

CHROMBIO. 568

## ÜBER DAS EINSCHLEPPEN VON VERUNREINIGUNGEN BEI VERWENDUNG VON EXTRELUT®-FERTIGSÄULEN

MANFRED ENDE\*, PETER PFEIFER und GERHARD SPITELLER

*Lehrstuhl Organische Chemie I der Universität Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 8580 Bayreuth (B.R.D.)*

(Eingegangen am 22. Januar 1980)

---

### SUMMARY

#### *Contamination by use of Extrelut® columns*

Extrelut® columns commonly used to isolate metabolites from biological fluids often contain fatty acids, phthalates, alcohols and especially resin acids which occasionally cause great analytical problems. Therefore purification before use of Extrelut® columns is strongly recommended.

---

### EINLEITUNG

Zur Isolierung von Stoffwechselprodukten aus Körperflüssigkeiten werden vor allem in der Arzneimittelanalytik in zunehmendem Masse Extrelutsäulen benutzt, weil so wesentlich rascher als bei der flüssig—flüssig-Extraktion und ohne Störungen durch Emulsion ein Extrakt erhalten wird, der direkt für die nachfolgende chromatographische Trennung und Identifizierung verwendet werden kann [1—5]

In unserem Labor wird dieses Extraktionsverfahren zur Isolierung von Säuren und Steroiden aus Urin bzw. Plasma eingesetzt, die wir nachfolgend mit der Kombination Glaskapillargaschromatographie—Massenspektrometrie untersuchen. Wir fanden nun, dass Extrelutsäulen organische Verbindungen enthalten, die insbesondere die Identifizierung von Spurenbestandteilen stören. Im folgenden wollen wir über die Art der Verunreinigungen und ihre Beseitigung berichten.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Verwendete Geräte*

**Glaskapillargaschromatographie—Massenspektrometrie (GC—MS):** Die Trennung der Substanzgemische und die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem LKB 2091 Kombinationsgerät von Gaschromatograph mit dem Massenspektrometer. Zur Registrierung der Spektren diente das LKB 2130-Datensystem (PDP 11/05-Rechner).

**Messbedingungen:** 25-m Glaskapillarsäule (Innendurchmesser 0.3 mm, SE-30-Dünnsfilm), Helium 2 ml/min, Injektortemperatur 275°C, Säulentemperatur von 150°C bis 300°C mit 2°C/min programmiert. Ionisierungsenergie 70 eV. Der Totalionenstrom wurde bei 20 eV registriert.

Die Gaschromatogramme zur Ermittlung der Retentionsindices wurden an einem Siemens L 402 Gaschromatograph aufgenommen: 25-m Glaskapillarsäule (Innendurchmesser 0.3 mm, SE-30-Dünnsfilm), Injektortemperatur 275°C, Detektortemperatur (Flammenionisationsdetektor) 280°C, Wasserstoff 2 ml/min, Säulentemperatur von 150°C bis 300°C mit 2°C/min programmiert.

### *Blindaufarbeitung zur Identifizierung der Verunreinigungen*

Dest. Wasser (20 ml) wurde mit verdünnter Salzsäure auf pH 2–3 eingestellt und auf einer Extrelut®-Fertigsäule (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) verteilt. Nach 30 min wurde die Säule mit 50 ml Essigsäureethylester eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeeengt, derivatisiert (siehe unten) und der GC—MS bzw. der GC-Analyse unterworfen.

### *Isolierung der Steroidfraktion aus Urin*

Urin (10 ml) wurde mit 10 ml 0.5 M Acetatpuffer (pH 4.5) und 100 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim, B.R.D.) versetzt und 72 Std. bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde anschliessend auf einer Extrelutsäule verteilt und die Säule nach 30 min mit 50 ml Essigsäureethylester eluiert.

Das Eluat wurde dreimal mit je 10 ml einer Lösung aus 5% Natriumhydrogencarbonat und 10% Natriumchlorid und nachfolgend zweimal mit je 5 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen [6]. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und einengen der Lösung wurden 1/5 des Extraktes mit 6 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA, Macherey-Nagel, Düren, B.R.D.) derivatisiert (siehe unten).

### *Derivatisierung*

**Darstellung der Methylester.** Die Proben wurden in wenig Methanol gelöst und mit einem Überschuss einer etherischen Diazomethanlösung versetzt. Nach 10 min wurde die Lösung im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt, in einigen Mikroliter Methanol gelöst und diese Lösung zur GC-, bzw. GC—MS-Analyse verwendet.

**Silylierung.** Die gut getrocknete Probe wurde in einem zugeschmolzenen Schmelzpunktröhrchen mit 5–10 µl MSTFA 24 Std. bei Raumtemperatur oder 45 min bei 60–80°C umgesetzt.

### Reinigung des Extrelutsäulenmaterials

In einer Soxhlett-Apparatur wird das Säulenmaterial jeweils 4 Std. mit Aceton, Toluol und Ethanol oder Methanol extrahiert.

### Die "Inhaltsstoffe" von Extrelutsäulen

Fig. 1 zeigt das Glaskapillargaschromatogramm des Extraktes aus Extrelutsäulen nach einer Blindaufarbeitung (Experimenteller Teil). Die Peaks sind nach steigenden Retentionsindices numeriert. Die zur Ermittlung der Retentionsindices beigefügten geradkettigen Kohlenwasserstoffe wurden mit C-10, C-12 usw. gekennzeichnet.

In der Tabelle I sind die in Extrelut gefundenen Verbindungen entsprechend der Kennzeichnung in den Chromatogrammen aufgelistet. Zusätzlich sind die bei Temperaturprogrammierung (150–300°C, 2°C/min, siehe Experimenteller Teil) gemessenen Retentionsindices sowie Literaturhinweise bzw. die charakteristischen Fragmentationen der Massenspektren angegeben.

Besonders störend sind die relativ grossen Mengen an Harzsäuren. Da die Hauptverbindungen [8(14),15-Pimaradien-18-säure, 7,15-Isopimaradien-18-säure und Dehydroabietinsäure] für Extrelutverunreinigungen geradezu typisch sind, wurden die Massenspektren ihrer Trimethylsilylester in Fig. 2 reproduziert.

Der Effekt, den eine derartige Verunreinigung verursacht, ist in dem in Fig. 3 dargestellten Gaschromatogramm veranschaulicht.

Harn (10 ml) wurde in der angegebenen Weise (Experimenteller Teil) auf Steroide aufgearbeitet. Das nach Extrelutextraktion erhaltene Gaschromatogramm der Steroidfraktion zeigt, dass die durch Extrelut eingeschleppten Verunreinigungen (Peak 9'–14' in Fig. 3) in gleicher Konzentration wie die Hauptsteroidmetabolite (b–f in Fig. 3) vorliegen.

Die Identifizierung von Metaboliten, die im Bereich zwischen C-22 und C-24 angezeigt werden (Androsten-3-ol-isomere) wird dadurch erschwert, bzw. unmöglich gemacht.

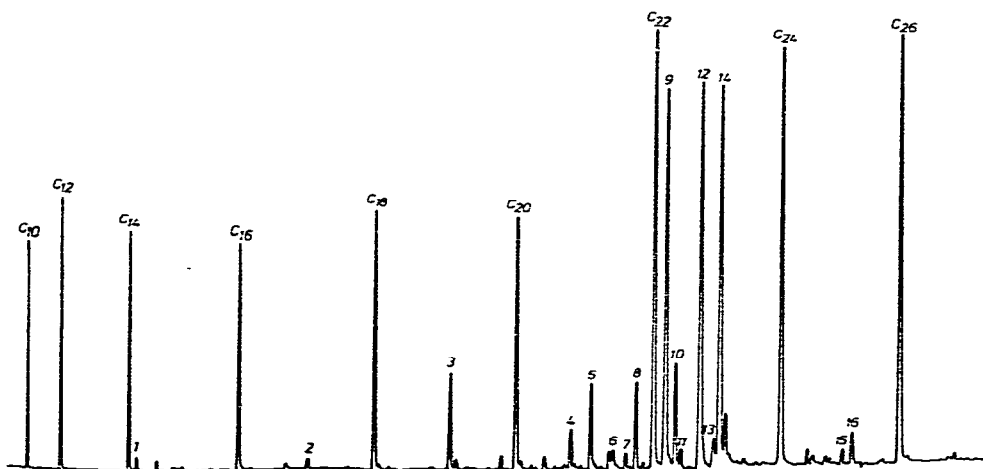


Fig. 1. Glaskapillargaschromatogramm eines Blindextraktes von Extrelutsäulen. In Tabelle I sind die den GC-Peaks entsprechenden Verbindungen angegeben.

TABELLE I

## ZUSAMMENSTELLUNG IN EXTRELUT® ENTHALTENEN VERUNREINIGUNGEN

GC-Peak-Nr.	Name der Verbindung	Reten- tions- index*	Mole- kular- gewicht	Massenspektrum, charakteris- tische Ionen [m/e (%)] bzw. Literaturhinweise
1	Phthalsäuredimethyl- ester**	1415	194	50 (10), 76 (12), 77 (24), 92 (9), 104 (6), 105 (4), 120 (3), 132 (5), 135 (7), 163 (100), 194 (8, M <sup>+</sup> )
2	Myristinsäure- -methylester	1707	242	Lit. 7
	-trimethylsilylester	1842	300	Lit. 8
3	Palmitinsäure- -methylester	1907	270	Lit. 7
	-trimethylsilylester	2041	328	Lit. 8
4	Ölsäure- -methylester	2080	296	Lit. 7
	-trimethylsilylester	2235	354	Lit. 8
5	Stearinsäure- -methylester	2108	298	Lit. 7
	-trimethylsilylester	2242	356	Lit. 8
6	1 $\alpha$ -Carbomethoxy-2 $\alpha$ - -[2'(m-isopropyl- phenyl)ethyl]-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ - dimethylcyclohexan	2143	316	Lit. 7
7	isomere Verbindung zu der im GC-Peak 6 ent- haltenden Verbindung	2160	316	133 (45), 146 (100), 192 (12), 284 (16), 316 (17, M <sup>+</sup> )
8	8, 15-Isopimaradien- 18-säure- -methylester	2173	316	Lit. 7
8	-trimethylsilylester	2229	374	73 (100), 241 (98), 256 (26), 257 (27), 359 (18), 374 (13, M <sup>+</sup> )
9	8(14), 15-Pimaradien- 18-säure (Pimarsäure) -methylester	2218	316	Lit. 7, 9
9	-trimethylsilylester	2285	374	Fig. 2a
10	8(14), 15-Isopimara- dien-18-säure- -methylester	2235	316	Lit. 7
10'	-trimethylsilylester	2298	374	73 (100), 121 (63), 241 (11), 256 (10), 257 (25), 359 (18), 374 (12, M <sup>+</sup> )
11	Harzsäure nicht be- kannter Struktur -methylester	2242	316	105 (89), 121 (100), 133 (49), 148 (68), 180 (25), 185 (28), 241 (58), 256 (42), 257 (58), 301 (34), 316 (25, M <sup>+</sup> )
	7, 15-Isopimaradien- 18-säure-(Isopimar- säure)			
12	-methylester	2272	316	Lit. 7, 9
12'	-trimethylsilylester	2311	374	Fig. 2b

TABELLE I (Fortsetzung)

GC-Peak-Nr.	Name der Verbindung	Reten- tions- index*	Mole- kular- gewicht	Massenspektrum, charakteris- tische Ionen [ $m/e$ (%)] bzw. Literaturhinweise
13	Harnsäure nicht be- kannter Struktur- -methylester	2295	318	107 (80), 121 (100), 136 (30), 181 (44), 215 (39), 243 (78), 259 (32), 271 (12), 275 (28), 303 (30), 318 (22, $M^+$ )
14	Dehydroabietinsäure- -methylester	2304	314	Lit. 7, 10, 11
14'	-trimethylsilylester	2352	372	Fig. 2c
<i>In anderen Lieferchargen von Extrelut wurden folgende Phthalester gefunden:</i>				
	Phthalsäuremethylester**	1482	208	50 (15), 65 (8), 76 (18), 77 (23), 92 (14), 104 (11), 105 (11), 121 (5), 133 (5), 135 (9), 136 (10) 149 (54), 163 (100), 176 (9), 177 (8), 208 (7, $M^+$ )
	Phthalsäurediethylester	1583	222	Lit. 12–14
	Phthalsäuredi-isobutylester	1825	278	Lit. 15, 16
	Phthalsäure-n-butylisobutylester	1868	278	Lit. 15
	Phthalsäuredi-n-butylester	1916	278	Lit. 14–17
<i>Als Trimethylsilylether (TMS) wurden folgende primäre Alkohole [11] identifiziert</i>				
	Tetradecanol-TMS	1764	286	73 (56), 75 (78), 83 (28), 103 (24) 271 (100)
	Hexadecanol-TMS	1964	314	73 (60), 75 (75), 83 (29), 103 (29) 299 (100)
	Octadecanol-TMS	2162	342	73 (38), 75 (100), 103 (42), 327 (90)

\*Die Retentionsindices wurden bei Temperaturprogrammierung gemessen: 150–300°C, 2°C/min (siehe Experimenteller Teil).

\*\*Nach Derivatisierung mit Diazomethan.

Der Gehalt an Verunreinigungen ist schwankend. Fig. 1 zeigt das Gaschromatogramm einer Durchschnittsprobe. In einer Liefercharge waren erheblich geringere Mengen an Beimengungen, in einer anderen Lieferung war die Konzentration an Harzsäuren gleich, an Phthalestern sehr viel höher.

Selbstverständlich schlagen bei Aufarbeitung grosser Probenmengen die Verunreinigungen nicht so sehr zu Buche. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung von basischen Arzneistoffmetaboliten, da bei der Aufarbeitung auf

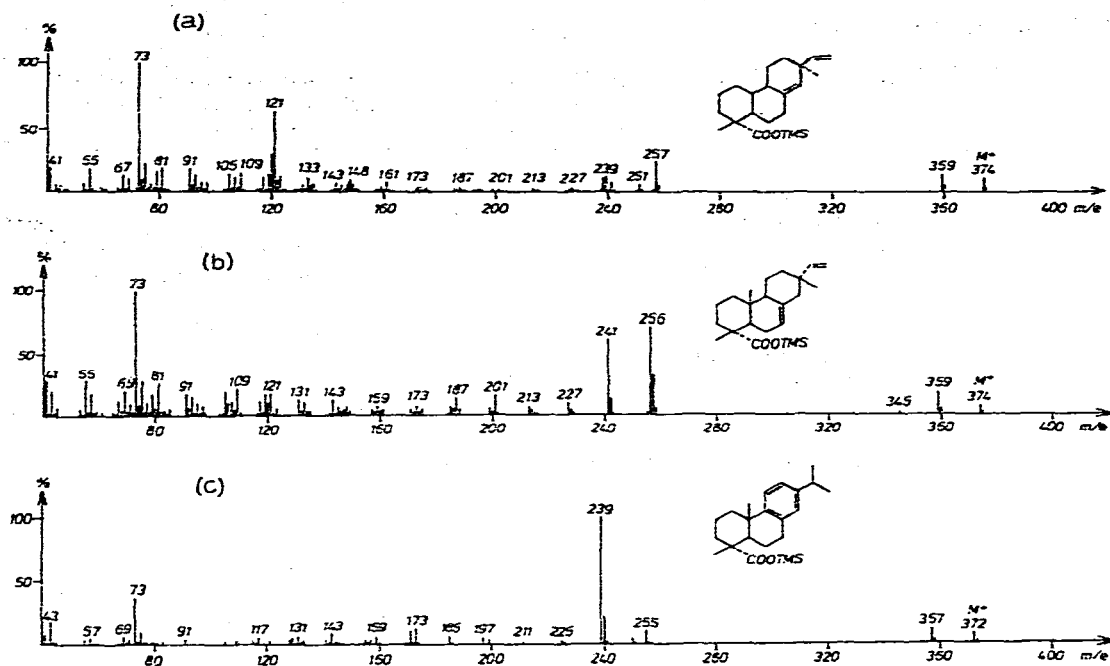


Fig. 2. Massenspektren der Trimethylsilylester von (a) 8(14),15-Pimaradien-18-säure (Pimarsäure), (b) 7,15-Isopimaradien-18-säure (Isopimarsäure), (c) Dehydroabietinsäure.

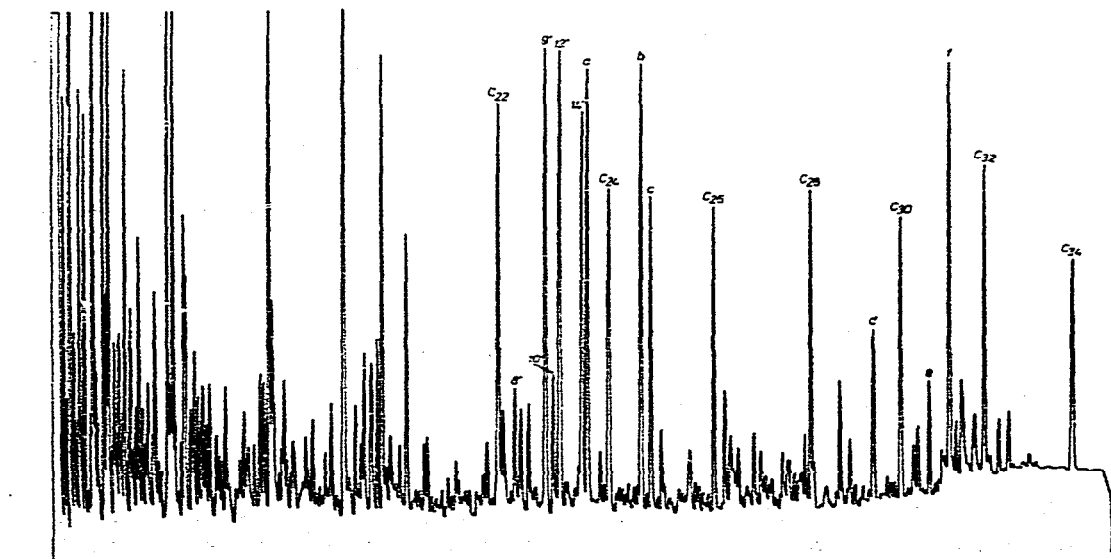


Fig. 3. Chromatogramm einer Steroidfraktion (analysiert in Form der Trimethylsilylderivate), die mit Hilfe von Extrelut<sup>®</sup>-Fertigsäulen isoliert wurde. Messbedingungen sind im Experimenteller Teil angegeben. Verunreinigungen aus Extrelut: (9') 8(14),15-Pimaradien-18-säure-trimethylsilylester (Pimarsäure-TMS-ester); (10') 8(14),15-Isopimaradien-18-säure-trimethylsilylester; (12') 7,15-Isopimaradien-18-säure-trimethylsilylester (Isopimarsäure-TMS-ester); (14') Dehydroabietinsäuretrimethylsilylester. a = Interner Standard. Hauptsteroid-metabolite als Trimethylsilylderivate: (b) Androsteron; (c) Etiocholanolon; (d) 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -di-TMS; (e) 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11-on ( $\alpha$ -Cortolon); (f) Tetrahydrocortison.

Basen die als Verunreinigung enthaltenen Säuren nicht stören. Sind jedoch nur kleine Mengen an Säuren und Neutralstoffen als Metabolite zu erwarten, so ist eine massenspektrometrische Kontrolle der Gaschromatogramme zur Identifizierung der aus Extrelut stammenden Verunreinigungen unerlässlich.

### *Entfernung der Verunreinigungen*

Ein einfacher Weg zur Entfernung der Verunreinigungen besteht in einer der Verwendung vorausgehenden 4-stündigen Extraktion des Säulenmaterials jeweils mit Aceton, Toluol und Ethanol bzw. Methanol in einer Soxhlett-Apparatur (siehe Experimenteller Teil).

### ZUSAMMENFASSUNG

Extrelutsäulen<sup>®</sup> die zur Isolierung von Stoffwechselprodukten aus Körperflüssigkeiten verwendet werden, enthalten oft Fettsäuren, Phthalester, Alkohole und insbesondere Harzsäuren, die die Analyse von Metaboliten stören. Daher ist eine Reinigung des Säulenmaterials vor der Verwendung dringend erforderlich.

### DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Dr. Robert Pfleger-Stiftung für Sachbeihilfen. Herrn Dr. J. Reiner danken wir für die Herstellung der Glaskapillarsäulen.

### LITERATUR

- 1 J. Breiter, *Arzneim.-Forsch.*, 28 (1978) 1941.
- 2 J. Breiter, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 14 (1976) 46.
- 3 J. Breiter und R. Helger, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 13 (1975) 254.
- 4 J. Breiter, R. Helger und H. Lang, *Forensic Sci.*, 7 (1976) 131.
- 5 P. Hoeltzenbein, G. Bohn und G. Ruecker, *Z. Anal. Chem.*, 292 (1978) 216.
- 6 C.D. Pfaffenberger und E.C. Horning, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 581.
- 7 E. Stenhagen, S. Abrahamsson und F.W. McLafferty, *Registry of Mass Spectral Data*, New York, 1974.
- 8 S.P. Markey, W.G. Urban und S.P. Levine, *Mass Spectra of Compounds of Biological Interest*, U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, TN.
- 9 K. Biemann, *Mass Spectrometry — Organic Chemical Applications*, New York, 1962, S. 336.
- 10 C.R. Enzell und I. Wahlberg, *Acta Chem. Scand.*, 23 (1969) 871.
- 11 G. von Unruh, G. Remberg und G. Spiteller, *Chem. Ber.*, 104 (1971) 2071.
- 12 D.H. Hunneman, *Application Note No. 19*, Varian MAT, Bremen, 1978.
- 13 *Eight Peak Index of Mass Spectra*, Mass Spectrometry Data Centre, AWRE, Aldermaston, Reading, 1974.
- 14 M.P. Friocourt, F. Berthou, D. Picart, Y. Dreano und H.H. Floch, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 261.
- 15 D.N. Hunneman und V. Christ, *Application Note No. 17*, Varian MAT, Bremen, 1974.
- 16 M. Spiteller und G. Spiteller, *Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen*, Springer Verlag, Wien, New York, 1973.
- 17 R.A. Hites, *Environ. Health Perspec.*, 3 (1973) 17.