

Empfehlungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) zur Durchführung von Analysen mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD)

Bearbeitet von F. Pragst unter Mitwirkung des Arbeitskreises Qualitätssicherung der GTFCh

Genehmigt vom Vorstand der GTFCh am 04.06.2004

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) gehört zu den am häufigsten in forensisch-toxikologischen Laboratorien zur Identifizierung und semiquantitativen oder quantitativen Bestimmung von toxischen Substanzen oder deren Metaboliten aus Blut (Serum, Plasma), Urin, Mageninhalt, Organproben oder anderen Asservaten angewendeten Methoden. Teilschritte sind die Abtrennung oder Anreicherung der Analyte durch geeignete Probenvorbereitung, Auftrennung durch chromatographische Trennung auf der HPLC-Säule, Identifizierung auf der Basis von UV-Spektrum und Retentionsparameter sowie Quantifizierung mit Hilfe der chromatographischen Peakflächen. Die chromatographische Trennung kann dabei isokratisch oder durch einen Gradienten der mobilen Phase erfolgen.

Eine Hauptanwendung ist der Einsatz in der systematischen toxikologischen Analyse (systematisches Screening auf toxische Substanzen). Etwa 90 % aller toxikologisch relevanten Verbindungen besitzen eine UV-Absorption im zugänglichen Wellenlängenbereich oberhalb 195 nm und können daher prinzipiell durch die Methode erfaßt werden. Die Zahl der tatsächlich im therapeutischen oder toxischen Konzentrationsbereich sicher nachweisbaren Wirkstoffe kann allerdings bei extrem niedrigen Konzentrationen oder speziellen Anforderungen an die Probenaufbereitung und chromatographische Trennung im Screening-Verfahren mehr oder weniger eingeschränkt sein.

1. Qualifizierung des Personals

Die Bearbeiter müssen mit den theoretischen Grundlagen und den praktischen Besonderheiten der Hochleistungs-Flüssigchromatographie und der UV-Spektroskopie organischer Verbindungen sowie der Funktionsweise der verwendeten Geräte vertraut sein. Insbesondere müssen sie die möglichen Fehlerquellen und Wege zu deren Beseitigung kennen. Eine sehr nützliche Übersicht hierzu wurde von V. R. Meyer publiziert [1].

Die Auswertung von HPLC-DAD-Chromatogrammen zur Wirkstoffidentifizierung im Rahmen der systematischen toxikologischen Analyse darf darüber hinaus nicht schematisch erfolgen und sollte von qualifizierten Mitarbeitern mit analytischen und toxikologischen Kenntnissen vorgenommen oder durch diese kontrolliert werden, die die Möglichkeiten und Grenzen der Methode berücksichtigen und das Resultat im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Methoden und der jeweiligen Aufgabenstellung kritisch würdigen können.

2. Regelmäßige Prüfung der HPLC-DAD-Anlage auf Funktionstüchtigkeit

Bei Einsatz zur systematischen toxikologischen Analyse ist die volle Funktionstüchtigkeit aller Bestandteile der HPLC-DAD-Anlage zu Beginn jedes Arbeitstages durch Messung einer geeigneten Testlösung zu überprüfen. Die Lösung sollte so zusammengesetzt sein, dass das erhaltene Chromatogramm Aufschluss über die Richtigkeit folgender Parameter gestattet:

- Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (HPLC-Pumpe)
- Injiziertes Volumen der Probelösung (Autoinjektor)

- Totzeit und chromatographisches Trennvermögen (HPLC-Säule)
- Durchlässigkeit der mobilen Phase im gesamten Wellenlängenbereich (mobile Phase und Entgasung)
- Wellenlängenzuordnung (DAD)
- Spektroskopisches Auflösungsvermögen (DAD)

Eine solche Kontrolllösung kann z. B. in saurer isokratischer mobiler Phase (Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 = 37 : 63 v/v) und bei Verwendung einer RP8-Säule wie folgt zusammengesetzt sein (Injektion 10 µl) [2]:

- *Histamindihydrochlorid (0,1 mg/ml)* zur Kontrolle der Totzeit
- *Coffein (0,1 mg/ml)* zur Kontrolle der Peakfläche
- *5-p-Methylphenyl-5-phenylhydantoin (MPPH; 0,1 mg/ml)* als Retentionszeit-Standard
- *Benzol (1 mg/ml, Zugabe von 11,4 µl pro 10 ml Testlösung mittels Mikroliterspritze)* zur Kontrolle der Wellenlängen-Richtigkeit und des spektralen Auflösungsvermögens des Detektors.*

Die Testchromatogramme sind aufzubewahren und bezüglich folgender Parameter auszuwerten, die in ein Logbuch eingetragen und mit Sollwerten verglichen werden:

- Retentionszeiten der Peaks (täglich)
- Halbwertsbreite und Symmetrie der Peaks (wöchentlich)
- Übereinstimmung der UV-Spektren mit den Sollspektren (Spektrenüberlagerung, Similarity-Index > 0,999, wöchentlich)
- Richtigkeit der λ_{\max} -Werte (wöchentlich). Die vier stärksten Schwingungsbanden des Benzols sollten bei 242-243 nm, 247-248 nm, 253-254 nm und 259-260 nm liegen
- Auflösung der Schwingungsstruktur der Benzolbanden (wöchentlich). Die Feinstruktur des Spektrums muss deutlich ausgeprägt sein. Der Extinktionsquotient E_{258}/E_{254} sollte > 2 betragen. Dieses wird durch ältere Detektoren häufig nicht erreicht. Entscheidend ist hier gleichbleibendes Auflösungsvermögen.
- Rauschpegel im gesamten Wellenlängenbereich bei hoher Empfindlichkeit. Hierzu wird ein Spektrum an einer peakfreien Stelle des Chromatogramms, bei z. B. 1 mAbs./Vollausschlag bewertet (1 mAbs. = 0,001 Extinktionseinheiten). Das Rauschen sollte im gesamten Wellenlängenbereich < 0,05 mAbs. sein.

Im Falle der Gradientenelution kann eine Funktionskontrolle analog mit Testlösungen basischer und saurer Wirkstoffe nach einem Verfahren von Bogusz und Erkens [3] erfolgen. Bei Abweichungen müssen die Fehlerquellen umgehend beseitigt werden.

Wird die HPLC-DAD-Anlage nur zur Quantifizierung im direkten Vergleich mit Standardlösungen herangezogen, so reicht es aus, folgende Parameter zu Beginn jeder Analysenserie zu überprüfen:

- Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (HPLC-Pumpe)
- Injiziertes Volumen der Probelösung (Autoinjektor)
- chromatographisches Trennvermögen (HPLC-Säule)

Dazu kann ein Substanzgemisch der zu bestimmenden Substanzen verwendet werden. Die Substanztrennung ist zu kontrollieren und die Retentionszeiten und Peakflächen sind zu protokollieren.

* Benzol wurde trotz seiner Toxizität wegen der ausgeprägten Schwingungsstruktur der längstwelligen aromatischen Absorptionsbande gewählt. Eine Gefährdung ist bei den eingesetzten Mengen nicht zu befürchten.

Die HPLC-DAD-Anlage ist regelmäßig entsprechend den Vorgaben des Herstellers zu warten. In diesem Zusammenhang wird unbedingt eine Wellenlängenkalibrierung und die Prüfung der Lampenenergie des DAD durchgeführt.

Die verwendete mobile Phase muß in ihrer Zusammensetzung konstant gehalten werden. Bei jedem Ansatz ist insbesondere der pH-Wert durch pH-Meter gewissenhaft zu kontrollieren und einzustellen, da die UV-Spektren hiervon erheblich beeinflußt werden.

3. Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung werden Methoden der Flüssig-flüssig- oder Festphasenextraktion sowie der Proteinfällung angewendet. Die Vorschriften sollen reproduzierbare Ergebnisse bei hohen Wiederfindungsraten (möglichst über 50 %) liefern. Alle Reagenzien, Probenentnahmegefäße usw. müssen auf Störsignale geprüft werden. Regelmäßig auftretende matrixbedingte Störsignale (körpereigene Substanzen, Fäulnis- und Abbauprodukte) sind so weit als möglich zu beseitigen, da sie nachzuweisende Analyte überdecken könnten.

Die Suchanalyse sollte ohne Standardzusätze vorgenommen, um evtl. auftretende Überlagerung mit Probenpeaks zu vermeiden.

Bei gezielter Analyse auf häufig nachzuweisende oder zu bestimmende Wirkstoffe oder Wirkstoffgruppen kann zu Beginn der Aufarbeitung ein innerer Standard mit möglichst ähnlicher chemischer Struktur, (pK-Wert, Lipophilie) aber deutlich unterschiedlicher Retentionszeit zugesetzt werden, der in der ursprünglichen Probe nicht vorkommen kann.

4. Identifizierung von Wirkstoffen und Metaboliten

Die Identifizierung erfolgt durch das UV-Spektrum und die Retentionszeit bzw. einen davon abgeleiteten geeigneten Retentionsparameter. Vor Anwendung der Bibliothekssuche muß jeder Peak durch die von der DAD-Software gebotenen Möglichkeiten auf Einheitlichkeit überprüft werden. Lässt sich aus einem Peak kein einheitliches Spektrum gewinnen oder besteht an der Einheitlichkeit anderweitig begründeter Zweifel, so muss die Analyse gegebenenfalls zur Trennung der überlagerten Peaks unter veränderten chromatographischen Bedingungen wiederholt werden. Jedoch kann in bestimmten Fällen zur Identifizierung auch die Auswertung des Spektrums in der Peakflanke sinnvoll sein. Zur Quantifizierung können solche überlagerte Peaks aber nur dann herangezogen werden, wenn eine geeignete spezifische und ungestörte Wellenlänge zur Auswertung existiert.

Wird zur Bibliothekssuche eine kommerziell erhältliche Spektrenbibliothek benutzt [2,5], so ist vorher zu sichern, daß die verwendete mobile Phase, insbesondere deren pH-Wert, mit der für die Bibliothek angegebenen übereinstimmt. Weiterhin ist an ausgewählten Beispielen die Übereinstimmung der selbst gemessenen Spektren mit den Bibliotheksspektren zu bestätigen. Es empfiehlt sich, für häufig vorkommende Substanzen eine eigene Spektrensammlung parallel zu der kommerziell erhältlichen Bibliothek zu erstellen.

UV-Spektren besitzen eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Daher erfordert die Identifizierung eine völlige Übereinstimmung des gesamten Proben- und Bibliotheksspektrums. Neben einem hohen Ähnlichkeitsindex (z. B. $> 0,998$ bei einem Maximalwert von 1,000) des Suchergebnisses muss dieses in jedem Fall durch visuelle Kontrolle der überlagerten Spektren vom Untersucher bestätigt werden.

Bei sehr niedriger Konzentration kann das Probenspektrum durch Rauschen verändert sein. Als untere Identifizierungsgrenze kann die Konzentration angesehen werden, bei der das Rauschen 10 % der maximalen Extinktion des Spektrums erreicht. Bei stärkerem Rauschen muß zur Klärung eine höhere Probenmenge erneut aufgearbeitet werden.

Als weiteres wichtiges Kriterium muss auch die Retentionszeit oder ein geeigneter anderer Retentionsparameter mit dem der entsprechenden Referenzsubstanz übereinstimmen. Werden im Zusammenhang mit der Spektrenbibliothek die dort angegebenen Retentionsdaten zur Identifizierung herangezogen, so ist auf Einhaltung aller dort angegebenen chromatographischen Bedingungen (mobile Phase, Temperaturkonstanz, HPLC-Füllmaterial, Fließgeschwindigkeit, Retentions-Standardsubstanzen) zu achten. Aufgrund von trotzdem schwankenden Analysenbedingungen kann eine gewisse Abweichung der Retentionszeit (z. B. $\pm 15\%$) bei der Substanzsuche toleriert werden. Werden bei der Bibliothekssuche innerhalb dieser Toleranz mehrere Substanzen mit hoher spektraler Ähnlichkeit gefunden, so muß für die Entscheidung eine direkte Vergleichsmessung der entsprechenden Referenzsubstanzen vorgenommen werden. Hier kann für die Identifizierung (unter Berücksichtigung geringer Konzentrationseinflüsse) eine exakte Übereinstimmung der Retentionszeit gefordert werden. Werden auch hierdurch bestehende Zweifel nicht ausgeräumt, so kann auf Übereinstimmung der Retentionszeit in einer zweiten mobilen Phase geprüft werden.

UV-Spektren besitzen je nach spektraler Ausdehnung im erfaßten Wellenlängenbereich und der Häufigkeit des zugrundeliegenden Chromophors eine unterschiedliche Spezifität. Gegebenenfalls, insbesondere bei Spektren geringerer Spezifität, sind daher andere unabhängige Verfahren, insbesondere die GC-MS, zur Bestätigung der Identität heranzuziehen.

5. Semiquantitative und quantitative Konzentrationsbestimmungen

Jeder quantifizierte Peak muß vorher eindeutig identifiziert sein (Abschnitt 4). Für die Quantifizierung wird ein Wellenlängenbereich gewählt, bei dem einerseits im Bereich eines Absorptionsmaximums eine möglichst hohe Empfindlichkeit erreicht wird und andererseits störende Effekte von koeluerenden Verbindungen ausgeschlossen sind. Bei selten in Untersuchungsfällen vorkommenden Wirkstoffen ist die Erstellung einer quantitativen Methode nicht immer sinnvoll. Hier kann auf die Methode der Standardaddition zurückgegriffen werden, die gleichzeitig eine individuelle Berücksichtigung der Matrixeigenschaften ermöglicht. Die zu untersuchende Probe wird bei dieser semiquantitativen Methode in völlig gleicher Weise einmal unverändert und einmal unter Zusatz einer definierten Menge des zu bestimmenden Wirkstoffs aufgearbeitet und gemessen. Der Kalibrierfaktor ergibt sich als Quotient aus der Zunahme Peakfläche und der zugesetzten Konzentration. Die zugesetzte Konzentration soll dabei etwa der höchsten erwarteten Probenkonzentration entsprechen.

Bei häufig zu bestimmenden Wirkstoffen wird eine Kalibrationskurve erstellt. Ist die Linearität über den gemessenen Bereich gegeben (was durch die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes in der Regel der Fall ist) und der Achsenabschnitt hinreichend klein kann auch eine matrixbasierte Einpunktkalibrierung ausreichend sein. Bei komplizierter Probenaufbereitung und geringeren oder schwankenden Extraktionsausbeuten muss ein geeigneter interner Standard angewendet werden. Auch bei Verwendung der Proteinfällung als einzigem Probenvorbereitungsschritt muss die Ausbeute überprüft werden. Es kann nicht automatisch von quantitativer Ausbeute ausgegangen werden, da der Wirkstoff in erheblichem Umfange mitgefällt werden kann.

Für die Methodvalidierung gelten die allgemein für quantitative Bestimmungen herangezogenen Kriterien (s. Richtlinie der GTFCh zur Methodvalidierung, [6]) zur Bestimmung und Kontrolle der Wiederfindungsrate, der Linearität, der Präzision, der Richtigkeit sowie der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen. Auch im Bereich der Nachweisgrenze ist die Identität der Substanz durch Spektrenvergleich sicherzustellen.

Literatur

- [1] V. R. Meyer: Fallstricke und Fehlerquellen in der HPLC in Bildern. Zweite erweiterte Auflage, Weinheim, Wiley-VCH 1999)
- [2] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben, M. Rothe: UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons. Handbuch und CD, Verlag Dieter Helm, Heppenheim 2001, 1034 Seiten, ISBN 3-923032-13-7.
- [3] M. Bogusz, M. Erkens: Reversed-phase high performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use. *J. Chromatogr. A* 674 (1994) 97-126
- [4] F. Pragst, H. H. Maurer, J. Hallbach, U. Staerk, W. R. Külpmann, F. Degel und H. J. Gibitz: Suchverfahren (General Unknown). In: W. R. Külpmann (Hrs.) *Klinisch-toxikologische Analytik – Verfahren, Befunde, Interpretation*. Wiley-VCH Verlag GmbH., Weinheim 2002, Kapitel 4, S. 49-124.
- [5] M. Herzler, S. Herre and F. Pragst: Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2,682 compounds. *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 233-242.
- [6] GTFCh Arbeitskreis Qualitätskontrolle: Anlagen zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang C: Anforderungen an eine Validierung. In *Bearbeitung, Publikation in einem der nächsten Hefte.*