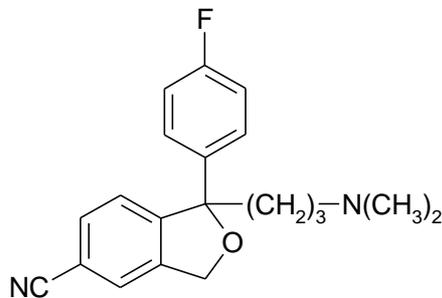


Nachweis von Citalopram im Blut mittels LC/MS nach der Probenaufbereitung mit Oasis® Extraktions-Säulen

M. Lenz, W.-R. Bork

Landeskriminalamt Berlin, Institut Polizeitechnische Untersuchungen, LKA PTU 41, Tempelhofer Damm 12, D-12101 Berlin

Im Zusammenhang mit einem Ermittlungsverfahren sollte eine Blutprobe im LKA Institut Polizeitechnische Untersuchungen Berlin auf Medikamentenwirkstoffe hin untersucht werden. Es ergaben sich Hinweise auf die Einnahme von Citalopram. Citalopram ist der Wirkstoff von u.a. Cipramil® 20 mg/-40 mg Filmtabletten der Fa. Lundbeck, und wirkt gegen depressive Erkrankungen (Antidepressivum).



1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(p-fluorophenyl)-5-phthalanecarbonitril (C₂₀H₂₁FN₂O, MG 324)

Die therapeutischen Mengen liegen je nach Schwere der Depression und Ansprechen des Patienten bei max. 60 mg täglich. Der antidepressive Effekt setzt normalerweise nach 2 bis 4 Wochen Behandlung ein. Die Halbwertszeit liegt bei 33 Stunden.

Zum Nachweis waren Versuche zur Probenaufbereitung einer mit Citalopram versetzten Blutprobe (122 µg/ml) auf einer Oasis® MCX Festphase der Fa. Waters erforderlich. Die Einführung von Kationenaustauscherfunktionalitäten an den SO₃H⁺ Gruppen führt zu einer selektiven Retention basischer Wirkstoffe. Das wasserbenetzbare Polymermaterial besitzt eine hohe pH-Stabilität (pH 0-14). Die Verwendung einer pH-modifizierten Waschlösung erlaubt die Optimierung der damit sehr selektiven Methode für basische Komponenten.

Extraktionsmethode:

- Die Säule wird mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser gewaschen bzw. konditioniert, dann mit 1 ml Serum beladen und es wird innerhalb von 2 Minuten extrahiert.
- Der Kationenaustauscher wird mit 1 ml 0.1 M HCl eingeschaltet (Protonierung der Base) bzw. gewaschen (Säule nach 2 Minuten trocken laufen lassen).
- Saure und neutrale Interferenzen werden im 2. Waschschrift mit 1 ml Methanol entfernt.
- Der Kationenaustauscher wird dann mit 1 ml K₂HPO₄ pH 13 abgeschaltet bzw. gewaschen (Säule nach 2 Minuten trocken laufen lassen).
- Die basischen Verbindungen werden jetzt mit 1 ml Methanol eluiert.
- Die Wiederfindung von 122 µg Citalopram/ml Serum entspricht 62 %.

LC-MS-Methode:

Die chromatographische Trennung und Detektion wurde mittels LC-ESI-MS durchgeführt. Die Trennung erfolgte an einer 15 cm langen Silica-Phase der Fa. LC Packings, mit einem Innendurchmesser von 1000 μm (Microbore) und einer Partikelgröße von 3 μm , sowie durch mobile Phasen, - von unpolar bis polar -, im Linear-Gradienten bei einem Flow von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einem Post-Column Split-Verhältnis von 1:4.

Mobile Phase:

Eluens C: Acetonitril / 5 mM Ammoniumacetat pH 5.0 90/10 (V/V)
 Eluens D: Acetonitril / 5 mM Ammoniumacetat pH 5.0 10/90 (V/V)

LC-Gradient:

- 2 min auf 100 % C isokratisch
- danach innerhalb 0.1 min linear auf 100 % D
- isokratisch bei 100 % D bis 18 min, dann innerhalb von 0.1 min linear wieder auf 100 % C

Die Retentionszeit beträgt hierbei für Citalopram 12.88 min.

Gemessen wird mit einem Massenspektrometer vom Typ SSQ 7000 der Fa. Finnigan im Positiv-Ion-Mode und der ESI-Methode mit folgenden Parametern:

ESI Spray Voltage 4.5 keV
 Heated Capillary 230 °C
 Sheath Gas Pressure 55 PSI

Im fullscan-Bereich (220 – 400) kann sodann eine protonierte Molekül-Ionenmasse $(\text{M}+\text{H})^+$ von 325 als Base Peak dargestellt werden. Die Nachweisgrenze beträgt im SIM-Mode < 2 ng / ml Serum (S/N 3:1). Durch Anlegen einer CID-Offset-Spannung von 30 eV am Octapole des MS SSQ 7000 können somit signifikante Fragment-Ionen erzeugt werden. Das Massenspektrum ist in Abb. 1 dargestellt.

```
File: b0119381c.dat (19-JUN-02 15:18:52)           Scans: 1 > 4560
Samp: Serum 41/01/1938 1.SPE auf Citalopram
Comm: OH/MIC-15-03/2min 100%C ---0.1min ---100%D
Oper: le                                           Study: CID      Client: LKA PTU 41 M:
Base: 108.98                                       Masses: 100.00 > 399.99 Peaks: 207
Peak: 1000.0 mmu                                  Intensity: 138909  RIC: 1052604
Defect: 0 @ 1, 300 @ 1000
Scan 1548 @ 12.89 min (ESI +Q1MS APICID LMR  UP LR)      1.4E+05
```

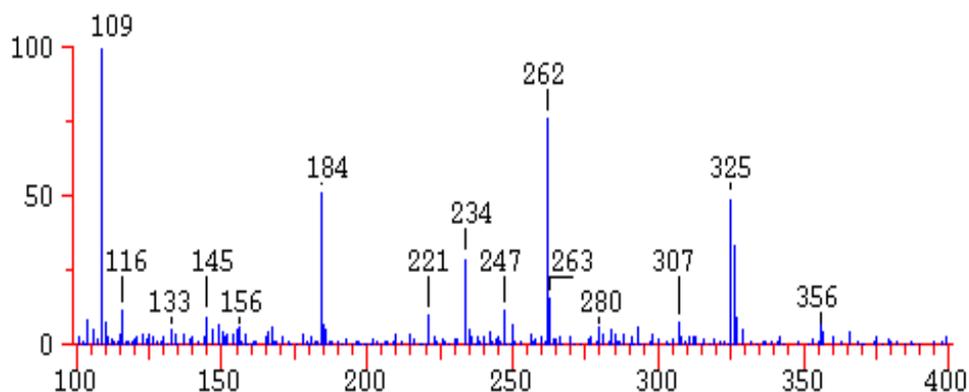


Abb. 1. LC-MS-Spektrum von Citalopram

Neben der protonierten Molekül-Ionenmasse von 325 erhält man durch Abspaltung von Dimethylamin aus der Seitenkette das Fragment 280 bzw. durch Abspaltung von $N^+(CH_3)_2$ und F das Fragment 262 und Abspaltung zweier CH_2 -Gruppen aus der Seitenkette das Fragment 234, sowie ein Benzofuran-Rest als Fragment 116.

Nach erfolgter Probenaufbereitung der Blutprobe an einer MCX-Festphase konnte mittels der vorgenannten selektiven LC/MS-Methode über die Retentionszeit und durch Vergleich des Massenspektrums (gemessen im CID-Mode) der hausinternen LC/MS-Spektrenbibliothek, - erstellt durch eine zertifizierte Referenz-Standard-Substanz -, die Substanz Citalopram eindeutig identifiziert werden. In der Blutprobe konnte eine Wirkstoff-Konzentration von 700 ng Citalopram pro ml Serum nachgewiesen werden. Das Chromatogramm ist in Abb. 2 dargestellt.

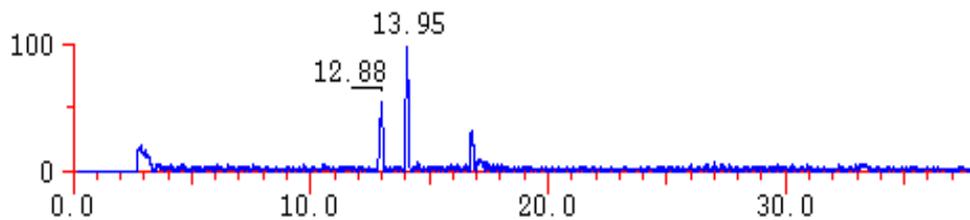
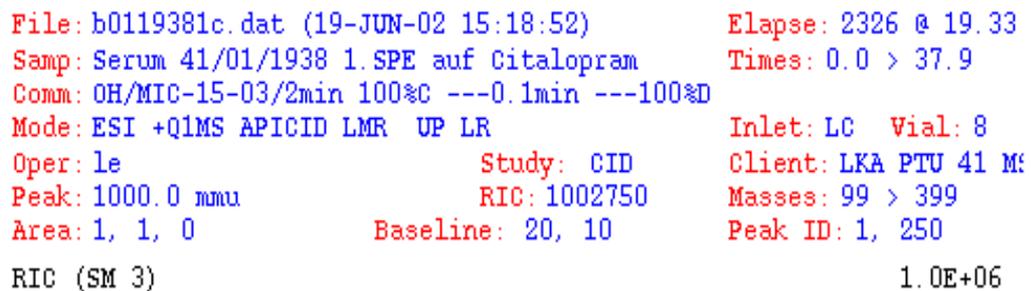


Abb. 2. Chromatogramm der Blutprobe des zu untersuchenden Falles