



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung von Valerensäure
in biologischen Matrices
mittels HPLC-MS/MS“

verfasst von

Bernhard Wittig

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Ganz besonders herzlich will ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Reznicek, meinem Diplomarbeitsbetreuer bedanken, der sich ausnahmslos immer für meine Fragen Zeit genommen und mich mit seinem Fachwissen bei Problemen während der Arbeit stets unterstützt hat. Ich kann mir keine bessere Betreuung vorstellen.

Mein Dank gilt auch der Leitung des Departments für Pharmakognosie, Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, für die Möglichkeit eines Diplomarbeitsplatzes.

Großer Dank gebührt auch Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl und Herrn Dr. Martin Zehl für ihren wertvollen fachlichen Beistand.

Weiters will ich mich bei allen Mitarbeiter/-innen der Arbeitsgruppe Phytochemie bedanken für ihre Hilfsbereitschaft, die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering und Frau Mag. pharm. Juliane Hintersteiner bedanke ich mich für das Probematerial und bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Walter Jäger für die Unterstützung bei der Aufarbeitung. Danke für die gute Zusammenarbeit.

Bedanken will ich mich auch bei Frau Mag. pharm. Irmhild Gräbner, die mir am Anfang meiner Diplomarbeit viel ihrer Zeit geschenkt hat, um mir die Bedienung einiger Geräte zu erklären.

Mein allergrößter Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir das Studium durch ihre große Unterstützung in jeder Hinsicht erst ermöglicht haben.

Vielen Dank auch all meinen Freundinnen und Freunden, die die Zeit des Studiums zu einer unvergesslich schönen gemacht haben, die mich motiviert und unterstützt haben und für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Baldrian und Valerensäure	- 1 -
1.2. Prodrugs der Valerensäure.....	- 3 -
1.3. Valerensäure als Alternative zu standardmäßig eingesetzten Psychopharmaka	- 3 -
1.4. Problemstellung	- 4 -
2. Material und Methoden	- 5 -
2.1. Reagenzienverzeichnis.....	- 5 -
2.2. Geräteverzeichnis und Software.....	- 6 -
2.3. Versuchstiere	- 8 -
2.3.1. Charakterisierung der eingesetzten Versuchstiere	- 8 -
2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Probengewinnung	- 8 -
2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn	- 10 -
2.5. LC-MS/MS Analyse	- 12 -
2.5.1. Funktion des UHPLC-MS/MS Systems	- 12 -
2.5.2. Methodenentwicklung.....	- 17 -
2.5.3. Optimierung der TripleQuad-MS/MS Parameter	- 19 -
2.5.4. Verwendung eines internen Standards.....	- 23 -
2.5.4.1. Undecansäure (UNA) als interner Standard.....	- 24 -
2.5.4.2. Acetoxyvalerensäure (ACVA) als interner Standard	- 26 -
2.5.5. Optimierung der UHPLC Paramter	- 30 -
2.5.6. LC-MS/MS Methode	- 33 -
2.5.7. Erstellung einer Eichgeraden und Quantifizierung	- 34 -
2.5.8. Ermittlung der Wiederfindungsrate	- 38 -
3. Ergebnisse	- 39 -

4. Diskussion	- 44 -
5. Zusammenfassung:	- 49 -
6. Abstract	- 51 -
7. Anhang	- 53 -
8. Abkürzungsverzeichnis.....	- 113 -
9. Abbildungsverzeichnis.....	- 115 -
10. Tabellenverzeichnis.....	- 117 -
11. Literaturverzeichnis	- 118 -
12. Curriculum Vitae	- 123 -

1. Einleitung

1.1. Baldrian und Valerensäure



Abb. 1. *Valeriana officinalis* L. s.l.

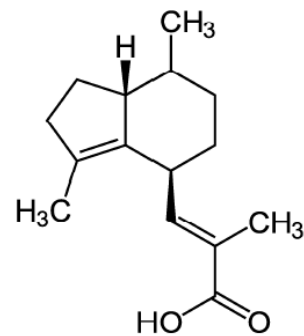


Abb. 2. Valerensäure

Zubereitungen und Herstellungen aus dem Wurzelstock von *Valeriana officinalis* L. s.l. (Abb. 1.) werden schon lange in der Phytotherapie wegen ihrer zentral dämpfenden, antikonvulsiven, spasmolytischen und muskel-relaxierenden Wirkung für verschiedene Indikationsstellungen eingesetzt [9]. Im Weiteren wurde auch eine anxiolytische Wirkung beschrieben [12]. Den verschiedenen Wirkungen konnten noch keine eindeutig dafür verantwortlichen Substanzen zugeordnet werden, wodurch man heute in der Phytotherapie allgemein die Ansicht vertritt, dass die Wirksamkeit von Baldrian auf dem Zusammenspiel der Inhaltsstoffgruppen beruht und nicht auf einer einzelnen Substanz [27]. Zu den möglichen Wirksubstanzen werden das Lignan 4'-O- β -Glucosyl-9-O-(6''-desoxy-saccharosyl)-olivil, Valerenol, Sesquiterpensäuren vom Valerensäuretyp, Flavonoide und ihre Metaboliten, GABA sowie Teile des ätherischen Öls gezählt [9, 26]. Besonderes Augenmerk gilt dabei der schwer flüchtigen Cyclopentansesquiterpencarbonsäure Valerensäure (VA) (Abb. 2.), die auch als Leitsubstanz für die Qualitätskontrolle von Baldrianpräparaten gilt und zu den

wichtigsten sekundären bioaktiven Metaboliten von *Valeriana officinalis* L. s.l. zählt [9, 23].

Als Target für Valerensäure wurde die $\beta_{2/3}$ Untereinheit des γ -Aminobuttersäure (GABA) Typ A Rezeptors, einem ligandengesteuerten Chloridkanal, identifiziert [13]. Dieser gilt als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter Rezeptor im Gehirn von Säugetieren, ist von zentraler Bedeutung für die Erregbarkeit des ZNS und wurde in allen Hirnregionen gefunden [13, 24, 25]. Valerensäure zeigt eine agonistische Wirkung [28]. Der daraus resultierende hemmende Effekt auf das ZNS kann durch den GABA_A Antagonisten Bicucullin vermindert werden, wohingegen der GABA_A Agonist Muscimol zu keinem Synergismus führt, sondern dessen Wirkung sogar vermindert wird, wodurch auch eine geringe antagonistische Aktivität der Valerensäure vermutet werden kann [28]. Im Weiteren beruht der Wirkmechanismus dieses selektiven Modulators am GABA_A Rezeptor auf der vermehrten Ausschüttung des inhibitorischen Neurotransmitter GABA aus den Synaptosomen und der Hemmung der Wiederaufnahme in die Vesikel, wodurch sich die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt erhöht [1, 13]. Das wird auch durch die Hemmung des Enzym GABAse bedingten Abbaus von GABA durch Valerensäure und deren Derivate verstärkt [28]. Eine agonistische Wirkung an A₁ Adenosinrezeptoren in der Hirnrinde dürfte zusätzlich an der sedativen Wirkung von *Valeriana* beteiligt sein [17]. Dietz et al. vermuten einen entscheidenden Teil der sedativen Wirkung von Valerensäure und Extrakten aus Baldrian durch einen partialen Agonismus *in-vitro* am 5-HT_{5a} Rezeptor, der in großer Menge in weiten Teilen des Gehirns vorkommt, unter anderem im suprachiasmatischen Nucleus, welcher für den circadianen Schlaf-Wach Rhythmus verantwortlich ist [4].

Ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern ist für zahlreiche psychische Erkrankungen verantwortlich, darunter Angstzustände, Schlafstörungen und Epilepsie [13]. Der Anstieg der GABAergen Neurotransmission durch Valerensäure erklärt deren Wirkung im ZNS und den positiven Effekt auf die erwähnten Krankheitsbilder [3, 13].

Um an den Rezeptor im ZNS binden zu können, muss Valerensäure die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren [18]. Bei der BHS handelt es sich um eine Barriere, gebildet aus „brain microvascular endothelial cells“, die einen

selektiven Stoffaustausch mit dem Gehirn ermöglicht, an der Entgiftung beteiligt ist, es mit Nährstoffen versorgt und vor Noxen schützt [18, 19]. Im Vergleich zum GABA_A Modulator Diazepam gelingt der Durchtritt von Valerensäure um den Faktor 0,03 langsamer, was wesentlich für die Wirkstärke und den Wirkungseintritt ist [18]. Von Neuhaus et al. wurde die Hypothese erstellt, dass Valerensäure nicht transzellulär durch passive Diffusion die BHS passiert, sondern über ein noch unbekanntes Transportsystem [18].

1957 wurde Valerensäure erstmals von Stoll und Seebeck aus der Baldrianwurzel isoliert, 2009 veröffentlichten Ramharter und Mulzer erstmals eine Totalsynthese von Valerensäure und stellten auch Derivate der Valerensäure, wie unter anderem den Ethylester her [20, 21].

1.2. Prodrugs der Valerensäure

Synthetisch hergestellte Derivate gesteigerter Lipophilie können zu einer verbesserten Aufnahme über die BHS führen, was in höheren Konzentrationen am Wirkort und im Fall von Prodrugs der Valerensäure in einer erhöhten anxiolytischen Wirkung *in-vivo* resultieren kann [1, 13]. Die in dieser Arbeit untersuchten Derivate wurden von Dipl.-Ing. Maximilian Haider, Arbeitsgruppe TU Wien unter Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Marko Mihovilovic, hergestellt.

1.3. Valerensäure als Alternative zu standardmäßig eingesetzten Psychopharmaka

Neben einem besseren pharmakologischen Verständnis der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen bezüglich ihrer Verteilung, ihres exakten Wirkorts oder ihres Metabolismus, sollen auch potente Wirkstoffe für zukünftige Therapiekonzepte gefunden werden. Murphy et al. sprechen von potentiellen Alternativen zu standardmäßig eingesetzten Anxiolytica und deren unerwünschten Nebenwirkungen, wie beispielsweise Abhängigkeit, nachdem eine signifikante Senkung an Angst *in-vivo* an Ratten beobachtet werden konnte [17]. Die Bindung von Valerensäure an den GABA_A Rezeptor

bleibt durch bekannte Sedativa, wie Benzodiazepine, Barbiturate oder Loreclezol oder GABA_A Antagonisten, wie Picrotoxin unbeeinflusst [3]. Hingegen konnte ein synergistischer Effekt mit Diazepam oder exogenen GABA durch die allosterischen Eigenschaften von Valerensäure festgestellt werden [3, 12, 17]. Im Vergleich zu Diazepam und einem ethanolischen Extrakt aus *Valeriana officinalis* konnte eine verstärkte anxiolytische Wirkung nachgewiesen werden [17]. Bedingt durch ihren Wirkkomplex gelten Präparate aus Baldrianwurzel als wirksame Alternative zu Benzodiazepinen für die Langzeittherapie [9]. Hingegen dürfte sich Acetoxyvalerensäure hemmend auf die anxiolytische Wirkung von Valerensäure auswirken [6]. Dies macht weitere Untersuchungen reiner Valerensäure vielversprechend. Kohm et al. stellten fest, dass Derivate der Valerensäure generiert werden können, die eine höhere Affinität und Effektivität *in-vitro* und *in-vivo* zeigen [13]. In den Versuchen wurde die Auswirkung diverser Amide der Valerensäure neben Valerensäure-Ethylester auf den GABA-bedingten Chloridstrom *in-vitro* an *Xenopus laevis* Oocyten verglichen, sowie deren sedative und anxiolytische *in-vivo* Aktivität im „elevated plus maze test“ an Mäusen bestimmt [13].

1.4. Problemstellung

Dementsprechend sollte in dieser Diplomarbeit Valerensäure in Blutplasma und Gehirn von Versuchstieren quantifiziert werden, die reine Valerensäure oder Valerensäure-Derivate bekommen haben. Die Resultate sollten pharmakokinetische Erkenntnisse über die Aufnahme von Valerensäure und der möglichen Prodrugs an den Wirkort und den zeitgebundenen Abbau liefern, sowie helfen, vielversprechende Prodrugs von weniger potenten zu unterscheiden. Es sollte auch versucht werden, diese Daten mit den *in-vivo* Verhaltensstudien zu korrelieren. Um eine quantitative Analyse machen zu können, sollte eine geeignete Aufarbeitungsmethode des biologischen Materials und eine empfindliche Analysemethode mittels LC-MS/MS erstellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzienverzeichnis

Tab. 1. Verwendete Reagenzien

Acetonitril	HPLC FarUV / Gradient Grade J.T.Baker®, Lot: 10344-22013 CAS-Nummer [75-05-8]
Acetoxyvalerensäure	PhytoLab, Ch.-B.: 6799 CAS-Nummer [81397-67-3]
Ameisensäure	Roth® Rotipuran® ≥98%, p.o., ACS Carl Roth®, Ch.-B.: 441178769 CAS-Nummer [64-18-6]
Dichlormethan	AnalaR Normapur®, BDH Prolabo® VWR, Ch.-B.: 09K130518 CAS-Nummer [75-09-2]
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich® Chemistry Lot: 07896LMV CAS-Nummer [67-68-5]
Methanol	Roth® Rotisolv® HPLC Carl Roth®, Ch.-B.: 773851 CAS-Nummer [67-56-1]
Natriumchlorid (Saline)	Sigma-Aldrich® Chemistry Lot: S7653 CAS-Nummer [7647-14-5]
Polysorbat 80 (Tween 80)	Fluka® Analytical Lot: 142343740209905 CAS-Nummer [9005-65-6]
Propan-2-ol	AnalaR Normapur®, BDH Prolabo® VWR, Ch.-B.: 11/130514 CAS-Nummer [67-63-0]

tertiär-Butyl-Methylether	99,8% Sigma-Aldrich® Chemistry, Lot: 80114010 CAS-Nummer [1634-04-4]
Undecansäure	Sigma-Aldrich® Chemistry, Lot: #STBB7323V CAS-Nummer [112-37-8]
Valerensäure	PhytoLab, Ch.-B.: 3033 CAS-Nummer [3569-10-6]

2.2. Geräteverzeichnis und Software

Tab. 2. Verwendete Geräte

Analysenwaage	Sartorius® MC 120 Sartorius®
Kühlzentrifuge	Hettich® EBA 12R Typ: 1002 Hettich® Lab Technology
Magnetrührer	Heidolph® MR 3001 K Heidolph® Instruments
Massenspektrometer	API 4000® MS/MS System, Applied Biosystems®/MDS SCIEX Life Technologies®
ph-Meter	HI 223 Calibration Check Microprocessor ph Meter <u>Elektrode:</u> HI 1131P <u>Kalibrierlösungen:</u> • HI 7004, pH 4.01 Buffer Solution ±0.01 pH@ 25°C/77F, Lot: 3176 • HI 7007, pH 7.01 Buffer Solution ±0.01 pH@ 25°C/77F, Lot: 3277 Hanna instruments®

Spritzen	B. Braun® OMNIFIX-F® 1ml Tuberkulin/Tuberculin Lot: 2B20048 <u>Spitzen:</u> B. Braun® 100 Sterican® ø 0,40 x 20 mm, 27 G x ¾ Lot: OD16258510 B. Braun®
UHPLC-System	Dionex® Ulti Mate® 3000 RS <u>Vorsäule:</u> Acclaim® 120 C18 guard cartridge (5 µm, 10 x 2 mm I.D.) <u>Säule:</u> Acclaim® RSLC 120 C18 column (3 µm, 150 x 2.1 mm I.D.) Thermo Fisher Scientific®
Ultra-Turrax®	IKA® T10 basic ULTRA-TURRAX® IKA®
Vortexmischer	Heidolph® REAX 2000 Heidolph® Instruments
Zentrifuge	Heraeus® Pico® 21 Zentrifuge Thermo Fisher Scientific®

Tab. 3. Verwendete Software

Massenspektrometer	Analyst 1.5 Editions Applied Biosystems®/ MDS Analytical Technologies Instruments) Life Technologies®
Tabellenkalkulation	Microsoft® Office Excel® 2007 Microsoft® Corporation
UHPLC-System	Dionex® Chromatography MS Link, Built For Analyst Access Object Version 1.5, Link: 2.5.0.2429 Thermo Fisher Scientific® Chromeleon® Express (DIONEX® Corporation, Version: 6.80 SR 5 Build 2429 (144431) Thermo Fisher Scientific®

2.3. Versuchstiere

2.3.1. Charakterisierung der eingesetzten Versuchstiere

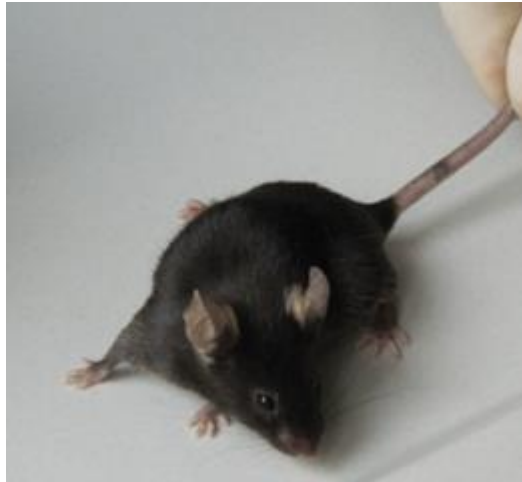


Abb. 3. Männliche Maus, Typ (C57BL/6N)

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um männliche Mäuse vom Typ (C57BL/6N) (Abb. 3.), (Charles River Laboratories), die eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten sollen und ein ideales Angstprofil zeigen. Die Maus als Versuchstier wurde zwecks einfacherer Haltung und Handhabung sowie wegen der günstigeren Kosten gewählt. Da, verglichen mit anderen Versuchstieren, bei Mäusen nur eine geringe Menge Blut und entsprechend eine noch geringere Menge an Plasma zur Verfügung steht, kann pro Tier nur eine Substanz bestimmter Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt getestet werden.

2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Probengewinnung

Den Tieren wurde Valerensäure oder eines ihrer Derivate in einer Konzentration von 3 mg/kg, gelöst in einer Saline/DMSO-Lösung (Saline / 10% DMSO / 3% Tween 80), intraperitoneal verabreicht und Blut bzw. Gehirn nach 15, 30, 60 oder 120 Minuten entnommen. Pro Substanz wurde für jeden der vier Zeitpunkte eine Versuchstieranzahl von $n = 4$ gewählt, um Schwankungen, die in biologischen Matrices zu erwarten sind, auszugleichen. Die Tiere wurden mittels Genickschlag betäubt und

anschließend dekapitiert. 300 µl Blut wurden aus der sublingualen Vene in EDTA-beschichtete Röhrchen aufgefangen und mittels Kühlzentrifuge zentrifugiert (4000 U/min, 5°C, 15 min). Das überstehende Plasma wurde bei einer Temperatur von -80°C tiefgefroren, um die Enzymaktivität zu unterdrücken. Das Gehirn wurde vollständig entnommen und in zuvor abgewogenen Eppendorfgefäßen ebenfalls bei -80°C zur weiteren Aufarbeitung bereitgehalten (Entnahmetechnik 1). Dem Gehirn musste eine bestimmte Menge an Flüssigkeit zugefügt werden, damit bei der weiteren Aufarbeitung ein aliquoter Probenanteil entnommen werden konnte. Dazu wurde das Gewicht des Gehirns bestimmt und die 1,5 fache Menge des ermittelten Wertes in µl Pufferlösung (ameisensaures H₂O, pH 3,5) zugesetzt. Der verwendete Puffer entspricht dem Lösungsmittel A der UHPLC. Das Gehirn wurde mit einem Ultra-Turrax® zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurde mit einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (13000 U/min, 5°C, 5 min). Vom Überstand wurden 100 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß übergeführt.

Da Blutreste im Gehirn die Ergebnisse beeinflussen könnten, wurden zur Überprüfung auch Proben mittels anderer Entnahmetechnik des Gehirns gewonnen. Dazu wurde das Tier mit Thiopental (150 mg/kg) betäubt, der Brustkorb geöffnet und das Tier durch gezieltes Spülen des Organismus ausgehend vom Herz mit Phosphatpuffer-Saline (pH 7,2) mittels Venenkanüle möglichst vollständig entblutet, bevor das Gehirn entnommen werden konnte (Entnahmetechnik 2). Dadurch konnten mögliche Blutreste zur Gänze entfernt werden. Die Verabreichung der Proben und Entnahme von Plasma und Gehirn wurde von Frau Mag. pharm. Juliane Hintersteiner, Department für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien, durchgeführt.

2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn

Ein für die quantitative Messung von Valerensäure in Plasma und Gehirn maßgebliches Problem im Zuge der Methodenentwicklung war, dass Valerensäure in hohem Maße an Proteine gebunden wird und daher nicht oder nur unvollständig nachweisbar ist. Proteine befinden sich auch in gelöster Form im Plasma und in den aus dem Gehirn gewonnenen Proben. Die Bindung ergibt sich aus Wechselwirkungen der polaren Gruppen. Daher müssen die Proteinbindungen gespalten und die Proteine ausgefällt werden. Eine Möglichkeit wäre die Proteinfällung mit organischem Lösungsmittel (z.B. Methanol) im Überschuss. Daher wurde zunächst Probe und Methanol im Verhältnis 1:2 verwendet. Als erstes wurde dies mit künstlichem Humanplasma versucht, da kein Leerplasma der Mäuse zur Verfügung stand. Die Wiederfindungsrate von Valerensäure lag bei 90%. Sobald man aber mit dem Mausplasma arbeitete, konnte man keine Valerensäure finden, auch nicht bei hohen Konzentrationen, da die Spaltung der Proteinbindungen offensichtlich nur unvollständig abläuft. Im Massenspektrometer (MS) kann die Ionisation des Analyten mit der von Störkomponenten, wie Probenmatrix oder Verunreinigungen, interferieren, was als Ionensuppression bezeichnet wird [14]. Das MS kann pro Zeiteinheit nur eine bestimmte Anzahl an Ionen verarbeiten. Bei einem hohen Maß an Störionen verschiebt sich das Verhältnis zu Ungunsten des Analyten (Valerensäure), da dieser nur noch einen kleinen Teil der verarbeiteten Ionenmenge ausmacht. Folglich verschwindet das Signal des Analyten unter die Nachweisgrenze im Grundlinienrauschen. Bleiben Teile der Valerensäure an Proteine gebunden, können diese in der MS/MS Analyse nicht detektiert werden, da nur reine Valerensäure erfasst werden kann. Für eine vollständige Spaltung der Proteinbindungen und eine Fällung müssen folglich höhere Methanol-Konzentrationen bis nahezu konzentriertes Methanol verwendet werden. Als Konsequenz wurde das Verhältnis Probe zu Methanol auf 1:15 erhöht. Bei einem Verhältnis von 1:2 resultiert eine Verdünnung zu Methanol 66%, bei einem Verhältnis von 1:15 Methanol 93,75%. Pro Tier steht nur eine geringe Probenmenge zur Verfügung und bei einer Gabe von 3 mg/kg Valerensäure kann von sehr geringen Konzentrationen, vor allem im Gehirn, ausgegangen

werden. Bei einem Verhältnis von 1:15 wird die Probe aber zu stark verdünnt, sodass die Ergebnisse erneut unter der Nachweisgrenze liegen. Diese beschriebenen Vorversuche mit MeOH zum Ausfällen der Proteine im Zuge der Methodenentwicklung wurden von meiner Vorgängerin Frau Mag. pharm. Irmhild Gräbner durchgeführt [36].

Deshalb wurde eine flüssig/flüssig Extraktionsmethode nach Sampath et al. überarbeitet, die für den Nachweis von Valerensäure im Plasma von Ratten entwickelt wurde [23]. In der adaptierten Aufarbeitungsmethode, die für Plasma und Gehirn gleichermaßen verwendet werden kann, werden 100 µl Probe, 100 µl Saline/DMSO-Lösung (Saline / 10% DMSO / 3% Tween 80), und 10 µl einer Lösung des internen Standard (iS) Acetoxyvalerensäure (1 µg/ml in Saline / 10% DMSO / 3% Tween 80) zugefügt. Ein aliquoter Teil von 100 µl wird mit 400 µl einer Mischung aus den organischen Lösungsmitteln Dichlormethan und tertiär-Butyl-Methyl-Ether (80:20, v:v) 5 Minuten mittels Vortexmischer ausgeschüttelt. Durch diesen flüssig/flüssig Extraktionsschritt werden die Proteine gefällt, die Proteinbindungen zu Valerensäure gespalten und diese sowie der interne Standard quantitativ in die organische Phase übergeführt, da beide relativ unpolar sind. Ein dreiphasiges System entsteht. Die klare organische Unterphase kann mittels Injektionsnadel aufgenommen und unter Stickstoff bei Raumtemperatur (25°C) zur Trockene gebracht werden. Anschließend wird in 100 µl MeOH für 5 Minuten im Ultraschallbad gelöst und dann für 5 Minuten bei 14800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen in Autosamplerfläschchen übergeführt und mittels UHPLC-MS/MS analysiert.

2.5. LC-MS/MS Analyse

2.5.1. Funktion des UHPLC-MS/MS Systems

In einem LC-MS/MS System werden ein Hochleistungstrennverfahren und ein Hochleistungsanalyseverfahren gekoppelt, was zu einer hohen Selektivität der Ergebnisse führt.



Abb. 4. Verwendete UHPLC-Anlage

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ist ein chemisch-physikalisches Hochleistungstrennverfahren zwischen einer stationären und mobilen Phase [15]. Verschiedene Substanzen gehen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein [22]. Unterschiedliche Polarität und Löslichkeit führen zu verschiedenen starker Adsorption und Desorption und resultieren in unterschiedlichen Retentionszeiten am Detektor [22]. Die Trennleistung hängt dabei stark von den Abmessungen der Trennsäule, der stationären Phase, der Zusammensetzung und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase sowie der Analyten und der Temperatur ab [15]. Das Verhältnis der Komponenten der mobilen Phase kann durch den gezielten Einsatz eines Lösungsmittelgradienten während des Laufs gesteuert werden. Für die optimale Trennleistung ist vor allem eine hohe Anzahl an theoretischen Böden, also an Trennstufen nötig, die

von geringer Trennstufenhöhe sind [8, 15]. Eine Trennstufe entspricht der chromatographischen Strecke, die zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts notwendig ist [15]. Je kleiner die Partikelgröße und deren Größenverteilung, desto dichter die Packung, desto höher die Anzahl der theoretischen Böden [8]. Je höher der einsetzbare Druck, desto kleiner die Partikelgröße, die verwendet werden kann [34]. In der HPLC kommen Drücke von bis zu 400 bar (6000 psi) und Partikel zwischen 3 und 5 μm Teilchendurchmesser vor. Die Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) (Abb. 4., s. S. 12), die verwendet wurde (Tab. 2., s. S. 6), ist eine Weiterentwicklung der HPLC, die Drücke bis zu 1000 bar (15000 psi) verarbeiten kann und somit eine sehr geringe Partikelgröße von bis zu 1,7 μm ermöglicht. Es kommt zu einer Steigerung der theoretischen Böden. Daraus resultieren eine deutlich verbesserte Auflösung und verkürzte Analysenzeiten [11].

Zwecks höherer Reproduzierbarkeit wird der Säulenofen temperiert und die Proben auf gekühlten Stellplätzen bereitgestellt. Das Auftragen einer exakten Probemenge auf die Säule übernimmt der automatische Probengeber. Der Säule wird das Massenspektrometer als Detektor direkt nachgeschaltet.



Abb. 5. Verwendetes TripleQuad-MS/MS System

Das Massenspektrometer (Abb. 5.) ist ein Hochleistungsanalysegerät, dass in die Gasphase übergeführte und ionisierte Analyte nach deren Masse-zu-

Ladungs-Verhältnis trennt und detektiert [33]. Die drei wesentlichen Grundbausteine sind eine Ionenquelle, ein Analysator und ein Detektor von denen es jeweils unterschiedliche Modelle für verschiedene analytische Zwecke gibt. Als Ionisierungsmethoden standen die Electrospray Ionization (ESI) und die Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (APCI) zur Verfügung. Dabei handelt es sich um zwei weiche Ionisierungsarten, wobei sich erstere besser für mittelmäßig polare bis hoch polare Substanzen eignet und letztere für mittelmäßig polare bis wenig polare Substanzen [2]. Der interne Standard Acetoxyvalerensäure konnte im Zuge der Methodenentwicklung auch bei relativ hoher Konzentration von 1000 ng/ml mittels ESI dargestellt werden. Daher wurde die APCI gewählt.

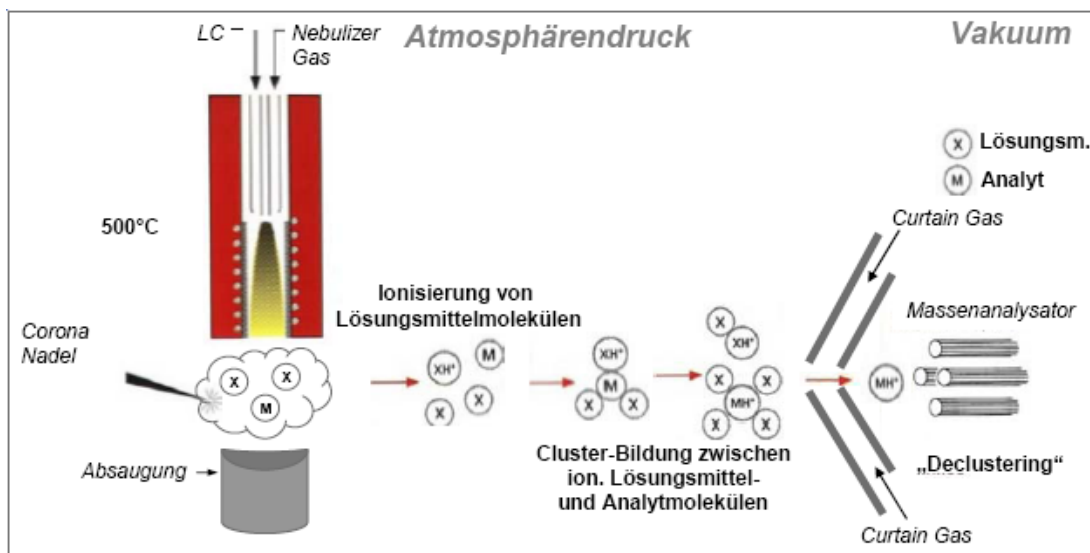


Abb. 6. APCI (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Bei der APCI (Abb. 6.) wird das Eluat direkt nach der Säule zusammen mit einem Vernebelungsgas (Stickstoff) unter Atmosphärendruck in ein beheiztes Rohr gesprüht, wo es schlagartig verdampft wird [22]. Der Dampf streift über eine Corona-Entladungs-Nadel mit hoher Spannung, an der es zu Spitzenentladungen kommt, wodurch die in größerer Menge vorliegenden Lösungsmittelmoleküle ionisiert werden [22]. Im „positiv-ion mode“ kommt es zu einer Protonierung der Solventmoleküle, im „negativ-ion mode“ zu einer Deprotonierung [2]. Zwischen den Molekülen von Analyt und Solvent kommt es zur Cluster-Bildung und anschließend zum Ladungsaustausch [22]. Man

spricht von einer 2-stufigen indirekten Ionisierung. Auf Grund der weichen Ionisierung bleibt die Fragmentierung der Analytmoleküle gering und Quasimolekülionen nahe dem ursprünglichen Molekulargewicht, $(M + H)^+$ im „positiv ion mode“ oder $(M - H)^-$ im „negative ion mode“, können detektiert werden [2]. Da sich Valerensäure leicht deprotonieren lässt, wurde der „negative ion mode“ gewählt. Die ionisierten Analytmoleküle werden mittels Stickstoffvorhang von Lösungsmittelmolekülen befreit und einem Potentialgefälle folgend in den Analysator geleitet [22]. Verglichen mit ESI sind bei der APCI deutlich höhere Flussraten nötig (man braucht ja Lösungsmittelmoleküle für die Ionisierung), was die Parameteroptimierung erschwert [2].



Abb. 7. Aufbau des TripleQuad-MS/MS Systems

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Triple Quadrupol Systeme (TripleQuad-MS/MS Systeme) (Abb. 7.) sind Mittel der Wahl bei quantitativen Analysen von Substanzen aus komplexen biologischer Proben, wie z.B. Serum, da sie durch hohe Selektivität bestehen [33]. Im Analysator wird Hochvakuum angelegt, damit die Teilchen nicht mit Luftpartikeln kollidieren. Das Hochvakuum wird durch Turbomolekularpumpen erzeugt.

Ein Quadrupol besteht aus vier kreuzförmig im Kreis angeordneten Elektroden, wobei gegenüberliegende Elektroden immer gleicher Ladung sind. Die Ionen beschreiben eine taumelnde Bewegung durch die Anordnung und werden nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis selektiert. Dazu wird sowohl Wechselstrom (AC) als auch Gleichstrom (DC) verwendet. Im negativen Modus stellen die in y-z Ebene gelegenen Elektroden einen, laut Miller und Denton, „high pass mass filter“ dar [16]. Schwere Ionen werden

von einem AC schneller Frequenz kaum beeinflusst und von DC negativer Ladung im Zentrum des Quadrupols fokussiert [16]. Leichte Ionen werden vom AC stark beeinflusst und von den Elektroden angezogen [16]. Nur Ionen schwerer Ladung gelangen zum Detektor [16]. Die sich in x-z Ebene befindenden Elektroden bilden den gegensätzlichen „low pass mass filter“ [16]. Die positiv geladenen Elektroden ziehen, bedingt durch den DC, schwere Ionen an und halten bei entsprechender Frequenz des AC leichte Elektroden im Zentrum, wodurch nur letztere den Detektor erreichen [16]. Eine Kombination aller vier Elektroden führt zu einer Überlappung der „filter“ und Miller und Denton sprechen von einem „band pass mass filter“ [16]. Nur Ionen einer Masse, die diesem Bereich entsprechen, durchlaufen den Quadrupol [16].

In einem TripleQuad-MS/MS System sind drei Quadrupole hintereinander geschaltet (Abb. 7., s. S. 15). Während Q1 und Q3, wie zuvor beschrieben, mit AC und DC betrieben werden und zum Selektieren bzw. zum Scannen dienen, stellt Q2 eine Stoßzelle dar. Ein Stickstoff-Gegenstrom zerlegt das Mutterion (precursor ion) durch Kollision (CAD = Collision Activated Decomposition) selektiv in Fragmente, die als Tochterionen (product ions) bezeichnet werden. Unabhängig vom Fraktionsgrad des Tochterions, wird dieses in der Mitte des Quadrupols fokussiert, da dieser im Gegensatz zu Q1 und Q3 nur mit AC betrieben wird [10]. In einem „ball-on-a-saddle-point“ Model kann dies veranschaulicht werden [10]. Ein Ball, der auf einem Sattel liegt, würde an einer der beiden Seiten hinunter rollen, lässt man den Sattel aber rotieren, bleibt der Ball im Zentrum fixiert [10].

Betrieibt man das MS nur mit einem Quadrupol im Scan Modus, dann verhält es sich sehr unempfindlich, da das Gerät das gesamte Massenspektrum aufnimmt und nur kurze Zeit auf die einzelnen Massen fokussiert. Wenn man hingegen im Modus „Single Ion Monitoring“ (SIM) nur den Durchtritt eines Ions (oder weniger Ionen „Selected Ion Monitoring“) zulässt, dann werden die Informationen über die Quantität des gewählten Ions sehr empfindlich, es gehen aber qualitative Informationen verloren. Durch den Einsatz mehrerer Quadrupole kann die Selektivität der Messung deutlich gesteigert werden.

Die Ionen treffen schließlich auf ein „Channel Electron Multiplier“ (CEM) Detektor-System, einen Sekundärelektronenvervielfacher mit kontinuierlicher Dynode [31]. Dabei handelt es sich um ein gebogenes Röhrchen aus Glas, das mit Blei stark dotiert ist. Treffen die Ionen darauf, entsteht ein elektrischer Impuls, der sich einem Potentialgradienten folgend durch den CEM bewegt, sich dabei kontinuierlich verstärkt und in ein messbares digitales Signal übersetzt werden kann [31].

2.5.2. Methodenentwicklung

In Versuchen im Vorfeld wurde festgestellt, dass sich die Derivate der Valerensäure (Prodrugs) wegen der geringen Polarität nicht ausreichend ionisieren lassen, um in einer MS/MS Analyse nachweisbar zu sein. Da davon ausgegangen wurde, dass die Derivate im Gehirn durch Enzyme der Klasse EC 3, den Hydrolasen, in Valerensäure gespalten werden, war ohnehin nur eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Valerensäure notwendig.

Daher sollen im Q1 nur Ionen des Quasimoleküls von Valerensäure m/z 233 (negativer Modus, $[M-H]^-$) selektiert werden. Natürlich könnten auch Fragmente ionisierter Matrixbestandteile oder Verunreinigungen ebenfalls m/z 233 zeigen. Deshalb wurde ein SRM-Experiment ausgearbeitet, um selektiv nur Fragmente von Valerensäure nachzuweisen. Dazu wurde die Referenzsubstanz (reine Valerensäure) mittels FIA (Flow Injection Analysis) in das MS eingebracht, durch Q1 konnte nur m/z 233 durchtreten (Q1 im SIM Modus), und dieses Mutterion von Valerensäure wurde im Q2 (Stoßzelle) fragmentiert. Q3 arbeitete zunächst im Scan Modus, damit alle bei der Fragmentierung entstandenen Tochterionen detektiert werden konnten. Es zeigte sich, dass das Tochterion m/z 84 am interessantesten war, weshalb es als Quantifier (typisches Tochterion höchster Intensität) für das SRM Experiment herangezogen wurde. In diesem Experiment arbeiteten nun sowohl Q1 als auch Q3 im SIM Modus, Q1 war auf das Mutterion m/z 233 eingestellt, Q3 auf das typische Tochterion m/z 84, das bei der Fragmentierung in Q2 entsteht. (Abb. 8., s. S. 18). Der Übergang m/z 233/84 ist typisch und selektiv für Valerensäure. Die hohe Selektivität wird durch die

vorgeschaltete UHPLC durch die spezifische Retentionszeit von Valerensäure unterstrichen. Damit konnte nun Valerensäure selektiv und sehr empfindlich detektiert und quantifiziert werden.

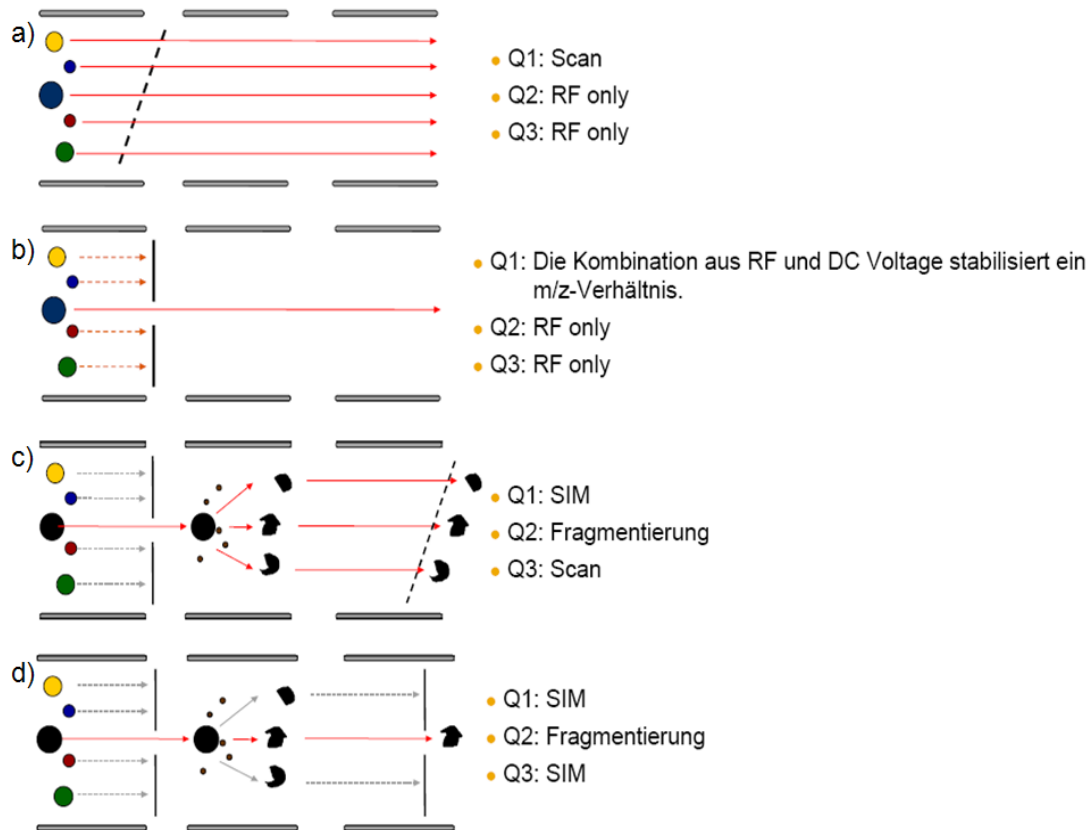


Abb. 8. Methodenentwicklung einer MS/MS Analyse: a) Q1 arbeitet im Scan Modus, alle Ionen innerhalb des eingegebenen Massebereichs werden detektiert; b) Q1 arbeitet im SIM Modus, nur das gewählte Mutterion wird detektiert; c) Q1 arbeitet im SIM Modus, Q2 fragmentiert, Q3 arbeitet im Scan Modus, alle Tochterionen eines Mutterions werden detektiert; d) Q1 arbeitet im SIM Modus, Q2 fragmentiert, Q3 arbeitet im SIM Modus, nur das gewählte Tochterion eines Mutterions wird detektiert = „Single Reaction Monitoring“ (SRM);

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

2.5.3. Optimierung der TripleQuad-MS/MS Parameter

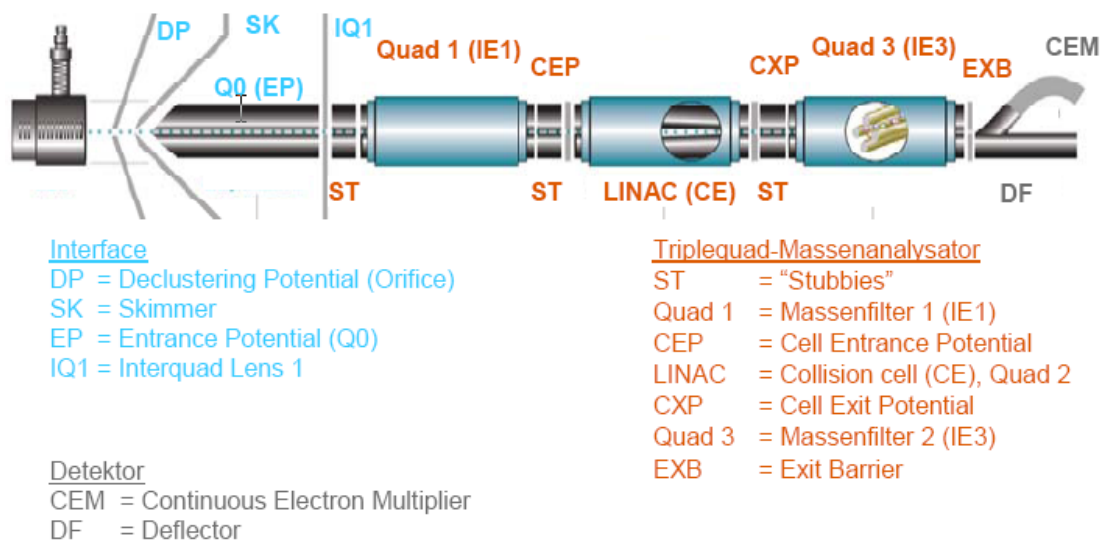


Abb. 9. Geräteparameter des TripleQuad-MS/MS Systems

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Im Gegensatz zur ESI können, bei Verwendung der APCI als Ionenquelle, die idealen Geräteparameter (Abb. 9.) durch die Software nicht automatisch mit einer Pumpenspritze bestimmt werden, weil hohe Lösungsmittelflüsse nötig sind. In einer „flow injection analysis“ (konstanter Fluss von mobiler Phase 0,3 ml/min) wird unter Umgehung der UHPLC-Säule jeder Parameter einzeln optimiert. Die Parameter wurden sowohl für Valerensäure (0,1 ng/ml) als auch für den internen Standard Acetoxyvalerensäure (300 ng/ml), separat optimiert. Dazu wurden jeweils 5 µl der Lösungen in den Fluss der mobilen Phase injiziert und jeweils die Auswirkungen bei Veränderung der einzelnen Parameter beobachtet.

Ziel der Optimierung war es, möglichst schmale Peaks von hoher Intensität, die ein möglichst großes Signal/Rausch Verhältnis (S/N) zeigten, zu generieren. Damit sollte eine optimale (möglichst intensive) Ionisierung des Mutterions als auch optimale Ionisierungsbedingungen für das Tochterion, das für die selektive Quantifizierung von Valerensäure verwendet wird, erreicht werden. Dies ist Voraussetzung für eine möglichst geringe Nachweisgrenze.

Optimierung „Declustering Potential“ (DP -400 V bis 0 V)

Das DP ist ein elektrisches Potential, das an der „orifice plate“ angelegt ist und zur Fragmentierung der Cluster zwischen Ionenquelle und Hochvakuumbereich dient [32]. Die höchsten Peaks wurden bei -65 V erreicht (Abb. 10).

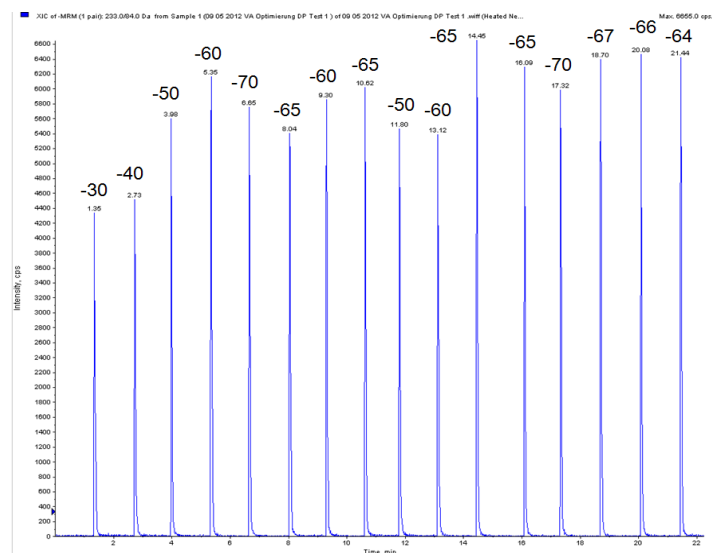


Abb. 10. Optimierung „Declustering Potential“ (DP)

Optimierung „Entrance Potential“ (EP -12 V bis -2 V)

Das EP ist ein elektrisches Potential, das zur Fokussierung der Ionen durch Q0 führt [29]. Die höchsten Peaks wurden bei -11 V erreicht (Abb. 11., s. S. 21).

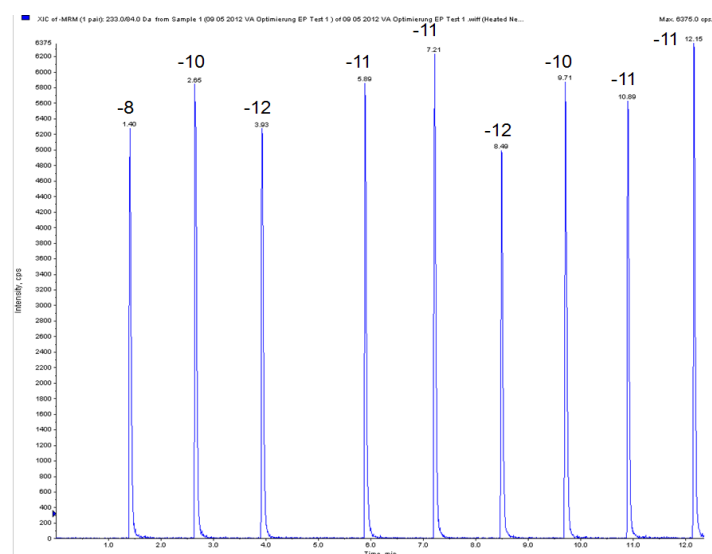


Abb. 11. Optimierung „Entrance Potential“ (EP)

Optimierung „Collision Energy“ (CE -130 V bis -5 V)

Die CE ist die Energie, mit der Ionen in die Stoßzelle beschleunigt werden, um durch Zusammenstoß mit Gasmolekülen fragmentiert zu werden. Sie steuert die Potenzialdifferenz zwischen Q0 und der Stoßzelle Q2 [7, 29]. Die höchsten Peaks wurden bei -29 V erzielt. (Abb. 12.)

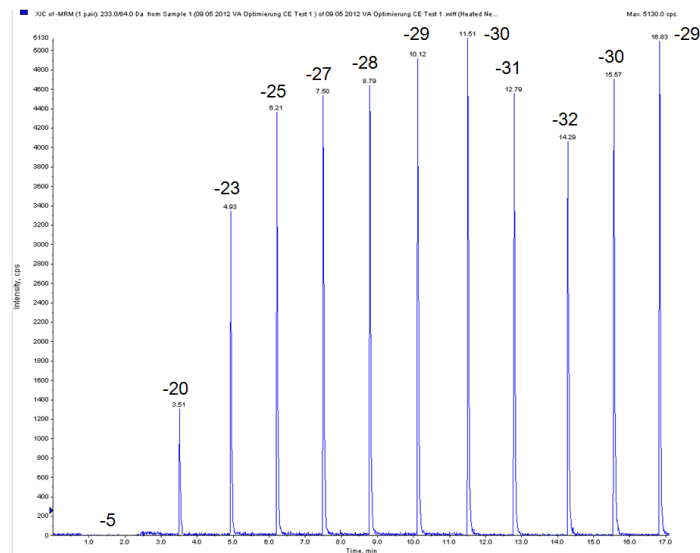


Abb. 12. Optimierung „Collision Energy“ (CE) VA

Optimierung „Collision Cell Exit Potential“ (CXP -55 V bis 0 V)

Das CXP ist ein elektrisches Potential, das der Fokussierung und Beschleunigung von Ionen beim Verlassen der Stoßzelle Q2 in Q3 dient [7]. Die höchsten Peaks wurden bei -5 V erreicht (Abb. 13.).

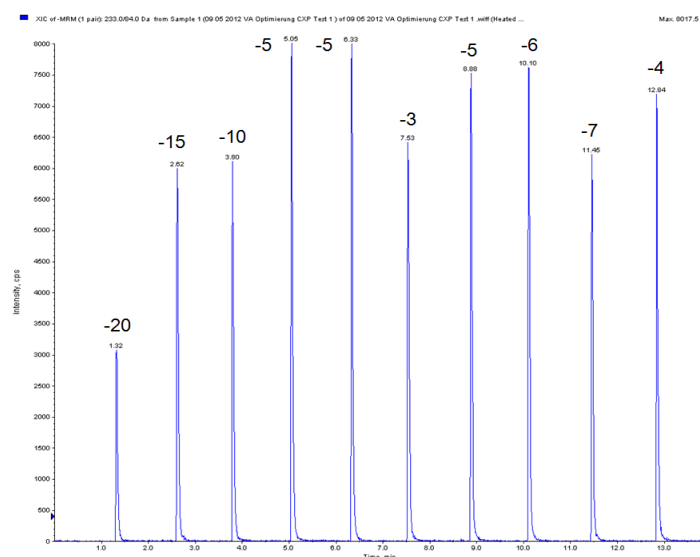


Abb. 13. Optimierung „Collision Cell Exit Potential“ (CXP)

Optimierung Temperatur (TEM 0°C bis 750°C)

Dieser Parameter gibt die Temperatur an, bei der die Probe in der Ionenquelle verdampft wird [32]. Die höchsten Peaks wurden bei TEM 400°C erreicht (Abb. 14., Abb. 15.). Die Temperatur muss für Valerensäure und Acetoxyvalerensäure gleich gewählt werden, da eine schnelle Änderung dieses Parameters nicht möglich ist. Die Orientierung erfolgt am schwerer nachzuweisenden Analyt Valerensäure.

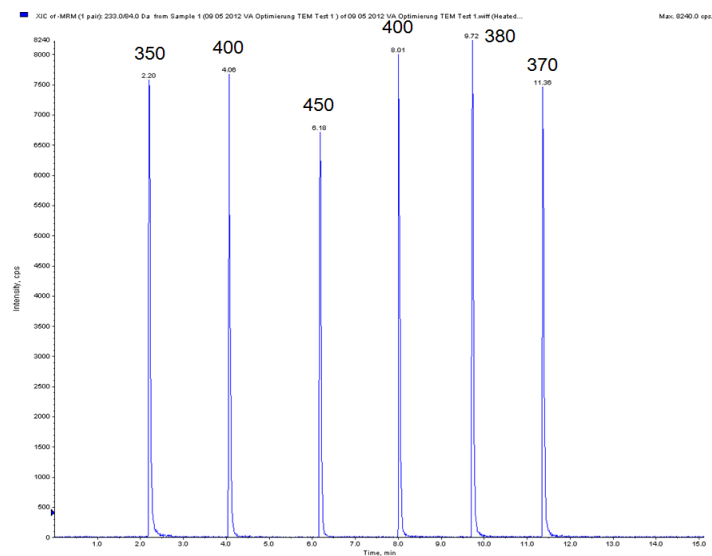


Abb. 14. Optimierung Temperatur (TEM) 1

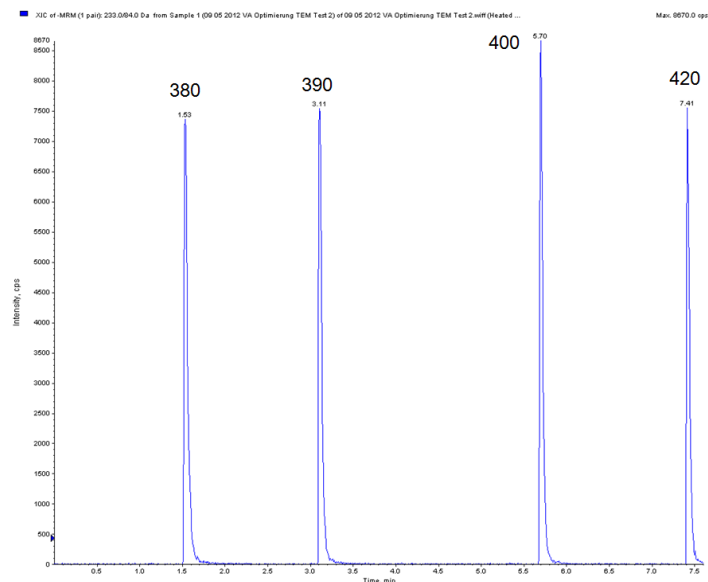


Abb. 15. Optimierung Temperatur (TEM) 2

Optimierung „Nebulizer Current“ (NC -5 μ A bis 0 μ A)

Der NC ist ein elektrischer Strom, der an der für die Ionisierung der Moleküle in der Ionenquelle zuständigen Corona-Entladungs-Nadel angelegt ist [30]. Die höchsten Peaks wurden -5 μ A erlangt (Abb. 16.).

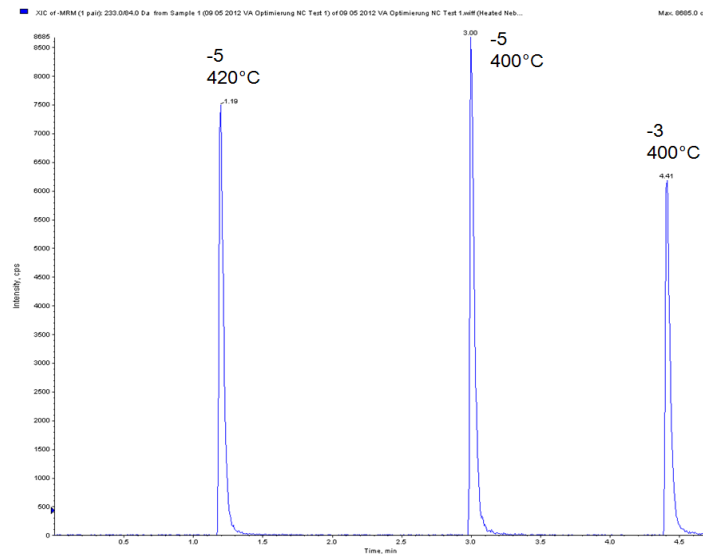


Abb. 16. Optimierung „Nebulizer Current“ (NC)

Optimierung „Collision Activated Dissociation“ (bzw. Decomposition) (CAD 2 bis 12)

CAD beschreibt die Fragmentierung von Ionen durch Zusammenstoß mit neutralen Gasmolekülen in der Stoßzelle. Beim Collision Gas handelt es sich um hochreinen Stickstoff (99,999%) [31]. Der Parameter CAD kontrolliert die Menge an eingeleitetem Collision Gas. Die höchsten Peaks wurden bei CAD 12 erreicht.

2.5.4. Verwendung eines internen Standards

Ein interner Standard ist ein Stoff, mit dem eine Probe versetzt wird, um die qualitative Identifikation und/oder die quantitative Bestimmung zu erleichtern [35]. Durch ihn können Schwankungen bei der Probenaufarbeitung und Geräteschwankungen ausgeglichen und Analysefehler erkannt werden. Die Proben werden zu Beginn der Aufarbeitung mit dem internen Standard gleicher Menge und Konzentration dotiert. Bei der Vermessung mittels

Eichgerade wird das Verhältnis Peakfläche Analyt / Peakfläche interner Standard einbezogen.

2.5.4.1. Undecansäure (UNA) als interner Standard

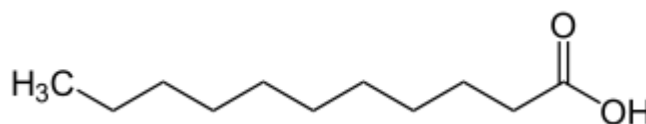


Abb. 17. Undecansäure

In der Arbeit von Sampath et al. wurde die kostengünstige gesättigte Fettsäure Undecansäure (Abb. 17.) verwendet [23].

Die Undecansäure (2 mg/100ml) wurde im Zug der Methodenoptimierung im Q1 Scan Modus (50 Da – 250 Da, Verweildauer 0,5 sek, step size 0,5) bei m/z 185 („negative ion mode“) detektiert und dann mittels Q1 im „Single Ion Monitoring“ Modus dargestellt. Auf der Suche nach einem Übergang für eine MRM Analyse wurde nach einem typischen Tochterion gesucht. Q1 „Single Ion Monitoring“ Modus (m/z 185), Q2 Fragmentierung, Q3 Scan Modus (50 Da – 250 Da, Verweildauer 0,5 sek, step size 0,5); Es konnte kein Tochterion gefunden werden. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass sich Undecansäure nicht in sinnvolle Tochterionen spalten lässt. Bei einer CE -30 V findet man einen deutlichen Undecansäure Peak, jedoch keine Tochterionen. Bei einer CE -35 V wird das Mutterion fragmentiert und es kommt zu einer Abnahme seiner Intensität, aber zu keiner entsprechenden Zunahme der Intensität eines Tochterions, sondern nur zu untypischen Fragmenten. Bei einer CE -40 V verschwindet der Peak des Mutterions, aber weiterhin bilden sich keine typischen Tochterionen (Abb. 18., s. S. 25). Daher muss in der MRM Methode der „Übergang“ m/z 185/185 gescannt werden. Mutter- und Tochterion sind ident, was aber nicht dem Sinn einer MRM-Analyse im TripleQuad-MS/MS entspricht.

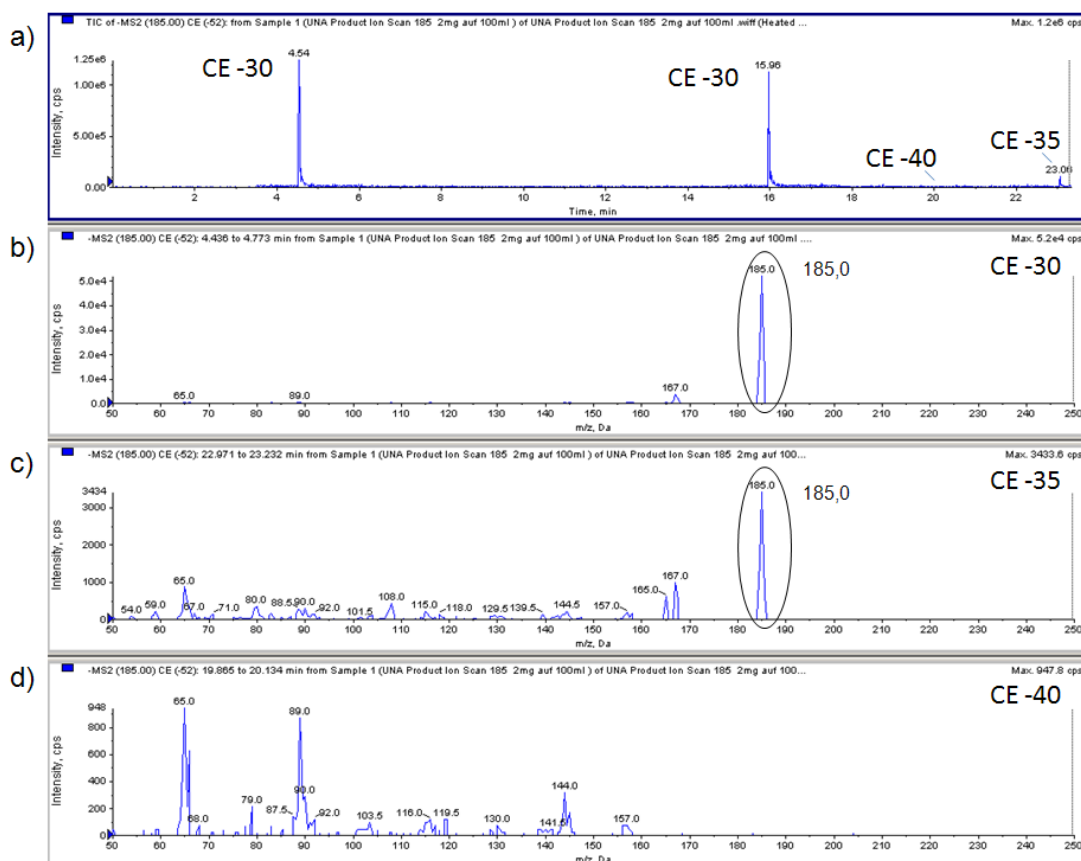


Abb. 18. „Product Ion Scan“ zur Findung eines typischen Tochterions für UNA: a) verschiedene eingesetzte CE; b) CE -30, Intensität des Mutterions ist hoch, keine geeigneten Tochterionen; c) CE -35, Intensität des Mutterions nimmt ab, keine geeigneten Tochterionen; d) CE -40, Mutterion ist verschwunden, keine geeigneten Tochterionen;

Eine Optimierung der MS-Parameter wurde vorgenommen. (DP -60, EP -30, CE -10, CXP -10) In der Scheduled-MRM Analyse (VA m/z 233/84, UNA m/z 185/185) zeigten sich ähnliche Retentionszeiten (VA 12,86 min, UNA 12,15 min), wodurch es zu keiner ausreichenden Trennung dieser Substanzen kam (Abb. 19., s. S. 26). Deshalb wurde versucht, einen anderen, besser geeigneten internen Standard zu finden.

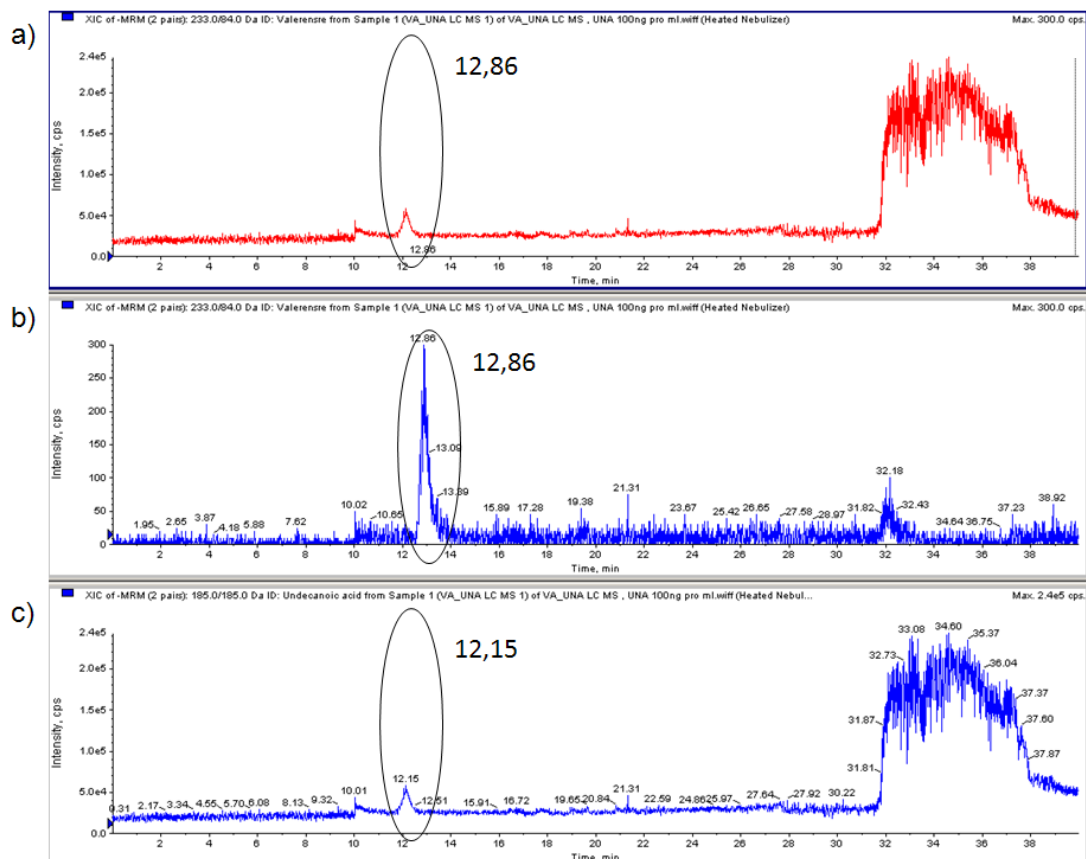


Abb. 19. Vergleich der Retentionszeiten von VA und UNA: a) VA ist von UNA überlagert wegen der ähnlichen Retentionszeiten; b) Retentionszeit VA: 12,86 min; c) Retentionszeit UNA: 12,15 min;

2.5.4.2. Acetoxyvalerensäure (ACVA) als interner Standard

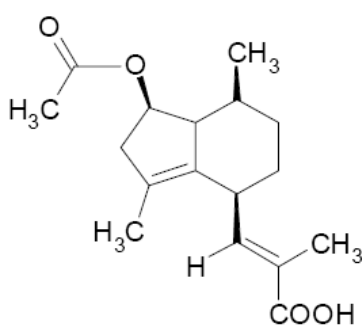


Abb. 20. Acetoxyvalerensäure

Acetoxyvalerensäure (Abb. 20.) wird im Europäischen Arzneibuch neben der Valerensäure als qualitätsbestimmende Substanz in der Gehaltsbestimmung von Sesquiterpensäuren in geschnittenen Baldrianwurzeln durch Flüssigchromatographie angeführt [5]. Aus diesen Chromatogrammen

ist bekannt, dass sich diese beiden Substanzen in einem gradienten-gesteuerten Umkehrphase-HPLC Model ähnlich verhalten und gut getrennt werden können. Daher wurde Acetoxyvalerensäure als möglicher interner Standard untersucht, der er ähnliche Eigenschaften wie Valerensäure haben sollte. Im Q1 Scan Modus (200 Da – 350 Da, Verweildauer 0,5 sek, step size 0,5) wurde die Acetoxyvalerensäure (300 ng/ml) bei m/z 291 („negative ion mode“) detektiert und dann mittels Q1 im „Single Ion Monitoring“ Modus dargestellt. Auf der Suche nach einem Übergang für eine MRM Analyse wurde nach einem Tochterion gesucht. Q1 „Single Ion Monitoring“ Modus (m/z 291), Q2 Fragmentierung, Q3 Scan Modus (50 Da – 300 Da, Verweildauer 0,5 sek, step size 0,5); Es konnten mehrere Tochterionen (m/z 59, m/z 231, m/z 249) gefunden werden. m/z 59 entsteht durch Abspaltung von Essigsäure, was wenig spezifisch ist. Unter den beiden anderen Tochterionen zeigte m/z 249 die höchste Intensität. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass sich Acetoxyvalerensäure bei Erhöhung der CE immer weiter fragmentieren lässt, wobei im Verhältnis die Essigsäure zunimmt. Bei einer CE -22 V war eine hohe Intensität des Mutterions und eine hohe Intensität der Tochterionen (m/z 231, m/z 249) und eine niedrige Intensität der Essigsäure (m/z 59) zu finden. Steigerte man auf CE -29 V sank die Intensität des Mutterions und stieg die Intensität der Essigsäure deutlich, wobei hier die meisten Tochterionen zu finden waren. Bei einer CE -52 V waren Mutterion und Tochterionen (m/z 231, m/z 249) verschwunden, wobei der Peak von Essigsäure bestehen blieb (Abb. 21., s. S. 28).

Für die MRM Methode wurde dementsprechend der Übergang m/z 291/249 gewählt.

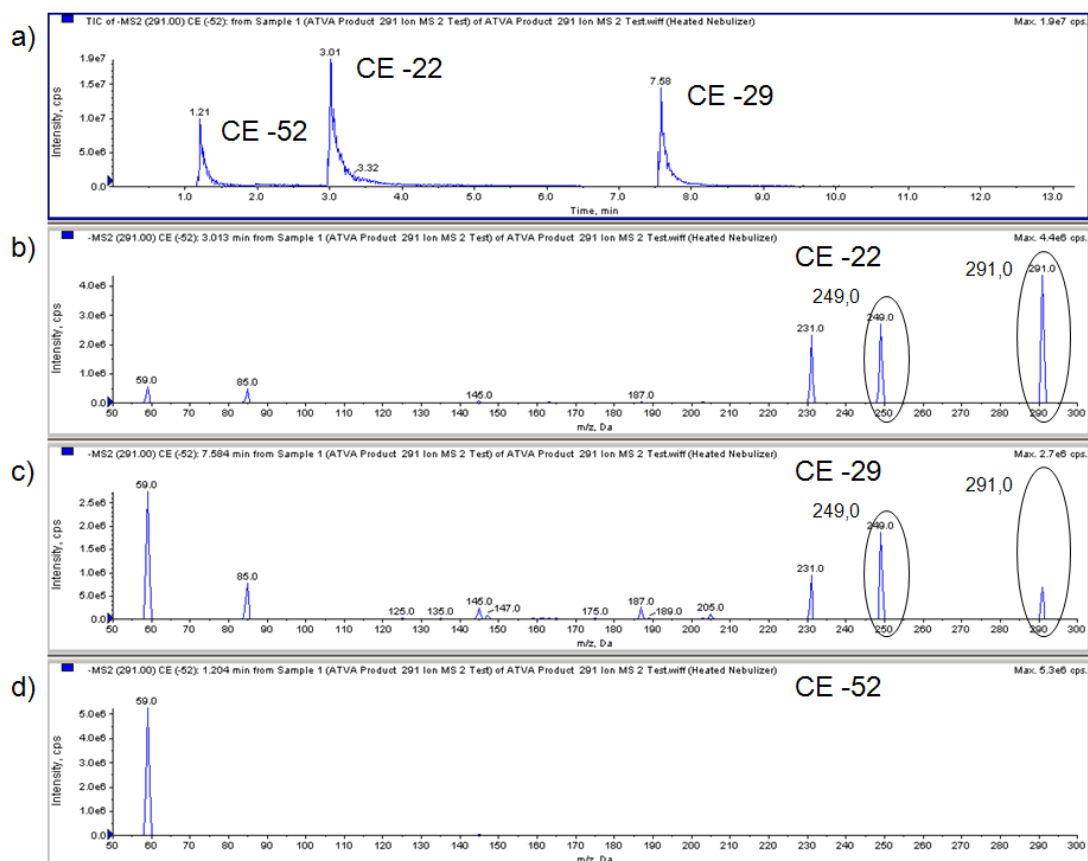


Abb. 21. „Product Ion Scan“ zur Findung eines typischen Tochterions für ACVA: a) verschiedene eingesetzte CE; b) CE -22, Intensität des Mutterions ist hoch, geeignetes Tochterion bei 249; c) CE -29, Intensität des Mutterions nimmt ab, verhältnismäßig nimmt die Intensität der Tochterionen zu, geeignetes Tochterion bei 249; d) CE -52, Mutterion ist verschwunden, keine geeigneten Tochterionen;

Eine Optimierung der MS-Parameter wurde in analoger Weise, wie zuvor für Valerensäure beschrieben, vorgenommen (DP -65, EP -11, CE -24, CXP -5), (CE Abb. 22, s. S. 29). In der Scheduled-MRM Analyse (VA m/z 233/84, ACVA m/z 291/249) zeigten sich unterschiedliche Retentionszeiten (VA 4,11 min, ACVA 7,03 min), wodurch eine vollständige Trennung möglich wurde und eine sinnvolle „Target Scan Time“ (180 sek) gesetzt werden konnte (Abb. 23, s. S. 29).

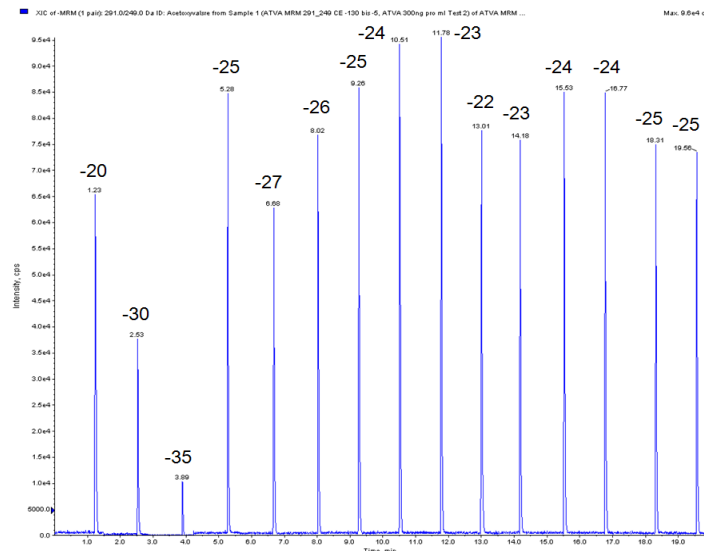


Abb. 22. Optimierung „Collision Energy“ (CE) ACVA

Obwohl Acetoxyvalerensäure zwar deutlich teurer als Undecansäure ist, wurde sie als interner Standard für die weiteren Experimente gewählt, weil sie nicht die analytischen Nachteile aufweist.

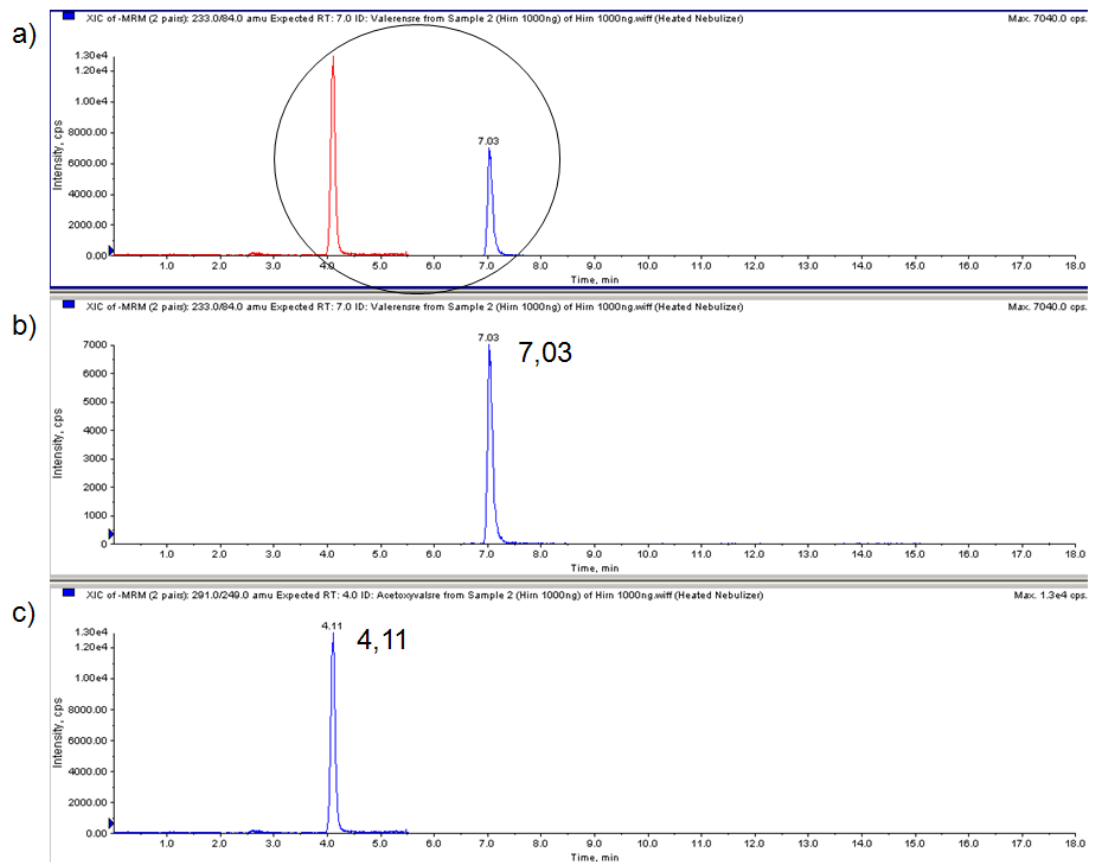


Abb. 23. Vergleich der Retentionszeiten von VA und ACVA: a) VA und ACVA erscheinen gut getrennt; b) Retentionszeit VA: 7,03 min; c) Retentionszeit ACVA: 4,11 min;

2.5.5. Optimierung der UHPLC Parameter

Eine ideale Messmethode zeichnet sich durch möglichst kurze Analysezeiten, damit verbunden eine Arbeitszeit- und eine Lösungsmittelersparnis an der UHPLC sowie gut reproduzierbaren Messergebnissen, resultierend aus schmalen hohen Peaks, hoher Auflösung und Präzision und einem geringen Grundlinienrauschen aus. Dazu war in diesem Projekt eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit für die quantitativ nachzuweisende Substanzen Valerensäure und den internen Standard notwendig.

Einer umfangreichen Methodenoptimierung kommt deshalb besondere Bedeutung zu.

Durch einen steileren Gradienten der mobilen Phase können schmälere und höhere Peaks erzielt werden, was wesentlich für die Vermessung der geringen Valerensäure-Konzentrationen im Probematerial ist.

Die Laufzeit der ursprünglichen Methode „Valerensäure.opt APCI neg. MRM 233_84 LCMS lang 3.dam“ von 40 min (Tab. 4., s. S. 31), konnte, nachdem Retentionszeit vom Analyt (ca. 7 min) und internem Standard (ca. 3 min) bekannt waren, unter Berücksichtigung von ausreichenden Abständen der 3-minütigen Zeitfenster, in denen das MS die Übergänge m/z 233/84 (Valerensäure) bzw. m/z 291/249 (Acetoxyvalerensäure, interner Standard) detektiert, auf eine Laufzeit von 18 min reduziert werden. In der resultierenden Methode „VA+ACVA_APCI neg MRM LCMS 3.dam“ kommt es zu einer Zeitersparnis von 22 min pro Lauf (Tab. 5., s. S. 31). Das ergibt bei 384 Proben eine Zeitersparnis von über 140 h und eine Lösungsmittelersparnis von mehr als 4 l.

Tab. 4. Lösungsmittelgradient, Methode „Valerensäure.opt APCI neg. MRM 233_84 LCMS lang 3.dam“

LC - Parameter	
0,0 – 4,5	1_6
4,5 ValveRight (Schaltventil)	1_2
4,5 – 40,0	1_2
Sampler.Temperature.Nominal	5,0 [°C]
ColumnOven.Temperature.Nominal	30,0 [°C]
%A	H ₂ O dest.HCOOH [pH 3,5]
%B	MeCN
InjectWash	Both (vor und nach der Injektion)
WashVolume	100,000 [µl]
Flow	0,500 [ml/min]
Gradient	
<u>Zeit [min]</u>	<u>Verhältnis Lösungsmittel [%]</u>
0,000	%B = 50,0 [%]
30,000	%B = 60,0 [%]
30,500	%B = 98,0 [%]
35,000	%B = 98,0 [%]
35,500	%B = 50,0 [%]
40,000	%B = 50,0 [%]

Tab. 5. Lösungsmittelgradient, Methode „VA+ACVA_APCI neg MRM LCMS 3.dam“

LC - Parameter	
0,0 – 2	1_6
2 ValveRight (Schaltventil)	1_2
2 – 18,0	1_2
Sampler.Temperature.Nominal	5,0 [°C]
ColumnOven.Temperature.Nominal	30,0 [°C]
%A	H ₂ O dest.HCOOH [pH 3,5]
%B	MeCN
InjectWash	Both (vor und nach der Injektion)
WashVolume	100,000 [µl]

Flow	0,500 [ml/min]
Gradient	
<u>Zeit [min]</u>	<u>Verhältnis Lösungsmittel [%]</u>
0,000	%B = 50,0 [%]
8,000	%B = 80,0 [%]
8,100	%B = 98,0 [%]
12,000	%B = 98,0 [%]
12,100	%B = 50,0 [%]
18,000	%B = 50,0 [%]

Die optimierten Parameter für Valerensäure bzw. Acetoxyvalerensäure wurden in einer Scheduled-MRM Methode vereint, wobei dem Gerät je eine „Target Scan Time“ pro Substanz (3 min) eingegeben wird, innerhalb der es die jeweiligen Parameter zur Detektion verwenden soll. Das ist ein wesentlicher Grund, warum eine ausreichende Trennung von Valerensäure und internem Standard bezüglich ihrer Retentionszeit und Peaks notwendig ist. So konnte eine Nachweisgrenze („lower limit of detection“) von 0,1 ng/ml erreicht werden.

2.5.6. LC-MS/MS Methode

Aus Laufzeitoptimierung und Parameteroptimierung resultierte die Methode „VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam“ (Tab. 6.).

Tab. 6. Parameter, Methode „VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam“

UHPLC- Dionex® Ulti Mate 3000	
Software Version	Dionex LC-MS Link
Massenspektrometer API 4000® MS/MS System	
Software Version	Analyst 1.5
Source Type	Heated Nebulizer
Mode	negativ
LC - Parameter	
0,0 – 2	1_6
2 ValveRight (Schaltventil)	1_2
2 – 18,0	1_2
Sampler.Temperature.Nominal	5,0 [°C]
ColumnOven.Temperature.Nominal	30,0 [°C]
%A	H ₂ O dest.HCOOH [pH 3,5]
%B	MeCN
InjectWash	Both (vor und nach der Injektion)
WashVolume	100,000 [µl]
Flow	0,500 [ml/min]
Gradient	
<u>Zeit [min]</u>	<u>Verhältnis Lösungsmittel [%]</u>
0,000	%B = 50,0 [%]
8,000	%B = 80,0 [%]
8,100	%B = 98,0 [%]
12,000	%B = 98,0 [%]
12,100	%B = 50,0 [%]
18,000	%B = 50,0 [%]
MS - Parameter	
CUR:	10,00

GS1:	30,00
GS2:	18,00
TEM	400,00
NC	-5,00
CAD	12,00
DP	-65,00
EP	-11,00
CXP	-5,00
<u>MRM – Übergang VA</u>	
Q1 Mass (Da)	233,00
Q3 Mass (Da)	84,00
Target Scan Time	180 sek (Minute 5,5 – 8,5)
dwell time	300 ms
CE (VA)	-29,00
<u>MRM – Übergang ACVA</u>	
Q1 Mass (Da)	291,00
Q3 Mass (Da)	249,00
Target Scan Time	180 sek (Minute 2,5 – 5,5)
dwell time	300 ms
CE (VA)	-24,00
Detector Parameters (Negativ)	
CEM	2100,00
DF	200,00

2.5.7. Erstellung einer Eichgeraden und Quantifizierung

Für die Quantifizierung wurden jeweils die Peakflächen von Valerensäure mit Acetoxyvalerensäure ermittelt. Um Aussagen über die vorliegenden Konzentrationen machen zu können, bedarf es Eichgeraden. Dazu wurden Leerplasma und Leerschirn mit unterschiedlichen Mengen Valerensäure und jeweils derselben Menge Acetoxyvalerensäure dotiert und anschließend nach der adaptierten Methode nach Sampath et. al aufgearbeitet (Kapitel 2.4. Aufarbeitungsmethoden Plasma und Hirn, s. S.10). In Tabelle 7 und 8 sind

die durchgeführten Verdünnungsreihen und resultierende Konzentrationen für die Eichgerade angegeben (Tab. 7., Tab. 8., Tab. 9.). Es wurden pro Verdünnungsstufe mehrere Proben aufgearbeitet.

Tab. 7. Verdünnungsreihe für die Eichgerade Plasma

Lösung	Plasma	VA-Lösung	Saline/DMSO-Lösung	ACVA-Lösung (L3)
1P	100µl (Plasma leer)	100µl (L1)	0µl	10µl
2P	100µl (Plasma leer)	50µl (L1)	50µl	10µl
3P	100µl (Plasma leer)	10µl (L1)	90µl	10µl
4P	100µl (Plasma leer)	5µl (L1)	95µl	10µl
5P	100µl (Plasma leer)	100µl (L2)	0µl	10µl
6P	100µl (Plasma leer)	50µl (L2)	50µl	10µl
7P	100µl (Plasma leer)	10µl (L2)	90µl	10µl
8P	100µl (Plasma leer)	1µl (L2)	99µl	10µl

(L1 = 1000ng/ml VA in Saline/DMSO-Lösung),

(L2 = 10ng/ml VA in Saline/DMSO-Lösung),

(L3 = 1000ng/ml ACVA Saline/DMSO-Lösung),

(Saline/DMSO-Lösung (Saline / 10% DMSO / 3% Tween 80))

Tab. 8. Verdünnungsreihe für die Eichgerade Hirn

Lösung	Hirn	VA-Lösung	Saline/DMSO-Lösung	ACVA-Lösung (L3)
1H	100µl (Hirn leer)	100µl (L1)	0µl	10µl
2H	100µl (Hirn leer)	50µl (L1)	50µl	10µl
3H	100µl (Hirn leer)	10µl (L1)	90µl	10µl
4H	100µl (Hirn leer)	5µl (L1)	95µl	10µl
5H	100µl (Hirn leer)	100µl (L2)	0µl	10µl
6H	100µl (Hirn leer)	50µl (L2)	50µl	10µl
7H	100µl (Hirn leer)	10µl (L2)	90µl	10µl
8H	100µl (Hirn leer)	1µl (L2)	99µl	10µl

(L1, L2, L3, Saline/DMSO-Lösung s. Tab. 7.)

Tab. 9. Konzentrationen der Verdünnungsreihen Plasma und Hirn

Lösung	VA-Konz. (ng/ml)	ACVA-Konz. (ng/ml)	Lösung	VA-Konz. (ng/ml)	ACVA-Konz. (ng/ml)
1P	476,19	4,76	1H	476,19	4,76
2P	238,10	4,76	2H	238,10	4,76
3P	47,62	4,76	3H	47,62	4,76
4P	23,81	4,76	4H	23,81	4,76
5P	4,76	4,76	5H	4,76	4,76
6P	2,38	4,76	6H	2,38	4,76
7P	0,48	4,76	7H	0,48	4,76
8P	0,24	4,76	8H	0,24	4,76

Mit der Software des MS (Analyst 1.5) konnte aus den Peakflächen von Valerensäure und den entsprechenden Konzentrationen eine Eichgerade erstellt werden. Die Werte streuten je nach Messlauf verschieden stark (Abb. 24.). Der Korrelationskoeffizient erlaubt eine Aussage über den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration von Valerensäure und dessen Peakfläche.

Beispielsweise ergaben sich so für die Eichgerade Hirn folgende Werte:

Korrelationskoeffizient: $R = 0,9836$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9675$

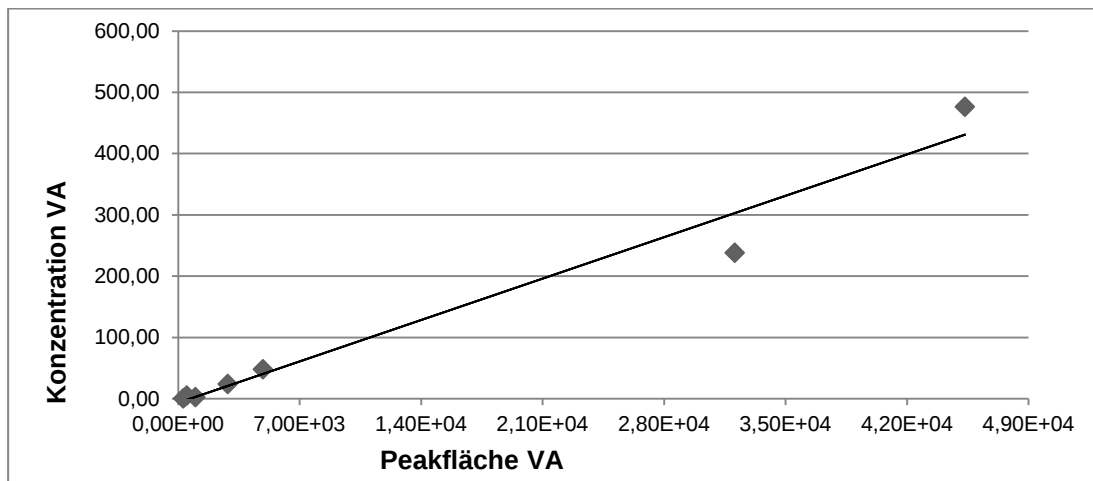


Abb. 24. Eichgerade Hirn ohne Normierung mittels iS

Der interne Standard soll Schwankungen bei der Aufarbeitung und Messung ausgleichen (Kapitel 2.5.4. Verwendung eines internen Standards, s. S. 23). Daher wurde zur Quantifizierung statt nur der Peakfläche Analyt das Verhältnis Peakfläche Analyt / interner Standard herangezogen. Für die Verknüpfung beider Werte wurde Excel® verwendet. Die Werte streuten deutlich weniger, der Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß näherten sich 1, ein verbesserter linearer Zusammenhang lag vor, was die Notwendigkeit des internen Standards unterstreicht (vgl. Abb. 24. und Abb. 26., s. S. 37).

Für die Eichgerade Plasma (Abb. 25., s. S. 37) ergaben sich somit folgende Werte und folgende Geradengleichung „ $y = k \cdot x + d$ “:

Korrelationskoeffizient: $R = 0,9996$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9992$

Geradengleichung: $y = 725,78x - 1,0308$

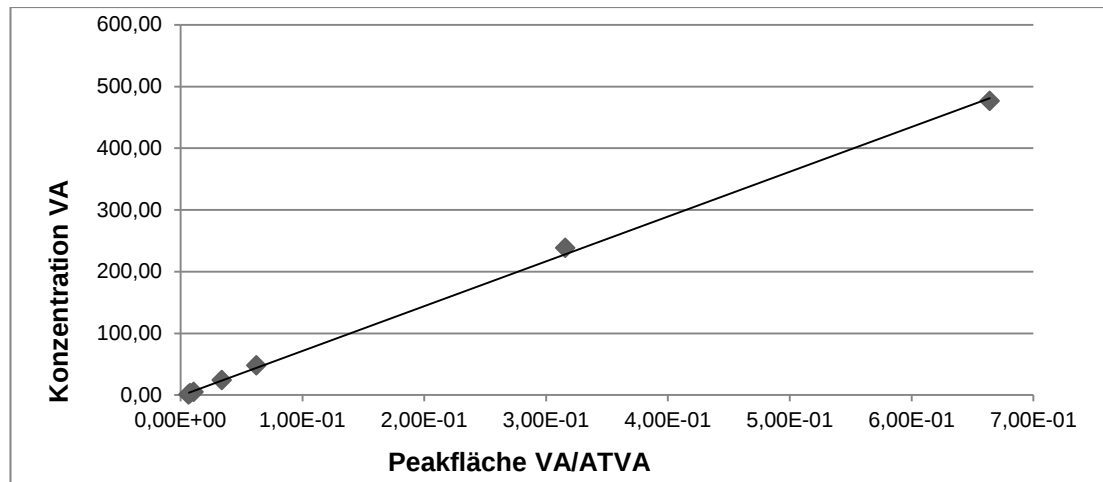


Abb. 25. Eichgerade Plasma nach Normierung mittels iS

Für die Eichgerade Hirn (Abb. 26.) ergaben sich somit folgende Werte und folgende Geradengleichung „ $y = k \cdot x + d$ “:

Korrelationskoeffizient: $R = 0,9998$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9997$

Geradengleichung: $y = 760,95x - 1,0527$

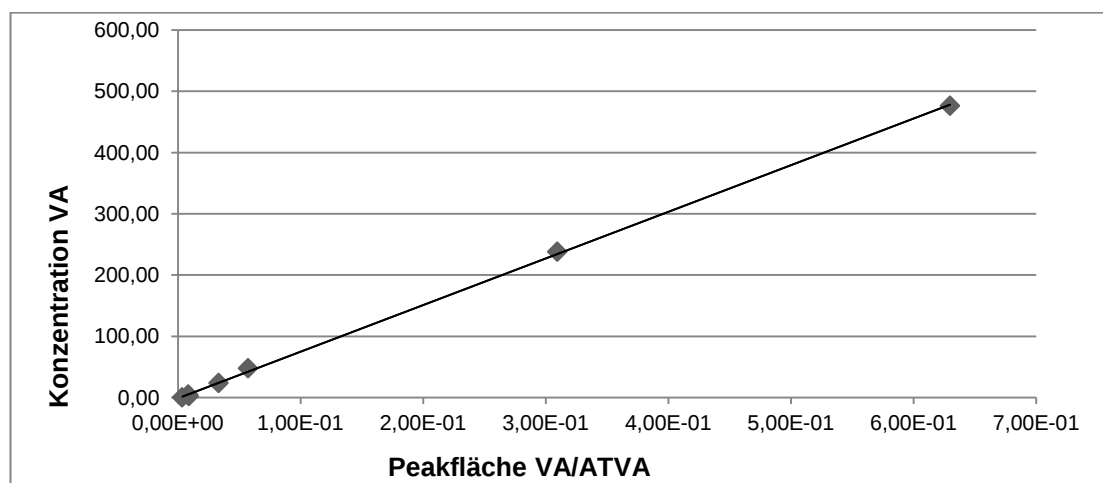


Abb. 26. Eichgerade Hirn nach Normierung mittels iS

Anhand dieser beiden Geradengleichungen kann nach Bestimmung der Peakflächen für Valerensäure und Acetoxyvalerensäure in einer unbekannten Probe deren Konzentration an Valerensäure berechnet werden.

2.5.8. Ermittlung der Wiederfindungsrate

Eine wichtige Größe bei der Validierung einer Methode stellt die Wiederfindungsrate dar. Durch sie kann eine Aussage über die Effizienz der Extraktion der adaptierten Aufarbeitungsmethode und damit über die Richtigkeit der Ergebnisse getroffen werden (Kapitel 2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn, s. S. 10). Dazu wurden Leerplasma und Leerhirn mit Valerensäure und Acetoxyvalerensäure dotiert, wobei die Zielkonzentrationen der einzelnen Proben gleich wie bei der Erstellung der Eichgeraden gewählt wurden. (Tab. 7., Tab. 8., Tab. 9., s. S. 35). Weiters wurden in einer Verdünnungsreihe reine methanolische Lösungen von Valerensäure und Acetoxyvalerensäure gleicher Konzentrationen wie die der dotierten Leerproben hergestellt (Tab. 9., s. S. 35). Die methanolischen Lösungen wurden gegen die dotierten Leerproben mittels UHPLC-MS/MS Analyse (Tab. 5., s. S. 31) vermessen und die Proben mit der jeweiligen Eichgerade Plasma oder Hirn (Abb. 25., Abb. 26., s. S. 37) auf den Verlust der Valerensäure im Zuge der Extraktion ausgewertet. Die errechnete Wiederfindungsrate liegt im Bereich von 84%.

3. Ergebnisse

Es wurden 10 Substanzen (Valerensäure und 9 Derivate, VB-a bis VB-i) durch *in-vitro* Experimente getestet. Dazu wurden pro Substanz zu 4 verschiedenen Zeitpunkten ($t = 15, 30, 60, 120$ min) aus jeweils 4 Versuchstieren Plasmaproben (Entnahmetechnik für Plasma (Kapitel 2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Probengewinnung, s. S. 8)) entnommen, aufgearbeitet (Kapitel 2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn, s. S. 10), dreifach analysiert (Tab. 5, s. S. 31) und mittels der Eichgerade für Plasma (Abb. 25., s. S. 37) quantifiziert (Tab. 10.), (Abb. 27., s. S. 40). Die einzelnen Messergebnisse sind in Tabelle 13 (s. S. 53 ff) angeführt sowie eine grafische Auswertung der einzelnen Substanzen inklusive Standardabweichung in den Abbildungen 33. bis 42. (s. S. 72 ff) zu sehen.

Tab. 10. Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmaproben aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Plasma					
Entnahmetechnik		Plasma			
Aufarbeitungsmethode		adaptiert nach Sampath et. al			
UHPLC-MS/MS Meth.		VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam.			
interner Standard		Acetoxxyvalerensäure (4,76 ng/ml)			
Substanz	15 min	30 min	60 min	120 min	
VA	640,71	105,21	61,32	71,77	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 252,40$	$\pm 35,60$	$\pm 41,81$	$\pm 24,97$	σ Proben (ng/ml)
VB-a	117,41	84,12	20,17	21,76	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 36,96$	$\pm 21,62$	$\pm 7,80$	$\pm 6,41$	σ Proben (ng/ml)
VB-b	103,83	77,23	44,40	14,14	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 24,22$	$\pm 30,30$	$\pm 13,91$	$\pm 1,94$	σ Proben (ng/ml)
VB-c	8,22	6,28	2,93	4,10	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 3,27$	$\pm 2,42$	$\pm 2,15$	$\pm 1,14$	σ Proben (ng/ml)
VB-d	166,45	80,36	11,03	11,68	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 17,44$	$\pm 51,83$	$\pm 3,12$	$\pm 2,87$	σ Proben (ng/ml)
VB-e	2,51	1,95	1,71	1,85	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,50$	$\pm 0,61$	$\pm 1,35$	$\pm 0,93$	σ Proben (ng/ml)
VB-f	164,23	76,70	24,21	26,55	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 90,29$	$\pm 37,68$	$\pm 8,27$	$\pm 6,86$	σ Proben (ng/ml)
VB-g	2,47	1,33	1,09	1,27	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,32$	$\pm 0,77$	$\pm 0,91$	$\pm 0,89$	σ Proben (ng/ml)
VB-h	39,30	16,33	5,03	4,28	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 7,78$	$\pm 5,33$	$\pm 2,12$	$\pm 1,75$	σ Proben (ng/ml)
VB-i	274,46	174,58	43,65	25,21	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 99,09$	$\pm 100,05$	$\pm 12,81$	$\pm 12,31$	σ Proben (ng/ml)

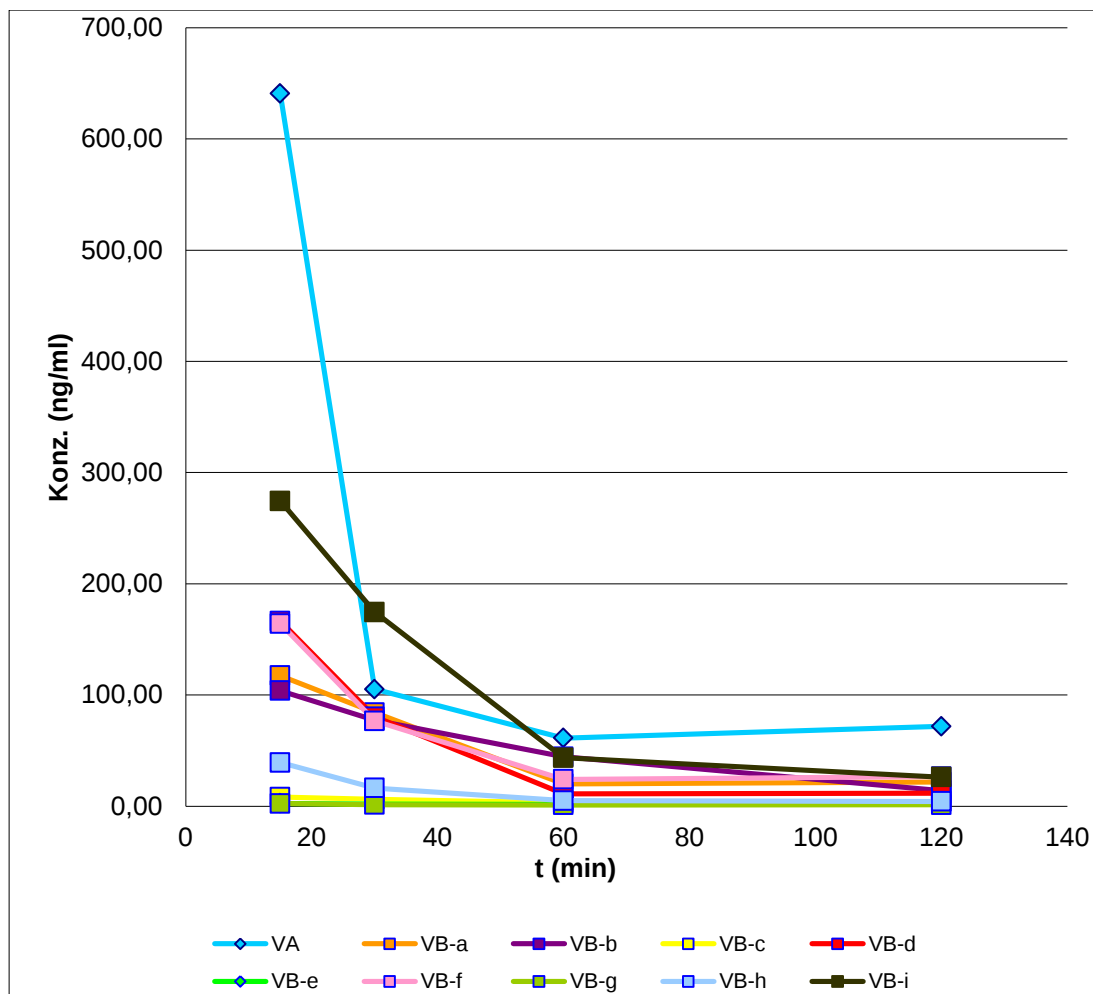


Abb. 27. Mittelwerte der Plasmaproben aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Für 9 Substanzen (Valerensäure, 8 Derivate, exklusive VB-i) wurden pro Substanz zu 4 verschiedenen Zeitpunkten ($t = 15, 30, 60, 120$ min) aus jeweils 4 Versuchstieren Hirnproben (Entnahmetechnik 1 für Gehirn (Kapitel 2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Probengewinnung, s. S. 8) entnommen, aufgearbeitet (Kapitel 2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn, s. S. 10), dreifach analysiert (Tab. 5, s. S. 31) und mittels der Eichgerade für Hirn (Abb. 26., s. S. 37) quantifiziert (Tab. 11., s. S. 41), (Abb. 28., s. S. 42). Die einzelnen Messergebnisse sind in Tabelle 14 (s. S. 78 ff) angeführt sowie eine grafische Auswertung der einzelnen Substanzen inklusive Standardabweichung in den Abbildungen 43. bis 51. (s. S. 95 ff).

Tab. 11. Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirnproben (Entnahmetechnik 1) aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Hirn					
Entnahmetechnik		Hirn 1			
Aufarbeitungsmethode		adaptiert nach Sampath et. al			
UHPLC-MS/MS Meth.		VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam.			
interner Standard		Acetoxyvalerensäure (4,76 ng/ml)			
Substanz	15 min	30 min	60 min	120 min	
VA	16,62	6,10	6,58	5,01	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 3,30$	$\pm 1,32$	$\pm 2,95$	$\pm 1,21$	σ Proben (ng/ml)
VB-a	6,97	7,21	4,43	4,68	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 2,01$	$\pm 2,99$	$\pm 1,27$	$\pm 1,83$	σ Proben (ng/ml)
VB-b	4,40	5,24	4,68	4,17	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,13$	$\pm 1,90$	$\pm 1,62$	$\pm 1,92$	σ Proben (ng/ml)
VB-c	5,35	5,61	4,37	4,32	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,35$	$\pm 1,22$	$\pm 0,98$	$\pm 1,29$	σ Proben (ng/ml)
VB-d	3,14	1,98	1,39	0,62	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,72$	$\pm 0,95$	$\pm 1,25$	$\pm 0,52$	σ Proben (ng/ml)
VB-e	0,28	0,06	0,19	0,05	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,66$	$\pm 0,15$	$\pm 0,37$	$\pm 0,09$	σ Proben (ng/ml)
VB-f	2,95	0,82	0,32	0,23	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 2,34$	$\pm 0,74$	$\pm 0,44$	$\pm 0,46$	σ Proben (ng/ml)
VB-g	0,19	0,22	0,25	0,19	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,43$	$\pm 0,72$	$\pm 0,37$	$\pm 0,45$	σ Proben (ng/ml)
VB-h	0,52	0,40	0,11	0,03	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,60$	$\pm 0,52$	$\pm 0,25$	$\pm 0,06$	σ Proben (ng/ml)

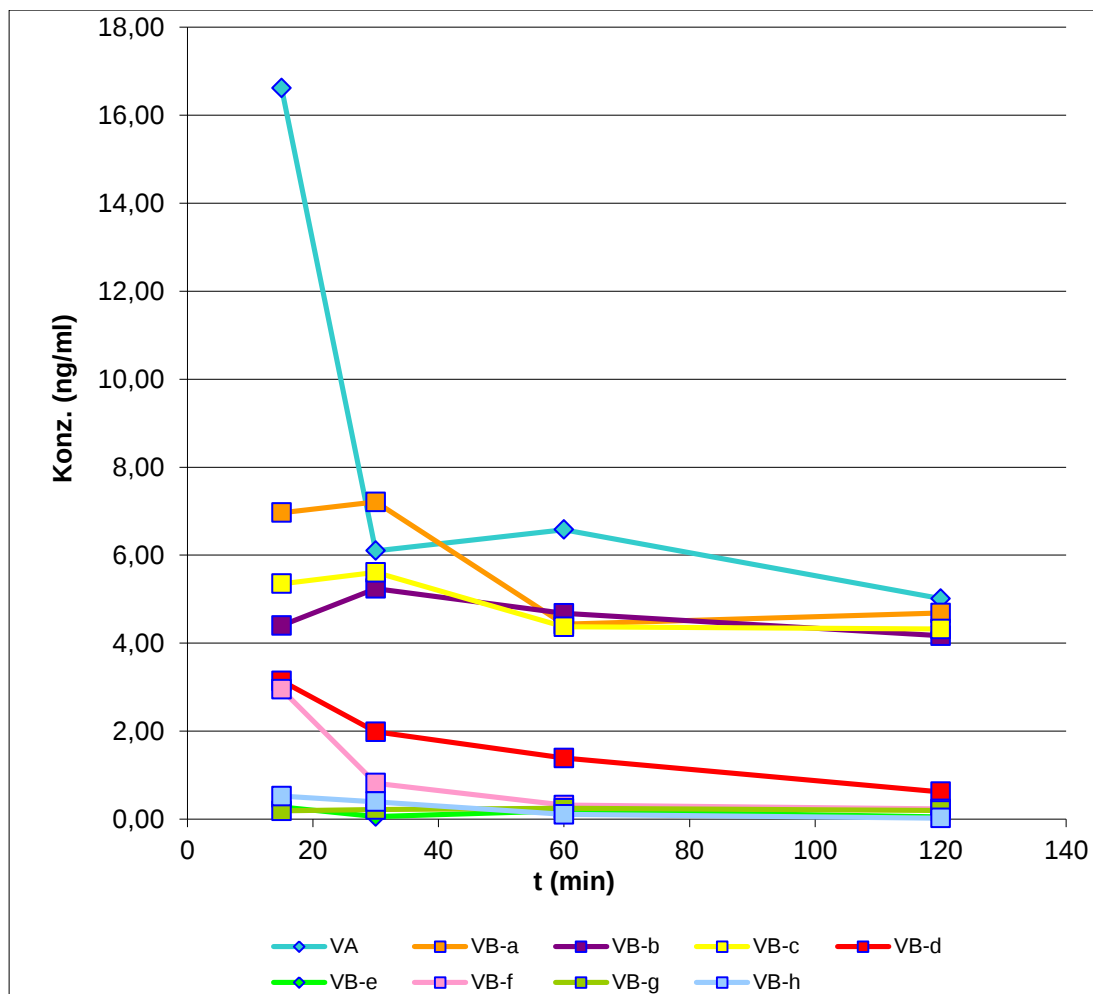


Abb. 28. Mittelwerte der Hirnproben (Entnahmetechnik 1) aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Wegen der möglichen Verfälschung der Hirnproben durch Blutreste (Problematik in Kapitel 2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Proben- gewinnung beschrieben) wurden für die vielversprechenden Substanzen (Valerensäure, VB-a, VB-b, VB-f, VB-i) zu 4 verschiedenen Zeitpunkten ($t = 15, 30, 60, 120$ min) aus jeweils 4 Versuchstieren Hirnproben (Entnahmetechnik 2 für Gehirn (Kapitel 2.3.2. Verabreichung der Substanzen und Probengewinnung, s. S. 8) entnommen, aufgearbeitet (Kapitel 2.4. Aufarbeitungsmethode von Plasma und Hirn, s. S. 10), dreifach analysiert (Tab. 5, s. S. 31) und mittels der Eichgerade für Hirn (Abb. 26., s. S. 37) quantifiziert (Tab. 12., s. S. 43), (Abb. 29., s. S. 43). Die einzelnen Mess- ergebnisse sind in Tabelle 15 (s. S. 100 ff) angeführt sowie eine grafische Auswertung der einzelnen Substanzen inklusive Standardabweichung in den Abbildungen 52. bis 56. (s. S. 110 ff).

Tab. 12. Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirnproben (Entnahmetechnik 2) aus den Dreifachbestimmungen von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Hirn					
Entnahmetechnik		Hirn 2			
Aufarbeitungsmethode		adaptiert nach Sampath et. al			
UHPLC-MS/MS Meth.		VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam.			
interner Standard		Acetoxysäure (4,76 ng/ml)			
Substanz	15 min	30 min	60 min	120 min	
VA	27,86	6,45	0,14	0,04	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 10,24$	$\pm 4,17$	$\pm 0,25$	$\pm 0,10$	σ Proben (ng/ml)
VB-a	1,00	0,75	0,46	0,00	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,97$	$\pm 0,78$	$\pm 0,95$	$\pm 0,00$	σ Proben (ng/ml)
VB-b	0,11	0,11	0,01	0,00	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,15$	$\pm 0,20$	$\pm 0,03$	$\pm 0,00$	σ Proben (ng/ml)
VB-f	0,71	0,30	0,40	0,00	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 0,81$	$\pm 0,35$	$\pm 0,87$	$\pm 0,00$	σ Proben (ng/ml)
VB-i	3,48	2,24	0,31	0,12	$\bar{x}$ Proben (ng/ml)
	$\pm 1,01$	$\pm 1,93$	$\pm 0,39$	$\pm 0,25$	σ Proben (ng/ml)

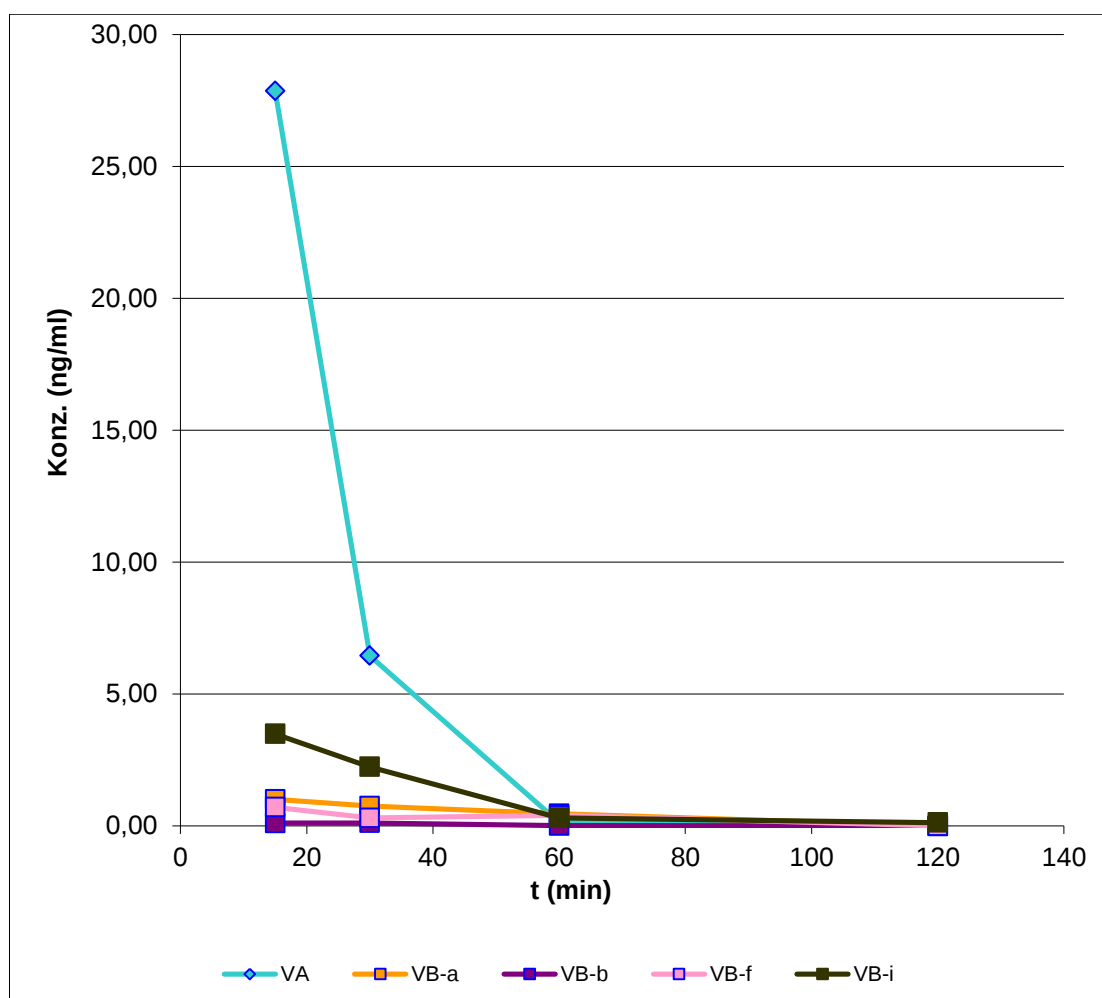


Abb. 29. Mittelwerte der Hirnproben (Entnahmetechnik 2) aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

4. Diskussion

Ziel der Diplomarbeit war es, eine quantitative Messung des Gehalts von Valerensäure im Blutplasma und Gehirn von Mäusen durchzuführen, um Korrelationen mit den Ergebnissen von *in-vivo* Versuchen, wie dem „elevated plus maze test“ oder dem „light/dark choice test“, zu generieren. Da Valerensäure in das Gehirn nur schwer aufgenommen wird, wurden Derivate mit dem Ziel eines besseren Durchtritts der Blut-Hirn-Schranke durch gesteigerte Lipophilie hergestellt. Dadurch wäre zu erwarten gewesen, dass eine relativ große Menge der Derivate das Gehirn erreicht, um dort mittels Enzyme der Klasse EC 3, den Hydrolasen, in die wirksame Form, die Valerensäure, gespalten zu werden. Vergleichsweise wurden auch Derivate eingesetzt, deren Strukturen einen enzymatischen Angriff erschweren oder verhindern und Valerensäure dadurch in entsprechend geringer Menge im Gehirn nachweisbar sein sollte. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass im MS nur Valerensäure detektiert werden kann, da sich die Derivate nicht ausreichend ionisieren lassen und folglich keine Peaks zu finden waren [36]. Dadurch konnten nur Aussagen über die Konzentration von Valerensäure in Blutplasma und Gehirn getroffen werden. Aussagen über die Menge der potentiellen Prodrugs im Plasma verglichen mit deren Konzentration im Gehirn, also wieviel tatsächlich die Blut-Hirn-Schranke passiert und über andere möglicherweise anxiolytisch wirksame Abbauprodukte der Derivate im Gehirn, abgesehen von Valerensäure, gelingen mit der vorgestellten LC-MS/MS Methode nicht.

In der Praxis zeigten sich hohe Plasmakonzentrationen an Valerensäure, wenn diese als Reinsubstanz gegeben wurde und deutlich geringere Konzentrationen dieser Verbindung, wenn ihre Derivate zum Einsatz kamen (Abb. 27., s. S. 40), was durch die selektive Detektion von Valerensäure in der LC-MS/MS Analyse verständlich ist. Nur ein kleiner Teil der Derivate dürfte schon im Blut zu Valerensäure metabolisieren, wobei dies bei enzymatisch leichter zugänglichen Verbindungen, wie VB-f, verstärkt der Fall ist. Weiters sieht man in allen Fällen eine deutlich geringere Konzentration an Valerensäure, wenn man die Blutplasmaproben mit

den entsprechenden Gehirnproben vergleicht (vgl. Abb. 27., s. S. 40 und Abb. 28., s. S. 42). Jedoch bleibt auch im Gehirn die Valerensäure-Konzentration, wenn sie als Reinsubstanz gegeben wird, deutlich über den Konzentrationen, die aus den Derivaten gebildet werden (Abb. 28., s. S. 42). Wenn aber davon ausgegangen wird, dass die Derivate durch gesteigerte Lipophilie in höherer Konzentration im Gehirn aufgenommen werden, müssen neben der Valerensäure selbst auch andere Abbauprodukte der Derivate im Falle einer gesteigerten anxiolytischen *in-vivo* Wirkung verantwortlich sein. Es wäre aber auch möglich, dass die „Prodrugs“ selbst eine entsprechende Wirkung entfalten. Im Weiteren ist fraglich, welchen Einfluss auch andere Mechanismen zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke auf die Aufnahme der Derivate nehmen, da für Valerensäure bereits die passive Diffusion in Frage gestellt und eine Hypothese über ein unbekanntes Transportsystem erstellt wurde [18]. Um eine klare Aussage zu treffen, ist eine Methode, mit der auch die Derivate selbst nachgewiesen werden können, für weitergehende Untersuchungen unumgänglich.

Die Valerensäure-Konzentrationen aus den Derivaten ergaben im Gehirn in allen Fällen nur geringe Werte, oft knapp über oder an der Nachweisgrenze. Eine Überlegung war, dass sich bei der Entnahmetechnik 1 Restblut im Gehirn befinden und dies zu jenen ähnlich geringen Konzentrationen führen könnte. Im Zuge der Diplomarbeit wurde deshalb eine weitere Entnahmetechnik angewendet und Vergleichsproben zu Valerensäure und vielversprechenden Prodrugs gemacht. Gehirnproben mit der VB-i wurden nur nach der Entnahmetechnik 2 gewonnen. Tatsächlich nahmen die Werte, vergleicht man die Entnahmetechniken, ab (Abb. 30., s. S. 46). Wegen der geringen Probemengen und statistischer Ausreißer in dieser Gesamtheit, konnte allerdings kein Faktor ermittelt werden, mit dem die 144 Gehirnproben, entnommen nach der Entnahmetechnik 1, korrigiert werden könnten. Trotz des in Entnahmetechnik 2 vorgenommenen Spülvorgangs des Gehirns, blieb Valerensäure aber in allen Fällen nachweisbar. Daher wird Valerensäure offensichtlich ins Gehirn aufgenommen und liegt dort in detektierbarer Konzentration vor. Auch die Derivate gelangen ins Gehirn und wurden zum Teil (enzymatisch?) zu Valerensäure abgebaut. Der unverhältnismäßig große Konzentrationsunterschied zwischen VB-a und VB-f nach der

Entnahmetechnik 1, konnte durch die Entnahmetechnik 2 korrigiert werden (vgl. Abb. 28., s. S. 42 und Abb. 29., s. S. 43).

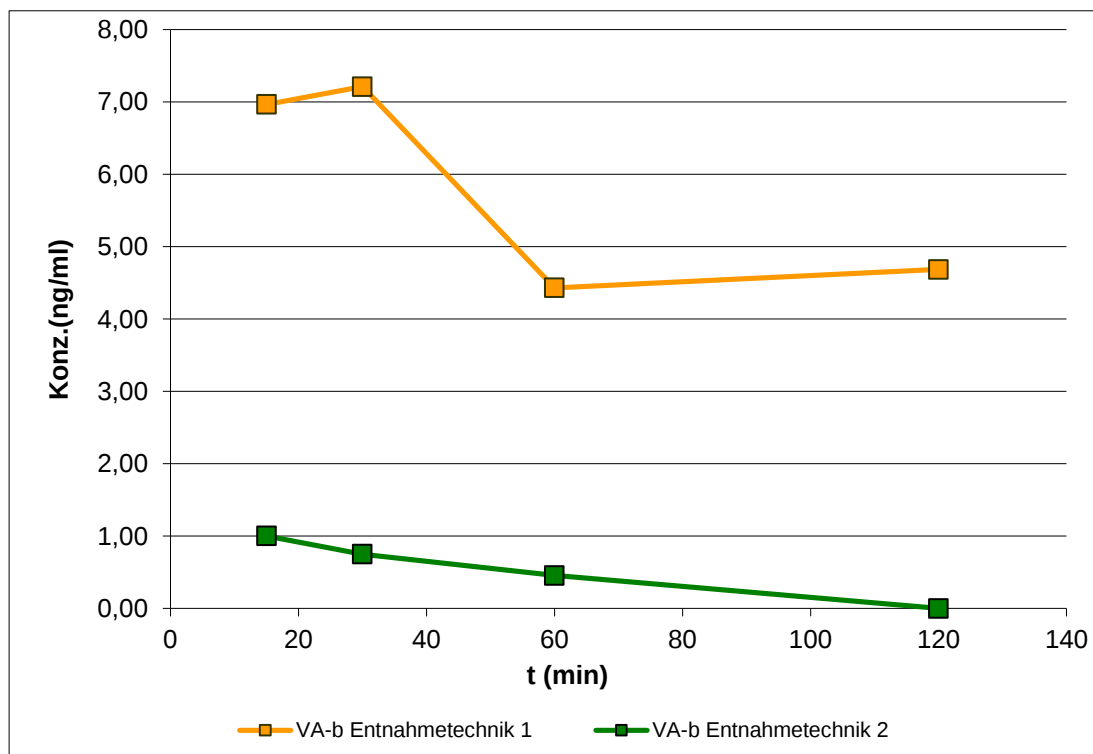


Abb. 30. Vergleich der Entnahmetechnik 1 und 2 des Gehirns anhand der Kinetikkurven von VB-a

Vergleicht man die Ergebnisse der Probenmessungen, so findet man eine starke Streuung der Werte bei den Tieren (n=4) selber Zeit und selber Substanz als große Unsicherheitsfaktoren (Abb. 31., s. S. 47). Hier müssten noch weitere Versuche gemacht werden, um über statistische Ausreißer entscheiden zu können. Die in dieser Diplomarbeit ermittelte LC-MS/MS Methode hingegen zeigte gut reproduzierbare Ergebnisse. Alle Proben wurden dreimal vermessen und zeigten hier sehr ähnliche Ergebnisse, was durch die geringe Standardabweichung ersichtlich wird (Abb. 32., s. S. 47). Abweichungen bei Geräteparametern und bei der Probenaufarbeitung könnten durch Verwendung des internen Standards weitgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden die Stammlösungen des internen Standard und der Valerensäure mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen, um fehlende Reproduzierbarkeit auszuschließen.

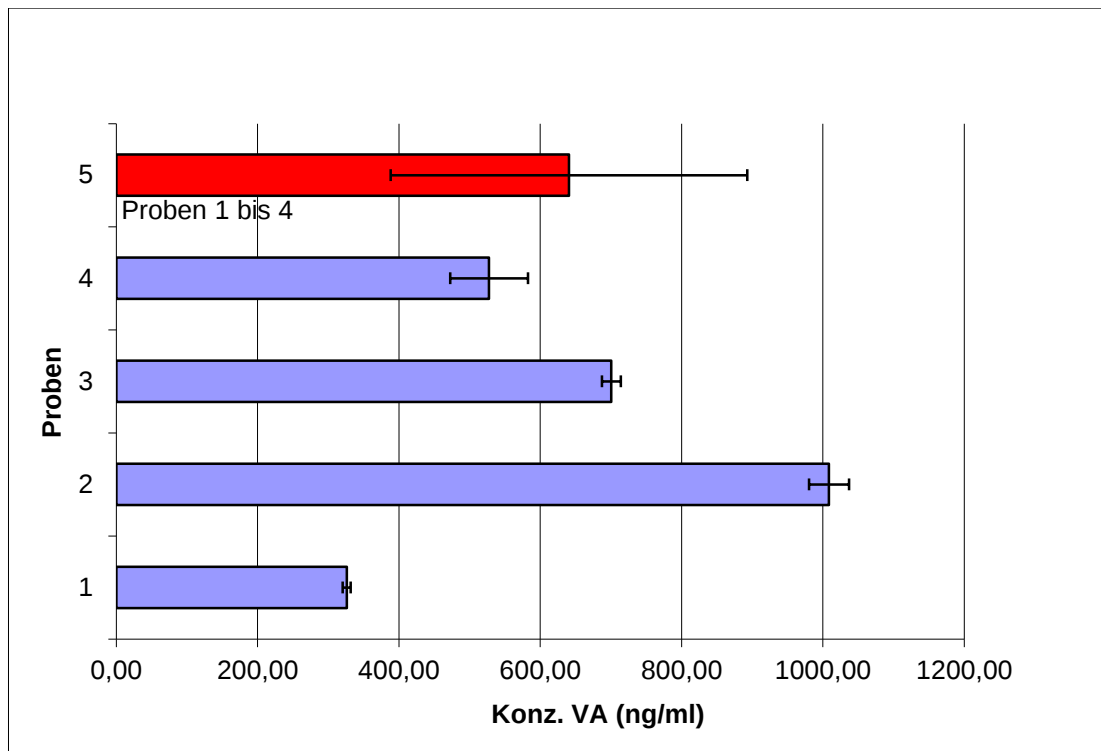


Abb. 31. Streuung der VA Plasmaproben nach 15 Minuten

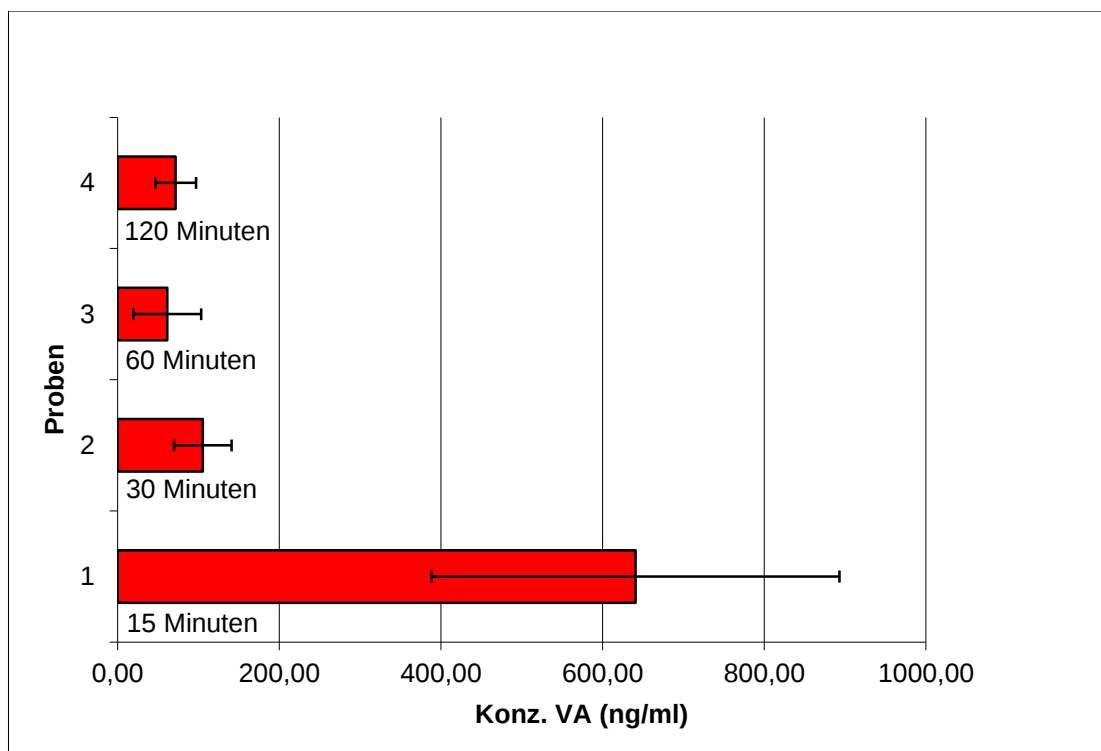


Abb. 32. Streuung der VA Plasmaproben nach 15, 30, 60 und 120 Minuten

Die Ergebnisse der Proben, die nach 15 Minuten entnommen wurden, zeigten in den meisten Fällen die höchsten Valerensäure-Konzentrationen,

spätestens aber nach 30 Minuten. Nach 60 Minuten war bei allen Proben deutlich weniger Valerensäure zu finden, wobei sich die Konzentration sich beim Zeitpunkt 120 Minuten nur unwesentlich ändert (Abb. 27. – 29., s. S. 40 ff). Daher stellt sich die Frage, ob statt bei 120 Minuten nicht schon wesentlich früher, bei 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten Proben entnommen werden sollten. Damit könnten aussagekräftigere Kinetikkurven gezeichnet werden und festgestellt werden, ob im Zeitpunkt 15 Minuten das Maximum erreicht ist oder dieses sich davor, zwischen 0 und 15 Minuten oder danach, zwischen 15 und 30 Minuten befindet. Aus den vorliegenden Kinetikkurven geht hervor, dass die Substanzen rasch an den Wirkort gelangen, der enzymatische Angriff zu einem frühen Zeitpunkt stattfindet, aber die Konzentrationen auch im weiteren zeitlichen Verlauf deutlich abnehmen.

Ein Problem stellte die Nachweisgrenze dar. Da die nachzuweisenden Konzentrationen äußerst gering waren, befanden sich viele Werte an oder unter der Nachweisgrenze, was eine exakte und reproduzierbare Quantifizierung erschwerte. Daher konnten hier keine genauen Ergebnisse, sehr wohl aber Trends abgeleitet werden. Somit konnte im Zuge der Diplomarbeit eine selektive LC-MS/MS Methode zum Nachweis von Valerensäure im Blutplasma und Gehirn von Mäusen gefunden werden. Dadurch steht für zukünftige Arbeiten zur Auffindung von Prodrugs von Valerensäure mit besserer anxiolytischer Wirkung eine empfindliche und selektive analytische Methode zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Valerensäure zeigt nachgewiesenermaßen eine angstlösende Wirkung. Da diese Substanz die Blut-Hirn-Schranke schlecht passieren kann, wurden lipophilere Derivate synthetisiert, von denen man sich höhere Konzentrationen am Wirkort und somit eine stärkere Wirkung *in-vivo* erwartete. Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der quantitativen Erfassung von Valerensäure in biologischen Matrices, wie Blutplasma und Gehirn von Mäusen, mittels LC-MS/MS Analyse. Damit sollten die vorliegenden Konzentrationen gemessen werden, um diese Ergebnisse mit *in-vivo* Versuchen zu korrelieren. 160 Plasmaproben und 224 Gehirnaproben wurden dazu von geklonten Mäusen, die alle dieselbe Konzentration von 3 mg/kg Valerensäure oder Derivaten bekommen hatten, nach 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten entnommen. Zur Aufarbeitung der Proben wurde eine entsprechende Methode optimiert, zur quantitativen Auswertung Eichgeraden erstellt und eine geeignete LC-MS/MS Methode entwickelt. Acetoxyvalerensäure wurde als geeigneter interner Standard ermittelt und verwendet. Valerensäure zeigte sowohl im Blutplasma als auch im Gehirn höhere Konzentrationen als die möglichen Prodrugs. Vergleicht man die Derivate untereinander, zeigten einzelne höhere Konzentrationen am Wirkort. Dadurch konnten vielversprechende Substanzen von vermutlich weniger wirksamen unterschieden werden. Alle vermessenen Substanzen zeigten schon nach 15 Minuten bzw. spätestens nach 30 Minuten ein Konzentrationsmaximum in den Kinetikkurven. Die Substanzen erreichen also rasch den Wirkort, werden aber auch schnell wieder abgebaut. Mit der vorgestellten LC-MS/MS Methode konnte eine ausgezeichnete Möglichkeit zur empfindlichen und selektiven Quantifizierung von Valerensäure in biologischen Matrices für weitergehende Untersuchungen erarbeitet werden.

6. Abstract

Valerenic acid, as has been proven, is well known as a potent anxiolytic active drug. The substance does not pass the blood-brain-barrier very well; so different, more lipophilic derivatives were synthesized. Higher concentrations at the target and an enhanced activity *in-vivo* were expected. This diploma thesis is concerned with the quantification of valerenic acid in biological matrices like blood plasma and the brain of mice by an LC-MS/MS analysis. Mass spectrometer data should supply data about concentrations to correlate with the outcomes of *in-vivo* attempts. 160 plasma samples and 224 brain samples of cloned mice were taken 15, 30, 60 or 120 minutes after delivering 3 mg/kg valerenic acid or a derivative each. For sample extraction a correspondent method was adapted, for quantification calibration curves were issued and a suitable LC-MS/MS method was generated. Acetoxyvalerenic acid was found to be an ideal internal standard. Concentrations of valerenic acid in plasma and brain samples were both higher than those of its possible prodrugs. Comparison of the derivatives showed increased concentrations of some compounds at target location. Therefore, potent substances could be distinguished from possible fewer promising ones. All studied substances showed their concentration maximum in kinetic curves after 15 minutes but no later than 30 minutes. So the substances reach target locations quickly, however they are decomposed quickly as well. With the described LC-MS/MS method, an ideal possibility for sensitive and selective quantification of valerenic acid in biological matrices for further investigations was found.

7. Anhang

Tab. 13. Ergebnisse der Plasmaproben aus dreifacher Vermessung je Probe pro Zeitpunkt

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 15 min	Probe Plasma 1	1,69E+04	3,82E+04	320,06	326,03	640,71
VA 15 min	Probe Plasma 1	1,04E+04	2,32E+04	324,32		
VA 15 min	Probe Plasma 1	9,04E+03	1,96E+04	333,72		
VA 15 min	Probe Plasma 2	5,86E+04	4,15E+04	1023,81	1008,62	
VA 15 min	Probe Plasma 2	3,22E+04	2,26E+04	1033,05		
VA 15 min	Probe Plasma 2	2,78E+04	2,08E+04	969,00		
VA 15 min	Probe Plasma 3	5,30E+04	5,49E+04	699,63	700,62	
VA 15 min	Probe Plasma 3	2,90E+04	2,93E+04	717,32		
VA 15 min	Probe Plasma 3	2,41E+04	2,55E+04	684,90		
VA 15 min	Probe Plasma 4	3,10E+04	3,71E+04	605,42	527,57	
VA 15 min	Probe Plasma 4	1,70E+04	2,49E+04	494,48		
VA 15 min	Probe Plasma 4	1,52E+04	2,28E+04	482,82		
VA 30 min	Probe Plasma 5	3,34E+03	2,61E+04	91,85	89,37	105,21
VA 30 min	Probe Plasma 5	3,39E+03	2,46E+04	98,99		
VA 30 min	Probe Plasma 5	3,00E+03	2,78E+04	77,29		
VA 30 min	Probe Plasma 6	5,97E+03	3,40E+04	126,41	148,70	
VA 30 min	Probe Plasma 6	5,11E+03	2,42E+04	152,22		
VA 30 min	Probe Plasma 6	4,62E+03	1,99E+04	167,47		
VA 30 min	Probe Plasma 7	4,93E+03	2,90E+04	122,35	124,36	
VA 30 min	Probe Plasma 7	4,61E+03	2,63E+04	126,19		
VA 30 min	Probe Plasma 7	4,10E+03	2,37E+04	124,53		
VA 30 min	Probe Plasma 8	2,31E+03	2,78E+04	59,28	58,41	
VA 30 min	Probe Plasma 8	2,09E+03	2,57E+04	57,99		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 30 min	Probe Plasma 8	1,78E+03	2,19E+04	57,96		
VA 60 min	Probe Plasma 9	2,08E+03	2,59E+04	57,26	56,99	61,32
VA 60 min	Probe Plasma 9	2,06E+03	2,57E+04	57,14		
VA 60 min	Probe Plasma 9	1,77E+03	2,23E+04	56,58		
VA 60 min	Probe Plasma 10	1,24E+03	2,69E+04	32,43	29,02	
VA 60 min	Probe Plasma 10	1,05E+03	2,73E+04	26,88		
VA 60 min	Probe Plasma 10	9,68E+02	2,44E+04	27,76		
VA 60 min	Probe Plasma 11	1,09E+03	2,60E+04	29,40	28,45	
VA 60 min	Probe Plasma 11	1,00E+03	2,52E+04	27,77		
VA 60 min	Probe Plasma 11	9,02E+02	2,24E+04	28,19		
VA 60 min	Probe Plasma 12	4,75E+03	2,51E+04	136,32	130,80	
VA 60 min	Probe Plasma 12	4,44E+03	2,49E+04	128,39		
VA 60 min	Probe Plasma 12	3,76E+03	2,12E+04	127,69		
VA 120 min	Probe Plasma 13	2,24E+03	2,63E+04	60,78	62,08	71,77
VA 120 min	Probe Plasma 13	2,11E+03	2,34E+04	64,41		
VA 120 min	Probe Plasma 13	1,89E+03	2,21E+04	61,04		
VA 120 min	Probe Plasma 14	1,44E+03	2,61E+04	39,01	36,58	
VA 120 min	Probe Plasma 14	1,34E+03	2,49E+04	38,03		
VA 120 min	Probe Plasma 14	1,25E+03	2,69E+04	32,70		
VA 120 min	Probe Plasma 15	3,17E+03	2,53E+04	89,91	86,15	
VA 120 min	Probe Plasma 15	3,05E+03	2,55E+04	85,78		
VA 120 min	Probe Plasma 15	2,69E+03	2,33E+04	82,76		
VA 120 min	Probe Plasma 16	3,62E+03	2,47E+04	105,34	102,27	
VA 120 min	Probe Plasma 16	3,36E+03	2,43E+04	99,32		
VA 120 min	Probe Plasma 16	3,00E+03	2,11E+04	102,16		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 15 min	Probe Plasma 17	1,81E+03	1,76E+04	73,61	98,18	117,41
VB-a 15 min	Probe Plasma 17	2,66E+03	1,66E+04	115,27		
VB-a 15 min	Probe Plasma 17	2,22E+03	1,51E+04	105,67		
VB-a 15 min	Probe Plasma 18	3,71E+03	2,03E+04	131,61	124,08	
VB-a 15 min	Probe Plasma 18	2,85E+03	1,74E+04	117,85		
VB-a 15 min	Probe Plasma 18	2,61E+03	1,53E+04	122,78		
VB-a 15 min	Probe Plasma 19	2,65E+03	8,60E+03	222,61	158,03	
VB-a 15 min	Probe Plasma 19	3,21E+03	1,86E+04	124,22		
VB-a 15 min	Probe Plasma 19	2,74E+03	1,55E+04	127,27		
VB-a 15 min	Probe Plasma 20	2,00E+03	1,33E+04	108,11	89,35	
VB-a 15 min	Probe Plasma 20	1,76E+03	1,59E+04	79,31		
VB-a 15 min	Probe Plasma 20	1,62E+03	1,44E+04	80,62		
VB-a 30 min	Probe Plasma 21	1,80E+03	1,64E+04	78,63	65,39	84,12
VB-a 30 min	Probe Plasma 21	1,41E+03	1,74E+04	57,78		
VB-a 30 min	Probe Plasma 21	1,29E+03	1,54E+04	59,77		
VB-a 30 min	Probe Plasma 22	2,80E+03	1,60E+04	125,98	112,91	
VB-a 30 min	Probe Plasma 22	2,39E+03	1,56E+04	110,16		
VB-a 30 min	Probe Plasma 22	1,97E+03	1,38E+04	102,58		
VB-a 30 min	Probe Plasma 23	1,72E+03	1,58E+04	77,98	66,73	
VB-a 30 min	Probe Plasma 23	1,30E+03	1,57E+04	59,07		
VB-a 30 min	Probe Plasma 23	1,22E+03	1,38E+04	63,13		
VB-a 30 min	Probe Plasma 24	1,93E+03	1,70E+04	81,37	91,46	
VB-a 30 min	Probe Plasma 24	2,18E+03	1,75E+04	89,38		
VB-a 30 min	Probe Plasma 24	1,99E+03	1,38E+04	103,63		
VB-a 60 min	Probe Plasma 25	6,49E+02	1,53E+04	29,76	27,27	20,17

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 60 min	Probe Plasma 25	4,92E+02	1,44E+04	23,77		
VB-a 60 min	Probe Plasma 25	5,33E+02	1,32E+04	28,28		
VB-a 60 min	Probe Plasma 26	8,37E+02	1,98E+04	29,65	28,22	
VB-a 60 min	Probe Plasma 26	5,32E+02	1,45E+04	25,60		
VB-a 60 min	Probe Plasma 26	5,62E+02	1,34E+04	29,41		
VB-a 60 min	Probe Plasma 27	4,28E+02	1,95E+04	14,90	13,58	
VB-a 60 min	Probe Plasma 27	2,78E+02	1,49E+04	12,51		
VB-a 60 min	Probe Plasma 27	2,81E+02	1,42E+04	13,33		
VB-a 60 min	Probe Plasma 28	3,79E+02	2,01E+04	12,65	11,61	
VB-a 60 min	Probe Plasma 28	2,89E+02	1,68E+04	11,45		
VB-a 60 min	Probe Plasma 28	2,59E+02	1,60E+04	10,72		
VB-a 120 min	Probe Plasma 29	4,60E+02	1,71E+04	18,49	16,61	21,76
VB-a 120 min	Probe Plasma 29	3,87E+02	1,66E+04	15,89		
VB-a 120 min	Probe Plasma 29	3,77E+02	1,66E+04	15,45		
VB-a 120 min	Probe Plasma 30	6,79E+02	1,97E+04	23,98	24,84	
VB-a 120 min	Probe Plasma 30	6,13E+02	1,65E+04	25,93		
VB-a 120 min	Probe Plasma 30	5,51E+02	1,56E+04	24,60		
VB-a 120 min	Probe Plasma 31	3,55E+02	1,82E+04	13,13	15,19	
VB-a 120 min	Probe Plasma 31	3,46E+02	1,58E+04	14,86		
VB-a 120 min	Probe Plasma 31	3,54E+02	1,38E+04	17,59		
VB-a 120 min	Probe Plasma 32	8,10E+02	1,88E+04	30,24	30,39	
VB-a 120 min	Probe Plasma 32	6,31E+02	1,59E+04	27,77		
VB-a 120 min	Probe Plasma 32	6,83E+02	1,45E+04	33,16		
VB-b 15 min	Probe Plasma 33	6,67E+03	3,88E+04	123,74	128,46	103,83
VB-b 15 min	Probe Plasma 33	7,47E+03	4,15E+04	129,61		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 15 min	Probe Plasma 33	7,37E+03	4,02E+04	132,03		
VB-b 15 min	Probe Plasma 34	4,24E+03	4,02E+04	75,52	69,55	
VB-b 15 min	Probe Plasma 34	4,39E+03	4,50E+04	69,77		
VB-b 15 min	Probe Plasma 34	4,25E+03	4,79E+04	63,37		
VB-b 15 min	Probe Plasma 35	7,66E+03	4,29E+04	128,56	123,73	
VB-b 15 min	Probe Plasma 35	7,94E+03	4,54E+04	125,90		
VB-b 15 min	Probe Plasma 35	6,96E+03	4,29E+04	116,72		
VB-b 15 min	Probe Plasma 36	6,16E+03	4,79E+04	92,31	93,59	
VB-b 15 min	Probe Plasma 36	6,29E+03	4,77E+04	94,67		
VB-b 15 min	Probe Plasma 36	6,31E+03	4,83E+04	93,79		
VB-b 30 min	Probe Plasma 37	6,31E+03	3,93E+04	115,50	100,44	77,23
VB-b 30 min	Probe Plasma 37	5,69E+03	4,27E+04	95,68		
VB-b 30 min	Probe Plasma 37	5,59E+03	4,45E+04	90,14		
VB-b 30 min	Probe Plasma 38	1,72E+03	4,39E+04	27,41	28,26	
VB-b 30 min	Probe Plasma 38	1,77E+03	4,36E+04	28,43		
VB-b 30 min	Probe Plasma 38	1,80E+03	4,36E+04	28,93		
VB-b 30 min	Probe Plasma 39	4,91E+03	4,38E+04	80,33	79,58	
VB-b 30 min	Probe Plasma 39	5,09E+03	4,15E+04	87,99		
VB-b 30 min	Probe Plasma 39	4,45E+03	4,52E+04	70,42		
VB-b 30 min	Probe Plasma 40	6,42E+03	4,39E+04	105,11	100,66	
VB-b 30 min	Probe Plasma 40	6,00E+03	4,43E+04	97,27		
VB-b 30 min	Probe Plasma 40	5,92E+03	4,27E+04	99,59		
VB-b 60 min	Probe Plasma 41	2,33E+03	4,50E+04	36,55	31,89	44,40
VB-b 60 min	Probe Plasma 41	2,23E+03	4,86E+04	32,27		
VB-b 60 min	Probe Plasma 41	1,89E+03	4,92E+04	26,85		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 60 min	Probe Plasma 42	2,10E+03	3,02E+04	49,44	42,52	
VB-b 60 min	Probe Plasma 42	1,84E+03	3,16E+04	41,23		
VB-b 60 min	Probe Plasma 42	1,74E+03	3,33E+04	36,89		
VB-b 60 min	Probe Plasma 43	4,37E+03	3,96E+04	79,06	64,90	
VB-b 60 min	Probe Plasma 43	3,34E+03	3,99E+04	59,72		
VB-b 60 min	Probe Plasma 43	3,53E+03	4,50E+04	55,90		
VB-b 60 min	Probe Plasma 44	2,25E+03	3,95E+04	40,31	38,29	
VB-b 60 min	Probe Plasma 44	2,08E+03	3,59E+04	41,02		
VB-b 60 min	Probe Plasma 44	2,02E+03	4,24E+04	33,55		
VB-b 120 min	Probe Plasma 45	7,34E+02	4,35E+04	11,22	11,91	14,14
VB-b 120 min	Probe Plasma 45	8,62E+02	4,73E+04	12,20		
VB-b 120 min	Probe Plasma 45	7,65E+02	4,16E+04	12,32		
VB-b 120 min	Probe Plasma 46	9,96E+02	4,39E+04	15,44	13,69	
VB-b 120 min	Probe Plasma 46	8,04E+02	4,54E+04	11,82		
VB-b 120 min	Probe Plasma 46	1,03E+03	5,04E+04	13,80		
VB-b 120 min	Probe Plasma 47	1,11E+03	4,29E+04	17,75	15,61	
VB-b 120 min	Probe Plasma 47	1,10E+03	4,71E+04	15,92		
VB-b 120 min	Probe Plasma 47	9,63E+02	4,92E+04	13,18		
VB-b 120 min	Probe Plasma 48	1,09E+03	4,64E+04	16,02	15,36	
VB-b 120 min	Probe Plasma 48	1,03E+03	4,62E+04	15,15		
VB-b 120 min	Probe Plasma 48	1,12E+03	5,10E+04	14,91		
VB-c 15 min	Probe Plasma 49	6,47E+02	5,28E+04	7,86	9,76	8,22
VB-c 15 min	Probe Plasma 49	5,53E+02	4,35E+04	8,20		
VB-c 15 min	Probe Plasma 49	7,75E+02	3,95E+04	13,21		
VB-c 15 min	Probe Plasma 50	3,03E+02	3,75E+04	4,83	3,80	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-c 15 min	Probe Plasma 50	1,44E+02	3,44E+04	2,01		
VB-c 15 min	Probe Plasma 50	2,92E+02	3,80E+04	4,55		
VB-c 15 min	Probe Plasma 51	5,73E+02	4,27E+04	8,71	9,48	
VB-c 15 min	Probe Plasma 51	5,15E+02	4,08E+04	8,13		
VB-c 15 min	Probe Plasma 51	7,02E+02	4,03E+04	11,61		
VB-c 15 min	Probe Plasma 52	7,83E+02	4,47E+04	11,68	9,83	
VB-c 15 min	Probe Plasma 52	3,97E+02	4,01E+04	6,15		
VB-c 15 min	Probe Plasma 52	7,79E+02	4,46E+04	11,65		
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/2	4,73E+02	5,09E+04	5,71	5,25	6,28
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/2	3,90E+02	5,12E+04	4,50		
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/2	3,83E+02	4,24E+04	5,53		
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/1	2,29E+02	2,03E+04	7,16	5,35	
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/1	1,85E+02	2,22E+04	5,02		
VB-c 30 min	Probe Plasma 53/1	1,47E+02	2,18E+04	3,86		
VB-c 30 min	Probe Plasma 54	6,42E+02	4,00E+04	10,62	9,26	
VB-c 30 min	Probe Plasma 54	6,37E+02	4,25E+04	9,85		
VB-c 30 min	Probe Plasma 54	5,47E+02	4,75E+04	7,33		
VB-c 30 min	Probe Plasma 55	5,39E+02	3,19E+04	11,23	7,59	
VB-c 30 min	Probe Plasma 55	4,09E+02	3,90E+04	6,58		
VB-c 30 min	Probe Plasma 55	2,91E+02	3,52E+04	4,97		
VB-c 30 min	Probe Plasma 56	3,45E+02	4,51E+04	4,52	3,96	
VB-c 30 min	Probe Plasma 56	3,19E+02	4,82E+04	3,77		
VB-c 30 min	Probe Plasma 56	3,21E+02	5,05E+04	3,58		
VB-c 60 min	Probe Plasma 57	3,51E+02	4,36E+04	4,81	2,12	2,93
VB-c 60 min	Probe Plasma 57	9,56E+01	5,08E+04	0,34		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-c 60 min	Probe Plasma 57	1,62E+02	5,23E+04	1,22		
VB-c 60 min	Probe Plasma 58	4,30E+02	3,91E+04	6,95	4,20	
VB-c 60 min	Probe Plasma 58	3,10E+02	3,92E+04	4,71		
VB-c 60 min	Probe Plasma 58	9,58E+01	3,54E+04	0,93		
VB-c 60 min	Probe Plasma 59	3,90E+02	4,31E+04	5,54	3,09	
VB-c 60 min	Probe Plasma 59	2,38E+02	4,19E+04	3,09		
VB-c 60 min	Probe Plasma 59	8,40E+01	3,64E+04	0,64		
VB-c 60 min	Probe Plasma 60	3,33E+02	4,59E+04	4,23	2,30	
VB-c 60 min	Probe Plasma 60	1,53E+02	4,96E+04	1,21		
VB-c 60 min	Probe Plasma 60	1,80E+02	5,22E+04	1,47		
VB-c 120 min	Probe Plasma 61	3,40E+02	4,04E+04	5,08	4,12	4,10
VB-c 120 min	Probe Plasma 61	2,85E+02	4,05E+04	4,08		
VB-c 120 min	Probe Plasma 61	2,36E+02	4,04E+04	3,21		
VB-c 120 min	Probe Plasma 62	4,11E+02	4,58E+04	5,48	4,02	
VB-c 120 min	Probe Plasma 62	3,56E+02	4,63E+04	4,55		
VB-c 120 min	Probe Plasma 62	2,14E+02	5,08E+04	2,03		
VB-c 120 min	Probe Plasma 63	3,51E+02	4,07E+04	5,23	3,57	
VB-c 120 min	Probe Plasma 63	1,83E+02	4,06E+04	2,24		
VB-c 120 min	Probe Plasma 63	2,39E+02	4,06E+04	3,24		
VB-c 120 min	Probe Plasma 64	3,25E+02	4,21E+04	4,57	4,68	
VB-c 120 min	Probe Plasma 64	2,91E+02	4,17E+04	4,03		
VB-c 120 min	Probe Plasma 64	3,30E+02	3,70E+04	5,44		
VB-d 15 min	Probe Plasma 65	5,83E+03	2,73E+04	153,96	159,03	166,45
VB-d 15 min	Probe Plasma 65	7,12E+03	3,29E+04	156,04		
VB-d 15 min	Probe Plasma 65	8,27E+03	3,57E+04	167,10		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-d 15 min	Probe Plasma 66	8,06E+03	3,34E+04	174,11	169,54	
VB-d 15 min	Probe Plasma 66	9,86E+03	4,01E+04	177,43		
VB-d 15 min	Probe Plasma 66	1,05E+04	4,82E+04	157,07		
VB-d 15 min	Probe Plasma 67	6,27E+03	2,92E+04	154,81	146,87	
VB-d 15 min	Probe Plasma 67	7,64E+03	3,65E+04	150,89		
VB-d 15 min	Probe Plasma 67	7,68E+03	4,10E+04	134,92		
VB-d 15 min	Probe Plasma 68	8,23E+03	3,06E+04	194,17	190,36	
VB-d 15 min	Probe Plasma 68	8,84E+03	3,35E+04	190,49		
VB-d 15 min	Probe Plasma 68	9,97E+03	3,86E+04	186,43		
VB-d 30 min	Probe Plasma 69	2,91E+03	2,75E+04	75,77	72,88	80,36
VB-d 30 min	Probe Plasma 69	3,61E+03	3,58E+04	72,16		
VB-d 30 min	Probe Plasma 69	3,43E+03	3,47E+04	70,71		
VB-d 30 min	Probe Plasma 70	1,75E+03	2,72E+04	45,66	43,25	
VB-d 30 min	Probe Plasma 70	2,04E+03	3,39E+04	42,64		
VB-d 30 min	Probe Plasma 70	2,16E+03	3,69E+04	41,45		
VB-d 30 min	Probe Plasma 71	1,44E+03	2,65E+04	38,41	38,80	
VB-d 30 min	Probe Plasma 71	1,72E+03	3,28E+04	37,03		
VB-d 30 min	Probe Plasma 71	2,02E+03	3,49E+04	40,98		
VB-d 30 min	Probe Plasma 72	6,49E+03	2,57E+04	182,25	166,50	
VB-d 30 min	Probe Plasma 72	7,20E+03	3,42E+04	151,76		
VB-d 30 min	Probe Plasma 72	7,80E+03	3,40E+04	165,47		
VB-d 60 min	Probe Plasma 73	4,48E+02	3,32E+04	8,76	7,16	11,03
VB-d 60 min	Probe Plasma 73	4,14E+02	4,06E+04	6,37		
VB-d 60 min	Probe Plasma 73	4,62E+02	4,54E+04	6,35		
VB-d 60 min	Probe Plasma 74	7,26E+02	3,32E+04	14,84	14,59	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-d 60 min	Probe Plasma 74	9,01E+02	4,31E+04	14,14		
VB-d 60 min	Probe Plasma 74	9,46E+02	4,34E+04	14,79		
VB-d 60 min	Probe Plasma 75	5,45E+02	3,24E+04	11,18	11,54	
VB-d 60 min	Probe Plasma 75	7,71E+02	3,78E+04	13,77		
VB-d 60 min	Probe Plasma 75	6,96E+02	4,72E+04	9,67		
VB-d 60 min	Probe Plasma 76	5,51E+02	2,96E+04	12,48	10,84	
VB-d 60 min	Probe Plasma 76	4,16E+02	3,69E+04	7,15		
VB-d 60 min	Probe Plasma 76	6,98E+02	3,64E+04	12,89		
VB-d 120 min	Probe Plasma 77	4,50E+02	3,61E+04	8,02	7,08	11,68
VB-d 120 min	Probe Plasma 77	4,07E+02	3,99E+04	6,37		
VB-d 120 min	Probe Plasma 77	4,71E+02	4,34E+04	6,85		
VB-d 120 min	Probe Plasma 78	7,36E+02	3,61E+04	13,77	14,16	
VB-d 120 min	Probe Plasma 78	8,30E+02	3,83E+04	14,70		
VB-d 120 min	Probe Plasma 78	8,83E+02	4,26E+04	14,01		
VB-d 120 min	Probe Plasma 79	6,31E+02	3,37E+04	12,56	11,73	
VB-d 120 min	Probe Plasma 79	7,50E+02	4,24E+04	11,81		
VB-d 120 min	Probe Plasma 79	6,66E+02	4,08E+04	10,82		
VB-d 120 min	Probe Plasma 80	5,98E+02	2,92E+04	13,83	13,75	
VB-d 120 min	Probe Plasma 80	7,10E+02	3,37E+04	14,26		
VB-d 120 min	Probe Plasma 80	7,16E+02	3,66E+04	13,17		
VB-e 15 min	Probe Plasma 81	2,86E+02	4,23E+04	3,88	3,90	2,51
VB-e 15 min	Probe Plasma 81	2,72E+02	3,90E+04	4,03		
VB-e 15 min	Probe Plasma 81	2,76E+02	4,16E+04	3,78		
VB-e 15 min	Probe Plasma 82	2,03E+02	1,02E+05	0,41	0,27	
VB-e 15 min	Probe Plasma 82	1,73E+02	1,03E+05	0,19		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-e 15 min	Probe Plasma 82	1,79E+02	1,06E+05	0,19		
VB-e 15 min	Probe Plasma 83	2,20E+02	3,90E+04	3,06	2,85	
VB-e 15 min	Probe Plasma 83	2,23E+02	3,67E+04	3,38		
VB-e 15 min	Probe Plasma 83	1,68E+02	3,87E+04	2,12		
VB-e 15 min	Probe Plasma 84	2,83E+02	3,62E+04	4,64	3,03	
VB-e 15 min	Probe Plasma 84	1,61E+02	3,80E+04	2,04		
VB-e 15 min	Probe Plasma 84	1,87E+02	3,97E+04	2,39		
VB-e 30 min	Probe Plasma 85	2,16E+02	4,48E+04	2,47	2,08	1,95
VB-e 30 min	Probe Plasma 85	1,84E+02	4,85E+04	1,72		
VB-e 30 min	Probe Plasma 85	2,04E+02	4,79E+04	2,06		
VB-e 30 min	Probe Plasma 86	1,10E+02	4,24E+04	0,85	1,73	
VB-e 30 min	Probe Plasma 86	2,07E+02	4,14E+04	2,60		
VB-e 30 min	Probe Plasma 86	1,58E+02	4,15E+04	1,73		
VB-e 30 min	Probe Plasma 87	1,88E+02	3,86E+04	2,50	1,64	
VB-e 30 min	Probe Plasma 87	1,11E+02	3,70E+04	1,15		
VB-e 30 min	Probe Plasma 87	1,24E+02	3,92E+04	1,27		
VB-e 30 min	Probe Plasma 88	2,44E+02	4,49E+04	2,91	2,34	
VB-e 30 min	Probe Plasma 88	1,96E+02	4,35E+04	2,24		
VB-e 30 min	Probe Plasma 88	1,57E+02	3,94E+04	1,86		
VB-e 60 min	Probe Plasma 89	2,21E+02	4,69E+04	2,39	1,03	1,71
VB-e 60 min	Probe Plasma 89	8,65E+01	4,26E+04	0,44		
VB-e 60 min	Probe Plasma 89	7,91E+01	4,45E+04	0,26		
VB-e 60 min	Probe Plasma 90	1,88E+02	4,48E+04	2,01	1,66	
VB-e 60 min	Probe Plasma 90	1,63E+02	4,33E+04	1,70		
VB-e 60 min	Probe Plasma 90	1,37E+02	4,32E+04	1,27		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-e 60 min	Probe Plasma 91	2,01E+02	4,03E+04	2,59	1,47	
VB-e 60 min	Probe Plasma 91	1,19E+02	4,40E+04	0,93		
VB-e 60 min	Probe Plasma 91	1,15E+02	4,38E+04	0,87		
VB-e 60 min	Probe Plasma 92	8,48E+01	4,01E+04	0,50	2,70	
VB-e 60 min	Probe Plasma 92	3,53E+02	3,98E+04	5,41		
VB-e 60 min	Probe Plasma 92	1,83E+02	4,14E+04	2,18		
VB-e 120 min	Probe Plasma 93	2,29E+02	3,54E+04	3,66	2,34	1,85
VB-e 120 min	Probe Plasma 93	1,21E+02	3,36E+04	1,58		
VB-e 120 min	Probe Plasma 93	1,45E+02	3,75E+04	1,78		
VB-e 120 min	Probe Plasma 94	2,31E+02	3,59E+04	3,64	2,15	
VB-e 120 min	Probe Plasma 94	1,35E+02	4,00E+04	1,42		
VB-e 120 min	Probe Plasma 94	1,35E+02	4,06E+04	1,38		
VB-e 120 min	Probe Plasma 95	2,05E+02	5,27E+04	1,79	1,28	
VB-e 120 min	Probe Plasma 95	1,78E+02	4,90E+04	1,61		
VB-e 120 min	Probe Plasma 95	1,02E+02	5,00E+04	0,45		
VB-e 120 min	Probe Plasma 96	1,11E+02	4,20E+04	0,89	1,64	
VB-e 120 min	Probe Plasma 96	1,61E+02	4,46E+04	1,59		
VB-e 120 min	Probe Plasma 96	2,15E+02	4,49E+04	2,44		
VB-f 15 min	Probe Plasma 97	2,35E+04	5,44E+04	312,50	312,96	164,23
VB-f 15 min	Probe Plasma 97	2,04E+04	4,81E+04	306,78		
VB-f 15 min	Probe Plasma 97	2,01E+04	4,55E+04	319,59		
VB-f 15 min	Probe Plasma 98	1,01E+04	4,84E+04	150,42	144,29	
VB-f 15 min	Probe Plasma 98	9,02E+03	4,68E+04	138,85		
VB-f 15 min	Probe Plasma 98	8,39E+03	4,21E+04	143,61		
VB-f 15 min	Probe Plasma 99	5,04E+03	5,16E+04	69,86	70,38	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 15 min	Probe Plasma 99	4,51E+03	4,66E+04	69,21		
VB-f 15 min	Probe Plasma 99	4,23E+03	4,20E+04	72,07		
VB-f 15 min	Probe Plasma 100	9,02E+03	4,94E+04	131,49	129,29	
VB-f 15 min	Probe Plasma 100	7,81E+03	4,50E+04	124,93		
VB-f 15 min	Probe Plasma 100	8,16E+03	4,47E+04	131,46		
VB-f 30 min	Probe Plasma 101	5,47E+03	4,89E+04	80,16	80,92	76,70
VB-f 30 min	Probe Plasma 101	5,10E+03	4,54E+04	80,50		
VB-f 30 min	Probe Plasma 101	5,04E+03	4,40E+04	82,10		
VB-f 30 min	Probe Plasma 102	3,48E+03	4,85E+04	51,05	52,51	
VB-f 30 min	Probe Plasma 102	3,43E+03	4,50E+04	54,29		
VB-f 30 min	Probe Plasma 102	3,19E+03	4,35E+04	52,19		
VB-f 30 min	Probe Plasma 103	5,45E+03	4,98E+04	78,40	128,88	
VB-f 30 min	Probe Plasma 103	5,21E+03	2,34E+04	160,56		
VB-f 30 min	Probe Plasma 103	5,43E+03	2,65E+04	147,69		
VB-f 30 min	Probe Plasma 104	2,82E+03	4,63E+04	43,17	44,50	
VB-f 30 min	Probe Plasma 104	2,97E+03	4,27E+04	49,45		
VB-f 30 min	Probe Plasma 104	2,61E+03	4,52E+04	40,88		
VB-f 60 min	Probe Plasma 105	1,05E+03	4,84E+04	14,71	13,82	24,21
VB-f 60 min	Probe Plasma 105	1,00E+03	4,29E+04	15,89		
VB-f 60 min	Probe Plasma 105	7,02E+02	4,28E+04	10,87		
VB-f 60 min	Probe Plasma 106	2,23E+03	4,43E+04	35,50	33,32	
VB-f 60 min	Probe Plasma 106	1,95E+03	4,30E+04	31,88		
VB-f 60 min	Probe Plasma 106	2,07E+03	4,47E+04	32,58		
VB-f 60 min	Probe Plasma 107	1,60E+03	4,41E+04	25,30	19,83	
VB-f 60 min	Probe Plasma 107	1,07E+03	4,10E+04	17,91		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 60 min	Probe Plasma 107	9,58E+02	4,02E+04	16,27		
VB-f 60 min	Probe Plasma 108	1,46E+03	3,35E+04	30,60	29,86	
VB-f 60 min	Probe Plasma 108	1,44E+03	3,06E+04	33,12		
VB-f 60 min	Probe Plasma 108	1,20E+03	3,24E+04	25,85		
VB-f 120 min	Probe Plasma 109	1,99E+03	3,89E+04	36,10	36,66	26,55
VB-f 120 min	Probe Plasma 109	1,75E+03	3,62E+04	34,06		
VB-f 120 min	Probe Plasma 109	2,15E+03	3,82E+04	39,82		
VB-f 120 min	Probe Plasma 110	1,70E+03	4,59E+04	25,85	25,70	
VB-f 120 min	Probe Plasma 110	1,61E+03	4,33E+04	25,96		
VB-f 120 min	Probe Plasma 110	1,64E+03	4,52E+04	25,30		
VB-f 120 min	Probe Plasma 111	1,50E+03	4,62E+04	22,53	21,18	
VB-f 120 min	Probe Plasma 111	1,48E+03	4,25E+04	24,24		
VB-f 120 min	Probe Plasma 111	1,10E+03	4,49E+04	16,75		
VB-f 120 min	Probe Plasma 112	8,77E+02	3,25E+04	18,55	22,66	
VB-f 120 min	Probe Plasma 112	8,83E+02	3,10E+04	19,64		
VB-f 120 min	Probe Plasma 112	9,85E+02	2,32E+04	29,78		
VB-g 15 min	Probe Plasma 113	2,87E+02	4,30E+04	3,81	3,57	2,47
VB-g 15 min	Probe Plasma 113	3,19E+02	4,62E+04	3,98		
VB-g 15 min	Probe Plasma 113	2,58E+02	4,76E+04	2,90		
VB-g 15 min	Probe Plasma 114	1,96E+02	3,92E+04	2,60	2,62	
VB-g 15 min	Probe Plasma 114	1,27E+02	4,49E+04	1,02		
VB-g 15 min	Probe Plasma 114	3,26E+02	4,50E+04	4,23		
VB-g 15 min	Probe Plasma 115	2,48E+02	4,74E+04	2,77	1,52	
VB-g 15 min	Probe Plasma 115	1,90E+02	4,87E+04	1,80		
VB-g 15 min	Probe Plasma 115	6,55E+01	4,77E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-g 15 min	Probe Plasma 116	2,30E+02	3,77E+04	3,40	2,19	
VB-g 15 min	Probe Plasma 116	2,05E+02	4,02E+04	2,67		
VB-g 15 min	Probe Plasma 116	9,34E+01	4,39E+04	0,51		
VB-g 30 min	Probe Plasma 117	1,61E+02	3,80E+04	2,04	1,16	1,33
VB-g 30 min	Probe Plasma 117	7,90E+01	3,90E+04	0,44		
VB-g 30 min	Probe Plasma 117	1,19E+02	4,25E+04	1,00		
VB-g 30 min	Probe Plasma 118	6,82E+01	4,08E+04	0,18	1,00	
VB-g 30 min	Probe Plasma 118	1,38E+02	4,32E+04	1,29		
VB-g 30 min	Probe Plasma 118	1,58E+02	4,48E+04	1,53		
VB-g 30 min	Probe Plasma 119	1,70E+02	3,97E+04	2,08	1,83	
VB-g 30 min	Probe Plasma 119	2,10E+02	4,10E+04	2,69		
VB-g 30 min	Probe Plasma 119	1,06E+02	4,38E+04	0,73		
VB-g 30 min	Probe Plasma 120	2,08E+02	4,50E+04	2,32	1,35	
VB-g 30 min	Probe Plasma 120	1,12E+02	4,89E+04	0,63		
VB-g 30 min	Probe Plasma 120	1,40E+02	4,79E+04	1,09		
VB-g 60 min	Probe Plasma 121	7,23E+01	4,06E+04	0,26	0,09	1,09
VB-g 60 min	Probe Plasma 121	2,89E+01	4,16E+04	0,00		
VB-g 60 min	Probe Plasma 121	3,14E+01	4,41E+04	0,00		
VB-g 60 min	Probe Plasma 122	1,83E+02	4,49E+04	1,93	0,98	
VB-g 60 min	Probe Plasma 122	7,86E+01	4,62E+04	0,20		
VB-g 60 min	Probe Plasma 122	1,26E+02	4,99E+04	0,80		
VB-g 60 min	Probe Plasma 123	1,06E+02	4,81E+04	0,57	1,39	
VB-g 60 min	Probe Plasma 123	1,70E+02	4,75E+04	1,57		
VB-g 60 min	Probe Plasma 123	2,13E+02	5,02E+04	2,05		
VB-g 60 min	Probe Plasma 124	1,98E+02	4,22E+04	2,37	1,92	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-g 60 min	Probe Plasma 124	2,16E+02	4,37E+04	2,56		
VB-g 60 min	Probe Plasma 124	1,12E+02	4,40E+04	0,82		
VB-g 120 min	Probe Plasma 125	1,13E+02	4,11E+04	0,96	0,77	1,27
VB-g 120 min	Probe Plasma 125	7,10E+01	4,22E+04	0,19		
VB-g 120 min	Probe Plasma 125	1,26E+02	4,21E+04	1,14		
VB-g 120 min	Probe Plasma 126	2,90E+02	4,82E+04	3,34	1,54	
VB-g 120 min	Probe Plasma 126	1,05E+02	4,94E+04	0,51		
VB-g 120 min	Probe Plasma 126	1,26E+02	5,11E+04	0,76		
VB-g 120 min	Probe Plasma 127	1,05E+02	4,53E+04	0,65	1,80	
VB-g 120 min	Probe Plasma 127	2,18E+02	4,58E+04	2,42		
VB-g 120 min	Probe Plasma 127	2,26E+02	4,88E+04	2,33		
VB-g 120 min	Probe Plasma 128	1,00E+02	4,03E+04	0,77	0,96	
VB-g 120 min	Probe Plasma 128	1,21E+02	4,22E+04	1,05		
VB-g 120 min	Probe Plasma 128	1,23E+02	4,28E+04	1,05		
VB-h 15 min	Probe Plasma 129	2,63E+03	5,13E+04	36,18	35,03	39,30
VB-h 15 min	Probe Plasma 129	2,24E+03	4,99E+04	31,55		
VB-h 15 min	Probe Plasma 129	2,56E+03	4,84E+04	37,36		
VB-h 15 min	Probe Plasma 130	2,74E+03	4,63E+04	41,92	45,63	
VB-h 15 min	Probe Plasma 130	2,92E+03	4,44E+04	46,70		
VB-h 15 min	Probe Plasma 130	3,03E+03	4,46E+04	48,28		
VB-h 15 min	Probe Plasma 131	2,00E+03	4,97E+04	28,18	29,17	
VB-h 15 min	Probe Plasma 131	1,94E+03	4,78E+04	28,43		
VB-h 15 min	Probe Plasma 131	2,17E+03	4,93E+04	30,92		
VB-h 15 min	Probe Plasma 132	3,33E+03	4,85E+04	48,80	47,36	
VB-h 15 min	Probe Plasma 132	2,93E+03	4,50E+04	46,23		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-h 15 min	Probe Plasma 132	3,06E+03	4,62E+04	47,04		
VB-h 30 min	Probe Plasma 133	1,51E+03	5,53E+04	18,79	20,86	16,33
VB-h 30 min	Probe Plasma 133	1,42E+03	4,92E+04	19,92		
VB-h 30 min	Probe Plasma 133	1,76E+03	5,13E+04	23,87		
VB-h 30 min	Probe Plasma 134	1,45E+03	5,02E+04	19,93	20,32	
VB-h 30 min	Probe Plasma 134	1,47E+03	4,88E+04	20,83		
VB-h 30 min	Probe Plasma 134	1,40E+03	4,79E+04	20,18		
VB-h 30 min	Probe Plasma 135	8,95E+02	4,11E+04	14,77	16,00	
VB-h 30 min	Probe Plasma 135	1,05E+03	4,11E+04	17,51		
VB-h 30 min	Probe Plasma 135	9,19E+02	3,98E+04	15,73		
VB-h 30 min	Probe Plasma 136	6,85E+02	4,14E+04	10,98	8,16	
VB-h 30 min	Probe Plasma 136	4,44E+02	4,01E+04	7,01		
VB-h 30 min	Probe Plasma 136	4,10E+02	3,96E+04	6,48		
VB-h 60 min	Probe Plasma 137	5,01E+02	4,62E+04	6,84	5,93	5,03
VB-h 60 min	Probe Plasma 137	4,14E+02	4,33E+04	5,91		
VB-h 60 min	Probe Plasma 137	3,55E+02	4,24E+04	5,05		
VB-h 60 min	Probe Plasma 138	5,56E+02	4,47E+04	8,00	7,66	
VB-h 60 min	Probe Plasma 138	3,80E+02	4,05E+04	5,78		
VB-h 60 min	Probe Plasma 138	5,69E+02	4,04E+04	9,19		
VB-h 60 min	Probe Plasma 139	2,82E+02	4,53E+04	3,49	3,65	
VB-h 60 min	Probe Plasma 139	2,37E+02	4,47E+04	2,82		
VB-h 60 min	Probe Plasma 139	3,27E+02	4,18E+04	4,65		
VB-h 60 min	Probe Plasma 140	2,81E+02	4,42E+04	3,58	2,90	
VB-h 60 min	Probe Plasma 140	2,74E+02	4,53E+04	3,36		
VB-h 60 min	Probe Plasma 140	1,70E+02	4,43E+04	1,75		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-h 120 min	Probe Plasma 141	4,41E+02	4,56E+04	5,99	5,68	4,28
VB-h 120 min	Probe Plasma 141	4,43E+02	4,70E+04	5,81		
VB-h 120 min	Probe Plasma 141	4,02E+02	4,65E+04	5,24		
VB-h 120 min	Probe Plasma 142	4,15E+02	4,56E+04	5,57	4,69	
VB-h 120 min	Probe Plasma 142	3,18E+02	4,62E+04	3,96		
VB-h 120 min	Probe Plasma 142	3,54E+02	4,62E+04	4,53		
VB-h 120 min	Probe Plasma 143	5,28E+02	4,63E+04	7,25	4,86	
VB-h 120 min	Probe Plasma 143	3,14E+02	4,37E+04	4,18		
VB-h 120 min	Probe Plasma 143	2,64E+02	4,57E+04	3,16		
VB-h 120 min	Probe Plasma 144	1,50E+02	3,72E+04	1,90	1,87	
VB-h 120 min	Probe Plasma 144	1,06E+02	3,64E+04	1,08		
VB-h 120 min	Probe Plasma 144	1,83E+02	3,64E+04	2,62		
VB-i 15 min	Probe Plasma 145	9,93E+03	3,76E+04	190,64	199,19	274,46
VB-i 15 min	Probe Plasma 145	9,70E+03	3,24E+04	216,26		
VB-i 15 min	Probe Plasma 145	8,61E+03	3,26E+04	190,66		
VB-i 15 min	Probe Plasma 146	7,92E+03	1,29E+04	444,56	288,99	
VB-i 15 min	Probe Plasma 146	8,01E+03	2,57E+04	225,18		
VB-i 15 min	Probe Plasma 146	7,13E+03	2,61E+04	197,24		
VB-i 15 min	Probe Plasma 147	1,68E+04	3,08E+04	394,85	401,28	
VB-i 15 min	Probe Plasma 147	1,77E+04	2,96E+04	432,97		
VB-i 15 min	Probe Plasma 147	1,73E+04	3,33E+04	376,03		
VB-i 15 min	Probe Plasma 148	1,04E+04	3,54E+04	212,19	208,39	
VB-i 15 min	Probe Plasma 148	1,05E+04	3,66E+04	207,18		
VB-i 15 min	Probe Plasma 148	1,08E+04	3,79E+04	205,79		
VB-i 30 min	Probe Plasma 149	3,21E+03	2,94E+04	78,21	76,16	174,58

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-i 30 min	Probe Plasma 149	3,46E+03	3,14E+04	78,94		
VB-i 30 min	Probe Plasma 149	3,15E+03	3,16E+04	71,32		
VB-i 30 min	Probe Plasma 150	3,58E+03	3,21E+04	79,91	73,45	
VB-i 30 min	Probe Plasma 150	2,92E+03	3,01E+04	69,38		
VB-i 30 min	Probe Plasma 150	3,04E+03	3,06E+04	71,07		
VB-i 30 min	Probe Plasma 151	1,14E+04	2,87E+04	287,26	271,78	
VB-i 30 min	Probe Plasma 151	1,16E+04	3,15E+04	266,24		
VB-i 30 min	Probe Plasma 151	1,13E+04	3,12E+04	261,83		
VB-i 30 min	Probe Plasma 152	1,10E+04	2,79E+04	285,12	276,93	
VB-i 30 min	Probe Plasma 152	1,11E+04	2,90E+04	276,77		
VB-i 30 min	Probe Plasma 152	1,06E+04	2,85E+04	268,91		
VB-i 60 min	Probe Plasma 153	2,05E+03	3,20E+04	45,46	42,87	43,65
VB-i 60 min	Probe Plasma 153	1,88E+03	3,33E+04	39,94		
VB-i 60 min	Probe Plasma 153	1,92E+03	3,15E+04	43,21		
VB-i 60 min	Probe Plasma 154	3,06E+03	3,29E+04	66,47	61,17	
VB-i 60 min	Probe Plasma 154	2,67E+03	3,10E+04	61,48		
VB-i 60 min	Probe Plasma 154	2,51E+03	3,22E+04	55,54		
VB-i 60 min	Probe Plasma 155	1,22E+03	3,21E+04	26,55	26,04	
VB-i 60 min	Probe Plasma 155	1,11E+03	3,03E+04	25,56		
VB-i 60 min	Probe Plasma 155	1,14E+03	3,06E+04	26,01		
VB-i 60 min	Probe Plasma 156	2,25E+03	3,29E+04	48,60	44,50	
VB-i 60 min	Probe Plasma 156	1,93E+03	3,05E+04	44,90		
VB-i 60 min	Probe Plasma 156	1,90E+03	3,36E+04	40,01		
VB-i 120 min	Probe Plasma 157	8,84E+02	3,33E+04	18,24	17,19	26,21
VB-i 120 min	Probe Plasma 157	7,54E+02	3,44E+04	14,88		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-i 120 min	Probe Plasma 157	9,00E+02	3,35E+04	18,47		
VB-i 120 min	Probe Plasma 158	1,72E+03	2,84E+04	42,92	40,86	
VB-i 120 min	Probe Plasma 158	1,56E+03	2,87E+04	38,42		
VB-i 120 min	Probe Plasma 158	1,70E+03	2,92E+04	41,22		
VB-i 120 min	Probe Plasma 159	1,72E+03	3,07E+04	39,63	35,18	
VB-i 120 min	Probe Plasma 159	1,45E+03	2,99E+04	34,17		
VB-i 120 min	Probe Plasma 159	1,44E+03	3,19E+04	31,73		
VB-i 120 min	Probe Plasma 160	5,25E+02	3,03E+04	11,54	11,61	
VB-i 120 min	Probe Plasma 160	5,14E+02	3,02E+04	11,32		
VB-i 120 min	Probe Plasma 160	5,51E+02	3,08E+04	11,95		

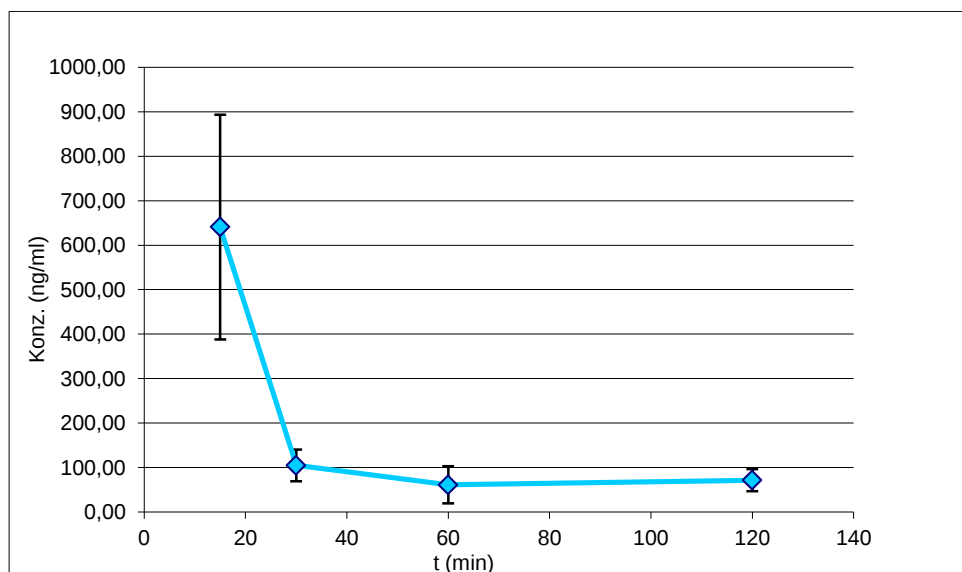


Abb. 33. Mittelwerte der Plasmaproben VA inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

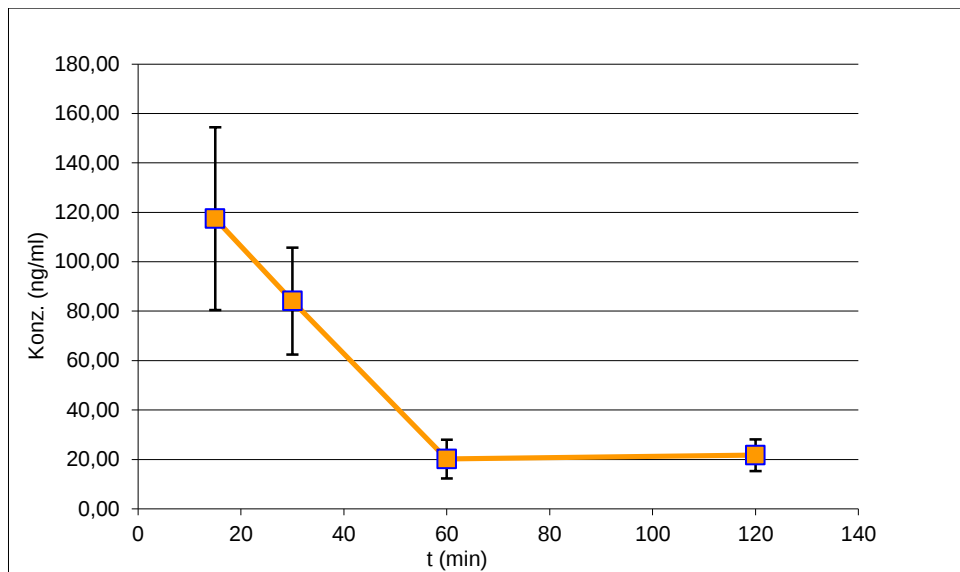


Abb. 34. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-a aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

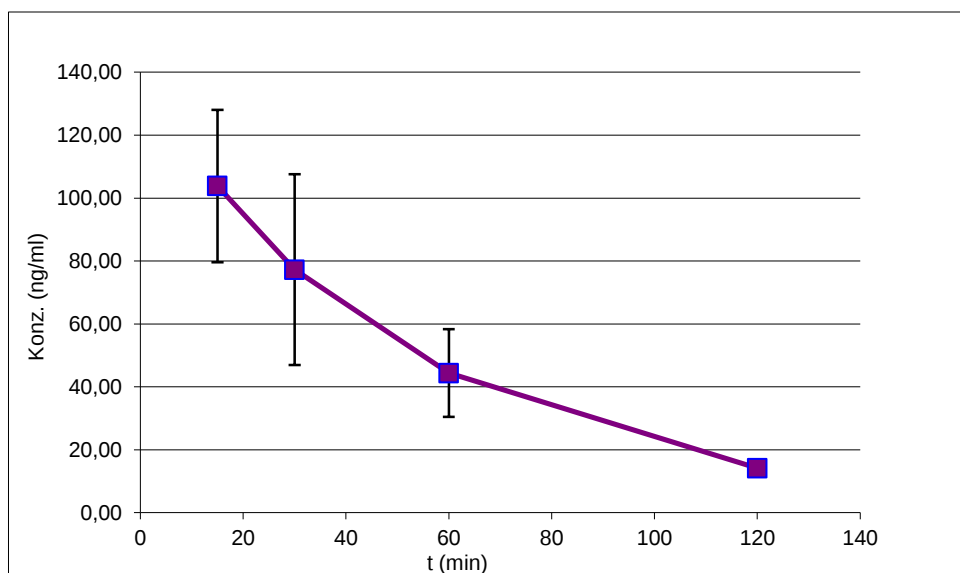


Abb. 35. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-b aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

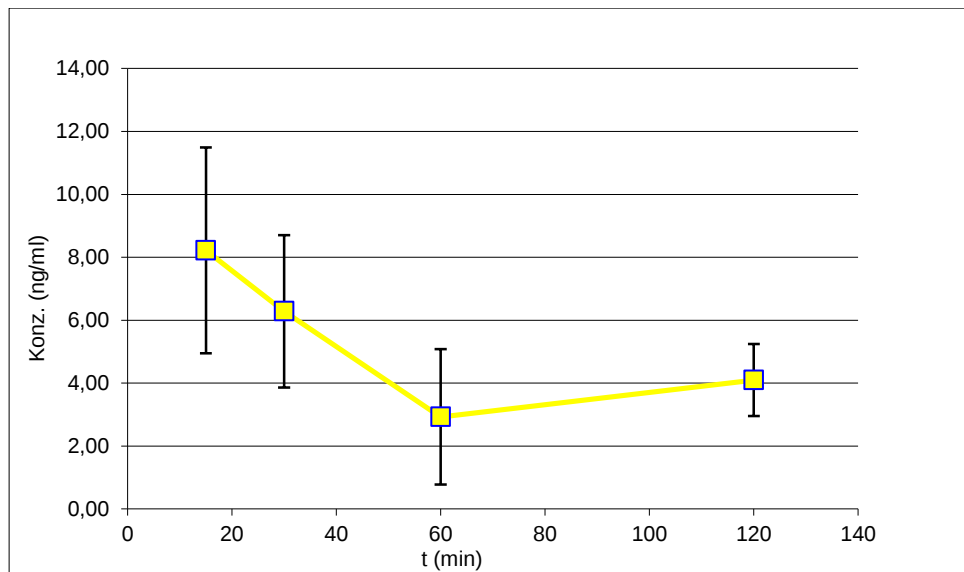


Abb. 36. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-c aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

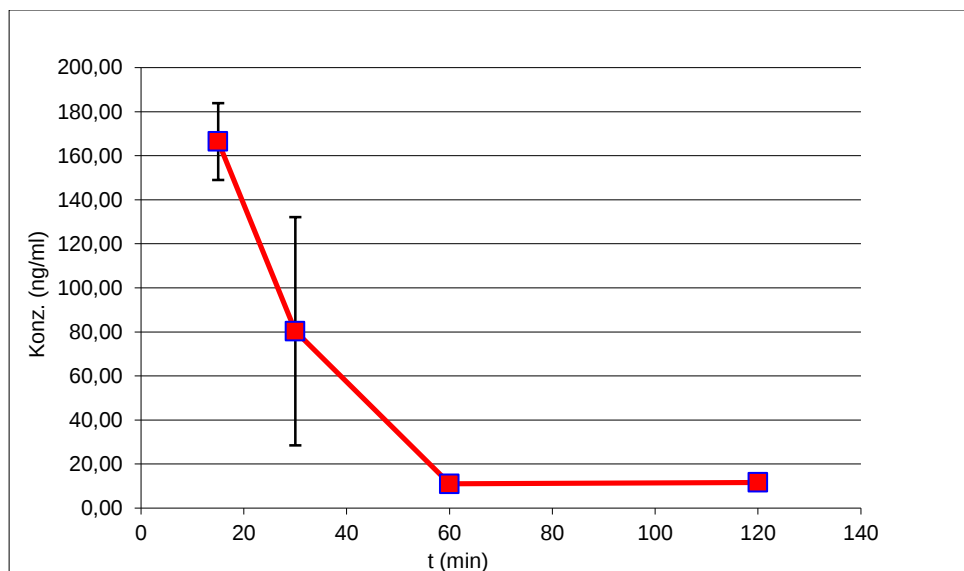


Abb. 37. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-d aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

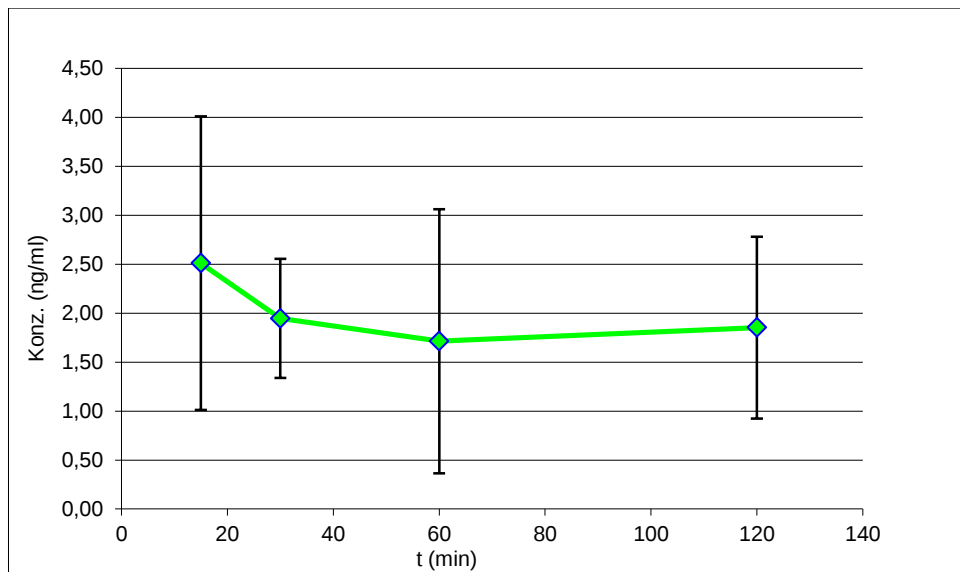


Abb. 38. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-e aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

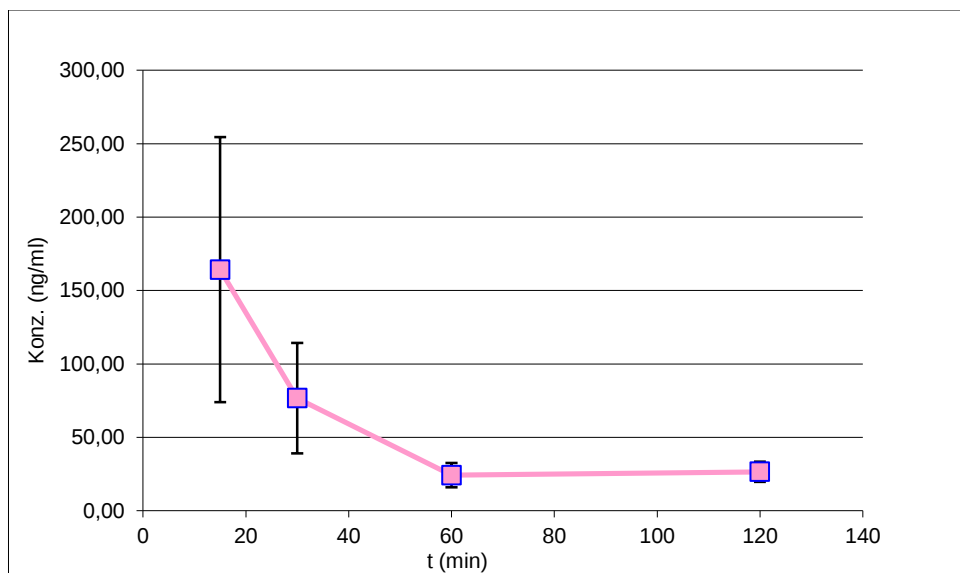


Abb. 39. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-f aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

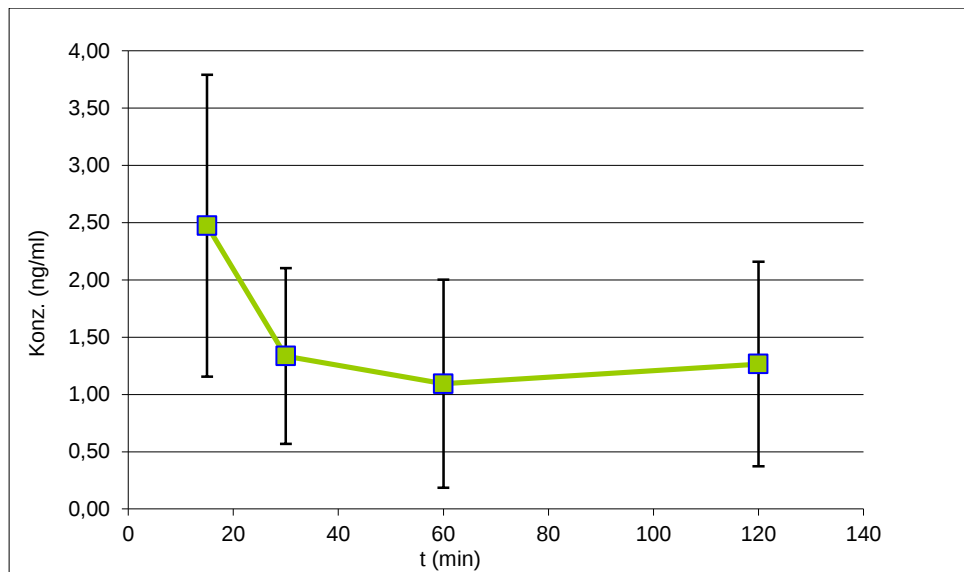


Abb. 40. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-g aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

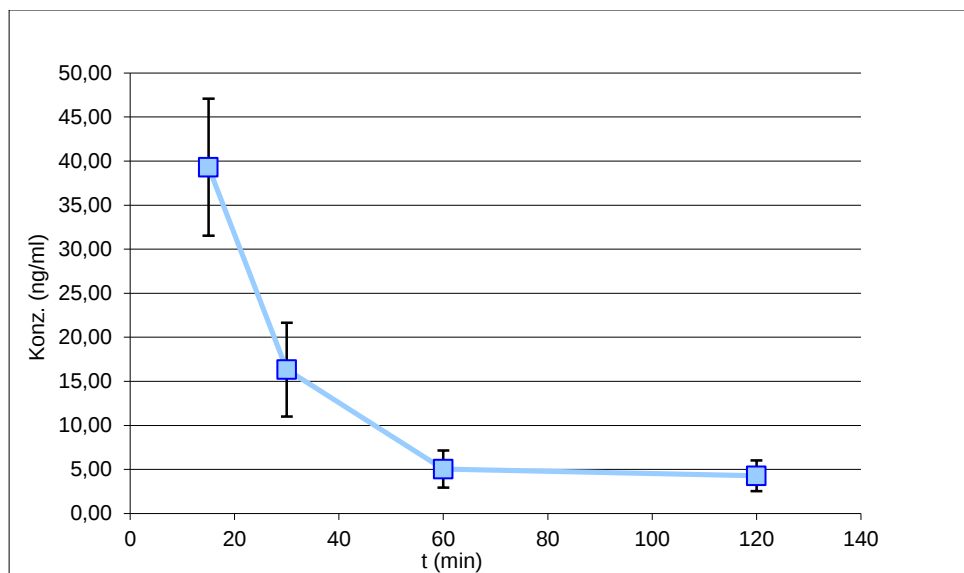


Abb. 41. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-h aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

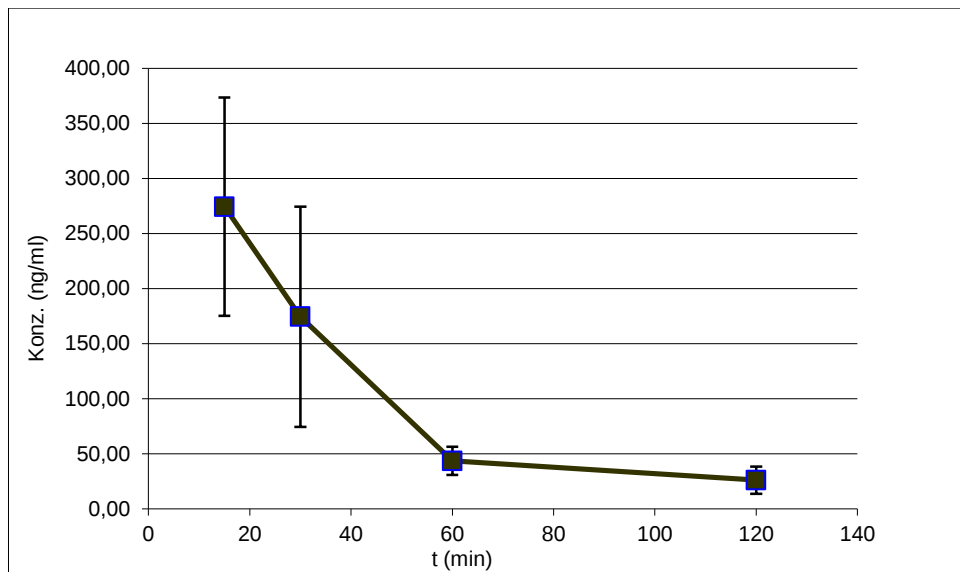


Abb. 42. Mittelwerte der Plasmaproben inkl. Standardabweichung VB-i aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Tab. 14. Ergebnisse der Gehirnproben (Entnahmetechnik 1) aus dreifacher Vermessung je Probe pro Zeitpunkt

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 15 min	Probe Hirn 1	6,12E+02	2,42E+04	18,19	19,75	16,62
VA 15 min	Probe Hirn 1	4,70E+02	1,68E+04	20,24		
VA 15 min	Probe Hirn 1	1,68E+02	5,84E+03	20,84		
VA 15 min	Probe Hirn 2	4,79E+02	2,06E+04	16,64	16,86	
VA 15 min	Probe Hirn 2	3,28E+02	1,46E+04	16,04		
VA 15 min	Probe Hirn 2	1,26E+02	5,06E+03	17,90		
VA 15 min	Probe Hirn 3	4,02E+02	2,01E+04	14,17	17,52	
VA 15 min	Probe Hirn 3	2,98E+02	1,29E+04	16,53		
VA 15 min	Probe Hirn 3	1,62E+02	5,38E+03	21,86		
VA 15 min	Probe Hirn 4	2,79E+02	1,81E+04	10,68	12,34	
VA 15 min	Probe Hirn 4	2,48E+02	1,23E+04	14,29		
VA 15 min	Probe Hirn 4	8,20E+01	4,76E+03	12,06		
VA 30 min	Probe Hirn 5	1,09E+02	8,68E+03	8,50	7,00	6,10
VA 30 min	Probe Hirn 5	6,30E+01	6,40E+03	6,44		
VA 30 min	Probe Hirn 5	2,30E+01	2,46E+03	6,06		
VA 30 min	Probe Hirn 6	1,82E+02	1,62E+04	7,50	7,08	
VA 30 min	Probe Hirn 6	1,06E+02	8,94E+03	7,97		
VA 30 min	Probe Hirn 6	3,41E+01	3,80E+03	5,78		
VA 30 min	Probe Hirn 7	1,62E+02	1,89E+04	5,47	5,70	
VA 30 min	Probe Hirn 7	8,06E+01	9,86E+03	5,17		
VA 30 min	Probe Hirn 7	4,80E+01	4,86E+03	6,46		
VA 30 min	Probe Hirn 8	1,43E+02	1,93E+04	4,59	4,61	
VA 30 min	Probe Hirn 8	7,80E+01	9,13E+03	5,45		
VA 30 min	Probe Hirn 8	3,15E+01	4,93E+03	3,81		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 60 min	Probe Hirn 9	2,55E+02	1,61E+04	11,00	10,71	6,58
VA 60 min	Probe Hirn 9	1,12E+02	7,91E+03	9,72		
VA 60 min	Probe Hirn 9	7,20E+01	4,40E+03	11,40		
VA 60 min	Probe Hirn 10	1,04E+02	1,75E+04	3,47	4,76	
VA 60 min	Probe Hirn 10	5,28E+01	7,15E+03	4,57		
VA 60 min	Probe Hirn 10	4,80E+01	5,01E+03	6,24		
VA 60 min	Probe Hirn 11	6,30E+01	1,26E+04	2,75	3,77	
VA 60 min	Probe Hirn 11	2,62E+01	5,84E+03	2,36		
VA 60 min	Probe Hirn 11	3,71E+01	3,90E+03	6,19		
VA 60 min	Probe Hirn 12	1,74E+02	1,63E+04	7,07	7,08	
VA 60 min	Probe Hirn 12	5,22E+01	6,00E+03	5,57		
VA 60 min	Probe Hirn 12	5,83E+01	4,59E+03	8,61		
VA 120 min	Probe Hirn 13	9,73E+01	1,52E+04	3,82	4,20	5,01
VA 120 min	Probe Hirn 13	3,47E+01	5,25E+03	3,98		
VA 120 min	Probe Hirn 13	3,17E+01	4,12E+03	4,80		
VA 120 min	Probe Hirn 14	9,63E+01	1,53E+04	3,74	3,92	
VA 120 min	Probe Hirn 14	3,56E+01	4,91E+03	4,46		
VA 120 min	Probe Hirn 14	2,76E+01	4,56E+03	3,55		
VA 120 min	Probe Hirn 15	1,36E+02	1,49E+04	5,89	5,35	
VA 120 min	Probe Hirn 15	3,50E+01	4,97E+03	4,31		
VA 120 min	Probe Hirn 15	3,93E+01	4,34E+03	5,84		
VA 120 min	Probe Hirn 16	1,28E+02	1,25E+04	6,74	6,59	
VA 120 min	Probe Hirn 16	3,55E+01	4,02E+03	5,67		
VA 120 min	Probe Hirn 16	4,30E+01	3,89E+03	7,36		
VB-a 15 min	Probe Hirn 17	3,35E+02	3,48E+04	6,27	7,03	6,97

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 15 min	Probe Hirn 17	5,49E+02	3,81E+04	9,91		
VB-a 15 min	Probe Hirn 17	2,73E+02	3,49E+04	4,90		
VB-a 15 min	Probe Hirn 18	3,47E+02	3,20E+04	7,20	5,75	
VB-a 15 min	Probe Hirn 18	3,14E+02	3,49E+04	5,79		
VB-a 15 min	Probe Hirn 18	2,29E+02	3,29E+04	4,24		
VB-a 15 min	Probe Hirn 19	3,59E+02	3,79E+04	6,16	8,90	
VB-a 15 min	Probe Hirn 19	6,12E+02	3,96E+04	10,71		
VB-a 15 min	Probe Hirn 19	5,69E+02	3,98E+04	9,83		
VB-a 15 min	Probe Hirn 20	3,27E+02	3,61E+04	5,84	6,19	
VB-a 15 min	Probe Hirn 20	3,13E+02	3,64E+04	5,49		
VB-a 15 min	Probe Hirn 20	3,50E+02	3,21E+04	7,24		
VB-a 30 min	Probe Hirn 21	7,47E+02	3,69E+04	14,35	10,17	7,21
VB-a 30 min	Probe Hirn 21	5,11E+02	3,25E+04	10,91		
VB-a 30 min	Probe Hirn 21	3,08E+02	3,72E+04	5,25		
VB-a 30 min	Probe Hirn 22	3,84E+02	3,69E+04	6,87	5,92	
VB-a 30 min	Probe Hirn 22	3,05E+02	3,99E+04	4,76		
VB-a 30 min	Probe Hirn 22	3,74E+02	3,96E+04	6,13		
VB-a 30 min	Probe Hirn 23	3,23E+02	4,12E+04	4,91	6,00	
VB-a 30 min	Probe Hirn 23	3,54E+02	4,12E+04	5,49		
VB-a 30 min	Probe Hirn 23	4,48E+02	3,94E+04	7,60		
VB-a 30 min	Probe Hirn 24	2,80E+02	3,48E+04	5,07	6,75	
VB-a 30 min	Probe Hirn 24	2,89E+02	3,92E+04	4,56		
VB-a 30 min	Probe Hirn 24	5,28E+02	3,44E+04	10,63		
VB-a 60 min	Probe Hirn 25	1,36E+02	3,53E+04	1,88	3,04	4,43
VB-a 60 min	Probe Hirn 25	2,68E+02	3,96E+04	4,10		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 60 min	Probe Hirn 25	2,18E+02	3,94E+04	3,16		
VB-a 60 min	Probe Hirn 26	2,49E+02	3,77E+04	3,97	4,68	
VB-a 60 min	Probe Hirn 26	3,68E+02	4,16E+04	5,68		
VB-a 60 min	Probe Hirn 26	2,83E+02	3,96E+04	4,39		
VB-a 60 min	Probe Hirn 27	3,36E+02	3,83E+04	5,62	4,94	
VB-a 60 min	Probe Hirn 27	3,02E+02	3,94E+04	4,78		
VB-a 60 min	Probe Hirn 27	2,87E+02	3,99E+04	4,42		
VB-a 60 min	Probe Hirn 28	3,70E+02	3,63E+04	6,70	5,06	
VB-a 60 min	Probe Hirn 28	2,09E+02	3,81E+04	-		
VB-a 60 min	Probe Hirn 28	2,31E+02	3,94E+04	3,41		
VB-a 120 min	Probe Hirn 29	2,36E+02	3,22E+04	4,52	3,61	4,68
VB-a 120 min	Probe Hirn 29	1,62E+02	3,84E+04	2,16		
VB-a 120 min	Probe Hirn 29	2,35E+02	3,43E+04	4,16		
VB-a 120 min	Probe Hirn 30	3,62E+02	3,94E+04	5,94	5,61	
VB-a 120 min	Probe Hirn 30	3,68E+02	3,91E+04	6,11		
VB-a 120 min	Probe Hirn 30	3,35E+02	4,37E+04	4,78		
VB-a 120 min	Probe Hirn 31	1,76E+02	3,43E+04	2,85	2,80	
VB-a 120 min	Probe Hirn 31	1,93E+02	3,36E+04	3,32		
VB-a 120 min	Probe Hirn 31	1,63E+02	3,77E+04	2,24		
VB-a 120 min	Probe Hirn 32	3,51E+02	3,80E+04	5,98	6,71	
VB-a 120 min	Probe Hirn 32	4,40E+02	3,42E+04	8,74		
VB-a 120 min	Probe Hirn 32	3,02E+02	3,55E+04	5,42		
VB-b 15 min	Probe Hirn 33	2,95E+02	3,56E+04	5,25	4,84	4,40
VB-b 15 min	Probe Hirn 33	2,77E+02	3,98E+04	4,24		
VB-b 15 min	Probe Hirn 33	3,34E+02	4,18E+04	5,03		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 15 min	Probe Hirn 34	2,97E+02	3,02E+04	6,43	4,93	
VB-b 15 min	Probe Hirn 34	2,93E+02	3,74E+04	4,91		
VB-b 15 min	Probe Hirn 34	2,38E+02	4,01E+04	3,46		
VB-b 15 min	Probe Hirn 35	2,78E+02	3,55E+04	4,91	4,57	
VB-b 15 min	Probe Hirn 35	2,79E+02	4,04E+04	4,20		
VB-b 15 min	Probe Hirn 35	3,17E+02	4,27E+04	4,60		
VB-b 15 min	Probe Hirn 36	2,29E+02	3,07E+04	4,62	3,26	
VB-b 15 min	Probe Hirn 36	2,33E+02	3,86E+04	3,54		
VB-b 15 min	Probe Hirn 36	1,36E+02	3,88E+04	1,61		
VB-b 30 min	Probe Hirn 37	1,06E+02	3,23E+04	1,44	3,34	5,24
VB-b 30 min	Probe Hirn 37	2,76E+02	3,86E+04	4,39		
VB-b 30 min	Probe Hirn 37	2,69E+02	3,91E+04	4,18		
VB-b 30 min	Probe Hirn 38	2,72E+02	3,08E+04	5,67	5,65	
VB-b 30 min	Probe Hirn 38	3,58E+02	3,77E+04	6,17		
VB-b 30 min	Probe Hirn 38	3,06E+02	3,77E+04	5,12		
VB-b 30 min	Probe Hirn 39	1,36E+02	2,79E+04	2,66	6,06	
VB-b 30 min	Probe Hirn 39	3,36E+02	3,55E+04	6,15		
VB-b 30 min	Probe Hirn 39	4,81E+02	3,51E+04	9,38		
VB-b 30 min	Probe Hirn 40	3,01E+02	3,28E+04	5,93	5,91	
VB-b 30 min	Probe Hirn 40	3,63E+02	3,84E+04	6,14		
VB-b 30 min	Probe Hirn 40	3,58E+02	4,06E+04	5,66		
VB-b 60 min	Probe Hirn 41	2,10E+02	3,62E+04	3,36	3,72	4,68
VB-b 60 min	Probe Hirn 41	1,46E+02	4,01E+04	-		
VB-b 60 min	Probe Hirn 41	2,64E+02	3,91E+04	4,09		
VB-b 60 min	Probe Hirn 42	2,58E+02	3,65E+04	4,33	4,23	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 60 min	Probe Hirn 42	2,80E+02	4,39E+04	3,80		
VB-b 60 min	Probe Hirn 42	3,26E+02	4,41E+04	4,57		
VB-b 60 min	Probe Hirn 43	3,09E+02	3,37E+04	5,92	4,47	
VB-b 60 min	Probe Hirn 43	3,50E+02	3,71E+04	6,13		
VB-b 60 min	Probe Hirn 43	1,22E+02	3,87E+04	1,35		
VB-b 60 min	Probe Hirn 44	3,22E+02	3,24E+04	6,51	6,29	
VB-b 60 min	Probe Hirn 44	2,89E+02	3,69E+04	4,91		
VB-b 60 min	Probe Hirn 44	4,43E+02	3,96E+04	7,46		
VB-b 120 min	Probe Hirn 45	3,17E+02	3,77E+04	5,35	4,94	4,17
VB-b 120 min	Probe Hirn 45	3,03E+02	4,12E+04	4,54		
VB-b 120 min	Probe Hirn 45	1,69E+02	4,21E+04	-		
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/2	2,58E+02	4,00E+04	3,86	4,04	
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/2	2,45E+02	4,31E+04	3,27		
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/2	3,48E+02	4,39E+04	4,98		
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/1	2,95E+02	3,33E+04	5,69	5,28	
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/1	4,24E+02	3,64E+04	7,81		
VB-b 120 min	Probe Hirn 46/1	1,47E+02	3,29E+04	2,35		
VB-b 120 min	Probe Hirn 47	0,00E+00	3,31E+04	0,00	2,06	
VB-b 120 min	Probe Hirn 47	1,24E+02	3,85E+04	1,40		
VB-b 120 min	Probe Hirn 47	2,63E+02	3,43E+04	4,78		
VB-b 120 min	Probe Hirn 48	1,26E+02	3,11E+04	-	4,52	
VB-b 120 min	Probe Hirn 48	2,57E+02	3,33E+04	4,82		
VB-b 120 min	Probe Hirn 48	2,26E+02	3,26E+04	4,22		
VB-c 15 min	Probe Hirn 49	3,07E+02	3,84E+04	5,03	5,16	5,35
VB-c 15 min	Probe Hirn 49	3,14E+02	3,35E+04	6,08		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-c 15 min	Probe Hirn 49	2,33E+02	3,27E+04	4,37		
VB-c 15 min	Probe Hirn 50	1,60E+02	3,26E+04	-	5,89	
VB-c 15 min	Probe Hirn 50	1,96E+02	3,38E+04	-		
VB-c 15 min	Probe Hirn 50	3,01E+02	3,30E+04	5,89		
VB-c 15 min	Probe Hirn 51	2,95E+02	3,67E+04	5,06	3,75	
VB-c 15 min	Probe Hirn 51	2,03E+02	4,11E+04	2,71		
VB-c 15 min	Probe Hirn 51	2,45E+02	4,11E+04	3,48		
VB-c 15 min	Probe Hirn 52	1,74E+02	3,82E+04	-	6,61	
VB-c 15 min	Probe Hirn 52	4,63E+02	4,13E+04	7,48		
VB-c 15 min	Probe Hirn 52	4,04E+02	4,53E+04	5,73		
VB-c 30 min	Probe Hirn 53	6,08E+01	2,78E+04	-	5,55	5,61
VB-c 30 min	Probe Hirn 53	3,73E+02	4,24E+04	5,64		
VB-c 30 min	Probe Hirn 53	2,76E+02	3,23E+04	5,45		
VB-c 30 min	Probe Hirn 54	2,79E+02	3,54E+04	4,94	4,68	
VB-c 30 min	Probe Hirn 54	2,99E+02	3,34E+04	5,76		
VB-c 30 min	Probe Hirn 54	2,26E+02	3,91E+04	3,35		
VB-c 30 min	Probe Hirn 55	2,05E+02	3,26E+04	3,73	5,88	
VB-c 30 min	Probe Hirn 55	3,31E+02	3,18E+04	6,87		
VB-c 30 min	Probe Hirn 55	3,96E+02	3,73E+04	7,03		
VB-c 30 min	Probe Hirn 56	3,17E+02	3,32E+04	6,21	6,33	
VB-c 30 min	Probe Hirn 56	3,97E+02	3,57E+04	7,41		
VB-c 30 min	Probe Hirn 56	2,66E+02	3,16E+04	5,35		
VB-c 60 min	Probe Hirn 57	1,23E+02	3,26E+04	-	3,58	4,37
VB-c 60 min	Probe Hirn 57	2,35E+02	3,57E+04	3,96		
VB-c 60 min	Probe Hirn 57	1,69E+02	3,02E+04	3,21		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-c 60 min	Probe Hirn 58	2,48E+02	3,13E+04	4,98	4,91	
VB-c 60 min	Probe Hirn 58	2,49E+02	3,63E+04	4,17		
VB-c 60 min	Probe Hirn 58	3,20E+02	3,66E+04	5,60		
VB-c 60 min	Probe Hirn 59	2,89E+02	3,23E+04	5,76	5,31	
VB-c 60 min	Probe Hirn 59	2,55E+02	3,30E+04	4,83		
VB-c 60 min	Probe Hirn 59	2,87E+02	3,42E+04	5,33		
VB-c 60 min	Probe Hirn 60	2,16E+02	2,90E+04	4,62	3,68	
VB-c 60 min	Probe Hirn 60	2,04E+02	3,05E+04	4,04		
VB-c 60 min	Probe Hirn 60	1,34E+02	2,96E+04	2,39		
VB-c 120 min	Probe Hirn 61	2,40E+02	3,52E+04	4,14	4,40	4,32
VB-c 120 min	Probe Hirn 61	1,54E+02	3,44E+04	-		
VB-c 120 min	Probe Hirn 61	2,35E+02	3,13E+04	4,66		
VB-c 120 min	Probe Hirn 62	3,30E+02	3,22E+04	6,75	5,89	
VB-c 120 min	Probe Hirn 62	2,76E+02	3,27E+04	5,37		
VB-c 120 min	Probe Hirn 62	2,82E+02	3,25E+04	5,55		
VB-c 120 min	Probe Hirn 63	2,15E+02	3,65E+04	3,43	3,23	
VB-c 120 min	Probe Hirn 63	2,41E+02	3,40E+04	4,34		
VB-c 120 min	Probe Hirn 63	1,37E+02	3,52E+04	1,91		
VB-c 120 min	Probe Hirn 64	1,86E+02	3,24E+04	3,32	3,77	
VB-c 120 min	Probe Hirn 64	2,48E+02	3,12E+04	5,00		
VB-c 120 min	Probe Hirn 64	1,79E+02	3,35E+04	3,01		
VB-d 15 min	Probe Hirn 65	1,69E+02	3,62E+04	2,50	2,03	3,14
VB-d 15 min	Probe Hirn 65	7,59E+01	3,83E+04	-		
VB-d 15 min	Probe Hirn 65	1,37E+02	3,99E+04	1,56		
VB-d 15 min	Probe Hirn 66	1,89E+02	3,51E+04	3,04	4,77	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-d 15 min	Probe Hirn 66	4,97E+02	3,99E+04	8,43		
VB-d 15 min	Probe Hirn 66	2,10E+02	4,10E+04	2,84		
VB-d 15 min	Probe Hirn 67	1,55E+02	3,06E+04	2,80	2,88	
VB-d 15 min	Probe Hirn 67	1,71E+02	3,03E+04	3,24		
VB-d 15 min	Probe Hirn 67	1,56E+02	3,25E+04	2,60		
VB-d 15 min	Probe Hirn 68	2,46E+02	4,29E+04	3,31	2,88	
VB-d 15 min	Probe Hirn 68	2,55E+02	4,50E+04	3,26		
VB-d 15 min	Probe Hirn 68	1,92E+02	4,68E+04	2,07		
VB-d 30 min	Probe Hirn 69	1,20E+02	2,81E+04	2,20	2,36	1,98
VB-d 30 min	Probe Hirn 69	1,34E+02	3,62E+04	1,76		
VB-d 30 min	Probe Hirn 69	1,97E+02	3,59E+04	3,12		
VB-d 30 min	Probe Hirn 70	1,16E+02	3,53E+04	1,45	1,45	
VB-d 30 min	Probe Hirn 70	1,65E+02	3,55E+04	-		
VB-d 30 min	Probe Hirn 70	8,85E+01	3,93E+04	-		
VB-d 30 min	Probe Hirn 71	9,86E+01	3,81E+04	0,92	0,92	
VB-d 30 min	Probe Hirn 71	1,64E+02	4,14E+04	-		
VB-d 30 min	Probe Hirn 71	1,26E+02	4,21E+04	-		
VB-d 30 min	Probe Hirn 72	1,73E+02	3,70E+04	2,51	3,21	
VB-d 30 min	Probe Hirn 72	2,17E+02	3,94E+04	3,14		
VB-d 30 min	Probe Hirn 72	2,68E+02	4,04E+04	4,00		
VB-d 60 min	Probe Hirn 73	0,00E+00	3,79E+04	0,00	1,03	1,39
VB-d 60 min	Probe Hirn 73	9,63E+01	4,12E+04	0,73		
VB-d 60 min	Probe Hirn 73	1,89E+02	4,22E+04	2,36		
VB-d 60 min	Probe Hirn 74	9,09E+01	4,05E+04	0,66	0,63	
VB-d 60 min	Probe Hirn 74	1,13E+02	4,02E+04	1,09		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-d 60 min	Probe Hirn 74	6,39E+01	4,03E+04	0,15		
VB-d 60 min	Probe Hirn 75	2,18E+02	3,41E+04	3,81	2,10	
VB-d 60 min	Probe Hirn 75	1,47E+02	4,00E+04	1,74		
VB-d 60 min	Probe Hirn 75	9,04E+01	3,82E+04	0,75		
VB-d 60 min	Probe Hirn 76	1,98E+02	3,28E+04	3,54	1,79	
VB-d 60 min	Probe Hirn 76	1,33E+02	3,51E+04	1,83		
VB-d 60 min	Probe Hirn 76	0,00E+00	3,57E+04	0,00		
VB-d 120 min	Probe Hirn 77	0,00E+00	3,65E+04	0,00	0,33	0,62
VB-d 120 min	Probe Hirn 77	7,86E+01	4,06E+04	0,42		
VB-d 120 min	Probe Hirn 77	9,15E+01	4,26E+04	0,58		
VB-d 120 min	Probe Hirn 78	9,78E+01	3,80E+04	0,91	0,69	
VB-d 120 min	Probe Hirn 78	1,16E+02	4,00E+04	1,15		
VB-d 120 min	Probe Hirn 78	0,00E+00	4,02E+04	0,00		
VB-d 120 min	Probe Hirn 79	1,06E+02	3,62E+04	1,18	0,39	
VB-d 120 min	Probe Hirn 79	0,00E+00	4,00E+04	0,00		
VB-d 120 min	Probe Hirn 79	0,00E+00	3,97E+04	0,00		
VB-d 120 min	Probe Hirn 80	7,71E+01	3,29E+04	0,73	1,08	
VB-d 120 min	Probe Hirn 80	1,27E+02	3,67E+04	1,58		
VB-d 120 min	Probe Hirn 80	9,42E+01	3,64E+04	0,92		
VB-e 15 min	Probe Hirn 81	8,01E+01	4,46E+04	0,31	0,10	0,28
VB-e 15 min	Probe Hirn 81	0,00E+00	4,95E+04	0,00		
VB-e 15 min	Probe Hirn 81	7,26E+01	5,36E+04	0,00		
VB-e 15 min	Probe Hirn 82	0,00E+00	4,16E+04	0,00	0,00	
VB-e 15 min	Probe Hirn 82	0,00E+00	4,56E+04	0,00		
VB-e 15 min	Probe Hirn 82	0,00E+00	4,77E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-e 15 min	Probe Hirn 83	5,00E+01	4,20E+04	0,00	0,19	
VB-e 15 min	Probe Hirn 83	9,58E+01	4,49E+04	0,57		
VB-e 15 min	Probe Hirn 83	0,00E+00	4,50E+04	0,00		
VB-e 15 min	Probe Hirn 84	3,69E+01	4,01E+04	0,00	0,82	
VB-e 15 min	Probe Hirn 84	2,10E+02	4,65E+04	2,38		
VB-e 15 min	Probe Hirn 84	7,00E+01	4,76E+04	0,07		
VB-e 30 min	Probe Hirn 85	3,31E+01	3,99E+04	0,00	0,18	0,06
VB-e 30 min	Probe Hirn 85	0,00E+00	4,43E+04	0,00		
VB-e 30 min	Probe Hirn 85	9,49E+01	4,53E+04	0,54		
VB-e 30 min	Probe Hirn 86	3,45E+01	4,20E+04	0,00	0,04	
VB-e 30 min	Probe Hirn 86	7,25E+01	4,68E+04	0,13		
VB-e 30 min	Probe Hirn 86	4,41E+01	4,74E+04	0,00		
VB-e 30 min	Probe Hirn 87	0,00E+00	4,05E+04	0,00	0,00	
VB-e 30 min	Probe Hirn 87	2,66E+01	4,50E+04	0,00		
VB-e 30 min	Probe Hirn 87	6,23E+01	4,46E+04	0,01		
VB-e 30 min	Probe Hirn 88	0,00E+00	4,25E+04	0,00	0,00	
VB-e 30 min	Probe Hirn 88	0,00E+00	4,57E+04	0,00		
VB-e 30 min	Probe Hirn 88	0,00E+00	4,67E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 89	6,75E+01	4,35E+04	0,13	0,04	0,19
VB-e 60 min	Probe Hirn 89	5,50E+01	4,75E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 89	5,54E+01	4,95E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 90	0,00E+00	3,92E+04	0,00	0,00	
VB-e 60 min	Probe Hirn 90	0,00E+00	4,29E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 90	0,00E+00	4,32E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 91	6,96E+01	4,14E+04	0,23	0,72	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-e 60 min	Probe Hirn 91	1,38E+02	4,51E+04	1,28		
VB-e 60 min	Probe Hirn 91	1,06E+02	4,75E+04	0,65		
VB-e 60 min	Probe Hirn 92	0,00E+00	3,97E+04	0,00	0,00	
VB-e 60 min	Probe Hirn 92	0,00E+00	4,26E+04	0,00		
VB-e 60 min	Probe Hirn 92	0,00E+00	4,80E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 93	4,97E+01	4,11E+04	0,00	0,05	0,05
VB-e 120 min	Probe Hirn 93	7,51E+01	4,74E+04	0,15		
VB-e 120 min	Probe Hirn 93	0,00E+00	5,01E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 94	0,00E+00	4,12E+04	0,00	0,00	
VB-e 120 min	Probe Hirn 94	3,67E+01	4,69E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 94	0,00E+00	4,69E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 95	0,00E+00	4,82E+04	0,00	0,09	
VB-e 120 min	Probe Hirn 95	8,97E+01	5,18E+04	0,27		
VB-e 120 min	Probe Hirn 95	0,00E+00	5,26E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 96	6,72E+01	4,08E+04	0,20	0,07	
VB-e 120 min	Probe Hirn 96	3,92E+01	4,29E+04	0,00		
VB-e 120 min	Probe Hirn 96	5,15E+01	4,41E+04	0,00		
VB-f 15 min	Probe Hirn 97	4,28E+02	4,81E+04	5,72	6,74	2,95
VB-f 15 min	Probe Hirn 97	6,46E+02	5,33E+04	8,17		
VB-f 15 min	Probe Hirn 97	4,97E+02	5,13E+04	6,32		
VB-f 15 min	Probe Hirn 98	1,93E+02	4,93E+04	1,93	1,79	
VB-f 15 min	Probe Hirn 98	1,28E+02	5,21E+04	0,82		
VB-f 15 min	Probe Hirn 98	2,70E+02	5,57E+04	2,64		
VB-f 15 min	Probe Hirn 99	1,52E+02	4,88E+04	1,32	1,72	
VB-f 15 min	Probe Hirn 99	2,50E+02	5,27E+04	2,56		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 15 min	Probe Hirn 99	1,71E+02	5,55E+04	1,29		
VB-f 15 min	Probe Hirn 100	1,59E+02	4,92E+04	1,41	1,54	
VB-f 15 min	Probe Hirn 100	1,13E+02	5,19E+04	0,60		
VB-f 15 min	Probe Hirn 100	2,49E+02	5,18E+04	2,61		
VB-f 30 min	Probe Hirn 101	1,44E+02	4,67E+04	1,29	1,10	0,82
VB-f 30 min	Probe Hirn 101	1,67E+02	5,02E+04	1,48		
VB-f 30 min	Probe Hirn 101	1,04E+02	5,00E+04	0,53		
VB-f 30 min	Probe Hirn 102	1,21E+02	4,85E+04	0,85	1,17	
VB-f 30 min	Probe Hirn 102	2,50E+02	5,14E+04	2,65		
VB-f 30 min	Probe Hirn 102	6,92E+01	4,94E+04	0,01		
VB-f 30 min	Probe Hirn 103	1,13E+02	4,82E+04	0,73	0,89	
VB-f 30 min	Probe Hirn 103	1,59E+02	5,16E+04	1,29		
VB-f 30 min	Probe Hirn 103	1,13E+02	5,08E+04	0,64		
VB-f 30 min	Probe Hirn 104	1,31E+01	3,71E+04	0,00	0,12	
VB-f 30 min	Probe Hirn 104	7,16E+01	3,89E+04	0,35		
VB-f 30 min	Probe Hirn 104	3,71E+01	3,90E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 105	1,27E+02	4,73E+04	0,99	0,56	0,32
VB-f 60 min	Probe Hirn 105	1,17E+02	5,10E+04	0,69		
VB-f 60 min	Probe Hirn 105	5,26E+01	5,13E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 106	5,22E+01	5,08E+04	0,00	0,31	
VB-f 60 min	Probe Hirn 106	1,31E+02	5,02E+04	0,93		
VB-f 60 min	Probe Hirn 106	1,67E+01	4,98E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 107	1,35E+02	4,75E+04	1,11	0,37	
VB-f 60 min	Probe Hirn 107	6,11E+01	4,93E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 107	0,00E+00	5,00E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 60 min	Probe Hirn 108	7,86E+01	5,15E+04	0,11	0,04	
VB-f 60 min	Probe Hirn 108	5,18E+01	5,22E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 108	5,57E+01	5,06E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 109	4,90E+01	5,29E+04	0,00	0,50	0,23
VB-f 120 min	Probe Hirn 109	1,79E+02	5,35E+04	1,49		
VB-f 120 min	Probe Hirn 109	4,07E+01	5,64E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 110	6,40E+01	4,82E+04	0,00	0,12	
VB-f 120 min	Probe Hirn 110	5,06E+01	5,10E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 110	9,34E+01	4,98E+04	0,37		
VB-f 120 min	Probe Hirn 111	0,00E+00	5,13E+04	0,00	0,00	
VB-f 120 min	Probe Hirn 111	4,23E+01	5,06E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 111	0,00E+00	5,00E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 112	0,00E+00	5,07E+04	0,00	0,30	
VB-f 120 min	Probe Hirn 112	6,08E+01	5,30E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 112	1,30E+02	5,06E+04	0,90		
VB-g 15 min	Probe Hirn 113	1,21E+02	4,83E+04	0,85	0,28	0,19
VB-g 15 min	Probe Hirn 113	5,96E+01	5,10E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 113	0,00E+00	5,10E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 114	0,00E+00	5,02E+04	0,00	0,00	
VB-g 15 min	Probe Hirn 114	0,00E+00	4,91E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 114	0,00E+00	5,12E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 115	0,00E+00	5,20E+04	0,00	0,00	
VB-g 15 min	Probe Hirn 115	4,62E+01	5,39E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 115	4,23E+01	5,16E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 116	0,00E+00	4,74E+04	0,00	0,46	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-g 15 min	Probe Hirn 116	0,00E+00	4,94E+04	0,00		
VB-g 15 min	Probe Hirn 116	1,60E+02	4,98E+04	1,39		
VB-g 30 min	Probe Hirn 117	0,00E+00	4,18E+04	0,00	0,87	0,22
VB-g 30 min	Probe Hirn 117	0,00E+00	4,38E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 117	2,05E+02	4,27E+04	2,60		
VB-g 30 min	Probe Hirn 118	0,00E+00	4,01E+04	0,00	0,00	
VB-g 30 min	Probe Hirn 118	0,00E+00	4,02E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 118	0,00E+00	4,13E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 119	0,00E+00	4,01E+04	0,00	0,00	
VB-g 30 min	Probe Hirn 119	4,09E+01	4,30E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 119	0,00E+00	4,53E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 120	0,00E+00	4,20E+04	0,00	0,00	
VB-g 30 min	Probe Hirn 120	0,00E+00	4,48E+04	0,00		
VB-g 30 min	Probe Hirn 120	0,00E+00	4,39E+04	0,00		
VB-g 60 min	Probe Hirn 121	0,00E+00	4,46E+04	0,00	0,25	0,25
VB-g 60 min	Probe Hirn 121	0,00E+00	4,61E+04	0,00		
VB-g 60 min	Probe Hirn 121	1,17E+02	4,90E+04	0,76		
VB-g 60 min	Probe Hirn 122	0,00E+00	4,74E+04	0,00	0,33	
VB-g 60 min	Probe Hirn 122	1,21E+02	4,53E+04	0,98		
VB-g 60 min	Probe Hirn 122	4,91E+01	4,55E+04	0,00		
VB-g 60 min	Probe Hirn 123	5,33E+01	4,51E+04	0,00	0,40	
VB-g 60 min	Probe Hirn 123	1,11E+02	4,51E+04	0,82		
VB-g 60 min	Probe Hirn 123	9,07E+01	4,79E+04	0,39		
VB-g 60 min	Probe Hirn 124	0,00E+00	4,72E+04	0,00	0,00	
VB-g 60 min	Probe Hirn 124	0,00E+00	4,54E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-g 60 min	Probe Hirn 124	4,78E+01	4,48E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 125	0,00E+00	4,65E+04	0,00	0,28	0,19
VB-g 120 min	Probe Hirn 125	0,00E+00	4,39E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 125	1,19E+02	4,77E+04	0,85		
VB-g 120 min	Probe Hirn 126	0,00E+00	4,24E+04	0,00	0,00	
VB-g 120 min	Probe Hirn 126	0,00E+00	4,32E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 126	0,00E+00	4,56E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 127	0,00E+00	4,89E+04	0,00	0,00	
VB-g 120 min	Probe Hirn 127	0,00E+00	4,84E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 127	0,00E+00	4,70E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 128	1,52E+02	4,56E+04	1,48	0,49	
VB-g 120 min	Probe Hirn 128	0,00E+00	4,59E+04	0,00		
VB-g 120 min	Probe Hirn 128	0,00E+00	4,79E+04	0,00		
VB-h 15 min	Probe Hirn 129	1,69E+02	4,80E+04	1,63	1,25	0,52
VB-h 15 min	Probe Hirn 129	1,61E+02	5,25E+04	1,28		
VB-h 15 min	Probe Hirn 129	1,40E+02	5,66E+04	0,83		
VB-h 15 min	Probe Hirn 130	1,15E+02	5,12E+04	0,66	0,24	
VB-h 15 min	Probe Hirn 130	8,30E+01	5,60E+04	0,08		
VB-h 15 min	Probe Hirn 130	6,35E+01	6,20E+04	0,00		
VB-h 15 min	Probe Hirn 131	1,33E+02	4,09E+04	1,42	0,60	
VB-h 15 min	Probe Hirn 131	5,43E+01	4,21E+04	0,00		
VB-h 15 min	Probe Hirn 131	8,89E+01	4,74E+04	0,37		
VB-h 15 min	Probe Hirn 132	6,59E+01	5,58E+04	0,00	0,00	
VB-h 15 min	Probe Hirn 132	3,73E+01	5,82E+04	0,00		
VB-h 15 min	Probe Hirn 132	6,99E+01	6,37E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-h 30 min	Probe Hirn 133	1,17E+02	5,48E+04	0,57	0,83	0,40
VB-h 30 min	Probe Hirn 133	1,67E+02	5,22E+04	1,38		
VB-h 30 min	Probe Hirn 133	1,21E+02	5,79E+04	0,54		
VB-h 30 min	Probe Hirn 134	0,00E+00	3,71E+04	0,00	0,00	
VB-h 30 min	Probe Hirn 134	0,00E+00	3,59E+04	0,00		
VB-h 30 min	Probe Hirn 134	4,26E+01	4,18E+04	0,00		
VB-h 30 min	Probe Hirn 135	1,41E+02	4,45E+04	1,36	0,75	
VB-h 30 min	Probe Hirn 135	1,21E+02	4,71E+04	0,90		
VB-h 30 min	Probe Hirn 135	0,00E+00	4,98E+04	0,00		
VB-h 30 min	Probe Hirn 136	5,03E+01	4,02E+04	0,00	0,00	
VB-h 30 min	Probe Hirn 136	0,00E+00	3,93E+04	0,00		
VB-h 30 min	Probe Hirn 136	0,00E+00	4,27E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 137	0,00E+00	3,64E+04	0,00	0,00	0,11
VB-h 60 min	Probe Hirn 137	0,00E+00	3,79E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 137	0,00E+00	4,11E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 138	6,95E+01	2,82E+04	0,82	0,27	
VB-h 60 min	Probe Hirn 138	0,00E+00	3,20E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 138	0,00E+00	3,15E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 139	0,00E+00	3,49E+04	0,00	0,15	
VB-h 60 min	Probe Hirn 139	7,09E+01	3,57E+04	0,46		
VB-h 60 min	Probe Hirn 139	0,00E+00	3,55E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 140	0,00E+00	4,37E+04	0,00	0,00	
VB-h 60 min	Probe Hirn 140	0,00E+00	4,35E+04	0,00		
VB-h 60 min	Probe Hirn 140	0,00E+00	4,68E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 141	0,00E+00	3,79E+04	0,00	0,10	0,03

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-h 120 min	Probe Hirn 141	6,35E+01	4,08E+04	0,13		
VB-h 120 min	Probe Hirn 141	7,14E+01	4,43E+04	0,17		
VB-h 120 min	Probe Hirn 142	0,00E+00	4,62E+04	0,00	0,00	
VB-h 120 min	Probe Hirn 142	0,00E+00	4,75E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 142	0,00E+00	4,80E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 143	0,00E+00	4,06E+04	0,00	0,00	
VB-h 120 min	Probe Hirn 143	0,00E+00	4,06E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 143	0,00E+00	4,05E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 144	0,00E+00	3,94E+04	0,00	0,00	
VB-h 120 min	Probe Hirn 144	4,48E+01	4,14E+04	0,00		
VB-h 120 min	Probe Hirn 144	0,00E+00	4,25E+04	0,00		

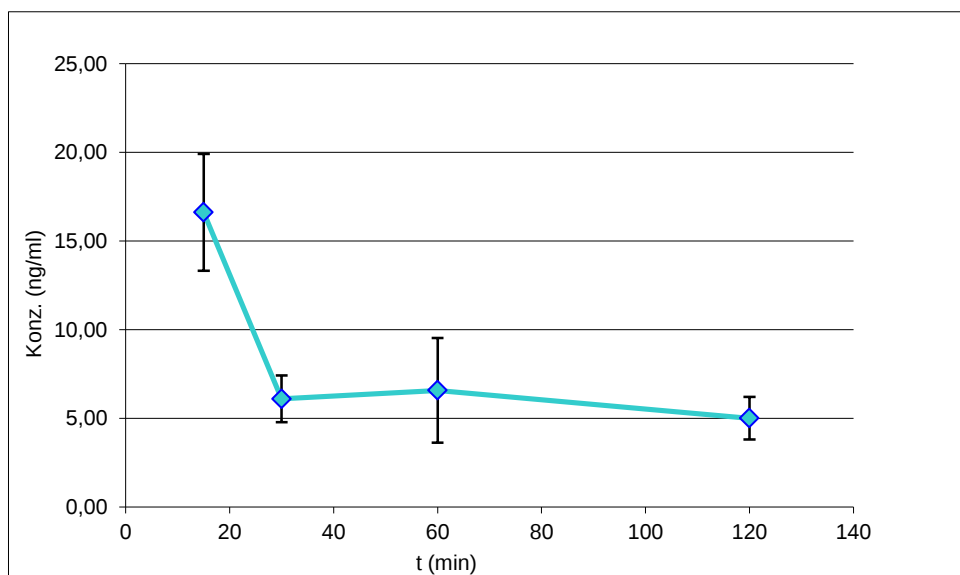


Abb. 43. Mittelwerte der Gehirnproben VA (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

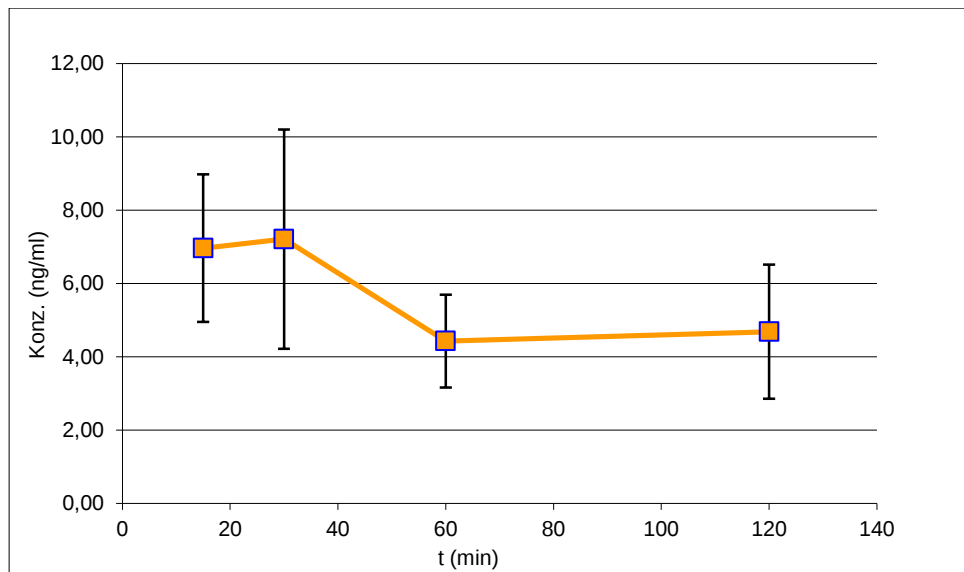


Abb. 44. Mittelwerte der Gehirnproben VB-a (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

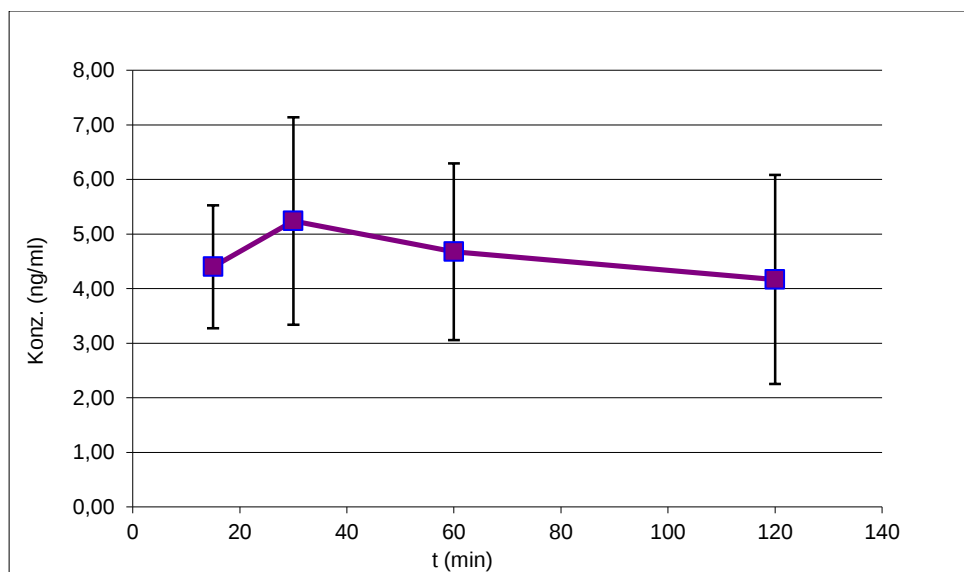


Abb. 45. Mittelwerte der Gehirnproben VB-b (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

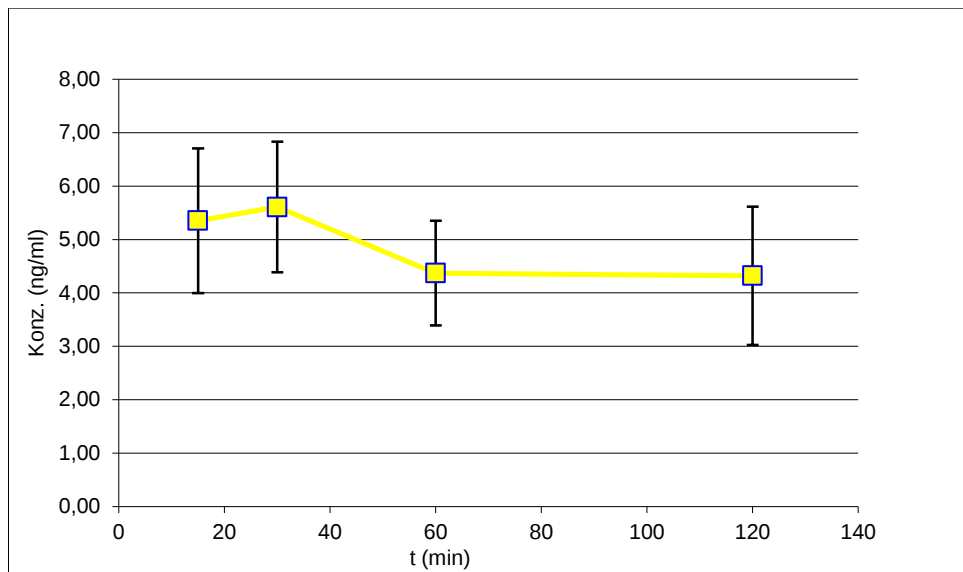


Abb. 46. Mittelwerte der Gehirnproben VB-c (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

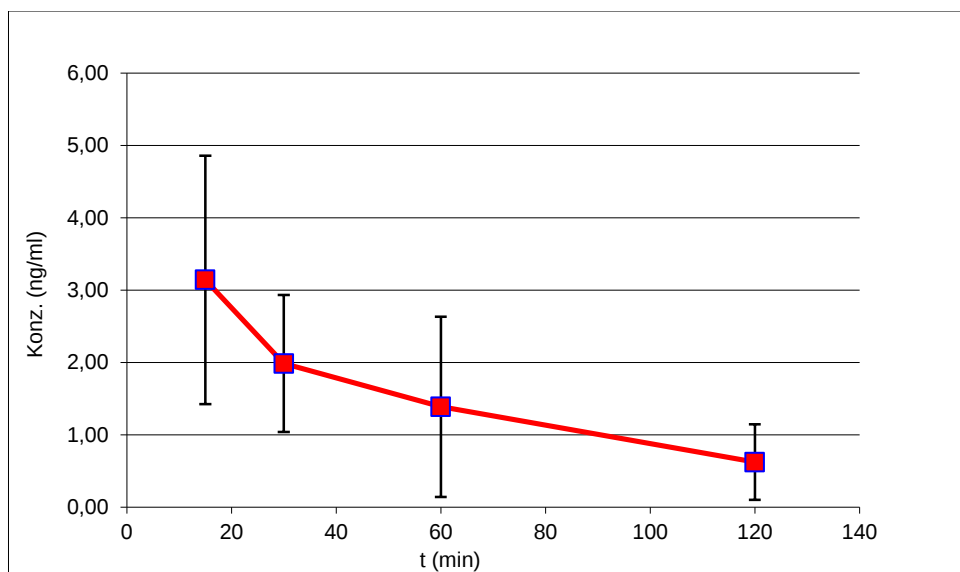


Abb. 47. Mittelwerte der Gehirnproben VB-d (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

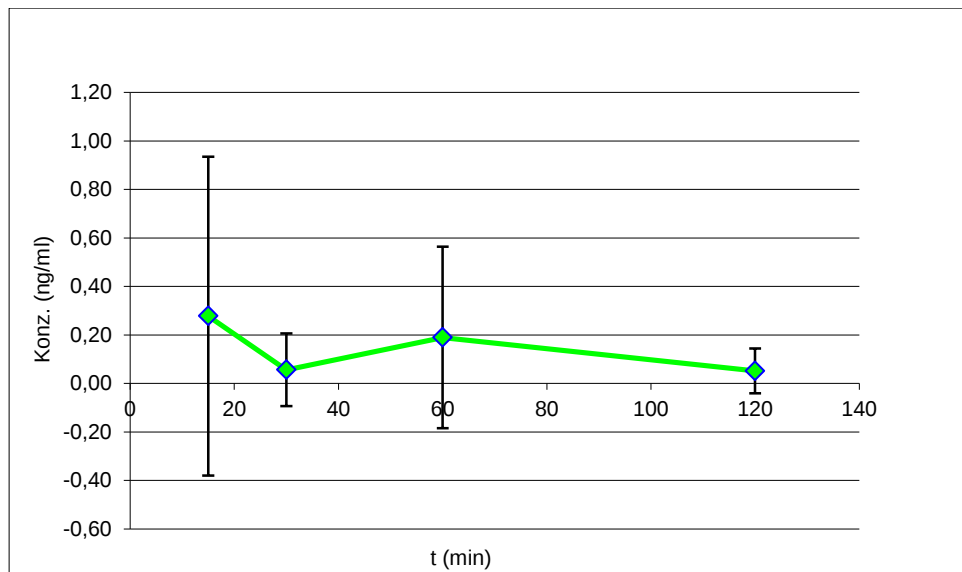


Abb. 48. Mittelwerte der Gehirnproben VB-e (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

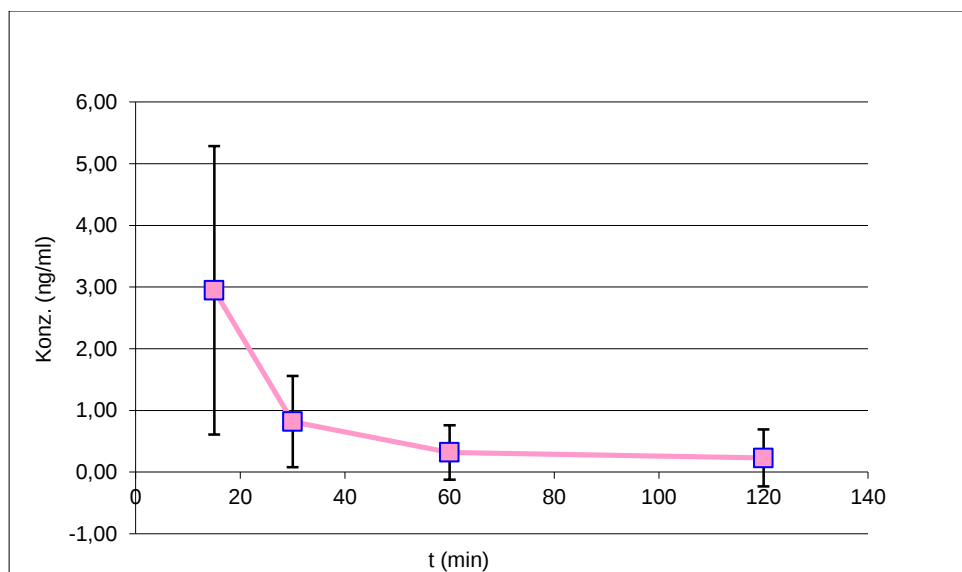


Abb. 49. Mittelwerte der Gehirnproben VB-f (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

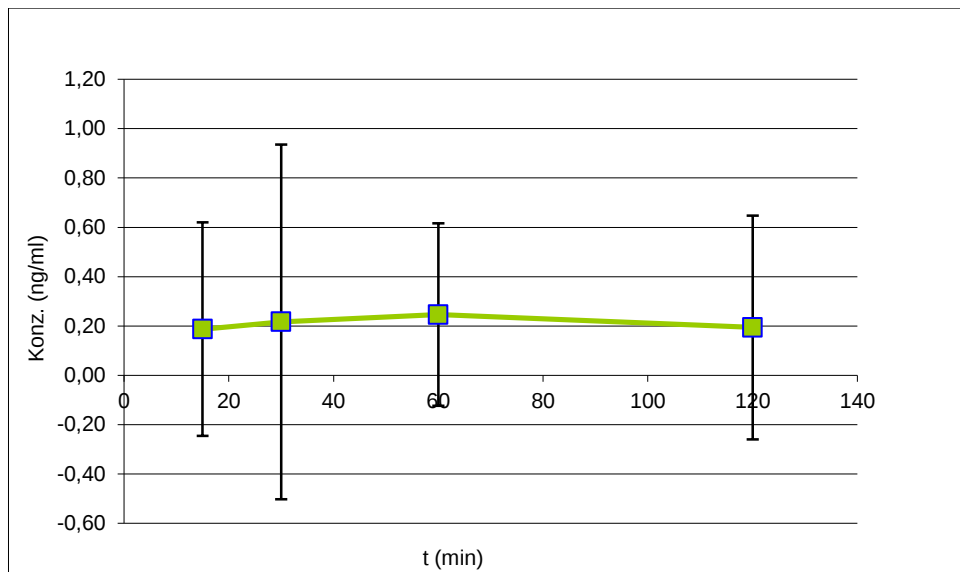


Abb. 50. Mittelwerte der Gehirnproben VB-g (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

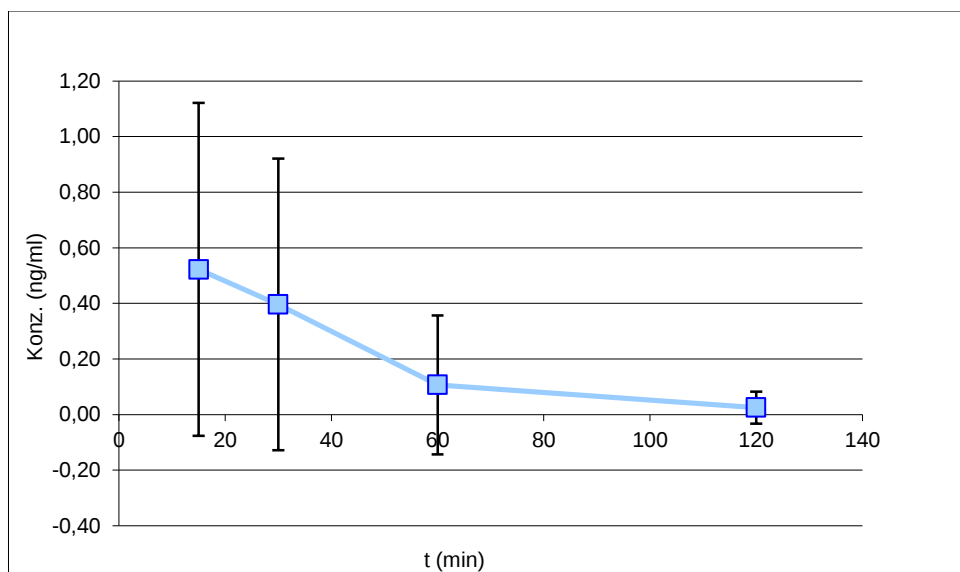


Abb. 51. Mittelwerte der Gehirnproben VB-h (Entnahmetechnik 1) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

Tab. 15. Ergebnisse der Gehirnproben (Entnahmetechnik 2) aus dreifacher Vermessung je Probe pro Zeitpunkt

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 15 min	Probe Hirn 161	-	-	-	9,92	27,86
VA 15 min	Probe Hirn 161	3,95E+02	2,57E+04	10,64		
VA 15 min	Probe Hirn 161	3,49E+02	2,59E+04	9,20		
VA 15 min	Probe Hirn 162	1,30E+03	2,60E+04	36,99	39,10	
VA 15 min	Probe Hirn 162	1,47E+03	2,66E+04	41,00		
VA 15 min	Probe Hirn 162	1,40E+03	2,64E+04	39,30		
VA 15 min	Probe Hirn 163	7,39E+02	1,67E+04	32,62	34,62	
VA 15 min	Probe Hirn 163	1,28E+03	2,55E+04	37,14		
VA 15 min	Probe Hirn 163	1,46E+03	3,16E+04	34,11		
VA 15 min	Probe Hirn 164	7,33E+02	2,04E+04	26,29	27,78	
VA 15 min	Probe Hirn 164	1,14E+03	2,98E+04	28,06		
VA 15 min	Probe Hirn 164	1,26E+03	3,19E+04	29,00		
VA 30 min	Probe Hirn 165	4,62E+01	2,69E+04	0,25	1,05	6,45
VA 30 min	Probe Hirn 165	9,47E+01	2,52E+04	1,81		
VA 30 min	Probe Hirn 165	7,01E+01	2,49E+04	1,09		
VA 30 min	Probe Hirn 166	2,37E+02	2,45E+04	6,31	6,41	
VA 30 min	Probe Hirn 166	2,73E+02	2,37E+04	7,71		
VA 30 min	Probe Hirn 166	1,95E+02	2,37E+04	5,21		
VA 30 min	Probe Hirn 167	1,22E+02	1,61E+04	4,71	6,28	
VA 30 min	Probe Hirn 167	1,89E+02	2,84E+04	4,01		
VA 30 min	Probe Hirn 167	4,56E+02	3,11E+04	10,10		
VA 30 min	Probe Hirn 168	2,88E+02	1,74E+04	11,54	12,05	
VA 30 min	Probe Hirn 168	4,91E+02	2,74E+04	12,58		
VA 30 min	Probe Hirn 168	5,38E+02	3,13E+04	12,03		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VA 60 min	Probe Hirn 169	3,63E+01	1,54E+04	0,74	0,40	0,14
VA 60 min	Probe Hirn 169	5,67E+01	2,86E+04	0,46		
VA 60 min	Probe Hirn 169	3,75E+01	3,18E+04	0,00		
VA 60 min	Probe Hirn 170	0,00E+00	1,79E+04	0,00	0,16	
VA 60 min	Probe Hirn 170	0,00E+00	2,71E+04	0,00		
VA 60 min	Probe Hirn 170	5,95E+01	2,95E+04	0,48		
VA 60 min	Probe Hirn 171	1,72E+01	2,18E+04	0,00	0,00	
VA 60 min	Probe Hirn 171	2,27E+01	2,96E+04	0,00		
VA 60 min	Probe Hirn 171	0,00E+00	3,50E+04	0,00		
VA 60 min	Probe Hirn 172	0,00E+00	2,03E+04	0,00	0,00	
VA 60 min	Probe Hirn 172	1,21E+01	3,02E+04	0,00		
VA 60 min	Probe Hirn 172	3,29E+01	3,58E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 173	0,00E+00	2,03E+04	0,00	0,00	0,04
VA 120 min	Probe Hirn 173	0,00E+00	2,94E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 173	0,00E+00	3,23E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 174	0,00E+00	2,01E+04	0,00	0,00	
VA 120 min	Probe Hirn 174	1,74E+01	2,93E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 174	2,33E+01	3,18E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 175	2,77E+01	1,99E+04	0,01	0,12	
VA 120 min	Probe Hirn 175	0,00E+00	2,69E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 175	4,71E+01	2,56E+04	0,35		
VA 120 min	Probe Hirn 176	2,87E+01	1,94E+04	0,07	0,02	
VA 120 min	Probe Hirn 176	0,00E+00	2,90E+04	0,00		
VA 120 min	Probe Hirn 176	3,39E+01	3,23E+04	0,00		
VB-a 15 min	Probe Hirn 177	5,44E+01	2,68E+04	0,49	0,83	1,00

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 15 min	Probe Hirn 177	7,11E+01	2,64E+04	1,00		
VB-a 15 min	Probe Hirn 177	7,31E+01	2,70E+04	1,01		
VB-a 15 min	Probe Hirn 178	5,31E+01	2,12E+04	0,85	1,56	
VB-a 15 min	Probe Hirn 178	1,29E+02	2,13E+04	3,56		
VB-a 15 min	Probe Hirn 178	3,80E+01	2,19E+04	0,27		
VB-a 15 min	Probe Hirn 179	8,81E+01	2,82E+04	1,32	0,78	
VB-a 15 min	Probe Hirn 179	9,10E+01	3,36E+04	1,01		
VB-a 15 min	Probe Hirn 179	4,84E+01	3,56E+04	0,00		
VB-a 15 min	Probe Hirn 180	4,64E+01	2,55E+04	0,33	0,84	
VB-a 15 min	Probe Hirn 180	1,38E+02	3,24E+04	2,19		
VB-a 15 min	Probe Hirn 180	3,38E+01	3,43E+04	0,00		
VB-a 30 min	Probe Hirn 181	3,68E+01	2,35E+04	0,14	0,48	0,75
VB-a 30 min	Probe Hirn 181	6,58E+01	2,42E+04	1,02		
VB-a 30 min	Probe Hirn 181	4,04E+01	2,28E+04	0,30		
VB-a 30 min	Probe Hirn 182	7,37E+01	2,06E+04	1,67	1,99	
VB-a 30 min	Probe Hirn 182	7,91E+01	2,04E+04	1,90		
VB-a 30 min	Probe Hirn 182	9,04E+01	1,99E+04	2,40		
VB-a 30 min	Probe Hirn 183	3,84E+01	3,23E+04	0,00	0,11	
VB-a 30 min	Probe Hirn 183	5,85E+01	3,20E+04	0,34		
VB-a 30 min	Probe Hirn 183	4,20E+01	3,46E+04	0,00		
VB-a 30 min	Probe Hirn 184	4,92E+01	2,46E+04	0,47	0,42	
VB-a 30 min	Probe Hirn 184	7,28E+01	3,29E+04	0,63		
VB-a 30 min	Probe Hirn 184	5,28E+01	3,32E+04	0,16		
VB-a 60 min	Probe Hirn 185	6,81E+01	2,87E+04	0,75	1,82	0,46
VB-a 60 min	Probe Hirn 185	9,89E+01	3,02E+04	1,44		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-a 60 min	Probe Hirn 185	1,88E+02	3,30E+04	3,28		
VB-a 60 min	Probe Hirn 186	2,71E+01	2,36E+04	0,00	0,00	
VB-a 60 min	Probe Hirn 186	1,46E+01	2,85E+04	0,00		
VB-a 60 min	Probe Hirn 186	8,63E+00	3,06E+04	0,00		
VB-a 60 min	Probe Hirn 187	0,00E+00	2,27E+04	0,00	0,00	
VB-a 60 min	Probe Hirn 187	1,36E+01	2,98E+04	0,00		
VB-a 60 min	Probe Hirn 187	0,00E+00	3,32E+04	0,00		
VB-a 60 min	Probe Hirn 188	3,18E+01	2,37E+04	0,00	0,00	
VB-a 60 min	Probe Hirn 188	0,00E+00	2,86E+04	0,00		
VB-a 60 min	Probe Hirn 188	0,00E+00	3,02E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 189	0,00E+00	2,06E+04	0,00	0,00	0,00
VB-a 120 min	Probe Hirn 189	2,02E+01	2,59E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 189	0,00E+00	2,91E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 190	0,00E+00	2,17E+04	0,00	0,00	
VB-a 120 min	Probe Hirn 190	0,00E+00	2,91E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 190	2,49E+01	2,94E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 191	1,85E+01	2,67E+04	0,00	0,00	
VB-a 120 min	Probe Hirn 191	1,44E+01	3,02E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 191	2,93E+01	3,06E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 192	1,49E+01	2,19E+04	0,00	0,00	
VB-a 120 min	Probe Hirn 192	0,00E+00	2,99E+04	0,00		
VB-a 120 min	Probe Hirn 192	0,00E+00	3,07E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 193	5,29E+01	2,96E+04	0,31	0,25	0,11
VB-b 15 min	Probe Hirn 193	5,84E+01	3,34E+04	0,28		
VB-b 15 min	Probe Hirn 193	5,75E+01	3,58E+04	0,17		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 15 min	Probe Hirn 194	5,25E+01	2,63E+04	0,47	0,16	
VB-b 15 min	Probe Hirn 194	0,00E+00	3,29E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 194	3,97E+01	3,47E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 195	0,00E+00	2,69E+04	0,00	0,00	
VB-b 15 min	Probe Hirn 195	0,00E+00	3,00E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 195	0,00E+00	3,13E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 196	3,86E+01	2,63E+04	0,06	0,02	
VB-b 15 min	Probe Hirn 196	0,00E+00	3,14E+04	0,00		
VB-b 15 min	Probe Hirn 196	0,00E+00	3,12E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 197	6,29E+01	2,87E+04	0,62	0,21	0,11
VB-b 30 min	Probe Hirn 197	0,00E+00	2,90E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 197	2,86E+01	3,30E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 198	0,00E+00	2,77E+04	0,00	0,00	
VB-b 30 min	Probe Hirn 198	0,00E+00	2,83E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 198	0,00E+00	2,99E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 199	2,89E+01	2,03E+04	0,03	0,01	
VB-b 30 min	Probe Hirn 199	0,00E+00	2,34E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 199	0,00E+00	2,23E+04	0,00		
VB-b 30 min	Probe Hirn 200	1,95E+01	2,63E+04	0,00	0,23	
VB-b 30 min	Probe Hirn 200	6,33E+01	3,21E+04	0,45		
VB-b 30 min	Probe Hirn 200	5,85E+01	3,43E+04	0,25		
VB-b 60 min	Probe Hirn 201	0,00E+00	2,93E+04	0,00	0,00	0,01
VB-b 60 min	Probe Hirn 201	0,00E+00	3,18E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 201	2,47E+01	3,49E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 202	2,45E+01	2,21E+04	0,00	0,00	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-b 60 min	Probe Hirn 202	0,00E+00	3,06E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 202	3,49E+01	3,25E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 203	4,26E+01	2,98E+04	0,04	0,01	
VB-b 60 min	Probe Hirn 203	3,01E+01	3,48E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 203	2,33E+01	3,44E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 204	4,06E+01	2,70E+04	0,09	0,03	
VB-b 60 min	Probe Hirn 204	0,00E+00	3,17E+04	0,00		
VB-b 60 min	Probe Hirn 204	0,00E+00	3,22E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 205	0,00E+00	2,18E+04	0,00	0,00	0,00
VB-b 120 min	Probe Hirn 205	0,00E+00	3,15E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 205	0,00E+00	3,25E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 206	0,00E+00	2,68E+04	0,00	0,00	
VB-b 120 min	Probe Hirn 206	0,00E+00	3,00E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 206	0,00E+00	3,17E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 207	0,00E+00	2,79E+04	0,00	0,00	
VB-b 120 min	Probe Hirn 207	0,00E+00	3,18E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 207	1,99E+01	3,41E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 208	0,00E+00	3,12E+04	0,00	0,00	
VB-b 120 min	Probe Hirn 208	0,00E+00	3,28E+04	0,00		
VB-b 120 min	Probe Hirn 208	2,15E+01	3,50E+04	0,00		
VB-f 15 min	Probe Hirn 209	9,02E+01	2,00E+04	2,38	0,83	0,71
VB-f 15 min	Probe Hirn 209	4,06E+01	2,67E+04	0,10		
VB-f 15 min	Probe Hirn 209	3,52E+01	2,89E+04	0,00		
VB-f 15 min	Probe Hirn 210	5,18E+01	2,22E+04	0,72	1,18	
VB-f 15 min	Probe Hirn 210	9,67E+01	2,49E+04	1,90		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 15 min	Probe Hirn 210	7,55E+01	2,92E+04	0,91		
VB-f 15 min	Probe Hirn 211	0,00E+00	2,33E+04	0,00	0,21	
VB-f 15 min	Probe Hirn 211	6,65E+01	3,03E+04	0,62		
VB-f 15 min	Probe Hirn 211	3,94E+01	3,23E+04	0,00		
VB-f 15 min	Probe Hirn 212	1,03E+02	2,85E+04	1,70	0,61	
VB-f 15 min	Probe Hirn 212	5,37E+01	3,46E+04	0,13		
VB-f 15 min	Probe Hirn 212	4,42E+01	3,66E+04	0,00		
VB-f 30 min	Probe Hirn 213	6,13E+01	2,55E+04	0,78	0,41	0,30
VB-f 30 min	Probe Hirn 213	5,48E+01	2,78E+04	0,45		
VB-f 30 min	Probe Hirn 213	3,89E+01	2,86E+04	0,00		
VB-f 30 min	Probe Hirn 214	4,21E+01	1,82E+04	0,71	0,56	
VB-f 30 min	Probe Hirn 214	6,85E+01	2,58E+04	0,97		
VB-f 30 min	Probe Hirn 214	7,28E+01	2,67E+04	0,00		
VB-f 30 min	Probe Hirn 215	0,00E+00	2,17E+04	0,00	0,16	
VB-f 30 min	Probe Hirn 215	2,04E+01	3,10E+04	0,00		
VB-f 30 min	Probe Hirn 215	6,76E+01	3,35E+04	0,48		
VB-f 30 min	Probe Hirn 216	5,94E+01	3,31E+04	0,00	0,06	
VB-f 30 min	Probe Hirn 216	5,64E+01	3,44E+04	0,19		
VB-f 30 min	Probe Hirn 216	0,00E+00	3,33E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 217	3,14E+01	2,56E+04	0,00	0,00	0,40
VB-f 60 min	Probe Hirn 217	0,00E+00	3,18E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 217	0,00E+00	3,19E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 218	0,00E+00	2,28E+04	0,00	0,00	
VB-f 60 min	Probe Hirn 218	0,00E+00	3,48E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 218	0,00E+00	3,62E+04	0,00		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-f 60 min	Probe Hirn 219	8,04E+01	2,16E+04	1,78	1,52	
VB-f 60 min	Probe Hirn 219	1,55E+02	3,07E+04	2,79		
VB-f 60 min	Probe Hirn 219	1,78E+02	3,41E+04	0,00		
VB-f 60 min	Probe Hirn 220	1,59E+01	2,98E+04	0,00	0,06	
VB-f 60 min	Probe Hirn 220	4,96E+01	3,03E+04	0,19		
VB-f 60 min	Probe Hirn 220	0,00E+00	3,18E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 221	1,97E+01	2,20E+04	0,00	0,00	0,00
VB-f 120 min	Probe Hirn 221	0,00E+00	3,05E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 221	0,00E+00	3,24E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 222	0,00E+00	2,61E+04	0,00	0,00	
VB-f 120 min	Probe Hirn 222	0,00E+00	3,16E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 222	0,00E+00	3,22E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 223	0,00E+00	3,17E+04	0,00	0,00	
VB-f 120 min	Probe Hirn 223	0,00E+00	3,03E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 223	3,37E+01	3,52E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 224	2,59E+01	2,30E+04	0,00	0,00	
VB-f 120 min	Probe Hirn 224	4,29E+01	3,10E+04	0,00		
VB-f 120 min	Probe Hirn 224	0,00E+00	3,22E+04	0,00		
VB-i 15 min	Probe Hirn 145	1,49E+02	3,56E+04	2,13	2,67	3,48
VB-i 15 min	Probe Hirn 145	1,87E+02	3,31E+04	3,25		
VB-i 15 min	Probe Hirn 145	1,53E+02	3,15E+04	2,64		
VB-i 15 min	Probe Hirn 146	1,48E+02	3,56E+04	2,11	2,88	
VB-i 15 min	Probe Hirn 146	1,96E+02	3,45E+04	3,27		
VB-i 15 min	Probe Hirn 146	1,90E+02	3,35E+04	3,26		
VB-i 15 min	Probe Hirn 147	2,84E+02	3,57E+04	5,00	4,84	

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-i 15 min	Probe Hirn 147	2,59E+02	3,50E+04	4,58		
VB-i 15 min	Probe Hirn 147	2,64E+02	3,35E+04	4,94		
VB-i 15 min	Probe Hirn 148	1,91E+02	3,22E+04	3,46	3,54	
VB-i 15 min	Probe Hirn 148	2,28E+02	3,09E+04	4,56		
VB-i 15 min	Probe Hirn 148	1,47E+02	3,06E+04	2,60		
VB-i 30 min	Probe Hirn 149	1,28E+02	3,41E+04	1,80	0,77	2,24
VB-i 30 min	Probe Hirn 149	5,29E+01	3,21E+04	0,20		
VB-i 30 min	Probe Hirn 149	5,68E+01	3,15E+04	0,32		
VB-i 30 min	Probe Hirn 150	1,20E+02	3,61E+04	1,48	1,11	
VB-i 30 min	Probe Hirn 150	1,09E+02	3,61E+04	1,24		
VB-i 30 min	Probe Hirn 150	7,50E+01	3,42E+04	0,62		
VB-i 30 min	Probe Hirn 151	2,30E+02	3,43E+04	4,05	4,83	
VB-i 30 min	Probe Hirn 151	2,91E+02	3,30E+04	5,66		
VB-i 30 min	Probe Hirn 151	2,49E+02	3,25E+04	4,78		
VB-i 30 min	Probe Hirn 152	-	-	-	-	
VB-i 30 min	Probe Hirn 152	-	-	-		
VB-i 30 min	Probe Hirn 152	-	-	-		
VB-i 60 min	Probe Hirn 153	4,36E+01	3,45E+04	0,00	0,00	0,31
VB-i 60 min	Probe Hirn 153	2,44E+01	3,20E+04	0,00		
VB-i 60 min	Probe Hirn 153	3,84E+01	3,37E+04	0,00		
VB-i 60 min	Probe Hirn 154	5,18E+01	3,00E+04	0,26	0,72	
VB-i 60 min	Probe Hirn 154	6,64E+01	2,86E+04	0,71		
VB-i 60 min	Probe Hirn 154	8,37E+01	2,86E+04	1,17		
VB-i 60 min	Probe Hirn 155	3,31E+01	3,56E+04	0,00	0,20	
VB-i 60 min	Probe Hirn 155	6,59E+01	3,33E+04	0,45		

Substanz	Probe	Area VA	Area ACVA	Konz. (ng/ml)	$\bar{x}$ Mess.	$\bar{x}$ Proben pro Zeit
VB-i 60 min	Probe Hirn 155	5,42E+01	3,40E+04	0,16		
VB-i 60 min	Probe Hirn 156	-	-	-	-	
VB-i 60 min	Probe Hirn 156	-	-	-		
VB-i 60 min	Probe Hirn 156	-	-	-		
VB-i 120 min	Probe Hirn 157	3,39E+01	3,09E+04	0,00	0,00	0,12
VB-i 120 min	Probe Hirn 157	2,47E+01	2,95E+04	0,00		
VB-i 120 min	Probe Hirn 157	1,70E+01	3,09E+04	0,00		
VB-i 120 min	Probe Hirn 158	7,46E+01	3,12E+04	0,77	0,50	
VB-i 120 min	Probe Hirn 158	6,13E+01	2,95E+04	0,53		
VB-i 120 min	Probe Hirn 158	5,06E+01	3,09E+04	0,19		
VB-i 120 min	Probe Hirn 159	-	-	-	0,00	
VB-i 120 min	Probe Hirn 159	3,78E+01	3,21E+04	0,00		
VB-i 120 min	Probe Hirn 159	3,01E+01	3,17E+04	0,00		
VB-i 120 min	Probe Hirn 160	3,56E+01	3,04E+04	0,00	0,00	
VB-i 120 min	Probe Hirn 160	3,40E+01	2,85E+04	0,00		
VB-i 120 min	Probe Hirn 160	3,69E+01	2,86E+04	0,00		

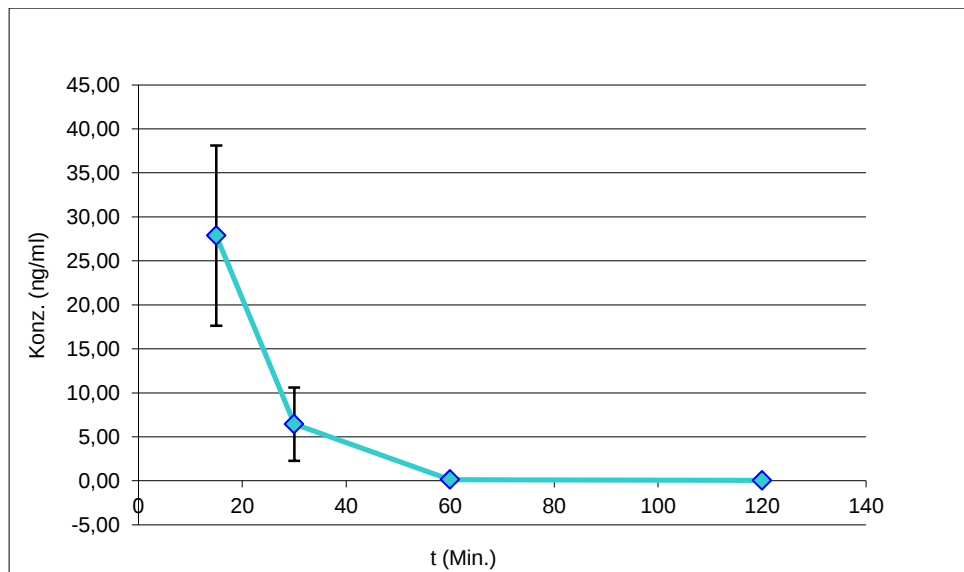


Abb. 52. Mittelwerte der Gehirnproben VA (Entnahmetechnik 2) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

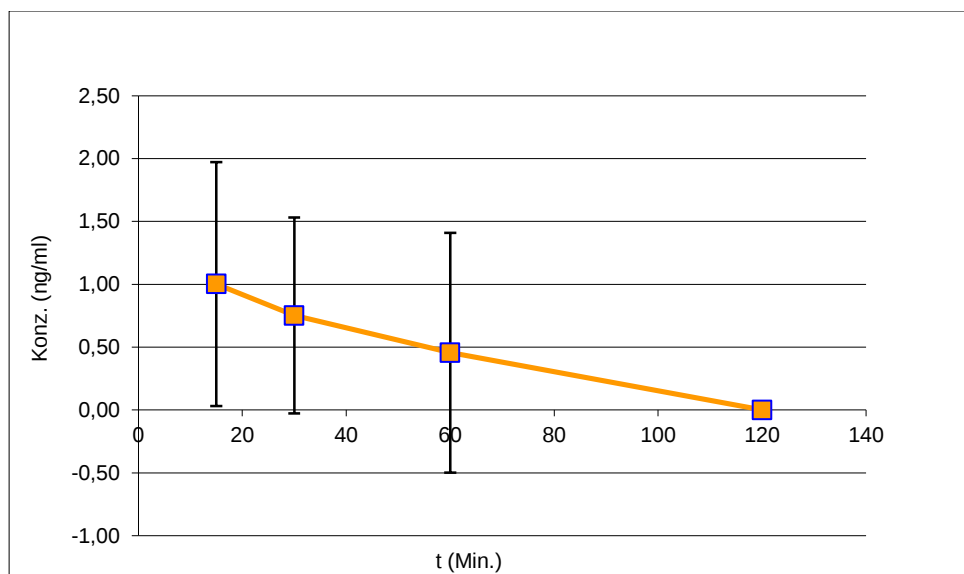


Abb. 53. Mittelwerte der Gehirnproben VB-a (Entnahmetechnik 2) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

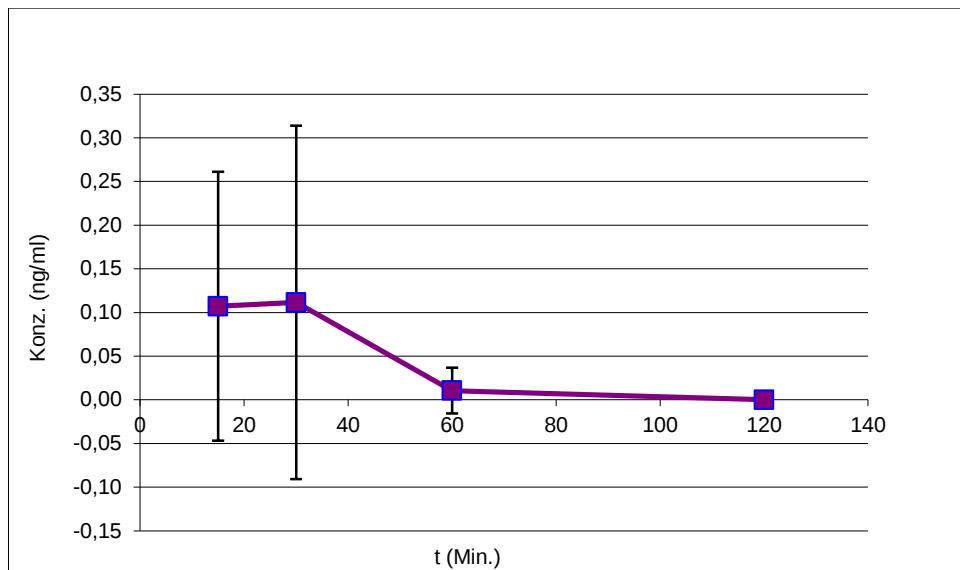


Abb. 54. Mittelwerte der Gehirnproben VB-b (Entnahmetechnik 2) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

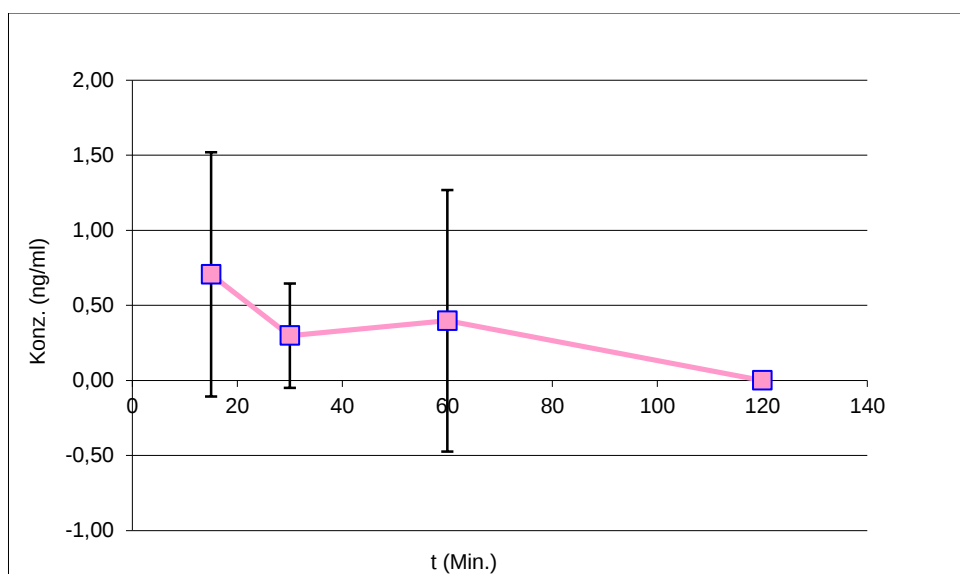


Abb. 55. Mittelwerte der Gehirnproben VB-f (Entnahmetechnik 2) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

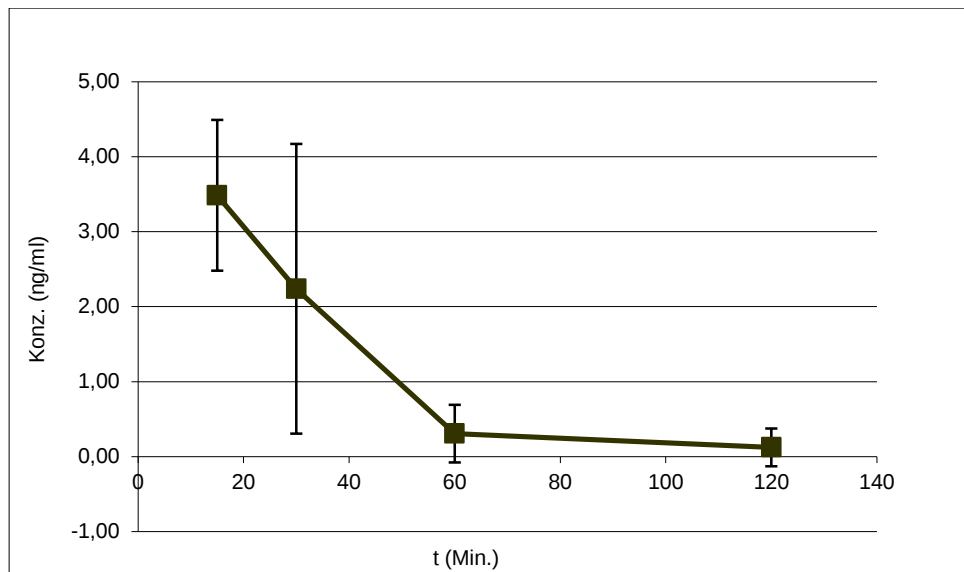


Abb. 56. Mittelwerte der Gehirnproben VB-i (Entnahmetechnik 2) inkl. Standardabweichung aus dreifacher Vermessung von jeweils 4 Versuchstieren je Substanz pro Zeitpunkt

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Wechselstrom
ACVA	Acetoxyvalerensäure
APCI	Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAD	Collision Activated Dissociation/Decomposition
CE	Collision Energy
CEM	Channel Electron Multiplier
CXP	Collision Cell Exit Potential
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Declustering Potential
DC	Gleichstrom
GABA	γ -Aminobuttersäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrospray Ionization
FIA	Flow Injection Analysis
ff	folgende
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
iS	interner Standard
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
L.	Linné
l	Liter
LC	liquid chromatography
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol

Mess.	Messung
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
MRM	Multi Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NC	Needle Current
ng	Nanogramm
µA	Mikroampere
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
psi	pound-force per square inch
Q	Quadrupol
s.	siehe
S.	Seite
sek.	Sekunden
SIM	Single Ion Monitoring
s.l.	sensu lato
SRM	Single Reaction Monitoring
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEM	Temperatur
TripleQuad	Triple-Quadrupol
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography
UNA	Undecansäure
V	Volt
VA	Valerensäure
VB	Verbindung
vgl.	vergleiche
v:v	Volumenverhältnis
ZNS	Zentralnervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. *Valeriana officinalis* L. s.l.,

<http://www.botanicus.org/item/31753002839139#>, besucht am 11.09.2013

Köhler H.A. (1887) Köhler's Medizinal-Pflanzen, botanischer Verlag Franz-Eugen

Köhler, **Band 1**: 47

Abb. 2. Valerensäure,

<http://de.wikipedia.org/wiki/Valerens%C3%A4ure>, besucht am 18.03.2013

Abb. 3. Männliche Maus, Typ (C57BL/6N)

Abb. 4. Verwendete UHPLC-Anlage

Abb. 5. Verwendetes TripleQuad-MS/MS System

Abb. 6. APCI (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization),

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Abb. 7. Aufbau des TripleQuad-MS/MS Systems

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Abb. 8. Methodenentwicklung einer MS/MS Analyse

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Abb. 9. Geräteparameter des TripleQuad-MS/MS Systems

© 2009 Applied Biosystems® Inc. and MDS Inc. Joint Owners

Abb. 10. Optimierung „Declustering Potential“ (DP)

Abb. 11. Optimierung „Entrance Potential“ (EP)

Abb. 12. Optimierung „Collision Energy“ (CE) VA

Abb. 13. Optimierung „Collision Cell Exit Potential“ (CXP)

Abb. 14. Optimierung Temperature (TEM) 1

Abb. 15. Optimierung Temperature (TEM) 2

Abb. 16. Optimierung „Nebulizer Current“ (NC)

Abb. 17. Undecansäure, besucht am 25.09.2013

<http://de.wikipedia.org/wiki/Undecans%C3%A4ure>

Abb. 18. Product Ion Scan zur Findung eines typischen Tochterions für UNA

Abb. 19. Vergleich der Retentionszeiten von VA und UNA

Abb. 20. Acetoxyvalerensäure, besucht am 02.04.2012

<http://www.phytochem-standards.de/topseller.pdf>

Abb. 21. Product Ion Scan zur Findung eines typischen Tochterions für ACVA

Abb. 22. Optimierung „Collision Energy“ (CE) ACVA

Abb. 23. Vergleich der Retentionszeiten von VA und ACVA

- Abb. 24.** Eichgerade Hirn ohne Normierung mittels iS
- Abb. 25.** Eichgerade Plasma nach Normierung mittels iS
- Abb. 26.** Eichgerade Hirn nach Normierung mittels iS
- Abb. 27.** Mittelwerte der Plasmaproben
- Abb. 28.** Mittelwerte der Hirnproben (Entnahmetechnik 1)
- Abb. 29.** Mittelwerte der Hirnproben (Entnahmetechnik 2)
- Abb. 30.** Vergleich der Entnahmetechnik 1 und 2 des Gehirns anhand der Kinetikkurven von VB-a
- Abb. 31.** Streuung der VA Plasmaproben nach 15 Minuten
- Abb. 32.** Streuung der VA Plasmaproben nach 15, 30, 60 und 120 Minuten
- Abb. 33.** Mittelwerte der Plasmaproben VA inkl. STAW
- Abb. 34.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-a inkl. STAW
- Abb. 35.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-b inkl. STAW
- Abb. 36.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-c inkl. STAW
- Abb. 37.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-d inkl. STAW
- Abb. 38.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-e inkl. STAW
- Abb. 39.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-f inkl. STAW
- Abb. 40.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-h inkl. STAW
- Abb. 41.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-g inkl. STAW
- Abb. 42.** Mittelwerte der Plasmaproben VB-i inkl. STAW
- Abb. 43.** Mittelwerte der Gehirnproben VA (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 44.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-a (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 45.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-b (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 46.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-c (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 47.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-d (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 48.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-e (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 49.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-f (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 50.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-h (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 51.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-g (Entnahmetechnik 1) inkl. STAW
- Abb. 52.** Mittelwerte der Gehirnproben VA (Entnahmetechnik 2) inkl. STAW
- Abb. 53.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-a (Entnahmetechnik 2) inkl. STAW
- Abb. 54.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-b (Entnahmetechnik 2) inkl. STAW
- Abb. 55.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-f (Entnahmetechnik 2) inkl. STAW
- Abb. 56.** Mittelwerte der Gehirnproben VB-i (Entnahmetechnik 2) inkl. STAW

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Verwendete Reagenzien

Tab. 2. Verwendete Geräte

Tab. 3. Verwendete Software

Tab. 4. LM-Gradient, Methode „Valerensäure.opt APCI neg. MRM 233_84 LCMS
lang 3.dam“

Tab. 5. LM-Gradient, Methode „VA+ACVA_APCI neg MRM LCMS 3.dam“

Tab. 6. Parameter, Methode „VA+ACVA_APCI neg Sched MRM LCMS 2.dam“

Tab. 7. Verdünnungsreihe für die Eichgerade Plasma

Tab. 8. Verdünnungsreihe für die Eichgerade Hirn

Tab. 9. Konzentrationen der Verdünnungsreihen Plasma und Hirn

Tab. 10. Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmaproben

Tab. 11. Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirnproben (Entnahmetechnik 1)

Tab. 12. Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirnproben (Entnahmetechnik 2)

Tab. 13. Ergebnisse Plasmaproben

Tab. 14. Ergebnisse Gehirnprouben (Entnahmetechnik 1)

Tab. 15. Ergebnisse Gehirnprouben (Entnahmetechnik 2)

11. Literaturverzeichnis

- [1] Abbott N.J., Romero I.A. (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier, *Molecular Medicine Today* **2(3)**: 106-113.
- [2] Ardrey R.E. (2009) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, **1.Auflage**: 122-127.
- [3] Benke D., Barberis A., Kopp S., Altmann K.-H., Schubiger M., Vogt K.E., Rudolph U., Möhler H. (2009) GABA_A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts, *Neuropharmacology* **56**: 174-181.
- [4] Dietz B.M., Mahady G.B., Pauli G.F., Farnsworth N.R. (2005) Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro, *Molecular Brain Research* **138**: 191-197.
- [5] (2011) *Europäisches Arzneibuch*, Verlag Österreich, **Ausgabe 7.0.:** 1640.
- [6] Felgentreff F., Becker A., Meier B. Brattström A. (2012) Valerian extract characterized by high valerenic acid and low acetoxy valerenic acid contents demonstrates anxiolytic activity, *Phytomedicine* **19**: 1216-1222.
- [7] Gambaro A., Zangrando R., Gabrielli P., Barbante C., Cescon P. (2008) Direct Determination of Levoglucosan at the Picogram per Milliliter Level in Antarctic Ice by High-Performance Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* **80(5)**: 1649-1655.
- [8] Geckeler K.E., Eckstein H. (2000) *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*, Verlag Vieweg, **Auflage 1998**: 5.

[9] Hänsel R., Sticher O. (2009) Pharmkognosie Phytopharmazie, Springer Medizin Verlag Heidelberg, **9.Auflage**: 769-771.

[10] de Hoffmann E. (1996) Tandem Mass Spectrometry: a Primer, Journal of Mass Spectrometry **31**: 129-137.

[11] Houghton R., Grace P. (2008) UHPLC – why all the hype?, Chromatography today **1(2)**: 7-9.

[12] Kohm S., Baburin I., Timin E., Hohaus A., Trauner G., Kopp B., Hering S. (2007) Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity, Neuropharmacology **53**: 178-187.

[13] Kohm S., Strommer B., Ramharter J., Schwarz T., Schwarzer C., Erker T., Ecker G.F., Mulzer J., Hering S. (2010) Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands – *in vitro* and *in vivo* characterization, British Journal of Pharmacology **161**: 65-78.

[14] Kromidas S. (2006) HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker, Wiley-VCH Verlag, **1.Auflage**: 566.

[15] Meyer V.R. (2009) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Wiley-VCH Verlag, **10.Auflage**: 17-24.

[16] Miller P.E., Bonner Denton M. (1986) The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts, Journal of Chemical Education **63(7)**: 617-622.

[17] Murphy K., Kubin Z.J., Shepherd J.N., Ettinger R.H. (2010) Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats, Phytomedicine **17**: 674-678.

[18] Neuhaus W., Trauner G., Gruber D., Oelzant S., Klepal W., Kopp B. Noe C.R. (2008) Transport of GABA_A Receptor Modulator and Its Derivatives

from *Valeriana officinalis* L. *s.l.* Across an *in Vitro* Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier, *Planta Med* **74**: 1338-1344.

[19] Pschyrembel W. (2013) *Klinisches Wörterbuch* 2014, De Gruyter, **Auflage 265**: 299.

[20] Ramharter J., Mulzer J. (2012) From Planning to Optimization: Total Synthesis of Valerenic Acid and Some Bioactive Derivatives, *European Journal of Organic Chemistry*: 2041-2053.

[21] Ramharter J., Mulzer J. (2009) Total Synthesis of Valerenic Acid, a Potent GABA_A Receptor Modulator, *Organic Letters* **11(5)**: 1151-1153.

[22] Rücker G., Neugebauer M., Willems G.G. (2008) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **4. Auflage**: 368-417.

[23] Sampath C., Haug K., Thanel S., Hamburger M., Derendorf H., Frye R., Butterweck V. (2012) Pharmacokinetics of Valerenic Acid in Rats after Intravenous and Oral Administrations, *Planta Med* **78**: 575-581.

[24] Siegel G.J., Brady S.T. (2011) *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*, Academic Press, **8. Auflage**: 368.

[25] Sigel E, Steinmann M.E. (2012) Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptors, *The Journal of Biological Chemistry* **287(48)**: 40224-40231.

[26] Teuscher E., Melzig M.F., Lindequist U. (2012) *Biogene Arzneimittel: Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **7. Auflage**: 194-195.

[27] Wichtl M. (2008) Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **5.Auflage**: 693-694.

[28] Yuan C.-S., Mehendale S., Xiao Y., Aung H.H., Xie J.-T., Ang-Lee M.K. (2004) The Gamma-Aminobutyric Acidergic Effects of Valerian and Valerenic Acid on Rat Brainstem Neuronal Activity, Anesthesia & Analgesia **98**: 353-358.

[29] http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/AN_TUT_D1000076695_EN.pdf, besucht am 17.09.2013.

[30] <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/turbo-v-operator-guide-eng.pdf>, besucht am 18.09.2013.

[31] <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/4000-api-hardware-guide.pdf>, besucht am 18.09.2013.

[32] <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/5600-hardware-overview.pdf>, besucht am 17.09.2013.

[33] <http://chemweb.ucc.ie/mass%20spec/MS%20summary.pdf>, besucht am 13.09.2013.

[34] <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf>: Swartz M.E. (2005) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction: Separation Science Redefined: 8-14, besucht am 25.09.2013.

[35] <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf> (2012) Compendium of Chemical Technology: IUPAC Recommendations: Gold Book, **Version 2.3.2**: 748, besucht am 18.09.2013.

[36] Gräbner I. (2013) Diplomarbeit: Quantifizierung von Naturstoffen und deren Metaboliten in biologischen Matrices mittels HPLC-MS/MS, Universität Wien.

12. Curriculum Vitae

persönliche Daten:

Name: Bernhard Ralf Wittig
Geburtsdatum: 12.04.1987
Geburtsort: Zwettl, Niederösterreich
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Mag. art. Ralf Wittig
Ulrike Wittig

Ausbildung:

09/1993 – 06/1997 Privat-Volksschule der Schulschwestern Zwettl
09/1997 – 06/2005 Bundesrealgymnasium Zwettl
07/2005 Erwerb des Reifezeugnisses am BRG Zwettl
01/2006 – 06/2006 Ableistung des österreichischen Präsenzdienstes
in Form des Grundwehrdienstes im Lager
Kaufholz, Allentsteig
10/2006 – 02/2014 Studium der Pharmazie an der Fakultät für
Lebenswissenschaften der Universität Wien
03/2012 – 12/2012 Diplomarbeit am Department für
Pharmakognosie an der Fakultät für
Lebenswissenschaften der Universität Wien

praktische Erfahrungen:

2007 – 2011 je einmonatiges Ferialpraktikum in den
Monaten Juli oder August in der „Apotheke zum
schwarzen Adler“, Zwettl
09/2009 Summer school of Traditional Chinese Medicine
an der University of Traditional Chinese Medicine
Chengdu, China
10/2010 – 02/2014 Tutor im Praktikum „Gewinnung und
instrumentelle Analytik“ des Studiengangs
Pharmazie der Universität Wien

10/2011 – 04/2012	Weiterbildungslehrgang für Apotheken Mitarbeiter/innen in Traditioneller Chinesischer Medizin der Wiener Schule für Traditionelle Chinesische Medizin
09/2012 – 12/2012 und 10/2013 – 01/2014	Tutor in den „Zellbiologischen Übungen 1“ des Studiengangs Biotechnologie der FH Campus Wien