



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Transfer und Etablierung verschiedener Analysemethoden zur  
Qualitätskontrolle von PET-Tracern nach Radiosynthese mittels  
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)“

verfasst von / submitted by

**Britta Steiner**

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

**Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)**

Wien, 2015 / Vienna, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

o.Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein



## **DANKSAGUNG**

- ) o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein: Zurverfügungstellung des interessanten Themas. Des Weiteren ein großes Dankeschön für das Engagement und die Betreuung.
- ) Prof. PD Mag. Dr. Markus Mitterhauser und Assoc.Prof. PD Wolfgang Wadsak, MSc PhD: Zur Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Materialien und der Arbeitsgeräte. Darüber hinaus habe ich die Besprechungen und das Feedback in Form der Jour-fixe sehr genossen.
- ) Mag. Dr. Lukas Nics: Durch ihn konnte ich sehr viel lernen und durch seine nette und geduldige Art war es mir immer möglich, offen und ehrlich mit ihm zu arbeiten. Vielen Dank für die Unterstützung!
- ) allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Nuklearmedizin am AKH Wien und allen Diplom- und Masterstudenten, die zu dem Zeitpunkt dort waren: Ich bewundere eure Arbeit und schätze es sehr, mit euch arbeiten zu dürfen.
- ) meinem Mann: Ohne dessen Liebe, Verständnis und finanzielle Unterstützung ich das Studium niemals geschafft hätte.
- ) meiner Familie: Die immer Vertrauen in mich gesetzt hat und mich somit gestärkt hat, auch wenn es schwierig war.
- ) meinen Freunden: Für ihr Verständnis, weil ich oft keine Zeit hatte und wir dafür nach den bestandenen Prüfungen gefeiert haben.
- ) meinen Ex-Arbeitskollegen: Die immer bereit waren Dienste mit mir zu tauschen und mich immer motiviert und ermutigt für das Studium haben.
- ) meinen Studienkollegen: Die mich immer mit Skripten versorgten und manche Labortage versüßten.
- ) meine „Labormädls“: Die immer ein offenes Ohr für mich hatten und ohne, die es diese Diplomarbeit nicht geben würde.
- ) meinen Zweiflern: Ich möchte auch denjenigen danken, die mir das Studium nicht zugetraut haben, denn es war mir ein großes Anliegen, ihnen das Gegenteil zu beweisen.



## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
1.1	Radiopharmaka .....	1
1.2	Strahlenphysik.....	2
1.3	Positronenemissionstomographie (PET).....	4
2	Qualitätskontrolle .....	5
2.1	Die Qualitätskontrolle eines PET Tracers.....	5
2.1.1	Parameter eines Qualitätskontrolle-Protokolls .....	6
2.1.1.1	Radiochemische Reinheit (RCR) .....	6
2.1.1.2	Chemische Reinheit.....	7
2.1.1.3	Radionuklidische Reinheit.....	9
2.1.1.4	Prüfung auf Lösungsmittel .....	10
2.1.1.5	Physikalische Parameter .....	10
2.1.1.6	Mikrobiologische Untersuchungen .....	11
2.1.2	Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).....	12
2.1.2.1	Laufmittel (mobile Phase).....	13
2.1.2.2	Gradientenmischer und Pumpe .....	13
2.1.2.3	Injektor .....	13
2.1.2.4	Säule (stationäre Phase).....	14
2.1.2.5	Detektor .....	16
2.1.3	Interpretation eines Chromatogramms .....	17
2.2	Aufgabenstellung der Diplomarbeit.....	20
2.2.1	Injektionslösung für die i.v. Anwendung (Formulierungslösung) .....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Geräte .....	21
3.2	Materialien.....	21
3.3	Laufmittel .....	23
3.3.1	Laufmittel Herstellung für den Methoden-Transfer .....	23
3.3.1.1	Ammoniumformiat Lösung .....	23
3.3.1.2	Phosphatpuffer .....	24
3.3.2	Laufmittel Herstellung für die Methoden-Etablierung .....	24
3.3.2.1	Laufmittel A: Ammoniumphosphatpuffer pH=2,1 .....	24
3.3.2.2	Laufmittel B: 90% Acetonitril (V%/V%) .....	24
3.3.2.3	Laufmittel C: 100% Aqua destillata .....	25

3.3.2.4	Laufmittel D: Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3 .....	25
3.4	Standardgerade .....	26
4	Methoden-Transfer und Methoden-Etablierung .....	27
4.1	[ <sup>11</sup> C]-L-Methionin.....	27
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften .....	27
4.1.2	Methoden-Transfer .....	27
4.1.3	Methoden-Etablierung .....	28
4.1.4	Resultate.....	29
4.1.4.1	Diskussion.....	29
4.2	[ <sup>11</sup> C]-PIB = 6-OH-BTA-1 .....	31
4.2.1	Allgemeine Eigenschaften .....	31
4.2.2	Methoden-Transfer .....	31
4.2.2.1	Absorptionsmaximum .....	32
4.2.2.2	Standardgeraden.....	33
4.2.3	Methoden-Etablierung.....	35
4.2.4	Resultate.....	35
4.2.4.1	Werte.....	35
4.2.4.2	Chromatogramme .....	36
4.2.4.3	Standardgeraden.....	37
4.2.4.4	Diskussion.....	39
4.3	[ <sup>11</sup> C]-Harmin.....	41
4.3.1	Allgemeine Eigenschaften .....	41
4.3.2	Methoden-Transfer .....	41
4.3.2.1	Absorptionsmaxima.....	42
4.3.2.2	Standardgeraden.....	43
4.3.3	Methoden-Etablierung.....	45
4.3.4	Resultate.....	45
4.3.4.1	Werte.....	45
4.3.4.2	Chromatogramme .....	46
4.3.4.3	Standardgeraden.....	47
4.3.4.4	Diskussion.....	49
4.4	[ <sup>11</sup> C]-(+)-PHNO .....	53
4.4.1	Allgemeine Eigenschaften .....	53
4.4.2	Methoden-Transfer .....	53

4.4.2.1	Absorptionsmaxima .....	54
4.4.2.2	Standardgeraden.....	55
4.4.3	Methoden-Etablierung.....	57
4.4.4	Resultate .....	57
4.4.4.1	Werte .....	57
4.4.4.2	Chromatogramme.....	58
4.4.4.3	Standardgeraden.....	59
4.4.4.4	Diskussion.....	61
4.5	[ <sup>11</sup> C]-DASB .....	67
4.5.1	Allgemeine Eigenschaften.....	67
4.5.2	Methoden-Transfer.....	67
4.5.2.1	Absorptionsmaximum.....	68
4.5.2.2	Standardgeraden.....	69
4.5.3	Methoden-Etablierung.....	71
4.5.4	Resultate .....	71
4.5.4.1	Werte .....	71
4.5.4.2	Chromatogramme.....	72
4.5.4.3	Standardgeraden.....	73
4.5.4.4	Diskussion.....	75
4.6	[ <sup>11</sup> C]-MHED.....	78
4.6.1	Allgemeine Eigenschaften.....	78
4.6.2	Methoden-Transfer.....	78
4.6.2.1	Absorptionsmaxima .....	79
4.6.2.2	Standardgeraden.....	80
4.6.3	Methoden-Etablierung.....	82
4.6.4	Resultate .....	82
4.6.4.1	Werte .....	82
4.6.4.2	Chromatogramme.....	83
4.6.4.3	Standardgeraden.....	84
4.6.4.4	Diskussion.....	86
4.7	[Carbonyl- <sup>11</sup> C]-WAY100635.....	88
4.7.1	Allgemeine Eigenschaften.....	88
4.7.2	Methoden-Transfer.....	89
4.7.2.1	Absorptionsmaxima .....	89

4.7.2.2	Standardgeraden.....	91
4.7.3	Methoden-Etablierung.....	93
4.7.4	Resultate.....	93
4.7.4.1	Werte.....	93
4.7.4.2	Chromatogramme.....	94
4.7.4.3	Standardgeraden.....	95
4.7.4.4	Diskussion.....	97
5	Diskussion.....	100
6	Zusammenfassung.....	102
7	Abstract.....	104
8	Literaturverzeichnis.....	105
9	Abkürzungsverzeichnis.....	108
10	Abbildungsverzeichnis.....	111
11	Chromatogramme.....	112
12	Tabellenverzeichnis.....	113
13	Formelverzeichnis.....	114
14	Anhang.....	115
14.1	Qualitätskontrolle-Protokoll [ <sup>11</sup> C]-PIB AKH Wien.....	116
14.2	Herstellungsprotokoll [ <sup>11</sup> C]-PIB AKH Wien.....	117
14.3	Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung (+)-PHNO.....	118
14.4	Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung DASB.....	123
14.5	Lebenslauf.....	125

# 1 Einleitung

## 1.1 Radiopharmaka

### Allgemein

*„Radioaktive Arzneimittel oder Radiopharmazeutika sind Arzneimittel, die in verwendungsfertiger Form ein Radionuklid oder mehrere Radionuklide (radioaktive Isotope) zu medizinischen Zwecken enthalten.“ [1]*

In der Medizin werden Radiopharmaka sowohl für die Therapie als auch für die Diagnostik von z.B. Schilddrüsen- und Tumorerkrankungen verwendet.

Für Radiopharmazeutika gilt ebenfalls das **ADME Modell** der Pharmakokinetik.

### **A: Absorption**

Die Aufnahme der Radiopharmaka erfolgt meistens durch intravenöse Injektion, sowie subkutan, oral oder durch Inhalation. [2]

### **D: Distribution**

Die Verteilung im Organismus erfolgt durch Bindung an Erythrozyten und Serumproteine, Diffusion oder aktive biochemische Transportvorgänge. Durch gezieltes Koppeln an eine geeignete Trägersubstanz erhöht sich dessen Selektivität. Man nützt bei der nuklearmedizinischen Anwendung die Affinität oder Anreicherungsneigung des Radiopharmakons zu bestimmten Organen oder Krankheitsprozessen. [2]

### **M: Metabolismus**

Radiopharmaka unterliegen denselben Prozessen, wie das entsprechende stabile Isotop. Nach der Verteilung des Radiopharmakons im Körper wird es Bestandteil metabolischer Vorgänge, z.B. in der Leber. [2]

### **E: Exkretion**

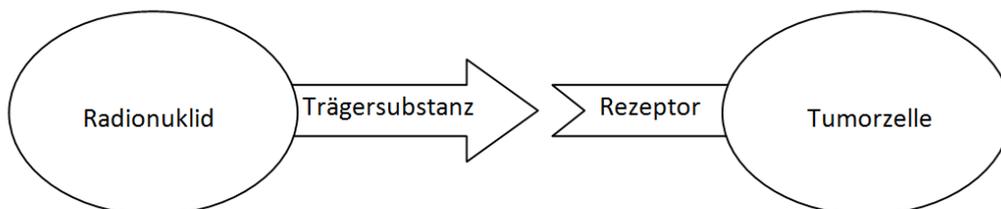
Die Ausscheidung des Radiopharmakons erfolgt über die Galle oder die Nieren, wobei es vorher in der Blase und vor allem im Dickdarm längere Zeit als lokale Strahlungsquelle wirken kann, was man sich bei der bildgebenden Diagnostik zum Nutzen macht. [2]

## Diagnose

Als stellvertretendes Beispiel für eine Diagnose mit einem PET Radiopharmakon eignet sich das weitaus am Häufigsten verwendete [<sup>18</sup>F]FDG (2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-glucose). Es verteilt sich nach der i.v. Verabreichung vorerst homogen im Körper und reichert sich v.a. im Gewebe mit einem erhöhten Glucosebedarf an. Schnell wachsende Zellen, wie Tumorzellen haben einen erhöhten Glucosebedarf und somit dient dieser Mechanismus als Tumormarker. [3] Eine vielversprechende Rolle der FDG-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) konnte bereits bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. [4]

## Therapie

Für die Herstellung eines Radiotherapeutikums wird, nicht nur für die Diagnose sondern auch für die Therapie, ein geeignetes Radionuklid an eine Trägersubstanz gekoppelt und in die Blutbahn injiziert. Durch seine spezifische biologische Affinität zum Rezeptor, auf der Tumoroberfläche, gelangt das mitgeführte Radionuklid direkt zum Tumorgewebe, welches mittels direkter Bestrahlung zerstört wird. [5]



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der Wirkweise eines Radiopharmakons**

## **1.2 Strahlenphysik**

Als radioaktiv wird ein Atom bezeichnet, dessen Kern instabil ist. Ein Kern besteht aus 2 verschiedenen Nukleonen, den sogenannten Protonen und Neutronen. Die Massenzahl A gibt die Summe der Nukleonen an, die Anzahl der Protonen wird als Kernladungszahl Z, oder auch Ordnungszahl, bezeichnet. Die allgemeine Schreibweise für einen Kern X sieht wie folgt aus: [4]



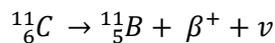
Das Verhältnis zwischen Neutronen und Protonen im Kern lässt darauf schließen, ob es sich um ein stabiles oder instabiles (radioaktives) Nuklid handelt. Ein radioaktiver Kern wandelt sich unter Abgabe von Strahlung ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Strahlung) spontan in eine stabile Konfiguration um. Durch gezieltes Entfernen mittels Teilchenbeschleuniger (Zyklotron) von Neutronen werden radioaktive Nuklide künstlich erzeugt. [4] Neben der Herstellung radioaktiver Nuklide mittels Zyklotron existiert für die nuklearmedizinische Anwendung noch die Möglichkeit mit dem Generator Radionuklide zu generieren.

#### Herstellung von Kohlenstoff-11 (C-11)

Der stabile Stickstoff N-14 wird durch Protonenbeschuss ( $p$ ), unter Emission eines  $\alpha$ -Teilchens in C-11 umgewandelt. Die dazugehörige Kernreaktion wird wie folgt dargestellt: [6]



Das neugebildete instabile C-11 wird durch einen  $\beta^+$  Zerfall mit einer Halbwertszeit von 20,3 min in ein stabiles Bor [ $^{11}\text{B}$ ] Atom umgewandelt. Durch Positronenemission zerfällt ein C-11 unter Bildung eines Bor-11 Atoms, eines Positrons ( $\beta^+$ ) und eines Neutrinos ( $\nu$ ). [4, 7]



Diesen Vorgang macht man sich in der Diagnostik durch einen Positronen-Emissions-Tomographen (PET) zunutze.

Die vorliegende Diplomarbeit hat sich im praktischen Teil ausschließlich mit C-11-Radiotracer befassen, wobei mittels Teilchenbeschleuniger das Radionuklid generiert wurde.

### 1.3 Positronenemissionstomographie (PET)

Die PET ist eine leistungsfähige Bildgebungsmethode, die zur Untersuchung und Visualisierung der menschlichen Physiologie eingesetzt wird um Informationen über Stoffwechselforgänge, Rezeptor-Enzym-Funktionen und biochemische Mechanismen in vivo zu erhalten. Dadurch kann die PET chemische Veränderungen messen, die bereits vor dem Auftreten anatomischer Krankheitszeichen auftreten. [7]

Dem Patienten wird das Radiopharmazeutikum verabreicht wo es im Körper Positronen emittiert ( $\beta^+$ ), welches nicht direkt detektiert wird, vielmehr wandert es eine kurze Strecke (0,5-2.0 cm, je nach seiner charakteristischen kinetischen Energie) und kollidiert mit einem Elektron im umgebenden Gewebe, was zu einem Annihilationsereignis führt. [7]

Der PET Scanner hat die Form einer Röhre mit ringförmig angeordneten Detektoren. Abbildung 2 zeigt die Kollision von Materie und Antimaterie, wodurch zwei Gammastrahlphotonen ( $\gamma$ ) von 511 Kiloelektronenvolt (keV) erzeugt werden, die sich im Winkel von  $180^\circ$  in gegensätzliche Richtungen voneinander wegbewegen. [7]

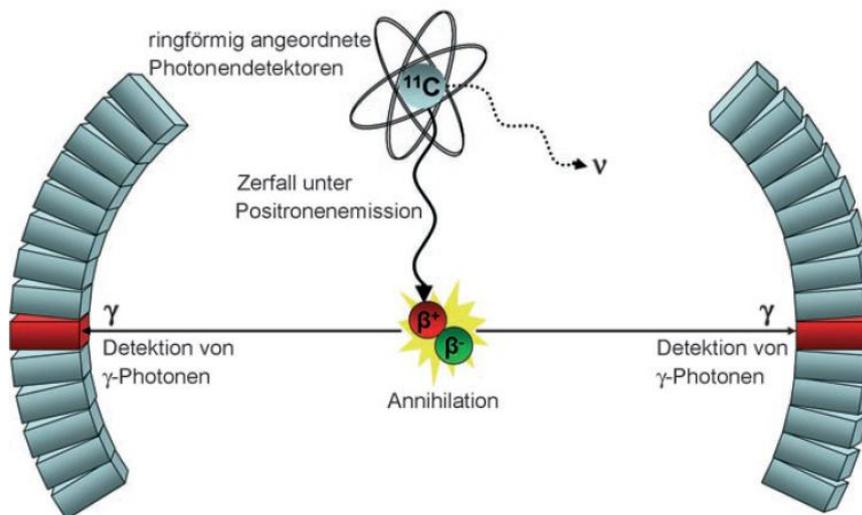


Abbildung 2 Prinzip der PET [7]

## 2 Qualitätskontrolle

### 2.1 Die Qualitätskontrolle eines PET Tracers

Die Qualitätskontrolle ist der wohl wichtigste Endpunkt eines jeden Arzneimittels, bevor es zur Anwendung am Menschen freigegeben werden kann. Das Europäische Arzneibuch 8. Ausgabe Grundwerk 2014 inkl. 1. bis 3. Nachtrag 8.3 beinhaltet in seinen insgesamt 6429 Seiten viele Kriterien, die erfüllt werden müssen, um dies garantieren zu können. Im allgemeinen Teil findet man zahlreiche Prüfvorschriften und Grenzwerte, nicht nur für Pharmaka, sondern auch speziell für Radiopharmaka.

Dass es sich bei Radiopharmaka um Arzneimittel handelt, ist dem §1 des Arzneimittelgesetzes (AMG) zu entnehmen: [8]

*„Radioaktive Arzneimittel“ sind Arzneimittel, die in gebrauchsfertiger Form ein oder mehrere für medizinische Zwecke aufgenommene Radionuklide (radioaktive Isotope) enthalten.“ [8]*

## 2.1.1 Parameter eines Qualitätskontrolle-Protokolls

Im Anhang ist ein Arbeitsprotokoll enthalten, welches die durchzuführenden Analysen der Qualitätskontrolle des Radiotracers [<sup>11</sup>C]-PIB am AKH Wien Abteilung Nuklearmedizin zeigt. Dessen Punkte werden nachfolgend schrittweise erläutert.

### 2.1.1.1 Radiochemische Reinheit (RCR)

*„Radiochemische Reinheit: für ein bestimmtes Radionuklid das in Prozent ausgedrückte Verhältnis der Radioaktivität des Radionuklids in der angegebenen chemischen Form, bezogen auf die Gesamtradioaktivität des Radionuklids im radioaktivem Arzneimittel.“ [1]*

Die radiochemische Reinheit wird mittels eines Radioaktivitäts-Detektors, der meist an eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt ist gemessen, und ist notwendig, um feststellen zu können, ob die Probe radiochemische Verunreinigungen enthält. Es sind meist zwei Verunreinigungen erlaubt, wenn sie je  $\leq 3\%$  betragen. Verunreinigungen lassen sich meist auf die Herstellung oder radiolytische Prozesse zurückführen. [4]

In der Abbildung 3 werden zwei Chromatogramme dargestellt. Die ermittelten Retentionszeiten der verschiedenen Messkanäle geben Auskunft über die, in der Messlösung enthalten, Stoffe.

Das untere der beiden Chromatogramme zeigt die Integration des Radiopeaks (heißer Peak). In der Tabelle ist zu erkennen, dass [<sup>11</sup>C]-PIB, welches bei 5 min 38 sek retentiert mit einer radiochemischen Reinheit von 99,44% vorliegt. Die radiochemische Verunreinigung (erkennbar bei 2 min 32 sek) ist unter 3% und somit entspricht die Probe aus radiochemischer Sicht den Anforderungen.

### 2.1.1.2 Chemische Reinheit

„Chemische Reinheit: In den Monographien über radioaktive Arzneimittel sind die Anforderungen an die chemische Reinheit durch Spezifizierung von Grenzwerten für die chemischen Verunreinigungen festgelegt.“ [1]

Durch die Verwendung von UV-Detektoren in der HPLC werden die nicht radioaktiv markierten (kalte) Substanzen angezeigt. Deren Nachweis für die chemische Reinheit und zur Bestimmung der spezifischen Aktivität notwendig ist. Als spezifische Aktivität wird das Verhältnis von der radioaktiven Substanz zu der inaktiven Trägersubstanz bezeichnet, die dazugehörige Einheit ist [GBq/μmol]. [4]

Formel zur Berechnung der spezifischen Aktivität: [4]

$$a_s = \frac{\text{Aktivität der Verbindung [GBq]} \times \text{Molgewicht der Verbindung [g/mol]}}{\text{Masse der Verbindung } [\mu\text{g}]}$$

#### Formel 1 Spezifische Aktivität

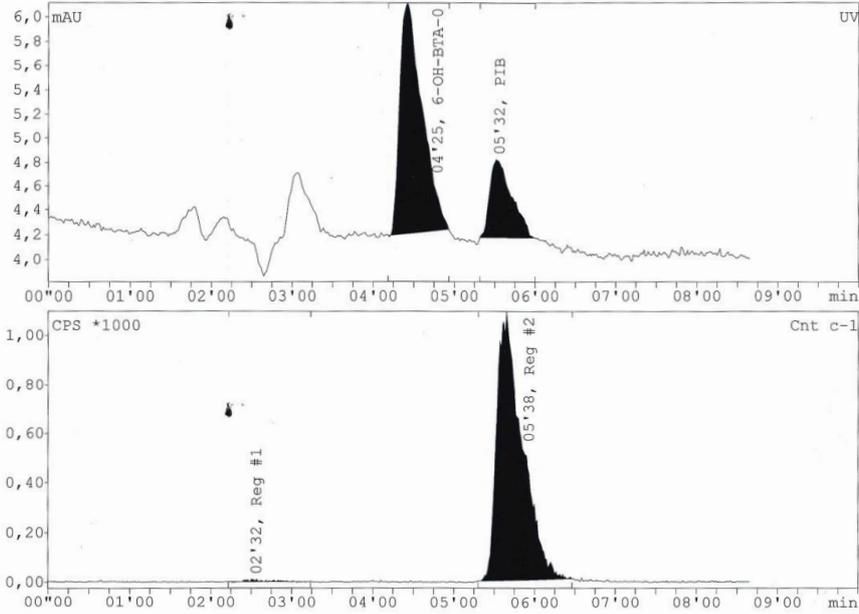
Im menschlichen Körper konkurrieren die kalten mit den heißen Molekülen um die Bindungsstellen an definierten Geweben wie unter anderem Rezeptoren, Transportern oder Enzymen. Somit ist es wichtig, den Anteil der kalten Moleküle in der Lösung gering zu halten, damit daraus eine hohe spezifische Aktivität resultiert.

Das obere Chromatogramm in der Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Messung mittels UV-Detektor, und somit die nicht radioaktiven Komponenten der Prüflösung. Der Retentionszeitpunkt (4min 25 sek) zeigt in diesem Fall den Precursor (6-OH-BTA-0).

Ein Precursor ist eine Substanz, welche als Vorläufer dient und aus dem das gewünschte Produkt synthetisiert werden kann. Beim [<sup>11</sup>C]PIB (= 6-OH-BTA-1) ist der Precursor 6-OH-BTA-0. Dieser unterscheidet sich zum Produkt durch eine Methylgruppe.

Die Größe der Fläche unter der Kurve (Integral) entspricht nach Rückrechnung über eine Kalibrationsgerade der Konzentration der Substanz. Die dadurch berechneten Werte sind in der Tabelle (Integration UV) dokumentiert.

C:\GINA\_NT\HPLC\_rechts\PIB\PIB0113



**Sample description**

Study: PIB  
 Measurement: 0113, injection : 25.03.2015 07:50  
 Method: PIB from: 02.03.2015 08:46  
 Produkt endformuliertC11-PIB  
 column: Phenomenex Prodigy 5µm 250x4mm  
 eluent: AcN/0.1 M AMF 50/50 (v/v)  
 flow: 1.5ml/min  
 UV-Det: WL=254nm

**Integration Cnt c-1**

Substance	R/T s	Type	Area Counts	Conc µg/ml	%Area %
Reg #1	02'32	BB	136,14	No c	0,56
Reg #2	05'38	BB	24004,00	No c	99,44
Sum in ROI			24140,14		
Area			26279,00		
Ext. BKG			0,00 CPS		

**Integration UV**

Substance	R/T s	Type	Area mAU*s	Conc µg/ml	%Area %
6-OH-BTA-0	04'25	BB	37,05249	1,91	75,20
PIB	05'32	BB	12,21956	0,67	24,80
Sum in ROI			49,27205		

Abbildung 3 Original QK Chromatogramme einer [<sup>11</sup>C]-PIB Radiosynthese

### **2.1.1.3 Radionuklidische Reinheit**

*„Radionuklid-Reinheit: für ein bestimmtes Radionuklid das in Prozent ausgedrückte Verhältnis der Radioaktivität des Radionuklids, bezogen auf die Gesamtradioaktivität des radioaktiven Arzneimittels. Eine Liste der relevanten, in Frage kommenden Radionuklid-Verunreinigungen ist in jeder Einzelmonographie mit entsprechenden Grenzwerten angegeben.“ [1]*

Die Halbwertszeit der zu prüfenden Substanz gibt Auskunft über die Richtigkeit des Radionuklids. Die Ermittlung der Halbwertszeit ist ein Teil der Qualitätskontrolle und beträgt bei C-11  $20,3 \pm 2$  min.

#### 2.1.1.3.1 Halbwertszeit

Die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) ist die Zeit, in der eine gegebene Radioaktivität (Menge) eines Radionuklids, nach einer exponentiellen Zerfallsrate, auf die Hälfte ihres Ausgangswerts zerfällt. [1]

Zur Durchführung der QK wird zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten die Aktivität gemessen und mit der Formel der Zerfallskonstante berechnet.

#### 2.1.1.3.2 $\gamma$ - Spektrum

Ein wichtiges Kriterium für die Qualität des Radionuklides ist die charakteristische Form des  $\gamma$ -Spektrums. Die Strahlung wird mit einem Spektrometer gemessen, und muss bei Positronen-Emittern zwischen 430 bis 520 keV liegen.

#### **2.1.1.4 Prüfung auf Lösungsmittel**

Lösungsmittel werden für den Synthesevorgang benötigt, dürfen aber nicht im Endprodukt vorhanden sein. Daher ist es wichtig, auch kleinste Mengen an Lösungsmittel nachzuweisen. Die Prüfung geschieht mittels eines Gaschromatographen.

Die einzuhaltenden Grenzwerte sind am Prüfprotokoll und ebenfalls im Ph.Eur. ersichtlich. Im Fall des [<sup>11</sup>C]-PIB müssen Substanzen wie Methylethylketon (MEK) unter 5000 ppm und Acetonitril (ACN) unter 410 ppm liegen.

#### **2.1.1.5 Physikalische Parameter**

Um eine Abwehrreaktion des Körpers bei i.v. Applikation zu verhindern, dient die Formulierung der Einstellung der physikalischen Parameter (pH-Wert und Osmolalität) möglichst nahe an die physiologischen Bedingungen des menschlichen Blutes anzupassen. Der pH-Wert des menschlichen Blutes beträgt ca. 7,4, deshalb sollte der pH-Wert der gebrauchsfertigen Lösung zwischen 4,5 und 8,5 liegen. Lösungen mit einer Osmolalität von 276 mosmol/kg bezeichnet man als blut-isoton, deshalb sollte die Osmolalität eines Radiopharmakons zwischen 200 und 400 mosmol/kg betragen. [6]

##### 2.1.1.5.1 pH-Wert

*„Der pH-Wert beschreibt in einer konventionell festgelegten logarithmischen Skala die Konzentration der Hydroxonium-Ionen in wässriger Lösung.“* [1] Mittels pH-Meter wird der Wert ermittelt.

##### 2.1.1.5.2 Osmolalität

*„Die Osmolalität ist eine praktische Größe, um das Gesamtmaß des Beitrags verschiedener gelöster Stoffe in einer Lösung auf den osmotischen Druck dieser Lösung auszudrücken.“* [1]

### **2.1.1.6 Mikrobiologische Untersuchungen**

Um die Patienten vor Infektionen durch das Radiopharmakon zu schützen, müssen sämtliche Radiopharmaka mikrobiologisch untersucht werden. Die mikrobiologische Untersuchung ist kein tatsächlicher Bestandteil der Qualitätskontrolle vor der Applikation des Radiopharmakons, da die Durchführung längere Zeit (Stunden bis Wochen) in Anspruch nimmt. Sie liefert somit retrospektiv mikrobiologische Informationen des Radiopharmakons. [6]

Bedingt durch die Halbwertszeit können radioaktive Arzneimittel bereits vor dem Untersuchungsergebnis verabreicht werden. Dies ist im Europäischen Arzneibuch verankert. [1]

#### **2.1.1.6.1 Sterilität**

Als steril wird ein Stoff bezeichnet der frei von lebensfähigen Mikroorganismen ist. [1]

*„Radioaktive Arzneimittel zur parenteralen Anwendung müssen der Prüfung auf Sterilität entsprechen. Sie müssen unter Bedingungen, die jede mikrobielle Kontamination ausschließen und Sterilität gewährleisten, hergestellt werden.“ [1] „Die gebrauchsfertige Lösung muss zur Gewährleistung von Keim und Partikelfreiheit unter aseptischen Bedingungen - innerhalb einer Laminar-Air-Flow-Zelle, Reinraumklasse A, innerhalb eines Raumes der Reinraumklasse D- steril filtriert werden.“ [6]*

#### **2.1.1.6.2 Bakterien-Endotoxine, Pyrogene**

Bakterien-Endotoxine und Pyrogene sind krankheits- bzw. fiebererregende Substanzen, deshalb schreibt das Europäische Arzneibuch die Prüfung auf diese Stoffe vor.

## 2.1.2 Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine chromatographische Trennmethode um Inhaltsstoffe einer flüssigen Probe bestimmen zu können. Es stehen unterschiedliche Trennprinzipien zur Verfügung. Die Gemeinsamkeit aller Trennprinzipien ist es, verschiedene Inhaltsstoffe einer Prüflösung aber auch der mobilen Phase durch Wechselwirkungen mit einer stationären Phase unterschiedlich stark zurückzuhalten (retentieren). Dadurch ergeben sich für die unterschiedlichen Inhaltsstoffe unterschiedliche Retentionszeiten. Durch diese selektive Trennung der Komponenten voneinander können die einzelnen Inhaltsstoffe analysiert werden.

Eine HPLC Anlage besteht im Wesentlichen aus folgenden Bestandteilen:

- Laufmittel (mobile Phase)
- Gradientenmischer
- Pumpe
- Injektor
- Säule (stationäre Phase)
- Detektor
- Integrator (Computer)

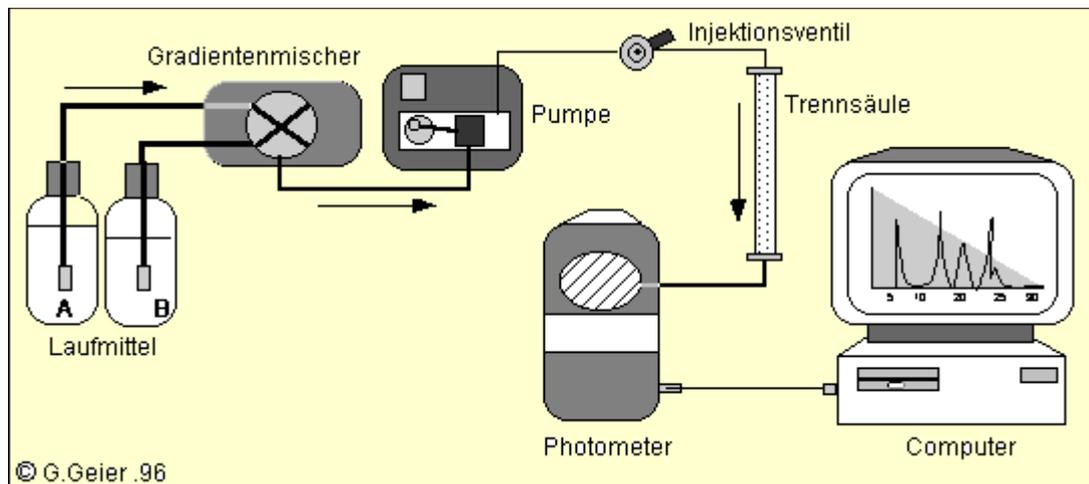


Abbildung 4 Schematischer Aufbau einer HPLC Anlage [9]

### **2.1.2.1 Laufmittel (mobile Phase)**

Für jede zu untersuchende Substanz muss das adäquate Laufmittel bzw. die richtige Zusammensetzung des Laufmittels, gewählt werden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist abhängig von den Eigenschaften z.B. Polarität (hydrophil oder lipophil) der Prüflösung. Polarität von verschiedenen Chemikalien, die in Laufmitteln zum Einsatz kommen finden sich in der „elutropen Reihe“ wieder. [10] Die Mischung des Laufmittels kann manchmal aus bis zu vier verschiedenen Lösungen bestehen. Im Gradientenmischer werden die unterschiedlichen Lösungen zu einem Laufmittel vermengt.

### **2.1.2.2 Gradientenmischer und Pumpe**

Bleibt das Mischverhältnis über die gesamte Versuchsdauer konstant, spricht man von einer isokratischen Elution, wird jedoch das Verhältnis während der Analyse verändert, nennt man das Gradientenelution. Der Gradient der Mischung kann durch zwei verschiedene Arten gebildet werden, entweder durch die Hochdruckmischung oder durch die Niederdruckmischung. Bei der Hochdruckmischung wird für jede Lösung eine eigene Pumpe (Einkanalpumpe) benötigt, die die Lösung in den Gradientenmischer fördert. Bei der Niederdruckmischung wird das Laufmittel zuerst im Gradientenmischer gemischt, und anschließend mit einer Gradientenpumpe weiter zum Injektorventil befördert. [4, 10] Diese Art der Laufmittelaufbereitung wird in Abbildung 4 dargestellt. Mit einer Regelung der Pumpe lässt sich die Durchflussmenge pro Minute einstellen, der sogenannte Flow (= Flussrate [ml/min]). Ein Entgaser sorgt dafür, dass eventuelle Luftbläschen aus den Lösungen entfernt werden.

### **2.1.2.3 Injektor**

Die Prüflösung wird entweder automatisch durch einen Autosampler oder manuell mittels Injektionsventil dem System zugeführt. Bei dem Injektionsventil handelt es sich um ein 6 Wege Ventil, welches Pumpe, Loop, Einspritzstelle, Wastegate (Abfall) und Säule verbindet. Das Ventil wird in zwei Stellungen betrieben:

- Load
- Inject

Die Load Stellung dient dazu, die sogenannte Probenschleife (Loop) ausreichend mit der Prüflösung drucklos zu befüllen. Unterschiedliche Loops stehen für die Untersuchung zur Verfügung und unterscheiden sich durch ihr Volumen. Um eine vollständige Befüllung der Loop zu gewährleisten, sollte die Prüflösung das zwei- bis dreifache Volumen der Loop ausmachen. Das Volumen der Loop definiert die Menge an Prüflösung, die ins System eingebracht wird. Durch Umschalten des Ventiles auf die Inject Position wird die Probenschleife in den Hochdruckbereich geschaltet und die Probe, durch die mobilen Phase, zur Säule geleitet. [11]

#### **2.1.2.4 Säule (stationäre Phase)**

Die Trennsäule besteht aussen in der Regel aus Edelstahl oder Kunststoff und birgt innen die sogenannte stationäre Phase. Diese hat als Grundstruktur Silica Gel (Kieselgel). Das Silica Gel ist ein wasserhaltiges Siliziumdioxid, welches durch die freien OH Gruppen auf der Oberfläche polar ist, und bindet polare Moleküle mittels Wasserstoffbrückenbindung, unpolare Moleküle werden hingegen nicht adsorbiert. Werden polare Prüfsubstanzen mittels unpolaren Laufmittels durch die stationäre Phase geleitet handelt es sich um eine Normal Phase. [12] Bei der Umkehrphase, der sogenannten Reverse Phase verhält es sich umgekehrt. In diesem Fall, wird das Silicagel durch lipophile Reste, z.B. C18-Ketten, modifiziert. Heutzutage werden fast ausschließlich RP Säulen eingesetzt. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal des Füllmaterials liegt in der Korngröße des Kieselgels. Überlicherweise werden Silica Gele mit einer Korngröße zwischen 2 und 10µm verwendet, bei neueren Säulen wird bereits mit Korngrößen von 1µm gearbeitet. [10]

Je nachdem um welche Säule es sich handelt, werden die Substanzgemische in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften unterschiedlich aufgetrennt. Die Retentionszeit einer Substanz ist umso länger, je länger diese durch die Wechselwirkungen in der Säule zurück gehalten wird. Die verschiedenen Säulen unterscheiden sich in der Länge, dem Innendurchmesser und den Füllmaterialien. Letzteres bestimmt die Funktionsweise der Säule.

Die Säule befindet sich oftmals in einem Säulenofen, der es erlaubt eine konstante Temperatur zu halten, und somit eine Variable, die die Messung beeinflussen könnte, zu eliminieren.

Die Kennzeichnung der Säule gibt Auskunft über dessen Eigenschaften.

Phenomenex	Aqua	5 $\mu$ m	C18	250x4,6mm
• Hersteller	• Modell	• Korngröße	• Polarität	• Länge x Innendurchmesser

Abbildung 5 Kennzeichnung einer Säule

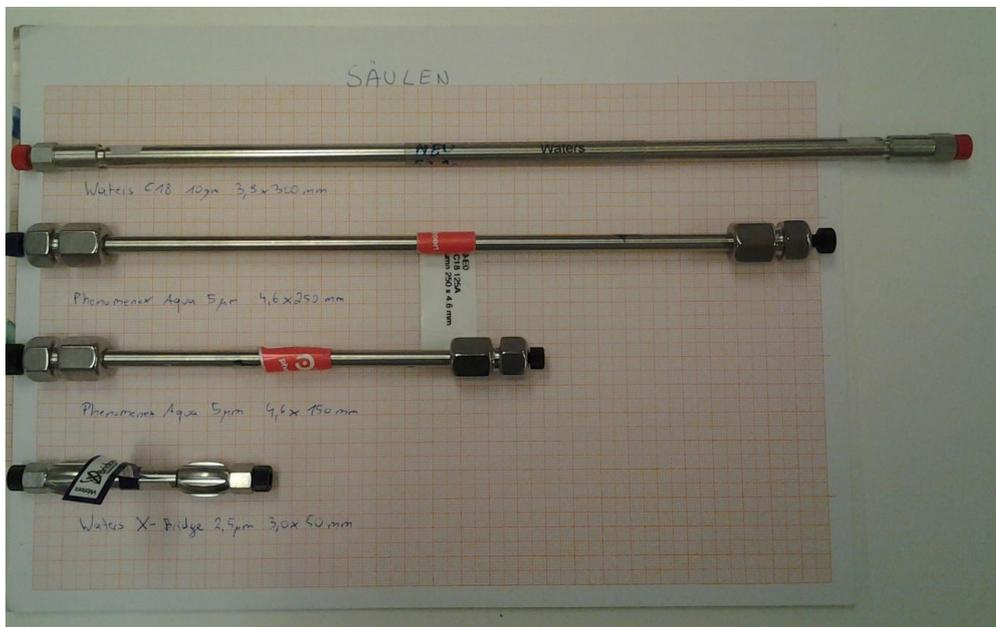


Abbildung 6 HPLC-Säulen

Mit den oberen drei abgebildeten Säulen wurde ein Teil des Methoden-Transfers durchgeführt und mit der „Waters X-Bridge RP-18, 2,5 $\mu$ m 3,0x50mm“ die Methoden-Etablierung.

### **2.1.2.5 Detektor**

Ein Detektor wandelt physikalische Informationen von Molekülen in elektrische Signale um. Je nach dem welche Eigenschaft die zu messenden Substanzen haben, kann ein dementsprechender Detektor ausgewählt werden. Für die Qualitätskontrolle an der Klinischen Abteilung für Nuklearmedizin sind folgende Detektoren in Verwendung:

- UV/VIS Detektor
- Brechungsindex Detektor
- Flammen-Ionisations Detektor
- Radioaktivitäts-Detektor

Da für vorliegende Diplomarbeit nur ein UV/VIS beziehungsweise Radioaktivitäts-Detektor zum Einsatz kamen, sind auch nur diese beiden näher erklärt.

#### UV/VIS Detektor

Der Detektor besteht in seinen Grundelementen aus einer Deuterium- bzw. Wolframlampe einem Spiegelsystem, und einer Photomesszelle. [13] Die Deuterium Lampe wird für Messungen im UV Bereich (190 bis 400 nm) verwendet, die Wolfram Lampe für den visuellen Bereich (400 bis 700 nm). [10] Die Wellenlängen können variabel gewählt werden.

Die Funktionsweise eines UV/VIS Detektors ist bei einfacher Bauweise wie folgt: Das Licht trifft von der Strahlenquelle auf ein Prisma, wird dort gestreut und trifft als monochromatisches Licht (eine Wellenlänge) auf eine Durchflussmesszelle. Eine Photomesszelle, die danach positioniert ist, misst die Abschwächung des Lichtes in der Messzelle, welche durch durchfließende Substanzen unterschiedlich bedingt ist, und setzt es in Relation zur Abschwächung des Lichtes durch die mobile Phase. Bei komplexeren Detektoren, wie dem Diodenarray-Detektor (DAD) ist die Anordnung der Bauelemente abgeändert. Hierbei trifft das Licht erst nach der Durchflussmesszelle auf das Prisma, wird gestreut und gelangt auf eine Diodenplatte, auf der bis zu 1024 Dioden positioniert sind. Dadurch kann für Messungen immer der komplette Wellenlängenbereich (190-700 nm) abgedeckt werden. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption (A) von der Konzentration der Substanz, dem molaren Extinktionskoeffizienten und der Länge des Weges, den das Licht durch die Probe zurücklegt, abhängig. [14]

$$A = \varepsilon * c * d$$

**Formel 2 Lambert Beer'sches Gesetz**

$\varepsilon$	=	molarer (dekadischer) Extinktionskoeffizient
$c$	=	Konzentration der Probe
$d$	=	(nach IUPAC I) Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe

Radioaktivitäts-Detektor

Ein Radioaktivitäts-Detektor dient zum Nachweis unterschiedlicher Strahlungsarten wie  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Strahlern. Je nach Bauweise eines Detektors ist dieser für bestimmte Strahlungsarten spezifisch. In der Nuklearmedizin bedient man sich bei der HPLC einer Bauart die für  $\beta^-$ -Strahler (z.B. Y-90, P-32, Lu-177), für  $\beta^+$ -Strahler (Positronenstrahler) wie z.B. C-11, F-18 oder Ga-68, aber auch für  $\gamma$ -Strahler (z.B. Tc-99m oder In-111) selektiv ist. Gemessen werden immer die Zerfälle (Counts) pro Zeiteinheit. [6, 15] Der bleiabgeschirmte Detektor besteht aus einem anregbaren Kristall (meist Natriumiodid) und einer Photomultiplieröhre zur Signalverstärkung. [6]

**2.1.3 Interpretation eines Chromatogramms**

Die Signale der Detektoren werden als Peaks bezeichnet und als zeitlicher Verlauf, der Konzentration der Substanz, in Form eines Chromatogramms ausgegeben. Ein Peak hat im Idealfall die Form einer symmetrischen Gauß'schen Glockenkurve. Ist sie nicht symmetrisch spricht man von „Fronting“ bzw. vom „Tailing“. Der letzte Peak in Abbildung 7 zeigt ein Tailing, welches dadurch erkennbar ist, dass der Peakanstieg steiler als der Peakabfall ist. Beim Fronting verhält es sich vice versa. Ein asymmetrischer Peak wird durch sein **Tailing (T)** charakterisiert: [10]

$$T = \frac{b}{a}$$

**Formel 3 Tailing (T)**

Die Abschnitte a und b, welche auf 10% der Peakhöhe liegen, werden durch eine Senkrechte, die durch das Peakmaximum verläuft, getrennt.

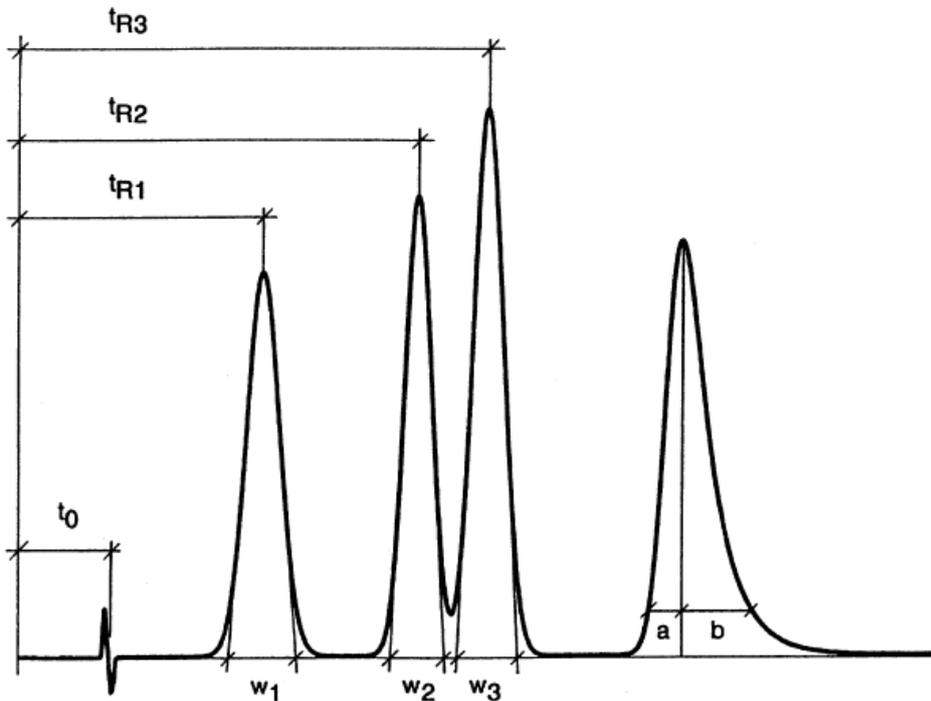


Abbildung 7 Chromatogramm [16]

$t_0$  = Totzeit (Durchbruchzeit) der Trennsäule; die Zeit, die die mobile Phase ohne Wechselwirkung benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern. [15]

$w$  = Basisbreite eines Peaks. Die Basisbreite ist die Strecke auf der Basislinie, die von den Wendetangenten begrenzt wird. [15]

$t_R$  =  $Rt$ , Retention Time / Retentionszeit; die Zeit, welche vom Einspritzen eines Stoffes bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht. Zwei verschiedene Stoffe werden dann getrennt, wenn ihre Retentionszeiten verschieden sind. [15]

Die Länge der Trennsäule und die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase beeinflussen die Retentionszeit. Je länger die Säule und je langsamer die mobile Phase, desto größer ist  $t_0$  und damit auch  $t_R$ . Durch diesen Umstand ist  $t_R$  für die Charakterisierung einer Substanz nicht gut geeignet, besser ist der **Retentionsfaktor (k-Wert) (früher Kapazitätsfaktor)**. Optimal ist der k-Wert zwischen 1 und 10. Große k-Werte bedeuten lange Analysezeiten. [15]

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

**Formel 4 Retentionsfaktor**

Es kommt nur zu einer Trennung, der Mischung, wenn die einzelnen Komponenten unterschiedliche Retentionsfaktoren besitzen. Für jede Komponente kann dessen k-Wert, mit der angegebenen Formel, berechnet werden. Das Verhältnis zweier k-Werte, nennt man **Trennfaktor  $\alpha$  (Selektivität)** und ist ein Mass für die Güte der Trennung zweier benachbarter Peaks. [15]

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \text{ mit } k_2 \geq k_1$$

**Formel 5 Selektivität ( $\alpha$ )**

Daraus ergibt sich, dass  $\alpha > 1$  sein muss, damit es zu einer Trennung der Komponenten kommt.

Bei der Berechnung des Trennfaktors wird die Breite des Peaks jedoch nicht berücksichtigt, daher können sich Peaks mit unterschiedlichen Retentionsfaktoren, überschneiden. In Abbildung 7 ist so ein Fall erkennbar, hier kommt es nicht zu einer Basislinien-Trennung. Deswegen wird bei der Berechnung der **Auflösung (R)** die Basisbreite (w) miteinbezogen.

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2}$$

**Formel 6 Auflösung (R)**

Eine Auflösung von 1 ist in der Regel für eine quantitative Analyse zu wenig. Möchte man eine Basislinien-Trennung erreichen ist ein Wert von mindestens  $R=1,5$  notwendig. [15]

Durch Änderung verschiedener Faktoren wie z.B. Säule und/oder Laufmittels können sowohl der Trennfaktor als auch die Auflösung verbessert werden.

## 2.2 Aufgabenstellung der Diplomarbeit

Der erste Teil der praktischen Arbeit bestand darin, bereits etablierte und in Verwendung befindliche Analyse Methoden der sieben unterschiedlichen C-11 PET-Tracer von einer HPLC der Marke Merck Hitachi L-7100 LaChrom auf eine neue HPCL Anlage der Marke Agilent 1260 Infinity zu transferieren. Um die Methoden maximal zu optimieren, wurde zu Beginn das Absorptionsmaximum jedes Tracers (und Precursors) ermittelt, mit welchem die neuen Standardgeraden erstellt werden konnten.

Der zweite Teil der Diplomarbeit bestand darin, besagte etablierte Methoden zu verbessern um dadurch Zeit bei der Qualitätskontrolle zu sparen. Dies wurde in Anlehnung an die Publikation: „1-Minute quality control tests for positron emission tomography radiopharmaceuticals“ von Ryuji Nakao et al., erschienen im Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 245-251, durchgeführt.

### 2.2.1 Injektionslösung für die i.v. Anwendung (Formulierungslösung)

#### Allgemein

Die im Herstellungsprotokoll (siehe Anhang) genannten Reagentien beschreiben u.a. einen Teil der Zusammensetzung der Lösung, in die der fertig synthetisierte Tracer eingeleitet wird. Diese sogenannte „Formulierungslösung“ besteht aus einer wässrigen Mischung von isotonem Puffer (pH 7,4) und einem Ethanol Anteil von ca. 8,5%. Die sterilfiltrierte Mischung aus Formulierungslösung und Tracer darf laut Arzneibuch durch i.v. Anwendung dem Patienten zugeführt werden.

#### Zusammensetzung der Formulierungslösung: (Summe = 17,5ml)

0,9% NaCl (5ml+4ml+5ml) =	14ml
EtOH	1,5ml
3% NaCl	1,0ml
125mM Phosphatpuffer	1,0ml

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

Agilent 1260 Infinity, Fa. Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
- 1260 Quat. Pump. G1311B
- 1260 TCC G 1316A
- 1260 MWD VL G 1365D
- 1260 Man. Inj. G1328C
Oberschalenwaage PJ300 Fa. Mettler-Toledo GmbH ,Wien, Österreich
Analysenwaage Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Fa. Merck, Wien, Österreich
Microprocessor pH-Meter pH537 Fa. WTW, Weilheim, Deutschland
Kolbenhubpipette, Eppendorf Research Plus, Hamburg, Deutschland

#### 3.2 Materialien

<b>Fa. ABX, Radeberg, Deutschland</b>
6-OH-BTA-0 (GMP), > 97%, CAS [178804-18-7]
6-OH-BTA-1 (free base), >95%, CAS [566169-93-5]
Harmol, >95%, CAS [487-03-6]
Harmin, >95%, CAS [442-51-3]
(+)-HNO Hydrochlorid, >95%, CAS [858517-21-2]
(+)-PHNO Hydrochlorid, >95%, CAS [99705-65-4]

MASB, >95%, CAS [296774-10-2]
DASB, >95%, CAS [627490-01-1]
Metaraminol (free base), >90%, CAS [54-49-9]
MHED Hydrochlorid, >95%, CAS [24493-89-8]
WAY 100634, >95%, CAS [155204-28-7]
WAY 100635, >95%, CAS [146714-97-8]
<b>Fa. Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</b>
1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat, ≥99%, CAS [207596-29-0]
Acetonitril, CHROMASOLV® PLUS, ≥99,9%, CAS [75-05-8]
Ammoniumdihydrogenphosphat, BioUltra, ≥99,5%, CAS [7722-76-1]
Ammoniumformiat, purum p.a., ≥97%, CAS [540-69-2]
Dimethylsulfoxid, wasserfrei, ≥99,9%, CAS [67-68-5]
DL-Homocystein, >95%, CAS [454-29-5]
L-Methionin, BioUltra, ≥99,5%, CAS [63-68-3]
Natriumazid, Minimum 99,5%, CAS [26628-22-8]
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, puriss. p.a., ≥99%, CAS [10049-21-5]
<b>Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</b>
Destilliertes Wasser durch Wasseraufbearbeitungssystem Milli-Q
Ethanol, EMPROVE®, CAS [64-17-5]
Natriumhydroxid Plätzchen reinst, CAS [1310-73-2]
Ortho-Phosphorsäure 85%, pro analysi, CAS [7664-38-2]
Salzsäure rauchend 37%, EMPROVE®, CAS [7647-01-0]

<b>Sonstige Firmen</b>
Natriumchlorid 9mg/ml 10ml, B. Braun Austria GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
Natriumchlorid 3% Landesapotheke Salzburg, Österreich
Phosphatpuffer 125mM pH7,6, Univ.-Klinik für Nuklearmedizin – PET, Wien, Österreich

### **3.3 Laufmittel**

#### **3.3.1 Laufmittel Herstellung für den Methoden-Transfer**

##### ***3.3.1.1 Ammoniumformiat Lösung***

- Für die Tracer DASB, PIB, WAY100635

Für eine 0,1M Ammoniumformiat Lösung werden 6,306g eingewogen, mit Aqua destillata vermengt und verrührt.

- Für Tracer Harmin

Für den Tracer Harmin wurde die oben beschriebene 0,1M Ammoniumformiat Lösung mit 10% HCl auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt.

- Für Tracer MHED

Für den Tracer MHed benötigt man eine 0,2M Ammoniumformiat Lösung, welche man erhält indem man die doppelte Menge des Ammoniumformiats (= 12,612g) auf einen Liter Aqua destillata auflöst.

### **3.3.1.2 Phosphatpuffer**

#### **- Für Tracer L-Methionin**

Für den Tracer L-Methionin benötigt man einen 10mM Phosphatpuffer pH=5,3. Es wurden dafür 1,380g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  eingewogen, in Aqua destillata gelöst, mittels Magnetrührer gemischt. Durch Hinzufügen von Natronlauge (=NaOH) oder Salzsäure (= HCl) wurde der pH-Wert eingestellt.

#### **- Für Tracer (+)-PHNO**

Für den Tracer (+)-PHNO benötigt man einen 25mM Phosphatpuffer pH=7,0. Es wurden dafür 3,450g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  eingewogen, in Aqua destillata gelöst, mittels Magnetrührer gemischt. Durch Hinzufügen von Natronlauge (=NaOH) oder Salzsäure (= HCl) wurde der pH-Wert eingestellt.

### **3.3.2 Laufmittel Herstellung für die Methoden-Etablierung**

#### **3.3.2.1 *Laufmittel A: Ammoniumphosphatpuffer pH=2,1***

100mM Ammoniumphosphat Puffer pH=2,1 inkl. 5mM 1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat

Es wurden 11,503g Ammoniumphosphat eingewogen und mittels 4,75ml Phosphorsäure 85% ein pH Wert von 2,1 eingestellt, anschließend fügt man 1,171g 1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat hinzu und füllt mit Wasser auf 1 Liter auf. Es wurde eine Spatelspitze  $\text{NaN}_3$  (Natriumazid) beigemischt um Mikroorganismenbefall zu verhindern.

#### **3.3.2.2 *Laufmittel B: 90% Acetonitril (V%/V%)***

In einer Messur wurden 900ml 100% Acetonitril abgemessen, die Messur gereinigt und anschließend wurden 100ml Aqua destillata abgemessen. Wegen einer Volumverschiebung ist es wichtig, die Bestandteile einzeln zu vermessen. Beide Flüssigkeiten wurden in eine Flasche zusammengefügt und am Magnetrührer für circa 5 Minuten durchgemischt. Danach

wurde die Mischung für weitere 5 Minuten ins Ultraschallbad gestellt, um vorhandene Luft zu entfernen.

### **3.3.2.3 Laufmittel C: 100% Aqua destillata**

### **3.3.2.4 Laufmittel D: Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3**

#### 50mM Ammoniumphosphat Puffer pH=9,3

5,752g Ammoniumphosphat wurden eingewogen mit 750ml Wasser vermengt und der pH-Wert mittels 5N NaOH eingestellt.

Nach Zugabe von etwa 13,5ml 5N NaOH wurde mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Es wurde eine Spatelspitze  $\text{NaN}_3$  (Natriumazid) hinzugefügt um Mikroorganismenbefall zu verhindern.

### 3.4 Standardgerade

Die Standardsubstanzen des Tracers und der Precursor wurden eingewogen und je nach Löslichkeit entweder mittels Wasser, DMSO oder 100% ACN gelöst um eine Stocklösung mit einer Konzentration von  $c=1\text{mg/ml}$  zu erhalten. Für die Standardgerade wurden drei Stocklösungen gefertigt ( $n=3$ ), verdünnt und jede Verdünnung im Triplikat gemessen. Aus jeder Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe ( $c=0,01\text{-}10\mu\text{g/ml}$ ) pipettiert. Als Verdünnungslösung wurde das jeweilige Laufmittel verwendet, um etwaige Störpeaks zu reduzieren.

Zuerst wurde eine  $10\mu\text{g/ml}$  Verdünnung hergestellt (1:100), aus dieser Konzentration wurde die Verdünnung pipettiert (siehe Pipettierschema).

Standard  $1\text{mg/ml}$   $1000\mu\text{g/ml}$   
 1 zu 100 ist  $10\mu\text{g/ml}$   $1+99=100$   $100T =$   $2000 \mu\text{l}$   
 $1T =$   $20 \mu\text{l}$  Standard  
 $99T =$   $1980 \mu\text{l}$  Laufmittel

Verdünnung	Gesamtmenge [ $\mu\text{l}$ ]	Teile (T)	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$10\mu\text{g/ml}$ Standard [ $\mu\text{l}$ ]	Laufmittel [ $\mu\text{l}$ ]
1: 1,333	1000	1+ 0,333	10	750	250
1: 2	1000	1+ 1	7,5	500	500
1: 4	1000	1+ 3	5	250	750
1: 10	1000	1+ 9	2,5	100	900
1: 20	1000	1+ 19	1	50	950
1: 100	1000	1+ 99	0,5	10	990
1: 200	1000	1+ 199	0,1	5	995
1: 1000	1000	1+ 999	0,05	1	999
			0,01		

Gesamtmenge:  $1666\mu\text{l}$

Tabelle 1 Pipettierschema für die Standardgeraden

Die Ergebnisse der Standardgeraden wurden in das Raytest Software Programm Gina Star 4.08 übertragen.

## 4 Methoden-Transfer und Methoden-Etablierung

### 4.1 [<sup>11</sup>C]-L-Methionin

#### 4.1.1 Allgemeine Eigenschaften

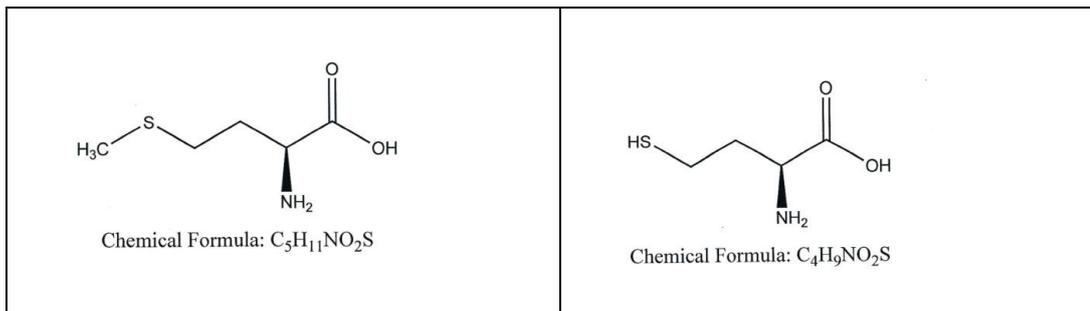


Tabelle 2 Strukturformeln von L-Methionin (links) und D-L Homocystein (rechts)

Die Aminosäure [<sup>11</sup>C]-L-Methionin [L-2-Amino-4-[<sup>11</sup>C]methylthio-butansäure] [17] eignet sich zur Diagnose des Malignitätsgrades von Tumoren aller Art vor allem im Kopf/Hals- Thorax Bereich. Des Weiteren durch ihre Fähigkeit die Bluthirnschranke zu überwinden auch für die Diagnose von Gehirnerkrankungen. [6] Das Radionuklid C-11 mit der Trägersubstanz L-Methionin dockt an der Tumorzelle an, und wird mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Screening identifiziert. Die Synthese erfolgt durch Verwendung des Precursors DL-Homocystein [(RS)-2-Amino-4-mercapto-butansäure]. [17]

#### 4.1.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 10mM Kaliumdihydrogenphosphat Lösung

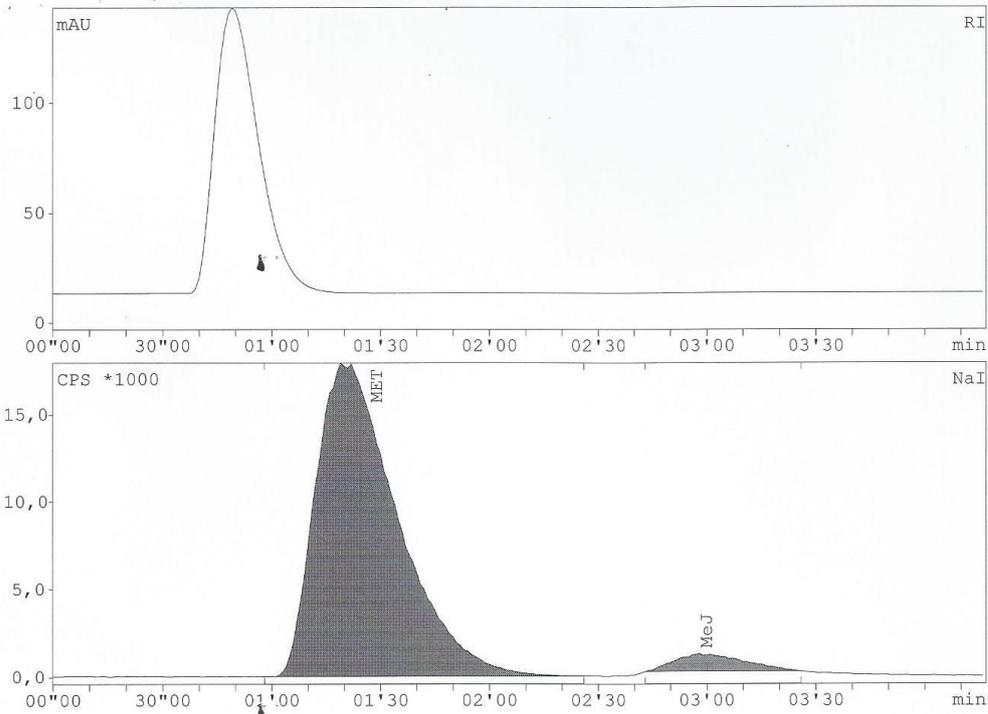
Säule/Stationäre Phase: Merck Chromolith Speedrod RP-18c, 50x4,6mm

Flow: 2,0 ml/min

Detektor: RI Detektor (Brechungsindexdetektor)

Precursor: DL-Homocystein

Standard: L-Methionin

**Sample description**

Study:	MET
Measurement:	833_1, injection : 03.07.2014 08:55
Method:	MET from: 22.12.2010 08:34

**Integration NaI**

Substance	R/T s	Type	Area Counts	%Area %
MET	01'20	BB	466677,7	95,51
MeJ	02'59	BB	21950,1	4,49
Sum in ROI			488627,8	
Area			523017,0	
Ext. BKG			0,00 CPS	

**Chromatogramm 1 Original QK Chromatogramme [<sup>11</sup>C]-L-Methionin, Merck Hitachi L-7100 LaChrom****4.1.3 Methoden-Etablierung**

Die Einstellungen wurden aus der Publikation: „1-Minute quality control tests for positron emission tomography radiopharmaceuticals“ von Ryuji Nakao et al., erschienen im Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 245-251, übernommen.

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 90% ACN / Ammoniumphosphat Puffer pH=2,1 13:87

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: 1 ml/min

Wellenlänge: 213 nm

Precursor: DL-Homocystein

Standard: L-Methionin

#### 4.1.4 Resultate

Die Aminosäure wurde unter einer Minute eluiert, konnte aber unter den chromatographischen Bedingungen nicht vom Precursor getrennt werden (siehe Abbildung 8).

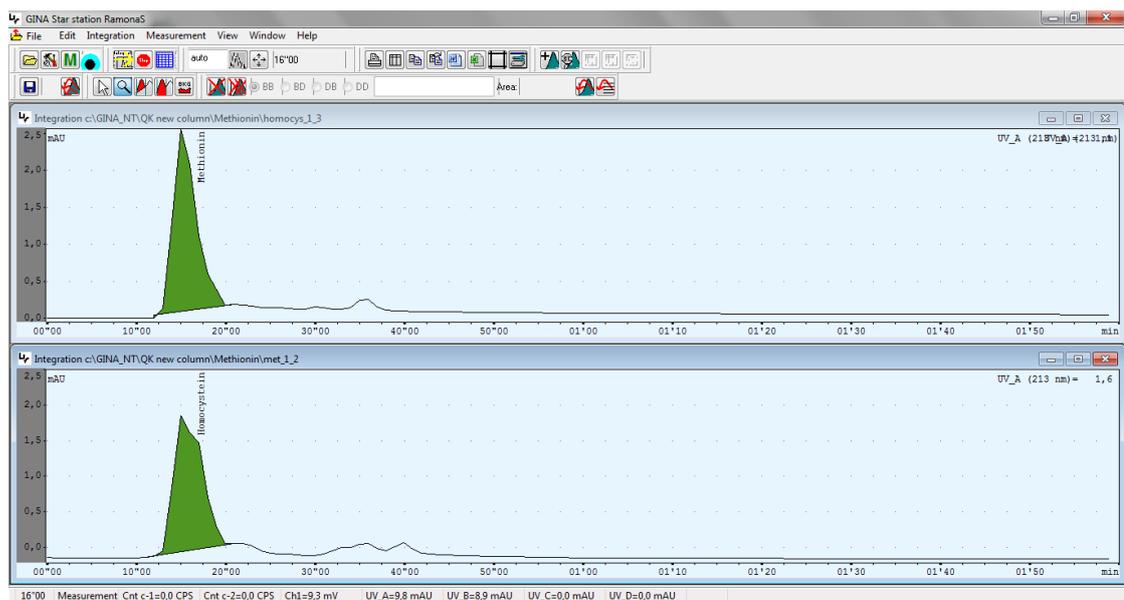


Abbildung 8 One-Minute-QK oben DL-Homocystein unten L-Methionin

##### 4.1.4.1 Diskussion

Die Methode konnte nicht verkürzt werden, da die einzelnen radiochemischen Verunreinigungen nicht ausreichend getrennt werden konnten. Dieser Umstand war ebenfalls in der Publikation [18] ersichtlich, da nur die Retentionszeit des Tracers, jedoch nicht die des Precursors angegeben wurde. Weiteres ist zu bedenken, dass die

Qualitätskontrolle zwar auf einer HPLC Anlage der Marke Merck Hitachi L-7100 LaChrom durchgeführt wurde, es sich bei dem Modell jedoch nicht um das Gerät handelt, welches ersetzt wurde. Dieses spezielle Modell besitzt einen Brechungsindex Detektor (RI) und durch die Wahl der Säule, Merck Chromolith Speedrod RP-18c, 50x4,6mm, konnten bereits frühe Retentionszeiten erbracht werden (siehe Chromatogramm 1). Der PET-Tracer [<sup>11</sup>C]-L-Methionin retentiert bereits bei 1 Minute 20 Sekunden und die Verunreinigung [<sup>11</sup>C]-Methyliodid bei 2 Minuten 59 Sekunden. Die Retentionszeit der Verunreinigung könnte durch eine Gradientenelution verkürzt werden, jedoch ist genau dieser Ansatzpunkt bei einem RI Detektor nicht durchführbar. Der Brechungsindex Detektor funktioniert nach dem „Strahl-Ablenkungsprinzip“. [10] Die Messzelle ist durch eine schräge Trennwand zweigeteilt. Eine Seite wird mit der Referenzlösung gefüllt, die andere mit dem Eluat durchflossen. Die Ablenkung des Lichtstrahls ändert sich, wenn die Messzelle einen anderen Brechungsindex als die Referenzzelle aufweist. [15] Das Eluat durchläuft vor der Messzelle eine Stahlkapillare, damit es der Detektortemperatur angeglichen wird und es ist notwendig, dass die Referenzzelle mit reiner mobiler Phase gefüllt ist. Deshalb kann ein RI Detektor nicht für eine Gradientenelution verwendet werden, es sei denn, man bringe es mit großem Aufwand fertig, die Änderungen der Zusammensetzung in beiden Zellen zeitgleich genau aufeinander ab zustimmen. [15]

Weiteres ist hier anzumerken, dass es sich bei der verwendeten Säule, Merck Chromolith Speedrod RP-18c, 50x4,6mm, um eine Aminosäure-Säule handelt. Die Säule ist nicht mehr mit winzigen Silica Partikeln gepackt, sondern besteht aus einem einzelnen Stück hoch reinem Silica Gel. Damit gelingen Trennungen viermal so schnell, da sie aus hoch porösen monolithischen Silica Stäben mit bimodaler Porenstruktur hergestellt ist. Chromolith-HPLC-Säulen bieten ausgezeichnete Trennungen in einem Bruchteil der Zeit einer Standardpartikelsäule. [19]

Aus oben genannten Gründen ergibt sich, dass keine Etablierung der neuen Methode durchgeführt werden konnte, da die chromatographischen Bedingungen bereits optimal genutzt werden. Die Qualitätskontrolle wird zukünftig unter den bestehenden Bedingungen mit der bestehenden HPLC-Anlage durchgeführt.

## 4.2 [<sup>11</sup>C]-PIB = 6-OH-BTA-1

### 4.2.1 Allgemeine Eigenschaften

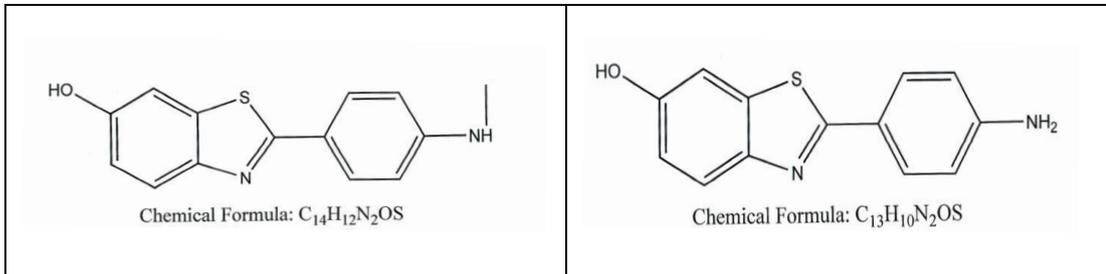


Tabelle 3 Strukturformel von PIB (links) und 6-OH-BTA-0 (rechts)

[<sup>11</sup>C]-PIB [2-(4-N-[<sup>11</sup>C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazol] = 6-OH-BTA-1. PIB (steht für "Pittsburgh-Verbindung B") ist immer noch die Standard-PET-Verbindung für die Bildgebung von Alzheimer-Beta-Amyloidplaques in vivo. [20] Für die Synthese wird der Precursor [2-(4-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazol] (6-OH-BTA-0) verwendet. [17]

### 4.2.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 0,1M Ammoniumformiat / 100% ACN 50:50

Säule/Stationäre Phase: Phenomenex Prodigy 5µm Phenyl 3 (PH-3) 250x4,6mm

Flow: 1,5 ml/min

Wellenlänge: 340 nm

Precursor: 6-OH-BTA-0

Standard: 6-OH-BTA-1

#### 4.2.2.1 Absorptionsmaximum

Wellenlänge [nm]	AUC [mAU*s]
255	0,847976
260	0,870107
265	0,998974
270	0,878528
275	0,799782
280	0,794941
285	0,815340
290	0,923820
295	1,094417
300	1,284665
305	1,527266
310	1,738447
315	1,980188
320	2,198140
325	2,431335
330	2,608933
335	2,791035
340	2,838313
345	2,789754
350	2,767050
355	2,780282
360	2,701520
365	2,471356
370	2,358019

Tabelle 4 Messwerte Absorptionsmaximum PIB, c=1µg/ml

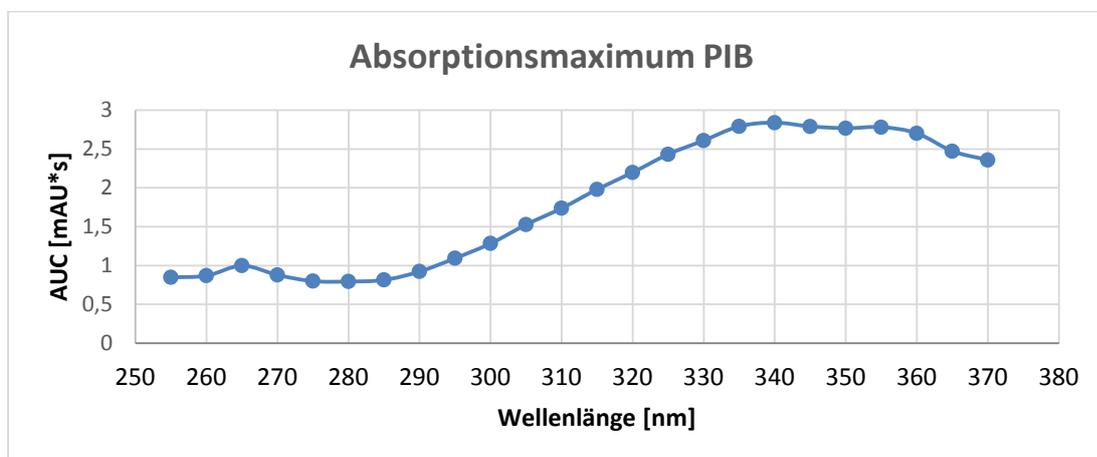


Abbildung 9 grafische Darstellung des Absorptionsmaximums von PIB

#### 4.2.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
15.12.2014	mw 1	0,04602	0,28032	0,61119	3,20449	7,15058	16,19950	36,19534	55,89499	72,43029
	mw 2	0,04363	0,27718	0,60646	3,31825	7,37273	17,97553	37,30365	55,87503	72,03227
	mw 3	0,04829	0,28820	0,63283	3,33646	7,35520	18,39291	36,44756	55,65450	72,60106
15.12.2014	mw 1	0,05356		0,66327	3,62036	7,36335	17,41861	37,03300	55,83800	73,70538
	mw 2	0,04996		0,65671	3,58082	7,39288	17,97103	36,66881	55,46782	72,28249
	mw 3	0,04903		0,66875	3,77207	7,18463	17,91705	36,88507	54,56969	74,29936
16.12.2014	mw 1	0,05124	0,28665	0,59346	3,61973	7,22750	18,13827	36,7655	55,11301	73,12499
	mw 2	0,04724	0,29270	0,59416	3,59830	7,26355	18,17171	37,2893	55,18716	73,23336
	mw 3	0,05122	0,286645	0,59496	3,48355	7,36202	18,26388	36,17295	55,42381	73,31443
	mittelwert	0,04891	0,28528	0,62464	3,503780	7,29694	17,82761	36,75124	55,44711	73,00263
	stabw	0,00302	0,00561	0,031281	0,182444	0,09149	0,670197	0,42346	0,43726	0,73228
	vk (%)	6,17281	1,96731	5,00784	5,20707	1,25380	3,75932	1,15226	0,788603	1,00308

Tabelle 5 Messwerte 6-OH-BTA-0, Methoden-Transfer

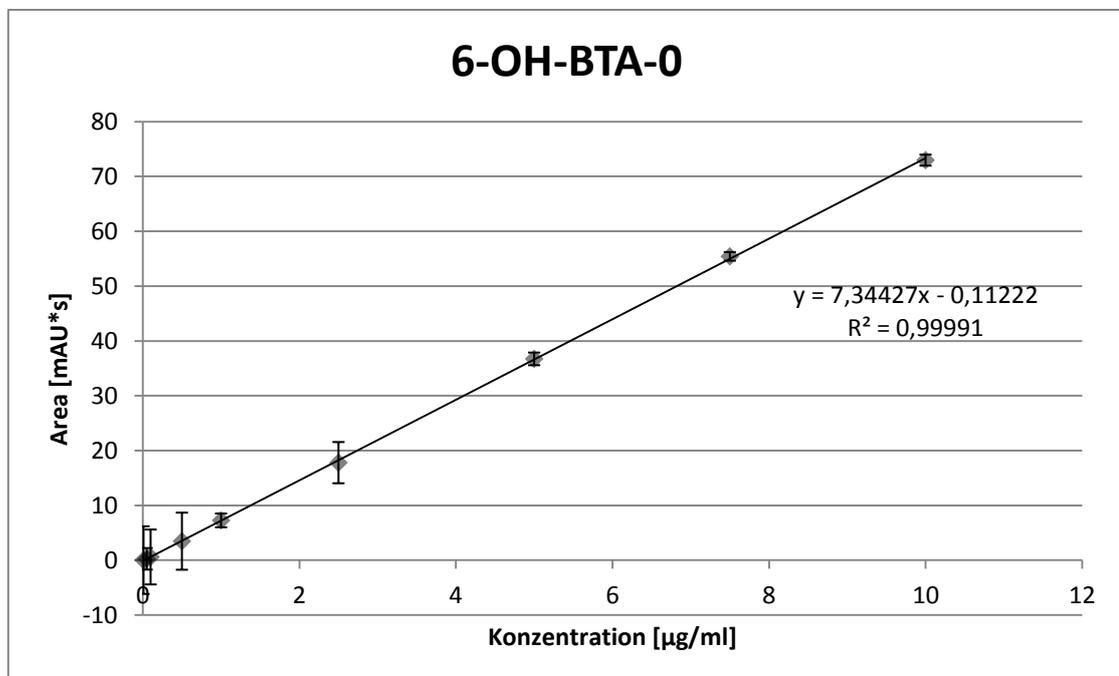


Abbildung 10 Standardgerade 6-OH-BTA-0, Methoden-Transfer

Datum	conc [µg/ml]	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
11.12.2014	mw 1	0,05456	0,30284	0,57480	4,24835	8,46229	21,00636	42,30291	65,40886	86,66152
	mw 2	0,07709	0,31712	0,60258	4,44462	8,78419	21,81797	42,73562	63,40502	88,18406
	mw 3	0,08570	0,34407	0,55510	4,38255	8,82181	21,40050	42,48624	65,17523	89,02877
12.12.2014	mw 1		0,21333	0,67268	3,94666	7,93622	19,70052	39,97374	60,08535	80,71858
	mw 2		0,20731	0,68732	3,89915	7,96914	19,68347	39,72035	59,66956	81,61561
	mw 3		0,22288	0,68373	3,94849	7,97091	20,06157	41,21097	60,46768	78,78284
15.12.2014	mw 1	0,03392	0,23563	0,62880	3,92808	8,08635	18,82944	41,82647	61,49879	80,69968
	mw 2	0,03380	0,21480	0,64396	3,99276	8,13292	20,31444	41,05651	60,86522	79,80161
	mw 3	0,03143	0,21640	0,65589	3,91224	7,86709	19,93708	40,00455	60,42303	81,60667
	mittelwert	0,05275	0,25271	0,63387	4,07810	8,22566	20,30570	41,25748	61,88875	83,01103
	stabw	0,02387	0,05310	0,04761	0,21777	0,36986	0,94238	1,15837	2,20895	3,85672
	vk (%)	45,2511	21,0127	7,51129	5,34012	4,49650	4,64101	2,80766	3,56923	4,64604

Tabelle 6 Messwerte PIB, Methoden-Transfer

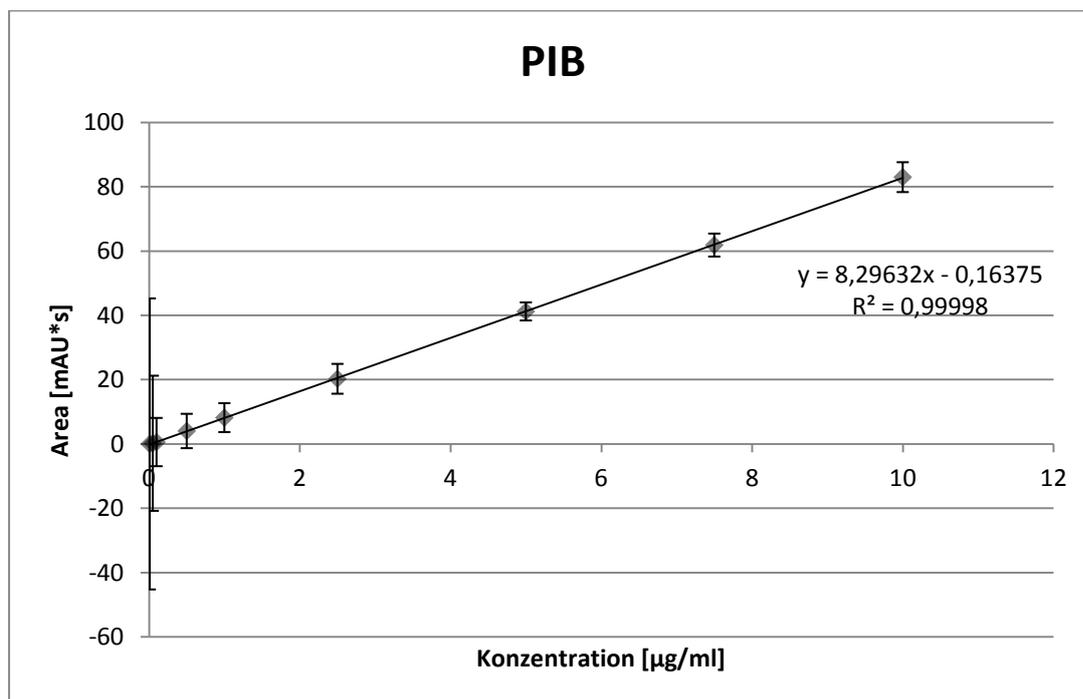


Abbildung 11 Standardgerade PIB, Methoden-Transfer

### 4.2.3 Methoden-Etablierung

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 90% ACN / Ammoniumphosphat Puffer pH=2,1, 56:44

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: 1 ml/min

Wellenlänge: 340 nm

Precursor: 6-OH-BTA-0

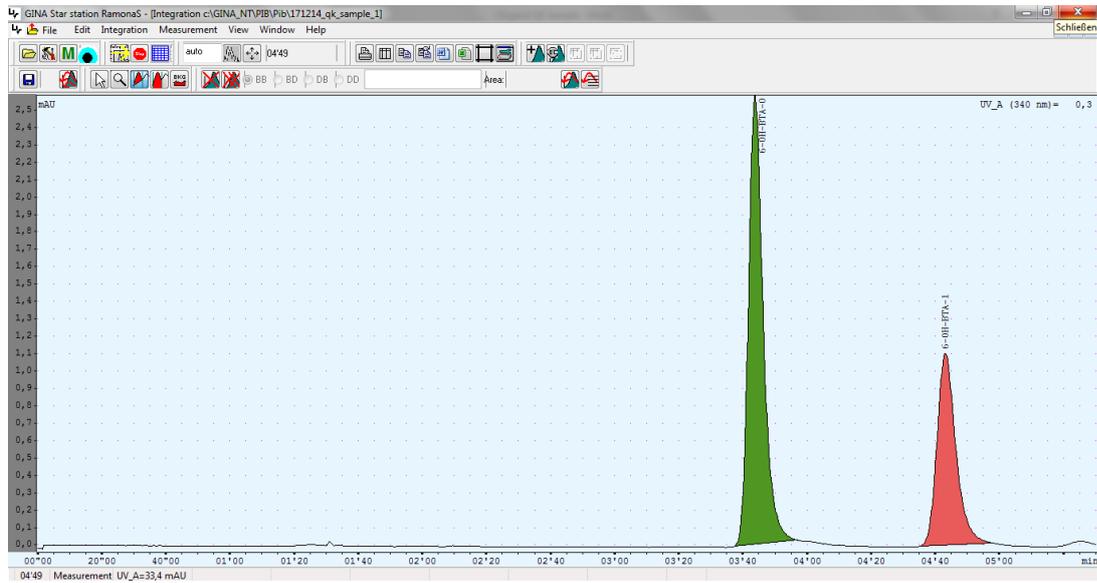
Standard: 6-OH-BTA-1

### 4.2.4 Resultate

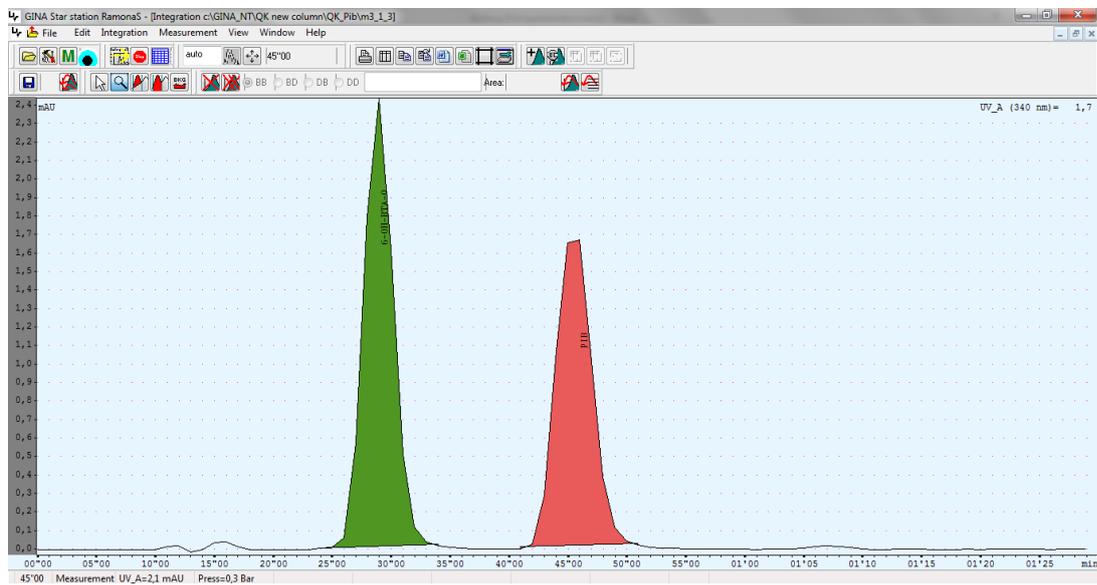
#### 4.2.4.1 Werte

Retentionszeiten	6-OH-BTA-0 (Precursor)	6-OH-BTA-1 (PIB)
Methoden-Transfer	3´43	4´43
Methoden-Etablierung	29``-30``	46``-47``

#### 4.2.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 2 6-OH-BTA-0 und PIB, Methoden-Transfer



Chromatogramm 3 6-OH-BTA-0 und PIB, Methoden-Etablierung

#### 4.2.4.3 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit 100% ACN verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
15.06.2015	mw 1	0,579385	3,297043	6,906494	17,12084	33,37928	52,86562	71,65962
Probe 2	mw 2	0,595492	3,268111	6,716001	16,79889	33,55026	51,77422	70,21575
	mw 3	0,574327	3,235573	6,774426	16,9787	35,23059	50,18037	69,95798
Probe 1	mw 1	0,638306	3,339219	6,869451	16,59136	34,07098	51,67146	68,8885
	mw 2	0,617498	3,303647	6,782919	17,26626	34,10392	51,02185	71,32435
	mw 3	0,622964	3,311837	6,743093	16,62636	33,59028	51,26084	70,11824
Probe 3	mw 1	0,650841	3,520304	7,048959	17,68757	35,71242	54,15483	71,13645
	mw 2	0,646675	3,410465	7,028246	17,37597	35,57774	55,50701	73,45336
	mw 3	0,664794	3,51092	7,045603	17,32092	35,14259	54,0858	71,54834
	mittelwert	0,6211424	3,3552354	6,87946577	17,08520	34,48422	52,50244	70,9225
	stabw	0,0322952	0,1028549	0,13461463	0,368229	0,928875	1,758668	1,311550
	vk (%)	5,199334	3,065505	1,9567600	2,1552509	2,69362	3,34968	1,84927

Tabelle 7 Messwerte 6-OH-BTA-0, Methoden-Etablierung

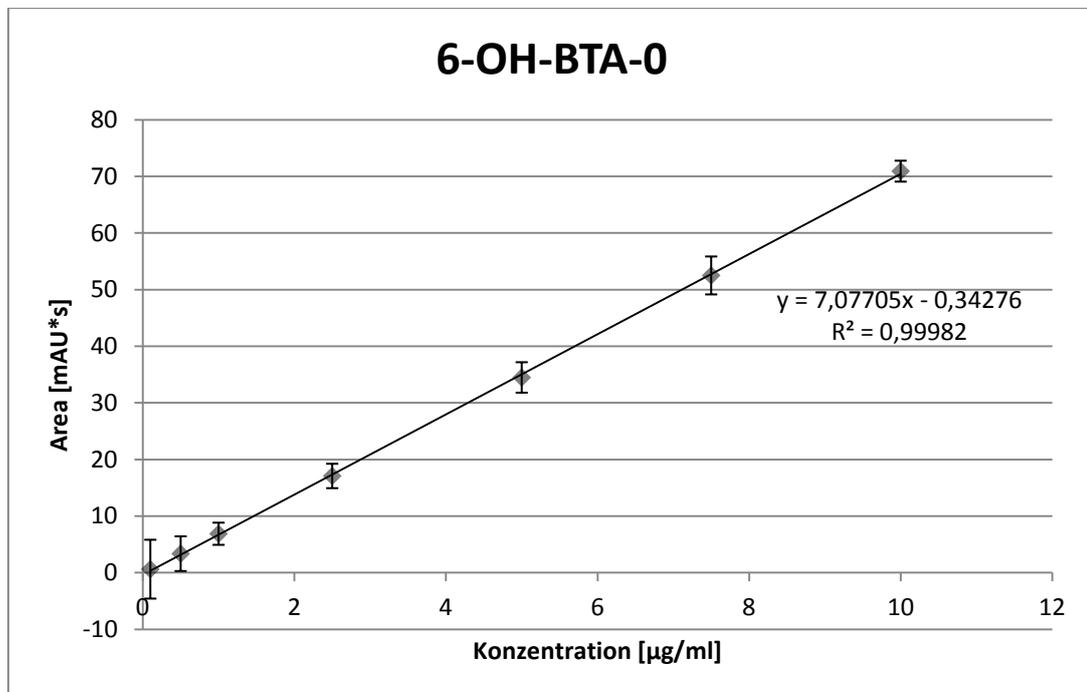


Abbildung 12 Standardgerade 6-OH-BTA-0, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
15.06.2015	mw 1	0,539011	2,918371	6,173563	15,23694	29,65827	47,22533	61,64952
Probe 2	mw 2	0,525037	2,920544	5,956084	14,94131	29,7624	46,20268	62,42957
	mw 3	0,515985	2,843126	6,099884	15,18551	31,44294	44,58716	62,41711
Probe 1	mw 1	0,558412	2,958918	6,054932	15,0462	30,04981	45,96386	61,42658
	mw 2	0,538611	2,894676	6,060741	15,24923	30,31417	45,55398	63,36916
	mw 3	0,567919	2,853282	6,045282	14,45347	30,54567	45,28261	63,79837
Probe 3	mw 1	0,550592	3,069381	6,292903	15,62321	31,40982	47,63434	62,17505
	mw 2	0,570575	3,06626	6,108582	15,23241	31,73268	47,73033	64,97901
	mw 3	0,568505	2,983387	6,234036	15,40214	31,10657	46,50235	62,3462
	mittelwert	0,54829411	2,9453272	6,11400078	15,1522689	30,669148	46,298071	62,732286
	stabw	0,01988221	0,0825160	0,10378853	0,32641873	0,7777121	1,0823219	1,1245949
	vk (%)	3,62619362	2,8015906	1,69755503	2,15425642	2,5358127	2,3377256	1,7926892

Tabelle 8 Messwerte PIB, Methoden-Etablierung

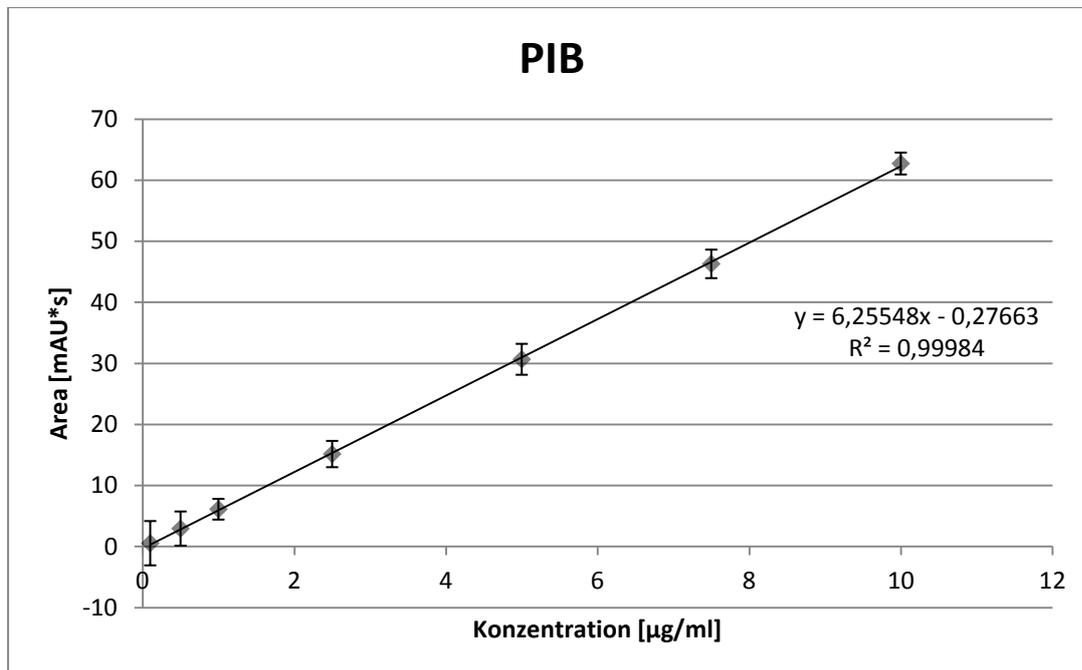


Abbildung 13 Standardgerade PIB, Methoden-Etablierung

#### 4.2.4.4 Diskussion

##### Selektivität

Die Berechnung der Selektivität erfolgte durch das Software Programm von der Fa. Raytest Gina Star 4.08, allerdings ist darauf zu achten, dass ein Totzeitpunkt in die Berechnung hineinfließt. Darauf wurde anfangs vergessen und deshalb wurden Änderungen der Laufmittelzusammensetzung vorgenommen um eine Selektivität von 2,0 (gelb markierte Werte in der Tabelle 9) zu erreichen. Da dies zu Lasten der Retentionszeiten ging und zudem die Selektivität nicht korrekt berechnet wurde, wurde ein Totzeitpunkt bei 16 Sekunden (ersichtlich aus dem Chromatogramm) festgelegt und die korrekte Selektivität betrug 2,1.

90% ACN(B)	Puffer2,1(A)	Flow [ml/min]	Rt Prec	Rt PIB	Druck [bar]	Selektivität
0,30	0,7	1	1'50	5'03	273	2,8
0,40	0,6	1	56''	2'03	260	2,2
0,41	0,59	1	53''-57''	1'53-1'58	258	2,1
0,42	0,58	1	51''	1'47	256	2,1
0,43	0,57	1	49''	1'40	255	2,0
0,44	0,56	1	47''-50''	1'33-1'36	254	1,9-2,0
0,45	0,55	1	47''	1'29	252	1,9
0,46	0,54	1	43''-45''	1'22-1'24	250	1,9
0,47	0,53	1	43''	1'18	249	1,8
0,48	0,52	1	41''	1'14	247	1,8
0,49	0,51	1	40''	1'10	244	1,8
0,50	0,50	1	36''-39''	1'04-1'07	243	1,7-1,8
0,51	0,49	1	36''	1'00	240	1,7
0,52	0,48	1	35''	59''	239	1,7
0,53	0,47	1	34''	56''	236	1,6
0,54	0,46	1	33''	53''	236	1,6
0,55	0,45	1	33''	52''	234	1,6
0,56	0,44	1	32''	50''	232	1,5

Tabelle 9 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung für PIB

Die Einstellungen (rot markiert in der Tabelle 9) für den Tracer [<sup>11</sup>C]-PIB konnten somit, ohne Änderungen, aus der Publikation [18] für die Methoden-Etablierung adaptiert werden.

## Realbedingungen

Im Anschluss an die Findung der Laufmittelzusammensetzung musste auch die Störungsfreiheit unter Realbedingungen getestet werden. Der PET-Tracer [<sup>11</sup>C]-PIB wurde deshalb nach erfolgter Radiosynthese bei einer Wellenlänge von 340nm unter den oben genannten Bedingungen vermessen. Da bei dieser Wellenlänge kein Rauschen oder zusätzliche Störsignale auftraten, wurde das publizierte Set-up für die Methoden-Etablierung gewählt.

## 4.3 [<sup>11</sup>C]-Harmin

### 4.3.1 Allgemeine Eigenschaften

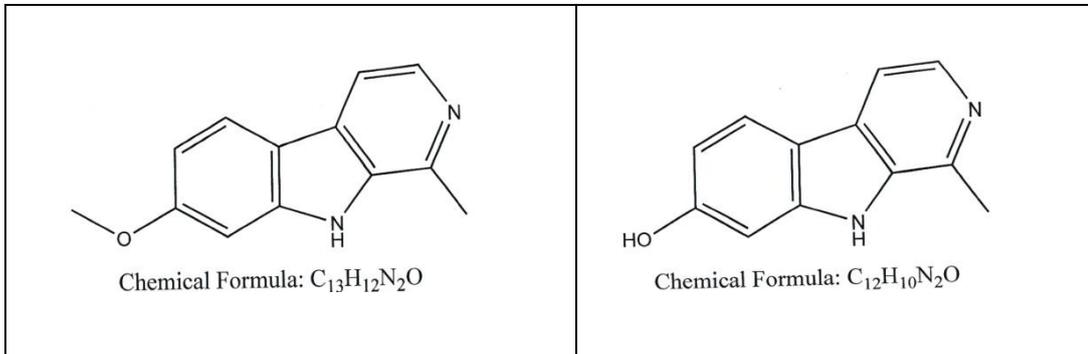


Tabelle 10 Strukturformeln von Harmin (links) und Harmol (rechts)

[<sup>11</sup>C]-Harmin (7-[<sup>11</sup>C]methoxy-1-methyl-9H-[3,4-b]indol) ist ein selektiver und reversibler Monoaminoxidase-A (MAO-A)-Inhibitor, welcher mit hoher Affinität im Gehirn bindet. [21] MAO-A ist ein Enzym, welches bevorzugt den Abbau (Oxidierung) der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Adrenalin katalysiert, und ist daher ein attraktives Ziel für Studien von psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen, da eine stark erhöhte MAO-A im Gehirn mit schweren Depressionen assoziiert ist. Deshalb wird für die Behandlung der Depressionen und Angststörungen das Neurotransmitter-abbauende Enzym (MAO-A) gehemmt. [21] Für die Synthese wird der Precursor Harmol (7-hydroxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indol) verwendet. [17]

### 4.3.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 0,1M Ammoniumformiat (pH=4 mittels HCl eingestellt)/ 100% ACN 75:25

Säule/Stationäre Phase: Phenomenex Prodigy 10µm Phenyl 3 (PH-3) 250x4,6mm

Flow: 1,5 ml/min

Wellenlänge: 246 nm

Precursor: Harmol

Standard: Harmin

### 4.3.2.1 Absorptionsmaxima

Rt [min]	05`04	02`35
Wellenlänge [nm]	AUC Harmin	AUC Harmol
235	8,419019	10,9454
240	11,09518	15,05289
244	13,13106	17,29567
245	13,28836	18,06673
246	13,69725	18,75473
247	13,45977	18,43979
248	13,25398	19,26431
250	12,78456	18,23815
254	10,52781	15,56322
255	9,933269	15,04177
260	7,617686	11,38239
265	4,772456	7,41793
270	1,83908	3,096514
275	0,740421	1,13045
280	0,584009	0,766018

Tabelle 11 Messwerte der Absorptionsmaxima Harmin und Harmol, c=1µg/ml

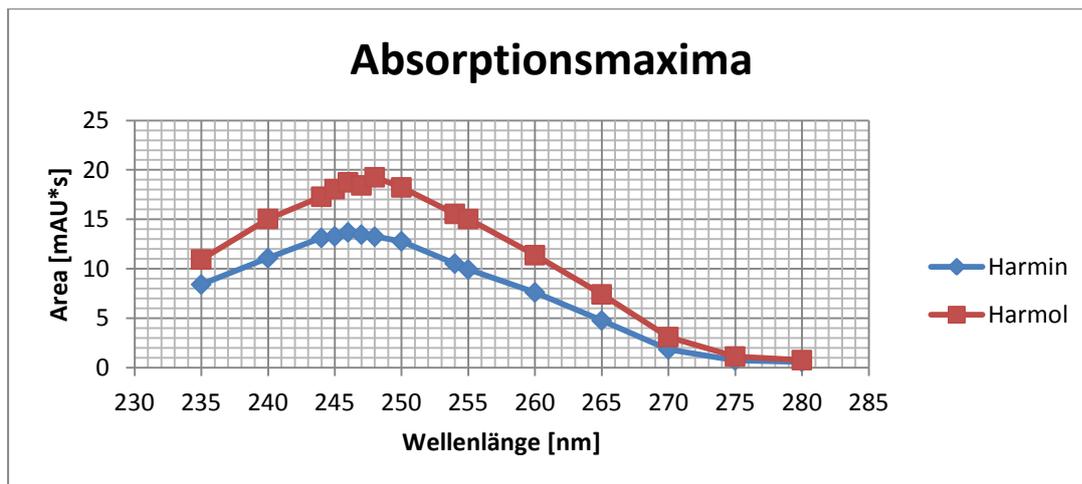


Abbildung 14 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima Harmin und Harmol

### 4.3.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
20.12.2014	mw 1		0,60609	1,028198	6,75739	14,29534	35,5913	72,1664	110,25	147,366
	mw 2	0,059783	0,59854	1,003569	6,82239	14,27209	35,7753	72,9253	110,583	146,757
	mw 3	0,041917	0,61111	0,963764	6,76834	14,23088	35,6159	72,8957	110,403	147,588
21.12.2014	mw 1	0,089195	0,49973	1,145248	7,18776	14,47414	35,8344	73,3778	110,146	147,273
	mw 2	0,079215	0,50744	1,153001	7,22243	14,61192	36,0925	71,333	110,048	147,149
	mw 3	0,072417	0,53447	1,164311	7,03865	14,56122	36,0783	73,1065	110,91	147,713
21.12.2014	mw 1	0,186631	0,59159	1,339582	7,41759	14,68373	36,4201	73,2119	111,299	147,67
	mw 2	0,183493	0,59805	1,342741	7,55757	14,70366	36,2101	74,4501	111,834	148,467
	mw 3	0,149455	0,60325	1,321127		14,62517	36,4642	73,8659	110,628	148,478
	mittelwert	0,107763	0,57225	1,162393	7,09652	14,49535	36,009	73,0369	110,678	147,607
	stabw	0,056997	0,04505	0,14671	0,30262	0,185035	0,3245	0,90344	0,58367	0,57189
	vk (%)	52,89058	7,87215	12,62137	4,2643	1,276514	0,9012	1,23696	0,52736	0,38744

Tabelle 12 Messwerte Harmol, Methoden-Transfer

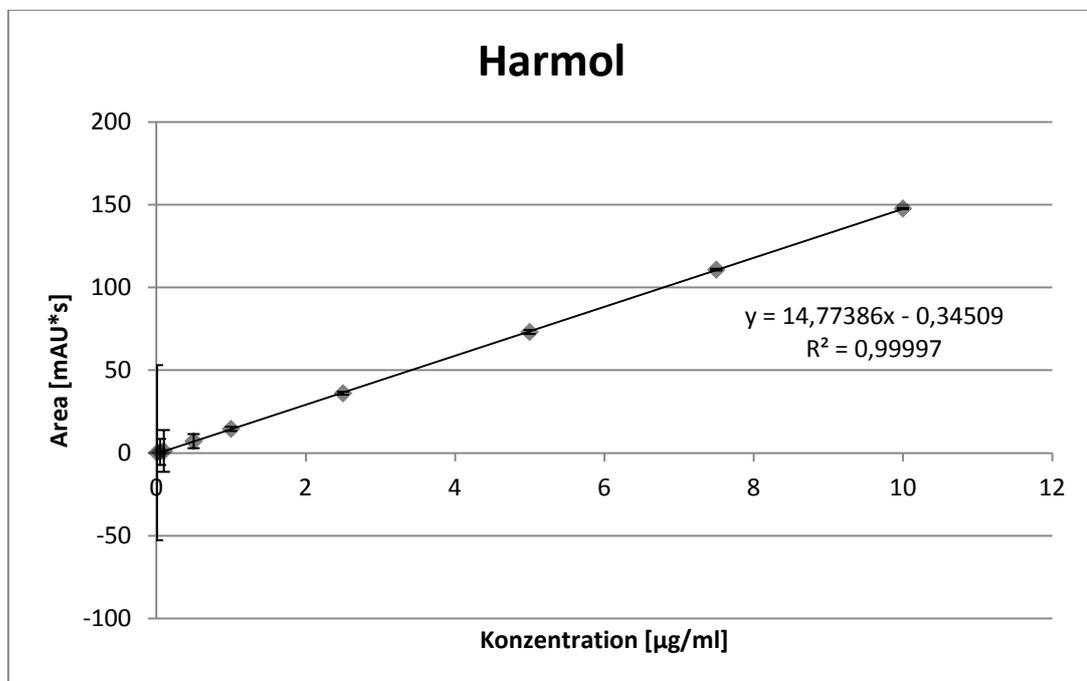


Abbildung 15 Standardgerade Harmol, Methoden-Transfer

Datum	conc [µg/ml]	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
19.12.2014	mw 1		0,6388	1,2496	6,7963	14,2924	33,6262	73,2772	108,2664	145,642
	mw 2		0,4863	1,2361	6,7587	14,5149	35,176	73,51067	108,7938	144,942
	mw 3		0,5436	1,2019	6,7927	14,4241	35,1214	72,78361	108,6553	146,9887
19.12.2014	mw 1	0,16215	0,4744	1,0711	6,7303	14,5236	36,2343	70,36177	102,4128	146,951
	mw 2	0,15442	0,5827	1,0316	6,8021	14,570	36,2427	73,68205	108,5578	145,881
	mw 3		0,4930	1,1744	6,7466	14,464	35,897	74,18684	110,1837	146,854
20.12.2014	mw 1	0,14638	0,6105	1,2040	6,7377	13,875	36,642	73,44612	109,1862	147,578
	mw 2		0,6634	1,2194	6,9454	13,4804	36,521	72,68555	109,4769	145,758
	mw 3		0,6476	1,2240	6,7036	13,684	36,605	72,02987	110,9907	147,046
	mittelwert	0,15431	0,5711	1,1791	6,7793	14,203	35,7852	72,88485	108,5026	146,4043
	stabw	0,00788	0,0742	0,0762	0,0707	0,4122	0,99025	1,136783	2,441463	0,869264
	vk (%)	5,10842	12,9903	6,4622	1,0423	2,9019	2,76720	1,559698	2,250142	0,593742

Tabelle 13 Messwerte Harmin, Methoden-Transfer

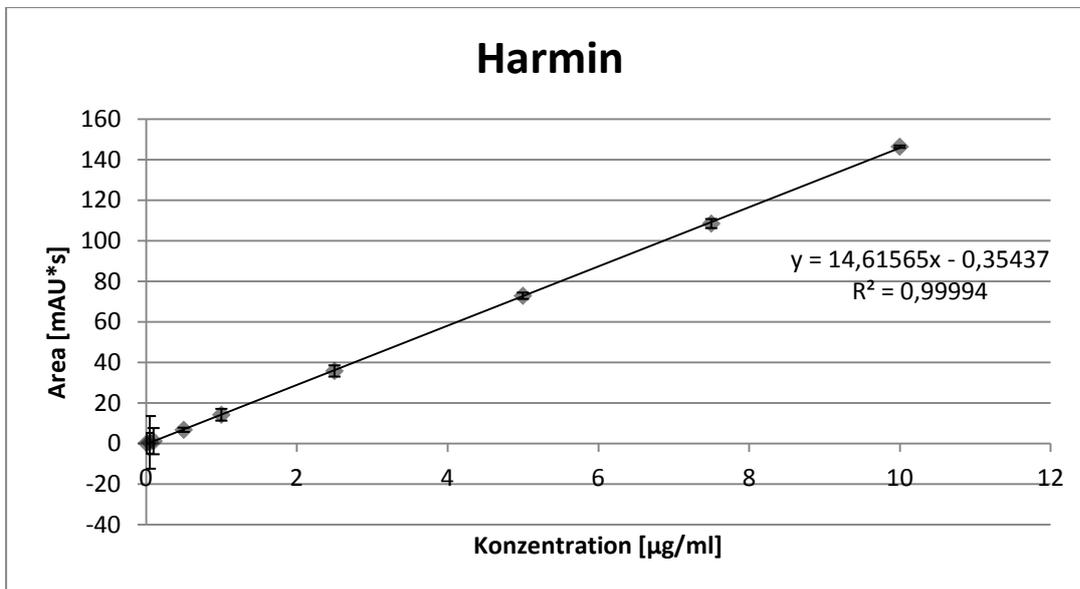


Abbildung 16 Standardgerade Harmin, Methoden-Transfer

### 4.3.3 Methoden-Etablierung

Bei einem schnellen Screening wurde festgestellt, dass das Laufmittel aus 90% ACN und Ammoniumpuffer pH=9,3 bestehen soll und im nächsten Schritt wurde dessen optimale Zusammensetzung ermittelt. In Tabelle 14 sind die verschiedenen Mischungen und die daraus resultierenden Retentionszeiten aufgelistet. Ein Original QK-Sample konnte anschließend die Methode mit dem Verhältnis 90% ACN / Puffer pH=9,3 44:56 bestätigen, da keine weiteren Störsignale im Bereich der Retentionszeit des Precursors auftraten.

90% ACN (B)	Puffer9,3(D)	Flow [ml/min]	Rt Harmol	Rt Harmin	Druck [bar]	Selektivität
0,36	0,64	1	36``	1`28	263	2,4
0,41	0,59	1	28``-30``	58``-1`00	256	2,1
0,42	0,58	1	28``-29``	55``56``	254	2
0,43	0,57	1	28``	52``	253	1,9
0,44	0,56	1	27``	50``	252	1,9
0,52	0,48	1	23``	35``	237	1,5
0,68	0,32	1	20``	26``		1,3

Tabelle 14 Versuche zur Findung der LM-Zusammensetzung für den Tracer Harmin bei c=1µg/ml

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 90% ACN / 50mM Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3, 44:56

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: 1,0 ml/min

Wellenlänge: 246 nm

Precursor: Harmol

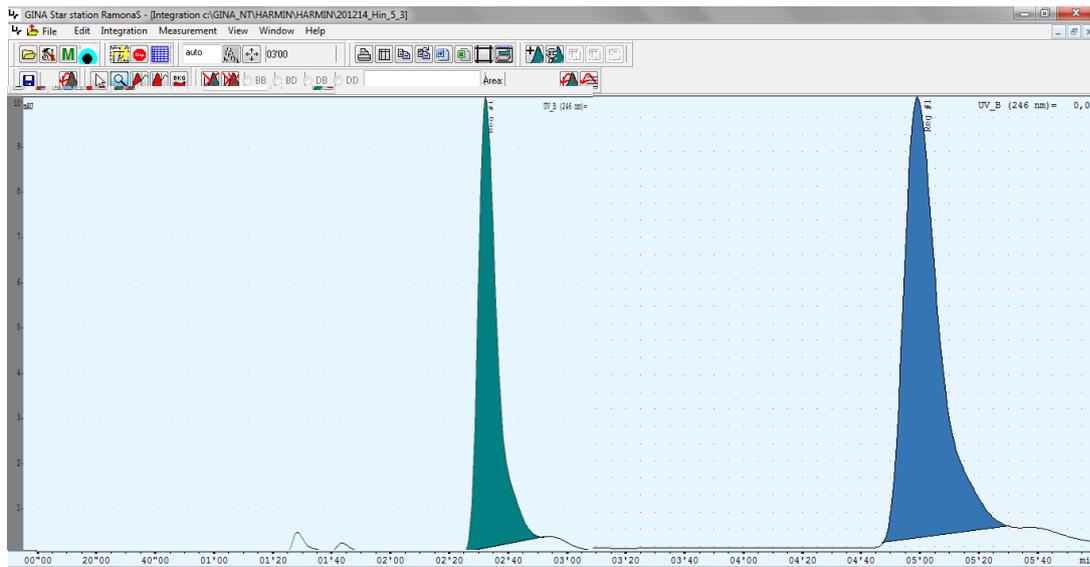
Standard: Harmin

### 4.3.4 Resultate

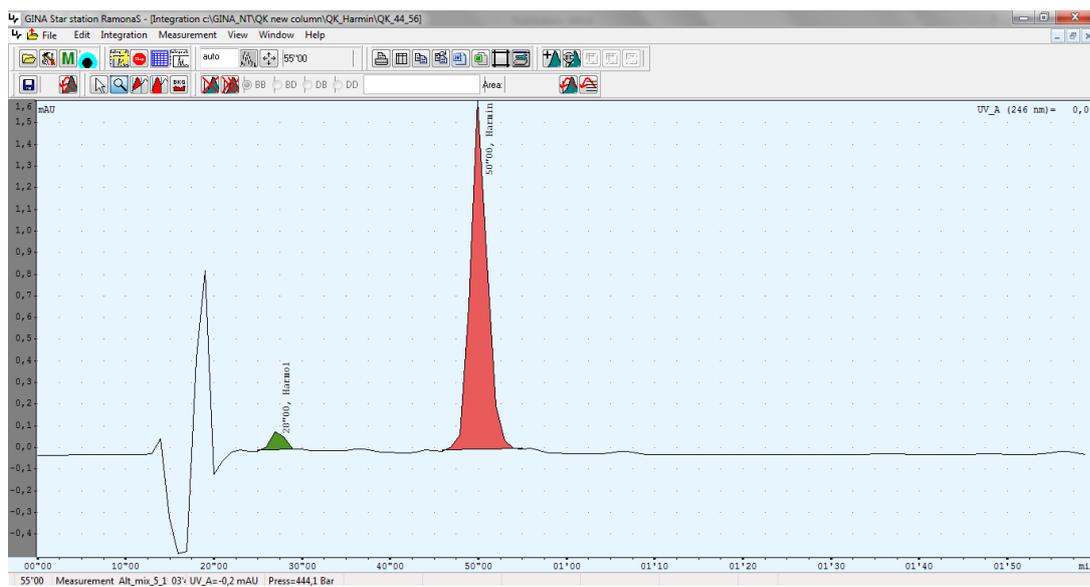
#### 4.3.4.1 Werte

Retentionszeiten	Harmol	Harmin
Methoden-Transfer	2'34	5'01
Methoden-Etablierung	28''	50''

#### 4.3.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 4 Harmol und Harmin, Methoden-Transfer



Chromatogramm 5 Harmol und Harmin, Methoden-Etablierung

#### 4.3.4.3 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt. Um eine homogene Lösung zu erhalten, empfiehlt es sich mindestens 15 Minuten zu warten.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
09.06.2015	mw 1	0,960302	5,235326	10,13026	25,94507	53,33243	77,757	105,5637
	mw 2	1,01157	5,789769	10,14429	25,54895	52,35355	78,018	105,3721
	mw 3	1,027958	5,61713	10,22462	26,91126	53,05567	78,6917	106,6724
11.06.2015	mw 1	0,9764149	5,188918	10,63918	25,65741	51,2393	77,9418	104,5182
	mw 2	0,952584	4,892862	10,68629	25,31095	53,84255	77,497	103,8491
	mw 3	0,917459	5,020022	10,49945	26,08871	51,88094	79,185	104,5045
12.06.2015	mw 1	0,912599	5,016077	10,66016	25,42756	52,24149	79,3313	107,2528
	mw 2	0,9607	5,497259	10,65577	26,36921	53,9628	79,2652	105,3875
	mw 3	0,929189	5,501223	10,69693	26,55505	51,95686	79,3692	106,4927
	mittelwert	0,956494575	5,305914	10,53690	26,311043	53,05115	79,12638	106,08526
	stabw	0,035090377	0,270523	0,546780	0,9030640	1,1436369	1,380412	1,5867230
	vk (%)	3,668643557	5,098518	5,189196	3,4322624	2,155725	1,744566	1,495706

Tabelle 15 Messwerte Harmol, Methoden-Etablierung

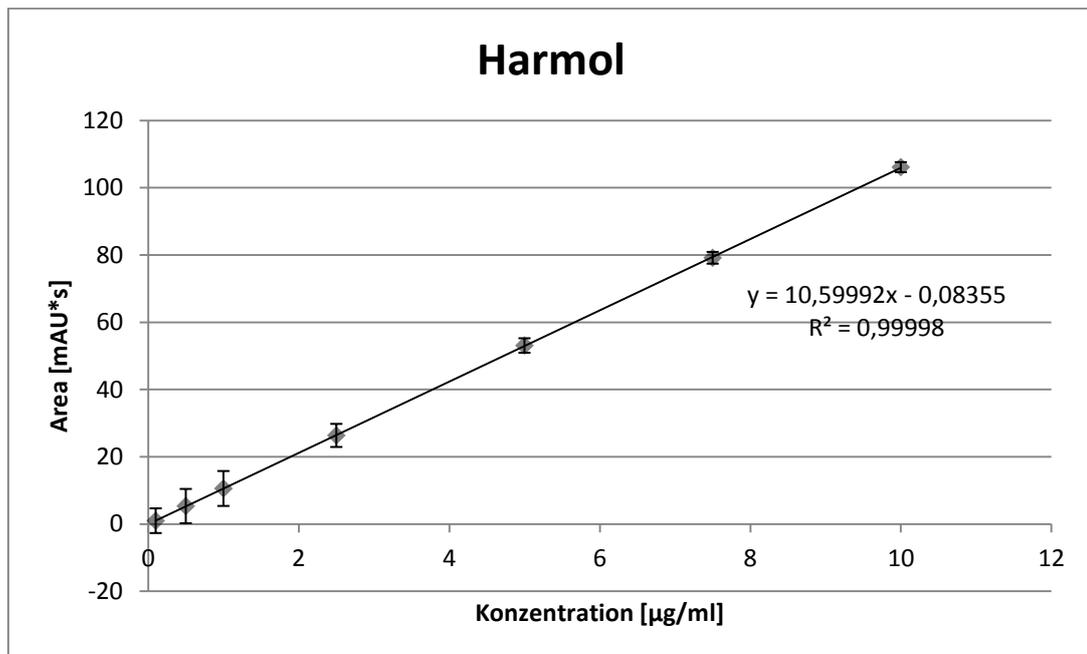


Abbildung 17 Standardgerade Harmol, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
09.06.2015	mw 1	1,050373	5,036926	11,73457	25,2045	51,15149	80,59844	102,2262
	mw 2	1,1512	4,963265	10,01413	25,17661	51,29958	78,34121	104,1683
	mw 3	1,052803	5,727386	10,1053	26,74402	52,68564	79,51772	107,2681
11.06.2015	mw 1	0,95157	5,64166	10,04935	26,39604	54,2024	76,13933	108,5275
	mw 2	0,955835	5,738932	11,08177	26,50615	55,1869	77,08018	108,7103
	mw 3	0,956532	5,468453	11,08813	26,85093	53,36229	81,07579	108,9016
12.06.2015	mw 1	0,955835	5,36113	10,91296	27,55441	54,04322	80,5076	112,1452
	mw 2	1,01349	5,43172	11,26538	27,29951	53,5118	80,58673	110,0908
	mw 3	0,978665	5,420935	11,2128	27,05456	55,61713	80,55862	108,9806
	mittelwert	1,002279	5,3839694	10,9048492	26,8067517	53,641559	80,169078	107,982367
	stabw	0,0584939	0,2622461	0,55031601	0,94955646	1,5012951	2,1666789	2,79767381
	vk (%)	5,8360904	4,8708684	5,04652567	3,54222872	2,7987537	2,7026367	2,59086172

Tabelle 16 Messwerte Harmin, Methoden-Etablierung

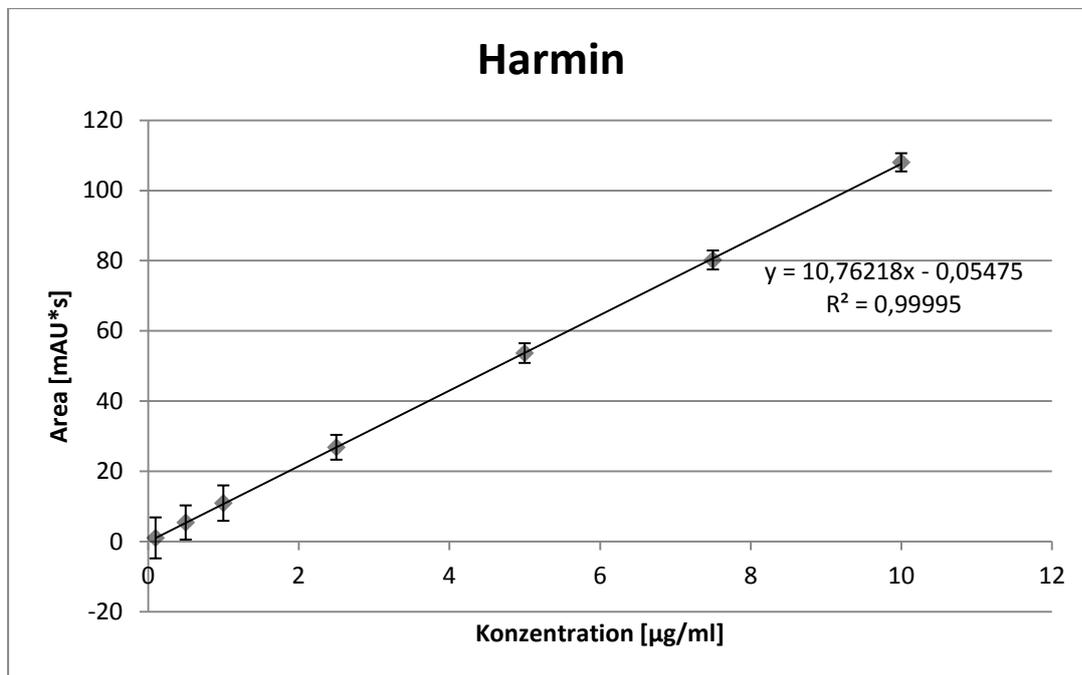


Abbildung 18 Standardgerade Harmin, Methoden-Etablierung

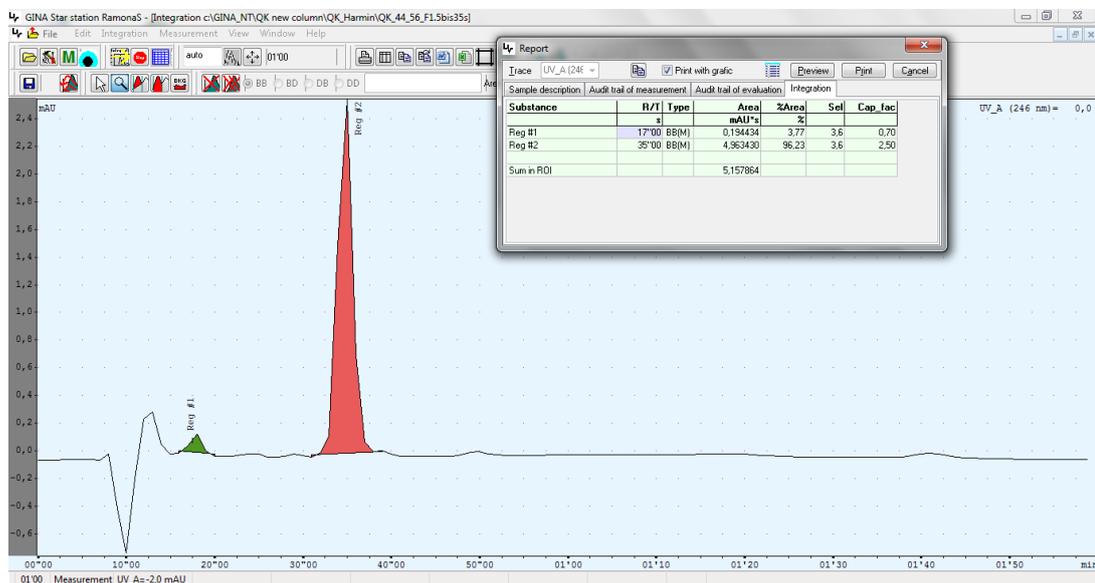
#### 4.3.4.4 Diskussion

##### Wellenlänge

Da für die Berechnung der spezifischen Aktivität die Menge des nicht-radioaktiven Tracers ausschlaggebend ist, wurde das Maximum von Harmin für die Erstellung der Standardgeraden gewählt.

##### Flowgradient

Um die Methode zu optimieren, wurde ein Flowgradient generiert, was in diesem Fall bedeutet, dass mit einem Initialflow von 1,5 ml/min gestartet wurde und ab Sekunde 36 der Flow 1 ml/min beträgt. Da auch hier keine Störpeaks im Bereich der Retentionszeit des Precursors zu sehen waren, und zusätzlich eine erhebliche Verbesserung der Retentionszeiten resultierte (siehe Chromatogramm 6), wurden zunächst die neuen Standardgeraden unter den veränderten Bedingungen angefertigt.



Chromatogramm 6 Harmol und Harmin mit Flowgradient

Es wurde aber festgestellt, dass es, bei der Erstellung der Standardgeraden mit dem Flowgradienten, zu großen Variationskoeffizienten – sprich Schwankungen der Harmol Werte (siehe vk in Tabelle 17) kam, und deshalb wurde der Flowgradient eliminiert. Die Schwankungen konnten so erklärt werden, dass es mit steigender Konzentration zu Überlappungen des Harmol Peaks mit dem „Totzeit“-Peak kam, und deshalb ein eindeutiges und reproduzierbares Integral nicht mehr möglich war.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
27.05.2015	mw 1	1,7161	9,54069	18,11476	45,0391	85,2796	131,802	185,96
<b>Harmol</b>	mw 2	1,6101	8,245136	20,12674	45,583	100,94	129,854	218,05
	mw 3	1,6101	8,245136	20,12674	45,583	100,94	129,854	218,05
	mw 4				43,8023		103,187	184,22
	mw 5						127,558	
	mittelwert	1,6455	8,676987	19,45608	45,0018	95,72	124,451	201,57
	stabw	0,0612	0,747988	1,1616172	0,83978	9,04167	11,9815	19,038
	vk (%)	3,7172	8,62037	5,9704586	1,8661	9,44596	9,62747	9,4447

**Tabelle 17 Messwerte Harmol mit Flowgradient**

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
27.05.2015	mw 1	2,5957	13,77684	31,74271	79,16	122,31	208,316	291,34
<b>Harmol</b>	mw 2	2,2263	14,39466	30,99951	74,9207	132,586	216,115	292,62
	mw 3	2,0254	14,20924	31,69394	72,8788	131,411	212,69	275,81
	mittelwert	2,2825	14,12691	31,47872	75,6532	128,769	212,373	286,59
	stabw	0,2893	0,317031	0,4157238	3,204	5,62456	3,9094	9,3582
	vk (%)	12,674	2,244163	1,3206503	4,23511	4,36795	1,84081	3,2653

**Tabelle 18 Messwerte Harmol ohne Flowgradient**

### Verdünnungsmedium

Die Standardgeraden wurden unter „Realbedingungen“, d.h. die Standards in der *Formulierungslösung* verdünnt, angefertigt.

In der folgenden Tabelle kann man erkennen, dass, obwohl Harmol und Harmin in der gleichen Lösung vorlag, die Variationskoeffizienten unterschiedlich sind. Dies lässt möglicherweise auf ein Löslichkeitsproblem des in DMSO gelösten Harmins mit der Formulierungslösung schließen, deshalb wurde als nächster Schritt *Wasser* als Verdünnungsmedium gewählt.

<b>Harmol</b>								
Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
1.6.15 vm	mw 1	1,477432	9,452871	23,10431	70,41964	147,4947	248,2361	298,5413
	mw 2	1,776437	7,701619	28,97654	61,71304	152,3447	246,9644	297,7507
	mw 3	1,849214	10,3104	30,90974	58,31453	167,0152	229,0733	324,4299
1.6.15 nm	mw 1	2,501249	16,50892	32,41395	78,02707	157,0992	238,844	299,1648
	mw 2	2,526649	15,44871	28,88603	69,62072	159,3065	230,3035	317,6554
	mw 3	2,491232	15,86588	30,19263	70,88223	150,3193	235,4992	297,2807
	mittelwert	2,1037022	12,548067	29,080533	68,162872	155,5966	238,15342	305,8038
	stabw	0,4585167	3,8258442	3,2080622	7,0782174	7,07772736	8,1349298	12,0142241
	vk (%)	21,795705	30,489511	11,031648	10,384271	4,54876737	3,4158358	3,92873604
<b>Harmin</b>								
Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
1.6.15 vm	mw 1	1,057806	7,027427	17,72152	53,77105	113,0333	191,177	230,4205
	mw 2	1,354488	5,937308	21,99244	47,08517	116,5429	189,7229	229,3625
	mw 3	1,403701	7,76099	23,72546	44,23855	127,8497	175,5051	251,0929
1.6.15 nm	mw 1	2,231673	14,65797	29,53446	47,0637	149,9427	226,4624	285,6788
	mw 2	2,320373	14,69616	27,27853	66,12053	151,3345	222,0635	304,3918
	mw 3	2,275864	14,65631	28,47637	67,4066	142,9854	224,9884	292,438
	mittelwert	1,7739842	10,789361	24,78813	54,280933	133,61475	204,98655	265,564083
	stabw	0,5631875	4,2906434	4,4992218	10,172867	16,8325905	22,116722	32,8312109
	vk(%)	31,747044	39,767355	18,150711	18,741142	12,5978536	10,789353	12,3628205

**Tabelle 19 Messwerte Harmol und Harmin mit Formulierungslösung verdünnt - Löslichkeitsproblem**

In den folgenden Tabellen kann man erkennen, dass, obwohl Harmol und Harmin in der gleichen Lösung vorlag, die Variationskoeffizienten und  $R^2$ -Werte unterschiedlich sind. Dies lässt ebenfalls möglicherweise auf ein Löslichkeitsproblem des in DMSO gelösten Harmins mit Wasser schließen, deshalb wurde als nächster Schritt 100% ACN, als ein lipophiles Verdünnungsmedium gewählt. Die Konsequenzen für die Wahl von 100% ACN als Verdünnungslösung sind im nachfolgenden Chromatogramm 7 abgebildet.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
08.06.2015	mw 1	1,164134	7,062356	14,10359	31,16098	62,04027	94,0469	120,094
Harmol	mw 2	1,1524	6,665631	14,53927	33,66374	65,87608	97,6018	126,6513
	mw 3	1,07702	7,102239	13,6943	33,60906	66,27364	96,5147	125,8201
	mw 4	1,176606	7,289243	13,86074	33,5467	64,5148	94,9734	124,0678

	mittelwert	1,14254	7,02986725	14,049475	32,99512	64,6761975	95,7842	124,1583
	stabw	0,0447842	0,26219396	0,36724095	1,22369455	1,91186676	1,582499	2,9156676
	vk (%)	3,9197083	3,72971421	2,6139123	3,70871375	2,95605931	1,65215	2,3483469

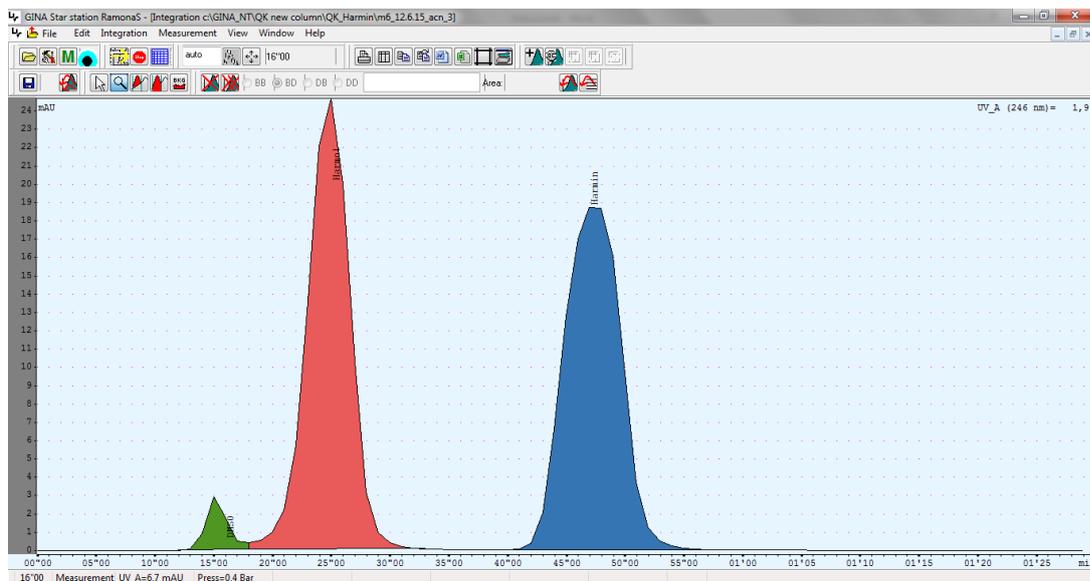
**Tabelle 20 Messwerte Harmol in DMSO gelöst und mit Wasser verdünnt -  $R^2=0,9994$**

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
08.06.2015	mw 1	1,324433	8,353372	16,75678	33,54152	69,46667	104,3231	122,8325
Harmin	mw 2	1,398623	8,374554	19,39186	41,41837	78,27903	103,9306	132,2117
	mw 3	1,265709	8,745583	16,71993	42,00025	78,20534	108,8815	135,6846
	mw 4	1,290576	8,725874	17,0277	38,2285	70,59128	106,6887	127,6284
	mittelwert	1,3198353	8,54984575	17,4740675	38,79716	74,13558	105,956	129,5893
	stabw	0,0577766	0,21496368	1,28587153	3,87623758	4,7641686	2,299566	5,5835813
	vk (%)	4,3775609	2,51424042	7,3587419	9,99103435	6,42629167	2,170303	4,3086746

**Tabelle 21 Messwerte Harmin in DMSO gelöst und mit Wasser verdünnt -  $R^2=0,9942$**

Das Chromatogramm 7 zeigt, dass bei einer hohen Konzentration von  $c=10\mu\text{g/ml}$  der DMSO-Peak, in welchem die Substanz vorgelöst wurde, den Harmol Peak stört und somit konnte Harmol nicht eindeutig quantifiziert werden.

Als letzte Möglichkeit wurden die vorgelösten Substanzen mit Laufmittel verdünnt und erzielten eine gute Reproduzierbarkeit (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16).



**Chromatogramm 7 Harmol und Harmin in DMSO gelöst und mit 100% ACN verdünnt  $c=10\mu\text{g/ml}$**

## 4.4 [<sup>11</sup>C]-(+)-PHNO

### 4.4.1 Allgemeine Eigenschaften

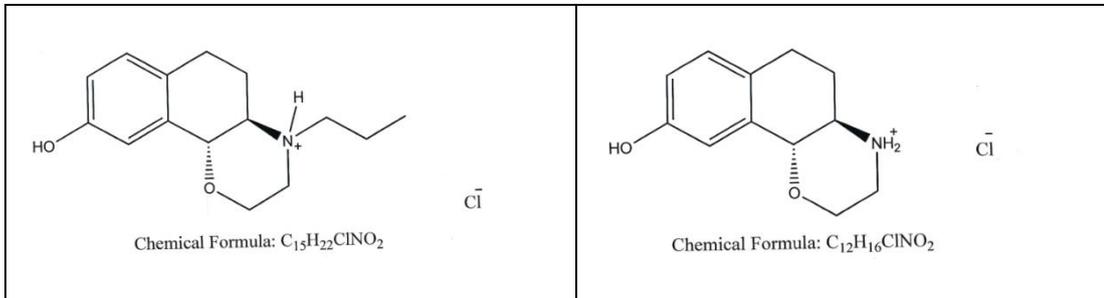


Tabelle 22 Strukturformeln von (+)-PHNO (links) und (+)-HNO (rechts)

[<sup>11</sup>C]-(+)-PHNO [(+)-4-Propyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-naphtho[1,2-b][1,4]oxazin-9-ol hydrochlorid (1:1)] wird als hochaffiner agonistisch wirkender Dopamin D2/3 Rezeptorligand in klinischen PET-Studien verwendet. [17, 22] Im Gegensatz zu den mehr allgemein verwendeten Antagonisten, konnte (+)-PHNO wichtige Informationen von Dopamin-D2-Rezeptoren bereitstellen und somit Erkrankungen wie Schizophrenie, Bewegungsstörungen und Suchterkrankungen mittels in-vivo-Bildgebung untersuchen. [23] Die Synthese erfolgt mittels des Precursors (+)-HNO [3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-, 2H-naphtho[1,2-b]-1,4-oxazin-9-ol, hydrochlorid (1:1)]. [17]

### 4.4.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 25mM Phosphatpuffer (pH=7 mit 10%HCl eingestellt)/100% ACN 60:40

Säule/Stationäre Phase: Lichrospher LiChrocart RP-18, 250x4.6mm

Flow: 1,5 ml/min

Wellenlänge: 280 nm

Precursor: (+)-HNO

Standard: (+)-PHNO

#### 4.4.2.1 Absorptionsmaxima

Rt [min]	5`10	1`47
Wellenlänge [nm]	(+)-PHNO	(+)-HNO
250	r	0,036077
255	0,030005	0,048570
260	0,032800	0,083262
265	0,091428	0,168610
270	0,165484	0,256274
275	0,231200	0,372863
279	0,277770	0,477366
280	0,724178	0,9387203
281	0,326314	0,47822
285	0,270903	0,436991
290	0,196598	0,341189
295	0,060558	0,123207
300	0,032800	0,024486
305	Rauschen	
310	Rauschen	
315	Rauschen	
320	Rauschen	
325	Rauschen	
330	Rauschen	
335	Rauschen	
340	Rauschen	
345	Rauschen	
350	Rauschen	

Tabelle 23 Messwerte Absorptionsmaxima (+)-PHNO und (+)-HNO, c=1µg/ml

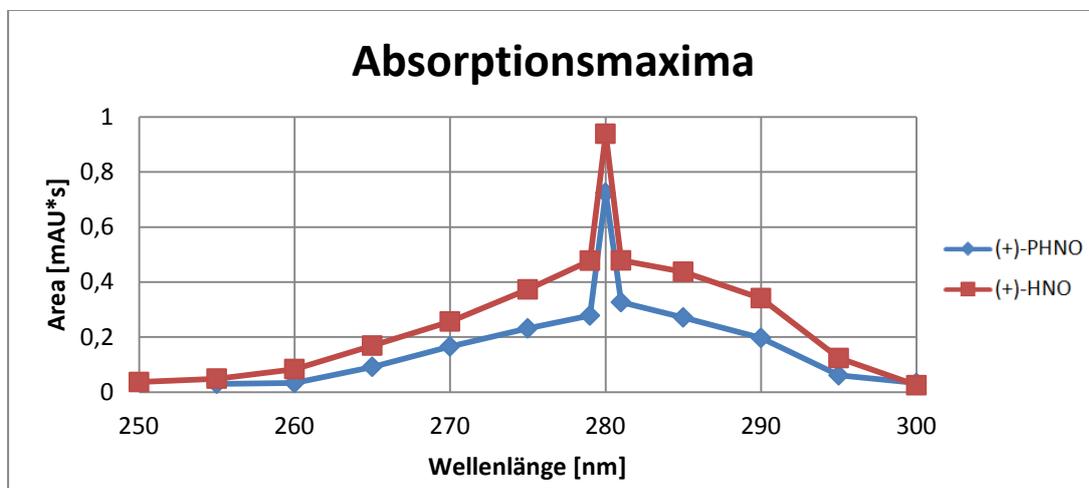


Abbildung 19 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima (+)-HNO und (+)-PHNO

#### 4.4.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
23.12.2014	mw 1	0,04470	0,08197	0,39233	0,77633	1,96602	4,10637	6,21004	8,18963
	mw 2	0,04523	0,07898	0,386781	0,79135	1,97596	4,08248	6,14257	8,22999
	mw 3	0,03610	0,07101	0,382245	0,78265	1,95426	4,10601	6,14787	8,17322
23.12.2014	mw 1	0,03967	0,07691	0,377403	0,79458	1,98321	4,00261	6,01936	8,1050
	mw 2	0,04079	0,06889	0,395179	0,79410	2,00059	4,03329	6,0439	8,0820
	mw 3	0,03927	0,06565	0,377389	0,80385	1,97435	4,01473	6,01336	8,15363
23.12.2014	mw 1			0,370312	0,79791	1,95712	4,00851	6,06913	8,14887
	mw 2			0,350344	0,78732	1,97727	3,99840	6,0622	8,17963
	mw 3			0,399685	0,77950	1,93695	3,98656	6,03726	8,06606
	mittelwert	0,04096	0,073903	0,381296	0,78973	1,96953	4,03766	6,08285	8,14756
	stabw	0,00348	0,00635	0,0149670	0,00903	0,01850	0,04767	0,06805	0,05367
	vk (%)	8,48689	8,58997	3,925987	1,14299	0,93925	1,18054	1,11870	0,65868

Tabelle 24 Messwerte (+)-HNO, Methoden-Transfer

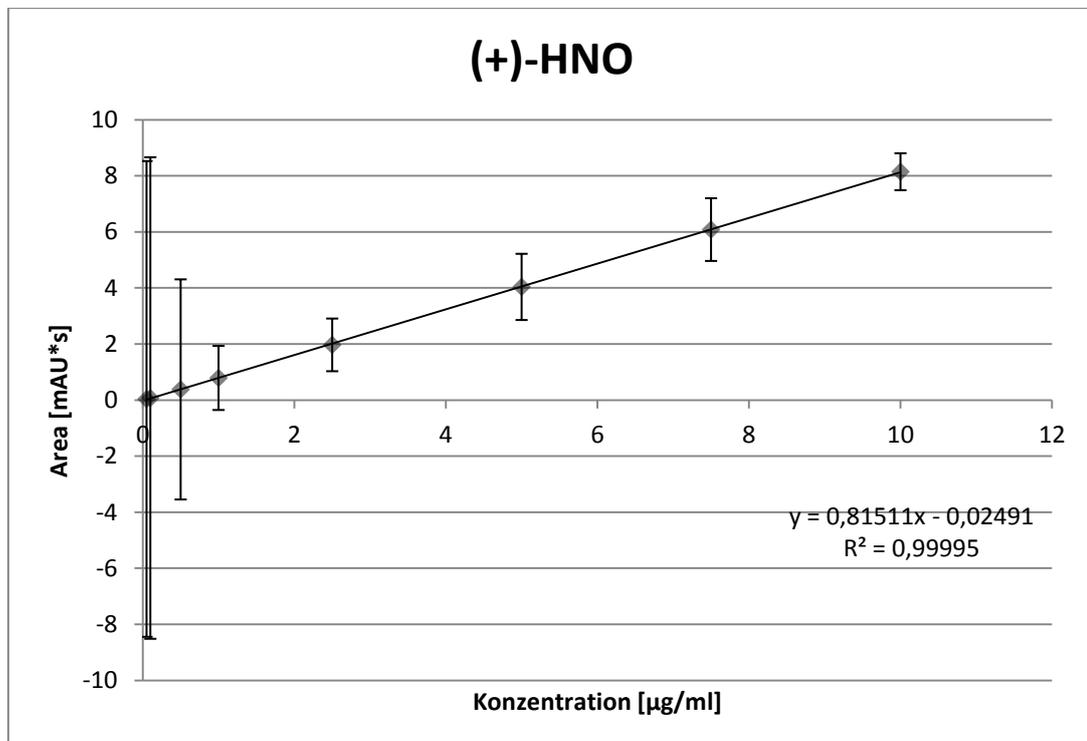


Abbildung 20 Standardgerade (+)-HNO, Methoden-Transfer

Datum	conc [µg/ml]	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
22.12.2014	mw 1			0,281942	0,723334	1,735526	3,505903	5,470409	7,261924
	mw 2			0,299915	0,719929	1,71802	3,597422	5,389365	7,233202
	mw 3			0,277845	0,729271	1,670122	3,588778	5,405045	7,21674
23.12.2014	mw 1	0,01861	0,041054	0,316258	0,684206	1,725123	3,619806	5,474714	7,248741
	mw 2		0,056362	0,325698	0,684981	1,698903	3,560543	5,471524	7,286207
	mw 3	0,02239	0,061415	0,299108	0,661623	1,714909	3,549767	5,450451	7,264006
23.12.2014	mw 1	0,01972	0,05031	0,329351	0,681019	1,714551	3,484962	5,299586	7,193828
	mw 2	0,02677	0,052247	0,322473	0,690528	1,726735	3,542082	5,360603	7,101574
	mw 3	0,01646	0,052696	0,305867	0,688058	1,721168	3,519946	5,268403	7,194978
	mittelwert	0,02079	0,052347	0,3064952	0,695883	1,713895	3,552134	5,3989	7,222356
	stabw	0,00397	0,006785	0,0185866	0,022876	0,019271	0,044492	0,0768774	0,055198
	vk (%)	19,0768	12,96096	6,0642401	3,287268	1,124411	1,252534	1,4239464	0,764262

Tabelle 25 Messwerte (+)-PHNO, Methoden-Transfer

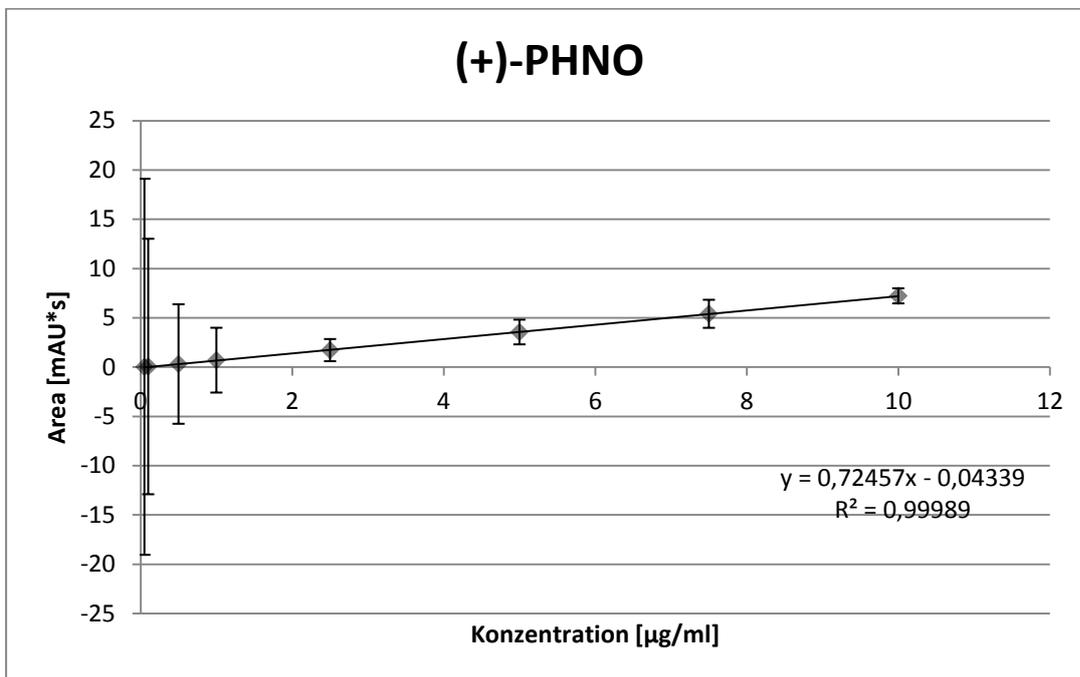


Abbildung 21 Standardgerade (+)-PHNO, Methoden-Transfer

### 4.4.3 Methoden-Etablierung

Mobile Phase: 33% A : 20% B : 14% C : 33% D

A: Ammoniumphosphatpuffer pH=2,1

B: 90% ACN (V%/V%)

C: 100% Aqua destillata

D: Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: Initialflow von 1,6 ml/min ab Sekunde 30 ein Flow von 1,0 ml/min

Wellenlänge: 280 nm

Precursor: (+)-HNO

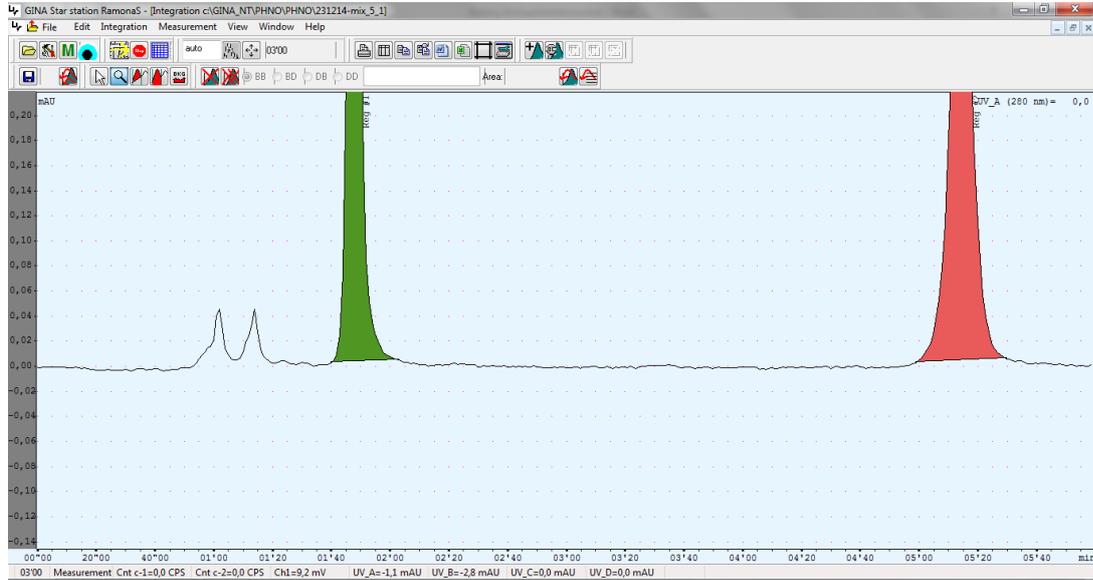
Standard: (+)-PHNO

### 4.4.4 Resultate

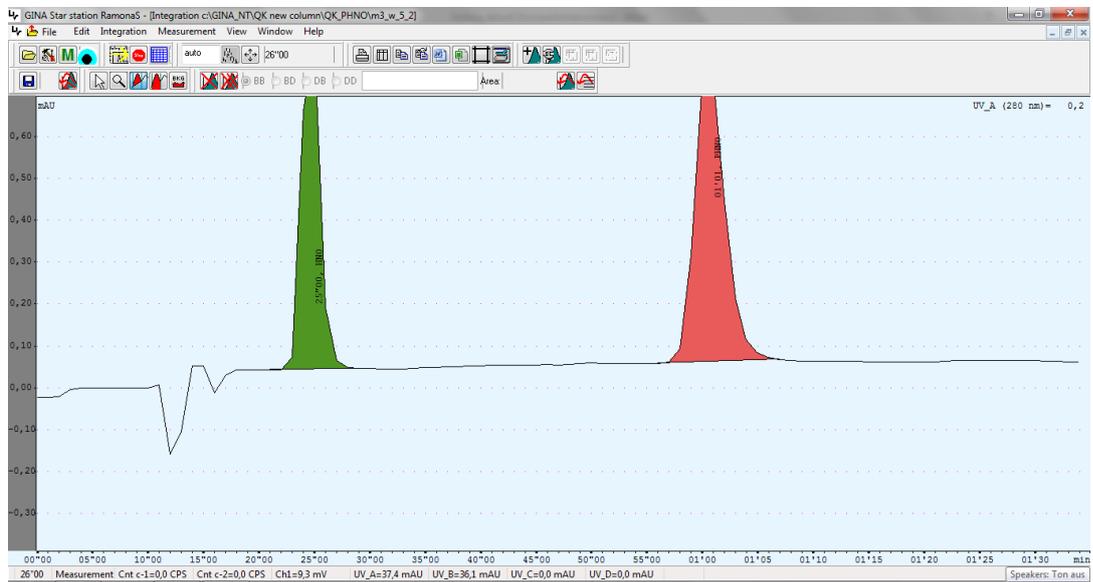
#### 4.4.4.1 Werte

Retentionszeiten	(+)-HNO	(+)-PHNO
Methoden-Transfer	1`48	5`15
Methoden-Etablierung	25``	1`01

#### 4.4.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 8 (+)-HNO und (+)-PHNO, Methoden-Transfer



Chromatogramm 9 (+)-HNO und (+)-PHNO, Methoden-Etablierung

#### 4.4.4.3 Standardgeraden

Der Standard wurde in DMSO gelöst und mittels Aqua destillata verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
08.06.2015	mw 1	0,039196	0,149312	0,315569	0,775327	1,541162	2,414997	3,149084
Probe a	mw 2	0,022471	0,150156	0,31112	0,787584	1,593367	2,36159	3,090326
	mw 3	0,027704	0,15232	0,301588	0,797113	1,595958	2,426211	3,125342
Probe b	mw 1	0,031648	0,14956	0,300143	0,743035	1,520216	2,251228	2,999423
	mw 2	0,029361	0,152359	0,301598	0,73754	1,473463	2,299196	3,038541
	mw 3	0,026	0,150275	0,296474	0,74086	1,515891	2,289263	3,035833
Probe c	mw 1	0,02922	0,159109	0,324553	0,791693	1,561026	2,432374	3,22661
	mw 2	0,02895	0,153697	0,307477	0,798456	1,641397	2,46007	3,300289
	mw 3	0,028574	0,1472	0,3148	0,788355	1,626613	2,451501	3,18022
	mittelwert	0,029236	0,15155422	0,30814689	0,77332922	1,5632326	2,37627	3,1272964
	stabw	0,00452961	0,00343612	0,0091106	0,0255443	0,055619	0,0784102	0,0981265
	Vk (%)	15,4932748	2,26725516	2,95658038	3,3031547	3,5579633	3,2997188	3,1377436

Tabelle 26 Messwerte (+)-HNO, Methoden-Etablierung

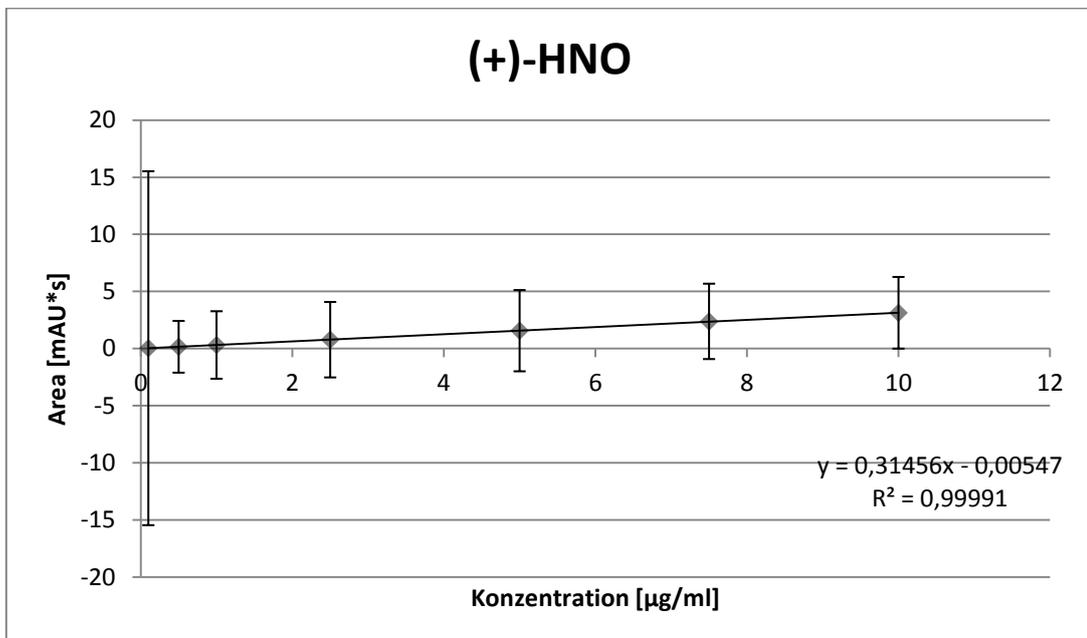


Abbildung 22 Standardgerade (+)-HNO, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
08.06.2015	mw 1	0,055861	0,217748	0,453657	1,138616	2,16397	3,360355	4,348888
Probe a	mw 2	0,033436	0,226307	0,425049	1,098281	2,237846	3,314775	4,446077
	mw 3	0,040799	0,219089	0,430457	1,135049	2,263059	3,374241	4,431609
Probe b	mw 1	0,057805	0,21767	0,447214	1,089219	2,205912	3,286386	4,402333
	mw 2	0,043625	0,219768	0,426201	1,081558	2,192537	3,274437	4,302136
	mw 3	0,03494	0,223863	0,430876	1,087256	2,224241	3,355861	4,348401
Probe c	mw 1	0,042319	0,216214	0,464225	1,122848	2,253519	3,468362	4,5512
	mw 2	0,04069	0,217732	0,419974	1,143312	2,263921	3,502369	4,553336
	mw 3	0,042244	0,217859	0,442761	1,119451	2,300022	3,427883	4,531986
	mittelwert	0,0435243	0,2195833	0,43782378	1,1128433	2,2338919	3,3738521	4,43510733
	stabw	0,0082928	0,00332762	0,01491521	0,024065	0,0418357	0,07897614	0,09399526
	vk (%)	19,0531613	1,5154224	3,40666922	2,1624966	1,8727735	2,3408298	2,1193457

Tabelle 27 Messwerte (+)-PHNO, Methoden-Etablierung

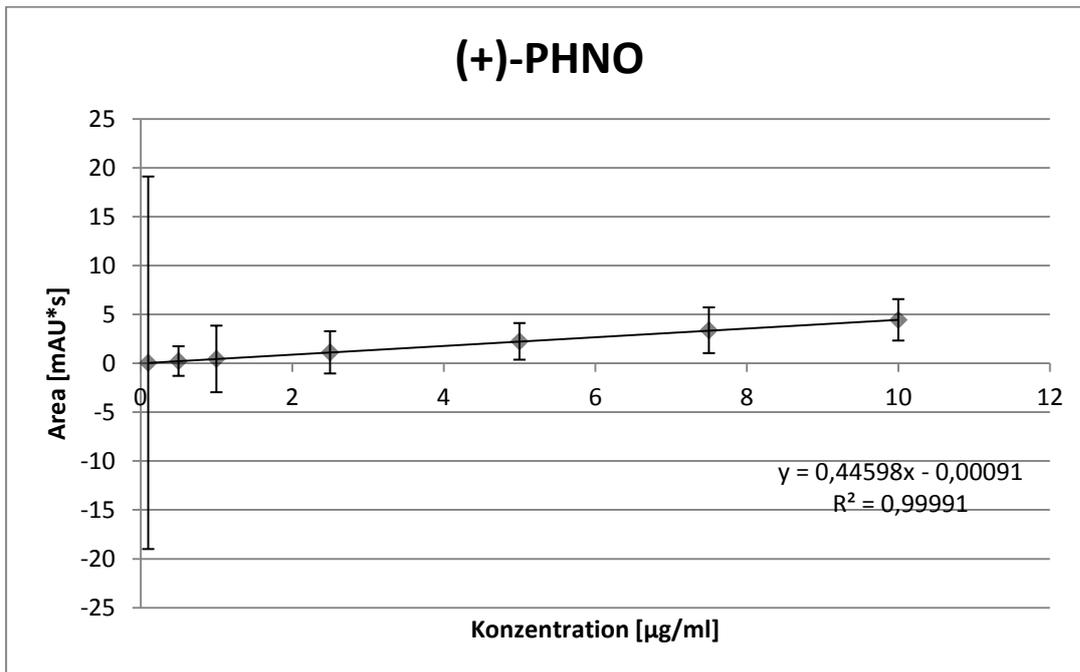


Abbildung 23 Standardgerade (+)-PHNO, Methoden-Etablierung

#### 4.4.4.4 Diskussion

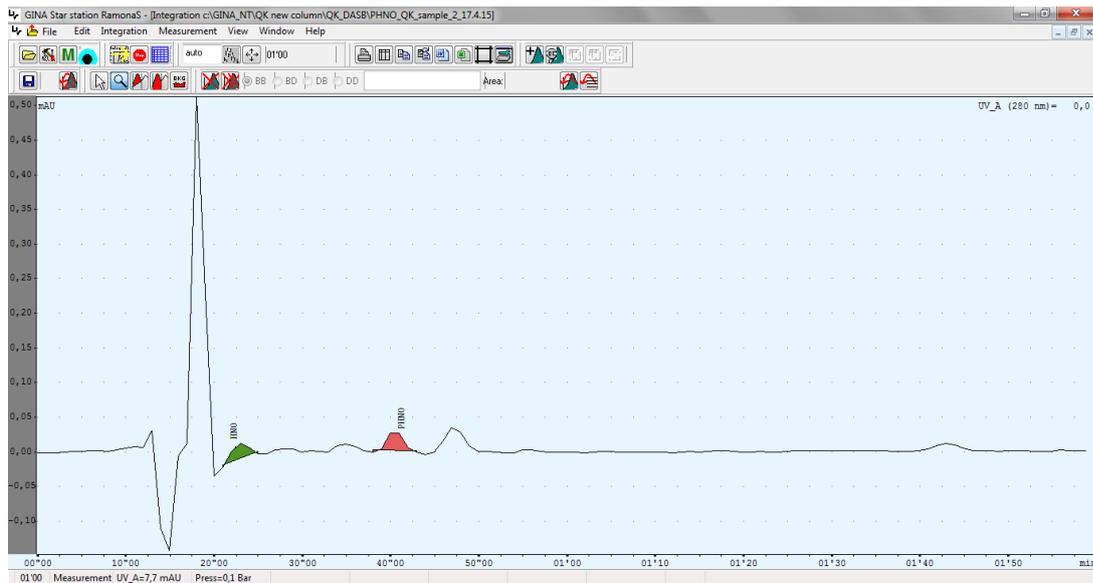
##### Laufmittelzusammensetzung

Bei einem schnellen Screening der vier Laufmitteln wurde ermittelt, dass bei Verwendung von 90% ACN und dem Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3 eine frühe Retentionszeit erreicht wird. Im nächsten Schritt wurde das Mischungsverhältnis beider Laufmittel eruiert. Da das DMSO, in welchem die Standardsubstanz zunächst gelöst war, die Analyse störte, wurde die Standardsubstanz in 50% ACN(100%) und 50% Wasser gelöst. Mit der Zusammensetzung von 49% ACN(90%) und 51% Puffer pH=9,3 konnte schlussendlich eine Retentionszeit des Precursors bei 21 Sekunden und des Tracers bei 41 Sekunden erreicht werden.

90% ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Flow [ml/min]	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO	Druck [bar]	Selektivität
0,3	0,7	1	28``	2`17	268	4,9
0,4	0,6	1	22``	1`02	257	2,8
0,45	0,55	1	20``-21``	47``-48``	249	2,3-2,4
0,49	0,51	1	21``	41``	244	2
0,5	0,5	1	20``	38``		1,9
0,72	0,28	1	16``	26``	191	1,4

**Tabelle 28** Versuche zur Findung der LM-Zusammensetzung für den Tracer (+)-PHNO bei c=1µg/ml

Bei der Überprüfung dieser Methode unter Realbedingungen wurde festgestellt, dass Ethanol, welcher in der Formulierungslösung enthalten ist, den Peak des Precursors stört. Im Chromatogramm 10 erkennt man, dass die Integration des (+)-HNOs unter diesen Bedingungen nicht zulässig ist, und deshalb wurden, unter Verwendung einer Gradientenelution, weitere Versuche unternommen, um eine Runtime von unter einer Minute zu erhalten.



**Chromatogramm 10 Original QK-Sample (+)-PHNO mit dem Laufmittelverhältnis ACN(90%) / Puffer 9,3 49:51**

Im Anhang findet man die Tabellen, welche die Anordnung der Versuche mit unterschiedlichen Parametern zeigen. Anfangs wurde nur mit einem Laufmittelgradienten gearbeitet, danach folgte zusätzlich die Änderung des Flows ab einem gewissen Zeitpunkt. Die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung von Kanal C (90% ACN 10% H<sub>2</sub>O) ersetzt durch 100% ACN, führte ab einer gewissen Ratio zu Löslichkeitsproblemen des Puffers mit Acetonitril.

Bei der Einstellung, (entspricht Versuch Nr. 16 der Tabellen im Anhang) 20 % ACN100% und 90% Puffer pH9,3 ab Sekunde 1 Änderung auf 90 % ACN100% und 10% Puffer pH9,3 weiteres ein Initialflow von 1,3 ab Sekunde 50 1 ml/min, wurde festgestellt, dass das oben beschriebene Löslichkeitsproblem Puffer/ACN auftrat.

#### Auskristallisationstests des Laufmittels

Der Puffer wurde unfiltriert und filtriert (Fa. Merck, MILLEX GV 0,22 µm) mit 90% ACN und 100% ACN in unterschiedlichen Zusammensetzungen vermischt und festgestellt, dass ab einem gewissen Verhältnis, die Lösung auskristallisiert, unabhängig davon, ob die Lösung filtriert war oder nicht.



Abbildung 24 verschiedene Laufmittelzusammensetzungen von 90% ACN und Puffer9,3

Der Versuch zeigte, dass die Laufmittelzusammensetzung höchstens 75% Puffer9,3 und 25% ACN 90% betragen darf, um ein Auskristallisieren zu verhindern.

Unter diesen Voraussetzungen wurde ein Flowgradient erstellt.

20.05.2015	c [µg/ml]	Flowrate [ml/min]	Flowrate von [sek]	Flowrate bis [sek]	Rt (+)- HNO [sek]	AUC	Rt (+)- PHNO [sek]	AUC	Selektivität
Mix	5µL	1,3	Anfang	Ende	36``	1,594263	56``	1,563932	1,6
Mix	5µL	1,5	Anfang	Ende	32``	1,458176	50``	1,361434	1,6
Single	10µL	1,5	Anfang	Ende	32``	3,322385			
Single	10µL	1,5	Anfang	Ende			49``	2,853501	
Single	10µL	1,5	Anfang	40``			52``	3,896413	
Single	10µL	1,5	Anfang	35``			55``	4,292476	
Single	10µL	1,5	Anfang	30``			58``	4,528944	
Single	10µL	1,5	Anfang	25``			1`01	4,433864	
Single	10µL	1	Anfang	Ende			1`11	4,473623	
Mix	5µL	1	Anfang	Ende	48``	2,086564	1`12	2,244228	1,5
Mix	5µL	1	Anfang	Ende	47``	2,109428	1`11	2,205455	1,5
Mix	5µL	1,5	Anfang	30``	32``	1,418396	58``	2,04108	1,8
Mix	5µL	1,5	Anfang	35``	33``	1,349211	55``	1,863384	1,7
Mix	5µL	1,5	Anfang	25``	32``	1,641381	1`00	2,054654	1,9

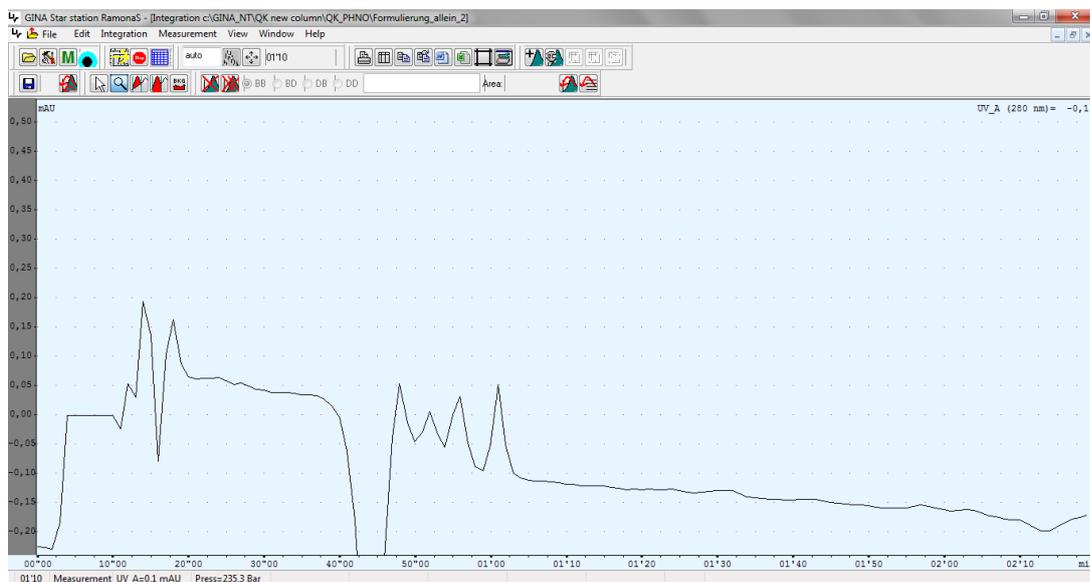
Tabelle 29 Versuche Flowgradient, (+)-HNO und (+)-PHNO

Die Standardgerade wurde zunächst unter folgenden Bedingungen gefertigt.

Initial 90%ACN/9,3 Puffer 20:80 mit einem Flow von 1,5 ml/min, nach 1 Sekunde wird die Zusammensetzung wie folgt verändert 90%ACN/9,3 Puffer 75:25 und der Flow wird nach 30 Sekunden auf 1,0 ml/min reduziert. Diese Einstellungen ergeben eine Retentionszeit des (+)-HNO von 32 Sekunden und von (+)-PHNO 58 Sekunden.

Es wurde nach der Erstellung der Verdünnungsreihe festgestellt, dass bei niedrigen Konzentrationen [ $c=0,1\mu\text{g/ml}$  -  $c=1\mu\text{g/ml}$ ] die Verunreinigungen, die in der Formulierungslösung enthalten sind, das Quantifizieren des (+)-PHNOs erschwerten.

Auch bei höheren Konzentrationen war ebenfalls die Integration der Peaks erschwert, und nur durch eine Lotfällung des Integrals realisierbar. Dies ist durch Betrachtung des Chromatogramm 11 nachvollziehbar, da bereits die Formulierungslösung alleine Störpeaks aufweist.



**Chromatogramm 11 oben genannte Bedingungen, Formulierungslösung alleine**

### Weitere Versuche der Laufmittelzusammensetzung

In der folgenden Tabelle sind weitere isokratische Versuche mit unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen aufgelistet.

Flow [ml/min]	Puffer2,1 (A)	90% ACN (B)	H2O (C)	Puffer9,3 (D)	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO	Anmerkung
1	0,33	0,34		0,33			keine 2 Peaks
1	0,33	0,17	0,17	0,33	1'02	2'29	
1	0,33	0,2	0,14	0,33	38-41''42	1'26-1'28-1'30	
1	0,33	0,21	0,13	0,33	37	1'17	davor kleiner Peak
1	0,33	0,22	0,12	0,33			Doppelpeak
1	0,33	0,24	0,1	0,33	30''	50''	Doppelpeak
1	0,32	0,25	0,11	0,32	28''	45''	Doppelpeak
1	0,3	0,4		0,3			keine 2 Peaks
1	0,2	0,4		0,4	19''-20''	33''-34''	EtOH Peak im (+)-HNO
1	0,1	0,3	0,2	0,4	24	1,31	Lange Rt (+)-PHNO
1	0,17	0,6	0,06	0,17			nichts gesehen

**Tabelle 30 Versuche neue Laufmittelzusammensetzung, (+)-HNO und (+)-PHNO**

Mit der Zusammensetzung 33/20/14/33 wurde ein Flowgradient erstellt.

Druck [Bar]	Flow [ml/min]	von [Zeit]	bis dann Flow von 1,0 [ml/min]	Puffer2,1 (A)	90% ACN (B)	H2O (C)	Puffer 9,3 (D)	Rt (+)-HNO	AUC	Rt (+)-PHNO	AUC
	1	Anfang	Ende	0,33	0,2	0,14	0,33	38-42	10,4021	1'26-1'30	11,06529
	1,5	Anfang	Ende	0,33	0,2	0,14	0,33	29''	5,529654	1'01	5,909357
435	1,6	Anfang	Ende	0,33	0,2	0,14	0,33	26''	5,602403	53''	5,913699
	1,6	Anfang	40 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	26''	6,064636	55''	8,708211
	1,6	Anfang	40 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	26''	5,255342	1'01	8,609001
	1,6	Anfang	35 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	5,461246	1'05	9,236048
462	1,7	Anfang	35 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	26''	5,040836	59''	8,782546
	1,6	Anfang	30 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	28''	3,109396	1'07	5,274588

**Tabelle 31 Versuche neue LM-Zusammensetzung und Flowgradient, (+)-HNO und (+)-PHNO**

Versuch [Nr]	Flow [ml/min]	von [Zeit]	bis dann Flow von 1,0 [ml/min]	Puffer 2,1 (A)	90% ACN (B)	H <sub>2</sub> O (C)	Puffer 9,3 (D)	Rt (+)-HNO	AUC	Rt (+)-PHNO	AUC
1	1,6	Anfang	30 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	26''	3,66163	1'05	5,11517
2	1,6	Anfang	30 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	3,39574	1'06	4,59091
3	1,6	Anfang	30 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	4,31933	1'06	5,94140
Mittelwert der Flächen									3,79224		5,215826
1	1,6	Anfang	35 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	3,46368	1'03	4,74728
2	1,6	Anfang	35 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	3,28026	1'03	4,42863
3	1,6	Anfang	35 sek	0,33	0,2	0,14	0,33	27''	3,85576	1'04	5,27475
Mittelwert der Flächen									3,533234		4,816886

**Tabelle 32 Gegenüberstellung der letzten zwei Versuche, (+)-HNO und (+)-PHNO**

Da der Retentionszeitunterschied von (+)-PHNO nur ein bis drei Sekunden betrug und die Fläche (AUC) auch nur gering höher war, wurde die Methode mit einem Initialflow von 1,6 ml/min und ab Sekunde 30 ein Flow von 1,0 ml/min ausgewählt.

Es wurden, zur Verifizierung, nochmals alle Möglichkeiten getestet, und es konnte festgestellt werden, dass unter den oben genannten Konditionen, weder Verunreinigungen der Formulierungslösung noch andere Störpeaks eine einwandfreie Quantifizierung erschwerten.

Der Standard wurde in DMSO gelöst und mittels der Formulierungslösung verdünnt. Da beim zweiten Durchgang eine Verunreinigung vor dem (+)-PHNO festgestellt wurde, wurden die weiteren Verdünnungsreihen mit Wasser (= Aqua destillata) angefertigt.

## 4.5 [<sup>11</sup>C]-DASB

### 4.5.1 Allgemeine Eigenschaften

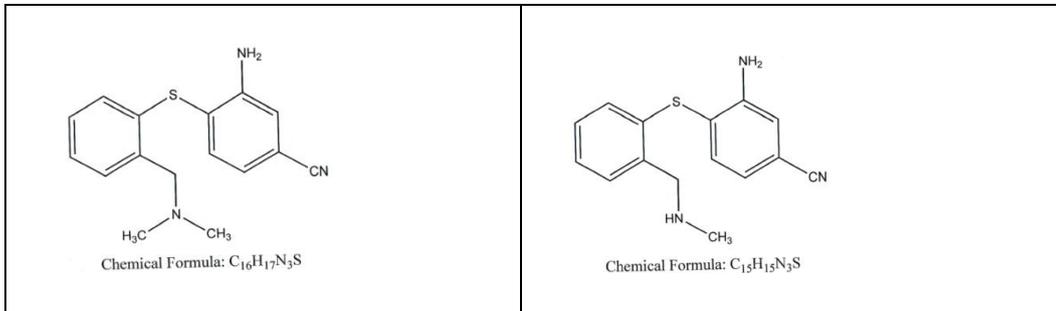


Tabelle 33 Strukturformel von DASB (links) und MASB (rechts)

[<sup>11</sup>C]-DASB [[(<sup>11</sup>C]N,N-Dimethyl-2-(2-amino-4-cyanophenylthio)benzylamin] ist ein Ligand am Serotonin-Transporter (SERT). [17, 24] Der SERT kontrolliert den extrazellulären Serotoninspiegel im synaptischen Spalt, wodurch die Serotonin Wiederaufnahme beeinflusst wird. Auf Grund dieses Umstandes kann es zu psychiatrischen Störungen kommen. Dieser Radiotracer eignet sich zur Bildgebung mittels PET um den SERT in vivo zu visualisieren und zu quantifizieren. In klinischen Studien wird mittels dieser Anwendung unter anderem die Wirkungsweise neu entwickelter Antipsychotika erforscht. [24] Die Synthese erfolgt durch den Precursor MASB [N-Methyl-2-(2-amino-4-cyanophenylthio)benzylamin]. [17]

### 4.5.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 0,1M Ammoniumformiat /100% Acetonitril 50:50

Säule/Stationäre Phase: Phenomenex Prodigy 5µm Phenyl 3 (PH-3) 250x4,6mm

Flow: 2 ml/min

Wellenlänge: 254 nm

Precursor: MASB

Standard: DASB

#### 4.5.2.1 Absorptionsmaximum

Rt [min]	5'52
Wellenlänge [nm]	AUC DASB
245	3,183472
250	3,199595
254	3,660381
255	3,630479
256	3,452934
260	3,328002
265	2,984911
270	2,519803
275	2,168752
280	1,955591
285	1,699334
290	1,506738
295	1,441783
300	1,362757
305	1,297287
310	1,274364
315	1,196969
320	1,151989
325	1,117954
330	1,046449
335	0,931815
340	0,885436

Tabelle 34 Messwerte Absorptionsmaximum DASB, c=1µg/ml

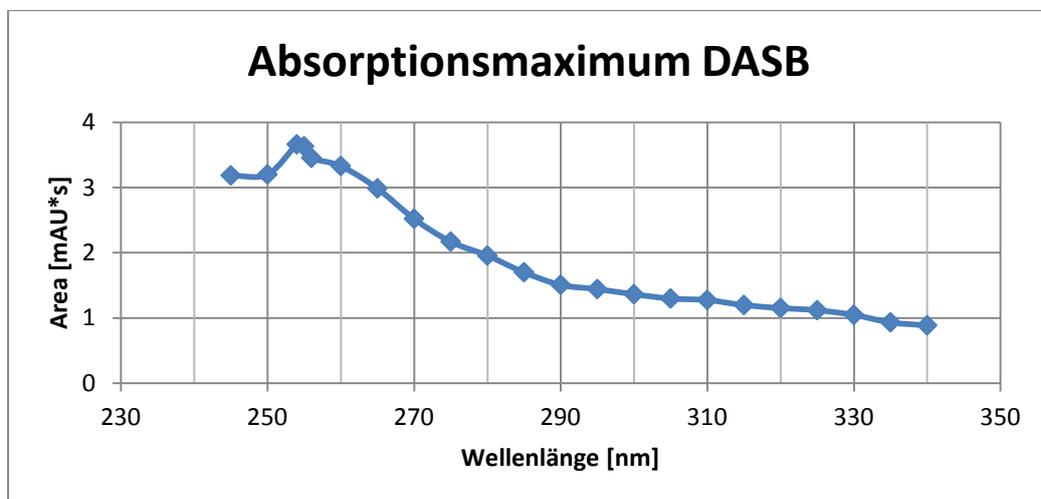


Abbildung 25 grafische Darstellung des Absorptionsmaximums von DASB

#### 4.5.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt.

Datum	conc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,5	1	2,5	5	7,5	10
30.12.2014	mw 1	1,084798	3,270093	6,871402	13,44858	20,29273	27,88742
	mw 2	1,059123	3,254555	6,198776	13,36997	20,34886	27,97054
	mw 3	1,66418	2,87801	6,964525	13,99363	20,69132	27,43309
30.12.2014	mw 1	1,76418	2,623257	7,403456	13,81643	20,81039	26,92955
	mw 2	1,360512	1,771542	6,184155	14,19946	20,81119	27,63071
	mw 3		2,338433	7,097767	13,95736	19,13438	26,9918
30.12.2014	mw 1	0,987676	2,108014	6,987294	13,34876	21,53419	27,75285
	mw 2	1,163683	2,801418	6,597608	13,07843	21,04246	26,95947
	mw 3	0,993022	2,662614	5,85717	13,64764	21,04246	27,51767
	mittelwert	1,2596468	2,634215	6,6846837	13,65114	20,63422	27,4525667
	stabw	0,3055259	0,498255	0,5087995	0,3671811	0,676059	0,40511008
	vk (%)	24,254887	18,91473	7,6114227	2,6897465	3,2763972	1,47567286

Tabelle 35 Messwerte MASB, Methoden-Transfer

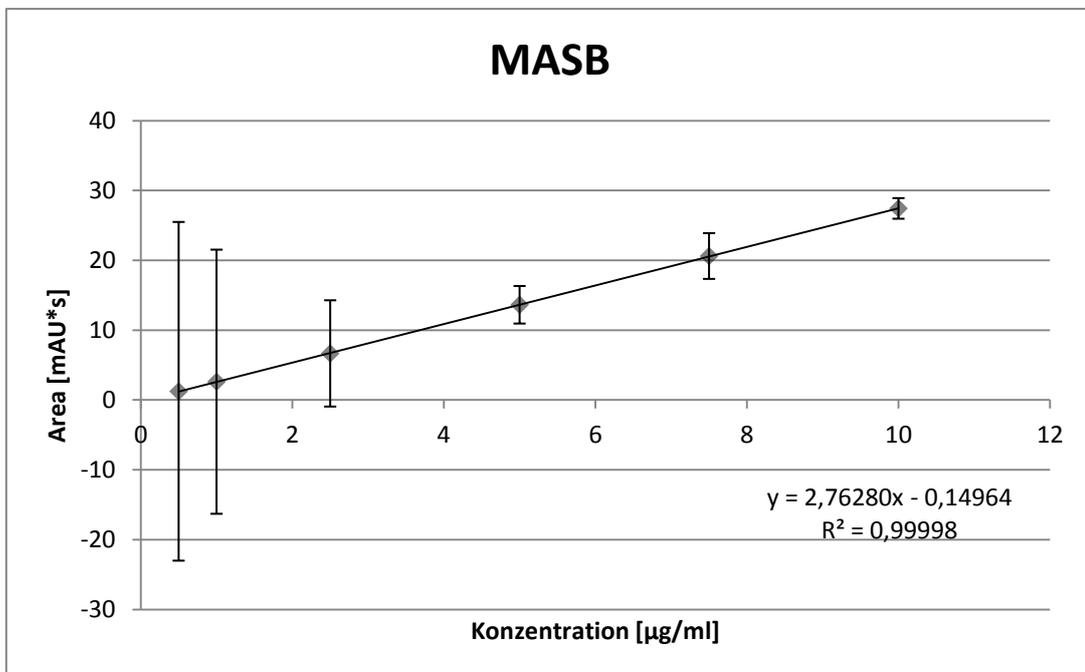


Abbildung 26 Standardgerade MASB, Methoden-Transfer

Datum	conc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,5	1	2,5	5	7,5	10
30.11.2014	mw 1		2,025694	5,423214	12,15	19,88491	26,89968
	mw 2	1,359816	2,825153	6,325579	13,18777	19,56786	26,59492
	mw 3	0,993957	2,87801	5,930352	13,7898	19,04247	26,80997
30.11.2014	mw 1	1,744291	2,258006	7,53974	12,29756	18,22173	26,13717
	mw 2	1,335073	1,887919	6,311715	12,85106	19,85388	26,9597
	mw 3		2,728151	6,367999	12,39497	20,30265	26,99799
30.11.2014	mw 1	1,310442	1,639107	5,916977	12,25734	20,09692	26,03482
	mw 2	1,067662	2,621514	6,596723	12,44073	20,37935	25,592
	mw 3	1,199919	2,367802	6,239651	13,21102	20,37935	26,30943
	mittelwert	1,2873086	2,3590396	6,29466111	12,7311389	19,74768	26,4817422
	stabw	0,2445552	0,4406514	0,57942866	0,56141424	0,7173096	0,49116854
	vk (%)	18,997406	18,679272	9,20508117	4,40977231	3,63237405	1,85474406

Tabelle 36 Messwerte DASB, Methoden-Transfer

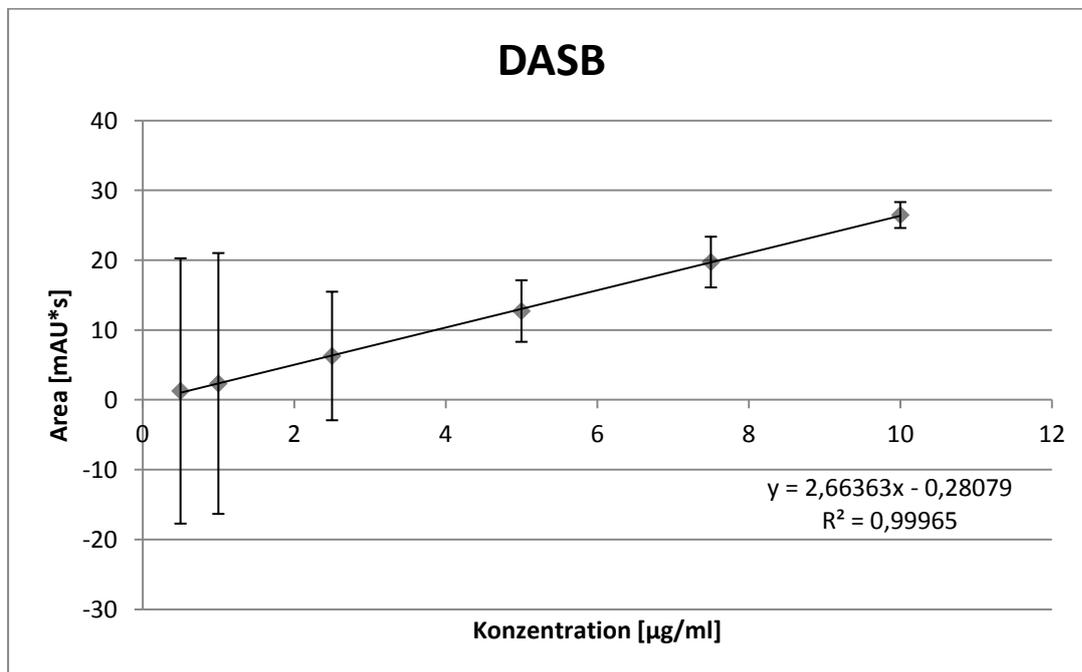


Abbildung 27 Standardgerade DASB, Methoden-Transfer

### 4.5.3 Methoden-Etablierung

Pumpenbetrieb: Flowgradient

Mobile Phase: ACN (90%) / 50mM Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3, 60:40

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: Initialflow von 1,5 ml/min ab Sekunde 25 ein Flow von 1,0 ml/min

Wellenlänge: 254 nm

Precursor: MASB

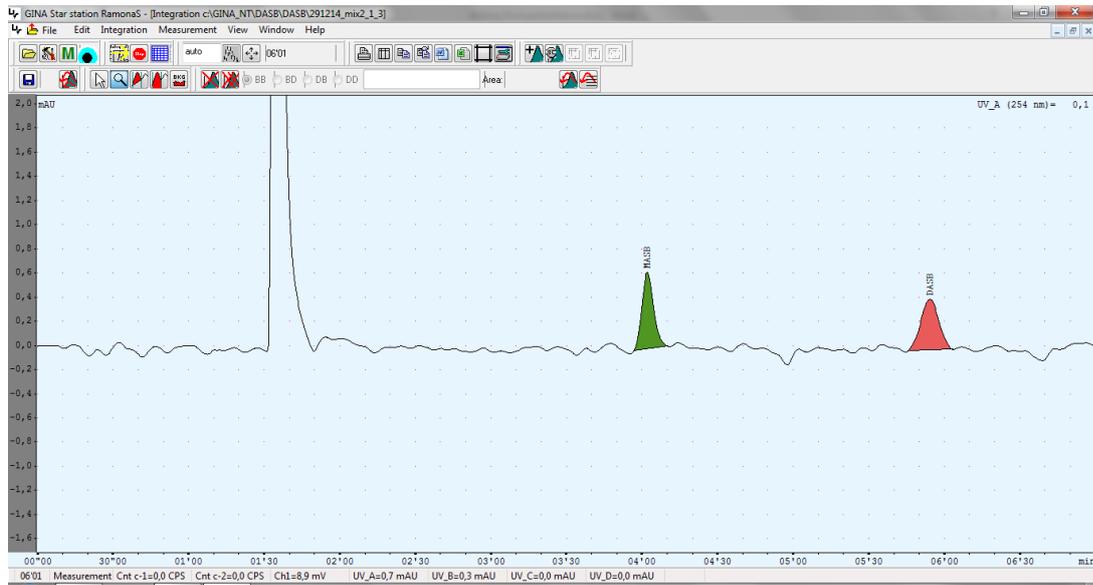
Standard: DASB

### 4.5.4 Resultate

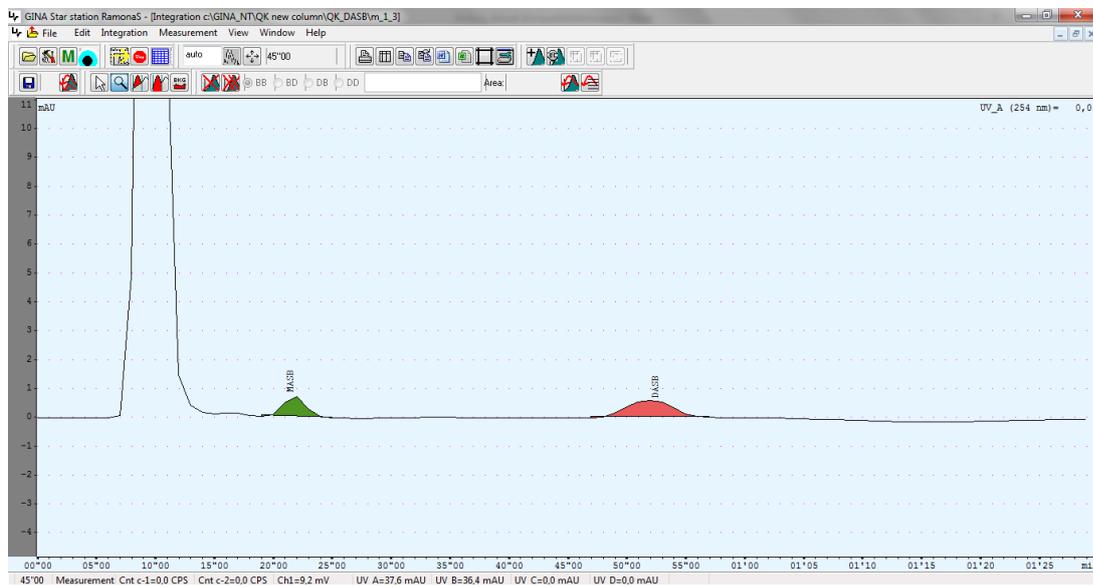
#### 4.5.4.1 Werte

Retentionszeiten	MASB	DASB
Methoden-Transfer	4`02	5`54
Methoden-Etablierung	21,5``	53,5``

## 4.5.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 12 MASB und DASB, Methoden-Transfer



Chromatogramm 13 MASB und DASB, Methoden-Etablierung

#### 4.5.4.3 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mittels 100% ACN verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
25.06.2015	mw 1	0,113189	0,817092	1,777856	4,392002	8,93633	13,3653	17,84799
		0,104475	0,810075	1,690292	4,519633	9,10244	13,7882	17,8246
		0,101151	0,85301	1,753398	4,224873	9,2536	13,8089	17,87852
26.06.2015	mw 2	0,148439	0,805203	1,813734	4,050573	8,55867	13,1192	17,91376
		0,130939	0,9051	1,705237	4,12539	8,23325	13,0102	16,83361
		0,130355	0,849034	1,789876	4,15355	8,72353	13,1379	17,01422
	mw 3	0,12784	0,837147	1,75028	4,011093	8,351735	12,6462	16,70965
		0,139326	0,701159	1,610454	4,047775	8,37077	12,3266	15,99002
		0,115924	0,71876	1,533711	3,933467	8,22505	12,4871	17,10925
	mittelwert	0,1235153	0,8107311	1,713871	4,16204	8,639486	13,0766	17,23574
	stabw	0,0158852	0,0646085	0,091183	0,189285	0,384865	0,5281	0,675449
	vk (%)	12,860925	7,9691674	5,320294	4,547891	4,454718	4,03853	3,918888

Tabelle 37 Messwerte MASB, Methoden-Etablierung

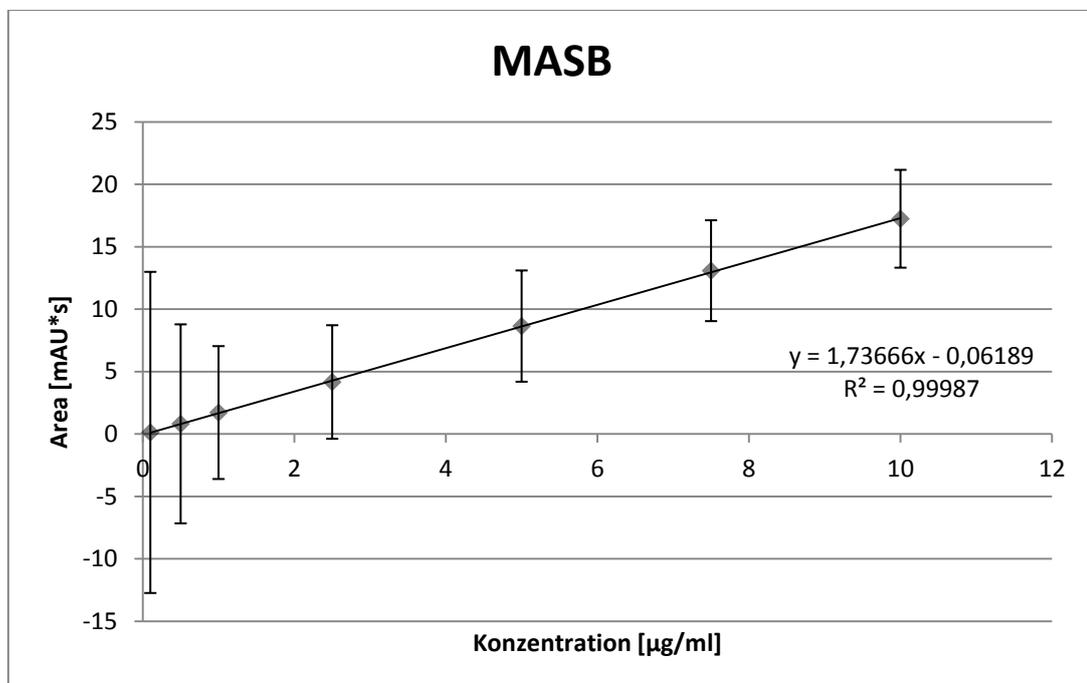


Abbildung 28 Standardgerade MASB, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
25.06.2015	mw 1	0,232093	1,515496	2,640212	6,551919	13,5872	19,791	26,97134
		0,248706	1,418944	2,739263	6,672859	13,94187	19,8376	26,45968
		0,278413	1,355179	2,795229	6,643981	13,31215	20,0723	26,24904
26.06.2015	mw 2	0,272322	1,422135	2,648421	6,390886	13,28854	19,7573	26,36378
		0,259437	1,53043	2,952623	6,926223	14,12194	20,3757	28,63171
		0,274483	1,505723	2,859235	7,069012	14,14784	21,6152	28,21512
	mw 3	0,260236	1,412054	2,839744	6,528227	13,8462	20,5571	27,22604
		0,26575	1,427031	2,640076	6,557516	13,11237	19,8581	28,63171
		0,22068	1,34774	2,675613	6,943215	13,78692	20,3461	26,91565
	mittelwert	0,2569022	1,4371924	2,754491	6,698204	13,68278	20,2456	27,29601
	stabw	0,0196854	0,0666558	0,113474	0,228482	0,377676	0,59071	0,957378
	vk (%)	7,662597	4,6379197	4,119589	3,411097	2,760232	2,91774	3,507392

Tabelle 38 Messwerte DASB, Methoden-Etablierung

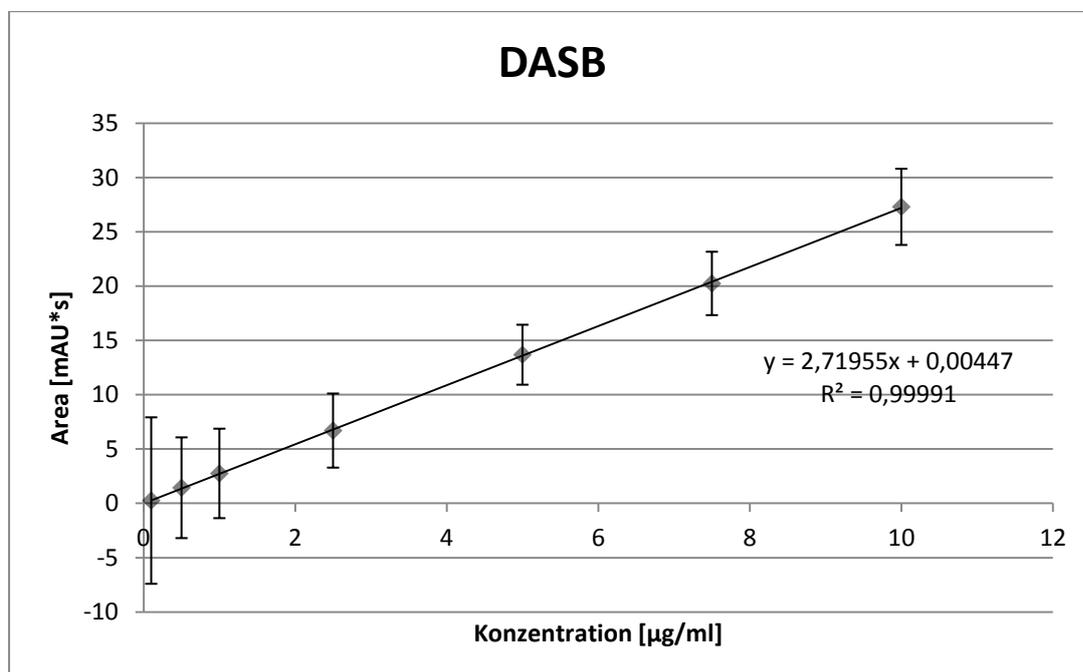
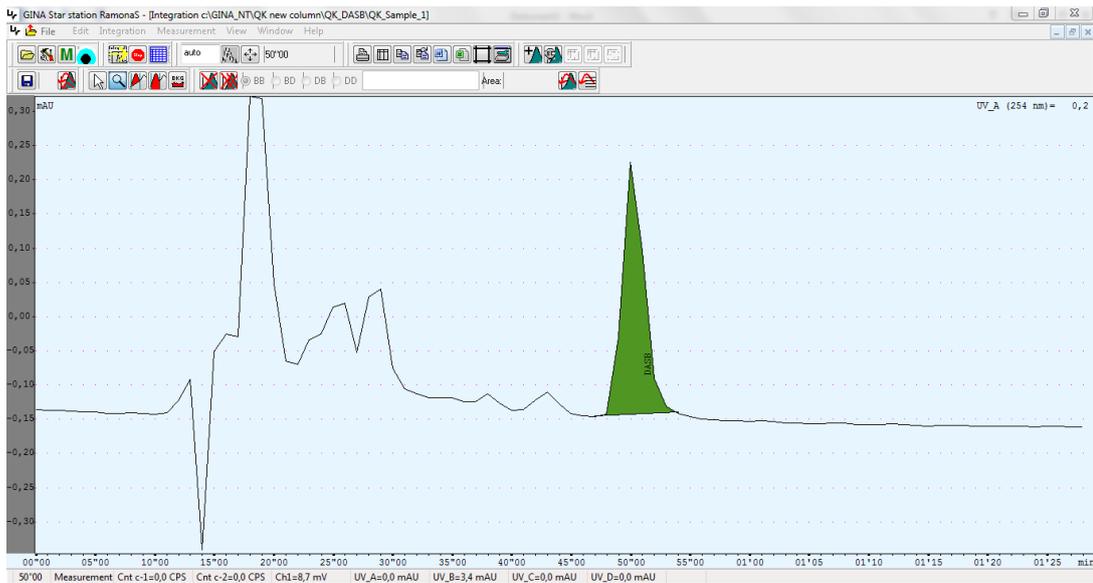


Abbildung 29 Standardgerade DASB, Methoden-Etablierung

#### 4.5.4.4 Diskussion

Die von [18] publizierte DASB Methode konnte vorerst auf der Agilent 1260 Infinity HPCL Anlage erfolgreich reproduziert werden.

Bei der Verifizierung unter Realbedingungen (Formulierungslösung), wurde jedoch festgestellt, dass MASB nicht eindeutig quantifizierbar war (siehe Chromatogramm 14) und deshalb wurde die Methode variiert.



**Chromatogramm 14 Original QK-Sample von MASB und DASB mit der publizierten Methode**

Es wurde festgestellt, dass die frühesten Retentionszeiten mit zwei Laufmitteln (90% ACN und Puffer pH=9,3) erreicht wurden. Die dazugehörigen Tabellen befinden sich im Anhang. Auf dieser Zusammensetzung basierend wurden, mittels Flowgradient, die Retentionszeiten weiter optimiert.

Änderung	Flow von [ml/min]	Flow bis [ml/min]	90% ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]	Anmerkung
Flow	1,6	55 sek	50	50	31	58	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,6	50 sek	50	50	31	59	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,6	45 sek	50	50	30	1'02	
Zusammensetzung		11 sek		30			
Flow	1,6	40 sek	50	50	31	1'05	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,7	40 sek	50	50	30	1'01	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,7	40 sek	60	40	20	41	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,5	45 sek	60	40	22	45	
Zusammensetzung		11 sek	70	30			
Flow	1,5	40 sek	60	40	23	48	23 + 50
Zusammensetzung		21 sek	70	30			Original QK
Flow	1,5	30 sek	60	40	23	52	
Zusammensetzung		21 sek	70	30			

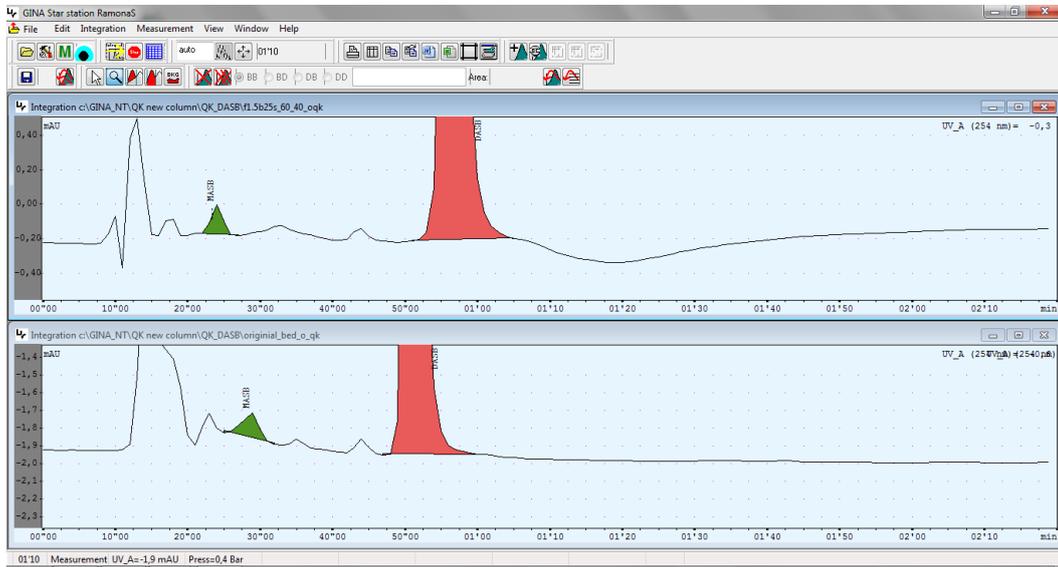
**Tabelle 39 (3) Flow und Laufmitteländerungen ,MASB und DASB**

Änderung	Flow von [ml/min]	Flow bis [ml/min]	90% ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]	AUC DASB
Flow	1,5	30 sek	60	40	23	51	3,9854651
Flow	1,6	30 sek	60	40	21	47	3,458644
Flow	1,5	25 sek	60	40	23	54	4,354424

**Tabelle 40 Flowänderungen, MASB und DASB**

Die gelb markierten Einstellungen wurden für die Methoden-Etablierung gewählt, welche im Kapitel 4.5.3. näher erläutert werden, weil unter diesen Bedingungen die AUC des Tracers am größten war.

Abschließend wurden die Chromatogramme eines Original QK-Samples mit den Einstellungen der publizierten Methode (unteres Chromatogramm) und der neu entwickelten Methode (oberes Chromatogramm) verglichen, um die Verbesserungen visuell darzustellen.



**Chromatogramm 15 Gegenüberstellung Methoden-Etablierung (oben) und publizierte Methode (unten)**

## 4.6 [<sup>11</sup>C]-MHED

### 4.6.1 Allgemeine Eigenschaften

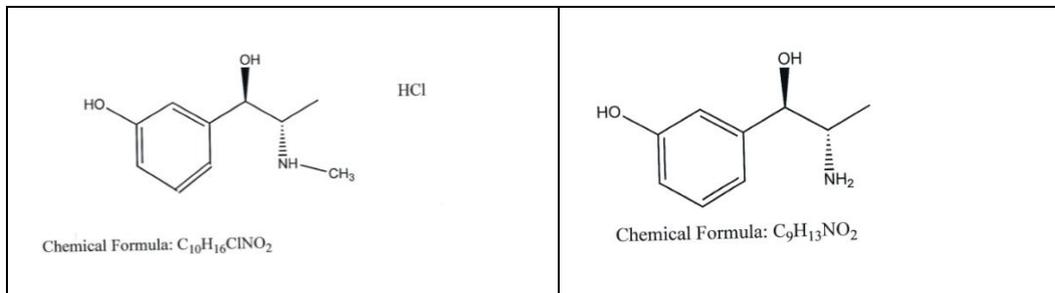


Tabelle 41 Strukturformel von MHED Hydrochlorid (links) und Metaraminol (rechts)

MHED steht für meta-Hydroxyephedrin und wirkt als indirektes Sympathomimetika. [17] Indirekt wirkende Sympathomimetika sind Substanzen, die infolge ihrer Aufnahme in die Axone nicht-exozytotisch Noradrenalin aus dem Axoplasma freisetzen und somit indirekt den Sympathikus nachahmen. [25]. C-11 markiertes (-)-(1R,2S)-meta-Hydroxyephedrin findet demnach Verwendung zur in vivo Markierung von noradrenergen Neuronen. PET-Studien mit [<sup>11</sup>C]-MHED dienen zur Beurteilung des menschlichen kardialen sympathischen Nervensystems im normal- und transplantierten Herzen und dessen Krankheitszuständen. [26] Die Synthese erfolgt aus dem Precursor Metaraminol [ $\alpha$ -[(1S)-1-(amino)ethyl]-3-hydroxybenzenemethanol]. [17]

### 4.6.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 0,2M Ammoniumformiat /100% Acetonitril 95:5

Säule/Stationäre Phase: Phenomenex Aqua 5 $\mu$ m Phenyl 3 (PH-3) 150x4,6mm

Flow: 1,5 ml/min

Wellenlänge: 275 nm

Precursor: Metaraminol

Standard: MHED

#### 4.6.2.1 Absorptionsmaxima

Rt [min]	3'12	4'22
Wellenlänge [nm]	AUC Metaminol	AUC MHED
255	0,247645	0,179279
260	0,421977	0,317446
265	0,676000	0,489920
270	0,922924	0,676922
274	0,944384	0,633399
275	0,940990	0,699250
276	0,894658	0,604860
280	0,782867	0,605895
285	0,317359	0,197442
290	0,048614	0,022376
295	Rauschen	
300	Rauschen	
305	Rauschen	
310	Rauschen	
315	Rauschen	
320	Rauschen	
325	Rauschen	
330	Rauschen	
335	Rauschen	
340	Rauschen	
345	Rauschen	
350	Rauschen	

Tabelle 42 Messwerte Absorptionsmaxima Metaminol und MHED, c=1µg/ml

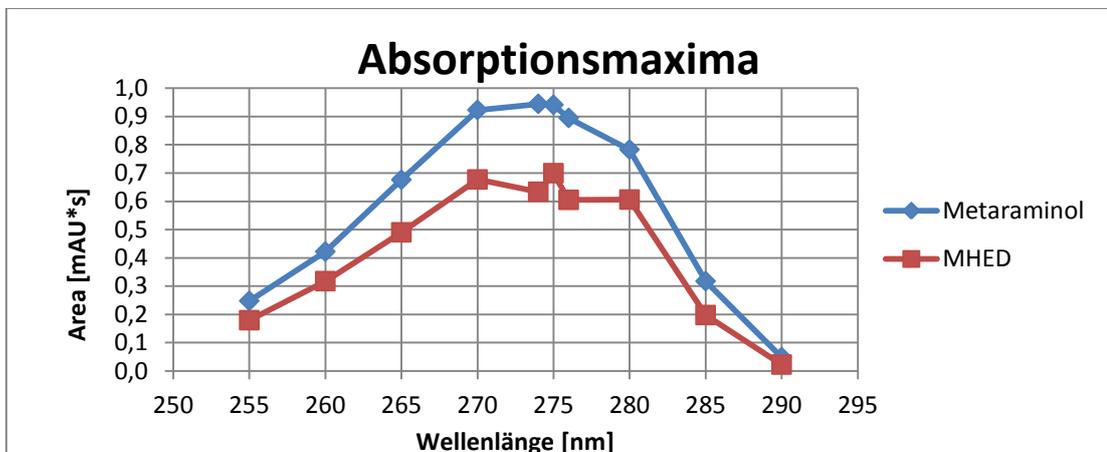


Abbildung 30 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima Metaminol und MHED

#### 4.6.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mittels Laufmittel verdünnt.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
25.02.2015	mw 1	0,092527	0,45628790	0,9767145	2,444117	4,976820	7,4896840	9,93671
	Probe c/mix	0,0828756	0,44278322	0,97634206	2,421179	4,970235	7,5365900	9,90455
	mw 3	0,0830521	0,44525632	0,9641567	2,451855	4,976258	7,4897034	9,95049
26.02.2015	mw 1	0,0820273	0,43486127	0,9563394	2,358133	4,804921	7,3696315	9,79949
	Probe m	0,0802333	0,44640767	0,9702335	2,380326	4,827117	7,3714523	9,81660
	mw 3	0,0745460	0,42593888	0,9524995	2,365298	4,814218	7,3455736	9,73987
	Probe b	0,0891825	0,46062190	0,9262484	2,418023	4,946008	7,3285333	9,95317
	mw 2	0,0734140	0,46448855	0,9441382	2,396248	4,885927	7,3564604	9,93615
	mw 3	0,0886336	0,46367555	0,9325017	2,414367	4,886120	7,3973943	9,83362
	mittelwert	0,08294346	0,44892459	0,9554638	2,405505	4,898625	7,4094470	9,87452
	stabw	0,00644860	0,01339076	0,0183705	0,032978	0,071458	0,0755421	0,07850
	vk (%)	9,46240274	3,63035941	2,3400543	1,668545	1,775403	1,2408560	0,96766

Tabelle 43 Messwerte Metaraminol, Methoden-Transfer

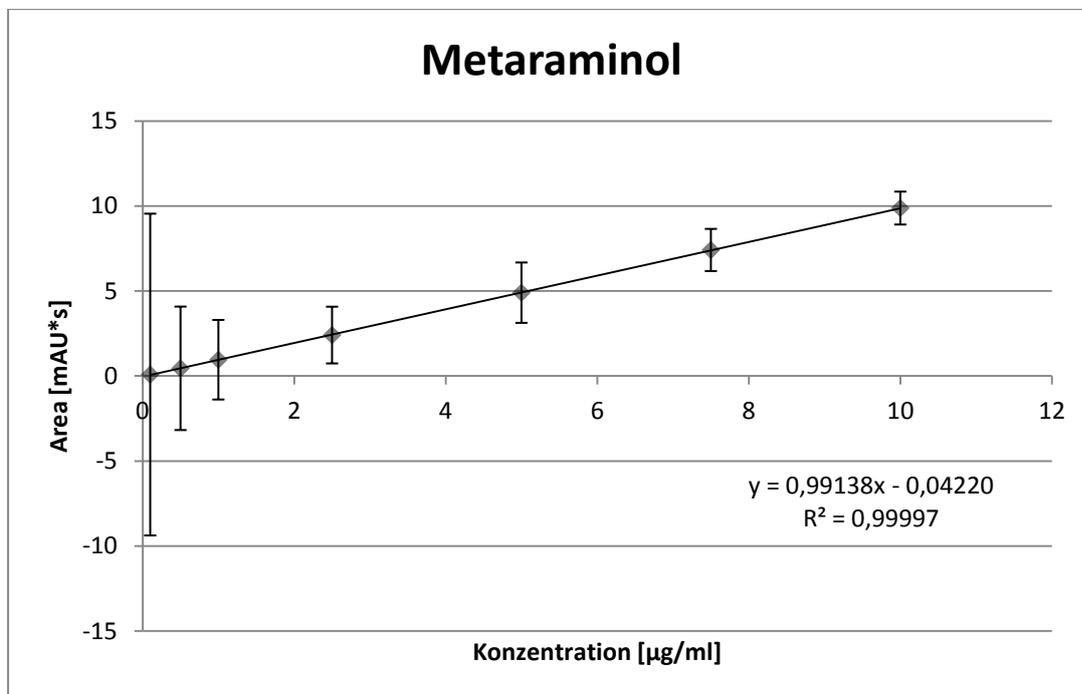


Abbildung 31 Standardgerade Metaraminol, Methoden-Transfer

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
25.02.2015	mw 1	0,0485313	0,3618284	0,7672876	1,8615249	3,9183563	5,8955953	7,8732099
	mw 2	0,0570047	0,3458835	0,7391244	1,8689588	3,9294416	5,9386590	7,8745729
	mw 3	0,0505558	0,3630290	0,7698923	1,8839260	3,9836370	5,9316661	7,9193630
24.02.2015	mw 1	0,0633834	0,3617703	0,7452899	1,8076301	3,7255056	5,6485639	7,5359343
25.02.2015	mw 1	0,0678721	0,3375652	0,7256692	1,8114392	3,6135278	5,5242879	7,3939349
	mw 2	0,0588632	0,3186024	0,7254669	1,7932263	3,6607652	5,5337003	7,3397906
	mw 3	0,0491359	0,3182837	0,6867077	1,8122763	3,6778914	5,5543144	7,4608330
25.02.2015	mw 1		0,3567885	0,7508326	1,8958596	3,8123490	5,5744185	8,0082333
	mw 2		0,3481467	0,7649408	1,8562632	3,7888514	5,5740768	7,9480362
	mittelwert	0,0564781	0,3457664	0,7416902	1,8434561	3,7900361	5,6861425	7,7059898
	stabw	0,0074789	0,0176767	0,0265453	0,0376308	0,1315710	0,1806877	0,2674765
	vk (%)	13,2421953	5,1123160	3,5790344	2,0413184	3,4714959	3,1776844	3,4710207

Tabelle 44 Messwerte MHED, Methoden-Transfer

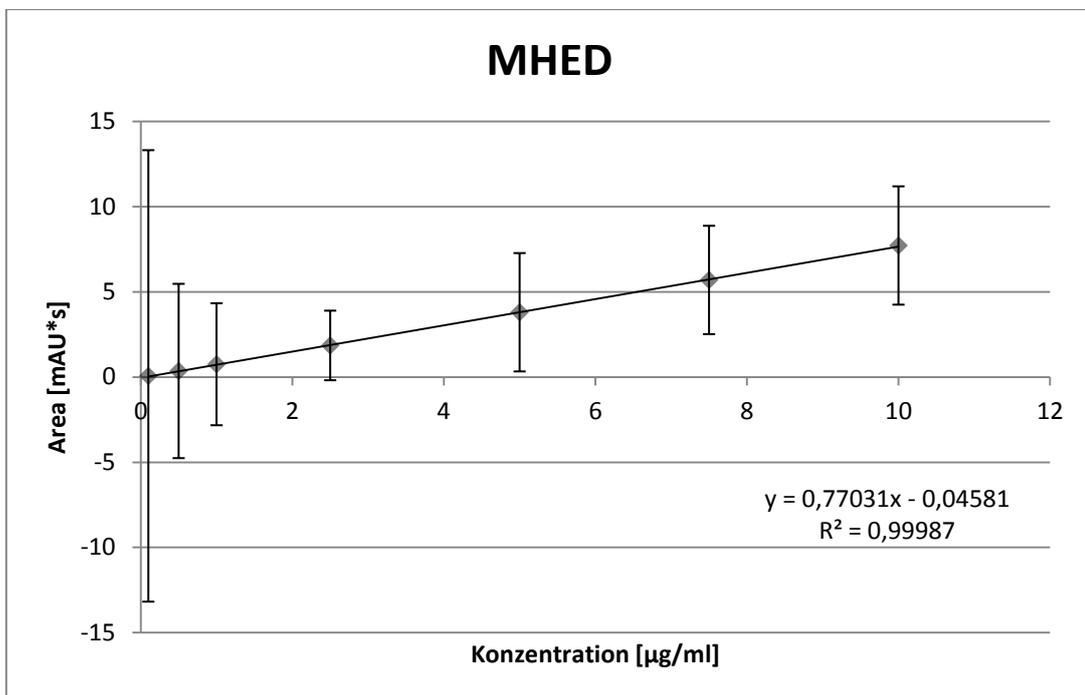


Abbildung 32 Standardgerade MHED, Methoden-Transfer

### 4.6.3 Methoden-Etablierung

Pumpenbetrieb: Flowgradient

Mobile Phase: 40% A : 13% B : 7% C : 40% D

A: Ammoniumphosphatpuffer pH=2,1

B: 90% ACN (V%/V%)

C: 100% Aqua destillata

D: Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3

Säule/ Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: Initialflow von 1,6 ml/min ab Sekunde 25 ein Flow von 1,0 ml/min

Wellenlänge: 275 nm

Precursor: Metaraminol

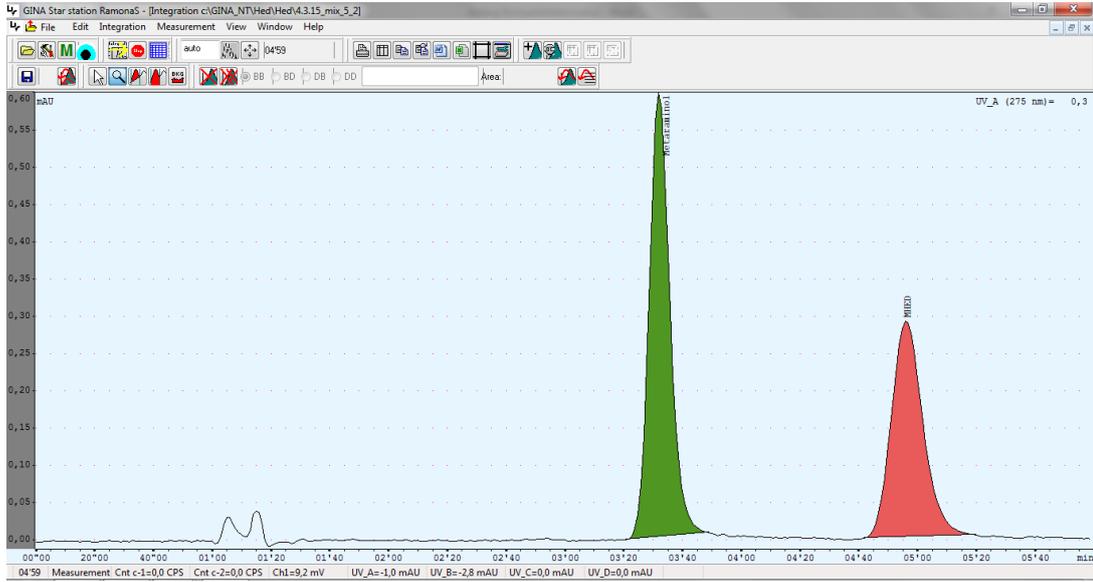
Standard: MHED

### 4.6.4 Resultate

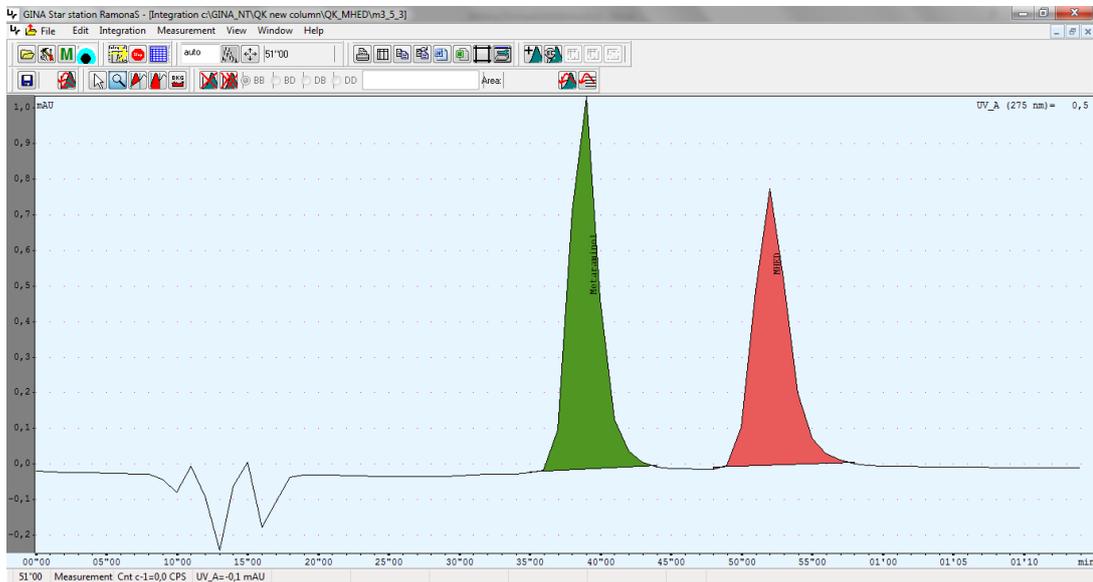
#### 4.6.4.1 Werte

Retentionszeiten	Metaraminol	MHED
Methoden-Transfer	3'12	4'22
Methoden-Etablierung	38``	51``

#### 4.6.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 16 Metaminol und MHED, Methoden-Transfer



Chromatogramm 17 Metaminol und MHED, Methoden-Etablierung

#### 4.6.4.3 Standardgeraden

Die Standardsubstanz wurde in DMSO gelöst und mittels Aqua destillata verdünnt.

Datum	C [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
02.07.2015	mw 1	0,046138	0,238446	0,495529	1,280578	2,528626	3,677607	4,900372
Mix 1	mw 2	0,044243	0,243501	0,477044	1,185006	2,498635	3,778474	4,987542
	mw 3	0,04793	0,228876	0,4843	1,232076	2,505763	3,71331	4,994728
Mix 2	mw 1	0,044135	0,233463	0,497329	1,197147	2,435482	3,740338	4,87655
	mw 2	0,046903	0,233241	0,48663	1,210153	2,447313	3,643966	4,947627
	mw 3	0,050128	0,243747	0,470034	1,227087	2,450577	3,759873	4,935288
Mix 3	mw 1	0,049591	0,232049	0,481252	1,240325	2,467686	3,77574	4,996258
	mw 2	0,05337	0,229987	0,492767	1,213115	2,444094	3,678815	4,904383
	mw 3	0,051033	0,249545	0,484677	1,188048	2,413857	3,671801	4,974991
	mittelwert	0,0478048	0,2354138	0,4845883	1,2231858	2,472272	3,7210154	4,9428435
	stabw	0,0031469	0,0058074	0,0097138	0,0294930	0,0343398	0,0504844	0,046753
	vk (%)	6,582788	2,4668884	2,0045533	2,4111632	1,3890006	1,3567362	0,9458725

Tabelle 45 Messwerte Metaminol, Methoden-Etablierung

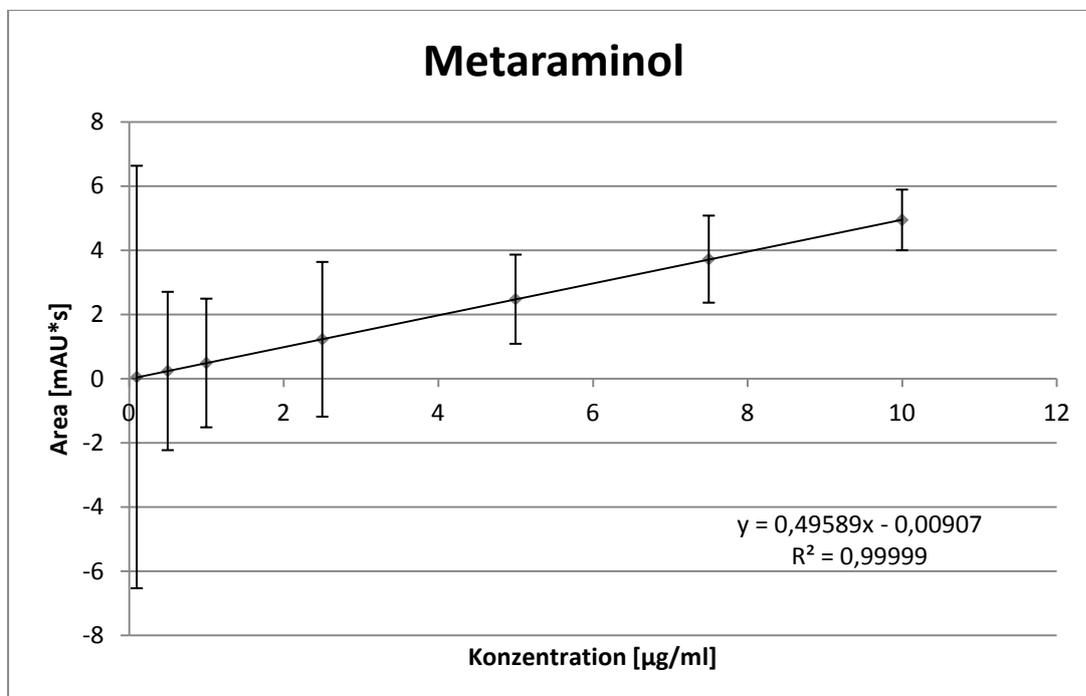


Abbildung 33 Standardgerade Metaminol, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
02.07.2015	mw 1	0,038127	0,199751	0,435007	1,037908	2,173012	3,198147	4,294205
Mix 1	mw 2	0,045526	0,203621	0,438325	1,103294	2,18308	3,162432	4,299164
	mw 3	0,035638	0,202696	0,407175	1,068759	2,155526	3,243359	4,300205
Mix 2	mw 1	0,037456	0,203156	0,438257	1,03639	2,130127	3,205276	4,270422
	mw 2	0,041664	0,203852	0,430709	1,052471	2,126737	3,190724	4,291713
	mw 3	0,045909	0,206614	0,409627	1,042497	2,146737	3,281132	4,364721
Mix 3	mw 1	0,037011	0,201948	0,402562	1,049215	2,125859	3,350071	4,31866
	mw 2	0,033724	0,19594	0,40527	1,060549	2,143554	3,228962	4,2931
	mw 3	0,042129	0,203729	0,428104	1,068783	2,17251	3,15842	4,241916
	mittelwert	0,0393819	0,2021973	0,4208665	1,0563854	2,148079	3,232512	4,3040238
	stabw	0,0045118	0,0031767	0,0160185	0,0219471	0,0213673	0,0596352	0,0278592
	vk (%)	11,45655	1,5710938	3,8060762	2,0775617	0,9947185	1,844855	0,6472826

Tabelle 46 Messwerte MHED, Methoden-Etablierung

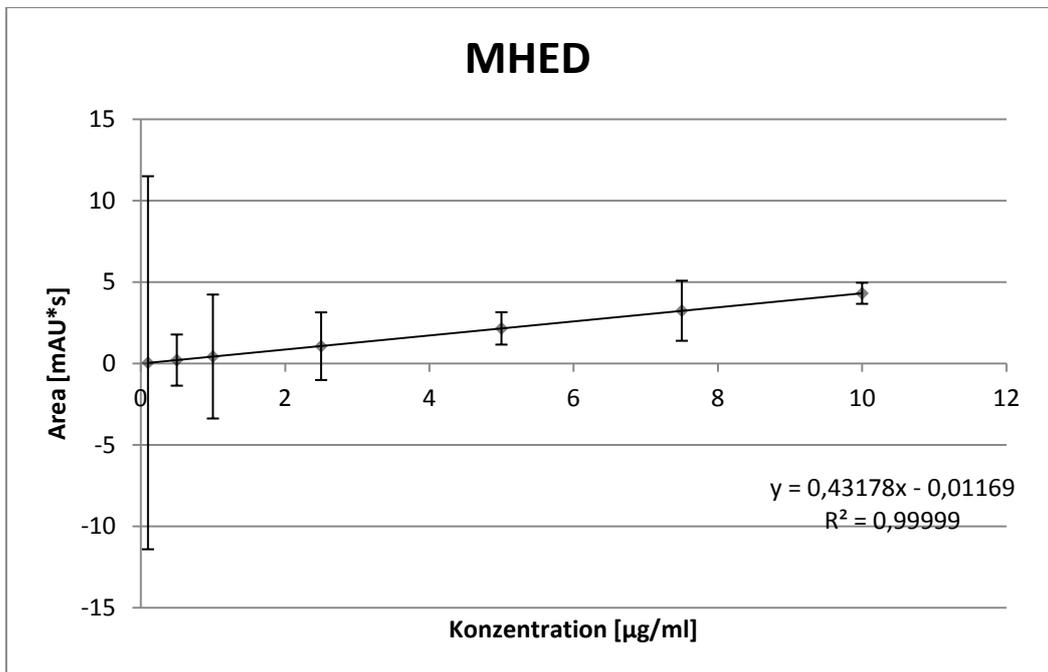


Abbildung 34 Standardgerade MHED, Methoden-Etablierung

#### 4.6.4.4 Diskussion

Der PET-Tracer [<sup>11</sup>C]-MHED wurde nicht publiziert [18] und somit galt es zuerst eine passende Laufmittelzusammensetzung zu finden.

#### Verschiedene Laufmittelzusammensetzungen

ACN 90% (B)	Puffer 2,1 (A)	H2O (C)	Puffer 9,3 (D)	Flow [ml/min]	Rt Metara. [sek]	Rt MHED [sek]	Druck [bar]	Selektivität
0,09	0,91			1	2`42	3`34	273	1,3
0,1	0,9			1	2`19	3`00	271	1,3
0,11	0,89			1	1`57	2`29	274	1,3
0,12	0,88			1	1`41	2`03	274	1,2
0,13	0,87			1	1`29	1`46	280	1,2
0,18	0,82			1	40``-42``	48``-50``	280	1,2
0,23	0,77			1	29``	33``	276	1,1
0,37	0,63			1	1`02	1`21	263	1,3
0,38	0,62			1	57``	1`17	262	1,3
0,39	0,61			1	56``	1`15	260	1,3
0,43	0,57			1	46``	1`01	256	1,3
0,13	0,67	0,2		1	1`20	1`40	237	1,3
0,13	0,67		0,2	1	1`14	1`36		1,3
0,13	0,57		0,3	1	1`06-1`09	1`24-1`29	274	1,3
0,13	0,47		0,4	1	1`02-1`07	1`19-1`24	272	1,3
0,13	0,4	0,07	0,4	1	1`00-1`01	1`15	272	1,3
0,2	0,4		0,4	1	42``	49``	273	1,2
0,2	0,4	0,4		1	keine Selektivität			
0,4	0,4	0,2		1	53``	1`10	256	1,3
0,4	0,4		0,2	1	52``	1`09	258	1,3
0,5			0,5	1	1`05	1`37	247	1,3
0,13	0,87			1,2	1`12	1`26	331	1,2

Tabelle 47 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von Metaminol und MHED Hydrochlorid

Um etwaige Störpeaks, verursacht durch Totzeitpeaks, im Vorfeld zu vermeiden, wurde mit der Zusammensetzung der gelb markierten Zeile aus Tabelle 47 ein Flowgradient generiert.

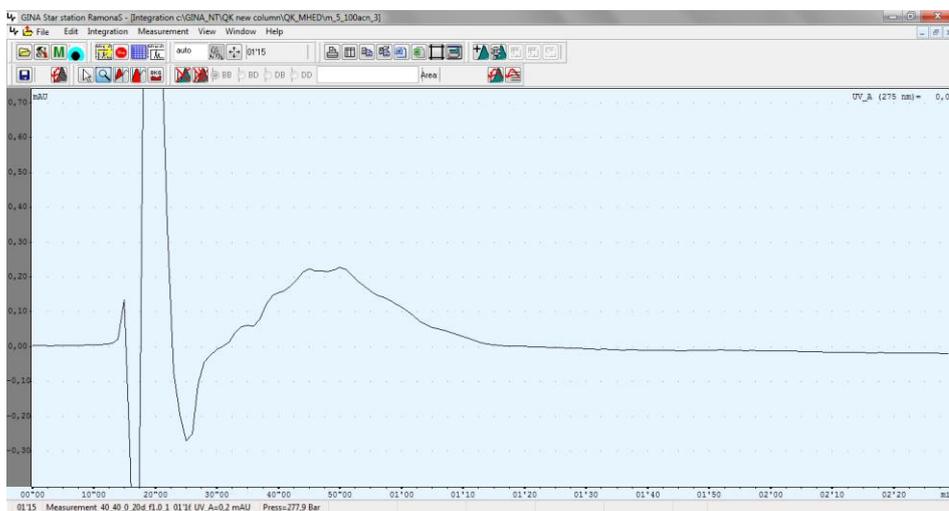
Änderung	Flow von [ml/min]	Flow bis [sek]	Puffer 2,1 (A)	90% ACN (B)	H2O (C)	Puffer 9,3 (D)	Rt Metara. [sek]	AUC [mAU*s]	Rt MHED [sek, min]	AUC [mAU*s]
Flow	1	Ende	40	13	7	40	58-59	5,7308	1`12-1`13	4,399633
Flow	1,5	Ende	40	13	7	40	38-39	3,743281	48	2,945375
Flow	1,6	25	40	13	7	40	38	5,146897	51	4,494882
Flow	1,6	30	40	13	7	40	37	4,177193	49	3,58214
Flow	1,5	30	40	13	7	40	40	4,740453	53	4,235452
Flow	1,4	35	40	13	7	40	42	4,821142	55	4,316767
Flow	1,4	40	40	13	7	40	42	4,193695	54	4,15295
Zusammens.	1	Ende	40	40	20	0	-		-	
Zusammens.	1	Ende	40	40	0	20	-		-	

Tabelle 48 Flowgradient mit Zusammensetzung aus Tabelle 56 , Metaraminol und MHED

Da unter den gewählten chromatographischen Parametern die Integrale des Metaraminols und MHEDs am größten waren und auch die Retentionszeiten unter einer Minute lagen, wurde die Einstellung für die Methoden-Etablierung gewählt, die in Tabelle 48 gelb markiert ist.

### Verdünnungsmedium

Chromatogramm 18 zeigt die Elution von Metaraminol sowie MHED nach Verdünnung der in DMSO vorgelösten Standards mit 100% ACN. Die vermutete Löslichkeitsproblematik der Komponenten zueinander führte zu einer Änderung des Verdünnungsmediums von ACN zu Wasser.



Chromatogramm 18 Metaraminol und MHED in DMSO gelöst und mit 100% ACN verdünnt

## 4.7 [*Carbonyl*-<sup>11</sup>C]-WAY100635

### 4.7.1 Allgemeine Eigenschaften

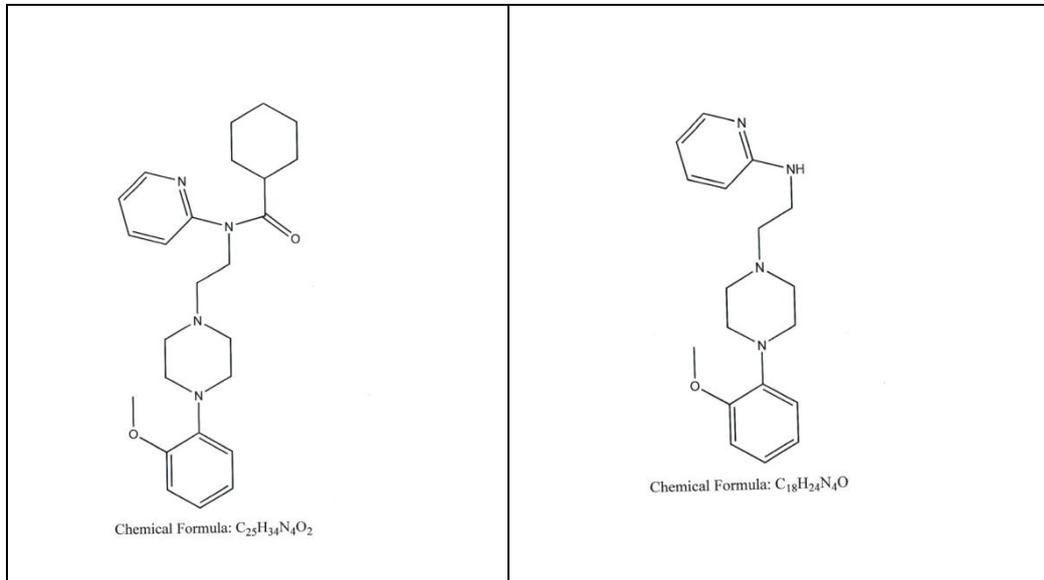


Tabelle 49 Strukturformel von WAY100635 (links) und WAY100634 (rechts)

[*carbonyl*-<sup>11</sup>C]-WAY100635 [(N-(2-(1-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl))-N-(2-pyridyl)-cyclohexan-carboxamid)] ist ein hochwirksamer und selektiver 5HT<sub>1A</sub> – Rezeptor-Antagonist. [27] Der Serotonin - Rezeptor 5HT<sub>1A</sub> wird mit der Pathogenese von Angstzuständen, Depressionen und Essstörungen in Verbindung gebracht und ist ein wichtiges Ziel für die Arzneimitteltherapie. Der PET Tracer [*carbonyl*-<sup>11</sup>C]-WAY100635 ist, bedingt durch seinen polaren Hauptmetaboliten, der die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren können, Mittel der Wahl, wenn es um die Visualisierung und Quantifizierung dieses Rezeptors geht. [27]. Die Synthese erfolgt durch den Precursor WAY100634 [4-(2-methoxyphenyl)-N-2-pyridinyl-1-piperazinethanamin]. [17]

## 4.7.2 Methoden-Transfer

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 0,1M Ammoniumformiat / 100% Acetonitril 45:55

Säule/Stationäre Phase: Waters C18 (10µm) 300x3,9mm

Flow: 2 ml/min

Wellenlänge: 216 nm

Precursor: WAY100634

Standard: WAY100635

### 4.7.2.1 Absorptionsmaxima

Rt [min]	4`31	8`02
Wellenlänge [nm]	AUC WAY 100634	AUC WAY 100635
205	6,935596	r
210	16,88657	10,64099
211	26,76976	11,74629
212	29,19481	15,57664
213	27,92136	16,74139
214	29,25425	16,61619
215	27,77038	16,33981
216	30,10029	17,1108
217	27,51937	15,05737
218	27,09482	15,2995
219	25,65124	14,35947
220	21,36455	12,76586
225	23,00616	12,22827
230	28,84995	12,40505
235	36,80307	12,00856
240	39,48912	11,73886
245	38,16808	11,19782
250	25,09263	10,12171
255	11,51579	8,50819
260	6,243357	7,759163
265	5,292127	7,222931
270	6,492603	7,111916

275	8,338123	6,488171
280	9,76157	5,634338
285	9,999486	4,200584
290	9,373461	2,299079
295	8,718914	0,976208
300	8,416031	0,406281
305	8,305883	0,14199
310	7,117024	rauschen
315	5,518869	rauschen
320	3,508279	rauschen

Tabelle 50 Messwerte Absorptionsmaxima WAY100634 und WAY100635, c=10µg/ml

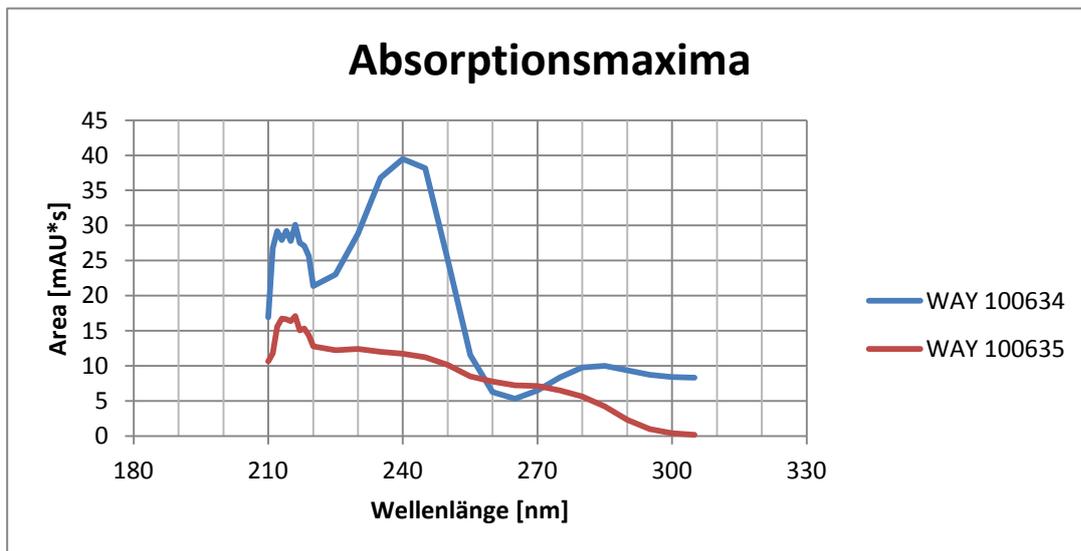


Abbildung 35 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima WAY100634 und WAY100635

#### 4.7.2.2 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Laufmittel verdünnt, gemessen bei einer Wellenlänge von 240nm.

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
13.03.2015	mw1	0,267741	1,809261	4,069213	10,46429	21,44266	32,96743	44,41344
	mw2	0,264749	1,839614	4,233329	10,79090	21,89029	32,48456	44,26431
	mw3	0,268109	1,895886	4,014766	10,61273	21,89933	32,62788	43,30883
16.03.2015	mw1	0,257268	1,868242	4,084677	10,22017	20,61547	31,12686	42,20622
	mw2	0,204482	1,852250	4,023101	9,926262	20,70669	30,05376	43,26763
	mw3	0,230325	1,788291	4,145497	10,07815	20,09460	31,14592	43,27380
16.03.2015	mw1	0,200131	1,991065	4,282805	10,79054	22,49662	32,89511	44,45537
	mw2	0,239629	1,992026	4,152504	10,76888	22,26087	32,97073	43,86001
	mw3	0,246598	1,946759	4,27698	10,69558	22,17123	33,31686	45,46334
	mittelwert	0,24211467	1,88704378	4,1425413	10,4830558	21,50864	32,176568	43,834772
	stabw	0,0260252	0,07508474	0,1033295	0,33098737	0,8458734	1,1203628	0,9435643
	vk (%)	10,749105	3,9789611	2,4943506	3,15735584	3,932714	3,481921	2,1525475

Tabelle 51 Messwerte WAY100634, Methoden-Transfer

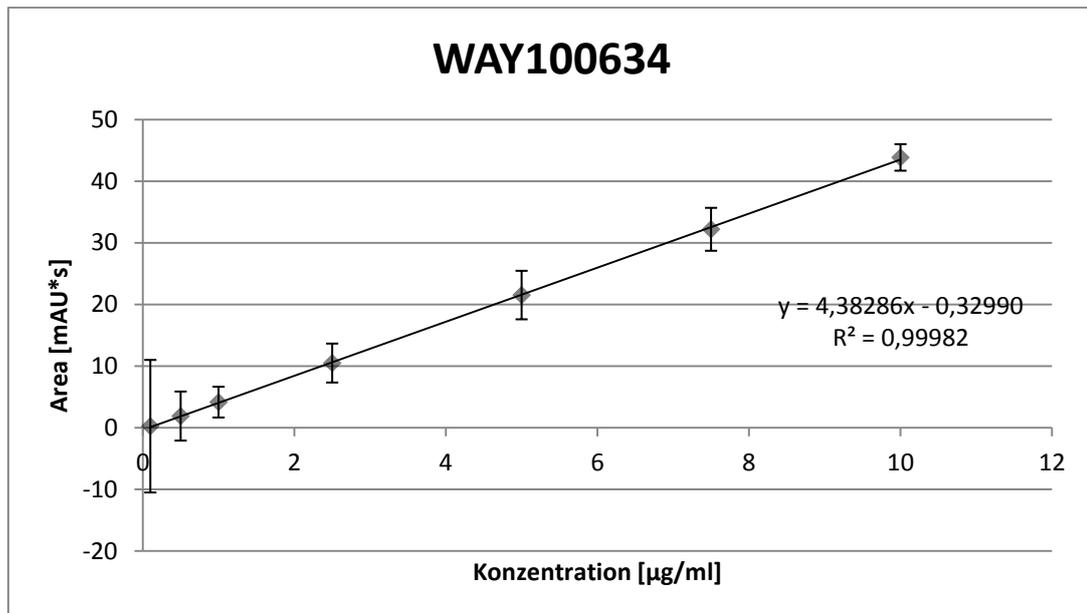


Abbildung 36 Standardgerade WAY100634, Methoden-Transfer

Datum	conc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10
13.03.2015	mw1	0,067830	0,478087	1,186536	2,800850	6,05936	9,31525	12,96011
	mw2	0,065319	0,456071	1,215372	3,161750	6,40897	9,27403	12,68463
	mw3	0,062554	0,524325	1,106232	3,072490	6,30648	9,32916	12,41567
16.06.2015	mw1	0,060108	0,528439	1,178900	3,121540	6,48243	9,78852	13,24235
	Vormittag mw2	0,067554	0,500459	1,171046	3,154083	6,52448	9,45587	13,71795
	mw3	0,061052	0,517341	1,187162	3,115550	6,21240	9,69664	13,65232
Nachmittag	mw1	0,065297	0,536105	1,233776	3,174610	6,62328	9,90795	13,50671
	mw2	0,07003	0,522341	1,197607	3,300190	6,59536	9,86515	13,01326
	mw3	0,05736	0,515064	1,162422	3,092610	6,70985	9,86142	13,61882
	Mittelwert	0,06412	0,5086924	1,182117	3,1104081	6,435846	9,610443	13,201313
	stabw	0,00414	0,0261269	0,0359493	0,1334230	0,210597	0,264302	0,4633200
	vk (%)	6,45283	5,1360938	3,0410937	4,2895672	3,272248	2,750149	3,5096511

Tabelle 52 Messwerte WAY100635, Methoden-Transfer

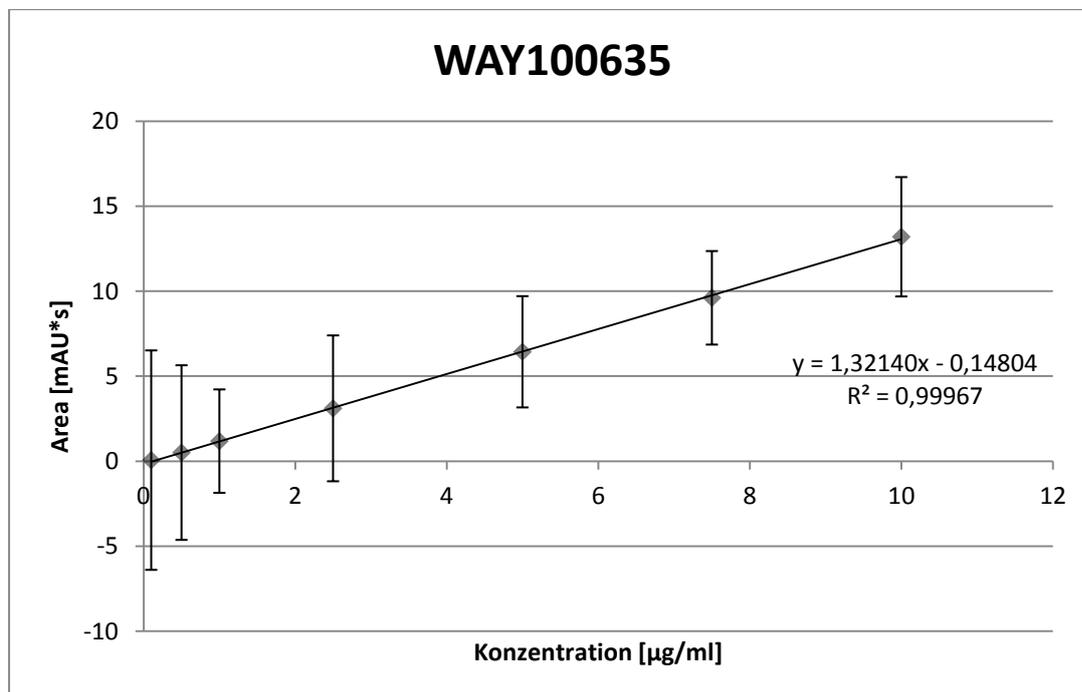


Abbildung 37 Standardgerade WAY100635, Methoden-Transfer

### 4.7.3 Methoden-Etablierung

Pumpenbetrieb: isokratisch

Mobile Phase: 90% ACN / Ammoniumphosphatpuffer pH=9,3, 50:50

Säule/Stationäre Phase: Waters X-Bridge RP-18, 2,5 µm 3,0x50mm

Flow: 1,0 ml/min

Wellenlänge: 216 nm

Precursor: WAY100634

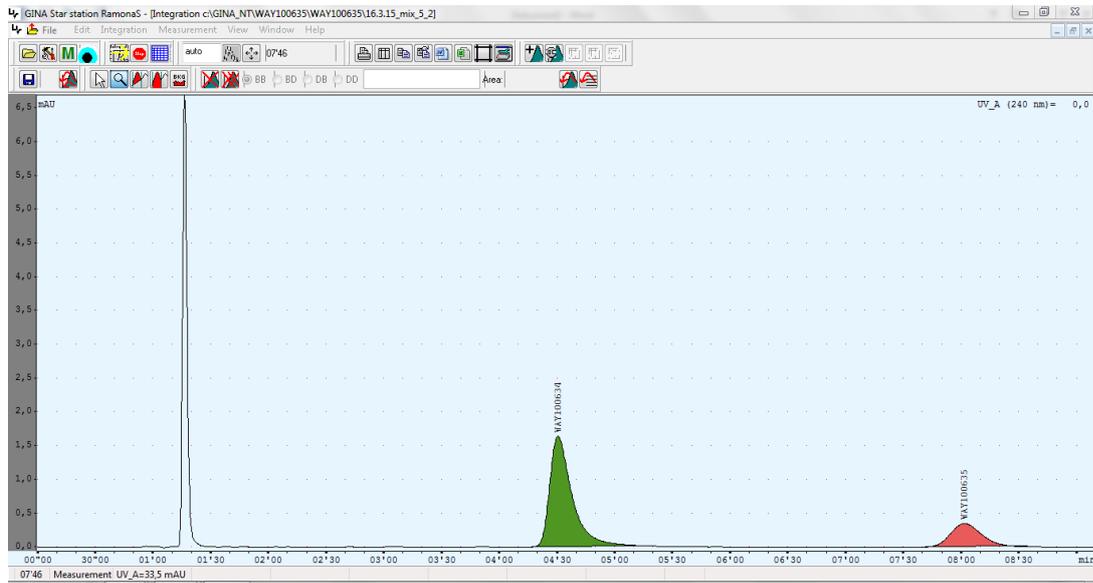
Standard: WAY100635

### 4.7.4 Resultate

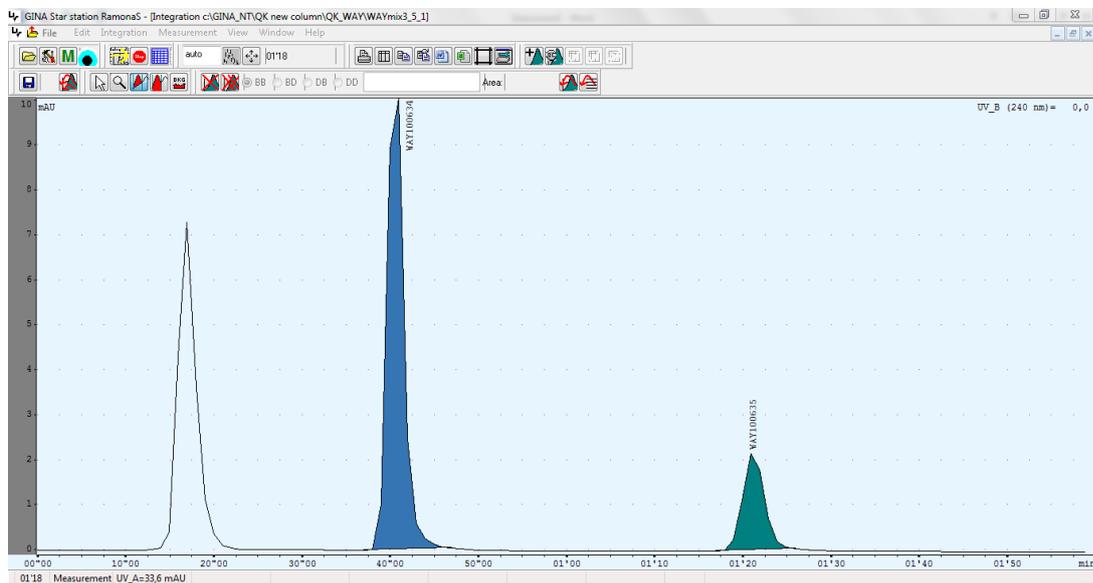
#### 4.7.4.1 Werte

Retentionszeiten	WAY100634	WAY100635
Methoden-Transfer	4`30	8`02
Methoden-Etablierung	39``	1`18

#### 4.7.4.2 Chromatogramme



Chromatogramm 19 WAY100634 und WAY100635, Methoden-Transfer



Chromatogramm 20 WAY100634 und WAY100635, Methoden-Etablierung

#### 4.7.4.3 Standardgeraden

Die Standardsubstanzen wurden in 100% ACN gelöst und mit Laufmittel verdünnt, gemessen bei einer Wellenlänge von 216nm.

Datum	conc [μ/ml]	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
13.04.2015	mw 1	0,473213	2,158503	4,317292	10,70261	20,83755	30,15423	40,01602
	mw 2	0,383461	2,158574	4,288075	10,44172	20,17608	30,08404	40,23999
	mw 3	0,420558	2,07746	4,461312	10,51522	19,49906	29,91066	39,78685
13.04.2015	mw 1	0,438619	2,098056	4,231576	9,97862	20,19794	29,39192	40,76527
	mw 2	0,382777	2,096421	4,357636	10,24326	20,68811	29,96066	39,96726
	mw 3	0,3667	2,126644	4,396868	10,34598	20,72641	28,99467	39,54498
14.04.2015	mw 1	0,352859	1,783991	4,094017	9,95903	20,2335	28,64423	39,30029
	mw 2	0,376225	2,091908	4,07927	10,31612	20,00031	28,8483	39,3375
	mw 3	0,371724	2,118436	4,299039	9,772734	19,76859	28,52315	39,04439
	mittelwert	0,3962373	2,0788881	4,280565	10,25281	20,236394	29,39021	39,778061
	stabw	0,0393905	0,1142058	0,128259	0,2982461	0,4512364	0,653817	0,5356558
	vk(%)	9,9411412	5,4935998	2,9963	2,9089204	2,2298259	2,224607	1,3466111

Tabelle 53 Messwerte WAY100634, Methoden-Etablierung

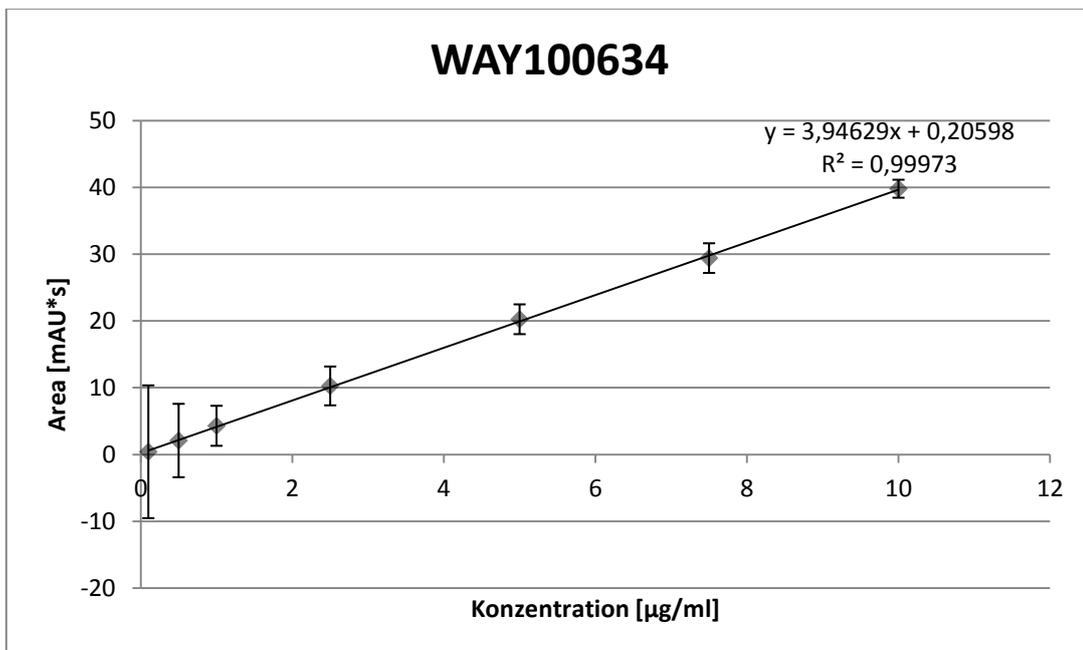


Abbildung 38 Standardgerade WAY100634, Methoden-Etablierung

Datum	conc [µg/ml]	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
13.04.2015	mw 1	0,118339	0,860518	2,20492	6,40575	12,73046	19,88062	26,30248
	mw 2	0,12149	0,867456	2,36328	6,08203	12,73929	19,89576	26,07285
	mw 3	0,145047	0,85096	2,25348	6,28274	12,58767	19,82056	26,46349
13.04.2015	mw 1	0,219077	0,886114	1,97817	5,745351	12,20275	18,68331	24,08855
	mw 2	0,160545	0,959031	2,09329	6,21481	13,15178	20,04304	25,30185
	mw 3	0,185833	0,954858	2,34719	6,14244	13,00101	19,14108	26,16161
14.04.2015	mw 1	0,17103	0,887859	1,86487	5,933448	13,23987	18,35954	27,00293
	mw 2	0,181506	0,920208	2,1373	5,99126	13,37466	19,40185	25,28617
	mw 3	0,149693	0,897253	2,26997	6,004852	12,8042	18,74377	25,43765
	mittelwert	0,16139556	0,89825078	2,168053	6,0891868	12,870188	19,329948	25,790842
	stabw	0,0321575	0,03912403	0,167242	0,1985963	0,3629511	0,624186	0,8599951
	vk (%)	19,9246751	4,35557975	7,71393	3,2614540	2,8200914	3,229112	3,334498

Tabelle 54 Messwerte WAY100635, Methoden-Etablierung

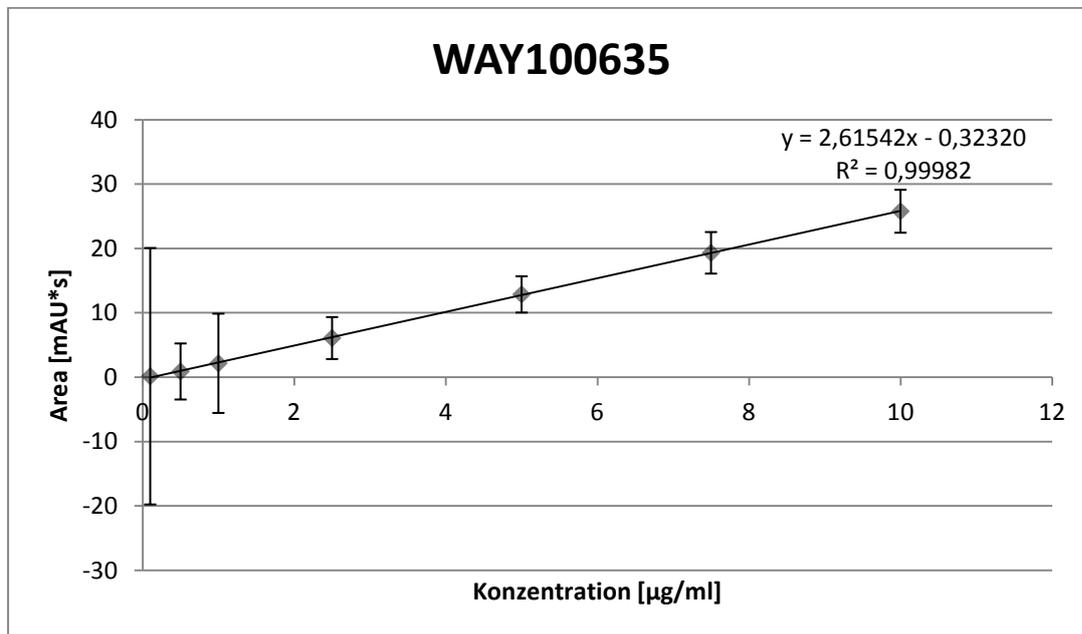
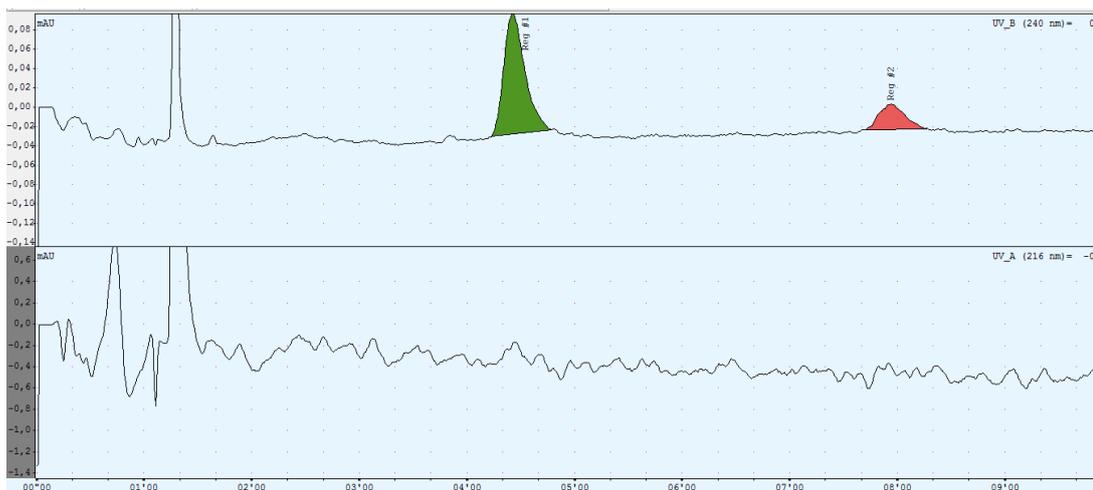


Abbildung 39 Standardgerade WAY100635, Methoden-Etablierung

#### 4.7.4.4 Diskussion

##### Wellenlänge

Die Bestimmung der Absorptionsmaxima erfolgte bei einer Konzentration von  $10\mu\text{g/ml}$  und ergab für WAY100635 die Wellenlänge 216nm und für den Precursor WAY100634 die Wellenlänge 240nm. Die Standardgeraden für den Methoden-Transfer wurden jedoch bei einer Wellenlänge von 240nm gemessen, da bei einer niedrigen Konzentration keine Peaks detektierbar waren. Im Chromatogramm 21 ist gut erkennbar, dass das Basislinienrauschen unter diesen chromatographischen Bedingungen sehr stark ist, und dadurch die Substanzpeaks im Rauschen verschwinden (= geringes Signal/Rausch-Verhältnis). Die Methoden-Etablierung konnte bei der Wellenlänge von 216nm erfolgen.

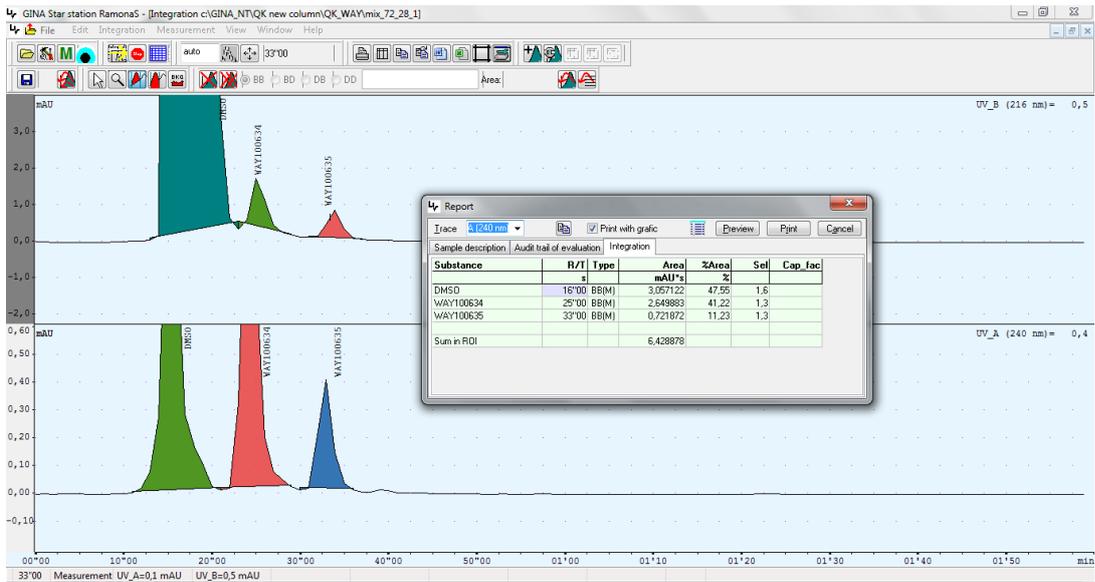


Chromatogramm 21 Gegenüberstellung der Wellenlänge 240nm und 216nm,  $c=0,5\mu\text{g/ml}$

##### Laufmittelzusammensetzung

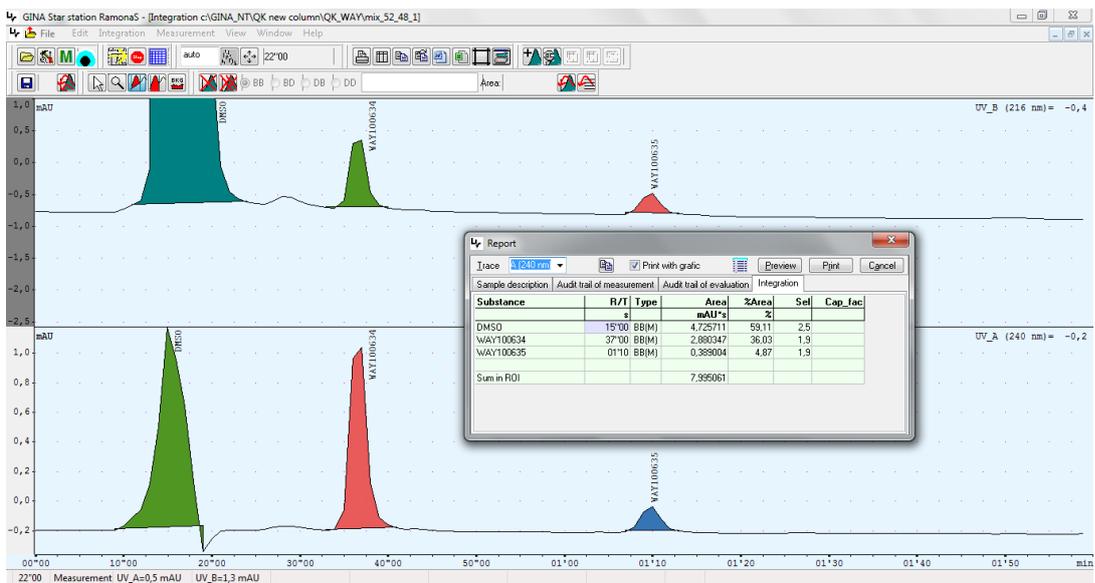
Die Publikation [18] enthielt einen Summenfehler der Flussrate vom Tracer WAY100635. Ein Summenfehler der publizierten Werte bedeutet, dass mit dem Verhältnis 52% von 90%ACN und 28% Puffer 9,3, kein Flow von 1 ml/min generiert werden kann, deshalb wurden zwei der möglichen Varianten der Laufmittelzusammensetzung getestet.

Beim Verhältnis 72% 90%ACN und 28% Puffer 9,3, konnte die Qualitätskontrolle unter einer Minute durchgeführt werden, allerdings zu Lasten der Trenngüte von WAY100634 und WAY100635 (siehe Chromatogramm 22).



Chromatogramm 22 WAY100635 90%ACN / Puffer 9,3, 72:28

Beim Verhältnis 52% 90%ACN und 48% Puffer 9,3, konnte die Qualitätskontrolle zwar nicht unter einer Minute durchgeführt werden, dafür stieg aber die Trenngüte beider Substanzen auf einen ausreichenden Wert an (Chromatogramm 23 und Tabelle 55).



Chromatogramm 23 WAY100635 90%ACN / Puffer 9,3, 52:48

ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Flow [ml/min]	Rt WAY100634 [sek]	AUC	Rt WAY100635 [sek]	AUC	Selektivität
0,42	0,58	1	54``-59``-1`00	2,38	2`35-2`43	1,29	2,7-2,8-2,9
0,5	0,5	1	39``	2,44	1`18	1,3	2
0,51	0,49	1	38``	2,53	1`13	1,35	1,9
0,52	0,48	1	37``	2,41	1`10	1,24	1,9
0,72	0,28	1	25``	2,35	33``	1,44	1,3

Tabelle 55 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von WAY100634 und WAY100635

### Selektivität

Um eine Selektivität von 2,0 zu erreichen, wurde die gelb markierte Einstellung für die Erstellung der Standardgeraden gewählt. Die Analysezeit des Tracers WAY100635 konnte dadurch von 8 Minuten 2 Sekunden auf 1 Minute 18 Sekunden gesenkt werden und man gab sich zufrieden. Bei näherer Betrachtung der Sachlage ist jedoch zu erwähnen, dass die Selektivität nicht korrekt berechnet wurde, da auf die Eingabe eines „Totzeit“-Peaks vergessen wurde. Somit bestehen für die Zukunft weitere Optionen um die Retentionszeiten des Tracers zu verbessern.

## 5 Diskussion

### Methoden-Transfer

Die für die Qualitätskontrolle der Radiotracer [ $^{11}\text{C}$ ]-L-Methionin, [ $^{11}\text{C}$ ]-PIB, [ $^{11}\text{C}$ ]-DASB, [ $^{11}\text{C}$ ]-Harmin, [ $^{11}\text{C}$ ]-MHED und [*carbonyl* $^{11}\text{C}$ ]-WAY100635 vorliegenden HPLC Methoden wurden auf eine neue Anlage der Fa. Agilent (Infinity Series 1260) transferiert. Dabei wurden sowohl die Trennsäulen als auch die Laufmittel der Tracer beibehalten. Durch die Verwendung einer neuen HPLC Technik (Hybridtechnik zwischen HPLC und (U)HPLC mit Maximaldruck von bis zu 650 bar) wurde eine signifikante Reduzierung der Laufzeiten bei allen Tracern verzeichnet. Die Reduzierung war auf kürzere Weglängen und geringere Innendurchmesser der Hochdruckleitungen kombiniert mit dem höheren Basisdruck zurückzuführen.

### Methoden-Etablierung

Die durch R. Nakao et al. [18] gezeigte Reduzierung der HPLC-Qualitätskontrolle auf rund 1 Minute brachte einen deutlichen Zeitgewinn innerhalb der gesamten Qualitätskontrolle eines Radiopharmakons vor Applikation in den Patienten. Vier der sieben in vorliegender Diplomarbeit bearbeiteten Tracer (PIB, DASB, WAY100635 und L-Methionin) wurden durch Nakao et al. bereits etabliert. Die Methoden der drei verbliebenen Tracer (Harmin, MHED und (+)-PHNO) wurden neu entwickelt und zusammen mit den anderen für eine Routine-, bzw. Forschungsanwendung an der klinischen Abteilung für Nuklearmedizin, AKH Wien etabliert. Diese Etablierung bedeutete auf der einen Seite eine Anpassung sämtlicher Parameter an oben beschriebene neue HPLC-Anlage, auf der anderen Seite unterzog sich die Methodenoptimierung der Fragestellung einer möglichen Beibehaltung aller erarbeiteten Parameter unter Realbedingungen. Realbedingungen bedeutet, dass das fertige Produkt nach der Radiosynthese in eine für den Patienten applizierbare Formulierung gebracht wurde. Diese Formulierungslösung enthält einen isotonischen Cocktail an Phosphatpuffer, Kochsalz, Wasser und eine maximale Menge Ethanol von 10% der Gesamtlösung. Dieser durch die veränderte Situation geänderte Ausgangszustand an Gesamtkomponenten in der Analyse Mischung stellte eine Herausforderung für eine chromatographische HPLC-Basislinientrennung von jeweils Precursor und Tracer dar.

Ein besonders wichtiger Vorteil der durch den Zeitgewinn der HPLC-Qualitätskontrolle erarbeitet wurde, ist der des geringeren Verlustes an Radioaktivität bedingt durch den

radioaktiven Zerfall. Bei C-11 reduziert sich im Durchschnitt pro Minute die Aktivitätsmenge an Radioaktivität um ca. 3%. Tabelle 56 zeigt den Prozentsatz der, durch die Zeitersparnis geringeren Reduktion an Aktivität für die einzelnen Radiotracer.

Name	Rt [sek] Methoden- Transfer	Mittel= wert	Rt [sek] Methoden- Etablierung	Mittel= wert	Zeit= gewinn [sek]	Aktivitäts= verlust um Prozent [%] verringert
[ <sup>11</sup> C]-6-OH- BTA-1	282-284	283	46-47	46,5	236,5	11,8
[ <sup>11</sup> C]-Harmin	299-303	301	49-50	49,5	251,5	12,6
[ <sup>11</sup> C]-(+)-PHNO	315	315	61	61	254	12,7
[ <sup>11</sup> C]-DASB	354-356	355	53,5	53,5	301,5	15,1
[ <sup>11</sup> C]-MHED	262	262	51	51	211	10,6
[ <i>Carbonyl</i> - <sup>11</sup> C]- WAY100635	482	482	78	78	404	20,2

**Tabelle 56 Verbesserungen (zusammengefasst)**

## 6 Zusammenfassung

Die Qualitätskontrolle ist der wichtige Endpunkt nach der Herstellung eines jeden Arzneimittels, nicht nur für Pharmaka, sondern auch für Radiopharmaka.

### **Ziel:**

Ziel dieser Arbeit war es erstens, bestehende HPLC-Methoden für die Qualitätskontrolle auf eine neue HPLC Technik zu transferieren. Zweitens wurden schnelle HPLC-Methoden in der Qualitätskontrolle entwickelt, da eine HPLC Analyse im Qualitätskontrollprozess erfahrungsgemäß am längsten dauert. Dadurch kann wertvolle Analysezeit, bedingt durch die kurze Halbwertszeit von Kohlenstoff-11 gewonnen werden und es wurde eine HPLC-Analysezeit von unter einer Minute angestrebt.

### **Methoden:**

Es wurden viele Parameter (mobile Phase, stationäre Phase, Injektionsvolumen, Fließgeschwindigkeit) verändert.

### **Ergebnisse:**

Bei vier der sieben Tracer konnte das Ziel, die Messung unter einer Minute durchzuführen und unter Realbedingungen erreicht werden. Die durchschnittliche Retentionszeit der Tracer DASB beträgt 53,5 Sekunden, MHED 51 Sekunden, Harmin 49,5 Sekunden und PIB 46,5 Sekunden.

Bei WAY100635 (1 Minute 18 Sekunden) und (+)-PHNO (1 Minute 1) lag die Retentionszeit knapp über einer Minute. Es stehen weitere zukünftige Optionen für die Verbesserung von WAY100635 zur Verfügung.

Beim letzten Tracer L-Methionin konnte die Methoden-Etablierung nicht angewendet werden.

### **Ausblick:**

Bedingt durch die Halbwertszeit der Radiopharmaka, kommt hier der Spruch „Zeit ist Aktivitätsverlust“ zum Tragen. Deshalb versucht man Zeit in gewissen Arbeitsschritten einzusparen, und da die Qualitätskontrolle ein langes, aber absolutes MUSS ist, ist es sinnvoll hier die Zeit zu verkürzen. Mit Änderungen vieler Variablen ist dies auch möglich.

**Schlagwörter:**

PET-Tracer, Qualitätskontrolle, Kohlenstoff-11, Radiosynthese

## 7 Abstract

Quality control is the important end point after the preparation of each drug, not only for drugs but also specifically for radiopharmaceuticals.

### **Purpose:**

The aim of this work was firstly to transfer existing HPLC methods for quality control to a new HPLC technique. Secondly faster HPLC methods have been developed for quality control as a HPLC analysis in the process according to experience takes the longest amount of time. The goal was, due to the short half-life of carbon-11, to reduce the time of HPLC analysis for less than one minute.

### **Methods:**

During the analysis many parameters have been modified e.g. mobile phase, stationary phase, injection volume and the flow rate.

### **Results:**

The analysis in less than one minute was achieved for four of seven tracers under real conditions.

The average retention time of DASB was 53,5 seconds, MHED 51 seconds, Harmin 49,5 seconds and PIB 46,5 seconds. The retention time for (+)-PHNO (1 minute 1 second) and WAY 100635 (1 minute 18 seconds) are just over one minute. There are further options to improve WAY100635. For the last tracer L-methionine the methods-establishment could not be achieved.

### **Conclusion:**

Because radiopharmaceuticals have a short half-life, here comes the saying "time is loss of activity" to fruition. Therefore, tries to save time in certain operations, and because the quality control is a long, but absolute required, it is useful here to reduce time. With changes of many variables, this is also possible.

### **Keywords:**

PET-Tracer, quality control, carbon-11, Radiosynthesis

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Deutscher Apotheker Verlag. Europäisches Arzneibuch. 8. Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. 2014.
- [2] Fercher A. Medizinische Physik: Physik für Mediziner, Pharmazeuten und Biologen. 2. Auflage. Wien: Springer-Verlag Wien GmbH. 1999:598.
- [3] Grillenberger K, Schirrmeister H. Radioaktive Arzneimittel: Herstellung – Handhabung – Anwendung. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. 2003:77-78.
- [4] Kuwert T, Grünwald F, Haberkorn U, Krause T. Nuklearmedizin. 4 Auflage. Stuttgart: Thieme. 2008:91-101.
- [5] <https://radiologie.unibas.ch/einstiegseiten/patienten/untersuchung-und-therapie/radionuklidtherapie/radiopharmaka-fuer-nuklearmedizinische-therapien> [Zugriff am 20.09.2015].
- [6] Mitterhauser M. VO Radiopharmazeutische Technologie I – Grundlagen und konventionelle Nuklearmedizin. Universität Wien. Skriptum 2014.
- [7] Miller P, Long N, Vilar R, Gee A. Synthese von <sup>11</sup>C-, <sup>18</sup>F-, <sup>15</sup>O- und <sup>13</sup>N- Radiotracer für die Positronenemissionstomographie. Angewandte Chemie. 2008; 120:9136-9172.
- [8] Österreichisches Bundeskanzleramt.  
<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetznummer=10010441> [Zugriff am 3.10.2015].
- [9] <http://uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt1/polyzen/physiol/hplc.htm> [Zugriff am 15.6.2015].
- [10] Nics L. VO Chromatographie in der qualitativen und quantitativen Bioanalytik – Schwerpunkt HPLC. Universität Wien. Skriptum 2014.
- [11] Agilent Technologies. Agilent 1260 Infinity Manual Injector. Waldbronn: Agilent Technologies. 2012.
- [12] Haider N. VO Trenn- und Analysemethoden organischer Arzneistoffe. Universität Wien. Skriptum 2012.

- [13] Agilent Technologies. Agilent 1260 Infinity Variable Wavelength Detector User Manual. Waldbronn: Agilent Technologies. 2012.
- [14] Cohen R, Cvitaš T, Frey J, Holmström B, Kuchitsu K, Marquardt R, Mills I, Pavese F, Quak M, Stohner J, Strauss H, Takami M, Thor A. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry (Green Book). 3 Auflage. Cambridge: RSC Publishing. 2007.
- [15] Meyer V. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 9. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH. 2009:24-26, 92-93.
- [16] Meyer V. Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. 3. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH. 2006:7.
- [17] <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html> [Zugriff am 16.10.2015].
- [18] Nakao R, Ito T, Hayashi K, Fukumura T, Yamaguchi M, Suzuki K. 1-Minute quality control tests for positron emission tomography radiopharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009; 50:245-251.
- [19] [http://www.analytix-shop.com/de/chromatographie/hplc-saulen/hplc-saulen-nachhersteller/merck-hplc-saulen.html?column\\_description\\_1=56732](http://www.analytix-shop.com/de/chromatographie/hplc-saulen/hplc-saulen-nachhersteller/merck-hplc-saulen.html?column_description_1=56732) [Zugriff am 24.11.2015].
- [20] Philippe C, Haeusler D, Mitterhauser M, Ungersboeck J, Viernstein H, Dudczak R, Wadsak W. Optimization of the radiosynthesis of the Alzheimer tracer 2-(4-N-[<sup>11</sup>C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole([<sup>11</sup>C]PIB). Applied Radiation and Isotopes. 2011; 69:1212-1217.
- [21] Philippe C, Zeilinger M, Mitterhauser M, Dumanic M, Lanzenberger R, Hacker M, Wadsak W. Parameter evaluation and fully-automated radiosynthesis of [<sup>11</sup>C]harmine for imaging of MAO-A for clinical trials. Applied Radiation and Isotopes. 2015; 97:182-187.
- [22] Plisson C, Huiban M, Pampols-Maso S, Singleton G, Hill S, Passchier J. Automated preparation of the dopamine D2/3 receptor agonist ligand [<sup>11</sup>C]-(+)-PHNO for human PET imaging studies. Applied Radiation and Isotopes. 2012; 70:380-387.
- [23] Wilson A, McCormick P, Kapur S, Willeit M, Garcia A, Hussey D, Houle S, Seeman P, Ginovart N. Radiosynthesis and Evaluation of [<sup>11</sup>C]-(+)-4-Propyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-naphtho[1,2-b][1,4]oxazin-9-ol as a Potential Radiotracer for in Vivo

Imaging of the Dopamine D2 High-Affinity State with Positron Emission Tomography. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; 48(12):4153-4160.

- [24] Haeusler D, Mien LK, Nics L, Ungersboeck J, Philippe C, Lanzenberger RR, Kletter K, Dudczak R, Mitterhauser M, Wadsak W. Simple and rapid preparation of [<sup>11</sup>C]DASB with high quality and reliability for routine applications. *Applied Radiation and Isotopes*. 2009; 67:1654–1660.
- [25] Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2009:164,172.
- [26] Van Dort ME, Tluczek L. Synthesis and Carbon-11 labeling of the Stereoisomers of meta-Hydroxyephedrine (HED) and meta-Hydroxypseudoephedrine (HPED). *Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2000; 43:603-612.
- [27] Wadsak W, Mien LK, Ettlinger DE, Lanzenberger RR, Haeusler D, Dudczak R, Kletter K, Mitterhauser M. Simple and fully automated preparation of [*carbonyl*-<sup>11</sup>C]WAY100635. *Radiochimica Acta*. 2007; 95:417-422.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

' , min	Minuten
` ` , sek, s	Sekunden
ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
AKH	Allgemeines Krankenhaus
AmF	Ammoniumformiat
AMG	Arzneimittelgesetz
AUC	Area under the Curve [mAU*s]
c, conc	Concentration, Konzentration
cm	Zentimeter
dest	destillata, Aqua destillata, destilliertes Wasser
DAD	Dioden Array Detektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
Fa	Firma
g	Gramm
GBq	Giga Becquerel
GMP	Good Manufacturing Practice = gute Herstellungspraxis
HCl	Chlorwasserstoff = Salzsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
i.v.	intravenös

keV	Kiloelektronenvolt
k.s.	kein Signal
LM	Laufmittel = mobile Phase
M	Molar
MAO–A	Monoaminoxidase A
MEK	Methylethylketon
ml	Milliliter
mM	milliMolar
mw	Messwert
N	Normalität veraltete Bezeichnung für Stoffmengenkonz.
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge, Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OH	Hydroxylgruppe (funktionelle Gruppe der Alkohole/Phenole)
PET	Positronen Emissions-Tomographie
pH	pH-Wert = negative dekadischer Logarithmus
Ph.Eur.	Pharmakopoe Europae, Europäisches Arzneibuch
ppm	Parts per mililon
QK	Qualitätskontrolle
r	Rauschen
RCR	Radiochemische Reinheit
RI-Detektor	refractive index detector / Brechungsindexdetektor

Rt, rt, T <sub>R</sub>	Retention Time, Retentionszeit
SERT	Serotonin Transporter
Stabw	Standardabweichung
UV	ultraviolett
Vk (%)	Variationskoeffizient (%) = (stabw/mittelwert)*100

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Wirkweise eines Radiopharmakons.....	2
Abbildung 2 Prinzip der PET [7].....	4
Abbildung 3 Original QK Chromatogramme einer [ <sup>11</sup> C]-PIB Radiosynthese .....	8
Abbildung 4 Schematischer Aufbau einer HPLC Anlage [9] .....	12
Abbildung 5 Kennzeichnung einer Säule.....	15
Abbildung 6 HPLC-Säulen.....	15
Abbildung 7 Chromatogramm [16] .....	18
Abbildung 8 One-Minute-QK oben DL-Homocystein unten L-Methionin.....	29
Abbildung 9 grafische Darstellung des Absorptionsmaximums von PIB .....	32
Abbildung 10 Standardgerade 6-OH-BTA-0, Methoden-Transfer .....	33
Abbildung 11 Standardgerade PIB, Methoden-Transfer .....	34
Abbildung 12 Standardgerade 6-OH-BTA-0, Methoden-Etablierung .....	37
Abbildung 13 Standardgerade PIB, Methoden-Etablierung .....	38
Abbildung 14 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima Harmin und Harmol.....	42
Abbildung 15 Standardgerade Harmol, Methoden-Transfer.....	43
Abbildung 16 Standardgerade Harmin, Methoden-Transfer.....	44
Abbildung 17 Standardgerade Harmol, Methoden-Etablierung.....	47
Abbildung 18 Standardgerade Harmin, Methoden-Etablierung.....	48
Abbildung 19 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima (+)-HNO und (+)-PHNO.....	54
Abbildung 20 Standardgerade (+)-HNO, Methoden-Transfer .....	55
Abbildung 21 Standardgerade (+)-PHNO, Methoden-Transfer .....	56
Abbildung 22 Standardgerade (+)-HNO, Methoden-Etablierung .....	59
Abbildung 23 Standardgerade (+)-PHNO, Methoden-Etablierung .....	60
Abbildung 24 verschiedene Laufmittelzusammensetzungen von 90% ACN und Puffer9,3 .....	63
Abbildung 25 grafische Darstellung des Absorptionsmaximums von DASB.....	68
Abbildung 26 Standardgerade MASB, Methoden-Transfer .....	69
Abbildung 27 Standardgerade DASB, Methoden-Transfer .....	70
Abbildung 28 Standardgerade MASB, Methoden-Etablierung.....	73
Abbildung 29 Standardgerade DASB, Methoden-Etablierung.....	74
Abbildung 30 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima Metaraminol und MHED .....	79
Abbildung 31 Standardgerade Metaraminol, Methoden-Transfer.....	80
Abbildung 32 Standardgerade MHED, Methoden-Transfer .....	81
Abbildung 33 Standardgerade Metaraminol, Methoden-Etablierung.....	84
Abbildung 34 Standardgerade MHED, Methoden-Etablierung .....	85
Abbildung 35 grafische Darstellung der Absorptionsmaxima WAY100634 und WAY100635..	90
Abbildung 36 Standardgerade WAY100634, Methoden-Transfer.....	91
Abbildung 37 Standardgerade WAY100635, Methoden-Transfer .....	92
Abbildung 38 Standardgerade WAY100634, Methoden-Etablierung.....	95
Abbildung 39 Standardgerade WAY100635, Methoden-Etablierung.....	96

## 11 Chromatogramme

Chromatogramm 1 Original QK Chromatogramme [ <sup>11</sup> C]-L-Methionin, Merck Hitachi L-7100 LaChrom .....	28
Chromatogramm 2 6-OH-BTA-0 und PIB, Methoden-Transfer .....	36
Chromatogramm 3 6-OH-BTA-0 und PIB, Methoden-Etablierung .....	36
Chromatogramm 4 Harmol und Harmin, Methoden-Transfer.....	46
Chromatogramm 5 Harmol und Harmin, Methoden-Etablierung .....	46
Chromatogramm 6 Harmol und Harmin mit Flowgradient.....	49
Chromatogramm 7 Harmol und Harmin in DMSO gelöst und mit 100% ACN verdünnt c=10µg/ml .....	52
Chromatogramm 8 (+)-HNO und (+)-PHNO, Methoden-Transfer.....	58
Chromatogramm 9 (+)-HNO und (+)-PHNO, Methoden-Etablierung.....	58
Chromatogramm 10 Original QK-Sample (+)-PHNO mit dem Laufmittelverhältnis ACN(90%) / Puffer 9,3 49:51.....	62
Chromatogramm 11 oben genannte Bedingungen, Formulierungslösung alleine .....	64
Chromatogramm 12 MASB und DASB, Methoden-Transfer .....	72
Chromatogramm 13 MASB und DASB, Methoden-Etablierung.....	72
Chromatogramm 14 Original QK-Sample von MASB und DASB mit der publizierten Methode .....	75
Chromatogramm 15 Gegenüberstellung Methoden-Etablierung (oben) und publizierte Methode (unten).....	77
Chromatogramm 16 Metaraminol und MHED, Methoden-Transfer .....	83
Chromatogramm 17 Metaraminol und MHED, Methoden-Etablierung.....	83
Chromatogramm 18 Metaraminol und MHED in DMSO gelöst und mit 100% ACN verdünnt .	87
Chromatogramm 19 WAY100634 und WAY100635, Methoden-Transfer.....	94
Chromatogramm 20 WAY100634 und WAY100635, Methoden-Etablierung.....	94
Chromatogramm 21 Gegenüberstellung der Wellenlänge 240nm und 216nm, c= 0,5µg/ml ..	97
Chromatogramm 22 WAY100635 90%ACN / Puffer 9,3, 72:28 .....	98
Chromatogramm 23 WAY100635 90%ACN / Puffer 9,3, 52:48 .....	98

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Pipettierschema für die Standardgeraden .....	26
Tabelle 2 Strukturformeln von L-Methionin (links) und D-L Homocystein (rechts).....	27
Tabelle 3 Strukturformel von PIB (links) und 6-OH-BTA-0 (rechts).....	31
Tabelle 4 Messwerte Absorptionsmaximum PIB, c=1µg/ml.....	32
Tabelle 5 Messwerte 6-OH-BTA-0, Methoden-Transfer .....	33
Tabelle 6 Messwerte PIB, Methoden-Transfer .....	34
Tabelle 7 Messwerte 6-OH-BTA-0, Methoden-Etablierung .....	37
Tabelle 8 Messwerte PIB, Methoden-Etablierung .....	38
Tabelle 9 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung für PIB .....	39
Tabelle 10 Strukturformeln von Harmin (links) und Harmol (rechts) .....	41
Tabelle 11 Messwerte der Absorptionsmaxima Harmin und Harmol, c=1µg/ml .....	42
Tabelle 12 Messwerte Harmol, Methoden-Transfer .....	43
Tabelle 13 Messwerte Harmin, Methoden-Transfer .....	44
Tabelle 14 Versuche zur Findung der LM-Zusammensetzung für den Tracer Harmin bei c=1µg/ml .....	45
Tabelle 15 Messwerte Harmol, Methoden-Etablierung .....	47
Tabelle 16 Messwerte Harmin, Methoden-Etablierung .....	48
Tabelle 17 Messwerte Harmol mit Flowgradient .....	50
Tabelle 18 Messwerte Harmol ohne Flowgradient.....	50
Tabelle 19 Messwerte Harmol und Harmin mit Formulierungslösung verdünnt - Löslichkeitsproblem .....	51
Tabelle 20 Messwerte Harmol in DMSO gelöst und mit Wasser verdünnt - $R^2=0,9994$ .....	52
Tabelle 21 Messwerte Harmin in DMSO gelöst und mit Wasser verdünnt - $R^2=0,9942$ .....	52
Tabelle 22 Strukturformeln von (+)-PHNO (links) und (+)-HNO (rechts) .....	53
Tabelle 23 Messwerte Absorptionsmaxima (+)-PHNO und (+)-HNO, c=1µg/ml.....	54
Tabelle 24 Messwerte (+)-HNO, Methoden-Transfer .....	55
Tabelle 25 Messwerte (+)-PHNO, Methoden-Transfer .....	56
Tabelle 26 Messwerte (+)-HNO, Methoden-Etablierung .....	59
Tabelle 27 Messwerte (+)-PHNO, Methoden-Etablierung .....	60
Tabelle 28 Versuche zur Findung der LM-Zusammensetzung für den Tracer (+)-PHNO bei c=1µg/ml .....	61
Tabelle 29 Versuche Flowgradient, (+)-HNO und (+)-PHNO .....	63
Tabelle 30 Versuche neue Laufmittelzusammensetzung, (+)-HNO und (+)-PHNO.....	65
Tabelle 31 Versuche neue LM-Zusammensetzung und Flowgradient, (+)-HNO und (+)-PHNO	65
Tabelle 32 Gegenüberstellung der letzten zwei Versuche, (+)-HNO und (+)-PHNO .....	66
Tabelle 33 Strukturformel von DASB (links) und MASB (rechts).....	67
Tabelle 34 Messwerte Absorptionsmaximum DASB, c=1µg/ml .....	68
Tabelle 35 Messwerte MASB, Methoden-Transfer.....	69
Tabelle 36 Messwerte DASB, Methoden-Transfer.....	70
Tabelle 37 Messwerte MASB, Methoden-Etablierung.....	73
Tabelle 38 Messwerte DASB, Methoden-Etablierung .....	74
Tabelle 39 (3) Flow und Laufmitteländerungen ,MASB und DASB .....	76

Tabelle 40 Flowänderungen, MASB und DASB .....	76
Tabelle 41 Strukturformel von MHED Hydrochlorid (links) und Metaraminol (rechts) .....	78
Tabelle 42 Messwerte Absorptionsmaxima Metaraminol und MHED, $c=1\mu\text{g/ml}$ .....	79
Tabelle 43 Messwerte Metaraminol, Methoden-Transfer .....	80
Tabelle 44 Messwerte MHED, Methoden-Transfer .....	81
Tabelle 45 Messwerte Metaraminol, Methoden-Etablierung .....	84
Tabelle 46 Messwerte MHED, Methoden-Etablierung .....	85
Tabelle 47 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von Metaraminol und MHED Hydrochlorid.....	86
Tabelle 48 Flowgradient mit Zusammensetzung aus Tabelle 56 , Metaraminol und MHED ....	87
Tabelle 49 Strukturformel von WAY100635 (links) und WAY100634 (rechts).....	88
Tabelle 50 Messwerte Absorptionsmaxima WAY100634 und WAY100635, $c=10\mu\text{g/ml}$ .....	90
Tabelle 51 Messwerte WAY100634, Methoden-Transfer.....	91
Tabelle 52 Messwerte WAY100635, Methoden-Transfer.....	92
Tabelle 53 Messwerte WAY100634, Methoden-Etablierung.....	95
Tabelle 54 Messwerte WAY100635, Methoden-Etablierung.....	96
Tabelle 55 Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von WAY100634 und WAY100635 .....	99
Tabelle 56 Verbesserungen (zusammengefasst).....	101
Tabelle 57 Versuche(1) - Gradientenelution – (+)-PHNO .....	119
Tabelle 58 Versuche(2) - Gradientenelution – (+)-PHNO .....	120
Tabelle 59 Versuche(1) - Gradienten- und Flowänderung – (+)-PHNO.....	121
Tabelle 60 Versuche (2) - Gradienten- und Flowänderung – (+)-PHNO.....	121
Tabelle 61 Versuche mit 100% ACN – (+)-PHNO .....	122
Tabelle 62 (1) Versuch zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB.	123
Tabelle 63 (1) Flow- und Laufmitteländerungen, MASB und DASB .....	123
Tabelle 64 (2) Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB .....	124
Tabelle 65 (2) Flow- und Laufmitteländerungen, MASB und DASB .....	124
Tabelle 66 (3) Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB .....	124

## 13 Formelverzeichnis

Formel 1 Spezifische Aktivität .....	7
Formel 2 Lambert Beer'sches Gesetz .....	17
Formel 3 Tailing (T).....	17
Formel 4 Retentionsfaktor .....	19
Formel 5 Selektivität ( $\alpha$ ) .....	19
Formel 6 Auflösung (R) .....	19

## **14 Anhang**

Qualitätskontrolle-Protokoll [ $^{11}\text{C}$ ]-PIB AKH Wien

Herstellungsprotokoll [ $^{11}\text{C}$ ]-PIB AKH Wien

Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung (+)-PHNO

Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung DASB

Lebenslauf

# 14.1 Qualitätskontrolle-Protokoll [<sup>11</sup>C]-PIB AKH Wien



## Herstellungsprotokoll <sup>11</sup>C-PIB

Version 03

FM-RCH-067

erstellt von: Prof. Dr. W.Wadsak

gültig ab: 09.12.2011

Seite 3 von 3

### Qualitätskontrolle

[<sup>11</sup>C]-PIB-Charge: PIB- .....

Datum: \_\_\_\_\_

	Entspricht	Entspricht nicht	Wert
<b>RCR (HPLC - Radioaktivitätsdetektor)</b>			
Produkt [ <sup>11</sup> C]PIB $\geq 95\%$	☺	☹	.....% $t_R = \dots$ min
sonstige Verunreinigung $\leq 3\%$	☺	☹	.....% $t_R = \dots$ min
sonstige Verunreinigung $\leq 3\%$	☺	☹	.....% $t_R = \dots$ min
<b>Chemische Reinheit (HPLC – UV Det)</b>			
[ <sup>12</sup> C]-PIB	☺	☹	.....µg/ml $t_R = \dots$ ⇒ .....GBq/µmol
6-OH-BTA-0 (Precursor)	☺	☹	.....µg/ml $t_R = \dots$
<b>Radionuklidische Reinheit</b>			
HWZ ( $t_{1/2}$ ) $20,3 \pm 2$ min	☺	☹	1) ..... 2) ..... ⇒ .....min
γ-Spektrum Peak bei 430-520keV	☺	☹	.....keV
<b>Prüfung auf Lösungsmittel (GC - FID)</b>			
MEK $< 5000$ ppm	☺	☹	.....ppm
Acetonitril $< 410$ ppm	☺	☹	.....ppm
<b>Physikalische Parameter</b>			
pH-Wert: $4.5-8.5$	☺	☹	
Osmolalität: $200 - 400$ mosm/kg	☺	☹	.....mosmol/kg
<b>Freigabe der Charge</b>	<b>JA</b> ☺	<b>NEIN</b> ☹	

Anmerkung: n.d. nicht detektierbar //  $t_R$  ... Retentionszeit

Formel zur Berechnung der spez. Aktivität:  $a_2$  [GBq/µmol] = Ausbeute [GBq] / ( $a_1$  [µg/ml] x Volumen [ml] / 256,32 [g/mol])

Durchführende Person

Kontrollleiter

Mikrobiologische Untersuchungen	Entspricht	Entspricht nicht	
Sterilität gewährleistet	☺	☹	
Endotoxine $< 1.0$ EU/ml	☺	☹	

Kontrollleiter

## 14.2 Herstellungsprotokoll [<sup>11</sup>C]-PIB AKH Wien



[<sup>11</sup>C]-PIB-Charge: PIB - .....

Datum: \_\_\_\_\_

Verwendete Reagentien / Verbrauchsmittel	Menge	Charge laut Liste
Reaktor 2: Precursor	2mg	<input type="radio"/>
MEK (>99,7%)	500µl	<input type="radio"/>
Vorratsgefäß 2: HPLC-Eluent	1ml	<input type="radio"/>
Vorratsgefäß 4: NaCl 0,9%	5ml	<input type="radio"/>
Vorratsgefäß 5: Ethanol abs.	1,5ml	<input type="radio"/>
Vorratsgefäß 6: Wasser ad inj.	10ml	<input type="radio"/>
Produktsammelgefäß: NaCl 0.9%	4ml	<input type="radio"/>
NaCl 3%	1ml	<input type="radio"/>
Phosphatpuffer 125mM	1ml	<input type="radio"/>
„bulb“: Wasser ad inj.	100ml	<input type="radio"/>
C-18 sep pak plus, konditioniert	1	<input type="radio"/>
Produktvial beschriftet mit Sterilfiltern assembliert	1	<input type="radio"/>
+ NaCl 0.9%, sterilfiltriert	5ml	<input type="radio"/>
Sterilfilter GV 0,22µm (Millex; gelb)	1	<input type="radio"/>
Sterilluftfilter (Millex)	1	<input type="radio"/>

Bemerkungen: Akt. Mel (getrappt): .....GBq (.....Uhr) // Akt. Re (getrappt):.....GBq (.....Uhr)

Loop waste: .....MBq (.....Uhr) // prep. Peak:Retentionszeit.  $t_R$  = .....min.

Nach der Synthese:

- SYNTHESEDATEN in Excel eingetragen
- prep. HPLC Chromatogramm ausgedruckt
- auf Liste Mel-Runs (FM-RCH-026) eingetragen

Durchführende Person

Herstellerteiler

### 14.3 Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung (+)-PHNO

21.04.2015	Puffer 2,1 (A)	90 % ACN (B)	Puffer 9,3 (D)	sek [ '' ]	Flow [ml/min]	Rt (+)- HNO	Rt (+)-PHNO
1.Versuch		20	80		1	45''	8'03
2.Versuch		20 50	80 50	45	1	45''	1'50
3.Versuch		20 60	80 40	30	1	45''	1'34
4.Versuch		20 60	80 40	30	1	46''	1'31
5.Versuch		20 60	80 40	20	1	45''	1'26
6. Versuch		20 70	80 30	20	1	45''	1'19
7. Versuch		70	100 30	20	1	k.s.	1'26
8. Versuch		20 70	80 30	10	1	44''	1'14
9.Versuch		20 70	80 30	10	1	45''	1'09
10.Versuch		20 80	80 20	10	1,2	38''	59''
11.Versuch		80	100 20	10	1,2	k.s.	1'07
12. Versuch		10 80	90 20	10	1,2	k.s.	1'04
13.Versuch		20 90	80 10	10	1,2	38''	57''
14. Versuch		20 90	80 10	20	1,2	38''	1'01
15.Versuch		100	100	20	1,2	k.s.	1'05
16.Versuch		80	100 20	20	1,2	k.s.	1'18
17.Versuch		50 80	50 20	10	1,2	k.s.	
18.Versuch		20 80	80 20	20	1	k.s.	
19.Versuch		50 80	50 20	20	1,2	k.s.	
20.Versuch	50	50 80	50 20	30	1,2	k.s.	

21.Versuch	50	50 50	50	30	1	k.s.	
22.Versuch	50	50 50	50	40	1	k.s.	
23.Versuch		45 50	55 50	40	1	37``	1`10
24.Versuch		45 50	50 50	30	1,2	30``	59``
25.Versuch		45 80	55 20	20	1,2	28``	53``
26. Versuch		45 50	55 50	20	1,2	31``	59``
27.Versuch		45 80	55 20	10	1,2	k.s.	44``
28.Versuch		80 20	20 80	20	1,2	k.s.	55``
versuch 25 reproduziert		45 80	55 20	20	1,2	k.s.	40``

**Tabelle 57 Versuche(1) - Gradientenelution – (+)-PHNO**

22.04.2015	90% ACN (B)	Puffer 9,3 (D)	sek [``]	flow [ml/min]	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO
1.Versuch	30 80	70 20	20	1,2	23``	1`00
2.Versuch	30 80	70 20	20	1	k.s.	1`08
3.Versuch	30 80	70 20	30	1	28``	1`28
4.Versuch	30 80	70 20	20	1	k.s.	1`08
5.Versuch	45 60	55 40	20	1	27``	1`05
6. Versuch	40 60	60 40	20	1	k.s.	54``
7. Versuch	40 60	60 40	30	1	k.s.	1`01
8. Versuch	20 60	80 40	30	1	21``	1`27
9.Versuch	45 49	55 51	20	1	k.s.	52``
10.Versuch	35 49	65 51	20	1	k.s.	1`04
11.Versuch	49 60	51 40	20	1	k.s.	44``
12. Versuch	30 60	70 40	30	1	k.s.	1`02

13.Versuch	20 40	80 60	30	1,2	34''	1'44
14. Versuch	20 40	80 60	20	1,2	k.s.	1'28
15.Versuch	20 50	80 50	30	1,2	k.s.	1'26
16.Versuch	49 50	51 50	30	1	40''	1'07
17.Versuch	48 50	52 50	40	1	k.s.	41''
18.Versuch	49 50	51 50	30	1,2	k.s.	34''
19.Versuch	40 50	60 50	30	1,1	k.s.	46''
20.Versuch	49	51		1	k.s.	40''
21.Versuch HNO	20	80			33''	

**Tabelle 58 Versuche(2) - Gradientenelution – (+)-PHNO**

23.04.2015	90% ACN (B)	Puffer 9,3 (D)	sek [']	bis sek [']	Flow [ml/min] von	Flow [ml/min] bis	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO
1. Versuch	49 50	51 50	30		1		k.s	41''
2. Versuch	20 90	80 10	10		1,2		39''	59''
3. Versuch	20 80	80 20	10		1,2		39''	1'01
4. Versuch	30 80	70 20	20		1,2		24''	1'01
5. Versuch	30 80	70 20	30		1,2		22''	1'04
6. Versuch	20 60	80 40	30		1,2		38''	1'19
7. Versuch	20 70	80 30	20		1,2		39''	1'09
8. Versuch	20 60	80 40	20		1,2		38''	1'15
9.Versuch	20 50	80 50	20		1,2		38''	1'28
10. Versuch	20 70	80 30	10		1,2		38''	1'04
11. Versuch	20 80	80 20	1''	1'	1		45''	1'07
12. Versuch	50 80	50 20	1''	1'	1		20'' (k.t.)	39''
13. Versuch	35	65	1''	1'	1		k.s	1'

	80	20						
14. Versuch	30	70	1''	1'	1		28''	1'03
	80	20						
15. Versuch	30	70	1''	1'	1		28''	1'02
	90	10						
16. Versuch	30	70	1''	1'	1		27''	59''
	100							
17. Versuch	30	70	1''	1'	1,2		28''	56''
	100							
18. Versuch	30	70	1''	1'	1,3	ab 30s 1,0	21''	51''
	100							
19. Versuch	30	70	1''	1'	1,3	ab 25s 1,0	20''	53''
	99	1						
20. Versuch	30	70	1''	1'	1,3	ab 40s 1,0	20''	49''
	99	1						
21. Versuch	30	70	1''	1'	1,5	ab 40s 1,0	18''	43''
	99	1						
21. Versuch reproduzierbar	30	70	1''	1'	1,5	ab 40s 1,0	18''	42''
	99	1						

**Tabelle 59 Versuche(1) - Gradienten- und Flowänderung – (+)-PHNO**

	90% ACN (B)	Puffer 9,3 (D)	sek [']	bis sek [']	Flow [ml/min] von	Flow [ml/min] bis	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO
24.04.2015								
1. Versuch	30	70	1''	1'	1,6	ab 40s 1,0	16''	40''
	99	1						
2. Versuch	30	70	1''	1'	1,6	ab 35s 1,0	17''	41''
	99	1						
3. Versuch	30	70	1''	1'	1,7	ab 35s 1,0	16''	42''
	99	1						
4. Versuch	30	70	1''	1'	1,7	ab 40s 1,0	15''	39''
	99	1						
5. Versuch	30	70	1''	1'	1,7	ab 38s 1,0	16''	38''
	99	1						

**Tabelle 60 Versuche (2) - Gradienten- und Flowänderung – (+)-PHNO**

27.04.2015	100% ACN (B)	Puffer 9,3 (D)	sek [']	Flow [ml/min]	Rt (+)-HNO	Rt (+)-PHNO
1 versuch	20	80	1	1	37''	1'21
	50	50				
2 versuch	20	80	1	1	41''	1'48
	99	1				
3 versuch	20	80	1	1	39''	1'05
	80	20				
4 versuch	20	80	1	1,2	34''	55''
	80	20				
5 versuch	20	80	1	1,2	38''	1'24''

	99	1				
6 versuch	35 75	65 25	1	1,2	19``	48``
7 versuch	35 75	65 25	1	1	23``	58``
8 versuch	30 80	70 20	1	1	25``	1`
9 versuch	20 50	80 50	10	1	25``	1`20
10 versuch	10 90	90 10	10	1		1`08
11 versuch	15 99	85 1	1	1	1`14	1`26
12 versuch	20 60	80 40	1	1	40``	1`13
13 versuch	20 70	80 30	1	1	36``	1`08
14 versuch	20 80	80 20	1	1,3 bis 35``	31``	54``
15 versuch	20 90	80 10	1	1,3 bis 30``	24``	54``
16 versuch	20 90	80 10	1	1,3 bis 50``	29``	48``

**Tabelle 61 Versuche mit 100% ACN – (+)-PHNO**

## 14.4 Versuchstabellen für die Methoden-Etablierung DASB

Mit 2 Laufmitteln (90% ACN und Puffer pH=9,3)

Flow [ml/min]	90% ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Rt DMSO [sek]	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]	Anmerkung
1	0,68	0,32	15	27	50	
1	0,67	0,33	15	28	51	Lotfällung
1	0,62	0,38	15	32	1`04	
1	0,58	0,42	15	36	1`18	
1	0,56	0,44	15	38	1`27	
1,5	0,56	0,44	15	25	57	
1	0,54	0,46	15	42	1`40	
1,5	0,54	0,46	15	27	1`05	
1	0,5	0,5	15	49	2`15	

Tabelle 62 (1) Versuch zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB

Änderung	Flow von [ml/min]	Flow bis [ml/min]	90% ACN (B)	Puffer9,3 (D)	Rt DMSO [sek]	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]	Anmerkung
Flow Zusammensetzung	1,5	50 sek 31sek	50 68	50 32		32	1`23	
Flow Zusammensetzung	1,5	60sek 31sek	50 72	50 28		32	1`17	
Flow Zusammensetzung	1,6	60sek 21sek	50 72	50 28	10	30	1`03	32 + 1`05 Original QK
Flow (Druckbeginn 352 Bar) Zusammensetzung	1,6	60sek 21sek	50 75	50 25	10	30	1`02	Druckabfall auf 30Bar
Flow (Druck fällt auf 90Bar steigt wieder auf 138Bar) Zusammensetzung	1,6	60sek 11sek	50 72	50 28		31	56	31 + 57 Original QK

Tabelle 63 (1) Flow- und Laufmitteländerungen, MASB und DASB

Mit 3 Laufmitteln (90% ACN, 100% Aqua destillata, Ammoniumpuffer pH=9,3)

Flow [ml/min]	90% ACN (B)	H2O (C)	Puffer9,3 (D)	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]
1	0,6	0,1	0,3	32	1`10
1	0,6	0,2	0,2	34	1`11
1	0,6	0,25	0,15	34	1`12
1	0,55	0,2	0,25	40	1`35
1	0,55	0,25	0,2	40	1`35

1,4	0,55	0,25	0,2	28	1'06
-----	------	------	-----	----	------

**Tabelle 64 (2) Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB**

Änderung	Flow von [ml/min]	Flow bis [ml/min]	90% AcN (B)	H2O (C)	Puffer9,3 (D)	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min]
Flow	1,4		0,55	0,25	0,2	28	1'17
Zusammensetzung		30sek	0,7		0,3		
Flow	1,4		0,55	0,2	0,25	28	1'17
Zusammensetzung		30sek	0,6	0,1	0,3		
Flow	1,4	60sek	0,55	0,2	0,25	28	1'07
Zusammensetzung		30sek	0,6	0,1	0,3		
Flow	1,5	60sek	0,55	0,2	0,25	26	1'01
Zusammensetzung		30sek	0,6	0,1	0,3		
Flow	1,5	60sek	0,55	0,2	0,25	26	1'02
Zusammensetzung		30sek	0,68		0,32		
Flow	1,6	60sek	0,55	0,2	0,25	24	57
Zusammensetzung		30sek	0,68		0,32		
Flow	1,6	60sek	0,55	0,2	0,25	24	57
Zusammensetzung		21sek	0,72		0,28		

**Tabelle 65 (2) Flow- und Laufmitteländerungen, MASB und DASB**

Mit 4 Laufmitteln (Puffer pH=2,1, 90% ACN, 100% Aqua dest, Puffer pH=9,3)

Flow [ml/min]	Puffer2,1 (A)	90% ACN (B)	H2O (C)	Puffer9,3 (D)	Rt DMSO [sek]	Rt MASB [sek]	Rt DASB [sek, min']	Anmerkung
1	0,06	0,47	0,14	0,33	14	25	1'34	
1	0,1	0,47	0,2	0,23	15	23	44	
1	0,1	0,45	0,45	0	15	-	-	
1	0,15	0,45	0,2	0,2	15	-	-	
1	0,1	0,4	0,1	0,4	15	29-31	1'41-1'4,3	Lotfällung
1	0,35	0,35	0,05	0,25	keine eindeutige Trennung			
1	0,33	0,34	0	0,33	keine eindeutige Trennung			
1	0,1	0,3	0,1	0,5	16	1'04		
1	0,2	0,3	0,1	0,4	16	37	1'37	Lotfällung
1	0,1	0,3	0,2	0,4	1'03			
1	0,2	0,2	0,2	0,4	17	-	-	
1	0,33	0,2	0,14	0,33	17	-	-	
1	0,3	0,6	0,1	0	15	-	-	

**Tabelle 66 (3) Versuche zur Findung der Laufmittelzusammensetzung von MASB und DASB**

## 14.5 Lebenslauf



### PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Britta Steiner  
Anschrift: Hauptstraße 74/2/4  
2491 Neufeld an der Leitha  
Geburtsdaten: 13.07.1983, Wiener Neustadt  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: verheiratet

### AUSBILDUNGSDATEN:

1989 – 1993 Volksschule Bad Sauerbrunn  
1993 – 1997 Bundesrealgymnasium Zehnergasse Wiener Neustadt  
1997 – 2002 Bundeshandelsakademie Wiener Neustadt  
WS 02 – SS 03 Wirtschaftsuniversität Wien, Wirtschaftspädagogik  
WS 03 – WS 04 Universität Wien, Lehramt Mathematik und Geographie und  
Wirtschaftskunde  
Feb 05 - Jän 07 PKA Lehre in der Landschaftsapotheke Baden, Mag.pharm. Haberfeld  
Seit WS 07 Universität Wien, Diplomstudium Pharmazie  
Okt 14 – Jun 15 Praktischer Teil der Diplomarbeit am AKH Wien,  
Abteilung Nuklearmedizin

### BERUFSPRAXIS:

August 2000 VJV-Versicherung, Mattersburg, Ferialpraktikum  
August 2001 Optik Klikovitz, Wr. Neustadt, EDV-Dateneingabe  
September 2002 Manpower, Lagertätigkeiten bei H&M Hauptzentrale Wien  
Dezember 2003 Servicepersonal bei Palazzo und Do&Co Wien  
August 2004 Österreichisches Jugendrotkreuz, Betreuerin am Therapie- und  
Erholungslager, Kärnten  
Feb 2007-Dez 2013 PKA in der Burgenland Apotheke Siegendorf, Mag.pharm. Tesar

### SPRACHKENNTNISSE:

Deutsch (Muttersprache)  
Englisch

### BESONDERE KENNTNISSE:

Stenographie  
Microsoft Office  
Führerschein B