe-atmospheric pressure chemical ionization source and ion trap mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 28 (2014) 1862–1870.
- [144] Horst, S.; Schmitz, O. J.; Quantitative Analysis of Bisphenol A in Recycled Paper with a Novel Direct Inlet Probe-Atmospheric Pressure Photoionization–IonTrap-MS *J. Anal. Test.*, 1 (2017) 255–263.
- [145] Krieger, S.; Hayen, H.; Schmitz, O. J.; Quantification of coumarin in cinnamon and woodruff beverages using DIP-APCI-MS and LC-MS *Anal Bioanal Chem*, 405 (2013) 8337–8345.
- [146] Paul, W.; Steinwedel, H.; Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld *Zeitschrift für Naturforschung A*, 8 (1953) 448–450.
- [147] Paul, W.; Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen (Nobel-Vortrag) *Angew. Chem.*, 102 (1990) 780–789.
- [148] Stafford, G. C.; Kelley, P. E.; Syka, J.E.P.; Reynolds, W. E.; Todd, J.F.J.; Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 60 (1984) 85–98.
- [149] March, R. E.; An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 32 (1997) 351–369.
- [150] Yoshinari, K.; Theoretical and numerical analysis of the behavior of ions injected into a quadrupole ion trap mass spectrometer *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 215–223.
- [151] Wuerker, R. F.; Shelton, H.; Langmuir, R. V.; Electrodynamic Containment of Charged Particles *Journal of Applied Physics*, 30 (1959) 342–349.
- [152] Nappi, M.; Weil, C.; Cleven, C. D.; Horn, L. A.; Wollnik, H.; Cooks, R. Graham; Visual representations of simulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 161 (1997) 77–85.
- [153] Splendore, M.; Lausevic, M.; Lausevic, Z.; March, R. E.; Resonant Excitation and/or Ejection of Ions Subjected to DC and RF fields in a Commercial Quadrupole Ion Trap *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 228–233.
- [154] Kaiser, R. E.; Louris, J. N.; Amy, J. W.; Cooks, R. Graham; Hunt, D. F.; Extending the mass range of the quadrupole ion trap using axial modulation *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3 (1989) 225–229.
- [155] March, Raymond E.; Todd, John F. J.; Quadrupole ion trap mass spectrometry. 2, Hoboken, N.J, J. Wiley, (2005).
- [156] Plomley, J. Blaise.; Koester, C. Jean.; March, R. Evans.; Determination of N-Nitrosodimethylamine in Complex Environmental Matrixes by Quadrupole Ion Storage Tandem Mass Spectrometry Enhanced by Unidirectional Ion Ejection *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4437–4443.
- [157] Council of Europe; European pharmacopoeia 7.0. 7, Strasbourg, Council Of Europe, (2010).
- [158] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Arzneimittelgesetz - AMG (2020).

- [159] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A – Q6A (1999).
- [160] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2) – Q1A(R2) (2003).
- [161] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) – Q2(R1) (2005).
- [162] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Impurities in new drug products Q3B(R2) – Q3B(R2) (2006).
- [163] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R8) – Q3C(R8) (2020).
- [164] European Medicines Agency; Frequently asked questions about parallel distribution, FAQ 9. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/parallel-distribution/frequently-asked-questions-about-parallel-distribution>; 24.01.2021.
- [165] United States Pharmacopeial Convention; USP 35-NF30 – United States pharmacopeia [and] national formulary., Rockville, Md., United States Pharmacopeial Convention, (2012).
- [166] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Apothekenbetriebsordnung - ApBetrO (2020).
- [167] Bundesapothekerkammer; Leitlinie der Bundesapothekerkammer zur Qualitätssicherung – Patientenindividuelle manuelle Neuverpackung von Fertigarzneimitteln für bestimmte Einnahmezeitpunkte (2017).
- [168] Bonfilio, R.; De Araujo, M. Benjamim; Salgado, H. Regina Nunes; Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review WSEAS TRANSACTIONS on BIOLOGY and BIOMEDICINE, 7 (2010) 316–338.
- [169] Siddiqui, M. Raza; AlOthman, Z. A.; Rahman, N.; Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review Arabian Journal of Chemistry, 10 (2013) S1409-S1421.
- [170] Martino, R.; Malet-Martino, M.; Gilard, V.; Balaýssac, S.; Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification Anal Bioanal Chem, 398 (2010) 77–92.
- [171] Nageswara Rao, R.; Nagaraju, V.; An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 33 (2003) 335–377.
- [172] Haque, S. ManirulK; Ratemi, E. S.; Drug Development and Analysis Review Pharm Chem J, 50 (2017) 837–850.
- [173] Beccaria, M.; Cabooter, D.; Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis The Analyst, 145 (2020) 1129–1157.
- [174] Pavlović, D. Mutavdžić; Babić, S.; Horvat, A. J.M.; Kaštelan-Macan, M.; Sample preparation in analysis of pharmaceuticals Trends in Analytical Chemistry, 26 (2007) 1062–1075.
- [175] Ahuja, Satinder; Dong, M. W.; Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. 1, Amsterdam, Boston, Elsevier Academic Press, (2005).
- [176] Lenzen, C.; Winterfeld, G. A.; Schmitz, O. J.; Comparison of piracetam measured with HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS, DIP-APCI-MS, and a newly developed and optimized DIP-ESI-MS Anal Bioanal Chem, 408 (2016) 4103–4110.
- [177] Guo, T.; Shi, Y.; Zheng, L.; Feng, F.; Zheng, F.; Liu, W.; Rapid and simultaneous determination of sulfonate ester genotoxic impurities in drug substance by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: comparison of different ionization modes Journal of chromatography. A, 1355 (2014) 73–79.

- [178] Titato, G. M.; Bicudo, R. C.; Lanças, F. M.; Optimization of the ESI and APCI experimental variables for the LC/MS determination of s-triazines, methylcarbamates, organophosphorous, benzimidazoles, carboxamide and phenylurea compounds in orange samples *J. Mass Spectrom.*, 42 (2007) 1348–1357.
- [179] Covey, T. R.; Thomson, B. A.; Schneider, B. B.; Atmospheric pressure ion sources *Mass spectrometry reviews*, 28 (2009) 870–897.
- [180] Council of Europe; European Pharmacopoeia 5.0. 5, Strasbourg, Council Of Europe, (2004).
- [181] United States Pharmacopeial Convention; Amlodipine Besylate. <https://mc.usp.org/monographs/amlodipine-besylate-0-2>; 09.05.2013.
- [182] Chavali, A.; Jenkins, T.; McConville, P.; USP Method Transfer and Routine Use Analysis of Irbesartan Tablets from HPLC to UPLC, *Applikationsmitteilungen, Waters corporation*. (2013) 1–6.
- [183] Fu, R.; Modernizing the USP Monograph for Impurity Profiling of Metoprolol Tartrate, *Application note, Agilent Technologies, Inc.* (2014) 1–4.
- [184] Trabelsi, H.; Hassen, I. E.; Bouabdallah, S.; Bouzouita, K.; Safta, F.; Stability indicating LC method for the determination of pipamperone *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39 (2005) 914–919.
- [185] Roque-Ruiz, J. H.; Cabrera-Ontiveros, E. A.; González-García, G.; Reyes-López, S. Y.; Thermal degradation of aluminum formate sol-gel; synthesis of  $\alpha$ -alumina and characterization by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{27}\text{Al}$  MAS NMR and XRD spectroscopy *Results in Physics*, 6 (2016) 1096–1102.
- [186] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung; GESTIS-Stoffdatenbank. <https://gestis.dguv.de/data?name=496558>; 28.02.2021.
- [187] Horst, S.; Entwicklung und Einsatz einer ambienten Ionisationsmethode basierend auf der Atmosphärendruck-Photoionisation Dissertation (Uni-Duisburg-Essen, Angewandte Analytische Chemie), 2018.
- [188] DIN ISO 8466-2; Wasserbeschaffenheit - Kalibrierung und Auswertung analytischer Verfahren und Beurteilung von Verfahrenskennwerten - Teil 2: Kalibrierstrategie für nichtlineare Kalibrierfunktionen zweiten Grades, Berlin, Beuth Verlag GmbH; 2004.
- [189] DIN 32645; Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, Berlin, Beuth Verlag GmbH; 2008.
- [190] Zscheppank, C.; Telgheder, U.; Molt, K.; Stir-bar sorptive extraction and TDS-IMS for the detection of pesticides in aqueous samples *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, 15 (2012) 257–264.
- [191] United States Environmental Protection Agency; Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database. <https://comptox.epa.gov/dashboard/>; 01.01.2021.
- [192] Rivera, H.; Walker, G. Stewart; Hughes, J. M; Analysis of Benzodiazepines in Blood by LC/MS/MS Agilent Application Note, (2006) 1–16.
- [193] HighChem LLC; m/z cloud - Database. [https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference\\$-1/u0%23Standard/Recalibrated/-2](https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference$-1/u0%23Standard/Recalibrated/-2); 05.02.2021.
- [194] Edge, J. H.; Walson, P. D.; Rane, A.; Clonazepam and 7-aminoclonazepam in human plasma Therapeutic drug monitoring, 13 (1991) 363–368.
- [195] Negrusz, A.; Bowen, A. M.; Moore, C. M.; Dowd, S. M.; Strong, M. Jane; Janicak, P. G.; Elimination of 7-aminoclonazepam in urine after a single dose of clonazepam *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376 (2003) 1198–1204.
- [196] Vindenes, V.; Strand, D. Helge; Koksæter, P.; Gjerde, H.; Detection of Nitrobenzodiazepines and Their 7-Amino Metabolites in Oral Fluid *Journal of analytical toxicology*, 40 (2016) 310–312.

- [197] Pei, J.; Hsu, C.-C.; Zhang, R.; Wang, Y.; Yu, K.; Huang, G.; Unexpected Reduction of Iminoquinone and Quinone Derivatives in Positive Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Possible Mechanism Exploration *J Am Soc Mass Spectrom*, 28 (2017) 2454–2461.
- [198] Rütters, H.; Möhring, T.; Rullkötter, J.; Griep-Raming, J.; Metzger, J. O.; The persistent memory effect of triethylamine in the analysis of phospholipids by liquid chromatography/mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 14 (2000) 122–123.
- [199] Waters corporation; Solvents and Caveats for LC/MS. [https://www.waters.com/waters/en\\_US/Solvents-and-Caveats-for-LC-MS/nav.htm?locale=en\\_US&cid=10091173](https://www.waters.com/waters/en_US/Solvents-and-Caveats-for-LC-MS/nav.htm?locale=en_US&cid=10091173); 22.05.2022.
- [200] Abdoh, A.; Al-Omari, M. M.; Badwan, A. A.; Jaber, A. M. Y.; Amlodipine besylate-excipients interaction in solid dosage form *Pharmaceutical development and technology*, 9 (2004) 15–24.
- [201] Lakshmi Devi, A. Siva; Srinivasa Rao, Y.; Satish, M.; Jyothi, G.; Babu Rao, K.; Omdutt, T.; Structure elucidation of thermal degradation products of amlodipine *Magn. Reson. Chem.*, 45 (2007) 688–691.
- [202] G. V. Reddy; A. P. Kumar; B. V. Reddy; J. Sreeramulu; J. H. Park; Separation, Identification and Structural Elucidation of a New Impurity in the Drug Substance of Amlodipine Maleate Using LC-MS/MS, NMR and IR *Croat. Chem. Acta*, 83 (2010) 443–449.
- [203] Weeratunga, G.; Bejan, E.; Process for the preparation of Midodrine, pharmaceutically-acceptable salts thereof and intermediates, WO 2004/080946 A1 (2004).
- [204] Noe, C. R.; Knollmiller, M.; Grtner, P.; Fleischhacker, W.; Katikarides, E.; Aminoalkohole, 3. Mitt. Ein Verfahren zur Herstellung von enantiomerenreinen pharmakologisch aktiven N-substituierten  $\alpha$ -Aminoalkoholen *Monatsh Chem*, 126 (1995) 557–564.
- [205] Ray, A. K.; Patel, H.; Patel, M. R.; Synthesis of midodrine HCl from a novel intermediate 1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-azidoethanone, US 6201153 B1 – U.S. Patent (2001).
- [206] Rao, R. Nageswara; Raju, A. Narasa; Development and validation of a reversed-phase HPLC method for separation and simultaneous determination of process-related substances of mirtazapine in bulk drugs and formulations *Journal of Chromatographic Science*, 47 (2009) 223–230.
- [207] Esa Lehtorinne; A Systematic Approach Towards UPLC® Method Development, *Applikationsmitteilungen, Waters corporation*. (2011) 1–66.
- [208] Williams, J. P.; Nibbering, N. M. M.; Green, B. N.; Patel, V. J.; Scrivens, J. H.; Collision-induced fragmentation pathways including odd-electron ion formation from desorption electrospray ionisation generated protonated and deprotonated drugs derived from tandem accurate mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006) 1277–1286.
- [209] Long, G. T.; Vyatokin, S.; Gamble, N.; Wight, C. A.; Long, G. T.; Vyatokin, S.; Wight, C. A.; Hard to swallow dry: Kinetics and mechanism of the anhydrous thermal decomposition of acetylsalicylic acid // Hard to swallow dry: kinetics and mechanism of the anhydrous thermal decomposition of acetylsalicylic acid *Journal of Pharmaceutical Science*, 91 (2002) 800–809.
- [210] Valladao, D. M. S.; Oliveira, L. C. S. de; Netto, J. Zuanon; Ionashiro, M.; Thermal decomposition of some diuretic agents *Journal of Thermal Analysis*, 46 (1996) 1291–1299.
- [211] Macêdo, R. O.; do Nascimento, T. G.; Veras, J. W. E.; Comparison of Generic Hydrochlorothiazide Formulations by Means of TG and DSC Coupled to a Photovisual System *J Therm Anal Calorim*, 64 (2001) 757–763.
- [212] Souza, C. Maria Pereira de; dos Santos, J. Anderson Borges; do Nascimento, A. Luiz; Chaves Júnior, J. Venâncio; Lima Ramos Júnior, F. José de; Lima Neto, S. Antônio de; Souza, F. Santos de; Macêdo, R. Oliveira; Thermal analysis study of solid dispersions hydrochlorothiazide *J Therm Anal Calorim*, 131 (2018) 681–689.

- [213] Mahajan, A. Avinash; Thaker, A. Keshavlal; Mohanraj, K.; LC, LC-MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of hydrochlorothiazide and establishment of mechanistic approach towards degradation *J. Braz. Chem. Soc.*, (2012).
- [214] Gumieniczek, A.; Galeza, J.; Mroczek, T.; Wojtanowski, K.; Lipska, K.; Pietras, R.; Kinetics and Characterization of Degradation Products of Dihydralazine and Hydrochlorothiazide in Binary Mixture by HPLC-UV, LC-DAD and LC-MS Methods *Chromatographia*, 81 (2018) 1147–1162.
- [215] You, J. Zong; Wu, C. Jie; Wang, X. Jie; The thermal decomposition mechanism of irbesartan *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 134 (2018) 93–101.
- [216] Mutha, V. V. S. R. N. Anji Karun; Guduru, S.; Kaliyaperumal, M.; Rumalla, C. Swamy; Maddi, S. Rao; Korupolu, R. Babu; Gajbhiye, S. Bai; Degradation study of irbesartan: Isolation and structural elucidation of novel degradants *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 157 (2018) 180–188.
- [217] Goswami, N.; A validated stability-indicating liquid chromatographic method for determination of process related impurities and degradation behavior of Irbesartan in solid oral dosage *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 5 (2014) 33–40.
- [218] I.Ug; ar Reddy; K.Hima Bindu; A.Madhuri; A.Rammohan Rao; Jaydeep Lilakar; P.Nageswara Rao; V.Ranga Reddy; Development and validation of a HPLC method for separation and simultaneous determination of process-related substances of Irbesartan in bulk drugs *Analytical Chemistry: An Indian Journal*, 9 (2010).
- [219] Satyanarayana, B.; Sumalatha, Y.; Sridhar, C.; Venkatraman, S.; Reddy, P. Pratap; A new entry to antihypertensive active pharmaceutical ingredient, Irbesartan and its analogues *Heterocyclic Communications*, 12 (2006).
- [220] Shah, R. P.; Sahu, A.; Singh, S.; Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC-MS/TOF, MS(n), on-line H/D exchange and LC-NMR *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51 (2010) 1037–1046.
- [221] Grzeńkowiak, T.; Zgoła-Grzeńkowiak, A.; Rusińska-Roszak, D.; Zaporowska-Stachowiak, I.; Jeszka-Skowron, M.; Fragmentation studies of selected drugs utilized in palliative care *Eur. J. Mass Spectrom.*, 24 (2018) 420–436.
- [222] Smyth, W. Franklin; Leslie, J. C.; McClean, S.; Hannigan, B.; McKenna, H. P.; Doherty, B.; Joyce, C.; O'Kane, E.; The characterisation of selected antidepressant drugs using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 1637–1642.