

Automatisierte Methodenentwicklung

Multikomponentenanalyse für 12 ausgewählte Zytostatika

T. Hetzel, T. Teutenberg und S. Giegold

Wurde früher üblicherweise Einzelkomponentenanalytik unterschiedlicher Substanzklassen betrieben, so entwickelt sich der Trend heute in Richtung Multikomponentenanalysen. Eine möglichst große Anzahl von Substanzen unterschiedlicher Polarität soll gleichzeitig in einem Lauf untersucht werden. Durch den Einsatz automatisierter Systeme wie dem Nexera Method Scouting System wird der Anwender bei der Auswahl geeigneter mobiler und stationärer Phasen für solch komplexe Fragestellungen unterstützt.



© Robert Kreschke - Fotolia.com

Kritische Peak-Paare erfordern Selektivität

Die Entwicklung flüssigkeitschromatographischer Methoden erfolgt häufig nach dem Prinzip von „trial and error“. In vielen Fällen wird eine „Standardsäule“ verwendet, ohne ein systematisches Screening bezüglich der Selektivität durchzuführen. Mit der Einführung leistungsstarker Massenspektrometer ist die Notwendigkeit, eine chromatographische Trennung zu erzielen, in den Hintergrund gerückt. In der Target-Analytik werden i. d. R. Triple-Quadrupol-Instrumente verwendet, wobei pro Substanz zwei Massenübergänge mit Hilfe des sogenannten Multiple-Reaction Monitoring (MRM) erfasst werden (s. auch S. 26). Aufgrund dessen ist eine chromatographische Trennung oftmals nicht erforderlich, selbst wenn eine Co-Elution vorliegt.

Allerdings kann auch die Massenspektrometrie (MS) hinsichtlich der Identifizierung der Zielkomponenten an ihre Grenzen stoßen. Eine Optimierung der chromatographischen Selektivität bzw. Trennung wird somit unumgänglich und absolut notwendig, um eine bestmögliche Auflösung dieser kritischen Peak-Paare zu erzielen.

Selektivitätsoptimierung am Beispiel der Zytostatika

Im Folgenden wird die Methodenentwicklung für 12 ausgewählte Zytostatika beschrieben. Diese Stoffe werden in der Chemotherapie eingesetzt, um Krebszellen zu zerstören bzw. die Teilungsraten der Zellen zu vermindern. Die in Abbildung 1 aufgelisteten Analyten repräsentieren zwölf der am häufigsten eingesetzten Zytostatika.

Innerhalb des Analytspektrums treten drei Spezialfälle auf, die eine Optimierung der chromatographischen Selektivität erfordern. Ifosfamid (7) und Cyclophosphamid (8) sind Strukturisomere und weisen einen gleichen Massenübergang während der massenspektrometrischen Detektion auf. Doxorubicin (3) und Epi-

rubicin (4) sind Epimere, die sich lediglich durch die sterische Ausrichtung einer Hydroxygruppe unterscheiden. In diesem Fall sind beide MRM-Übergänge identisch. Eine Identifizierung ohne chromatographische Trennung ist somit nicht möglich. Der dritte Spezialfall umfasst die Analyten Docetaxel (11) und Paclitaxel (12). Bei einer Co-Elution dieser Substanzen wurde häufig eine Ionensuppression beobachtet. Um die

Chancen einer erfolgreichen chromatographischen Auftrennung zu erhöhen, ist es notwendig, die Selektivität des Phasensystems hinsichtlich dieser drei kritischen Substanz-Paare zu optimieren.

Method Scouting

Für diese Optimierung wurde ein Method Scouting System von Shimadzu verwendet, wel-

ches es ermöglicht, gleichzeitig sechs Trennsäulen und acht Lösungsmittel zu kombinieren. Dadurch ergeben sich 96 Variationen, wodurch in kürzester Zeit eine Vielzahl an Informationen, die für die Methodenentwicklung nützlich sind, generiert werden können. Der Nutzer muss vorab lediglich die Randbedingungen, wie z. B. die Trennsäulen, die organischen Lösungsmittel, die Gradienten-

Analytenspektrum	
1) 5-Fluorouracil $C_4H_3FN_2O_2$ 130,018 Da	2) Gencitabn $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ 263,072 Da
3) Doxorubicin $C_{27}H_{29}NO_{11}$ 543,174 Da	4) Epirubicin $C_{27}H_{29}NO_{11}$ 543,174 Da
5) Methotrexat $C_{22}H_{22}N_4O_5$ 454,171 Da	6) Etoposid $C_{29}H_{32}O_{13}$ 588,184 Da
7) Ifosfamid $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ 260,025 Da	8) Cyclophosphamid $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ 260,025 Da
9) Topotecan $C_{23}H_{23}N_3O_5$ 421,164 Da	10) Irinotecan $C_{33}H_{39}N_4O_6$ 586,280 Da
11) Docetaxel $C_{43}H_{53}NO_{14}$ 807,347 Da	12) Paclitaxel $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 853,331 Da

Abb. 1: Auflistung der Struktur- und Summenformeln der untersuchten Zytostatika

steigerungen und die Temperatur definieren. Die aufwendige Batch-Erstellung übernimmt anschließend die Software unter Berücksichtigung aller relevanten Equilibrierungs- und Spülvorgänge. Tabelle 1 fasst

alle verwendeten Screeningparameter zusammen.

In Abbildung 2 sind Beispielchromatogramme für drei unterschiedliche Trennphasen mittels UV-Detektion dargestellt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch

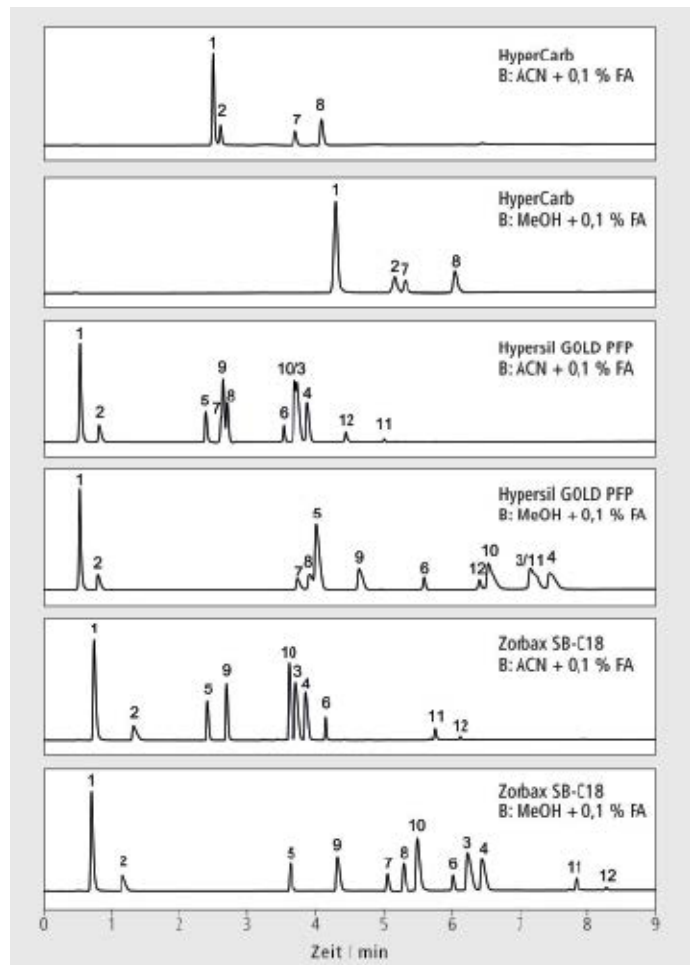


Abb. 2: Beispielchromatogramme zum direkten Vergleich der chromatographischen Selektivität

aus Wasser und Acetonitril bzw. Wasser und Methanol verwendet. Der pH-Wert wurde mit Ameisensäure eingestellt.

Beispielchromatogramme für drei unterschiedliche Trennphasen

Die ersten beiden Chromatogramme zeigen die Trennung auf einer Hypercarb-Phase von Thermo. Die stationäre Phase

besteht aus porösem graphitisiertem Kohlenstoff, der ein sehr hohes Retentionsvermögen aufweist. Diese Eigenschaft wird durch das vorliegende Beispiel untermauert, da lediglich vier der zwölf Komponenten eluieren, unabhängig davon, ob Acetonitril oder Methanol verwendet wird. Des Weiteren sind längere Retentionszeiten mit Methanol zu beobachten, was aufgrund der niedrigeren Elutionsstärke im Gegensatz zu Acetonitril zu erwarten ist. Im Zusammenhang mit dieser Anwendung stellt die Hypercarb-Phase deshalb keine geeignete Alternative dar.

Die zweite Trennphase ist eine Pentafluorphenyl-Phase (PFP), ebenfalls von Thermo (3. und 4. Chromatogramm). Die Elution des Analytgemisches mit Acetonitril weist die kürzeste Analysenzeit aller aufgeführten Bei-

Tab. 1: Zusammenfassung der ausgewählten Screeningparameter für die automatisierte Methodenentwicklung.

Trennsäule	Thermo Hypercarb (2,1 x 50 mm; 3 µm)	Thermo Hypersil Gold PFP (50 x 2,1 mm; 1,9 µm)	Agilent Zorbax SB-C18 (2,1 x 50 mm; 1,8 µm)
Lösungsmittel		Wasser + Acetonitril Wasser + Methanol	
Additiv		0,1% Ameisensäure	
Temperatur		30 °C; 50 °C	
Gradientensteigung		10 min; 30 min	

spiele auf. Es werden lediglich fünf Minuten benötigt, um mit einem linearen Lösungsmittelgradienten alle Substanzen zu eluieren. Des Weiteren werden die drei kritischen Peak-Paare mit ausreichender Auflösung getrennt. Für eine Anwendung mit dem Massenspektrometer wäre das betrachtete Phasensystem geeignet, auch wenn keine vollständige Auftrennung aller Komponenten erreicht wird. Durch die Verwendung von Methanol wird die Elutionsreihenfolge nahezu komplett verändert. Auch diese Kombination wäre für den vorliegenden Anwendungsfall eine Option, allerdings zeigen die spät eluierenden Substanzen ein deutliches Tailing.

Zum Abschluss wird die Trennung auf einer Agilent Zorbax SB-C18-Phase untersucht. Innerhalb dieser Trennsäule befinden sich vollporöse Partikel mit einer Octadecyl-Modifizierung (C18) auf der Oberfläche. Bei näherer Betrachtung wird deutlich, dass diese Phase die beste Grundselektivität aufweist. Die Verwendung von Acetonitril ergibt eine gute Auftrennung nahezu aller Komponenten, lediglich Cyclophosphamid (7) und Ifosfamid (8) sind nicht vollständig aufgetrennt und können mittels UV-Detektion nicht zugeordnet werden.

Wird stattdessen Methanol als mobile Phase verwendet, kann eine Basislinientrennung aller Komponenten erzielt werden. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, sowohl die massenspektrometrische als auch die UV-Detektion zu nutzen. Hervorzuheben ist, dass diese Kombination Kompromisse bezüglich längerer Laufzeiten von etwa 8,5 Minuten erfordert.

Fazit

Alles in allem kann durch den Einsatz des Method Scouting Systems eine erhöhte Produktivität im Laboralltag erreicht werden. Innerhalb kurzer Zeit ist eine Aussage über die beste Selektivität des chromatographischen Phasensystems möglich. Die Benutzerfreundlichkeit ermöglicht den Anwendern, die beste Kombination aus mobiler und stationärer Phase für ihr individuelles Trennproblem zu ermitteln.

Autoren

Terence Hetzel, M. Sc.,
Dr. Thorsten Teutenberg
Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.
(IUTA)

Dr. Sascha Giegold
Shimadzu Deutschland

KONTAKT |

Dr. Thorsten Teutenberg
Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA)
Bereichsleiter Forschungsanalytik
Duisburg
Tel.: 02065/418-179
teutenberg@iuta.de

Dr. Sascha Giegold
Shimadzu Deutschland GmbH
Duisburg
Tel.: 0203/7687-0
info@shimadzu.de



Brauchen wir die Chromatographie wirklich?
<http://bit.ly/Teutenberg>



Mehr Informationen zu Zytostatika:
<http://bit.ly/Zytostatika>