

Spezifischer Nachweis der Beimischung einer Teeprobe in Pleurapunktat mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Specific Proof of Admixed Tea in a Pleural Effusion by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

K.-M. Otte^{1,2}, R. Haeckel¹

Zusammenfassung: Gaschromatographie-Massenspektrometrie ist ein leistungsfähiges Analysenprinzip zur Auftrennung von Stoffgemischen und anschließenden Identifizierung der Einzelsubstanzen. Im vorliegenden Fall wurde dieses Prinzip eingesetzt, um mit hoher Sicherheit nachzuweisen, daß über eine Magensonde, die intrapleural lag, Fencheltee, ein komplexes Stoffgemisch, appliziert wurde. Mit Hilfe des direkten Spektrenvergleichs mit der verwendeten Auswertesoftware konnte gezeigt werden, daß sich erhebliche Mengen Tee im Pleurapunktat befanden. Die Fehllage der Magensonde konnte so sicher nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Gaschromatographie-Massenspektrometrie; Getränke/Alytik; Enterale Ernährung/unerwünschte Wirkungen; Pleuraflüssigkeit.

Summary: Gas chromatography-mass spectrometry is a powerful analytical principle for the separation of complex mixtures followed by identification of the individual substances. In the present case it was applied for a reliable proof of the application of fennel tea via a naso-gastric tube that was displaced to the pleural space. By direct comparison of the spectra by means of the interpretation software it could be shown that appreciable amounts of tea were contained in the pleural effusion. Thus the displacement of the tube could be demonstrated with certainty.

Keywords: Beverages/analysis; Enteral Nutrition/adverse effects; Mass Fragmentography, Pleura Effusion.

Der Nachweis eines komplexen Stoffgemisches, wie z. B. Tee oder Fencheltee, in einer Körperflüssigkeit wird üblicherweise über den Nachweis einer charakteristischen Einzelsubstanz geführt. Bei manchen Teezubereitungen ist z. B. Coffein eine charakteristische Substanz. Methoden zur Bestimmung von Coffein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sind beschrieben worden [1-4], ebenso der Nachweis durch die Dünnschichtchromatographie [5,6] oder mit der Kapillarelektrophorese [7], bzw. mit ihrer Variation, der „Micellar Electrokinetic Chromatography“ (MEKC) [8,9]. Speziell für Fencheltee wären charakteristische Einzelsubstanzen das trans-Anethol und das Fenchon [10]. Der Nachweis erfolgt auch hier dünn-schichtchromatographisch [11] oder mit der HPLC [12].

Bei dem im vorliegenden Fall angewandten Verfahren wird der Nachweis nicht nur über die Identifikation einer Einzelsubstanz geführt, sondern über mehrere gaschromatographisch aufgetrennte Einzelstoffe des gesamten Stoffgemisches mit anschließendem massenspektroskopischen Vergleich zwischen dem nachzuweisenden Stoffgemisch und der Beimischung dieses Stoffgemisches in der Körperflüssigkeit.

Der Untersuchungsauftrag wurde erteilt wegen des Verdachts einer intrapleural deplazierten Magensonde, über die möglicherweise Fencheltee appliziert wurde. Es wurden ca. 3 ml Pleurapunktat und eine gleiche Menge Tee eingesandt. Der Tee lag in der Zubereitung vor, wie er bei der Ernährung über eine Magensonde verwendet wird.

Beide Proben wurden parallel mit der Festphasenextraktion vorbereitet. Nach der Derivatisierung erfolgten die Messungen direkt hintereinander. Die Auswertung der beiden Totalionen-chromatogramme (TIC) wurde mit Hilfe der Funktion „Spektrenvergleich“ der Auswertesoftware durch direkten Vergleich beider Spektren vorgenommen. Anschließend wurde zu ausgewählten Peaks mit gleichen Retentionszeiten beider Spektren das Massenspektrum verglichen.

¹ Institut für Laboratoriumsmedizin, Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße, Bremen

² Korrespondenzadresse: Dr. K.-M. Otte, Abteilung Laboratoriumsmedizin/Klinische Chemie, Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Lohmühlenstraße 5, D-20099 Hamburg. Fax: +49-40-24884405

Eingegangen: 11. Dez. 1995 / Angenommen: 29. Aug. 1996

Material

Für die Festphasenextraktion wurden Clean Screen ZS Dau 020 Säulen von der Firma Restek (Sulzbach) verwendet. Alle Reagenzien (Methanol, Essigsäure, n-Hexan, Dichlormethan, 2-Propanol (Isopropanol), Essigsäureanhydrid, Pyridin und die NH_3 -Lösung) hatten den Reinheitsgrad p.a. und wurden von der Firma E. Merck AG (Darmstadt) bezogen. Der Phosphatpuffer wurde selbst hergestellt.

Methoden

Die Probenvorbereitung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von *Pfleger, Maurer* und *Weber* [13].

Die Analyse wurde auf einem Shimadzu GC-17A mit QP 5000 durchgeführt. Die Messung erfolgte im full scan mode. Die Auswertung geschah mit der Class 5000 Software mit Hilfe der Funktion „Spectra Comparison“.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe der Festphasenextraktion an Clean Screen ZS Dau 020 Säulen (World Wide Monitoring). Eluiert wurde mit einem sauren und basischen Extraktionsverfahren, wie es für das Drogenscreening entwickelt wurde. Eingesetzt wurden 1 ml Tee und 2 ml Pleurapunktat, denen je 2 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 6,0 zugesetzt wurden. Die Säulen wurden jeweils mit 3 ml Methanol, 3 ml Aqua dest. und 3 ml Phosphatpuffer konditioniert. Nachdem die Proben auf die Säulen gegeben und langsam durchgelaufen waren, wurde mit 3 ml Phosphatpuffer und danach mit 1 ml 1 mol/l Essigsäure gespült. Nach gründlichem Trocknen der Säulen und Spülen mit 1 ml Hexan wurde mit 3 ml Dichlormethan sauer eluiert. Nach erneutem Waschen mit 3 ml Methanol und Trocknen der Säulen erfolgte die basische Extraktion mit 3 ml Dichlormethan/Isopropanol/ NH_3 (78/20/2). Die basische Fraktion wurde nach Eindampfen im Stickstoffstrom bei 40 °C mit 50 μl Essigsäureanhydrid/Pyridin (3:2) 20 min bei 80 °C derivatisiert. Zur Auswertung wurde die basische Fraktion herangezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Methoden zur Identifikation von Einzelsubstanzen, wie z. B. Coffein, mit Hilfe der GC-MS [14], bzw. Anethol oder Fenchon sind beschrieben worden. Im Vergleich zur HPLC oder Dünnschichtchromatographie benötigt die GC-MS eine aufwendigere Probenvorbereitung über die Festphasenextraktion mit anschließender Derivatisierung. Methoden zur Isolierung mit der Flüssig-Flüssig Extraktion [15] reduzie-

ren diesen Aufwand. Durch Verwendung der Mikroextraktionstechnik (solid-phase mikroextraction, SPME) mit Fiberglasfasern [16] ließe sich allerdings die Probenvorbereitung weiter vereinfachen.

Die hier gewählte Analysenmethode bietet aber gegenüber anderen Verfahren eine höhere Nachweisicherheit bei der Identifikation des Stoffgemisches im Pleurapunktat. Beide Spektren der gaschromatischen Auftrennung zeigten jeweils Peaks mit gleichen Retentionszeiten. Durch die anschließende massenspektroskopische Identifikation der einzelnen Peaks in beiden Spektren konnte ausgeschlossen werden, daß unterschiedliche Substanzen mit zufällig gleichen Retentionszeiten zu einer Fehlinterpretation führten. Die Auswertesoftware erleichterte mit ihrer Möglichkeit des direkten Spektrenvergleichs die Auswertung der Totalionenchromatogramme (TIC) und der Massenspektren.

Es zeigte sich, daß in beiden TIC's etwa 12 identische Peaks sichtbar waren, die jeweils gleiche Retentionszeiten besaßen. Das Spektrum des Fencheltees (Abbildung 1b) läßt sich mit allen Peaks auf das Spektrum des Pleuraergusses (Abbildung 1a) projizieren. Zu mehreren deutlichen Peaks in beiden Spektren wurden die Massenspektren dargestellt und verglichen. Die Subtraktion des einen Massenspektrum von dem anderen gibt im Idealfall eine Nulllinie. Als Beispiel sind die beiden Massenspektren der Peaks mit der Retentionszeit 9,700 min in Abbildung 2 dargestellt.

Mit Hilfe der GC-MS konnte so bei vertretbarem Zeit- und Kostenaufwand eindeutig gezeigt werden, daß im Pleurapunktat größere Mengen von Fencheltee enthalten waren. Bei Fragestellungen, bei denen eine hohe Spezifität des gewählten Verfahrens gefordert wird, scheint uns daher der Mehraufwand gerechtfertigt.

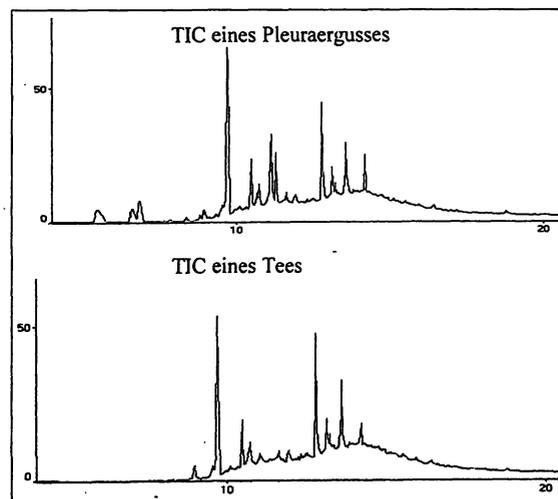


Abbildung 1 a, b Totalionenchromatogramm (TIC) von Pleuraerguß (a) und Fencheltee (b). Abszisse: Retentionszeit (min)

Nicht standardisierte Abkürzungen: GC-MS, Gaschromatographie-Massenspektrometrie; HPLC, High-performance liquid chromatography; TIC, Totalionenchromatogramm.

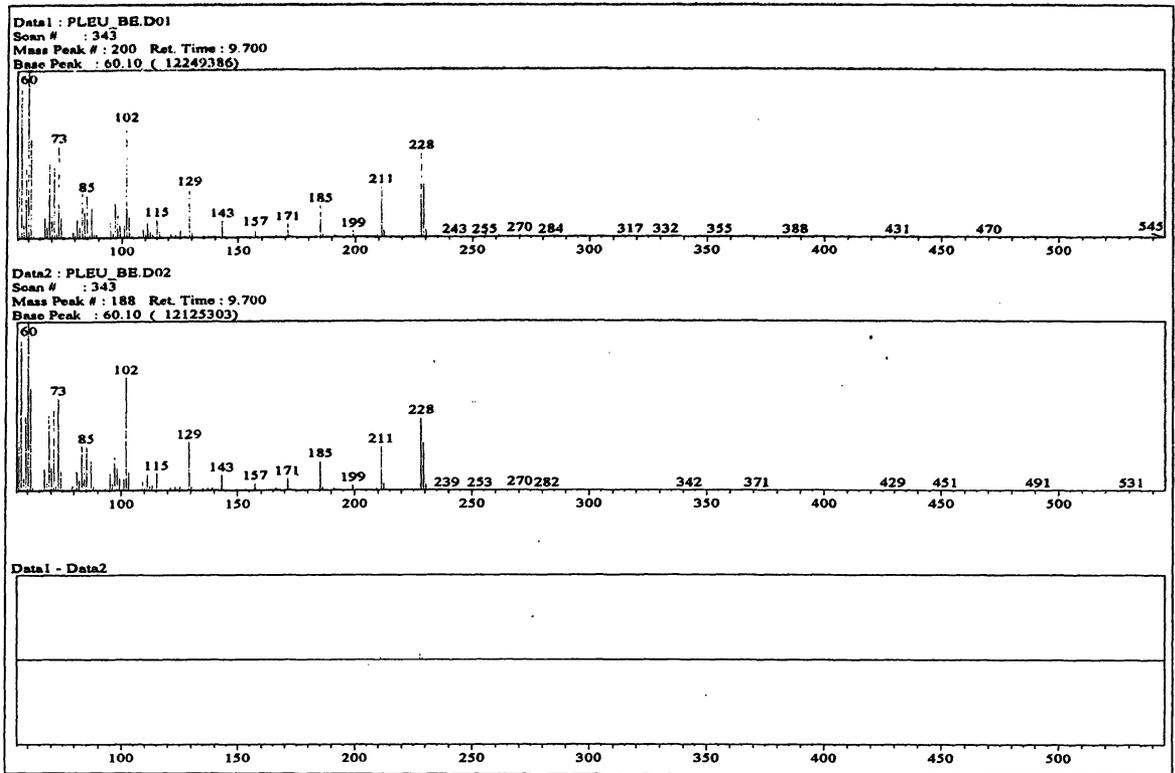
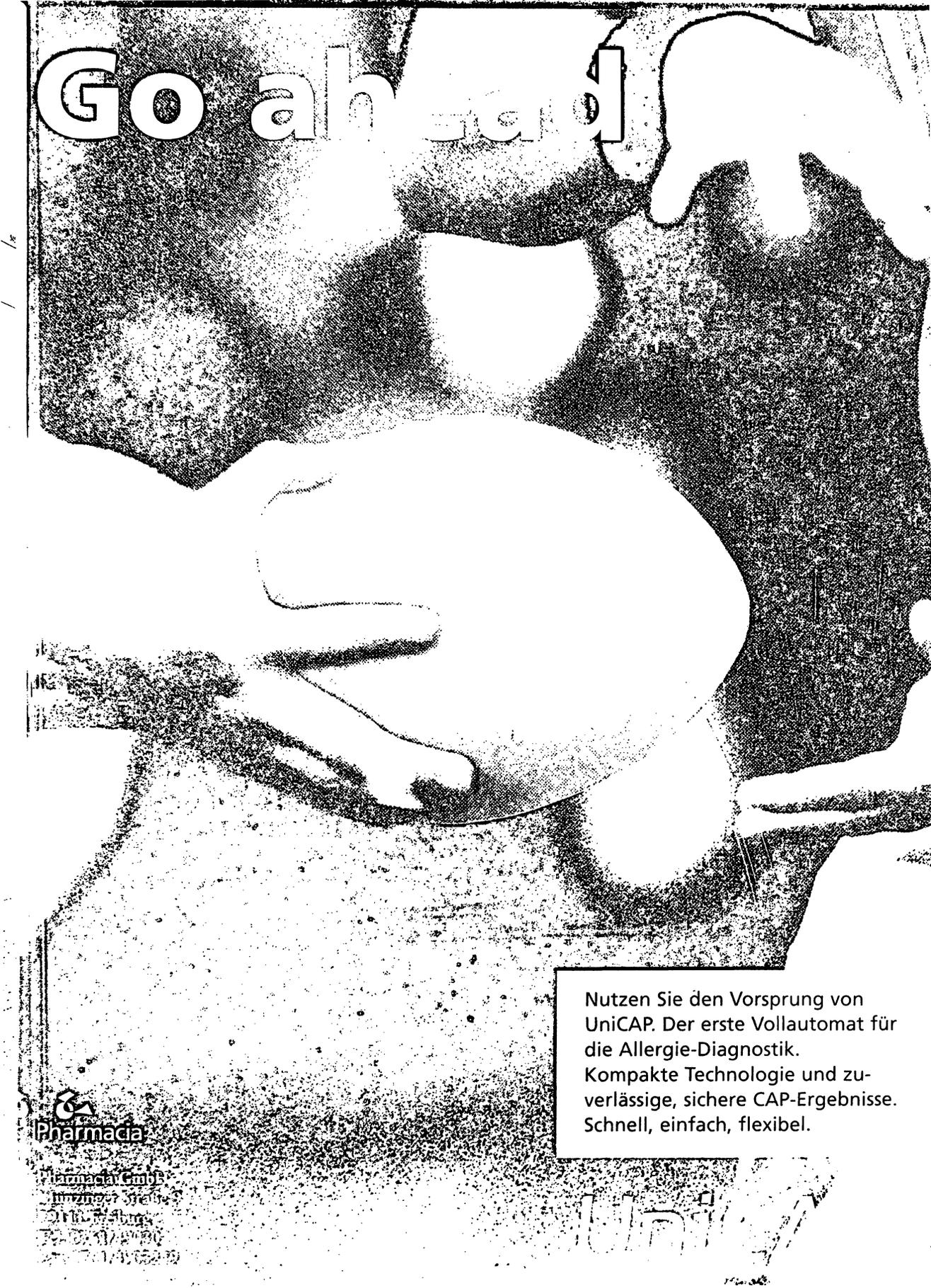


Abbildung 2 Massenspektren der beiden Peaks mit der Retentionszeit 9,7 min. Das obere Massenspektrum entspricht dem Peak aus dem TIC des Pleuraergusses, das mittlere dem TIC des Fencheltees. Das untere Spektrum zeigt die Subtraktion der beiden Massenspektren.

Literatur

1. Tanaka, E. Simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992;575:311-4.
2. Rodopoulos N, Wisen O, Norman A. Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:229-42.
3. Hartley R, Smith IJ, Cookman RJ. Improved high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and its N-demethylated methabolites in plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogr* 1985;342:105-17.
4. Wahllander A, Renner E, Karlaganis G. High-performance liquid chromatographic determination of dimethylxanthine metabolites of caffeine in human plasma. *J Chromatogr* 1985; 338:369-75.
5. Stennert A, Maier HG. Trigonellin in Bohnenkaffee, Vergleich der Dünnschicht- mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Gleichzeitige Bestimmung von Coffein. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993; 196:430-4.
6. Salvadori MC, Rieser E M, Ribeiro Neto, LM, Nascimento ES. Determination of xanthines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of guaraná powder. *Analyst* 1994; 119: 2701-3.
7. Rodopulos N, Norman A. Determination of caffeine and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:305-15.
8. Li SFY. Capillary Electrophoreses - Principles, Practice and applications. *Journal of Chromatography Library*; Vol 52. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier, 1992.
9. Thompson CO, Trenerry VC, Kemmery B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods. *J Chromatogr* 1995;694:507-14.
10. Wichtl M. Teedrogen: Ein Handbuch für Apotheker und Ärzte. Stuttgart (Deutschland): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1984.
11. Pachaly P. Dünnschichtchromatographie in der Apotheke. 2. Auflage. Stuttgart, (Deutschland): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1983.
12. Rompelber CJ, Verhagen H, van Bladeren PJ. Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Food Chem Toxicol* 1993;31: 637-45.
13. Pflieger K, Maurer H, Weber A. Mass spectral and GC data of drugs, poisons and their metabolites (Part I and II), second Edition. Weinheim (Deutschland): VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1985.
14. Michaelis HC, Sharifi S, Schoel G. Rhabdomyolysis after suicidal ingestion of an overdose of caffeine, acetaminophen and phenazone as a fixed-dose combination (Spalt N) *Clinical Toxicology* 1991;29:521-6.
15. Benčekroun Y, Desage M, Ribon B, Brazier JL. Gas chromatographic-mass spectrometric quantitation of tri-, di- and monomethylxanthines and uric acids from hepatocyte incubation media. *J Chromatogr* 1990;532:261-75.
16. Hawthorne SB, Miller DJ, Pawliszyn J, Arthur CL. Solventless determination of caffeine in beverages using solid phase microextraction with fused-silica fibers. *J Chromatogr* 1992;603:185-91.

Go ahead




Pharmacia

Pharmacia GmbH
Lindzinger Straße
D-61169 Frankfurt
Tel. 069 31 4100
Fax 069 31 4152 0

Nutzen Sie den Vorsprung von
UniCAP. Der erste Vollautomat für
die Allergie-Diagnostik.
Kompakte Technologie und zu-
verlässige, sichere CAP-Ergebnisse.
Schnell, einfach, flexibel.

UniCAP