

1

Einleitung

Wenn man als Analytiker vor der Herausforderung steht, einen bestimmten Stoff – sei es ein Medikament, ein Metabolit eines Medikaments oder ein körpereigener Stoff – in Plasma, Harn oder Gewebe nachzuweisen, so sind ganz unterschiedliche Ansätze denkbar. Man könnte mit der Frage beginnen: „Was wurde bisher darüber publiziert?“. Allzu leicht fühlt man sich dann von der Vielzahl der Möglichkeiten erschlagen, speziell, wenn es um gängige Medikamente geht. Alternativ kann man seine Beziehungen aktivieren und befreundete oder bekannte Kollegen anrufen, die hoffentlich schon etwas mit diesem Stoff zu tun hatten, um sich Tipps zu holen. Eine dritte Möglichkeit besteht in einer geistigen Klausur, die allerdings dann doch häufig in einem Chaos von „Stoffsammlung“ endet und so womöglich deutlich mehr Fragen aufwirft, als sie beantwortet.

Haben Sie sich nicht schon immer ein Handwerkszeug für solche Fragestellungen gewünscht, mit dem man zügig an eine Lösung herankommt und bald weiß, ob man mit den eigenen instrumentellen Möglichkeiten auch ans Ziel kommen könnte? In diesem Buch werden Sie einen solchen Denkansatz kennen lernen. Teile dieses Konzepts verwendet jeder Analytiker, der im klinisch-pharmazeutischen Umfeld tätig ist. Aber die Radikalität dieses Ansatzes, der sich bei uns in der Praxis schon viele tausende Male bewährt hat, macht ihn zu einem Werkzeug, das immer wieder gerne zur Hand genommen wird. Vielleicht auch von Ihnen, wenn Sie dieses Grundkonzept mehrere Male erfolgreich angewandt haben.

In den folgenden drei Abschnitten wird jeweils ein konkretes Problem gestellt und eine mögliche Lösung entwickelt. Bitte wenden Sie zuerst Ihre Methode zur Problemlösung an und vergleichen Sie dann, ob Ihnen der Denkansatz des Buches geläufig ist und Sie ihn sowieso anwenden oder ob Sie vielleicht hier Werkzeuge kennen lernen, die für eine schnelle und gute Lösung der Fragestellung sehr hilfreich sind.

In der klinischen Praxis oder bei Untersuchungen im bioanalytischen Bereich von Pharmaunternehmen nimmt Plasma (Serum) die dominierende Rolle ein. Gelegentlich sind auch Harnuntersuchungen von großer Relevanz: bei der Überwachung von Krankheitsbildern, zur Therapiekontrolle oder auch für eine Massenbilanz von Pharmaka (z. B. wie viel eines oral verabreichten Wirkstoffs wird wieder ausgeschieden). Ob es sich bei der zu bestimmenden Substanz nun um

den Wirkstoff selbst oder auch zahlreiche Metaboliten handelt, spielt für die momentane Betrachtung keine Rolle.

1.1

Erste Problemstellung: Bestimmung von Ibuprofen in Plasma

Ein Kollege oder Vorgesetzter bittet um den Nachweis eines NSAR (= nichtsteroidales Antirheumatikum) in Humanplasma. (Möglicherweise klingt das dann von Klinikern so ähnlich wie: „Sie haben doch schon Stoffe aus diesem Therapiegebiet analysiert, dann können Sie mir doch auch diesen Stoff nachweisen – oder?“). Nach Rückfrage erhält man möglicherweise nicht einmal den Substanznamen, sondern nur den des Präparats und vielleicht noch die Dosierung. Der klinische Kollege hat in diesem Fall Brufen verabreicht und braucht – das ergibt ein kurzer Blick in eine Präparatliste – somit den Nachweis von Ibuprofen im Plasma. Wie geht man jetzt üblicherweise so eine Problemstellung an? Literaturnachweise suchen? Kollegen anrufen? Strukturformel anschauen?

Unserer Erfahrung nach empfiehlt es sich, als Erstes die folgenden zwei Fragen zu beantworten:

- Welche Nachweisgrenze wird gebraucht?
- Welche Geräte stehen zur Verfügung?

Die zweite Frage lässt sich leicht beantworten. Für das vorliegende Beispiel nehmen wir an, es stünde ein HPLC-Gerät, ein UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und ein Fluoreszenzdetektor zur Verfügung. Die Frage nach der Nachweisgrenze jedoch ist es schon viel heikler. Welche Frage will der Kollege denn klären? Braucht er eine Kontrolle zur Therapietreue des Patienten? Hat er wegen gewisser Nebenwirkungen Bedenken, dass die Plasmaspiegel zu hoch sind? Oder würde er bloß gerne wissen, wie die Plasmakonzentrationen im Minimum sind, bevor erneut dosiert wird ($C_{ss,min}$)? Für den Maximalspiegel bei üblicher Dosierung findet man in der Literatur (z. B. „Martindale“ als gutes Nachschlagewerk¹ oder Angaben der Präparatehersteller) als Richtwert etwa 20–50 µg/ml (siehe Anhang „Ibuprofen“). Auch die Angaben der Halbwertszeiten sind bei solchen Fragestellungen oft von Interesse, weil man dem Kliniker dann sagen kann, wann er Blutproben nehmen soll, damit seine Fragen beantwortet werden können. Andererseits weiß der Analytiker durch die Halbwertszeit, welche Plasmaspiegel zu erwarten sind, wenn standardmäßig beispielsweise rund fünf Stunden nach Verabreichung Blutproben genommen werden.

Zurück zur Fragestellung: Den Kliniker interessiert im vorliegenden Fall nur der Maximalspiegel wegen der Nebenwirkungen. Er muss also wissen, dass er dafür Blutabnahmen nach etwa zwei Stunden durchführen soll und nicht knapp nach Verabreichung oder erst nach fünf Stunden.

1 Siehe Tabelle 11.36 Sweetman: „Martindale – The Complete Drug Reference“

Der Analytiker weiß also jetzt, dass er einen sicheren Nachweis im Bereich von 10–60 µg/ml entwickeln muss. Klingt eigentlich sehr einfach: 10–60 ppm, wo doch oft Nachweise im Bereich von 10–60 ppb (10–60 ng/ml) erforderlich sind. Zu diesem Zeitpunkt empfiehlt es sich, die Strukturformel anzusehen und – da ja nur UV- und Fluoreszenzdetektion zur Verfügung stehen – die Löslichkeiten sowie das UV-Spektrum.

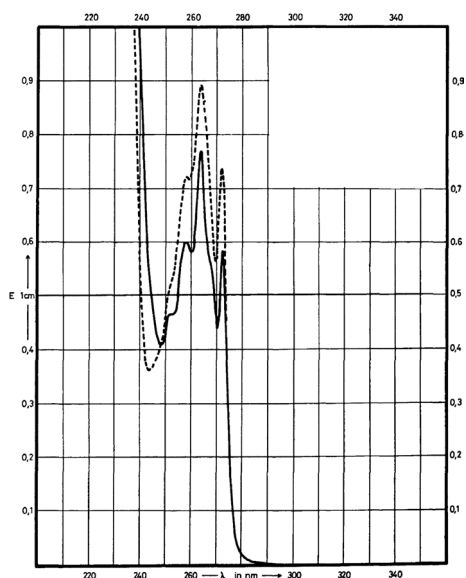
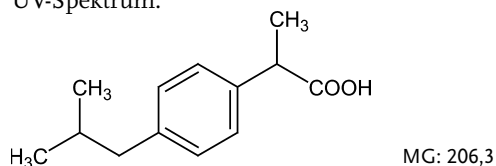


Tabelle 1.1: Ibuprofen – Erklärung zum UV-Spektrum.

| Lösungsmittel Symbol | Methanol — | Wasser - - - - | 0,1 m HCl - - - - - | 0,1 m NaOH |
|-------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|
| Absorptions- maximum | 272 nm 264 nm 258 nm | | | 272 nm 264 nm 258 nm |
| $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ | 11,2 14,5 11,3 | | | 15,4 18,4 15,0 |
| ϵ | 230 300 233 | | | 320 380 310 |

- *Struktur:* Ibuprofen ist eine relativ lipophile Substanz, hat aber eine Carboxyfunktion.
- *Löslichkeit:* Als undissoziierter Stoff im sauren pH-Bereich somit lipophil, als Salz aber vermutlich sehr gut wasserlöslich.
- *UV-Spektrum:* Eine brauchbare Absorption gibt es erst unterhalb von 230 nm. Ob der Stoff fluoresziert, ist so nicht zu erkennen.

Bei der in diesem Buch beschriebenen Vorgehensweise wird ein Analyseverfahren immer ausgehend von der Detektion entwickelt, in diesem Fall also UV-Detektion. Als Faustregel gilt, dass man bei einem $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Wert von größer 200 (ϵ ca. 5000 je nach Molekulargewicht) etwa 1 ng Substanz als Peak noch gut sehen kann. Das gilt also auch für Ibuprofen bei einer Wellenlänge von unter 230 nm (der Wert in der Tabelle ist beim erkennbaren Maximum bei ca. 260 nm und nicht bei der maximalen Absorption bei < 240 nm).

Hinweis: Im Plasma natürlich vorkommende Stoffe (= endogene Stoffe) enthalten diverse funktionelle Gruppen und konjugierte Doppelbindungen. Deshalb hat sich in der Praxis gezeigt: Je kürzer man die Wellenlänge im UV wählt, desto mehr Störstoffe sind aus dem Plasma zu erwarten.

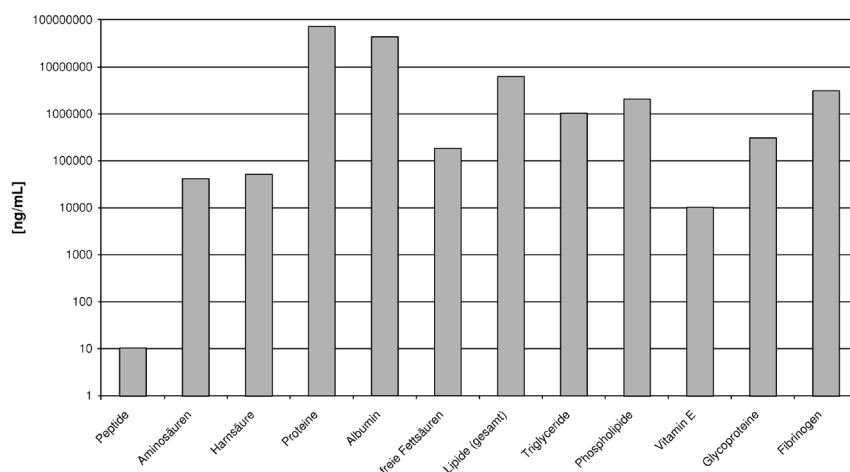
Zurück zum Ibuprofen: Wenn es also gilt, noch ca. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Plasma nachzuweisen und 1 ng als Peak bei 220–230 nm noch zu sehen ist, müssten wir nur 0,1 μl Plasma auf die Säule aufbringen. Ein Kinderspiel?

Wenden wir uns nun der HPLC-Trennung zu. Der naheliegende Ansatz ist eine „reversed-phase(RP)“-Trennung (C8 oder C18). Um Ibuprofen zu eluieren, braucht man schon höhere Anteile von Methanol oder Acetonitril (ACN) in der mobilen Phase. Somit kann man auf keinen Fall Plasma direkt injizieren, weil die Plasmaproteine durch den höheren Organikanteil im Elutionsmittel sofort auf der Säule ausfallen würden. Deshalb ist nicht nur eine Plasmaverdünnung (beispielsweise 0,1 μl Plasma mit Wasser 1:20), sondern auch eine Probenvorbereitung notwendig.

Die Plasmainhaltsstoffe sind in einer weiteren Hinsicht problematisch: Bei 220–230 nm absorbiert ein Großteil von ihnen relativ gut. Plasma enthält alleine etwa 8% (= 80000 ppm) Plasmaproteine (der Großteil davon als Albumin). Damit ist klar, dass zuerst sehr viele mögliche Störstoffe entfernt werden müssen, bevor ein Nachweis gelingen kann. Eine gute HPLC-Trennung kann dabei nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Da Ibuprofen als freie Säure relativ lipophil ist, bietet sich eine flüssig-flüssig-Verteilung (FFV) mit einem wasserunlöslichen mittelpolaren organischen Lösungsmittel wie Diisopropylether, Chloroform oder Gemischen von Hexan/Heptan mit mittelpolaren Lösungsmitteln an (siehe Diskussion Extraktionsmittel in Abschnitt 3.3.1.2). Ethylacetat z. B. wäre in der Handhabung ganz angenehm, nimmt aber mehrere Prozent wässrige Phase auf, und kann daher nur im Gemisch mit Aliphaten verwendet werden, um die Wasseraufnahme deutlich zu reduzieren.

Eine recht effiziente Vorreinigung kann also folgendermaßen erreicht werden: Nach Ansäuern des Plasmas mit z. B. Phosphorsäure und intensivem Mischen mit organischem Lösungsmittel wird zentrifugiert und die organische Phase, die das Ibuprofen enthält, anschließend abgehoben.



Konzentration ausgewählter Stoffe in Plasma (Achtung: Konzentration in 10er Schritten!)

Mit dieser Extraktion lassen sich nicht nur alle hydrophilen Stoffe eliminieren (also auch fast alle Proteine, Peptide und Aminosäuren), sondern auch alle lipophilen basischen Stoffe, weil diese als Salze in der wässrigen Phase bleiben.

Mit dem Ibuprofen werden somit alle lipophilen Säuren und alle lipophilen Neutralstoffe extrahiert. Sollte diese Vorreinigung nicht ausreichen – das Chromatogramm offenbart zu viele Störstoffe im Elutionsbereich von Ibuprofen –, so kann man noch einen zweiten Extraktionsschritt anschließen: eine Rückextraktion. Dabei wird das organische Lösungsmittel nicht abgedampft, sondern mit einem wässrigen basischen Puffer versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Nun sind alle Säuren – auch Ibuprofen – als Salze in die wässrige Phase gewandert und können unter bestimmten Umständen in dieser Phase gelöst injiziert werden. Mit diesem zweiten Extraktionsschritt können alle lipophilen Neutralstoffe entfernt werden, sie verbleiben im organischen Lösungsmittel. Nach so einer Vorreinigung kann man dann Ibuprofen sehr einfach und auch selektiv mit HPLC-UV bei 220–230 nm bis 10 µg/ml Plasma nachweisen.

Mit Fluoreszenzdetektoren, die noch genug Lichtintensität bei 220 nm haben, kann sogar eine noch selektivere Detektion erreicht werden².

Eine alternative Probenvorbereitung wäre eine Festphasenextraktion: Das leicht angesäuerte Plasma wird (bevorzugt off-line) auf C8- oder C18-Material gegeben, auf dem Ibuprofen gut hängen bleibt. Anschließend wird die Säule mit Methanol oder Acetonitril eluiert. Allerdings befinden sich im Eluat nicht nur Ibuprofen, sondern natürlich auch alle lipophileren Säuren, alle lipophileren Neutralstoffe und auch teilweise lipophilere Basen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die *Probenvorbereitung*, den man nie außer Acht lassen darf, ist die *Proteinbindung*: Die meisten Medikamente wei-

2 Eur. J. Clin. Pharmacol. 48 (1995), 505–511 „Comparison of the bioavailability of dexibuprofen administered alone or as part of racemic ibuprofen“

sen eine mehr oder weniger starke Proteinbindung auf, meist in der Art einer Nernstschen Verteilung (also eines Lipophiliegradienten). Diese Proteinbindung wird üblicherweise leicht und sehr schnell gelöst bei flüssig-flüssig- oder bei Festphasenextraktion (gelegentlich etwas schlechter). Ibuprofen ist zu mehr als 99% proteingebunden, was aber bei oben erwähntem Probenvorbereitungsvorschlag keine Rolle spielt, da die Proteinbindung dabei gut aufgeht (siehe Praxistipp 6: „Proteinbindung“).

Zum Thema Nachweis und Proteinbindung: Wir Analytiker können in fast allen Fällen nur die Gesamtkonzentration eines Medikaments im Plasma/Serum nachweisen. Da die Proteinbindung eine sehr labile Größe ist, die durch geringfügige Änderungen des Plasmas (Verdünnung, pH-Wert-Änderung, Lösungsmittelzusatz) dramatisch verändert werden kann, müssen wir darauf achten, Bedingungen zu finden, die die sichere Bestimmung von freier *und* proteingebundener Substanz gewährleisten. Würde man beispielsweise die Proteine durch Fällung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure entfernen wollen, so würde auch ein Großteil des Ibuprofens (an den Proteinen gebunden oder eingeschlossen) mitgefällt werden. Die Bestimmung würde somit zu völlig falschen (viel zu niedrigen) Ergebnissen führen. Bei einer Proteinfällung mit Acetonitril oder Methanol dagegen löst sich die Proteinbindung üblicherweise, bevor die Proteine gefällt werden, und ist somit, was die Richtigkeit der Ergebnisse betrifft, meist unbedenklich.

Zur HPLC-Trennung ist nur zu sagen, dass die mobile Phase natürlich sauer sein muss, um das Ibuprofen als undissoziiertes Molekül zu chromatografieren. Es sollte üblicherweise ein k' -Wert von 2–5 angestrebt werden. Vermeiden Sie bitte den Fehler, in Retentionszeit statt k' -Werten zu denken: Jeder Säulentyp hat unterschiedliche Totzeiten – abhängig von Säulenlänge, Säulendurchmesser und Eluentenfluss.

Bleibt die Frage, ob isokratisch chromatografiert werden soll oder mit Gradienten. Die Entscheidung hängt von zahlreichen Umständen ab und soll in späteren Kapiteln (z. B. 4.1.1) intensiver diskutiert werden.

Praxistipp 1: Plasma oder Serum? Wenn wir es uns frei aussuchen können, dann nehmen wir entweder Serum, das lange genug vor der Zentrifugation stehen konnte (damit die Gerinnung weitgehend abgeschlossen ist), oder Plasma, das wirklich intensiv zentrifugiert wurde. Andernfalls besteht immer das Risiko von – wie wir es bezeichnen – „Fibrinklumpen“ oder „Fibrinfäden“. Diese können beim Pipettieren leicht die Pipetten verstopfen und zu Verlusten (somit zu geringeren Volumina) beim Umfüllen führen. Natürlich kann man die Serum- oder Plasmaproben nachzentrifugieren, das bedeutet aber einen Arbeitsschritt mehr und ist nur hilfreich, wenn relativ stark zentrifugiert werden kann. Die Tatsache, dass man bis zum Zentrifugieren des Vollbluts etwas warten sollte, kann gegen die Verwendung von Serum sprechen: Zum einen kann das den Ablauf in der Klinik stören, zum anderen gibt es einige Stoffe, deren Bestimmung ein schnelles Zentrifugieren (teilweise bei 4 °C) und ein zügiges Einfrieren erfordert, damit sie nicht teilweise zerfallen. Generell gilt: Der Analytiker ist verpflichtet, über Stabilitätstests festzulegen, wie (Zeit, Antikoagulans, stabilisierende Zusätze) das Plasma/Serum gewonnen werden muss und bei welcher Temperatur es gelagert werden soll.

1.2

Zweite Problemstellung: Bestimmung von Tryptophan in Harn

Gewisse Therapien mit Medikamenten oder Krankheitszustände verändern die Ausscheidung bestimmter hydrophiler Säuren im Harn. Nehmen wir nun an, es soll für Tryptophan ein Nachweis aus Harn erarbeitet werden.

Nach unserem bewährten Konzept beginnen wir wieder mit den Fragen nach der

- gewünschten Nachweisgrenze und
- Verfügbarkeit von eigenen Geräten.

Für unser Beispiel nehmen wir an, dass eine Nachweisgrenze von 1 µg/ml Harn gefordert sei und dass zwar ein HPLC-MS-Gerät (single quadrupol) im Labor existiert, dieses aber für andere wichtige Aufgabenstellungen fast dauernd blockiert ist. Sollte sich diese Themenstellung (Tryptophannachweis aus Harn) bewähren, würde es denkbar werden, auch auf dieses Gerät zuzugreifen. Vorläufig haben Sie aber nur HPLC-UV (variable Wellenlänge/DAD) sowie einen alten elektrochemischen Detektor zur Verfügung.

Als Nächstes betrachten wir Struktur, Löslichkeiten, UV-Spektrum bzw. elektrochemisches Verhalten sowie Massenspektrometrie(MS)-Tauglichkeit (für die Zukunft) von Tryptophan.

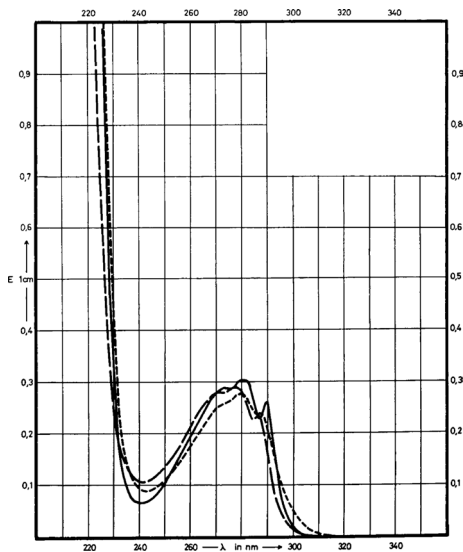
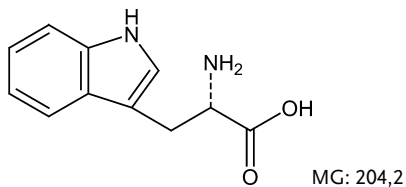


Tabelle 1.2: Tryptophan – Erklärung zum UV-Spektrum.

| Lösungsmittel Symbol | Methanol ——— | Wasser - - - - - | 0,1 m HCl - - - - - | 0,1 m NaOH |
|-------------------------|------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| Absorptions- maximum | 290 nm 280 nm | | 286 nm 278 nm | 288 nm 280 nm |
| $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ | 259 303 | | 234 290 | 238 275 |
| ϵ | 5290 6190 | | 4780 5920 | 4860 5620 |

- *Struktur*: Tryptophan ist ein eindeutig amphoterer Molekül – also kaum extrahierbar – mit gewissen lipophilen Teilstrukturen – also eventuell auf C8/C18-Festphase extrahierbar. Es hat zwei wesentliche funktionelle Gruppen: $-\text{NH}_2$ und $-\text{COOH}$ ($-\text{NH}-$ im Fünfring eher untergeordnet).
- *Löslichkeit*: generell gut in Wasser, Alkoholen und Acetonitril.
- *UV-Spektrum*: eine gute Absorption bei 280 nm (und damit keine Probleme bei Gradienten mit Acetonitril oder Methanol).
- *Elektrochemie*: relativ gute Oxidierbarkeit der N–H-Bindung im Fünfring (bei Literaturdurchsicht findet man bei oxidierbaren Molekülen auch gute Angaben zu Tryptophan).
- *MS*: voraussichtlich (nötigenfalls fragen Sie einen Kollegen mit mehr Erfahrung in der MS) gute Ionisierbarkeit bei positiver Ionisierung.

Gegen eine massenspektrometrische Bestimmung spricht – neben der Tatsache, dass das Gerät vorerst nicht verfügbar ist –, dass Ionisierung und Detektion mit Massenspektrometrie üblicherweise deutlich instabilere Ergebnisse liefern als die UV-Spektrometrie. Eine recht gute Kompensation kann mit einem isotope markierten internen Standard erreicht werden, der aber relativ teuer und oft nicht verfügbar ist (siehe auch Abschnitt 2.3.6).

Gegen elektrochemische Detektion spricht, dass nur mehr wenige Analytiker heutzutage Erfahrung mit diesem Detektor haben. Die Gerätehandhabung ist deutlich komplizierter als bei UV-Detektoren, aber die Selektivität ist teilweise ganz hervorragend. Außerdem ist er im Vergleich zu einem Massenspektrometer ein sehr preisgünstiger Detektor.

Wir werden also versuchen, das Problem mit HPLC-UV zu lösen. Bei 280 nm hat Tryptophan einen $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ von 303, d. h. 1 ng Substanz ist als Peak leicht nachzuweisen und das bei einer deutlich selektiveren Wellenlänge als bei Ibuprofen. Wir müssten also 1 μl Harn oder den Stoff aus 1 μl Harn auf die Säule bringen.

Welche Säule bietet sich an? Da das Tryptophan schon eine gewisse Lipophilie hat, können C8/C18-Säulen mit 5–15% Methanol oder Acetonitril verwendet werden. Nehmen Sie dabei sicherheitshalber eine AQ-Säule (verschiedene Hersteller bieten Reversed-Phase-Materialien an, die auch längere Zeit rein wässrig gefah-

ren werden können, ohne dass die Trennung wegen Mangels an organischem Lösungsmittel zusammenbricht). Man könnte auch Ionentauschersäulen verwenden, wobei Kationentauscher (Bindung des Tryptophans an der NH_2 -Gruppe) den Anionentauschern (Bindung des Tryptophans an der COOH -Gruppe) vorzuziehen sind, was unsere Erfahrung gezeigt hat. Da aber die Erfahrung mit Ionentauschern in analytischen Labors oft relativ gering ist, empfiehlt sich eher der Gebrauch von C8/C18-Säulen.

Zur Probenvorbereitung gibt es kaum Möglichkeiten (nur starke RP-Materialien wie ENV+ oder auch Ionentauscher sind geeignet), daher bietet es sich an, den Harn direkt zu injizieren.

Generell ist bei Harn (besonders bei tiefgefrorenem Harn) darauf zu achten, dass alle Bestandteile wieder in Lösung gebracht werden (oft hilft nur Erwärmung auf 37°C und Schütteln oder Ultraschall). Wichtig ist immer, eine repräsentative Probe zu nehmen (was bei Plasma deutlich einfacher ist!). Damit nicht wieder Stoffe ausfallen, könnte in diesem Fall $50\ \mu\text{l}$ Harn mit $250\ \mu\text{l}$ Wasser verdünnt werden (eventuell mit 5% methanolischem Wasser, damit auch lipophilere Stoffe leichter in Lösung bleiben). Von dieser Probe könnte man dann $10\text{--}20\ \mu\text{l}$ auf die HPLC-Säule injizieren.

Erfahrungsgemäß kann es dabei zwei Probleme geben:

1. Wenn ein selektiver Nachweis isokratisch gleich auf Anhieb gelingt (d. h. es tritt bei guter Trennleistung ein schmaler Peak auf, der bei Zusatz von ähnlichen Mengen Tryptophan als Reinstofflösung nur höher wird und nicht breiter), dann wird vermutlich im nächsten oder spätestens im fünften Chromatogramm nach Injektion von Harnproben das Problem auftreten, dass breite Signale von spät eluierten Stoffen aus den vorherigen Injektionen den Nachweis stören. Dagegen kann man vorgehen, indem ein Gradientensystem verwendet wird und nach der isokratischen Trennung für $2\text{--}3\ \text{min}$ auf $80\text{--}90\%$ organischen Anteil umgeschaltet wird, damit später eluierende Störstoffe schnell von der Säule gespült werden.
2. Wenn die Trennung unselektiv ist (Peak im Chromatogramm der Reinstofflösung ist schmaler als der im Chromatogramm von Harn und die Zudotierung des Reinstoffs zeigt deutlich, dass nur ein Teil des Peaks im Harn-Chromatogramm größer wird), sollten Sie die Trennung mit RP-Säulen verschiedener Hersteller wiederholen, um eine bessere Selektivität zu erreichen.

Eine alternative und häufig bessere Strategie ist es, eine Ionenpaarchromatografie durchzuführen. Sie haben bei C8/C18-Materialien vermutlich schon mit Puffersystemen oder Trifluoressigsäure (TFA) in der mobilen Phase arbeiten müssen, um eine gute Peakform zu erhalten. Im vorliegenden Fall kann beispielsweise Pentansulfonsäure (ca. $10\ \text{mM}$) in $10\text{--}20\%$ Acetonitril oder Methanol in der mobilen Phase verwendet werden (für das Lösen von Pentansulfonsäure und für die Elution sind gewisse Anteile an organischem Lösungsmittel erforderlich). Die Pentansulfonsäure bildet mit Tryptophan (über die NH_2 -Gruppe) ein Ionenpaar, das zur Elution einen deutlich höheren organischen Anteil erfordert als Tryptophan

allein. Bestehen die Störstoffe allein aus organischen Säuren aus dem Harn (was wahrscheinlich ist), dann eluieren diese nun viel früher und stören den Nachweis von Tryptophan nicht mehr. Vermutlich ist aber zusätzlich ein analoger Auswaschschritt für spät eluierende Störstoffe mit einem Gradienten erforderlich.

1.3

Dritte Problemstellung: Bestimmung von Paclitaxel in Gewebe

Es kommt durchaus vor, dass man bestimmte Stoffe aus Geweben nachweisen soll. An dieser Stelle wird vorausgesetzt, dass der Analytiker mit Plasma und Harn als Matrix gut umgehen kann, aber mit Gewebe noch keine Erfahrung hat.

Die entscheidenden Faktoren beim Nachweis aus Gewebe sind

- die Homogenisierung des Gewebes und
- die Erreichung einer hohen Wiederfindungsrate des gesuchten Stoffs.

Praxistipp 2: Gewebsaufarbeitung Da bei uns schon sehr viele verschiedene Gewebstypen analysiert wurden, sollen an dieser Stelle ein paar allgemeine Regeln angerissen werden (siehe auch Abschnitt 11.19).

Es ist zwischen weichen nahezu faserfreien Geweben und anderen zu unterscheiden. Weiche Gewebe, wie Gehirn oder meist auch Leber, können mit einem Ultraturrax sehr gut homogenisiert werden. Dabei geht man folgendermaßen vor: Nach Zerschneiden des aufgetauten Gewebes (eine repräsentative Probe zu nehmen, ist nicht immer leicht), wird ein Teil in ein Zentrifugenglas eingewogen und beispielsweise mit 2–3 Teilen Äthanol, wässrigem Äthanol oder Aceton (je nach Stoff und Matrix) versetzt und dann mit dem Ultraturrax innerhalb von 30–60 s feinst homogenisiert. Von diesem Brei oder dieser Suspension wird dann ein homogener Teil eingewogen, mehrfach mit Wasser oder bestimmten hydrophilen Lösungsmitteln verdünnt, sodass ca. 10% Proteinanteil resultieren (ist dann dem Plasma ähnlich), und dann wie Plasma aufgearbeitet.

Für alle anderen Gewebe empfiehlt sich die Verwendung eines so genannten Disintegrators, dessen Grundprinzip darin besteht, das unter flüssigem Stickstoff gefrorene Gewebe (oder vorher ausgewählte Teile von größeren Geweben) mit einer Stahlkugel oder Ähnlichem innerhalb von ca. 30 s vollständig zu pulverisieren. Es gibt fast kein Gewebe, das so nicht feinst zerstört wird.

Die Wiederfindung bei Gewebe wird, wenn es sich nicht um körpereigene Stoffe handelt, immer in zwei Stufen getestet:

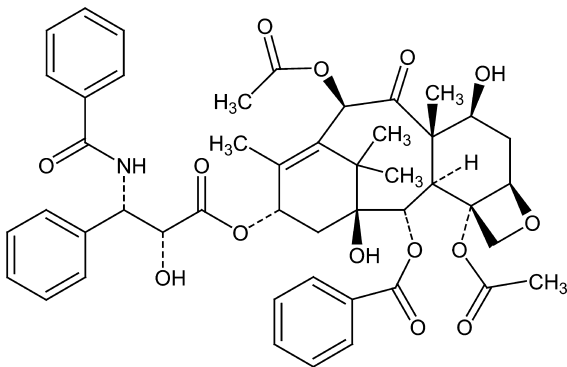
1. Zuerst wird dem Leergewebshomogenat der zu suchende Stoff in ausreichender Konzentration (nicht an der Nachweisgrenze, weil sonst die orientierenden Ergebnisse viel zu sehr schwanken) zudosiert und anschließend bestimmt. Mit den gleichen Vorbereitungsschritten werden entsprechende Lösungen ohne Gewebe vermessen und die Ergebnisse beider Bestimmungen miteinander verglichen. Erst wenn dabei hohe Wiederfindungsraten erreicht wurden (wozu gelegentlich viele verschiedene Vorversuche nötig sind) geht man zur nächsten Stufe über.

2. Falls Realgewebe mit der zu analysierenden Substanz schon vorhanden ist, variiert man die vorher ermittelten Extraktionsbedingungen mit mehreren gleichen Homogenaten dieses Realgewebes, um die maximale Extraktionsausbeute zu erreichen.

Eine Randbemerkung zu diesem Thema: Falls diese Extraktionsversuche nach Zudotierung und auch von Realgewebe (nach Verabreichung *in vivo*) mit HPLC-MS oder MS/MS analysiert werden sollen, muss man gewärtig sein, dass immense Matrixeffekte auftreten können, die die Ionisierung bestimmter Stoffe um bis zu 95 % unterdrücken können.

Ein ganz wichtiger Punkt soll hier nur kurz angesprochen werden: Ungeachtet der Übertragbarkeit der Probenvorbereitung von Plasma auf Gewebe können die Wiederfindungen aus Gewebe völlig anders (also schlechter) sein. Gelegentlich hat sich der Einsatz von diversen Detergentien bei schwieriger Wiederfindung bewährt. Da gibt es nichtionische und ionische Tenside, relativ hydrophile und auch hydrophobe Tenside. Die Anwendung kann Wunder wirken, aber beachten Sie immer, dass man den größeren Teil der Tenside wieder verlieren muss, bevor man die HPLC-Analytik durchführt. Große Tensidmengen beeinflussen nicht nur die HPLC-Trennung, sondern können auch das MS-Signal bis zur Unkenntlichkeit unterdrücken.

Zusammenfassend kann man sagen: Das Ziel in der klinischen Analytik ist letztlich, zu sicheren und richtigen Ergebnissen zu kommen mit Methoden, die relativ schnell von guten Analytikern entwickelt werden können. Dazu soll dieses Buch beitragen.



MG = 853,9

Paclitaxel ist ein mittelpolares Molekül (nähere Details zur gewünschten Nachweisgrenze, Struktur und Löslichkeit siehe 11.14 bzw. im Anhang unter Paclitaxel). Das Gewebe wird in kleine Stücke geschnitten (repräsentative Probe!), tiefgefroren (mit der Stahlkugel des Dismembrators in einem Teflonbehälter in flüssigem Stickstoff, ca. 15 min) und mit einem Dismembrator zertrümmert. Ein kleiner Teil der Probe (5 mg von insgesamt ca. 30 mg) wird mit 100 µl 50%igem Ethanol, 20 µl Triton X100 (5% in Wasser) und 300 µl Wasser versetzt und dann mit 4 ml Diisopropylether extrahiert. Ohne den Ethanolzusatz gibt es oft Probleme hinsichtlich der Löslichkeit der zu analysierenden Stoffe und ohne Triton X100 ist bei bestimmten Geweben die Wiederfindung sehr schlecht.

