



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Erstellung und Validierung eines HPLC-Systems zur
Qualifizierung von Altersolanolen in biologischer Matrix“

verfasst von

Susanne Satzinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Gelegenheit bedanken, an diesem Diplomarbeitsthema am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik arbeiten zu dürfen.

Insbesondere auch ein großes Danke an die Mitarbeiter dieses Departments für die tolle Atmosphäre. Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen beiden Betreuerinnen Mag. Katharina Schüller und Mag. Elisabeth Wurzer-Priester für ihre Ratschläge bei auftretenden Problemen.

Zum Schluss möchte ich jedoch meiner Familie Dank aussprechen. Insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, dafür, dass sie mir in all den Jahren immer wieder Kraft zum Weitermachen gegeben haben und dass sie mich immer unterstützt haben, egal welche Schwierigkeiten auch immer aufgetreten sind.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich diese vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Die aus fremden Quellen stammenden Gedanken, ob direkt oder indirekt, habe ich nach bestem Wissen kenntlich gemacht.

Ich erkläre auch, dass diese Arbeit weder in dieser noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt oder veröffentlicht wurde.

Wien, August 2014

INHALTSANGABE

1. Einleitung.....	1
2. Rationale.....	2
3. Altersolanol A.....	3
3.1. Allgemeines über Altersolanol A.....	3
3.2. Antimikrobielle Eigenschaften.....	4
3.3. Antitumorwirkung von Altersolanol A.....	5
4. Bioanalytical Method Validation.....	6
4.1. Warum eine Validierung?.....	6
4.2. Schlüsselparameter der Validierung.....	6
4.2.1. Richtigkeit.....	6
4.2.2 Genauigkeit.....	7
4.2.3. Linearität / Eichgerade.....	8
4.2.4. Empfindlichkeit.....	9
4.2.5. Bestimmungsgrenze.....	9
4.2.6 Wiederfindungsrate.....	10
4.2.7. Selektivität (Spezifität).....	10
4.2.8.Stabilität.....	11
4.2.8.1. Kurzzeitstabilität.....	11
4.2.8.1.1. Short-term Temperatur Stability.....	11
4.2.8.1.2. Stress.....	11
4.2.8.1.3. Vorbereitung, Handhabung, Verarbeitung.....	12
4.2.8.2. Langzeitstabilität.....	12
4.2.8.2.1. Freeze and Thaw Stability.....	12
4.2.8.2.2. Stabilität auf Eis.....	12
4.3. weitere Parameter.....	13
4.3.1. Verfahrensstabilität.....	13

4.3.2. Messbereich.....	13
4.3.3. Nachweisgrenze.....	13
4.3.4. Übertragbarkeit.....	14
5. Analytische und präanalytische Methoden.....	14
5.1. präanalytische Methoden.....	14
5.1.1. Festphasenextraktion.....	15
5.1.1.1. Aufbau einer Festphasenextraktionsapparatur.....	15
5.1.1.2. Prinzip der Festphasenextraktion.....	16
5.1.2 Ultrafiltration.....	16
5.2. Analysenmethode HPLC.....	16
5.2.1. Allgemeiner Aufbau von einer HPLC-Anlage.....	17
6. Material und Methoden.....	18
6.1. Stammlösung.....	18
6.2. Geräte und Materialien.....	18
6.3. Reagenzien.....	19
6.4. Laborutensilien.....	19
6.5. Biomatrix.....	19
6.6 Methoden.....	20
6.6.1 HPLC.....	20
6.6.1.1. HPLC-Anlage.....	20
6.6.1.2. HPLC-Analyseparameter.....	20
6.6.2. Festphasenextraktionsvorgang.....	21
6.7. Computerprogramme.....	21
7. Experimenteller Teil.....	22
7.1. Vorprobe - Sättigung der Membranen.....	22
7.2. Validierung von Altersolanol A (ausgewählte Punkte).....	22
7.2.1. Eichgeraden.....	22
7.2.1.1. Eichgerade in PBS.....	22

7.2.1.2. Eichgerade in Plasma.....	23
7.2.2 Stabilität.....	23
7.2.2.1. Langzeitstabilität.....	23
7.2.2.1.1. freeze – thaw – Zyklen.....	23
7.2.2.1.2. Stabilität auf Eis.....	23
7.2.2.2. Kurzzeitstabilität.....	24
7.2.2.2.1. Stress.....	24
7.2.2.2.2. Vorbereitung, Handhabung, Verarbeitung.....	24
7.2.3. Nachweisgrenze.....	25
7.2.4. Bestimmungsgrenze.....	25
7.2.5. Richtigkeit.....	25
7.2.6. Genauigkeit.....	25
7.2.7. Selektivität.....	26
7.2.7.1. Vollblut (modifiziert).....	26
7.2.7.2. Urin.....	28
7.2.7.3. Leberextrakt.....	28
7.2.7.4. Plasma.....	28
8. Ergebnisse und Diskussion.....	29
9. Zusammenfassung.....	52
10. Summary.....	53
11. Lebenslauf.....	54
12. Anhänge, Übersichten, Verzeichnisse.....	55
12.1. Anhänge.....	55
12.2. Literaturverzeichnis.....	60
12.3. Abbildungsverzeichnis.....	63
12.4. Tabellenübersicht.....	65

1.EINLEITUNG

Bioanalytische Methodenvvalidierung ist sehr wichtig, da bioanalytische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen sowie deren Metaboliten in biologischen Matrices (Blut, Serum, Plasma oder Urin) angewendet werden.

Daher ist sie insbesondere für die Durchführung von präklinischen und klinischen pharmakologischen Studien unerlässlich um selektive und zulässige Resultate zu erhalten. Diese Resultate, die sich aus diesen Methoden ergeben, sind nämlich für die Beurteilung und Interpretation von präklinischen und klinischen Studienparametern – also die Beurteilung der Bioverfügbarkeit, der Bioäquivalenz und anderen pharmakokinetischen Parametern - in der pharmazeutischen Entwicklung von Bedeutung. ^{[1][15] [19]}

Um dies zu gewährleisten haben sich Institutionen wie die *Food and Drug Administration* ^[17] und die *International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* mit ihren *Validation of Analytical Procedures*, kurz ICH ^[18]; damit auseinandergesetzt, um die Rahmenbedingungen für die Ermittlung dieser klinischen und präklinischen Daten wichtigen Validierungsparameter, wie zum Beispiel Genauigkeit, Richtigkeit, Stabilität oder Selektivität, zu schaffen. Nicht nur die vorangegangenen erwähnten Institutionen, sondern auch andere haben sich, wie unter anderem Dr. Ludwig Huber mit *Validation and Qualification in Analytical Laboratories* ^{[14] [15]}, mit der Thematik der Validierung beschäftigt. Diese und viele andere Werke geben einen Überblick und stellen wichtige Richtlinien für die Validierung einer eigenen Methode dar. Wie es auch in der folgenden Diplomarbeit der Fall ist

Altersolanole sind Polyketidmetabolite mit teilweise antiinfektiven als auch antitumorösen Eigenschaften, welche bereits in vielen Studien untersucht wurden. Durch steigende Resistenzen der Keime gegen antiinfektive Therapiemaßnahmen, besonders gefürchtet sind vor allem Resistenzen bei den nosokmialen Infektionen, den „Krankenhauskeimen“ wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa*, sowie der steigenden Resistenzentwicklung bei Antitumortheraeutika, ist die Suche nach neuen Therapiemitteln wichtig. Altersolanole sind sowohl als Antiinfektiva als auch als Antitumormittel eine neuere Hoffnung ^[2].

2. RATIONALE

Ziel meiner Diplomarbeit ist die Substanz Altersolanol A mittels HPLC–Analyse unter Berücksichtigung einiger ausgewählten bioanalytischen Validationspunkte zu untersuchen, um dessen Eigenschaften in diesen Reaktions- und Analysenbedingungen zu beurteilen.

3. ALTERSOLANOL A

3.1. Allgemeines über Altersolanol A

Altersolanol A ist ein Tetrahydroanthrachinon, welches nach IUPAC als (1S,2R,3S,4R)-1,2,3,4,8-pentahydroxy-6-methoxy-3-methyl-2,4-dihydro-1H-anthracen-9,10-dion bezeichnet wird. Diese Verbindung hat eine Summenformel von $C_{16}H_{16}O_8$ und entsprechend ein Molekulargewicht von 336,29 g / mol.

Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein Polyketidmetabolit, welche zum Beispiel aus dem endophytischen Pilz *Stemphylium globuliferum* isoliert wurde. Von diesem Pflanzenpathogen aus dem Stamm der Ascomyceten leitet sich auch der alte Synonymname Stemphylin ab.

Viele andere Produzenten dieser Verbindung sind ebenfalls aus dem Stamm der Ascomyceten und entstammen aus der Gattung *Alternaria*. Ein dieser Verbindung namensgebender Vertreter ist *Alternaria solani*, der bei Nachtschattengewächsen wie der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) die Dürrefleckenkrankheit auslöst.

Des Weiteren ist bekannt, dass Altersolanol A in isolierter Form eine gelblichorange bis bräunlich gefärbte feste Substanz ist, die in Dimethylsulfoxid (DMSO) und in hundertprozentigem Ethanol löslich ist.

Altersolanol A sowie einige andere Altersolanole haben eine gewisse phytotoxische und antibakterielle Eigenschaften^{[3][4][5][6]}.

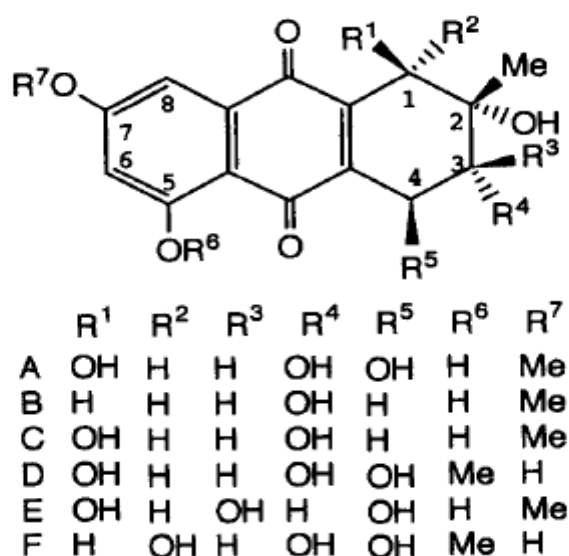


Abb. 01. Darstellung der Grundstruktur von Altersolanole^[7]

3.2. Antimikrobielle Eigenschaften

In vielen Studien wurden die Eigenschaften der Altersolanole untersucht. Diese zeigen, dass zum Beispiel die Altersolanole A bis C und Altersolanol E eine gewisse antimikrobielle Aktivität, unter anderen gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* und auch gegen *Pseudomonas aeruginosa*, besitzen. Wogegen die Altersolanole D und F selbst bei Konzentrationen über 100 µg / ml der keine nennenswerte Aktivitäten aufweisen. Es liegt nahe, dass diesen beiden letztgenannten Verbindungen ineffektiv sind, weil die phenolische Gruppe in peri-Position (siehe Abb. 01. Rest 6) fehlt, welche offensichtlich für die antimikrobielle Wirkung nötig ist. ^[8]

Die Wirkungen von Altersolanol A auf den Erreger *Pseudomonas aeruginosa* wurden von Haraguchi et al. (1992)^[9] anhand des Stammes IFO 3080 näher untersucht:

- Bei einer Konzentration von 30 µg / ml tritt eine dauerhafte bakteriostatische Wirkung von Altersolanol A ein. Die Wirkung scheint nur bakteriostatisch zu sein, weil zwar das Wachstum reduziert wird, aber keine Abnahme der Lebendzellzahl feststellbar ist.
- Des Weiteren bewirkt diese Substanz eine Aufnahmehemmung der Biosynthesebausteine Thymidin, Uracil und L-Leucin ohne einen signifikanten direkten Einfluss auf die DNA-, die RNA- beziehungsweise die Proteinbiosynthese zu haben. Diese Wirkung wurde durch eine weitere Untersuchung von Haraguchi et al. (1996)^[7] anhand einer Pflanzenzellkultur von *Nicotiana rustica* bestätigt. Zu dieser letzten Studie ist noch hinzuzufügen, dass der Hemmeffekt bei Behandlung unter Lichtausschluss wesentlich stärker ist, als unter Lichteinfluss.
- Anders ist der Effekt auf die Kaskade der Zellatmung: Einerseits erhöht Altersolanol A den Sauerstoffverbrauch und die NADH-Oxidase-Aktivität und fungiert auch als Elektronenakzeptor für die Cytochrom c-Reduktase. Andererseits hat die Substanz keinen Einfluss auf die Protonenübertragung in der Zellatmungskaskade. Die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches durch vermehrte NADH-Oxidase-Aktivität wurde in der Studie von Haraguchi et al. (1996)^[7] ebenfalls bestätigt. In dem Sinne, dass dieser aktivitätssteigernder Effekt von Altersolanol A selbst durch Zugabe verschiedener Hemmer des Elektronentransportes nicht beeinflusst wurde. Folglich

kommt es zur erhöhten Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel Hyperoxid – Anionen.

3.3. Antitumorwirkung von Altersolanol A

Altersolanol A zeigt gegenüber der Zelllinie des human chronic myeloid leukemia K562 cancer cells gewisse cytotoxische und antiinflammatorische Eigenschaften ^[10]:

- Die Wirkung des Altersolanol A auf die mononukleären Zellen des peripheren Blutes beruht darauf den Metabolismus ebenjener Zellen zu beeinflussen, aber nicht deren Lebensfähigkeit an sich.

- Altersolanol A hat einen dosis- und zeitabhängigen Effekt auf den Zellteilungszyklus. Das heißt, die mit der Substanz behandelten K562 – Zellen werden in der Sub-G₁-Phase akkumuliert. Anders ausgedrückt; gehen die behandelten Zellen nach einem gewissen Zeitintervall in einen apoptotischen Zustand über. Das liegt darin begründet, dass Altersolanol A für die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-9 sorgt.

Des Weiteren wird durch die Substanz die Bildung von antiapoptotischen Proteinen, wie Mcl-1, XIAP und Bcl-xl, unterdrückt

- Die antiaoptotischen Proteine Mcl-1, XIAP und Bcl-xl werden von NF-κB kontrolliert. Altersolanol A begünstigt eine dosisabhängige Hemmung der TNF-α-assozierten NF-κB-Aktivierung in den K562-Zellen.

4. BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION

4.1 Warum eine Validierung?

Als bioanalytische Methodenvvalidierung bezeichnet man den Vorgang, der nötig ist um eine quantitative analytische Methode für biomedizinische Anwendungen zu etablieren und um folglich einheitliche, zuverlässige und korrekte Daten zu erhalten

Allerdings bietet eine Methodenvvalidierung keine vollkommene Garantie für die Qualität der Ergebnisse, sondern ist ein Bestandteil der Qualitätssicherung.

Denn neben der Methodenvvalidierung bedarf es eines geeigneten Messgerätes.

Die in diesem Bereich am häufigsten angewendete Technik ist die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Bei dieser chromatographischen Technik gibt es einige Schlüsselparameter, deren Evaluierung wichtig sind:

- Wiederfindungsrate (recovery)
- Linearität / Eichgerade (response function)
- Empfindlichkeit (sensitivity)
- Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ)
- Genauigkeit (precision)
- Richtigkeit (accuracy)
- Selektivität (oft auch Spezifität; selectivity)
- Stabilität

Weitere Validierungsparameter sind:

- Messbereich (range)
- Nachweisgrenze (limit of detection, LOD)
- Robustheit ^{[1] [11] [14] [16] [18] [19]}

4.2 Schlüsselparameter der Validierung

4.2.1 Richtigkeit (accuracy)

Richtigkeit definiert sich als Übereinstimmung inwiefern die gemessenen Einzelwerte am wahren Wert liegen.

Da im Regelfall der wahre Wert nicht bekannt ist, wird eine Schätzung angestrebt indem drogenfreie Matrix mit einer bekannten Konzentration des Analyten versetzt wird.

Zur Bestimmung werden drei verschiedene Konzentrationen mit je fünf Vermessungen durchgeführt. Nach den Vermessungen vergleicht man die gemessenen Werte mit dem wahren Wert sowie dieser in der Probenmischung vorkommt.

Mathematisch wird dies folgendermaßen beschrieben: $\% \text{ Accuracy} = \frac{(\text{gemessener Wert} - \text{wahrer Wert})}{\text{wahrer Wert}} \cdot 100$.

Die Abweichungen des Mittelwertes sollten nicht mehr als 15 % vom tatsächlichen Wert betragen.

Es ist zu empfehlen, dass bei diesem Parameter dieselben Konzentrationen wie bei der Bestimmung der Genauigkeit verwendet werden. ^{[11] [12] [14] [19]}

4.2.2. Genauigkeit (precision)

Genauigkeit definiert sich als Übereinstimmung von wiederholten Messungen derselben Probe.

Dieser Parameter wird in drei Unterpunkte eingeteilt:

- **Wiederholbarkeit** (repeatability, within-run precision, within-day precision, intra-assay-precision):

Damit wird die Genauigkeit unter denselben Arbeitsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls, wie zum Beispiel innerhalb von 24 Stunden, ausgedrückt.

Es wird empfohlen, dafür drei verschiedene Konzentrationen mit mindestens fünf Bestimmungen pro Konzentration zu vermessen.

- **Vergleichspräzision** (intermediate precision, between-run, between-day, inter-assay precision, Laborpräzision):

Die Vergleichspräzision beschreibt inwieweit in einem einzelnen Labor eine Methode außerhalb eines Arbeitszyklus ähnliche Ergebnisse liefert. Damit werden

Schwankungen innerhalb bestimmter Zeitintervalle, von verschiedenen Gerätschaften und Reagenzien innerhalb eines selben Labors oder auch durch die Bearbeitung unterschiedlicher Analytiker erfasst

Bei der Validierung bioanalytischer Methoden wird bei der Bestimmung von Schwankungen innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls empfohlen, diese an vier aufeinanderfolgenden Tagen beziehungsweise anhand vier verschiedenen Bearbeitungsänderungen (zum Beispiel von verschiedenen Analytikern) durchzuführen und die Ergebnisse mit der entsprechenden Konzentration der Wiederholbarkeit zu vergleichen.

- **Reproduzierbarkeit** (reproducibility):

Damit wird die Genauigkeit zwischen verschiedenen Laboratorien und anderen Analytikern erfasst. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit ist sehr wichtig, da in anderen Labors mit großer Wahrscheinlichkeit Gerätschaften und Reagenzien etc. von anderen Herstellern verwendet werden. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit dient zur Feststellung inwieweit diese Faktoren Einfluss auf die Analysensubstanz nehmen könnten.

Ausgedrückt wird die Genauigkeit als relative Standardabweichung (RSD) = $[(\text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert der Messungen}) * 100]$

Die Grenzwerte für die Genauigkeit sollten nicht mehr als 15 % der relativen Standardabweichung überschreiten. ^{[11] [12] [14] [18] [19]}

4.2.3. Linearität / Eichgerade (response function)

Linearität wird als Eigenschaft eines analytischen Verfahrens definiert, Ergebnisse zu liefern, die innerhalb des angegebenen Bereiches direkt proportional zu den angegebenen Konzentrationen des Analyten sind.

Dieser Parameter wird auch Eichgerade genannt.

Bei chromatographischen Methoden wird die Peakhöhe beziehungsweise die Peakfläche (also die Response) häufig als lineare Beziehung zur Konzentration dargestellt. Graphisch erfolgt dies als eine Gerade in der die Response auf der y-Achse im Verhältnis zur Konzentration des Analyten auf der x-Achse stehen.

Diese als lineare Regressionsgerade bezeichnete Darstellung sollte einen Achsenabschnitt haben, der keine zu signifikante Abweichung von Null hat. Weitere wichtige Parameter sind der Korrelationskoeffizient, die Summe der quadratischen Abweichungen und die Steigung der Regressionsgerade

In der Bioanalytik ist es wichtig für jede Matrix mit der weitergearbeitet wird eine eigene Eichgerade erstellt werden.

Durchgeführt wird die Bestimmung von der Stammlösung ausgehend als Verdünnungsreihe und mit mindestens fünf Konzentrationen. Oder, wenn eine Verdünnungsreihe nicht möglich ist, indem jede Probenmischung der synthetischen Mixturen einzeln abgewogen wird.

Am besten ist es, wenn die Konzentrationen den Rahmen von 80 bis 120 Prozent des zu erwartenden Konzentrationsbereiches abdecken. [11] [12] [14] [17] [18] [19]

4.2.4. Empfindlichkeit (sensitivity)

Die Empfindlichkeit wird durch die Steigung der Eichgerade ausgedrückt. Eine Methode wird als empfindlich betrachtet, wenn kleine Konzentrationsänderungen große Veränderungen in der Response verursachen.

Dieser Parameter wird oft mit der Nachweisgrenze (LOD) gleichgesetzt. Jedoch beschreibt die Empfindlichkeit die Fähigkeit einer analytischen Methode kleine Abweichungen des Probenanalyten bezüglich Konzentration oder Masse festzustellen. Das ist in der Praxis die Steigung der Eichgerade.

Als Nachweisgrenze definiert sich jedoch jene Menge beziehungsweise jene Konzentration bei der der Analytenpeak mindestens zwei bis dreimal höher ist als das Grundrauschen. [11] [12] [14]

4.2.5. Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ)

Als Bestimmungsgrenze gilt jene Analysenmenge, die noch quantitativ erfassbar ist und dabei eine akzeptable Genauigkeit und Richtigkeit aufweist. Für die Bestimmung dieses Parameters werden im Regelfall Proben mit bekannter Analytenkonzentration verwendet. Hierbei ist besonders wichtig, dass es sich nicht um reine Analytenkonzentrationen handelt, sondern um Probenzubereitungen, die mit Matrix versetzt sind.

Bei chromatographischen Methoden wird dieser Parameter bestimmt, indem die Signale gemessener Konzentrationen mit Leerwerten verglichen werden.

Als Grenze gilt ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1. ^{[12] [14] [17] [18]}

4.2.6. Wiederfindungsrate (recovery)

Die Wiederfindungsrate beschreibt die Effizienz der auf biologischer Matrix basierenden Probenvorbereitung im Vergleich zu einem Standard in Lösungsmittel. Damit soll festgestellt werden, ob die gesamte Substanzmenge in der bearbeiteten Probe detektiert wird. Das macht eine achtsame Probenbearbeitung besonders wichtig.

Die Durchführung erfolgt am besten in einem niedrigen, einem mittleren und einem hohen Konzentrationsbereich, um den Messbereich der interessanten Konzentrationen abzudecken. Die Bestimmung dieses Parameters erfolgt am besten als neunfache Vermessung à je drei Probenzubereitungen pro Konzentration.

Dieser Parameter ist ähnlich der Richtigkeit, allerdings inkludiert die Wiederfindungsrate die Extraktionsleistung der Analysenmethode. Die Berechnung erfolgt als $[(\text{Response der bearbeiteten Probe in Matrix} / \text{Response des reinen Standards}) * 100]$. ^{[11] [12] [14]}

4.2.7. Selektivität (auch Spezifität)

Die Methode muss in der Lage sein den zu untersuchenden Analyten auch in Gegenwart anderer Komponenten zu detektieren. Im Regelfall sind diese Komponenten Verunreinigungen, Abbauprodukte oder auch Bestandteile von Matrices, welche im optimalen Fall durch die Probenaufreinigung vollständig entfernt werden. Dennoch gilt eine Methode als selektiv wenn die Response des gewünschten Analyten von den Peaks der möglichen Störungen klar zu unterscheiden ist.

Es wird empfohlen mit mindestens 6 unabhängigen Quellen von Zielmatrices zu arbeiten und die Interferenzen von den endogenen Matrixkomponenten mit Standard zu vergleichen. ^{[12] [14] [17] [18] [19]}

4.2.8. Stabilität

Da chemische Verbindungen schon vor dem analytischen Prozess, also während der Herstellung der Probenlösungen, bei der Aufreinigung oder unter anderem bei der Lagerung der zubereiteten Analysenproben - sowohl im Kühlschrank als auch im Autosampler - zerfallen sein können, ist es wichtig die Stabilität des Analyten zu prüfen.

Dazu ist eine frisch zubereitete Stammlösung des Analyten in einer von Störfaktoren freien Lösung (oder Matrix) wichtig.

Die Testbedingungen sollen die tatsächlichen Arbeitsbedingungen widerspiegeln, das heißt, die long-term-storage jene Lagerbedingungen wenn eine Probe eingefroren wird. Die short-term-storage beschreibt die Bedingungen bei denen die Proben für kurze Analysenreihen Raumtemperatur ausgesetzt sind.

In der Bioanalytik besonders wichtig ist die Überprüfung nach freeze-and-thaw-Zyklen. ^{[11] [12] [14] [19]}

4.2.8.1. Kurzzeitsstabilität (short term stability)

4.2.8.1.1 Short-Term Temperature Stability

Hierfür sollten mindestens je drei Aliquote einer niedrigen und einer hohen Konzentration herangezogen werden und nach einer Tiefkühlagerung bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Nach dem Auftauen werden sie 4 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend analysiert. ^{[12] [13]}

4.2.8.1.2 Stress

Um den Abbau der Verbindung zu forcieren wird die Analysenprobe zum Beispiel erhöhter Temperatur, Feuchtigkeit, Lichteinfluss (UV-Licht) oder verschiedenen pH-Werten, ausgesetzt. ^{[12] [13]}

4.2.8.1.3 Vorbereitung, Handhabung, Verarbeitung (stability of processed samples)

Wichtig, um zu bestimmen, ob die verarbeiteten Proben, die zum Beispiel in einem Autosampler / bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, stabil bleiben.

Es sollten mindestens 2 Konzentrationen je 24 und 48 Stunden nach Herstellung erneut vermessen werden.

Eventuell sollten bei auftretenden Instabilitäten geeignete Maßnahmen in Betracht gezogen werden (zum Beispiel Zugabe eines Puffers, Antioxidantien oder Enzymhemmer) ^{[1] [11] [12] [13]}

4.2.8.2 Langzeitstabilität (long term stability)

Die Lagerungsdauer bei der Bestimmung dieses Parameters der Langzeitstabilität sollte bevorzugterweise die Zeitspanne von der ersten Probennahme bis zur letzten Probenanalyse umfassen. ^{[12] [19]}

4.2.8.2.1 Freeze and Thaw Stability

Nach drei Freeze-Thaw-Cycles (dt. Gefrier-Auftau-Zyklen) werden die Analysenproben vermessen. Es sollten für diese Bestimmung mindestens je drei Aliquote einer niedrigen und einer hohen Konzentration herangezogen werden. Diese Konzentrationen sollten in einem Intervall von 24 Stunden unter Kühlung gelagert werden und nach diesen 24 Stunden ohne Hilfsmittel bei Raumtemperatur aufgetaut werden. ^{[12] [19]}

4.2.8.2.2 Stabilität auf Eis (stability on ice)

Für diesen Parameter genügen vier Aliquote einer Konzentration, die bei – 80 °C eingefroren werden und in bestimmten Zeitintervallen (zum Beispiel nach 1 Tag, nach 10 Tagen, nach 25 Tagen und nach 40 Tagen) aufgetaut und vermessen werden. Diese Vermessungen werden mit einer frisch zubereiteten und sofort vermessenen Probe entsprechender Konzentration verglichen. ^{[12] [13]}

4.3. weitere Parameter

4.3.1. Verfahrensstabilität (robustness)

Damit wird die Widerstandsfähigkeit eines analytischen Verfahrens bestimmt inwieweit die Methode die Fähigkeit hat, bei kleinen Abweichungen der Parameter beständig zu bleiben. Dieser Parameter dient als Indikator für die Zuverlässigkeit des Verfahrens während der normalen Anwendung.

Es wird überprüft, welchen Einfluss die Bearbeitungsparameter wie zum Beispiel pH-Werte, Flussrate, Säulentemperatur, Einspritzvolumen, Wellenlänge des Detektors oder die Zusammensetzung der mobilen Phase, auf die Analysenergebnisse haben. Dazu werden diese Faktoren innerhalb eines realistischen Bereichs variiert und der quantitative Einfluss der Variablen geprüft. Sind diese Abweichungen innerhalb eines zuvor festgelegten Toleranzbereiches, ist diese Methode robust.

Dieses Vorgehen soll die Entscheidung unterstützen, ob eine Methode erneut validiert werden muss, sobald eine oder mehrere Parameter verändert werden. [12] [14]
[17] [18]

4.3.2. Messbereich (range)

Als Messbereich einer analytischen Methode wird jene Spanne von der niedrigsten zur höchsten Konzentration eines Analyten beschrieben. In dieser Definition sind auch Konzentrationen einbezogen, welche zur Bestimmung der Genauigkeit, der Richtigkeit und der Linearität verwendet werden. [12] [18]

4.3.3. Nachweisgrenze (limit of detection; LOD)

Die Nachweisgrenze ist jener Wert eines analytischen Verfahrens, in welchem die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Probe gemessen werden kann. Diese Konzentration muss nicht notwendigerweise als exakter Wert quantifiziert sein. Dafür ist jener Messwert ausreichend, der sich klar von den Unsicherheiten des Analyseverfahrens abgrenzt.

Bei chromatographischen Verfahren gilt ein Signal-Rausch-Verhältnis von

mindestens 3:1 als Grenze. Das heißt, der Probenpeak sollte dreimal so hoch sein wie das Grundrauschen. [12] [14] [17]

4.3.4. Übertragbarkeit (ruggedness)

Der Parameter wurde durch den Parameter der Reproduzierbarkeit ersetzt, welcher dasselbe zum Ausdruck bringt. Er definiert sich als Grad der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen unter unterschiedlichen Bedingungen, wie zum Beispiel unterschiedliche Laboratorien, Analytiker oder Gerätschaften. [12] [14]

5. ANALYTISCHE UND PRÄANALYTISCHE METHODEN

5.1 präanalytische Methoden [20]

Als präanalytische Methoden sind sowohl Vorgänge zur Probengewinnung als auch zur Probenaufreinigung gemeint. Immerhin liegt das Analysenmaterial meistens nicht in reiner Form vor, sondern ist ein Gemisch aus verschiedenen Matrixbestandteilen

Die Ziele der präanalytischen Methoden sind:

- die Isolierung
- die Reinigung und
- die Konzentrierung des Analyten.

Zu diesen Methoden für die Reinigung und Anreicherung zählen unter anderem:

- Ultrazentrifugation
- Filtration (Mikrofiltration, Ultrafiltration)

Sowie diverse Extraktionsmethoden, wie zum Beispiel:

- adsorptive Extraktionstechniken, wie die Festphasenextraktion (solid phase extraction; SPE)

5.1.1. Festphasenextraktion ^[21]

Die Festphasenextraktion ist für viele verschiedene Substanzen geeignet. Vor allem hat diese Methode viele Vorteile:

- Sie ist leistungsfähig
- Sie ist einfach durchzuführen
- und das mit geringen Lösungsmittelverbrauch.

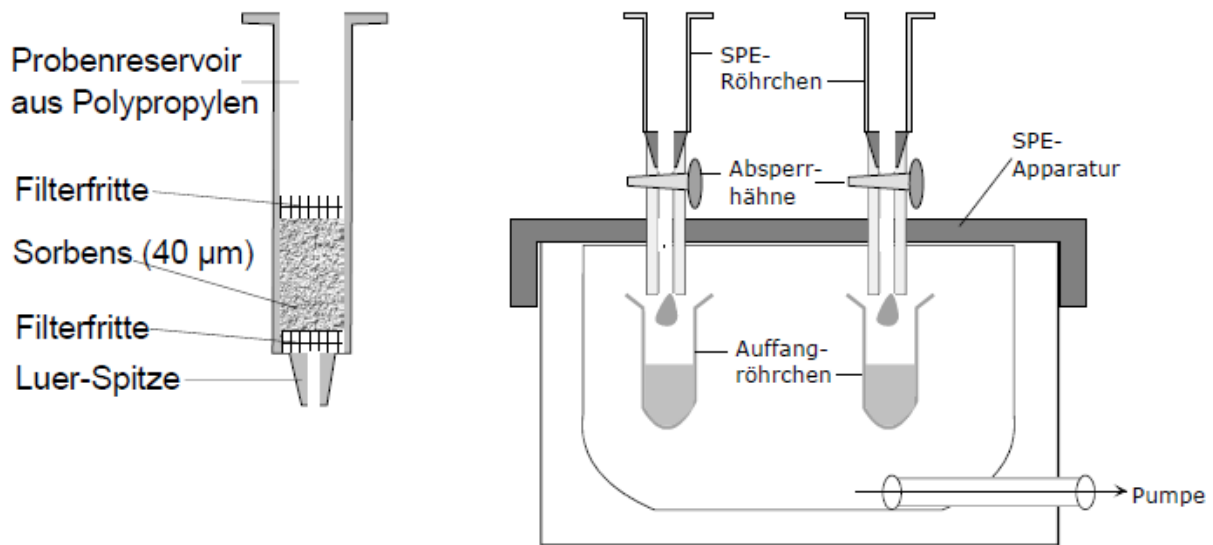


Abb. 02. Schematischer Aufbau einer SPE-Kartusche (links) und einer SPE-Apparatur (rechts) ^[21]

Aufgebaut sind (siehe Abb. 02 links) die im Durchschnitt sieben Zentimeter großen Extraktionsröhrchen aus einer Polypropylenhülle oder auch aus Glas. In diesen Röhrchen ist das Sorbens, welches je nach der zu extrahierenden Verbindung aufgebaut ist und in etwa eine eineinhalb Zentimeter hohe Schicht ausmacht. Dieses Sorbens stellt die stationäre Phase des Aufreinigungsvorganges dar. Ober – und unterhalb dieses Sorbens ist eine Filterfritte eingebracht. ^[21]

5.1.1.1. Aufbau der Festphasenextraktionsapparatur(Abb. 02 rechts)

- Eine SPE-Apparatur besteht aus einer Vakuumkammer (meistens aus Glas) in der ein Unterdruck erzeugt werden und somit die Elution beschleunigt werden kann.
- Auf dieser Glaskammer ist ein Deckel mit Anschlüssen für die SPE-Kartuschen. An

diesen Anschlüssen sind Absperrhähne um den Elutionsvorgang regulierbarer machen zu können. ^[21]

5.1.1.2. Prinzip der Festphasenextraktion

- Das Konditionieren der Elutionssäule soll für ein Gleichgewicht zwischen Sorbens und mobiler Phase sorgen.
- Danach wird die Probe durchgelaufen lassen. Der Probenanalyt und mögliche unerwünschte Verunreinigungen werden durch Wechselwirkungen unterschiedlich stark an der stationären Phase festgehalten. Damit kann man die erwünschte Substanz anreichern oder unerwünschte Verbindungen abtrennen.
- Anschließend erfolgt ein Waschdurchgang mit Lösungsmitteln, die jedoch keine Desorption des Analyten vom Sorbens begünstigen sollten. Dennoch sollten die zugesetzten Reagenzien stark genug sein um die meisten Verunreinigungen abzutrennen
- Zum Schluss wird mit Hilfe eines geeigneten „starken“ Lösungsmittels der Analyt von dem Sorbens losgelöst. ^[21]

5.1.2. Ultrafiltration

Das allgemeine Prinzip der Filtration beruht darauf feste und flüssige Bestandteile mithilfe einer Membran voneinander zu trennen.

Die Ultrafiltration dient unter anderem zur Aufkonzentrierung verdünnter Proteinlösungen.

Dazu werden Membranfilter verwendet, deren Poren klein genug sind um die gewünschte Verbindung nicht durchzulassen, aber sehr kleine Moleküle wie Wasser oder Salzionen passieren zu lassen. ^[22]

5.2. HPLC ^[23]

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography) ist eine Verbesserung der klassischen Flüssigchromatographie. Das Prinzip der Flüssigchromatographie beruht darauf, dass die gelöste

Analysensubstanz unterschiedlich intensive Wechselwirkungen zwischen der stationären festen Phase und der mobilen flüssigen Phase aufweist. Als Ergebnis solcher Wechselwirkungen erhält man Chromatogramme bei denen die erhaltenen Signale gegen die Zeit aufgetragen werden. Auf diesen sind dann die Analyten als Peaks dargestellt und diese Zeiten an denen die Peaks auf dem Chromatogramm erscheinen, den sogenannten Retentionszeiten, können ein Charakteristikum für diese Analyten darstellen.

5.2.1. Allgemeiner Aufbau von einer HPLC- Anlage

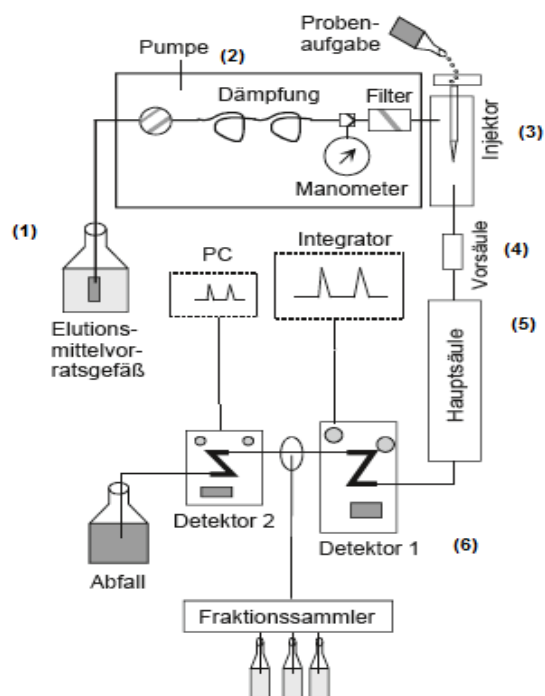


Abb. 03 allgemeiner Aufbau einer HPLC-Anlage ^[23]

Das Elutionsmittelvorratsgefäß (1) enthält die mobile Phase, welches von dort mittels einer Hochdruckpumpe (2) zum Injektor (3) gebracht wird. Dieser kann im Regelfall Probenmengen von 5 bis 20 µl ins System abgeben. Von dort kommt dieses Volumen zuerst auf die Vorsäule (4). Eine Vorsäule dient dazu Verunreinigungen größtmöglich von der eigentlichen Analytensubstanz abzutrennen. Damit an der Hauptsäule (5) eine möglichst genaue Auftrennung der gewünschten Verbindungen stattfinden kann. Diese Auftrennung wird an einem beziehungsweise mehreren Detektoren (6) mithilfe von Integratoren oder Computern graphisch dargestellt. ^[23]

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Stammlösung

Die Reinsubstanz Altersolanol A stammt von SEALIFE PHARMA GMGH (3430 Tulln, Österreich). Die Stammlösung aus der in der Regel weiterverdünnt wurde, betrug 1 mg / ml in PBS + 1 % DMSO (Dimethylsulfoxid). Diese wurde unabhängig von mir zubereitet.

Es wurde in der Regel mit PBS oder Plasma aufgefüllt.

6.2. Geräte und Materialien

Zentrifugation, Ultrafiltration:

- EBA 12 R von Hettich Zentrifugen
- Labofuge 400 von Heraeus Instruments
- Ultrafiltrationskartuschen Centrisart (20000 MWCO) von Sartorius
- Zentrifugenröhrchen (mit lila Schraubkappe) à 15 ml von VWR international

Tiefkühlung / Lagerung:

- forma 900 series von Thermo scientific

Stabilität:

- UV-Lampe von Camag
- DRI-Block DB 2A von Techne

Biomatrix:

- Ultraturrax Tube Drive Control von Ika
- Analysenwaage Sartorius handy H110 von Sartorius Mechatronics Austria
- Combimag RET mit Heizplatte von Ika

Homogenisation:

- Mini Shaker MS1 von Ika

Festphasenextraktion:

- Vakuum-SPE-Einheit von Alltech
- Kartuschen Oasis HLB 1 cc, 30 mg Sorbent / Kartusche (30 µm Teilchengröße) von Waters

Eluententgasung:

- Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 510 von Bandelin

6.3. Reagenzien

- Phosphatpuffer isoton mit Natriumchlorid, 10 mmol, pH 7,4 (PBS)
- pH4: Natriumacetat-Lösung
- pH 9: Phosphat – Pufferlösung
- Methanol für HPLC von Merck
- Acetonitril für HPLC von Merck
- Aqua bidestillata
- NaH_2PO_4 von Sigma-Aldrich
- NaH_2PO_4 + Methanol (9 + 1; v / v)
- NaH_2PO_4 + Methanol (1 + 9; v / v)

6.4. Laborutensilien

- Eppendorfgefäße à 1,5 ml von Brand
- HPLC-Vials 2-SV(A) von Chromacol
- Mikroinsätze 150 µl von Chromacol
- Mikroliterpipetten 20 – 200µl, 100 – 1000 µl (1 – 10 ml inklusive einer 10 ml Pipettenspitze) von Eppendorf research
- Pipettenspitzen gelb (2 – 200 µl) und blau (50 – 1000 µl)

6.5 Biomatrix

- Vollblut: Das bearbeitete Vollblut stammte vom Roten Kreuz (Konserve A, Rh D positiv; Verfall am 17.04.2011 08:44)
- Urin: Der Urin stammte von einem freiwilligen Spender und einer freiwilligen Spenderin des Departments
- tierische Leber aus dem Lebensmittelhandel

6.6. Methoden

6.6.1. HPLC

6.6.1.1. HPLC-Anlage (Merck Hitachi Interface D-7000)

- Autosampler: Merck Hitachi LaChrom L-7200
- Pumpe: Merck Hitachi LaChrom L-7100
- Säulenofen: Jetstream 2
- Kartuschensystem: Edelstahl-Kartuschensystem für Vor- und Trennsäule ohne Totvolumen
 - Vorsäule: Symmetry C8 Waters (10 µm, 20 x 4,6 mm ID)
 - Trennsäule: Symmetry C8 Waters (3,5 µm, 100 x 4,6 mm ID; 11000 plates)
- UV-Detektor: Merck Hitachi LaChrom L-7400
- Hardware: Compaq Deskpro XL 5100 (32 MB RAM, 2 GB Harddisk, Windows NT) Monitor 171 FS Drucker: Hewlett Packard Deskjett 600
- Software: Windows NT "HSM D-7000" Software zur Kontrolle und Integration

6.6.1.2. HPLC- Analyseparameter

- Säulentemperatur: 37 °C
- Eluent: KH₂PO₄-Puffer (1 g / l)-Methanol-Acetonitril (80 / 10 / 10; v / v / v); im Ultraschallbad für die Anwendung entgast
- Flussrate: 0,8 ml / min
- Druck: 115 bar
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektion: 270 nm
- Retentionszeit Altersolanol A: ca. 8 min

Jede zubereitete Probenmischung wurde im Regelfall als Doppelbestimmungen durchgeführt, ausgenommen die Standards für die Richtigkeit (je dreimal vermessen) und die Probenmischungen der Genauigkeit (je fünfmal vermessen)
Weiters wurde für einen Unterpunkt der Genauigkeitsbestimmung eine ACE HPLC-Column anstelle der Waters-Column verwendet.

6.6.2. Festphasenextraktionsvorgang

- Die Aktivierung erfolgt mittels 1 ml Methanol
- Anschließend wird mit 1 ml NaH_2PO_4 (1,8 g / 1 l Wasser)+Methanol (9+1; v / v) konditioniert.
- Bei der Probenauftragung wird 1 ml - oder so viel wie vom Plasma oder Gewebshomogenisat gewollt - aufgegeben.
- Dann wird mit 1 ml NaH_2PO_4 + Methanol (9+1, v/v) gewaschen.
- Zuletzt erfolgt die Elution mit dem gleichen Volumen NaH_2PO_4 + Methanol (1+9, v/v) mit der die Probenmenge aufgetragen wurde.

6.7. Computerprogramme

- Microsoft Office Excel 2010 (Berechnung der erhaltenen Daten)
- Microsoft Office Word 2010 / Word 2013 (Verfassen / Überarbeiten der Diplomarbeit)
- Microsoft Office Paint 2010 (Bearbeiten von Chromatogrammen)
- GraphPad Prism 5 (Darstellung und Berechnung der Rohdaten)

7. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

7.1. Vorprobe - Sättigung der Membranen

Zu diesem Zweck wurde eine Altersolanol A- Lösung von 5 µg / ml in PBS hergestellt. Mithilfe dieser Lösung wurde bestimmt, wie viele Waschungen nötig sind um die Membran abzusättigen, damit der Substanzverlust während der Bearbeitung möglichst gering bleibt.

Zuerst wurden aber sowohl die Vivaspin-Kartusche als auch die Centrisart-Kartusche mit Wasser vorgewaschen. Das heißt, die Vivaspin-Kartusche wurde zuerst einmal mit 1 ml destilliertem Wasser angefüllt und 10 min bei 3500 U / min im Labofuge 400 zentrifugiert. Das Wasser wurde nach der Zentrifugation verworfen. Anschließend wurde fünfmal mit je 200 µl der Altersolanol-Lösung bei 3500 U / min zentrifugiert und jedes Filtrat zur HPLC-Analyse gesondert aufgehoben.

Mit der Centrisart-Kartusche wurde ebenfalls mit Wasser vorgewaschen und anschließend fünfmal mit je 700 µl dieser Lösung zentrifugiert. Auch hiervon wurden die einzelnen Filtrate per HPLC bestimmt.

Von den erhaltenen Werten eine Kurve im Prism 5 erstellt.

7.2. Validierung von Altersolanol A (ausgewählte Punkte)

7.2.1. Eichgeraden

7.2.1.1. Eichgerade in PBS

Hierfür wurden mittels Verdünnungsreihe aus der ursprünglichen Stammlösung - entsprechend 1 mg / ml Altersolanol A in PBS + 1% DMSO - unterschiedliche Konzentrationen hergestellt: 10 µg / ml; 5 µg / ml; 2,5 µg / ml; 1,25 µg / ml; 0,625 µg / ml; 0,313 µg / ml; 0,156 µg / ml und 0,078 µg / ml. Jeder Verdünnungsschritt wurde mit PBS aufgefüllt.

Anschließend erfolgte eine doppelbestimmte, sofortige HPLC-Analyse beginnend mit der niedrigsten Stoffmenge bis hin zur höchsten.

Unter Beachtung, dass ausreichend Probenmenge hergestellt wurde, wurde die HPLC-Bestimmung dieser Proben 1 Woche, 2 Wochen und 4,5 Wochen nach der Herstellung erneut ausgeführt.

Die Probenmengen wurden sehr gut lichtgeschützt, dicht verschlossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

7.2.1.2. Eichgerade in Plasma

Es wurde eine Eichgerade in Plasma analog jener in PBS hergestellt, unter Berücksichtigung der LOQ (0,078 µg / ml) und unter Verwendung von Plasma anstelle PBS. Diese Proben wurden vor der HPLC-Analyse noch festphasenextrahiert.

7.2.2 Stabilität

7.2.2.1. Langzeitstabilität

7.2.2.1.1. freeze – thaw – cycles

Für diese Parameterbestimmung wurden je 2 Konzentrationen (0,5 µg / ml und 5 µg / ml) jeweils als PBS- und als Plasmaproben hergestellt. Aus allen vier Analysenproben wurde je ein Aliquot für die sofortige HPLC-Analyse entnommen. Die sofort analysierten Probenaliquote dienen zum Vergleich als Nullwerte. Der restliche Probenanteil wurde je Konzentration und Lösungsmittel in je drei Reaktionsgefäße aufgeteilt und in den Tiefkühler (- 80 °C) gepackt. In den drei folgenden Tagen wurden alle Probenaliquote bis zum vollständigen Auftauen, also in etwa eine Stunde, bei Raumtemperatur gelagert. Und danach anschließend wieder in den Tiefkühler zurückgebracht. Am dritten Tag wurden die Proben allerdings nach dem Auftauen vermessen.

Die plasmahältigen Probenaliquote wurden unmittelbar vor der HPLC-Analyse mittels Festphasenextraktion aufgereinigt.

7.2.2.1.2. Stabilität auf Eis (stability on ice)

Dazu wurde ausreichend Probenmenge in der Konzentration von 2,5 µg / ml in PBS hergestellt. Davon wurde gleich nach der Herstellung ein Aliquot entnommen und vermessen. Der Rest dieser Probe wurde in 5 Eppendorfgefäße aufgeteilt und anschließend im Tiefkühlschrank bei - 80 °C eingefroren und einzelne

Probenaliquote in bestimmten Zeitintervallen (Tag 1, Tag 7; Tag 14; Tag 20 und Tag 34) bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend vermessen.

7.2.2.2. Kurzzeitstabilität

7.2.2.2.1. Stress:

•Temperatur

Für diese Untersuchung wurde Altersolanol A in der Konzentration von 2,5 µg / ml in ausreichender Menge hergestellt, auf drei Probenaliquote in 1,5 ml - Eppendorfgefäße aufgeteilt und anschließend je ein Aliquot für eine Stunde bei 37 °C, bei 40 °C und 42 °C auf dem Heizblock erwärmt.

•UV (254 nm und 366 nm)

Um zu testen, ob ein Einfluss von Licht der verschiedenen Wellenlängen die Substanz verändern kann, wurde eine Konzentration von 1,25 µg / ml in PBS in ausreichender Menge hergestellt. Anschließend wurde von dieser Probe ein Aliquot als Standard vermessen und die verbliebene Probenmenge in zwei verschließbare Glasgefäße aufgeteilt. An Tag 1; Tag 3; Tag 7 beziehungsweise Tag 10 und Tag 21 wurden diese Gefäße für etwa zwei Stunden bei entsprechender Wellenlänge unter dem UV-Gerät belassen. In der Zeit zwischen den Bestrahlungen unter der UV-Lampe wurden die Proben normalem Tageslicht ausgesetzt.

•Einfluss des pH-Wertes

Um die Beständigkeit von Altersolanol A zu prüfen, wurden 3 Proben der Konzentration von 5 µg / ml hergestellt. In diesem Falle eine Konzentration mit pH 7,4 – entspricht den hergestellten PBS-Lösungen – bei pH 4 und pH 9. Anstelle PBS wurde bei pH 4 und pH 9 mit entsprechender Pufferlösung aufgefüllt.

7.2.2.2.2. Vorbereitung, Handhabung, Verarbeitung (stability of processed samples)

Dazu wurde eine ausreichende Probenmenge in der Konzentration von 5 µg / ml Altersolanol A in Plasma hergestellt und anschließend vermessen. Nach 24 Stunden Stehenlassen im Autosampler wurde dieselbe Probe erneut vermessen.

Im Gegensatz zu anderen Plasmaproben erfolgte hier keine Festphasenextraktion vor der Analyse

7.2.3. Nachweisgrenze (limit of detection; LOD)

Um diese für Altersolanol A zu bestimmen, wurde eine Konzentration von 0,625 µg / ml in PBS hergestellt. Aus dieser wurden die folgenden Konzentrationen 0,313 µg / ml, 0,156 µg / ml, 0,078 µg / ml, 0,039 µg / ml, 0,020 µg / ml, 0,0098 µg / ml, 0,0049 µg / ml und 0,0024 µg / ml in PBS entsprechend einer Verdünnungsreihe hergestellt und vermessen. Anhand des Signal-Rausch-Verhältnis, welche das Computerprogramm der HPLC automatisch bestimmt hat, wurde die Nachweisgrenze festgestellt.

7.2.4. Bestimmungsgrenze (limit of quantification; LOQ)

Zu diesem Zweck wurde nach der Feststellung der Nachweisgrenze von 0,039 µg / ml unter Berücksichtigung von dieser die Bestimmungsgrenze festgestellt. Hierzu wurde eine Eichgerade aus Plasma hergestellt bis zu einer Konzentration von 0,039 µg / ml. Diese Proben wurden vor der Analyse festphasenextrahiert und anschließend doppelbestimmt vermessen.

7.2.5. Richtigkeit (accuracy)

Zur Bestimmung wurden 3 Standardproben mit den Konzentrationen 0,078 µg / ml, 0,625 µg / ml und 5 µg / ml in dem Lösungsmittel PBS hergestellt und je dreifach vermessen. Anschließend wurden dieselben drei Konzentrationen als Plasmaproben je dreimal hergestellt und als Doppelvermessung im HPLC analysiert.

Anschließend wurde eine Gerade anhand der Standards hergestellt (nicht abgebildet), denn anhand der daraus resultierenden Daten (Slope 54470 ± 98.73, siehe Anhang 3) und der mathematischen Funktion $x = y * k + d$ (k entspricht hier den erhaltenen Peakflächen) wurden die Werte für die Richtigkeit berechnet.

7.2.6. Genauigkeit (precision)

Dazu wurden die Konzentrationen 0,078 µg / ml, 0,625 µg / ml und 5 µg / ml als PBS-Proben hergestellt und je fünfmal vermessen.

Die mittlere Konzentration ($0,625 \mu\text{g} / \text{ml}$) wurde am nächsten Tag nochmals hergestellt und vermessen. Damit wurde die Wiederholbarkeit bestimmt. Anhand einer Analyse ebenfalls mit derselben Konzentration, aber einer anderen HPLC-Säule und einer von einer anderen Person zubereiteten Probe, wurde die Vergleichspräzision bestimmt.

Nachdem alle Daten erfasst wurden, wurde anhand der Mittelwerte der mittleren Konzentration eine Kurve im Prism 5-Programm erstellt und die resultierenden Werte dieses Graphes wurden wieder herangezogen um die Genauigkeit zu berechnen ($\text{Slope } 54564 \pm 424,7$; siehe Anhang 4)

7.2.7. Selektivität

Dafür wurden verschiedene Probenkonzentrationen von Alterssolanol A in unterschiedlichen Biomatrices hergestellt. Bei diesen Biomatrices handelte es sich um Urin – eine männliche und eine weibliche Probe, Blutmaterial – sowohl Vollblut als auch Plasma und eine tierische Leber.

7.2.7.1. Vollblut (modifiziert)

Eine Analyse im tatsächlichen Vollblut war aufgrund der extrem starken hämolytischen Reaktion der Analysensubstanz unmöglich, weil keine Phasentrennung mehr möglich. Deswegen wurde die Vorgehensweise modifiziert. Dazu wurden Leerwertproben und Analysenproben je doppelt hergestellt. Für die Leerwerte (Blanks) wurden zwei Eppendorfgefäße mit je $1,5 \text{ ml}$ Vollblut, welches vorher ca. 15 Minuten mithilfe des Magnetrührers homogenisiert wurde, aufgefüllt und anschließend bei $5000 \text{ U} / \text{min}$ für 10 min vorzentrifugiert. Von diesen 2 Eppendorfgefäßen wurde je eine Oberphase (Plasma) für Ultrafiltration und Festphasenextraktion verwendet. Die unteren Phasen wurden für die Hämolysen der Erythrozyten bearbeitet. Weiterführende Bearbeitung siehe Proben (nur bei Blanks eben ohne Alterssolanol A)

Probenbearbeitung. Für die Analysenproben wurde zuerst 10 ml Vollblut aufbearbeitet (homogenisiert) und anschließend mit einer Alterssolanol A-Stammlösung (in PBS+1% DMSO) von $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ versetzt, sodass eine

Endkonzentration von 5 µg / ml entsteht (also 0,5 ml von der Stammlösung). Die Stammlösung wurde tropfenweise zugegeben und 15min gerührt.

Anschließend wurden 4 Eppendorfgefäße mit je 1,5 ml mit der Blut-Altersolanol-Mischung befüllt und bei 5000 U / min für 10 min zentrifugiert. Auch bei den Proben wurden je 2 Oberphasen für die Ultrafiltration und für die Festphasenextraktion verwendet. Die unteren Phasen wurden für die Erythrozytenhämolyse verwendet.

Weiterverarbeitung:

- Für die Ultrafiltration wurde zuerst die Membran gewaschen; das heißt den Innenteil der Filtrationsröhrchen herausnehmen 700 µl Aqua bidestillata in unteren Teil pipettieren. Dann Innenteil wieder einfüllen und bei 2500 U / min für 5 min zentrifugieren und das Wasser verwerfen. Folgender Schritt ist bei der Leerwertbearbeitung entfallen, da ohnehin kein Substanzverlust zu erwarten ist: Anschließend wurde noch mit 2,1 ml 5 µg / ml-hältigen Altersolanol A-Lösung (in PBS) bei 2500 U / min vorgewaschen. Nach diesem Vorgang wurde das Plasma beziehungsweise das Probengemisch hineinpipettiert und bei 2500 U / min 10min ultrafiltriert.
- Die Festphasenextraktion wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt unter Weiterverarbeitung von 750µl Plasma. Das resultierende Eluat wurde für die HPLC-Analyse verwendet.

Die modifizierte Hämolyse wurde wie in der Diplomarbeit von Sahmanovic ^[24] beschrieben durchgeführt, mit dem Ziel die Bindung der Substanz an die Erythrozyten zu bestimmen:

- Das Erythrozytenpellet wird im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschlemmt. Im vorliegenden Fall heißt das bei 750 µl Erythrozytensuspension wird 750 µl Kochsalzlösung zugegeben, mit dem Vortex homogenisiert und abzentrifugiert (bei 4000 g). Der klare Überstand wird verworfen.
- Nach dem Waschvorgang wird das Pellet wieder im 1:1 Verhältnis (wieder 750 µl Erythrozytensuspension und 750 µl Wasser) mit destilliertem Wasser versetzt. Anschließend die Probe gut homogenisieren und in Zentrifugenröhrchen umfüllen. Das ganze 15 min stehen lassen, um den Hämolysenvorgang ablaufen zu lassen.
- Danach wird die gleiche Menge Methanol wie vorangegangen schon beim Wasser

zugeben. Besonders wichtig hierbei ist, den Methanol vorsichtig zugeben und gut vortexen.

- Anschließend wird 1 ml Acetonitril tropfenweise zugeben (jeweils in 100 µl-Schritten) und dazwischen immer gut vortexen, da sich sonst eine zu starke Verklumpung der Erythrozyten ausbildet.
- Die mit Acetonitril behandelten Proben bei 3500 U / min für 10 min zentrifugieren
- Den klaren Überstand für HPLC verwenden.

7.2.7.2. Urin

Es wurden zwei Urinproben bearbeitet. Dazu wurde mithilfe dieser Biomatrix jeweils die Konzentrationen von 2,5 µg / ml, 5 µg / ml und 10 µg / ml hergestellt. Jedoch wurde anstatt der ursprünglichen PBS-Lösung der Urin verwendet und anschließend mittels SPE aufgereinigt und das Eluat zur HPLC-Analyse gegeben. Jede Konzentration wurde doppelt hergestellt und doppelt vermessen

7.2.7.3. Leberextrakt

Dafür wurden dreimal je 3 g tierische Leber und je 9 g destilliertes Wasser in eine Ultraturraxkartusche gefüllt, einige Metallperlen zugegeben und auf dem Ultraturrax homogenisiert für je 5 min bei 2500 U / min. Anschließend wurde aus diesen Homogenisaten je zweimal 1 ml in Eppendorfgefäße herauspipettiert. Aus diesen wurde jeweils ein Aliquot entfernt, welches durch das gleiche Volumen einer Stammlösung Altersolanol A ersetzt wurde, um die gewünschten Konzentrationen von 2,5 µg / g, 5 µg / g und 10 µg / g zu erhalten. Diese jeweils zweifach hergestellten Konzentrationen wurden anschließend festphasenextrahiert und diese Eluate dann HPLC-analysiert.

7.2.7.4. Plasma

(siehe bei den einzelnen Punkten wo mit Plasma gearbeitet wurde)

8. ERGEBNISSE und DISKUSSION

Sättigung

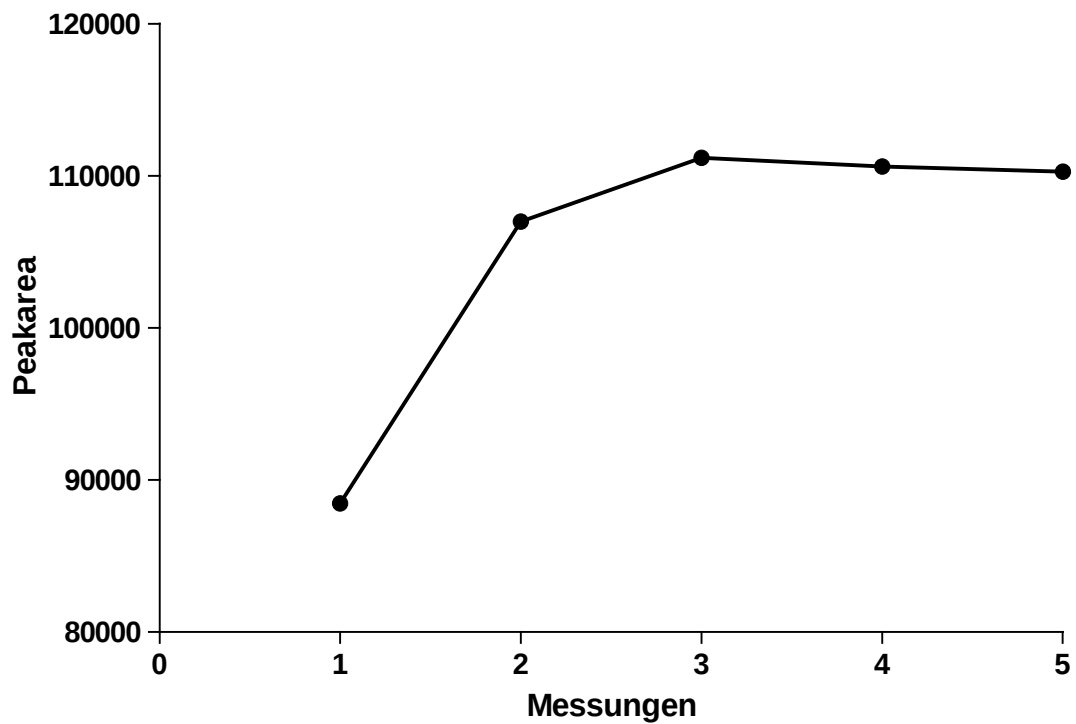
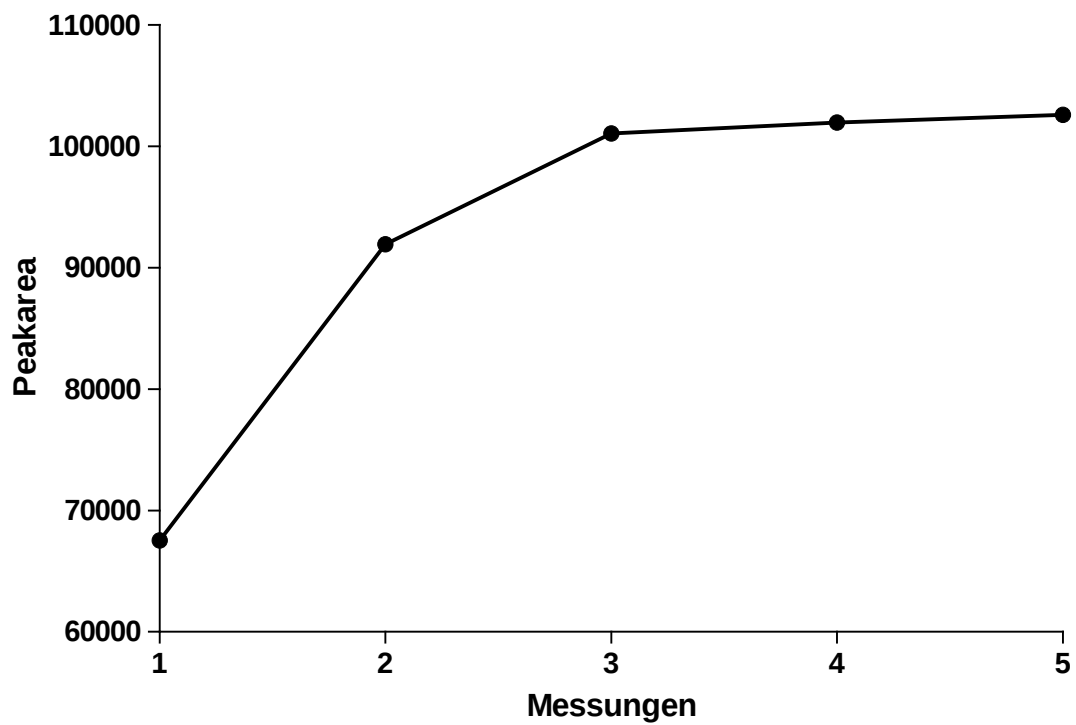


Abb. 04. Waschkurven von Vivaspin- (Grafik oben) und Centrisart-Kartuschen (Grafik unten)

Bei beiden Kurven zeigt sich nach der dritten Waschung, dass die Membran weitgehend gesättigt ist. Allerdings steigt die Altersolanolmenge bei der Vivaspin-Kartusche auch nach der dritten Waschung noch leicht an, während bei der Centrisart-Kartusche kein Anstieg mehr zu sehen ist.

Folglich wurde Centrisart für die weiterführenden Untersuchungen verwendet, weil hier die Membran genügend abgesättigt ist und daher kein Substanzverlust mehr zu befürchten ist.

Eichgeraden

- Eichgerade in PBS

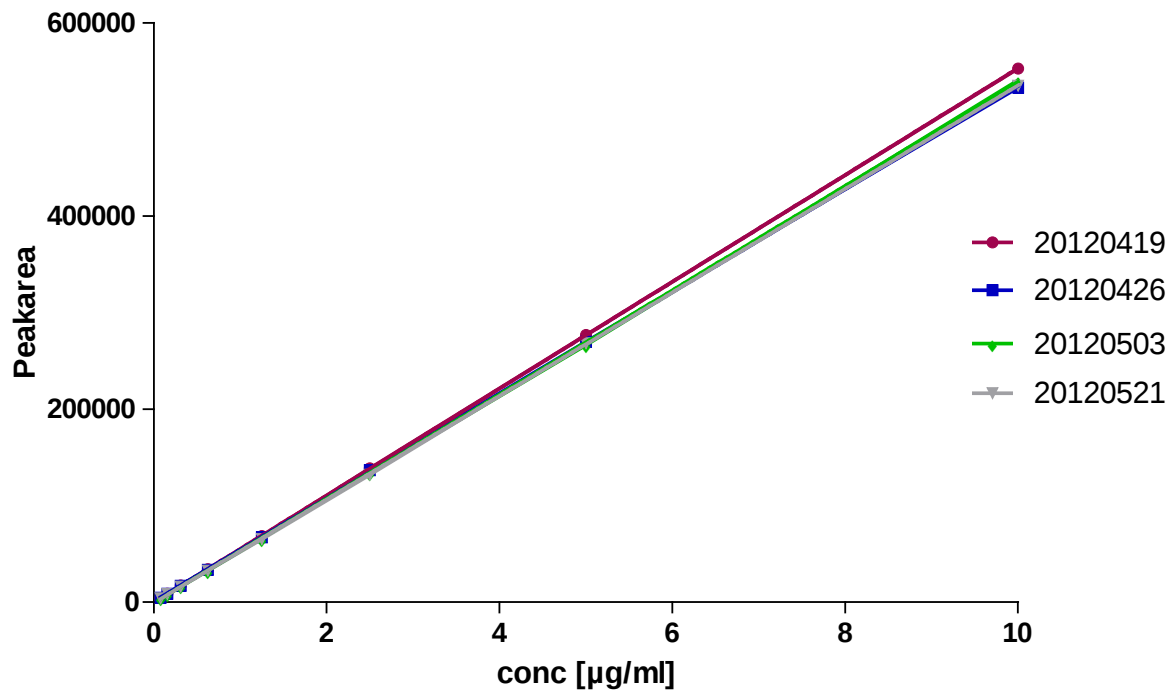


Abb. 05. graphische Darstellung der Eichgerade in PBS nach Herstellung (rot), nach 1 Woche (blau), nach 2 Wochen (grün) und nach 4,5 Wochen (grau); weitere Daten siehe Anhang 1

Konzentration [μg / ml]	Abweichungen nach Woche 1 [%]	Abweichungen nach Woche 2 [%]	Abweichungen nach Woche 4,5 [%]
0,078	-5,35	-2,19	6,89
0,156	-3,35	1,60	3,49
0,313	0,83	3,97	6,34
0,625	1,81	3,71	4,84
1,25	1,96	3,59	4,41
2,5	1,45	3,44	4,78
5	2,56	3,83	3,18
10	3,57	2,22	3,21

Tab. 01. prozentuelle Schwankungen im Vergleich zu den Messungen nach der Herstellung

- Eichgerade in Plasma

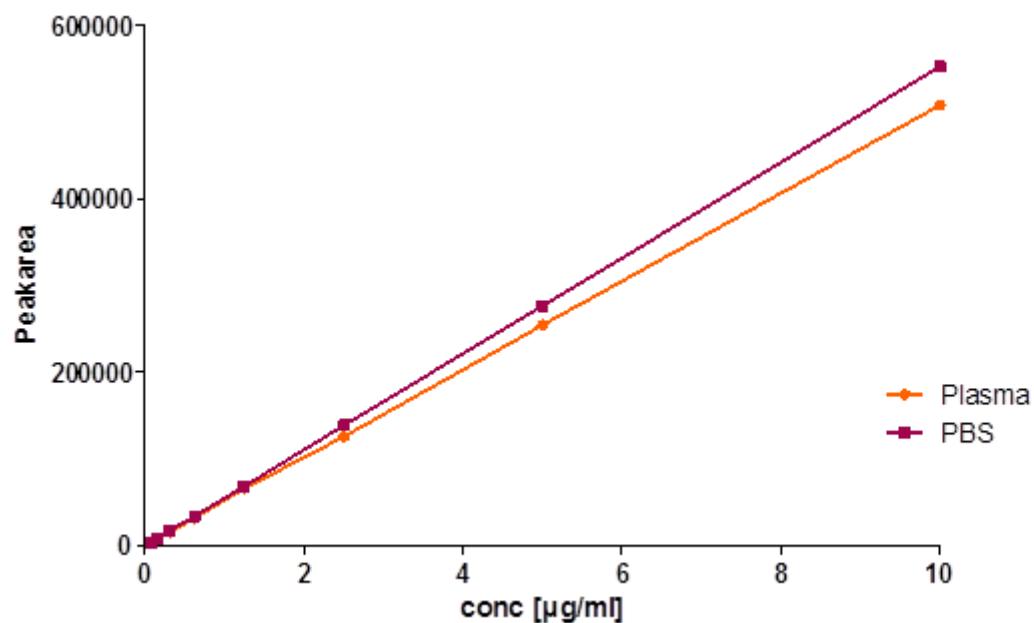


Abb. 06. Vergleich der Eichgeraden in Plasma und PBS (Konzentrationen von 0,078 μg / ml bis 10 μg / ml)

Konzentration [μg / ml]	Peakfläche PBS	Peakfläche Plasma	Vergleich Plasma zu PBS [%]
0,078	4332,5	3958	91,36

0,156	8599,5	7392	85,96
0,313	17246,5	15595	90,42
0,625	34141,5	31912,5	93,47
1,25	68433	66050	96,52
2,5	138739	125481	90,44
5	276931	254489,5	91,90
10	552926	508507,5	91,97

Tab. 02. Vergleich der beiden Eichgeraden, PBS nach Herstellung und Plasma nach Herstellung;
weitere Daten zur Grafik siehe Anhang 2

Diese prozentuellen Abweichungen zeigen, dass im Vergleich zu der Eichgerade nach der Herstellung (am 19. 04. 2012, rote Gerade in Abb. 1) sowohl bereits nach 1 Woche (26. 04. 2012, blaue Gerade), als auch nach 2 Wochen (03. 05. 2012, grüne Gerade) und auch nach 4,5 Wochen (21. 05. 2012, graue Gerade) minimale Substanzschwankungen - von – 5,35 % bis + 6,9 % - entstanden sind. Das muss nicht unbedingt an einem Substanzverlust liegen. Eventuell sind diese Abweichungen durch nicht ausreichendes Homogenisieren vor der Analyse entstanden.

Ansonsten zeigt Altersolanol A im organischen Lösungsmittel PBS über längeren Zeitraum gut lichtgeschützt und dichtverschlossen ein stabiles Verhalten.

Betrachtet man die Werte, die vom Prism 5-Programm erstellt wurden, erfüllt jede einzelne Eichgerade für sich die Voraussetzungen: alle Messwerte passen in die Gerade, der Achsenabschnitt ist nicht signifikant von Null abgewichen und der Korrelationskoeffizient ist entsprechend (siehe Anhang 1)

Dasselbe gilt auch für die von Prism 5 erstellten Werte der Eichgerade in Plasma (siehe Anhang 2)

Allerdings ist in Abb. 06 auch sehr gut dargestellt, durch die endogenen Matrixkomponenten des Plasmas einiges an Altersolanol A verlorengegangen ist. Im Vergleich zu den PBS-Proben wurde im Mittel ein Substanzverlust von 8,5 % berechnet.

Stabilität

Langzeitstabilität

- freeze – thaw – cycles

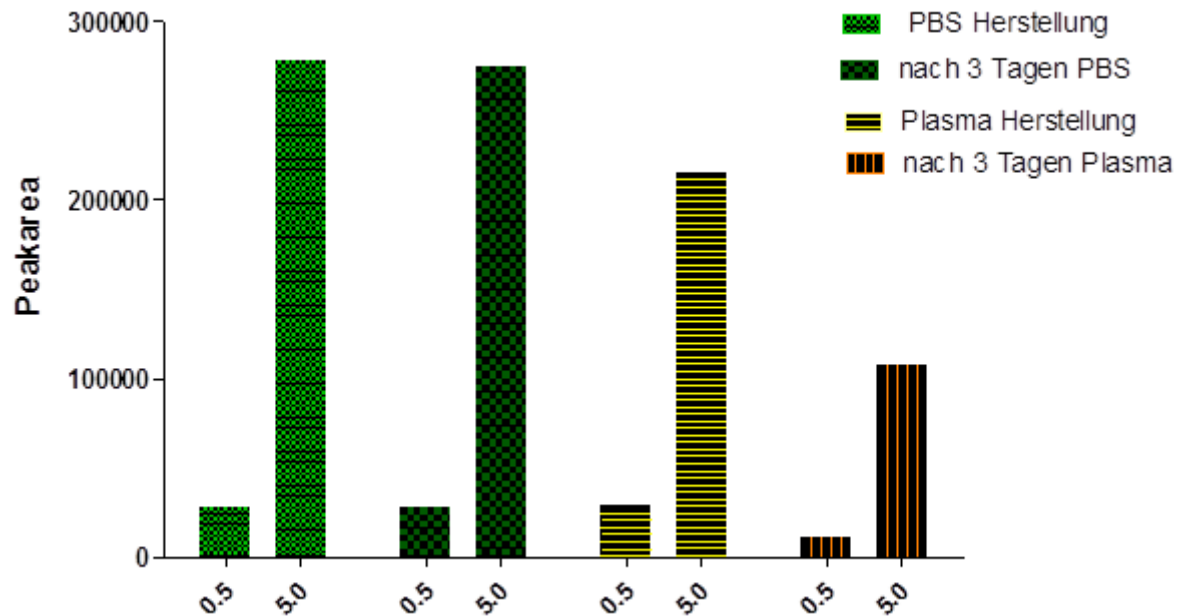


Abb. 07. Balkendiagramm der Resultate freeze-thaw-cycles.

Konzentration [µg / ml]	Werte nach Herstellung [Peakflächen]		Werte nach 3 Tagen [Peakflächen]	
	PBS	Plasma	PBS	Plasma
0,5	27518,5	28270	27181,5	11267,4
5	277685	215050,5	275222,333	107872,8
Verlust von Altersolanol A [%]				
Konzentration [µg / ml]	PBS		Plasma	
0,5	1,22		60,14	
5	0,89		49,84	

Tab. 03. Freeze-thaw-Werte nach drei Tagen im Tiefkühler

• Stabilität auf Eis (stability on ice)

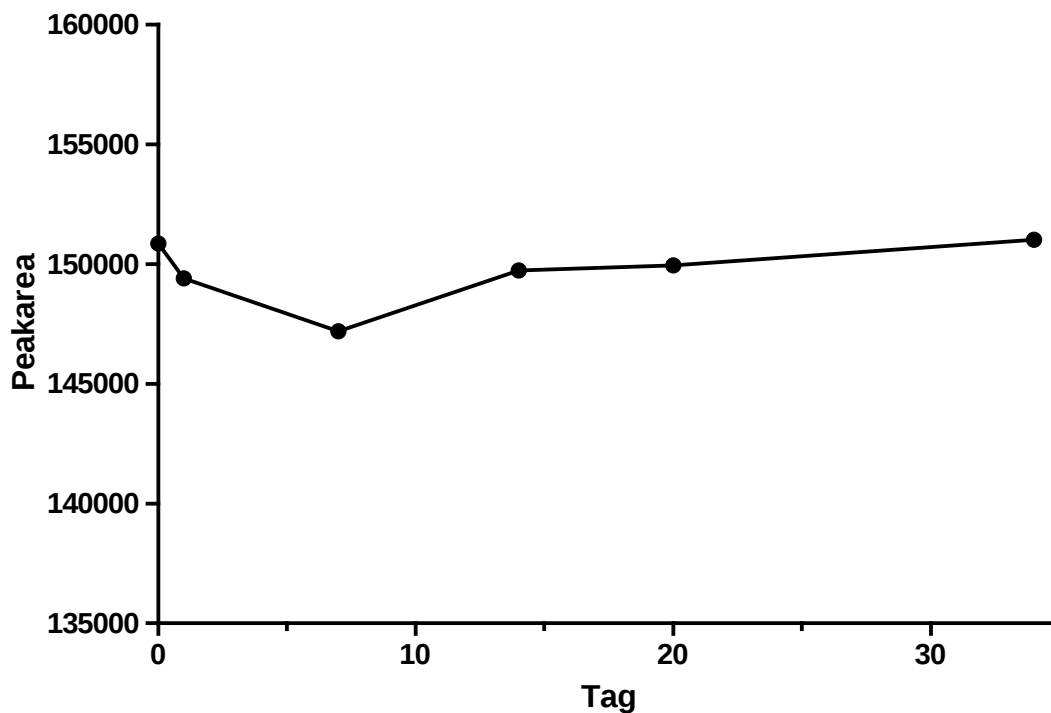


Abb. 08. Kurve stability on ice

	Peakfläche	Anteil Altersolanol A [%]
Herstellung	150863,5	-
Tag 1	150150,5	99,53
Tag 7	147198	97,57
Tag 14	149732	99,25
Tag 20	149944,5	99,39
Tag 34	151026	100,11

Tab. 04. prozentueller Anteiles an der Analysensubstanz (Konzentration von 2,5 µg / ml)

Die freeze-thaw-Proben, die in der organischen Lösung PBS hergestellt wurden sind sehr stabil. Es wurde immerhin nur ein Verlust an Altersolanol A von 1,22 % bei einer Konzentration von 0,5 µg / ml und nur 0,89 % bei einer Konzentration von 5 µg / ml berechnet. Hingegen sich in den plasmahältigen Proben nach 3 Tagen von der ursprünglichen Stoffmenge Altersolanol A ein Verlust von etwa der Hälfte (60,14 % bei 0,5 µg / ml und 49,84 % bei 5 µg / ml) abzeichnete. Das lässt den Rückschluss

zu, dass beim Arbeiten mit Plasma eine sofortige Analyse nötig ist, weil es sonst unter anderem durch Interaktion mit den im Plasma enthaltenen Proteinen zu „falschen“ Resultaten kommen kann.

Bei längerfristigen Lagerung auf Eis zeigt die Probe von 2,5 µg / ml nur am Tag 7 eine etwas höhere Substanzschwankung von 2,43 %. In diesem Fall ist zu erwähnen, dass dies an einem Bearbeitungsfehler meinerseits liegt, weil ich nach dem Auftauen und vor dem Vermessen der Probe nicht ordentlich homogenisiert habe und es ansonsten keine logischere Erklärung dafür gibt, dass bei den anderen die Schwankung unter 1 % (Abnahme von 0,47 % bis 0,97 %, Zunahme am 34. Tag um 0,11 %) liegt. Denn wäre die Probe in organischem Lösungsmittel bei längerer Lagerung im Tiefkühler tatsächlich instabil, müsste die Kurve mit zunehmender Lagerungsdauer sinken.

Kurzzeitstabilität

Stress

•Temperatur

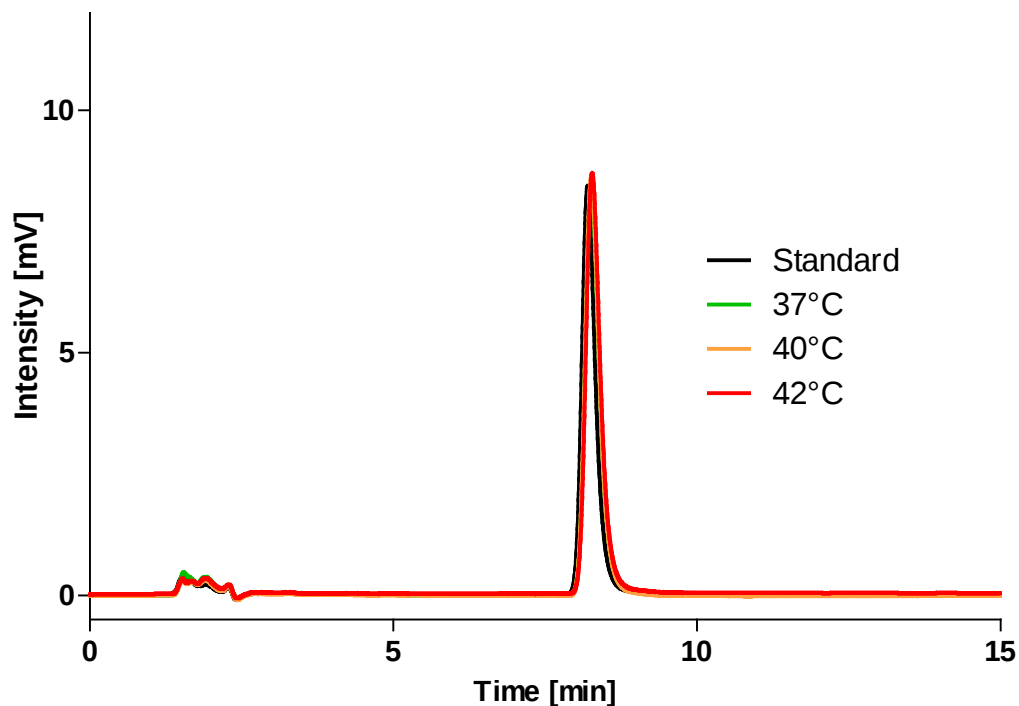
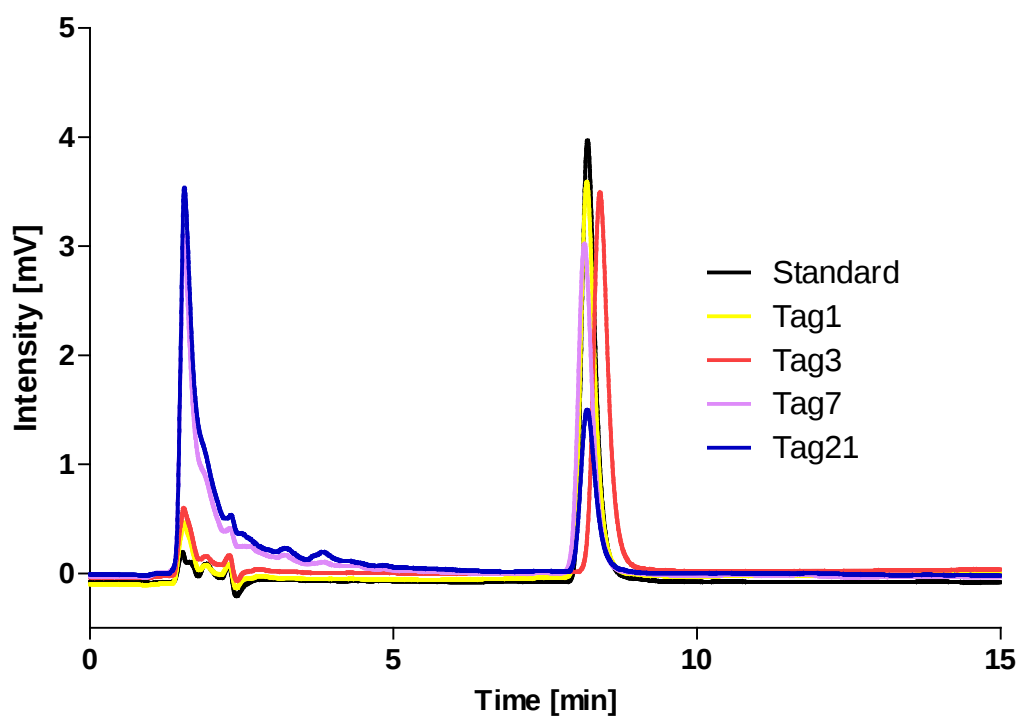


Abb. 09.Chromatogramm Stress-Test Temperatur

	Peakfläche	Verlust an Altersolanol A [%]
Standard	149752,5	–
Probe bei 37 °C	149294,5	0,31
Probe bei 40 °C	150098	-0,23
Probe bei 42 °C	152139,5	-1,59

Tab. 05. Abweichungen nach 1 Stunde thermischer Belastung (negatives Vorzeichen entspricht einer Zunahme)

- UV (366 nm und 254 nm)



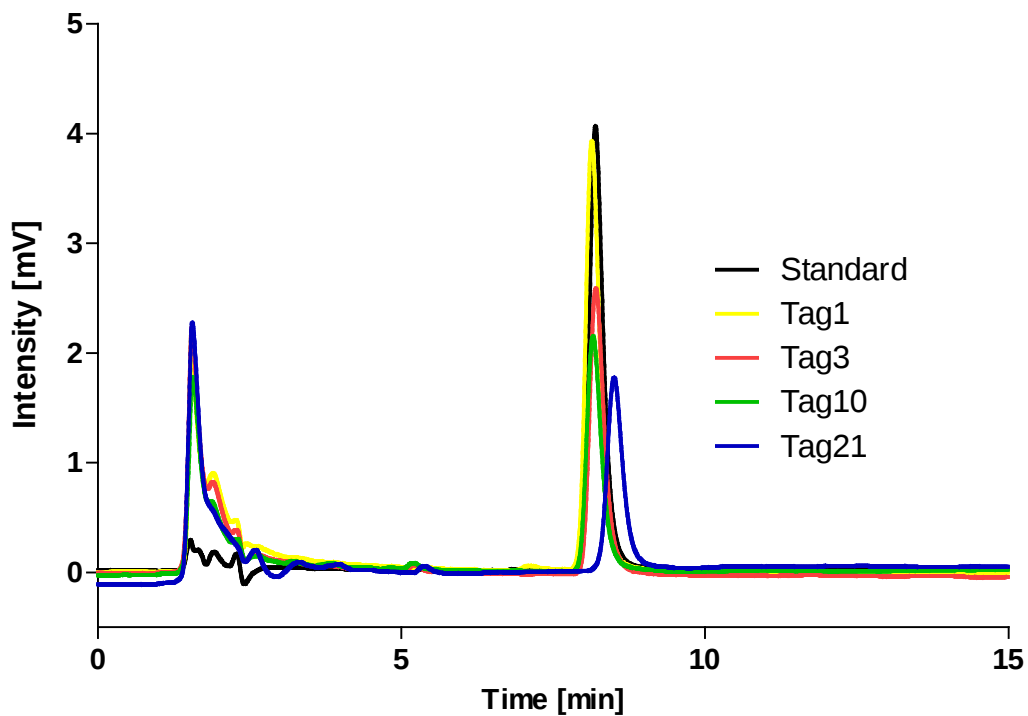


Abb. 10. übereinandergelegte Chromatogramme von UV 366 nm (oben) und UV 254 nm (unten)

UV 366 nm	Peakfläche	Altersolanol A [%]	UV 254 nm	Peakfläche	Altersolanol A [%]
Nullwert	68433	-	Nullwert	68433	-
Tag 1	61535,5	89,92	Tag 1	66742,5	97,53
Tag 3	61073,5	89,25	Tag 3	45167,5	66,00
Tag 7	51854	75,77	Tag 7	-	-
Tag 10	-	-	Tag 10	38447,5	56,18
Tag 21	26785	39,14	Tag 21	32191	47,04

Tab. 06. zeigt den prozentuellen Anteil an Altersolanol A, welcher nach dem Aussetzen der Proben an Sonnenlicht und UV-Strahlung noch vorhanden ist.

- Einfluss des pH-Wertes

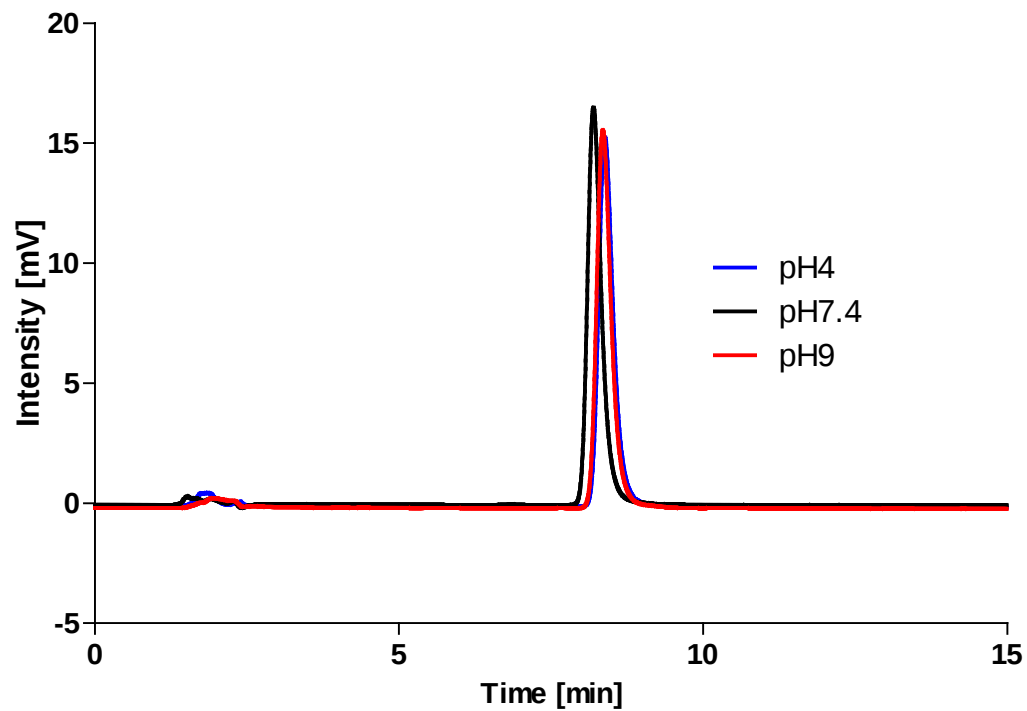


Abb. 11. Chromatogramm mit den einzelnen pH-Werten übereinandergelegt

Konzentration [5 µg / ml]	Peakfläche	Altersolanol A [%]
pH 7,4	276931	-
pH 4	270708,5	97,75
pH 9	273311	98,69

Tab. 07. tabellarische Ergebnisse der pH-Veränderung

- Vorbereitung, Handhabung, Verarbeitung (stability of processed samples)

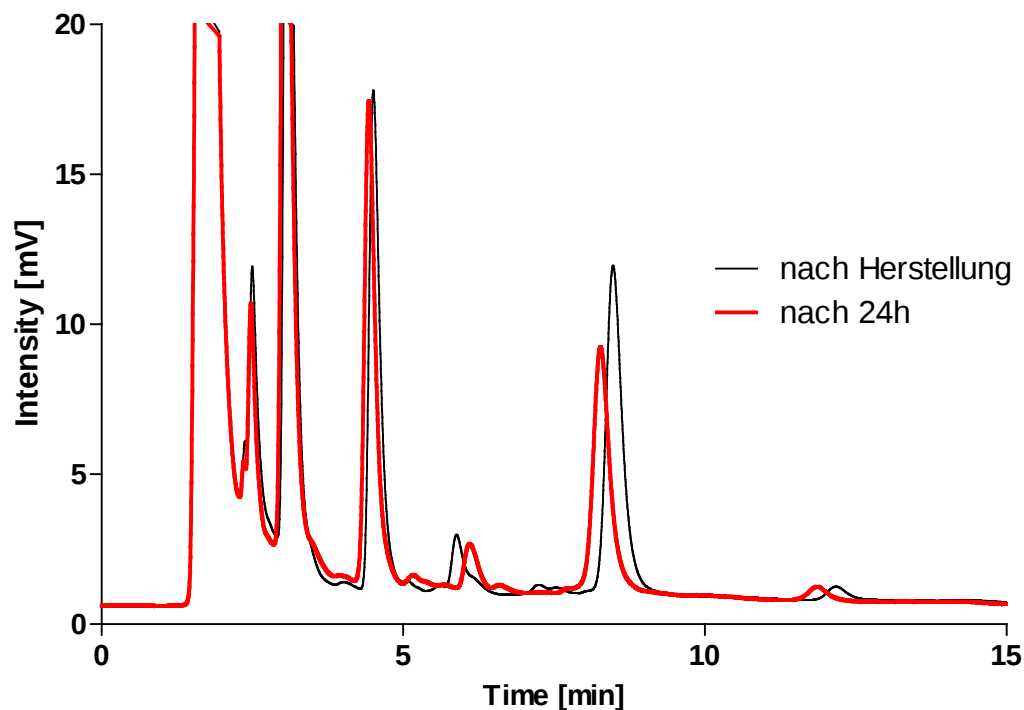


Abb. 12. Dieses Chromatogramm zeigt den Substanzverlust der Probe nachdem diese 24 Stunden später verarbeitet wurde

Konzentration [5 µg / ml]	Peakfläche	Altersolanol A [%]
Herstellung	215050,5	-
nach 24 Stunden	175442,5	81,58

Tab. 08. Veränderung bei späterem Verarbeiten einer Probe in Biomatrix

Anhand des Chromatogrammes lässt sich bei thermischer Belastung kein Zerfall des Altersolanol A in andere Derivate erkennen. Damit wäre diese Substanz innerhalb dieses im menschlichen Körper auftretenden Temperaturintervalles stabil. Es zeigt sich zwar, dass vor allem bei 40 °C und bei 42 °C eine leichte Stoffmengen Zunahme stattgefunden hat. Diese lässt sich damit erklären, dass während des Erwärmens minimale Mengen an Lösungsmittel aus den Eppendorffgefäßen verdunstet sind.

Altersolanol A zeigt auch bei diversen Veränderungen des pH-Wertes eine gewisse Stabilität sowohl in den basischen (1,31 % Substanzverlust) als auch in sauren (2,25 % Verlust).

Anders als bei den Belastungen durch Temperatur und pH-Wertänderungen zeigt die Stressbelastung durch Lichteinwirkung einen massiven Einfluss.

So entstehen unter dem Einfluss von UV-Strahlung Abbauprodukte, denn wie man anhand Abb. 5. sehr gut sieht, nehmen die Peakintensitäten um Minute 8 bei der zu erwartenden Retentionszeit für Altersolanol A stetig ab und die Peakintensitäten am Beginn des Analysenlaufes werden immer größer.

Massiver Verlust zeigt sich auch bei der Stabilität während des Arbeitsvorganges. Denn bei diesem Versuch ist deutlich zu sehen, dass eine Verarbeitung von Biomatrix – in diesem Falle Plasma – rasch durchgeführt werden sollte. Wie in Tab. 7. dargestellt ist, ist bereits 24 h nach Verarbeitung ein Substanzschwund von 18,42% aufgetreten.

Nachweisgrenze (LOD)

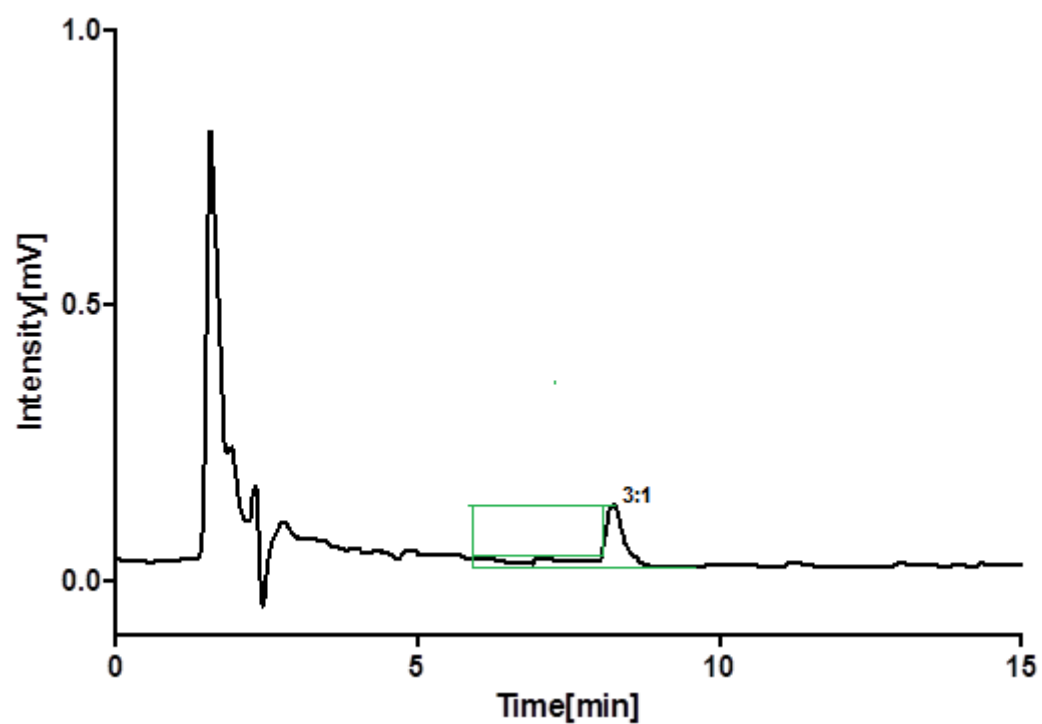
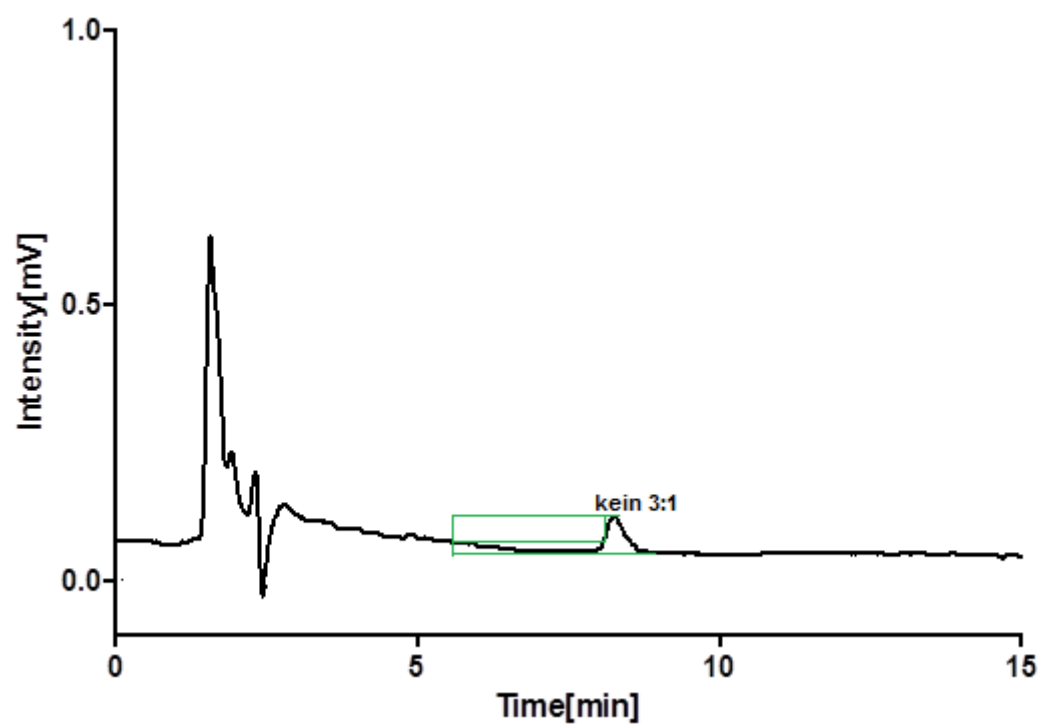


Abb. 13. Ermittlung der Nachweisgrenze. Chromatogramm von Altersolanol A in Konzentration 0,020 µg / ml (oben) und Konzentration 0,039 µg / ml (unten) jeweils in PBS.

Bestimmungsgrenze (LOQ)

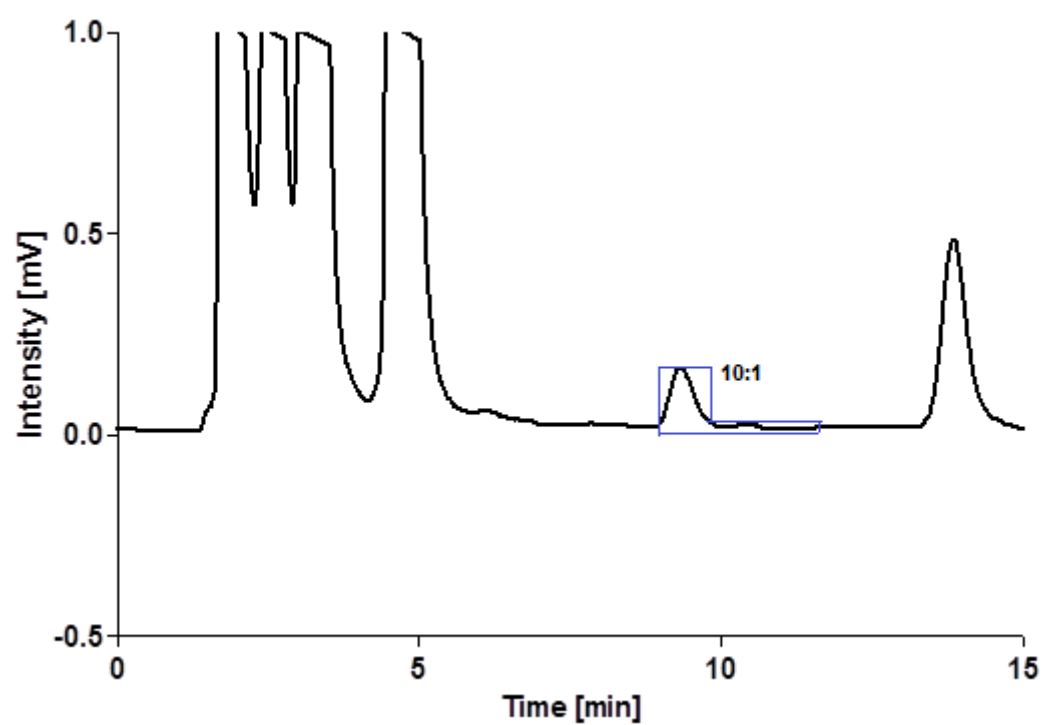
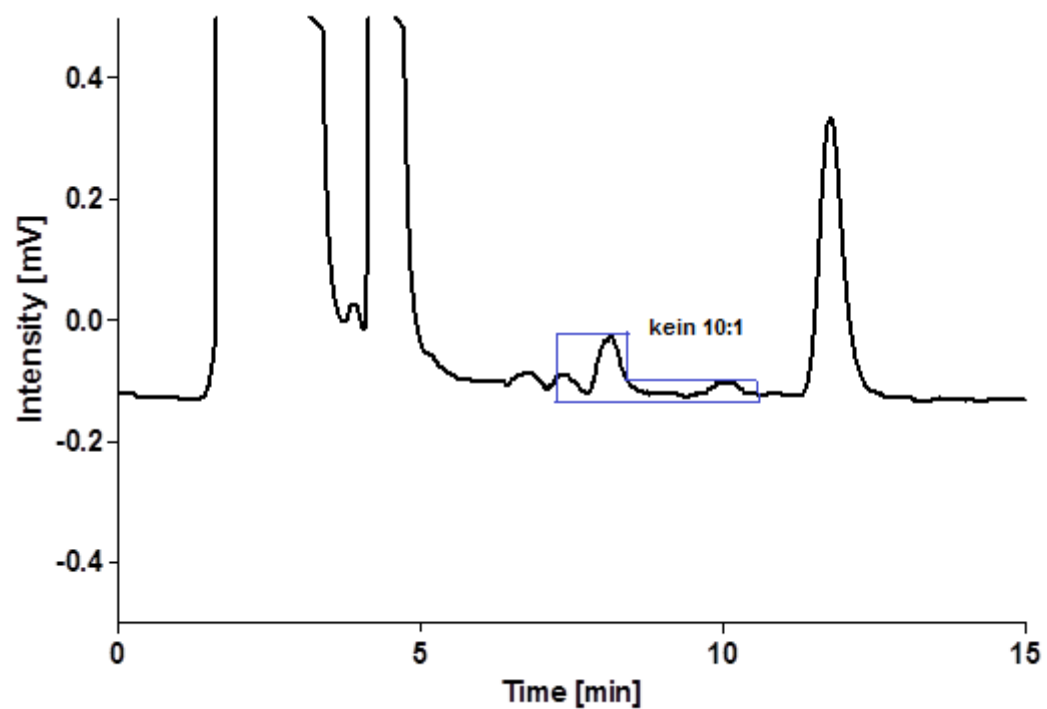


Abb. 14. Ermittlung der Bestimmungsgrenze. Chromatogramm von Altersolanol A in Konzentration 0,039 µg / ml (oben) und Konzentration 0,078 µg / ml (unten) jeweils in Plasma.

Bei den Konzentrationen die für die Ermittlung der Nachweisgrenze hergestellt wurden, war bei den Konzentrationen 0,0098 µg / ml; 0,049 µg / ml und 0,0024 µg / ml generell kein Peak für Altersolanol A bestimmbar. Ein solcher zeigte sich erst bei einer Konzentration von 0,020 µg / ml. Das für die als Grenze geltende Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wurde bei dieser Konzentration allerdings nicht erfüllt, sondern erst bei der nächsthöheren Konzentration von 0,039 µg / ml.

Die Bestimmungsgrenze beginnt bei der Konzentration von 0,078 µg / ml, da die Peakintensität der Konzentration von 0,039 µg / ml etwa 5:1 entspricht und damit unter dem geforderten Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 liegt. Dieser Anspruch wird von der nächsthöheren Stoffmenge (0,078 µg / ml) erfüllt.

Richtigkeit

Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	
Standard 0,078	4187,666 *	
Standard 0,625	33452,666 *	
Standard 5	272069,333 *	
angenommene Konzentration	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,078	4222	0,076
0,078	3677	0,066
0,078	4073	0,073
0,078	4168	0,075
0,078	3799	0,068
0,078	4029	0,072
Mittelwert berechnete Konzentration 0,0715		
SD 0,003922392		Accuracy (%) 91,70
angenommene Konzentration	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,625	34760	0,636
0,625	34752	0,636
0,625	36098	0,661
0,625	37803	0,692
0,625	35948	0,658
0,625	36372	0,666
Mittelwert berechnete Konzentration 0,658		
SD 0,02090756		Accuracy (%) 105,33
angenommene Konzentration	Peakfläche	berechnete Konzentration
5	290492	5,331
5	293331	5,383
5	300569	5,516
5	300318	5,512
5	307209	5,638
5	306606	5,627

Mittelwert berechnete Konzentration 5,501	
SD 0,124663431	Accuracy (%) 110,03

Tab. 09. Werte der Richtigkeit; * berechneter Mittelwert

Genauigkeit

angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,078	4201	0,069
0,078	4271	0,070
0,078	4341	0,072
0,078	4149	0,068
0,078	4231	0,070
Mittelwert berechnete Konzentration 0,070 (Mittelwert P.A* 4238,6)		
SD 0,001188727		Accuracy [%] 89,61
angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
5	272797	4,992
5	270848	4,956
5	271428	4,967
5	271956	4,976
5	271438	4,967
Mittelwert berechnete Konzentration 4,972 (Mittelwert P.A* 271693,4)		
SD 0,013396532		Accuracy [%] 99,43
angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,625	30154	0,545
0,625	29625	0,535
0,625	29751	0,537
0,625	29502	0,533
0,625	29791	0,538
Mittelwert berechnete Konzentration 0,538 (Mittelwert P.A*29764,6)		
SD 0,004498186		

Wiederholungspräzision		
angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,625	34692	0,628
0,625	34100	0,617
0,625	33841	0,612
0,625	33356	0,604
0,625	33332	0,603
Mittelwert berechnete Konzentration 0,613 (Mittelwert P.A*33864,2)		
SD 0,010379099		
Analyst		
angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,625	32945	0,596
0,625	32897	0,595
0,625	32943	0,596
0,625	33014	0,597
0,625	32995	0,597
Mittelwert berechnete Konzentration 0,596 (Mittelwert P.A* 32958,8)		
SD 0,000850622		
Säule		
angenommene Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	berechnete Konzentration
0,625	34003	0,615
0,625	33018	0,597
0,625	32733	0,592
0,625	33314	0,603
0,625	33237	0,601
Mittelwert berechnete Konzentration 0,602 (Mittelwert P.A* 33261)		
SD 0,008653527		
Gesamtwerte für die Konzentration 0,625 $\mu\text{g} / \text{ml}$		
Gesamtmittelwert berechneter Konzentration 0,587		
SD gesamt 0,006095359		Accuracy [%] 93,94

% RSD 1,0381199

Tab. 10. Ergebnisse der Genauigkeit; *P.A: Abkürzung für Peakarea (Peakfläche)

Die Standardabweichungen bei der Richtigkeit sehen gut aus und auch die Werte bleiben innerhalb des Abweichungsrahmens von ± 15 Prozent. Zu bemerken ist, dass es vor allem bei der mittelgroßen und der großen Konzentration eine Schwankung in den positiven Rahmen gibt. Es könnte sich um einen Bearbeitungsfehler handeln, da im Gegensatz zu der niedrigsten Konzentration hier mit Mikroliterpipetten gearbeitet wurden, die größere Fassungsvermögen haben und damit an sich auch größere Schwankungsrahmen haben.

Die Werte der Genauigkeit sind ebenfalls zufrieden stellend, allerdings weichen auch hier wie bei der Richtigkeit die tatsächlichen Konzentrationen von den angenommenen Konzentrationen stark ab. Auch hier wurden für die Herstellung unterschiedliche Mikroliterpipetten verwendet und damit ist auch das Schwankungsintervall der einzelnen tatsächlich pipettierten Volumina unterschiedlich. Trotzdem wird bei dieser Bestimmung der Rahmen von ± 15 % der relativen Standardabweichung nicht überschritten.

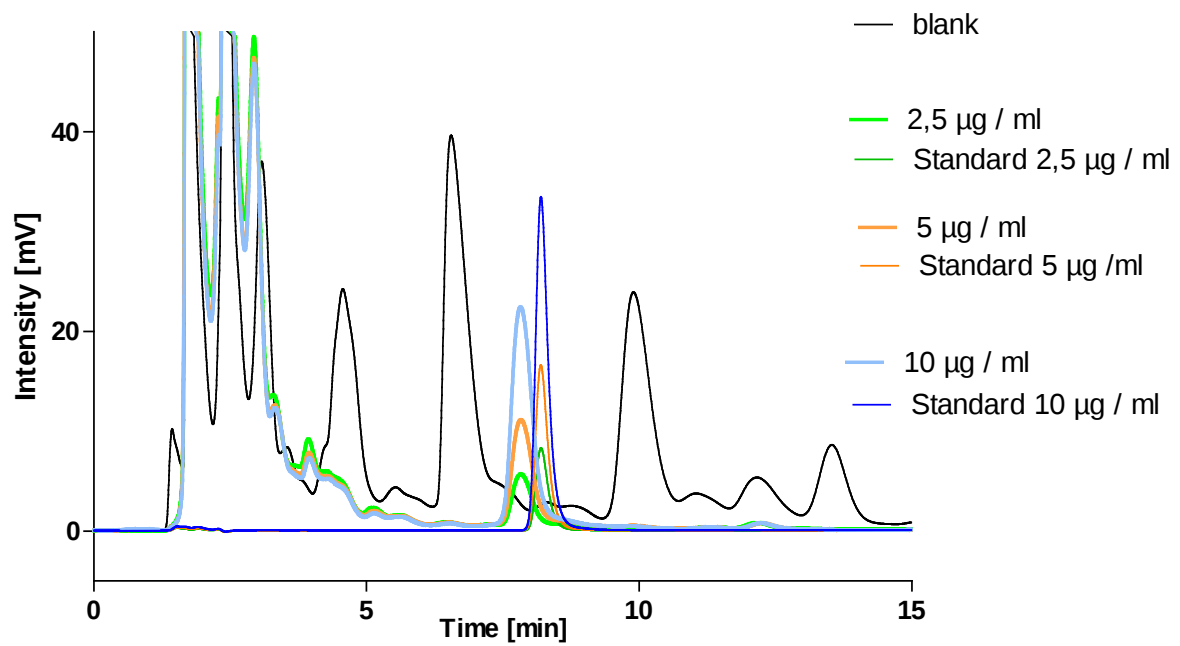
Selektivität

Vollblut

Konzentration des Standards 5 µg / ml in PBS; Peakfläche 276931		
Bearbeitungsmodus	Peakfläche	Anteil [%]
Hämolyse	1175	0,42
Plasma (Ultrafiltration)	23497	8,48
Plasma (SPE)	3433	1,24

Tab.11. Ergebnisse der modifizierten Vollblutanalyse

Urin



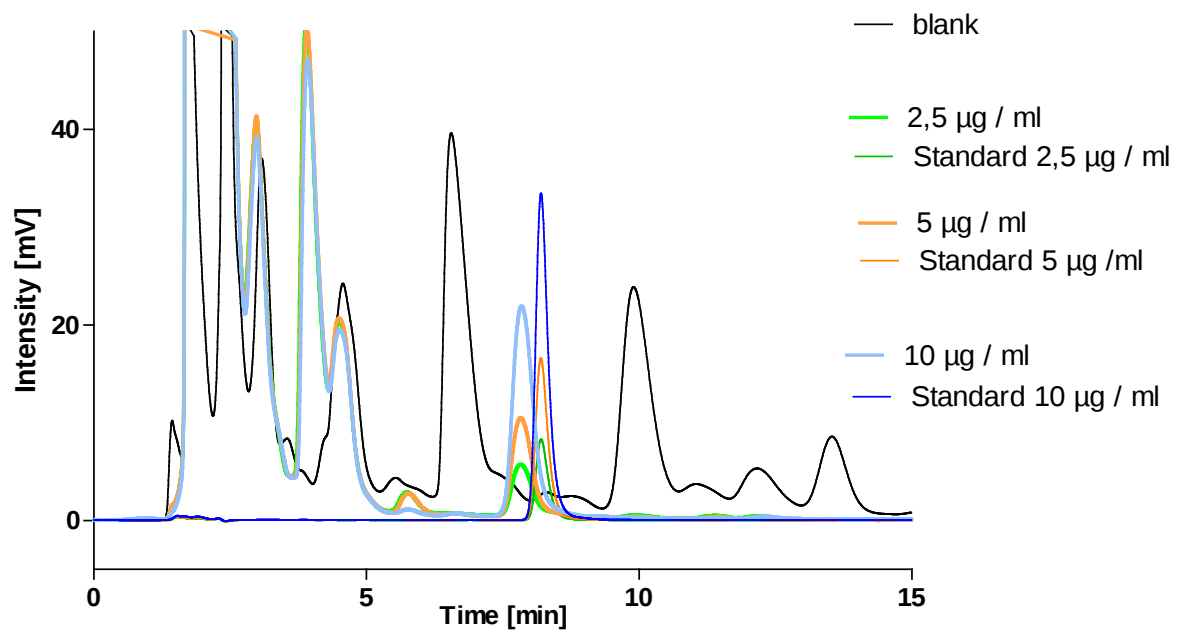


Abb. 15. graphische Darstellungen der einzelnen Konzentrationen in der männlichen Harnprobe (oben) und der weiblichen Harnprobe (unten)

Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	Peakfläche	Anteil [%]	Verlust [%]
Standard 2,5	138739	—	—
Urin m* 2,5	129508,5	93,35	6,65
Urin w* 2,5	131190,25	94,56	5,44
Standard 5	276931	—	—
Urin m 5	259416,25	93,68	6,32
Urin w 5	255228	92,16	7,84
Standard 10	552926	—	—
Urin m 10	544254,25	98,43	1,57
Urin w 10	546700	98,87	1,13

Tab. 12. Werte der Urinanalyse; *m: männlich, w: weiblich

Leberextrakt

Konzentration	Peakfläche	Anteil [%]
Standard 2,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$	138739	—

Extrakt 2,5 µg / g	37371,75	26,94
Standard 5 µg / ml	276931	–
Extrakt 5 µg / g	80328,25	29,01
Standard 10 µg / ml	552926	–
Extrakt 10 µg / g	115906,25	20,96

Tab. 13. Werte der Leberextraktion

Generell lässt sich sagen, dass durch die Probenaufarbeitung der Festphasenextraktion alle möglichen Störfaktoren sehr gut entfernt werden. Selbst wenn nicht lässt sich Altersolanol A zumindest in Plasmaproben sehr gut detektieren (siehe Abb. 12). Bei den anderen Biomatrices kann es zu Überlappungen kommen, welche insbesondere bei niederen Konzentrationen eine Detektion erschweren könnte. Dies zeigt sich repräsentativ sehr gut in der Grafik der Urinproben.

Aus den Werten der Biomatrixverarbeitung lassen sich auch folgende Daten herauslesen

Bei der Vollblutanalyse fehlt es an Referenzdaten, um festzustellen, ob die Substanz tatsächlich nur eine geringfügige Bindung von 0,42 % an die Erythrozyten hat. Oder eine Plasmaproteinbindung von 1,24 % beziehungsweise der frei verfügbare Anteil von 8,48 % normal sind. Oder ob es sich um einen Bearbeitungsfehler handelt. Denn Möglichkeiten dafür gibt es einige. Zum Beispiel, dass die Homogenisation des Altersolanol A-Vollblutgemisches nicht ausreichen war und damit die Probenentnahme nicht homogen. Dass bei der „modifizierten Hämolyse“ durch trotz aller Bemühungen im gewissen Rahmen auftretende Verklumpung Substanz verlorengegangen ist.

Beim Urin, wie in Tabelle 12 zu sehen ist, sind keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Proben zu erkennen. Des Weiteren werden auch hier bei der Probenaufreinigungen alle möglichen Störungen abgetrennt. Wenn dies nicht der Fall wäre, würde es vor allem bei niedrigeren Konzentrationen Schwierigkeiten bei deren Detektion geben. Auch ist in dieser Matrix zumeist über 90 % des Altersolanol A detektierbar.

Auch beim Leberextrakt werden alle Störungen durch Probenaufreinigung entfernt (nicht dargestellt).

Allerdings scheint Altersolanol A von der Leber sehr stark metabolisiert zu werden. Denn der gemessene Anteil von Altersolanol A beträgt bei 10 µg / ml einen Anteil von 20,96 %. Bei 5 µg / ml beträgt der Anteil 29,01 % und bei 2,5 µg / ml 26,94%.

Ein weiterer Punkt, den man an den Darstellungen der Urinproben repräsentativ gut erkennen kann, ist das bei Übereinanderlegen der Peakkurven beziehungsweise bei längerfristigem Arbeiten mit einer Probe eine Verschiebung der Retentionszeiten erkennbar wird.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Diplomarbeit überprüfte Analysenmethode für Altersolanol A erfüllt zum größten Teil die Anforderungen einer Validierung. Dies gilt vor allem für die Bestimmungen die mit dem Lösungsmittel isotoner Phosphatpuffer durchgeführt wurden.

Das heißt, sowohl bei längerfristiger Lagerung bei Raumtemperatur als auch im Tiefkühler ist diese Verbindung stabil. Für diese Stabilität vorausgesetzt ist jedoch, dass die Lagerung lichtgeschützt ist. Ansonsten haben auch kurzfristige Temperaturerhöhungen oder pH-Wert-Änderungen keinen destruktiven Effekt.

Neben dem Parameter der Stabilität wurden auch die anderen der wichtigsten Validierungsparameter der Bioanalytik vermessen: die Richtigkeit, die Genauigkeit und die Linearität. Auch diese Parameter sind erfüllt.

Anders sieht es bei dem Parameter der Selektivität aus, da insbesondere bei niederen Konzentrationen eine Überlagerung der Peakflächen des Altersolanol A mit jenen der Matrixbestandteile kommen kann. Jedoch werden diese in der Regel mit der Festphasenextraktion gut abgetrennt.

Das Arbeiten mit Biomatrices sollte generell rasch erfolgen, da hier eine längerfristige Lagerung in Plasma mit einem Substanzverlust von mehr als die Hälfte der Verbindung bedeuten kann.

Des Weiteren gehen zum Beispiel durch die starke Interaktion mit den Zytochrom P450 Leberenzymen über zwei Drittel des Altersolanol A verloren. Oder es wird wie zum Beispiel im Vollblut nur sehr wenig gebunden

Hinzuzufügen ist noch, dass Altersolanol A ein für Bioassays ausreichendes LOQ von 0,078 µg / ml und ein LOD von 0,039 µg / ml besitzt.

10. Summary

The key parameters of the method validation by Altersolanol evaluated in this diploma thesis are fulfilled. Especially all those samples that have been tested in solvents such as phosphate balanced saline.

In this case Altersolanol A is stable at long-term storage conditions as well at room temperature as in the freezer at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assuming that the Altersolanol A spiked samples are protected from light. Even short term exposure to increased temperature or a change of the pH-value does not show any degradation of the compound.

Beside the parameter of stability there had been other important bioanalytical method validation parameters tested. These important parameters are: accuracy, precision and linearity of the assay. And they are as fulfilled in accordance to the stability parameters.

However, the evaluation of the selectivity of this method shows a weak peak overlap at low Altersolanol plasma concentrations with peaks resulting from the biological matrix. This means at low concentration of Altersolanol A samples there is a limited quantitation due the observed peak overlap with matrix compounds. But a proper sample preparation as it is with solid phase extraction separates the matrix compounds sufficiently.

To assure correct results of matrix spiked samples it is required to analyze these samples as fast as possible. During long-term storage there might be a loss of Altersolanol A of more than fifty percent, this is very similar to loss of compound in spiked plasma samples.

Furthermore are there some degradation processes due the activity of liver enzymes (CYP450) which also leads to a loss of over two thirds of Altersolanol A. Further in whole blood samples there is hardly no substance detectable at all.

Despite of the above mentioned, Altersolanol A has a very limit of quantification at $0,078\text{ }\mu\text{g / ml}$ and a limit of detection at $0,039\text{ }\mu\text{g / ml}$.

11. LEBENSLAUF

Persönliches

Name: Susanne Satzinger

Geburtstag: 03. Jänner 1987

Wohnort: Freistadt; Oberösterreich

Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

1993 -1997: Volksschule I Freistadt

1997 – 2005: BG / BRG Freistadt

2005 – 2014: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung

August 2010 / August 2011: Ferielaushilfe in der Anstaltsapothek der Barmherzigen Schwestern Linz

12. ANHÄNGE, VERZEICHNISSE UND ÜBERSICHTEN

12.1. Anhang

Anhang 1 _ Daten Eichgerade in PBS

	20120419	20120426	20120503	20120521
Best-fit values				
Slope	55330 ± 44.90	53370 ± 164.3	53990 ± 160.8	53600 ± 85.87
Y-intercept when X=0.0	-111.4 ± 183.3	967.7 ± 670.9	-799.6 ± 656.3	-746.2 ± 350.5
X-intercept when Y=0.0	0.002014	-0.01813	0.01481	0.01392
1/slope	0.00001807	0.00001874	0.00001852	0.00001866
95% Confidence Intervals				
Slope	55220 to 55440	52970 to 53770	53600 to 54390	53390 to 53810
Y-intercept when X=0.0	-559.9 to 337.1	-674.0 to 2609	-2406 to 806.3	-1604 to 111.6
X-intercept when Y=0.0	-0.006099 to 0.01011	-0.04912 to 0.01257	-0.01500 to 0.04436	-0.002087 to 0.02986
Goodness of Fit				
r ²	1.000	0.9999	0.9999	1.000
Sy.x	410.8	1504	1471	785.7
Is slope significantly non-zero?				
F	1519000	105500	112800	389600
DFn, DFd	1.000, 6.000	1.000, 6.000	1.000, 6.000	1.000, 6.000
P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant	Significant
Data				
Number of X values	8	8	8	8
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1
Total number of values	8	8	8	8
Number of missing values	0	0	0	0

Anhang 2 _ Daten Vergleich Eichkurve in PBS mit Eichkurve in Plasma

	EK_Plasma	EK_PBS
Best-fit values		
Slope	50840 ± 136.4	55330 ± 44.90
Y-intercept when X=0.0	65.02 ± 556.6	-111.4 ± 183.3
X-intercept when Y=0.0	-0.001279	0.002014
1/slope	0.00001967	0.00001807
95% Confidence Intervals		
Slope	50510 to 51180	55220 to 55440
Y-intercept when X=0.0	-1297 to 1427	-559.9 to 337.1
X-intercept when Y=0.0	-0.02818 to 0.02541	-0.006099 to 0.01011
Goodness of Fit		
r ²	1.000	1.000
Sy.x	1248	410.8
Is slope significantly non-zero?		
F	139000	1519000
DFn, DFd	1.000, 6.000	1.000, 6.000
P value	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	8	8
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	8	8
Number of missing values	0	0

Anhang 3 _ Daten Gerade Accuracy

Best-fit values	
Slope	54470 ± 98.73
Y-intercept when X=0.0	-310.3 ± 287.3
X-intercept when Y=0.0	0.005698
1/slope	1.836e-005
95% Confidence Intervals	
Slope	53215 to 55724
Y-intercept when X=0.0	-3960 to 3339
X-intercept when Y=0.0	-0.06225 to 0.07164
Goodness of Fit	
R square	1.000
Sy.x	376.7
Is slope significantly non-zero?	
F	304400
DFn, DFd	1.000, 1.000
P value	0.0012
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	3
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	3
Number of missing values	0

Anhang 4 _ Daten Gerade Precision

Best-fit values	
Slope	54564 ± 424,7
Y-intercept when X=0.0	-1284 ± 893,7
X-intercept when Y=0.0	0,02353
1/slope	1,833e-005
95% Confidence Intervals	
Slope	53385 to 55743
Y-intercept when X=0.0	-3765 to 1197
X-intercept when Y=0.0	-0,02223 to 0,06813
Goodness of Fit	
R square	0,9998
Sy.x	1751
Is slope significantly non-zero?	
F	16505
DFn, DFd	1,000, 4,000
P value	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	0

12.2. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Tiwari Gauray / Tiwari Ruchi: Bioanalytical method validation: An updated review. Pharmaceutical Methods, 2010, Vol. 1 (1), p 25 – 38
- [2] Sealife Pharma GmbH: Neue Anthrachinon-Derivate. 2010, S 1 - 5; internationale Veröffentlichungsnummer WO 2010/ 135759 A1
- [3] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=89644> (Zugriff am 03.12.2013)
- [4] <http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-162/altersolanol-a/> (Zugriff am 21.11.2012)
- [5] http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Stemphylium_globuliferum&oldid=60907094 (Zugriff am 14.06.2014)
- [6] <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Alternaria&oldid=128663188> (Zugriff am 14.06.2014)
- [7] Haraguchi Hiroyuki / Abo Takahiro / Fukuda Ayumi / Okamura Nobuyuki und Yagi Akira: Mode of phytotoxic action of Altersolanols. Phytochemistry, 1996, Vol. 43, Nr. 5, p 989 – 992.
- [8] Yagi Akira / Okamura Nobuyuki / Haraguchi Hiroyuki / Abo Takahiro und Hashimoto Kensuke: Antimicrobial Tetrahydroanthraquinones from a strain of *Alternaria solani*. Phytochemistry, 1993, Vol. 33, Nr. 1, p 87 – 91
- [9] Haraguchi Hiroyuki / Abo Takahiro / Hashimoto Kensuke und Yagi Akira: Action-mode of antimicrobial Altersolanol A in *Pseudomonas aeruginosa*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, Vol. 56, Nr. 8, p 1221 – 1224
- [10] Teiten Marie-Hélène / Mack Fabienne / Debbab Abdessamad / Aly Amal H. / Dicato Mario / Proksch Peter und Diederich Marc: Anticancer effect of Altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 21, p 3850 – 3858

- [11] Causon Roger: Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion, Journal of Chromatography B, 1997, Vol. 689, p 175 - 180
- [12] Huber Ludwig: Validation of analytical methods. A Primer. Deutschland. Agilent Technologies. 2010, S 13 – 60.
- [13] von Mag. Katharina Schüller und Mag. Elisabeth Wurzer-Priester zur Verfügung gestellte Zusammenfassung (2012): Validation of an HPLC-System. Bioanalytical Method Validation.
- [14] Huber Ludwig: Validation and Quantification in Analytical Laboratories. Second Edition. New York. Informa Healthcare. 2007, p 125 – 155
- [15] Huber Ludwig: Validation of HPLC Methods, BioPharm, 1999, Vol. 12, p 64 – 66
- [16] Czejka Martin: Pharmazeutische Grundlagen der klinischen Prüfung: Konzepte pharmakokinetischer Untersuchungen. Onkologie. 2008, Vol. 31 (2), p 29 - 33
- [17] Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Rockville.1996. Online-Version von <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf> (Zugriff am 14.08.2014)
- [18] International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH harmonised tripartite Guideline: Validation of analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). 1994. Online-Version von http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (Zugriff am 14.08.2014)
- [19] European Medicines Agency: Guideline on bioanalytical method validation. London. 2011. Online-Version von http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (Zugriff am 14.08.2014)
- [20] Gey Manfred H.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 2008, S 57 - 59

[21] ibidem S 66 – 75

[22] Gey Manfred H.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 2008. S 87 – 89

[23] ibidem S 92 – 108

[24] Sahmanovic, Azra: Pharmakokinetik und Metabolismus von Gemcitabine in Plasma und Blutzellen während Kurzzeit- und Langzeitinfusion. Diplomarbeit. 2005. S 34

12.3. ABBILDUNGSÜBERSICHT

Abb. 01. Darstellung der Grundstruktur von Altersolanole
von Seite 989 *Fig. 1. Tetrahydroanthraquinones isolated from A. solani FY-03* siehe
Literaturverzeichnis [6]

Abb. 02. Schematischer Aufbau einer SPE-Kartusche (links) und einer SPE-
Apparatur
von Seite 69 *Abb. 3.12 Extraktionssäule für die SPE* und Seite 69 *Abb. 3.11*
Festphasenextraktions-Apparatur siehe Literaturverzeichnis [14]

Abb. 03 allgemeiner Aufbau einer HPLC-Apparatur
von Seite 101 *Abb. 4.8 HPLC-Apparatur* siehe Literaturverzeichnis [17]

Abb. 04. Waschkurven von Vivaspin- (Grafik oben) und Centrisart-Kartuschen (Grafik
unten)

Abb. 05. graphische Darstellung der Eichgerade in PBS nach Herstellung (rot), nach
1 Woche (blau), nach 2 Wochen (grün) und nach 4,5 Wochen (grau);

Abb. 06. Vergleich der Eichgeraden in Plasma und PBS (Konzentrationen von 0,078
 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bis 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$)

Abb. 07. Balkendiagramm der Resultate Freeze-thaw-Zyklen.

Abb. 08. Kurve stability on ice

Abb. 09. Chromatogramm Stress-Test Temperatur

Abb. 10. übereinandergelegte Chromatogramme von UV 366 nm (oben) und UV 254
nm (unten)

Abb. 11. Chromatogramm mit den einzelnen pH-Werten übereinandergelegt

Abb. 12. Dieses Chromatogramm zeigt den Substanzverlust der Probe nachdem
diese 24 Stunden später verarbeitet wurde

Abb. 13. Ermittlung der Nachweisgrenze.

Abb. 14. Ermittlung der Bestimmungsgrenze

Abb. 15. graphische Darstellungen der einzelnen Konzentrationen in der männlichen Harnprobe (oben) und der weiblichen Harnprobe (unten)

12.4. TABELLENÜBERSICHT

Tab. 01. prozentuelle Schwankungen im Vergleich zu den Messungen nach der Herstellung (Eichgerade in PBS)

Tab. 02. Vergleich der beiden Eichgeraden, PBS nach Herstellung und Plasma nach Herstellung

Tab. 03. Freeze-thaw-Werte nach drei Tagen im Tiefkühler

Tab. 04. prozentueller Anteil an der Analysesubstanz (Konzentration von 2,5 µg / ml; stability on ice)

Tab. 05. Abweichungen nach 1 Stunde thermischer Belastung

Tab. 06. zeigt den prozentuellen Anteil an Altersolanol A, welcher nach dem Aussetzen der Proben an Sonnenlicht und UV-Strahlung noch vorhanden ist.

Tab. 07. tabellarische Ergebnisse der pH-Veränderung

Tab. 08. Veränderung bei späterem Verarbeiten einer Probe in Biomatrix

Tab. 09. Werte der Richtigkeit

Tab. 10. Ergebnisse der Genauigkeit

Tab.11. Ergebnisse der modifizierten Vollblutanalyse

Tab. 12. Werte der Urinanalyse

Tab. 13. Werte der Leberextraktion