

Anwendung einer Festphasenextraktionsmethode für pharmakologische und toxikologische Problemstellungen in komplexen biologischen Matrices

Bernd Herber, Antje Hanes, Jörg Röhrich, Hildegard Spahn-Langguth, Gerold Kauert und Peter Langguth

Einleitung

Bei bestimmten, vor allem tierpharmakokinetischen Fragestellungen, wie z. B. bei der Untersuchung von Gewebeverteilungen im Ganztier, ist es notwendig, die gesuchten Analyten zur Abtrennung endogener Störsubstanzen und zur gleichzeitigen Anreicherung aus komplexen Matrices zu extrahieren. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn bei der entsprechenden Untersuchung auf die Anwendung von radioaktiv markierter Substanz (z. B. ^{14}C , ^3H) verzichtet werden soll (Arbeits-sicherheit, experimenteller Aufwand, Kosten).

Eine toxikologische Notfallanalytik verlangt außerdem - z. B. bei Vorliegen von Mageninhalt - eine schnelle Probenvorbereitung mit der Möglichkeit, ein weites Spektrum in Frage kommender Substanzen zu isolieren. Desweiteren besteht die Notwendigkeit, bei bestimmten forensisch/toxikologischen Fragestellungen die Konzentration von Pharmaka oder Toxinen in Gewebeasservaten bestimmen zu müssen.

Übliche Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren besitzen die Nachteile der aufwendigen Optimierungsarbeit für verschiedene Analyten sowie auch häufig geringer Wiederfindungsraten, die selbst durch Mehrfachextraktion nicht befriedigend erhöht werden können. Im allgemeinen werden bei Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren größere Mengen an organischen Lösungsmitteln benötigt, was sich sowohl nachteilig auf die entstehenden Kosten, die Umwelt, wie auch die Arbeitszeit auswirkt. Insbesondere bei Extraktion aus Gewebehomogenaten wird als weitere Schwierigkeit bei Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren die Bildung von Emulsionen beobachtet, die durch Zentrifugation nicht oder nur sehr schwer wieder aufgetrennt werden können. Die oft beobachtete Koextraktion interferierender Substanzen zwingt häufig zu einer umfangreichen substanzspezifischen Optimierung des entsprechenden Extraktionsverfahrens, das meist nicht auf ein anderes analytisches Prinzip (z. B. Wechsel von GC/MS zu HPLC) übertragbar ist [1, 6].

Zielstellung

Ziel der vorgestellten Arbeit war es daher, eine einfache, schnell durchführbare und robuste Festphasenextraktions-Methode zu entwickeln, die die Isolierung eines breiten Spektrums an basischen Pharmaka (Abb. 1) aus komplexen Matrices, wie Organhomogenaten oder Mageninhalt, mit der anschließenden Anwendung verschiedener analytischer Methoden erlaubt.

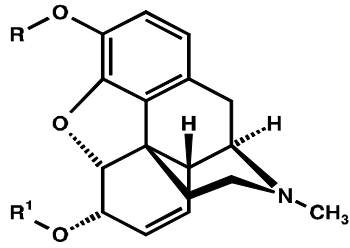
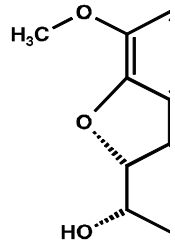
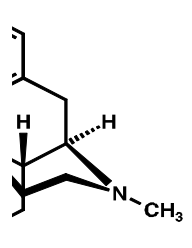
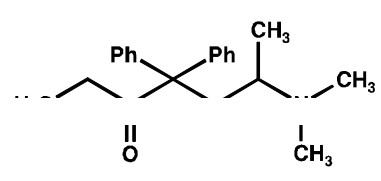
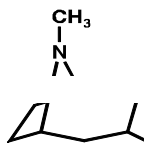
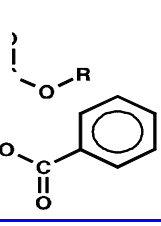
Untersuchte Opiate			
			
Morphin:	R=R ¹ =H	Dihydrocodein	codein
Codein:	R=CH ₃ ; R ¹ =H		
6-Monoacetylmorphin:	R=H; R ¹ =COCH ₃		
Ethylmorphin:	R=C ₂ H ₅ ; R ¹ =H		
Andere untersuchte Opiatagonisten		Untersuchte Ecgonine	
			
R/S-Methadon		Kokain:	R=CH ₃
		Benzoylcocgonin:	R=H

Abb. 1: Strukturformeln der Analyten

Methoden

Vorbereitung der Matrices: Gewebe und Mageninhalt wurden 1:1 (g/g) mit 0,9% NaCl homogenisiert. Bei Anwesenheit von Kokain war der Kochsalzlösung zur Inhibition der vorhandenen Esterasen NaF und Oxalsäure (10 g/l; 2 g/l) zugesetzt [2]. 1,0 g des Homogenates wurden anschließend mit 6 ml eines 0,1M

KH₂PO₄-Puffers (pH 6,0) bei RT homogenisiert (Vortex[®], 10 min geschüttelt und zentrifugiert (5500 min⁻¹, 0 °C, 10 min).

Festphasenextraktion: Die Teilschritte der Festphasenextraktion sind in Abb. 2a und 2b dargestellt.

GC/MS

Die Bestimmung von Morphin, 6-Monoacetylmorphin, Codein, Dihydrocodein, Methadon, Kokain und Benzoyllecgonin aus humanem Lungengewebe und humanem Mageninhalt sowie von Kokain und Benzoyllecgonin aus Rattenhirnge-
227] erfolgte nach Derivatisierung mittels Gaschromatographie und massen-
spektrometrischer Detektion [5].

HPLC:

Der Codeingehalt in Rattenhirngewebe wurde mithilfe einer modifizierten Reversed phase-HPLC-Methode mit fluorimetrischer Detektion ermittelt [4].

Festphasenextraktions- Kartuschen	Bakerbond spe TM Octadecyl C ₁₈ , 3 ml	
1. Vorkonditionierung	2x3 ml Methanol 2x3 ml Wasser bidest.	Flußgeschwindigkeit 1,0 ml/min
2. Probenaufgabe	2x3 ml Zentrifugationsüberstand	0,5 ml/min
3. Säulenwäsche	2x2 ml Wasser 2x2 ml Wasser/Methanol 80:20 (v/v) 1x1 ml 0,1M Essigsäure	1,0 ml/min
4. Säulentrocknung	bei max. Vakuum (10 min) Zentrifugation bei 5500 l/min, 0 °C (10 min)	
5. Elution von Säuren	1x3 ml Dichlormethan/Aceton 1:1 (v/v)	1,0 ml/min
6. Elution der basischen Analyten	1x3 ml Dichlormethan/2-Propanol/ Ammoniak 69:29:2 (v/v/v)	0,5 ml/min
7. Abziehen des Lösungsmittels	bei 60 °C im Vakuum oder bei 70 °C im N ₂ -Strom	

Abb. 2a: Teilschritte der Festphasenextraktion

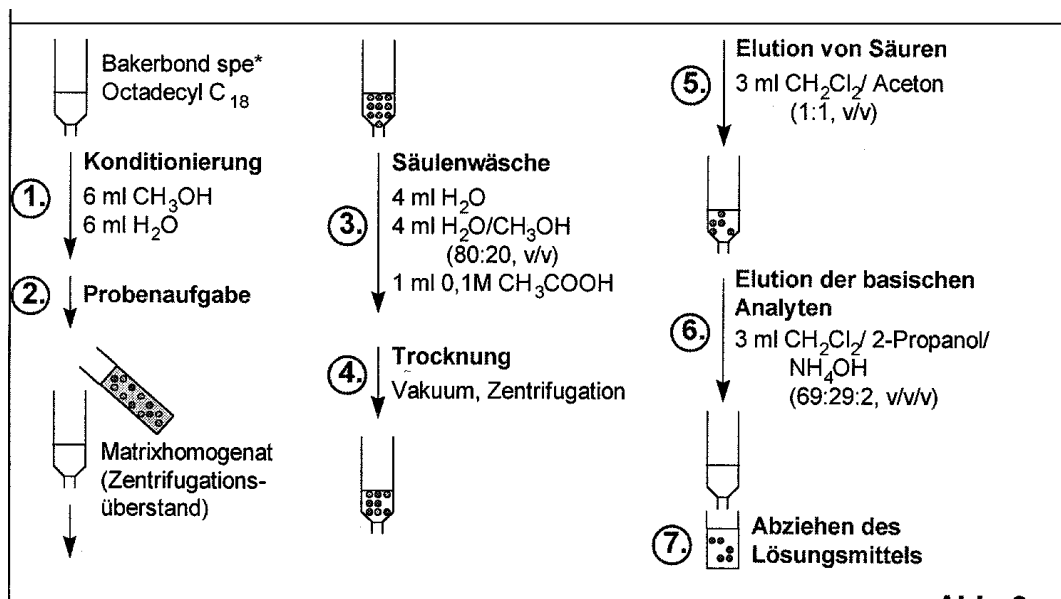


Abb. 2b: Schema der Festphasenextraktion

Ergebnisse:

Im Rahmen von pharmakokinetischen Untersuchungen konnte in Rattenhirnhomogenat mit anschließender HPLC-Trennung und Fluoreszenzdetektion Codein quantitativ bestimmt werden. Die Eichung wurde in einem Bereich zwischen 10 und 400 ng/g durchgeführt. Die Wiederfindung der hier vorgestellten Festphasenextraktionsmethode lag bei > 98%, im Gegensatz zu 60% bei einer bereits optimierten Flüssig/Flüssig-Extraktion. Als interner Standard diente bei diesem Verfahren Ethylmorphin (s. Abb. 3).

Relative Intensität

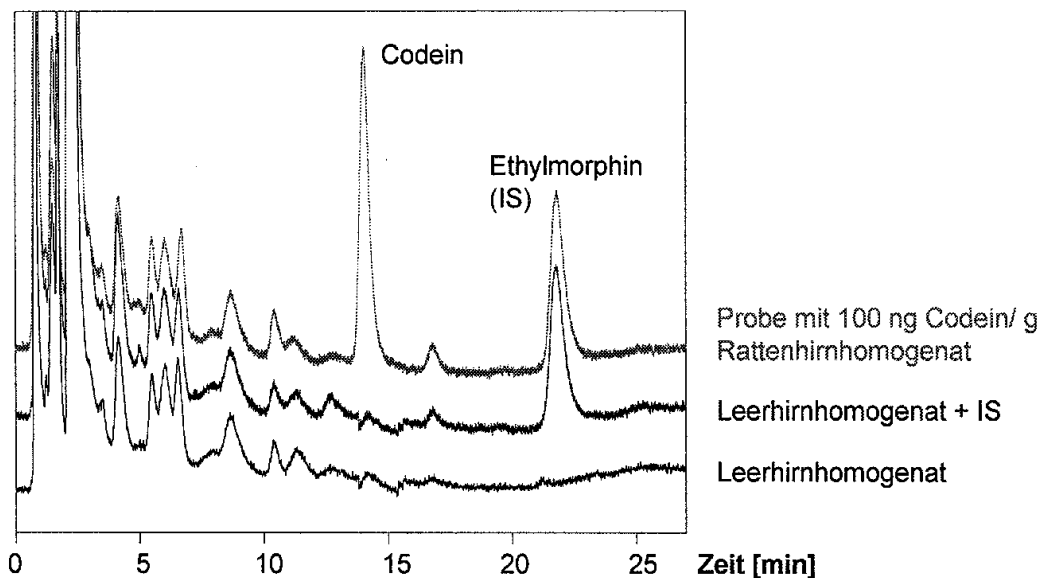
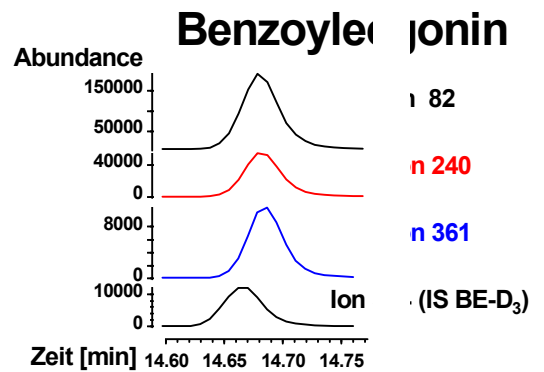
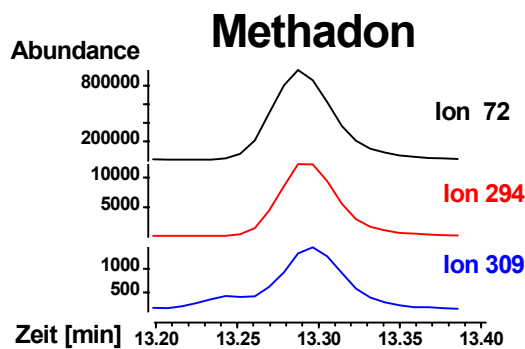
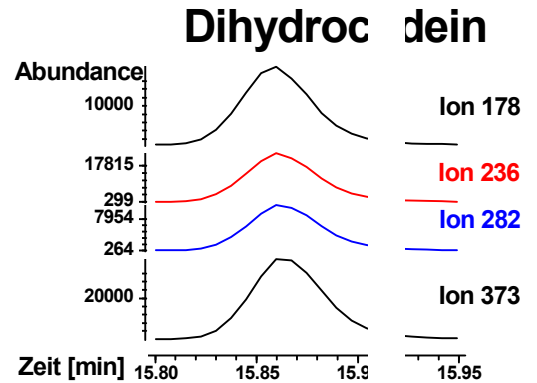
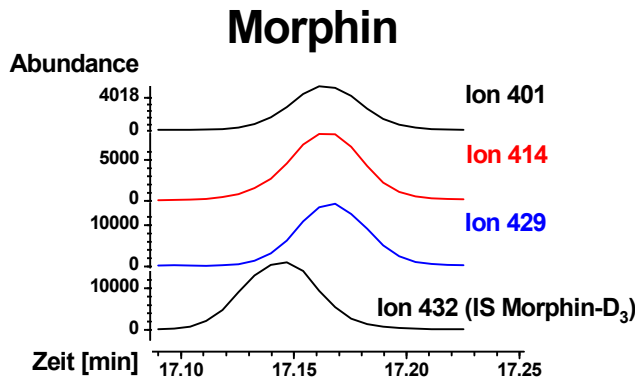


Abb. 3: HPLC-Kurven der Hirnhomogenisate zur Codeinbestimmung

In einer weiteren pharmakokinetischen Studie wurde der Kokain- bzw. Benzoylcegoningehalt in Rattenhirnhomogenat untersucht [Herber et al., 1997]. Die hierbei erzielten Wiederfindungsraten lagen für beide Substanzen bei nahe 100%. Eine Kalibrierung war sowohl für Kokain als auch für Benzoylcegonin zwischen 10 und 1000 ng/g möglich. Als analytische Methode wurde ein GC-Verfahren mit MS-Detektion verwendet (Abb. 4).

Als Anwendung für forensisch/toxikologische Fragestellungen wurde das Extraktionsverfahren auf humanes Lungengewebe und Mageninhalt übertragen. Auch hier zeigte sich die Leistungsfähigkeit der Methode. Nach Anwendung der Festphasenextraktion konnten mittels GC/MS Kokain und gängige Opiate (Abb. 1) nachgewiesen werden, wobei die Bestimmungsgrenzen unter 10 ng/g Untersuchungsmaterial lagen (Abb. 4).

a) aus humanem Lungengewebe



b) aus Rattengirngewebe

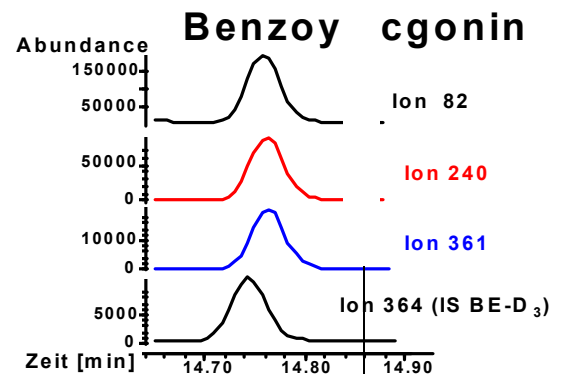
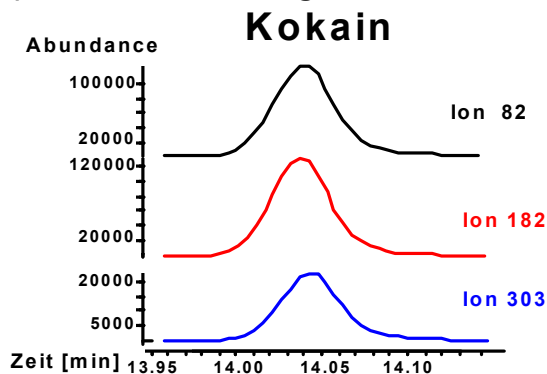


Abb. 4: Charakteristische Einzelionenchromatogramme bei der GC/MS-Analyse

Schlußfolgerung

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Festphasenextraktionsmethode war es möglich, mit vergleichsweise geringem Aufwand nahezu quantitative Extraktionsausbeuten für verschiedene basische Pharmaka bzw. ihre Metabolite aus komplexen Matrices (Gewebehomogenate, Mageninhalt) zu erreichen. Das Ver-

fahren erwies sich in Verbindung mit unterschiedlichen analytischen Methoden (HPLC mit Fluoreszenzdetektion, GC mit MS-Detektion) als gut anwendbar.

Literatur:

- [1] M. Baliková, J. Vercerková: High-performance liquid chromatographic confirmation of cocaine and benzoylecgonine in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening. *J. Chromat. Biomed. Appl.* 656 (1994) 267-273.
- [2] R. C. Baselt, D. Yoshikawa, J. Chang, J. Li: Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes. *J. For. Sci.* 38/4 (1993) 935-937.
- [3] B. Herber, H. Spahn-Langguth, J. Röhrich, G. Kauert, P. Langguth: Distribution of i.p. and nasal cocaine into the CNS of rats: Increased tissue-to-blood ratios after application on the nasal mucosa. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355(Suppl.), R8 (1997).
- [4] S. S. Mohammed, M. Butschkau, H. Derendorf: A reversed phase liquid chromatographic method for the determination of codeine in biological fluids with applications. *J. Liquid Chromat.* 16 (1993) 2325-2334.
- [5] J. Röhrich, K. Schmidt, G. Kauert: GTFCH-Workshop 1996 (Frankfurt/Main, 10./11. Oktober 1996)
- [6] J. T. Stewart, T. S. Reeves, I. L. Honigberg: A comparison of solid-phase extraction techniques for assay of drugs in aqueous and human plasma samples. *Anal. Lett.* 17/B16 (1984) 1811-1826.

Danksagung:

Wir danken der Doktor-Robert-Pfleger-Stiftung, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie dem Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, für ihre finanzielle Unterstützung.

Bernd Herber, Antje Hanses
Pharmakologisches Institut für
Naturwissenschaftler
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt/Main
Marie-Curie-Str. 9
D-60439 Frankfurt

Dr. Jörg Röhrich, Prof. Dr. Gerold Kauert
Zentrum der Rechtsmedizin
Universitätsklinikum der J.W.G.-Universität
Frankfurt/M.
Kennedyallee 104
D-60596 Frankfurt

Prof. Dr. Hildegard Spahn-Langguth
Institut für Pharmazeutische Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wolfgang-Langenbeck-Str. 4
D-06120 Halle/Saale

Priv.-Doz. Dr. Peter Langguth
ASTRA HÄSSLE AB
S-43183 Mölndal