

**Aus dem Institut für Klinische Chemie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Seyfarth)
Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
und der Medizinischen Fakultät (Dekan: Prof. Dr. med. W. Solbach)
der Universität zu Lübeck**

**Aufbau, Evaluierung und Anwendung sensitiver und spezifischer
Methoden zur Bestimmung von Propofol und Propofolchinon in biologi-
schen Flüssigkeiten mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Andrea Scheel
aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Seyfarth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Gehring

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.04.2011

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen.....	7
1 Einleitung und Zielsetzung.....	8
1.1 Eigenschaften von Propofol und Propofolchinon.....	8
1.1.1 Chemie.....	8
1.1.2 Pharmakologie.....	9
1.1.3 Biochemie.....	10
1.2 Analytik.....	10
1.2.1 Übersicht verfügbarer Methoden.....	11
1.2.2 Einführung in die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	12
1.2.3 Publierte HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Propofol und Propofol- chinon.....	13
1.3 Fragestellung und Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Geräte	15
2.1.1 HPLC.....	15
2.1.2 Sonstige Geräte.....	16
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3 Fertigarzneimittel und Chemikalien.....	17
2.4 Reagenzien.....	18
2.4.1 Propofol-Arbeitslösungen.....	18
2.4.2 Propofolchinon-Arbeitslösungen.....	19
2.4.3 Standards.....	19

2.4.4 Kontrollproben.....	20
2.4.5 Enteiweißungslösung mit Internem Standard.....	21
2.4.6 Peroxidfreies Dioxan.....	21
2.4.7 Eluenten.....	21
2.5 HPLC-Methodik einschließlich Probenvorbereitung.....	22
2.6 Photometrische Messung der UV-Spektren.....	24
2.7 Gewinnung der Blut- und Urinproben.....	25
2.8 Statistische Auswertung.....	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Aufbau, Optimierung und Validierung einer Reversed-Phase-HPLC- Methode zur Bestimmung von Propofol.....	28
3.2 Untersuchungen anderer chromatographischer Fraktionen.....	34
3.3 Analytik des Metaboliten Propofolchinon.....	35
3.3.1 Versuch der Messung von Propofolchinon mittels der für Propofol optimierten HPLC-Methode.....	35
3.3.2 Aufbau, Optimierung und Validierung einer Normalphasen-HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofolchinon.....	38
3.4 Experimentelle Anwendung der vorgestellten Methoden.....	41
3.4.1 Bestimmung von Propofol in Plasma und Serum.....	41
3.4.2 Bestimmung von Propofolchinon in Plasma und Serum.....	43
3.4.3 Stoffwechselunterschiede bei Schafen und Schweinen.....	45
4 Diskussion.....	46
4.1 Bestimmung von Propofol.....	46
4.2 Bestimmung von Propofolchinon.....	51

4.3 Ausblick.....	54
5 Zusammenfassung.....	55
6 Literaturverzeichnis.....	56
7 Anhang.....	66
7.1 Tabellen.....	66
7.2 Genehmigungen.....	74
7.3 Publikationen.....	74
Danksagung.....	75

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

A	arteriell
ACN	Acetonitril
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FL	Fluoreszenz
g	Gramm
g	Erd- oder Zentrifugalbeschleunigung
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IS	Interner Standard
KP	Kontrolle mit Propofol
KPC	Kontrolle mit Propofol und Propofolchinon
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LP	Leerplasma
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NP	Normalphase
P	Propofol-Arbeitslösungen
PC	Propofolchinon-Arbeitslösungen
p. a.	zur Analyse
R ²	Bestimmtheitsmaß
RP	Umkehrphase (<i>Reversed-Phase</i>)
S	Standard
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
v/v	Volumen/ Volumen
WL	Wellenlänge
w/v	Gewicht/ Volumen (<i>weight/ volume</i>)

1 Einleitung und Zielsetzung

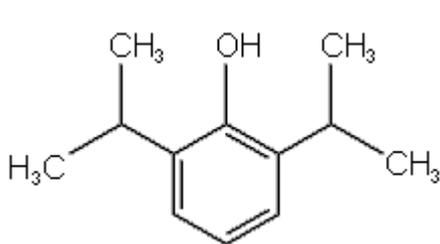
Propofol ist das weltweit am häufigsten verwendete intravenöse Narkotikum bei Mensch und Tier [Dowie et al., 1996; Larsen, 2006]. Die Substanz wurde 1953 von der Ethyl Corporation produziert [Römpp Lexikon Chemie, 1996-1999] und zu Beginn der 1980er Jahre erstmals klinisch erprobt [Larsen, 2006]. 1988 erfolgte die Zulassung durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Deutschland [BfArM, 2009].

Zunächst erstreckte sich die Anwendung von Propofol auf die Verwendung als kurz wirksames Mittel zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose [Stetson et al., 1993; Le Guellec et al., 1995]. Seit Mitte der 1990er Jahre ist es außerdem zur Sedierung von Patienten ab 16 Jahren auf Intensivstationen zugelassen [Wappler, 2006].

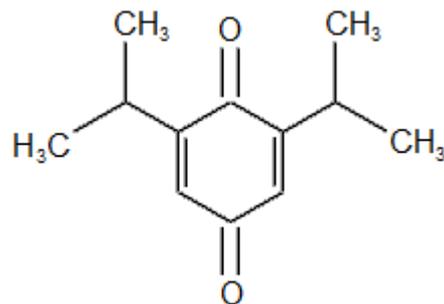
Für ein gemeinsames Forschungsprojekt der Klinik für Anästhesiologie und des Instituts für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zur Atemgasanalytik des Propofols wurden zuverlässige Bestimmungen der Propofol-Konzentration in Blut-, Plasma- und Serumproben verschiedener Spezies als Bezugswerte für gleichzeitig mit unterschiedlichen Verfahren gemessene Propofol-Konzentrationen in Atemgasproben benötigt. Für diesen Zweck sollten im Rahmen dieser Arbeit geeignete Methoden etabliert werden, die nach Möglichkeit auch Metabolite des Propofols wie beispielsweise das Propofolchinon erfassen können.

1.1 Eigenschaften von Propofol und Propofolchinon

1.1.1 Chemie



(a) 2,6-Diisopropylphenol



(b) 2,6-Diisopropyl-1,4-quinon

Abb. 1: Strukturformeln von Propofol (a) und Propofolchinon (b)

Propofol (2,6-Diisopropylphenol, Abb. 1a; Summenformel C₁₂H₁₈O) ist bei Raumtemperatur eine klare, farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit. Auf Grund seines chemischen

Aufbau ist es eher hydrophob [Fujita et al., 2000], sehr gut löslich in Fett [Guitton et al., 1998; Dawidowicz et al., 2006] und anderen organischen Lösungsmitteln. Die Substanz weist eine relative Molekülmasse von 178,27 g/ mol auf; der Schmelzpunkt liegt bei 18 – 19 °C, der Siedepunkt unter Normaldruck bei 256 °C (136 °C bei 40 mbar) [Römpp Lexikon Chemie, 1996-1999; Vetpharm Propofol, 2009]. Auf Grund seines hohen Siedepunktes ist Propofol nur begrenzt flüchtig.

Propofolchinon (2,6-Diisopropyl-1,4-chinon, Abb. 1b; Summenformel $C_{12}H_{16}O_2$) ist bei Raumtemperatur ein tief gelbes [Omura, 1998] oder gelblich-braunes Öl [Heyne et al., 2003]. Die relative Molekülmasse beträgt 192,25 g/ mol; andere Informationen sind in der Literatur kaum zu finden. Chemisch kann Propofolchinon durch Oxidation von Propofol unter Einsatz von Bleioxid und Perchlorsäure in Essigsäure gewonnen werden [Omura, 1998]; im Stoffwechsel entsteht es ebenfalls per Oxidation von Propofol (Kap. 1.1.3).

1.1.2 Pharmakologie

Propofol ist ein kurz wirksames Hypnotikum mit einer hohen therapeutischen Breite ohne analgetische Komponente [Sebel und Lowdon, 1989; Larsen, 2006]. Da die Substanz, wie beschrieben, schwer flüchtig und eher hydrophob ist, wird sie intravenös in Form einer Wasser-Öl-Emulsion appliziert [Baker et al., 2003]. Im Blut zirkuliert Propofol vorwiegend in Protein-gebundener Form (die Plasmaproteinbindung wird mit 97 – 98 % angegeben [Servin et al., 1988]), wobei vor allem Albumin als Trägersubstanz dient [Mazoit und Samii, 1999]. Der Anteil des freien, nicht an Plasmaproteine gebundenen und damit biologisch aktiven Propofols von etwa 1 – 3 % der gesamten Plasmakonzentration [Servin et al., 1988; Dawidowicz et al., 2006] bewirkt mit steigender Dosierung zunächst eine Sedierung, dann Schlaf, Narkose bis gegebenenfalls hin zum Koma, wobei die Übergänge fließend sind [Eberhardt et al., 2002]. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird angenommen, dass die Wirkung durch Inaktivierung der Kalium-evozierten Glutamat-Freisetzung über eine Aktivierung der $GABA_A$ -Rezeptoren [Buggy et al., 2000; Jurd et al., 2003] und eine Hemmung des Natriumkanal-abhängigen Natriumeinstroms zustande kommt [Wappler, 2006]. Die Wirkung tritt circa 10 – 40 Sekunden nach intravenöser Injektion ein [Kretz und Schäffer, 2006; Larsen, 2006] und hält ungefähr 5 – 10 Minuten an, wobei der schnelle Wirkverlust einerseits verursacht ist durch Umverteilung vom Hirn in Muskel- und Fettgewebe, andererseits durch raschen hepatischen Abbau (Plasmahalbwertszeit 30 – 60 Minuten) [Eberhardt et al., 2002].

1.1.3 Biochemie

Die Verstoffwechslung von Propofol im menschlichen Organismus wird mit 60 % hepatisch und 40 % extrahepatisch angegeben [Hiraoka et al., 2005]. Extrahepatisch scheint vor allem die Lunge von Bedeutung zu sein [Dawidowicz et al., 2000a]. Ein geringer Anteil des aufgenommenen Propofols wird direkt, also ohne Metabolisierung, mit Urin oder Fäzes ausgeschieden. Der überwiegende Teil wird jedoch entweder konjugiert – vor allem an wasserlösliche Glukuronsäure gebunden – oder zunächst zu Propofolchinol (etwa 47 %) oxidiert und dann in konjugierter Form renal eliminiert [Guitton et al., 1998; Dawidowicz et al., 2000a]. Propofolchinol kann außerdem zu Propofolchinon umgelagert werden [Vree et al., 1987; Favetta et al., 2000a], wobei bisher nicht geklärt ist, ob dieser Metabolit dann über die Nieren ausgeschieden wird. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 2) veranschaulicht die beschriebenen Abbauege.

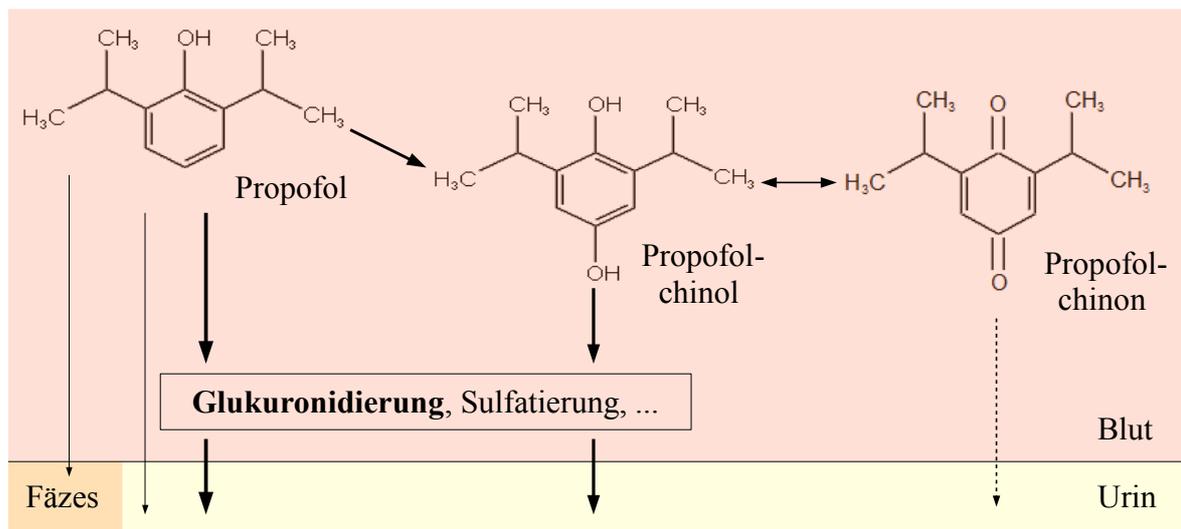


Abb. 2: Metabolismus und Elimination von Propofol (modifiziert nach [Favetta et al., 2000a])

Der größte Teil des zugeführten Propofols (etwa 90 %) wird nach Umwandlung in wasserlösliche Formen renal eliminiert [Favetta et al., 2000a]. Nur ein geringer Anteil der Ausscheidung (weniger als 2 %) erfolgt direkt über die Fäzes [Simons et al., 1988; Sebel und Lowdon, 1989]. Zudem sollen unter 0,3 % unverändert per Urin ausgeschieden werden [Simons et al., 1988], wobei neuere Untersuchungen von noch geringeren Mengen (0,002 - 0,006 %) ausgehen [Dawidowicz et al., 2002].

1.2 Analytik

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Bestimmung von Propofol beschrieben, die im Folgenden kurz dargestellt werden. Daran anschließend wird auf eines dieser

Verfahren – die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) – näher eingegangen, weil diese Methode für die Anforderungen des Projekts besonders geeignet erschien und in meiner Arbeit eingesetzt wurde.

1.2.1 Übersicht verfügbarer Methoden

Propofol kann optisch durch Messung seiner Absorption im ultravioletten [Heyne et al., 2003] und im infraroten Wellenlängen-Bereich [Viernstein et al., 1993] bestimmt werden. Dies ist jedoch nur mit geringer analytischer Spezifität und Sensitivität möglich. Bei Anregung mit UV-Strahlung von etwa 275 nm fluoresziert Propofol mit einem Emissionsmaximum von etwa 300 nm [Court et al., 1999]; die Messung der Fluoreszenz ist zwar empfindlicher als die der Absorption, bleibt aber ebenfalls recht unspezifisch, da im langwelligen UV-Bereich viele Biomoleküle Absorption und Fluoreszenz zeigen. Immunchemische Verfahren [Engelhardt et al., 2007] liefern Daten mit ebenfalls relativ geringer Spezifität, aber besserer analytischer Sensitivität.

Chromatographische Methoden mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) trennen vor der Messung das Propofol von anderen Komponenten der Probe und zeigen deshalb eine deutlich bessere Spezifität; ihre Sensitivität ist vom verwendeten Detektor abhängig – geringer bei UV-Messung [Vree et al., 1999], deutlich höher bei Messung mittels Fluoreszenz [Plummer, 1987] oder elektrochemischer Detektion [Dowrie et al., 1996]. Die Vorteile der HPLC liegen vor allem in kurzen Trennzeiten und hoher Trennleistung. Darüber hinaus ist mit ihr die Bestimmung begrenzt oder schwer flüchtiger Substanzen (wie Propofol) und thermolabiler Stoffe (wie Propofolchinon) möglich. Die Gaschromatographie [Fujita et al., 2000] liefert bei vergleichbarer Spezifität und Sensitivität ähnliche Daten wie die HPLC, kann aber nur für die Bestimmung thermisch stabiler Verbindungen eingesetzt werden. In Kombination mit der Massenspektrometrie [Stetson et al., 1993; Favetta et al., 2000b] kann die Spezifität der Gaschromatographie verbessert werden, allerdings zum Preis eines höheren technischen und zeitlichen Aufwands sowie der nötigen Expertise mit dieser komplexen Technik [Haeckel und Schumann, 1995].

Von den hier vorgestellten Methoden besteht im Institut für Klinische Chemie die größte Erfahrung in der Analytik mittels HPLC. Bei guter Spezifität und Sensitivität scheint die gleichzeitige Darstellung von Muttersubstanz (Propofol) und Metabolit (Propofolchinon) möglich.

1.2.2 Einführung in die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Chromatographie wurde vor etwa 100 Jahren entwickelt, wobei M. S. Tswett (1906a, b) mit seinen Untersuchungen vor allem an Chlorophyll als ihr Begründer gilt. In den 1960er Jahren entstand aus der Säulenchromatographie die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), die heute auf Grund ihrer Leistungsfähigkeit in der Forschung weit verbreitet ist, aber auch als Routinemethode beispielsweise zur Bestimmung verschiedener Pharmaka eingesetzt wird [Schumann, 1995; Atkins und Jones, 2006].

Eine HPLC-Anlage besteht mindestens aus Pumpe, Injektor und Trennsäule sowie einem Detektor und Ausgabegerät (Abb. 3).

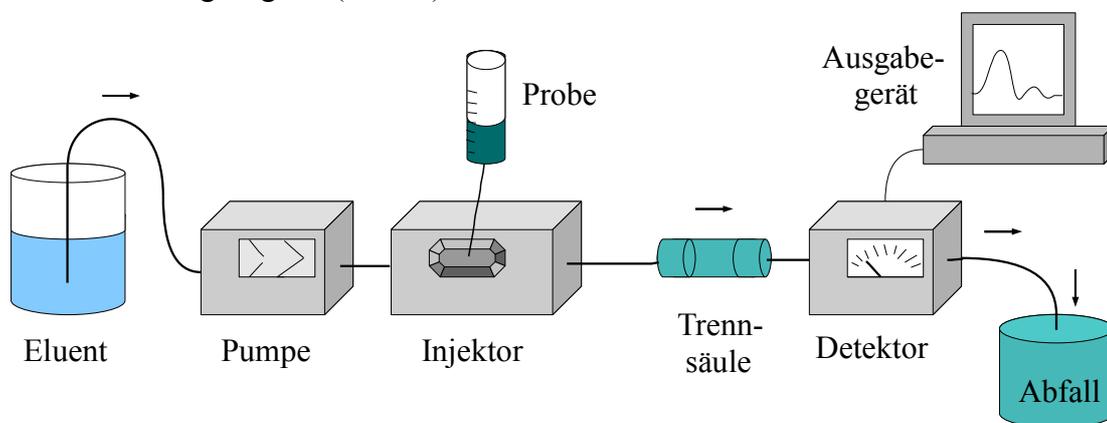


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographen

Die Säule (stationäre Phase) mit einem Innendurchmesser von in der Regel 2 – 6 mm ist mit einem sehr feinkörnigen Material wie zum Beispiel modifiziertem Kieselgel gefüllt. Mittels Eluent (mobile Phase) wird die Probe unter hohem Druck (bis etwa 300 bar/ 30 MPa) durch das System gespült. Hierbei kommt es zwischen Probe und Säulenmatrix zu reversiblen Bindungen, d. h. die unterschiedlichen Moleküle adsorbieren verschieden stark und lange an die stationäre Phase. Durch Desorption und Verdrängung, die für jede Substanz zeitlich charakteristisch erfolgt (Retentionszeit), kommt es zu einer versetzten Elution und damit zur Trennung der Probe in ihre Einzelkomponenten (Abb. 4).

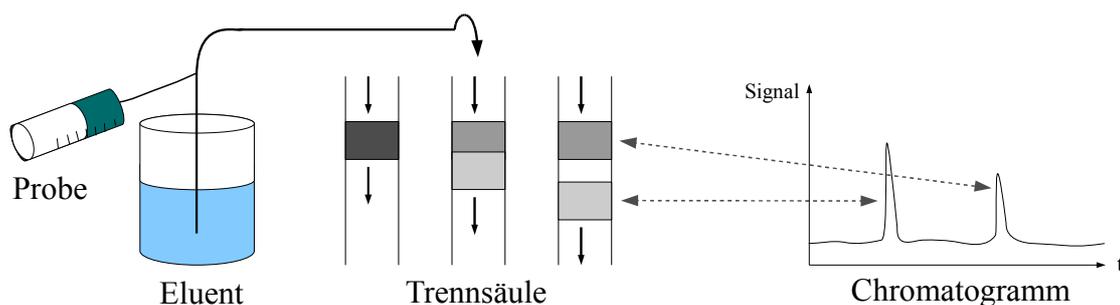


Abb. 4: Schematische Darstellung der Probentrennung mit korrespondierenden Peaks

Abhängig von der Retentionszeit und Signalintensität können über Höhe oder Fläche eines Peaks Rückschlüsse auf Qualität und Quantität des abgetrennten und eluierten Analyten gezogen werden [Hoinkis und Lindner, 2007].

1.2.3 Publierte HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Propofol und Propofolchinon

In der Literatur sind mehrere HPLC-Methoden zur Bestimmung von Propofol beschrieben, aber es gibt nur wenige Veröffentlichungen, in denen es um die Messung von Propofolchinon geht.

Propofol wurde sehr häufig in Vollblut [Dawidowicz und Fijalkowska, 1995; Fan et al., 1995] und anderen Blutprodukten wie zum Beispiel Plasma [Dawidowicz und Fijalkowska, 1995; Fan et al., 1995; Dowrie et al., 1996] und Serum [Altmayer et al., 1993] bestimmt. Andere Medien wie Urin [Favetta et al., 2000a], Liquor [Dawidowicz et al., 2003; Luo et al., 2004] und Follikelflüssigkeit [Christiaens et al., 1999] wurden ebenfalls auf darin enthaltenes Propofol untersucht. Als Detektionsprinzip wurde die Absorption im UV-Bereich [Vree et al., 1987; Pavan et al., 1992], die Fluoreszenz- [Plummer, 1987; Knibbe et al., 1998; Allegaert et al., 2007] oder die elektrochemische [Mazzi und Schinella, 1990; Dowrie et al., 1996] Detektion eingesetzt. Als besonders geeignet hat sich die Messung mittels Fluoreszenz-Detektor erwiesen, da Propofol mit ihr auf Grund seiner freien phenolischen Gruppe effektiv zu Fluoreszenz angeregt [Vree et al., 1999] und mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann.

Im Gegensatz dazu sind Publikationen, die sich mit der Messung von Propofolchinon befassen, deutlich seltener anzutreffen. Als Untersuchungsmaterial wurden ebenfalls Blut und Blutprodukte wie Plasma [Vree et al., 1987; Vree et al., 1999] eingesetzt, wobei die Daten mittels UV-Detektor gewonnen wurden. Untersuchungen mittels Fluoreszenz erwiesen sich als eher ungeeignet, da Propofolchinon je nach Quelle keine [Favetta et al., 2000a] oder allenfalls eine geringe [Court et al., 1999; Vree et al., 1999] Fluoreszenz-Aktivität zeigte, wohingegen die UV-Absorption ein intensives Signal lieferte. Eine Trennung von Propofol und Propofolchinon wurde in der Literatur zwar beschrieben [Vree et al., 1999; Heyne et al., 2003], dennoch scheint eine Verbesserung der Trennleistung dringend wünschenswert.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit zwei Fragestellungen: Im ersten Teil sollte der Versuch unternommen werden, für das eingangs geschilderte Forschungsprojekt zur Atemgasanalytik des Propofols eine spezifische, sensitive und zuverlässige Methode für Vergleichsmessungen der Propofol-Konzentration in parallel zu den Atemgasproben abgenommenen Blutproben zu etablieren. Zu diesem Zweck sollte eine bereits publizierte HPLC-Methode [Kita et al., 2002] installiert werden. Danach sollten Komponenten dieser Methode modifiziert und die optimierte Methode eingehend validiert werden, um sie dann für wissenschaftliche Untersuchungen einsetzen zu können. In den Chromatogrammen der Propofol-Proben traten weitere Peaks auf, bei denen es sich um andere während der Narkose eingesetzte Medikamente oder um Metabolite von Propofol handeln könnte. Deshalb sollte im zweiten Teil der Arbeit versucht werden, einzelne dieser Peaks zu identifizieren und zu quantifizieren. In einem ersten Schritt wurde hierfür die Co-Medikation untersucht; in einem zweiten der oxidative Metabolit Propofolchinon, der für Vergleichsuntersuchungen als Standard zur Verfügung stand. Für die Identifikation des Propofolchinon-Peaks war es nötig, eine weitere HPLC-Methode [Petro et al., 1992] zu installieren und zu modifizieren, da die Methode nach Kita et al. (2002) trotz zusätzlicher Modifikationen keine zufriedenstellende Auftrennung von Propofol und Propofolchinon lieferte. Auch diese Methode sollte zunächst validiert und anschließend für die Bestimmung des oxidativen Propofol-Metaboliten in Studienproben eingesetzt werden.

Zusammenfassend sollte also mit der vorliegenden Arbeit:

1. Eine HPLC-Methode zur Analyse von Propofol aufgebaut, optimiert und validiert werden, die für zuverlässige Vergleichsmessungen in Blut und anderen biologischen Flüssigkeiten geeignet ist.
2. Geprüft werden, ob mit der aufgebauten Methode zur Bestimmung von Propofol auch andere während der Narkose verabreichte Medikamente zu erfassen sind.
3. Eine Methode zur Analyse von Propofolchinon aufgebaut, optimiert und validiert werden, die die Bestimmung des oxidativen Metaboliten zusätzlich zur Muttersubstanz Propofol erlaubt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 HPLC

HPLC-Anlage: La Chrom	Merck-Hitachi, VWR International, Darmstadt, D
------------------------------	---

Autosampler L-7200

Entgaser L-7614

Pumpe L-7100

UV/VIS-Detektor L-7420

Fluoreszenz-Detektor L-7485

Interface D-7000

HPLC System Manager D-7000 (Version 4.0)

Säule: Umkehrphasen-Chromatographie (RP)

Synergi 4 μ Fusion-RP 80Å 250 x 4,6 mm 4 μ P/No 00G-4424-E 0	Phenomenex, Aschaffenburg, D
---	------------------------------

Security Guard Cartridge Polar-RP 4 x 3,0 mm P/No AJ0-6076-S	Phenomenex, Aschaffenburg, D
---	------------------------------

Prontosil 120-3-C18, H 3,0 μ m P/No 2003F185PS030	Bischoff Chromatographie, Leonberg, D
--	---------------------------------------

Säule: Normalphasen-Chromatographie (NP)

LiChrosorb Si 60 (5 μ m), Hibar Fertigsäule RT 250-4 No 118392	Merck, Darmstadt, D
---	---------------------

2.1.2 Sonstige Geräte

Gerät: Typ	Hersteller
Feinwaage: Mettler Toledo AG 245	Mettler-Toledo, Gießen, D
Gefrierschrank: ProfiLine ECU 5085-3 (- 60 °C)	National Lab, Mölln, D
Hämatologie-Analysator: Advia 120	Bayer, Fernwald, D
Klinisch-chemisches Analysesystem: Aeroset	Abbott, Wiesbaden, D
Magnetrührer: RCT basic IKA Labortechnik	IKA Werke, Staufen, D
Minischüttler: Heidolph Reax 2000	Heidolph, Schwabach, D
pH-Meter: Mettler Delta 345	Mettler-Toledo, Gießen, D
Pipetten: Finnpipette (20 – 200 µl)	VWR International, Darmstadt, D
Reference (10 – 100, 200 – 1000, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Research (0,5 – 10 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Micro Pettor (2 µl)	SMI, Emeryville, CA, USA
Multipette (x-mal 100 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasseranlage: TKA-GenPure	TKA, Niederelbert, D
Spektrophotometer: Uvikon 943 Double UV/VIS	Kontron Instruments, Milano, I
Überkopfschüttler: Heidolph-Schüttler	Heidolph, Schwabach, D
Ultraschallbad: Sternkopf Sonorex RK 102P	Bandelin electronic, Berlin, D
Vakuum-Filtrationsanlage	Millipore, Schwabach/ Ts., D
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

Geeichte Glaspipetten, Messkolben, Messzylinder, Schliffstopfenröhrchen aus Glas, Wasserstrahl-Pumpe, Ofen (+ 100 °C), Kühlschrank (+ 4 °C) und Gefrierschrank (- 20 °C) stammten aus gängigen kommerziellen Quellen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material: Typ	Hersteller
Filter: Cellulose Acetat Filter Poren 0,2 µm für Vakuum-Filtrationsanlage	Sartorius, Göttingen, D
HPLC-Gefäße: Gewinde-Mikroflaschen „V-Vial“ (braun 8 mm) Schraubdeckel	Chromatographie-Service, Kiel, D
Septen Sil/ PTEE weiß/ rot 1,1 mm	Merck, Darmstadt, D
Küvetten: 101-QS 10 mm für Spektralphotometer	A-Z Analytik-Zubehör, Langen, D
Monovetten: Lithium-Heparin (2,6 ml), Serum (9,0 ml), EDTA (2,7 ml)	Hellma, Müllheim, D
Pipettenspitzen: Combitips plus (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
ep T.I.P.S. Standard/ Bulk (0,5 – 20 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Finntip 250 universal (0,5 – 250 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
ultrapip (gelb und blau)	VWR International, Darmstadt, D
Reagiergefäße: 0,5; 1,5; 2,0 ml	Greiner bio-one, Essen, D
Transferpipetten: 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.3 Fertigarzneimittel und Chemikalien

Fertigarzneimittel [Zulassungsnummer]	Hersteller
Atropinsulfat 0,5 mg/ ml [5899.98.98]	B. Braun, Melsungen, D
Diazepam 10 mg/ 2 ml [1489.00.00]	Ratiopharm, Ulm, D
Ketamin 10 % [9089.01.00]	WDT, Garbsen, D
Propofol-Lipuro 2 % [41913.01.00]	B. Braun, Melsungen, D
Ringer-Lösung [1829.99.99]	Berlin-Chemie, Berlin, D
Rompun 2 % [6293841.00.00]	KVP, Kiel, D
zur Probenverdünnung:	
Natriumchlorid-Infusionslösung 154 [1299.99.99]	Berlin-Chemie, Berlin, D

Chemikalien [<i>Bestellnummer/ CAS-Nummer</i>]	Hersteller
Aqua bidest.	Reinstwasseranlage (Kap. 2.1.2)
Acetonitril p. a. [<i>8134/ 75-05-8</i>]	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Aluminiumoxid p. a. [<i>02084/ 1344-28-1</i>]	Woelm Pharma, Eschwege, D
1,4-Dioxan p. a. [<i>109671/ 123-91-1</i>]	Merck, Darmstadt, D
2,4-Di-tert-butylphenol p. a. [<i>820422/ 96-76-4</i>]	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
Kaliumdihydrogenphosphat p. a. [<i>104873/ 7778-77-0</i>]	Merck, Darmstadt, D
Methanol p. a. [<i>8402/ 67-56-1</i>]	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
n-Hexan p. a. [<i>104391/ 110-54-3</i>]	Merck, Darmstadt, D
Propofol 97 % [<i>D12-660-8/ 2078-54-8</i>]	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Propofolchinon (Propofol Impurity J) [<i>Y0000018/ -</i>]	LGC Promochem, Wesel, D
o-Phosphorsäure p. a. [<i>100573/ 7664-38-2</i>]	Merck, Darmstadt, D

2.4 Reagenzien

2.4.1 Propofol-Arbeitslösungen

Die Arbeitslösungen wurden mittels geeichter Glasgefäße und Pipetten in drei Konzentrationen hergestellt, die im weiteren Verlauf der Erzeugung von Standards (Kap. 2.4.3) und Kontrollproben (Kap. 2.4.4) dienen. Fertige Lösungen wurden bei + 4 °C in dicht verschlossenen Glasgefäßen abgedunkelt gelagert.

Die Propofol-Arbeitslösung 1 (P1) wurde wie folgt hergestellt: 10 µl (= 9,4 mg) Propofol wurden in einen 50 ml Messkolben gegeben, dieser mit Acetonitril (ACN) auf 50 ml aufgefüllt und die Lösung intensiv gemischt. Um Arbeitslösung 2 (P2) zu erhalten, wurde P1 mit Acetonitril im Verhältnis 1:10 verdünnt (100 µl P1 mit 900 µl ACN); für Arbeitslösung 3 (P3) wurde analog mit einer Verdünnung von 1:100 verfahren (10 µl P1 mit 990 µl ACN).

Da das hier verwendete Propofol eine Reinheit von 97 % aufwies, betrug der Propofolgehalt von P1: 9,12 mg/ 50 ml ACN. Daraus ergab sich für die Arbeitslösungen ein

rechnerischer Propofol-Gehalt von: P1 → 182,4 µg/ ml ACN
P2 → 18,2 µg/ ml ACN
P3 → 1,82 µg/ ml ACN

2.4.2 Propofolchinon-Arbeitslösungen

Aus Propofolchinon wurden ebenfalls drei Arbeitslösungen erstellt, die im Weiteren der Herstellung von Standards (Kap. 2.4.3) und Kontrollproben (Kap. 2.4.4) dienen. Auch hier fanden ausnahmslos geeichte Glasgefäße und Pipetten Verwendung; die Lagerung erfolgte ebenfalls bei + 4 °C dicht verschlossen und abgedunkelt in Glasgefäßen.

Die Propofolchinon-Arbeitslösung 1 (PC1) bestand aus 2 µl (= 2 mg) Propofolchinon in 1 ml Methanol (MeOH). Die weiteren Verdünnungen wurden aus PC1 unter Zugabe von Methanol gewonnen, indem sie für PC2 1:10 bzw. für PC3 1:100 verdünnt wurden (Mengenangaben wie in Kap. 2.4.1). Rechnerisch ergab sich ein Propofolchinon-Gehalt von:

PC1 → 2000 µg/ ml MeOH
PC2 → 200 µg/ ml MeOH
PC3 → 20 µg/ ml MeOH

2.4.3 Standards

Für die Kalibrationsmessungen wurden jeweils zehn Standards mit ansteigenden Konzentrationen in der Umkehrphasen-Chromatographie (RP) bzw. sechs Standards in der Normalphasen-Chromatographie (NP) eingesetzt. S0 bildete ohne Zusatz von Propofol oder Propofolchinon den Leerwert. Während in der RP-Chromatographie die Propofol-Konzentrationen von S1 – S9 zwischen 45,6 und 7294,4 µg/ l lagen, betragen sie in der NP-Chromatographie im Falle von Propofolchinon zwischen 100 und 7000 µg/ l bzw. bei Propofol zwischen 45,6 und 1823,6 µg/ l Plasma.

Die Kalibrationskurve wurde aus zum Versuch gehörigen Leerplasma für jede Probenserie frisch angesetzt. Das jeweilige Plasma wurde aufgetaut, in einem Reagenzglas 10 Sekunden gemischt, bei 3600 g für 10 Minuten zentrifugiert und jeweils 200 µl Überstand in die Reagiergefäße pipettiert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Propofol (Tab. 1) bzw. Propofolchinon und Propofol (Tab. 2) wurden die Standards wie die zu untersuchenden Proben weiter behandelt (Kap. 2.5).

Tab. 1: Pipettierschema der Kalibrationskurve für die Umkehrphasen-Chromatographie (RP)

Standard	LP [μ l]	Propofol		
			Menge [μ l]	Konzentration [μ g/l Plasma]
S0	200			-
S1	200	+	5,0 P3	(45,6)
S2	200	+	1,0 P2	(91,2)
S3	200	+	5,0 P2	(455,9)
S4	200	+	1,0 P1	(911,8)
S5	200	+	1,5 P1	(1367,7)
S6	200	+	2,0 P1	(1823,6)
S7	200	+	4,0 P1	(3647,2)
S8	200	+	6,0 P1	(5470,8)
S9	200	+	8,0 P1	(7294,4)

Tab. 2: Pipettierschema der Kalibrationskurve für die Normalphasen-Chromatographie (NP)

Standard	LP [μ l]	Propofolchinon			Propofol		
			Menge [μ l]	Konzentration [μ g/l Plasma]		Menge [μ l]	Konzentration [μ g/l Plasma]
S0	200						-
S1	200	+	1,0 PC2	(100)	+	5,0 P3	(45,6)
S2	200	+	5,0 PC2	(500)	+	2,0 P2	(182,4)
S3	200	+	10,0 PC2	(1000)	+	5,0 P2	(455,9)
S4	200	+	3,0 PC1	(3000)	+	1,0 P1	(911,8)
S5	200	+	7,0 PC1	(7000)	+	2,0 P1	(1823,6)

2.4.4 Kontrollproben

Bei jeder Messung wurden Kontrollproben aus humanem Leerplasma mit bekanntem Propofol- und gegebenenfalls Propofolchinon-Gehalt (Sollwert) mitgeführt.

Unter Verwendung geeichter Gefäße wurde zu jeweils 20 ml Leerplasma langsam (unter Mischung) die entsprechende Menge Arbeitslösung pipettiert (Tab. 3) und mindestens 10 Sekunden weiter gemischt. Die Kontrollen wurden zu je 250 μ l bei - 60 °C gelagert.

Tab. 3: Pipettierschema der Kontrollen mit zugehörigen Sollwerten

Kontrolle	LP [ml]	Propofol			Propofolchinon		HPLC-Methode	
			Menge [μ l]	Sollwert [μ g/l]		Menge [μ l]		Sollwert [μ g/l]
KP1	20	+	54,8 P2	(50)		-	RP-Chromatographie	
KP2	20	+	109,6 P1	(1000)		-		
KPC1	20	+	54,8 P2	(50)	+	2 PC1	(200)	NP-Chromatographie
KPC2	20	+	109,6 P1	(1000)	+	15 PC1	(1000)	

2.4.5 Enteiweißungslösung mit Internem Standard

Das in den Proben enthaltene Eiweiß wurde durch Zugabe von Methanol gefällt, welchem 2,4-Di-tert-butylphenol als Interner Standard (IS) zugesetzt war. Auch hier wurden ausnahmslos geeichte Glasgefäße benutzt; die Lagerung der Lösungen erfolgte gut verschlossen und dunkel im Kühlschrank.

Die Stammlösung enthielt 5,4 mg 2,4-Di-tert-butylphenol (IS) in 6 ml Methanol. Bei Bedarf wurde hieraus eine Arbeitslösung bestehend aus 250 µl Stammlösung in 200 ml Methanol hergestellt.

2.4.6 Peroxidfreies Dioxan

Zur Entfernung der im Dioxan enthaltenen Peroxide wurden etwa 100 g Aluminiumoxid 60 Minuten bei 100 °C getrocknet und zu 500 ml 1,4-Dioxan gegeben. Das Gemisch wurde nach 2 Stunden Rühren filtriert und das gereinigte Dioxan umgehend zur Herstellung des HPLC-Eluenten für die Analysen per Normalphasen-Chromatographie verwendet (Kap. 2.4.7).

2.4.7 Eluenten

Der Eluent zur Analyse per Umkehrphasen-Chromatographie bestand aus 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (KH_2PO_4) pH 2,3 und Acetonitril im Verhältnis 2 : 3 (40/60 v/v):

Zur Herstellung von 5 l Puffer wurden 68,05 g KH_2PO_4 in 4,5 l Aqua bidest. gelöst (30 Min. Magnetrührer). Der pH-Wert wurde mittels ortho-Phosphorsäure eingestellt und die Lösung dann mit Aqua bidest. auf 5 l aufgefüllt, filtriert und im Kühlschrank gelagert. Bei Bedarf wurde der Puffer frisch mit Acetonitril angesetzt (1000 ml Puffer + 1500 ml ACN) und 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die mobile Phase der Normalphasen-Chromatographie bildete n-Hexan mit einem 2%igen Anteil Dioxan:

Hierfür wurden 2500 ml n-Hexan mit 50 ml peroxidfreiem 1,4-Dioxan gemischt und 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

2.5 HPLC-Methodik einschließlich Probenvorbereitung

In der vorliegenden Studie fanden zwei in Tab. 4 gegenübergestellte HPLC-Methoden Anwendung (Übersicht der Probenbearbeitung in Tab. 5):

1. Die Umkehrphasen-Chromatographie (Versuchsteil 1 und 2)
2. Die Normalphasen-Chromatographie (Versuchsteil 2)

Tab. 4: Gegenüberstellung der angewandten HPLC-Methoden

HPLC-Methode	Umkehrphase		Normalphase
	Versuchsteil 1	Versuchsteil 2	Versuchsteil 2
Spezies Material	Mensch, Schwein, Schaf, Ziege Vollblut, Plasma	Schwein, Schaf Plasma, Serum	Schwein, Schaf Plasma, Serum
Nachweis	Propofol		Propofolchinon, <i>Propofol</i>
Injektionsvolumen	10 µl		50 µl
Eluent	0,1 M KH ₂ PO ₄ pH 2,3 + 60 % ACN		n-Hexan + 2 % Dioxan
Flussrate	1,1 bzw. 1,5 ml/ Min.		1,0 ml/ Min.
Detektor	Fluoreszenz (Anregung 270 nm/ Emission 310 nm)		UV (255 nm), <i>FL (270 nm/ 310 nm)</i>

Tab. 5: Übersicht der Probenbearbeitung

Bearbeitung	Versuchsteil 1	Versuchsteil 2	
		Umkehrphase	Normalphase
Probe		Kalibrationsreihe, Kontrolle 1 und 2 Vollblut, Plasma	Plasma, Serum Plasma, Serum
		30 Min. bei Zimmertemperatur auftauen Probe 10 Sek. mischen	
200 µl Probe +		400 µl MeOH/ IS	200 µl MeOH/ IS
		Probe 30 Sek. mischen 20 Min. im Kühlschrank inkubieren 10 Min. bei 20800 g und 4 °C zentrifugieren	
		Überstand analysieren	300 µl Überstand + 300 µl n-Hexan 30 Min. abgedunkelt über Kopf mischen 5 Min. bei 3000 g und 4 °C zentrifugieren ≤ 200 µl der oberen Phase analysieren

Zur Bestimmung der Propofol-Konzentrationen wurden Proben und Kontrollen etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut sowie für jede Serie aus dem zugehörigen Leerplasma Spezies-spezifische Kalibrationsreihen erstellt. Jede Probe wurde direkt vor dem Pipettieren 10 Sekunden gemischt und 200 µl in Reagiergefäße überführt. Nach Zugabe

der Enteiweißungs-Arbeitslösung (Umkehrphase: 400 µl MeOH/ IS; Normalphase: 200 µl MeOH/ IS) wurden die Ansätze 30 Sekunden gemischt und für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Ansätze (10 Min. bei 20800 g und + 4 °C), deren Überstand in braune, mit durchstechbaren Silikondichtungen luftdicht verschlossene Mikroflaschen überführt und per Umkehrphasen-HPLC analysiert wurde. Sollten die Proben per Normalphasen-HPLC untersucht werden, wurden die Analyten per Extraktion von der wässrigen in die organische Phase überführt. Hierfür wurden die Probe zunächst identisch behandelt (200 µl Probe + 200 µl MeOH/ IS, inklusive Inkubation und Zentrifugation), 300 µl Überstand in neue Reagiergefäße überführt, mit 300 µl n-Hexan aufgefüllt und für 30 Minuten abgedunkelt über Kopf gemischt. Zur Trennung der Phasen wurden die Gemische zentrifugiert (5 Min. bei 3000 g und + 4 °C) und mindestens 200 µl der oberen Phase in oben genannte Mikroflasche überführt und analysiert.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels HPLC-Anlage La Chrom der Firma Merck-Hitachi unter Verwendung einer Synergi 4 µ Fusion-RP 80Å 250 x 4,6 mm 4 micron mit der Vorsäule Security Guard Cartridge Polar-RP 4 x 3,0 mm der Firma Phenomenex (RP-Chromatographie) bzw. einer Hibar 250 x 4 mm mit Packungsmaterial LiChrosorb Si 60, Partikelgröße 5 µm der Firma Merck (NP-Chromatographie).

Der qualifizierende und quantifizierende Nachweis von Propofol mittels Umkehrphasen-Chromatographie erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Detektors mit Anregung bei 270 nm und Emission bei 310 nm. 10 µl Probe wurden injiziert und isokratisch mit einem Eluenten aus 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 2,3) und einem 60%igen Acetonitril-Anteil während des Analysezeitraums von 26 Minuten aufgetrennt. Der Lösungsmittelfluss betrug 1,1 bzw. 1,5 ml/ Min. (Abb. 5), worunter sich ein Säulendruck von etwa 105 bar ergab.

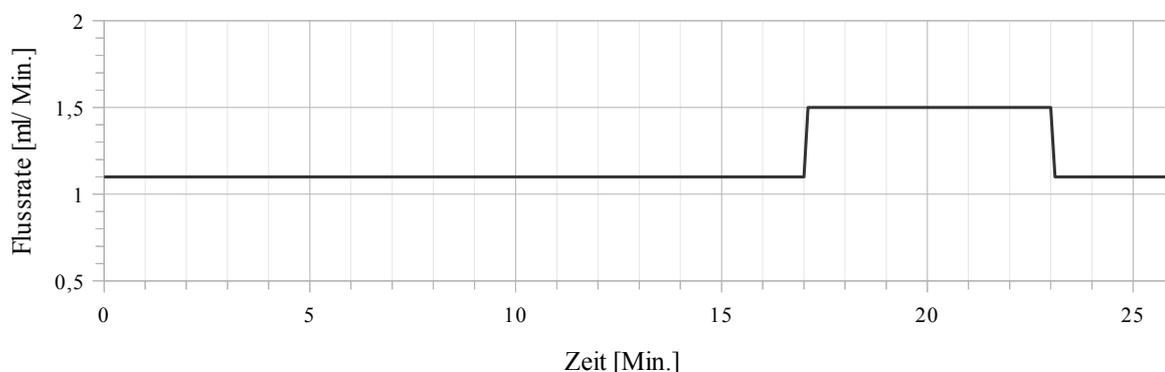


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Änderung des Lösungsmittelflusses

Zum qualifizierten und quantifizierten Nachweis von Propofolchinon und Propofol wurde die Normalphasen-Chromatographie mittels serieller UV- und Fluoreszenz-Detektion ein-

gesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl, wobei die Messung ebenfalls isokratisch erfolgte. Der Eluent bestand aus n-Hexan mit einem 2%igen Anteil Dioxan, welcher mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/ Min. lief und einen Säulendruck von etwa 48 bar verursachte. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten mittels UV-Detektor (Propofolchinon und Propofol) bei 255 nm bzw. Fluoreszenz-Detektor (Propofol) erneut Anregung bei 270 nm und Emission bei 310 nm (Abb. 6).

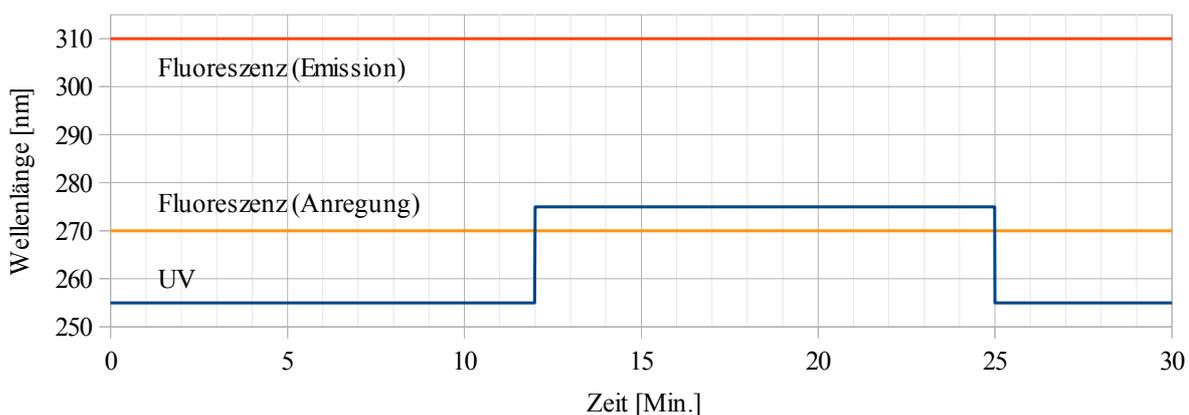


Abb. 6: Darstellung der Wellenlänge zur Messung mittels UV- und Fluoreszenz-Detektor

Im Anhang (Tab. 10, S. 66) ist die Gegenüberstellung der Probenvorbereitung und Analysebedingungen der HPLC-Methoden zusammengefasst. Dort finden sich auch Angaben zur Vorbereitung und Analyse der Urinproben.

2.6 Photometrische Messung der UV-Spektren

Die Messung der UV-Spektren von Propofol, Propofolchinon und des Internen Standards sowie einiger während der Narkose verwendeten Medikamente wurde unter Einsatz möglichst geringer Substanzmengen in einem Doppelstrahl-UV/VIS-Photometer durchgeführt.

Tab. 6: Pipettierschema zur Messung der UV-Spektren

Substanz/ Medikament	Menge	gelöst in	
		Methanol [ml]	Aqua bidest. [ml]
Propofol 97 %	5,0 µl	10,0	
Propofolchinon (PC1)	2,0 µl	1,98	
2,4-Di-tert-butylphenol	3,5 mg	10,0	
Propofol-Lipuro	200 µl		1,8
Atropinsulfat	200 µl		1,8
Diazepam	200 µl	1,8	
Ketamin	200 µl		1,8
Ringer-Lösung	1000 µl		
Rompun	200 µl		1,8

Die jeweiligen flüssigen oder gelösten Substanzen wurden pipettiert bzw. eingewogen (Tab. 6), die Lösungen gründlich gemischt und in Quarzküvetten gegen das jeweilige Lösungsmittel (Aqua bidest. bzw. Methanol) im Bereich von 220 – 450 nm bei Raumtemperatur gemessen. Substanzen, die nicht vollständig in Aqua bidest. zu lösen waren (Propofol; Propofolchinon; 2,4-Di-tert-butylphenol; Diazepam), wurden in Methanol bzw. Ringer-Lösung unverdünnt gemessen.

2.7 Gewinnung der Blut- und Urinproben

Die von den Anästhesisten entnommenen und zur Verfügung gestellten Proben wurden im Rahmen unabhängiger Tierversuche und Narkosen gewonnen und im Institut für Klinische Chemie im Auftrag der Klinik für Anästhesie untersucht. Die hierfür nötigen Genehmigungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät zu Lübeck und des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins lagen bei der Projektleitung (Professor Gehring, Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) vor (Kap. 7.2, S. 74 im Anhang).

Die Patienten erhielten zur Narkoseeinleitung pro Kilogramm Körpergewicht 1 µg Sufentanil, 0,7 mg Etomidate und 0,1 mg Pancuronium intravenös, wurden intubiert und normoventiliert. Die Blutentnahmen erfolgten nach Zeitschema am arteriellen Zugang, während Propofol sowie ggf. Ringer-Lösung venös verabreicht wurden.

Schweine, Schafe und Ziegen wurden pro Kilogramm Körpergewicht mit 4 mg Ketamin, 1,3 mg Rompun und 10 mg Atropin intramuskulär prämediziert (einige Schweine erhielten zudem Diazepam 0,3 mg/ kg KG), intubiert bzw. im Falle der Schweine ggf. tracheotomiert und alle Tiere normoventiliert. Probenentnahmen, Propofol-Gaben sowie Ausgleich von Volumenmangel erfolgten wie bei den Patienten beschrieben; Urinproben wurden mittels Urinkatheter gewonnen.

Das jeweilige Probenmaterial wurde von den behandelnden Anästhesisten am Entnahmeort unmittelbar anonymisiert. Im Labor wurden nur codierte Proben analysiert.

Die Blutentnahmen des ersten Versuchsteils erfolgten an je fünf Menschen, Schweinen, Schafen und Ziegen zu zwei Zeitpunkten (Abb. 7). Die Proben des ersten Entnahmezeitpunktes – ohne Propofol-Infusion – bildeten die Leerwerte. Sie beinhalteten mehrere Lithium-Heparin-Monovetten (Vollblut, Plasma, Gesamtprotein und Albumin) sowie ein EDTA-Röhrchen (kleines Blutbild). Die zweite Abnahme fand 10 Minuten nach Beginn

der Propofol-Infusion statt (Dosierung: Patienten eins bis vier 3 mg/ kg KG/ Std. und Patient fünf 6 mg/ kg KG/ Std.; alle Tiere 16 mg/ kg KG/ Std.). Hier wurden jeweils drei Lithium-Heparin-Röhrchen direkt aufeinanderfolgend zur Mehrfach-Bestimmung des Propofol-Spiegels entnommen, sowie eine EDTA-Monovette (Blutentnahmeschema Versuchsteil 1 in Tab. 11, S. 67 im Anhang). Bei einigen Ziegen wurden darüber hinaus Urinproben ebenfalls vor und nach Beginn der Propofol-Narkose entnommen.

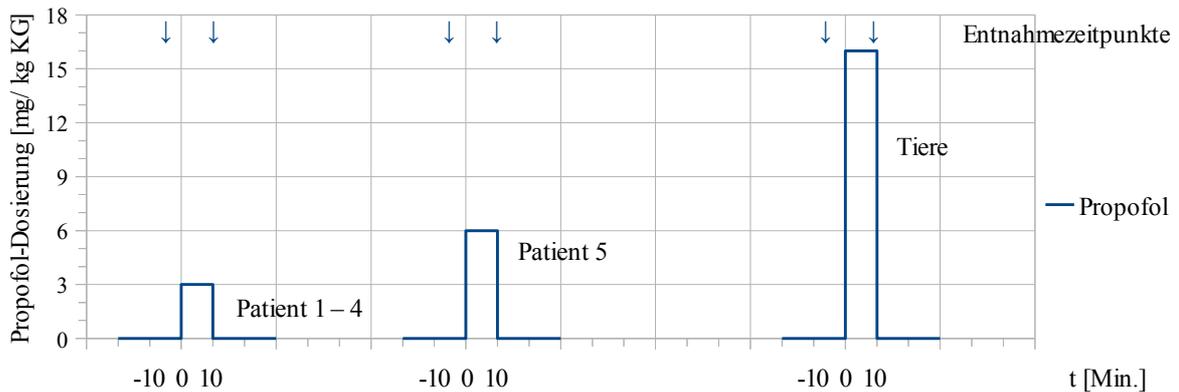


Abb. 7: Propofol-Dosierung und Entnahmezeitpunkte bei Menschen und Tieren

Das Entnahmeschema des zweiten Versuchsteils wurde an je sechs Schafen und Schweinen durchgeführt (Abb. 8), wobei auch hier nach Propofol-freier Narkoseeinleitung zunächst Leerwerte mittels Lithium-Heparin- und Serum-Monovetten (Plasma; Serum) entnommen wurden. Während der Propofol-Narkose, bestehend aus konstant laufender Infusion (Basalrate 0,96 mg/ kg KG/ Std.) und Bolus-Applikationen (1. – 4. Bolus 4 mg/ kg KG; 5. Bolus 2 mg/ kg KG), erfolgten die Blutentnahmen zur Propofol-Bestimmung jeweils 2, 5, 10 und 20 Minuten nach jeweiliger Bolus-Gabe – im Falle der Schweine nach zu Bolus fünf gehörigen Entnahmen zusätzlich 10-minütlich bis zum Versuchsende – mittels drei Lithium-Heparin-Monovetten (Plasma). Zum Zeitpunkt der letzten Blutabnahme, d. h. bei Schafen nach 80 Minuten bzw. bei Schweinen nach 270 Minuten, erfolgte zudem die Gewinnung je einer Serum-Monovette (Entnahmeschema Versuchsteil 2 in Tab. 12, S. 67 im Anhang).

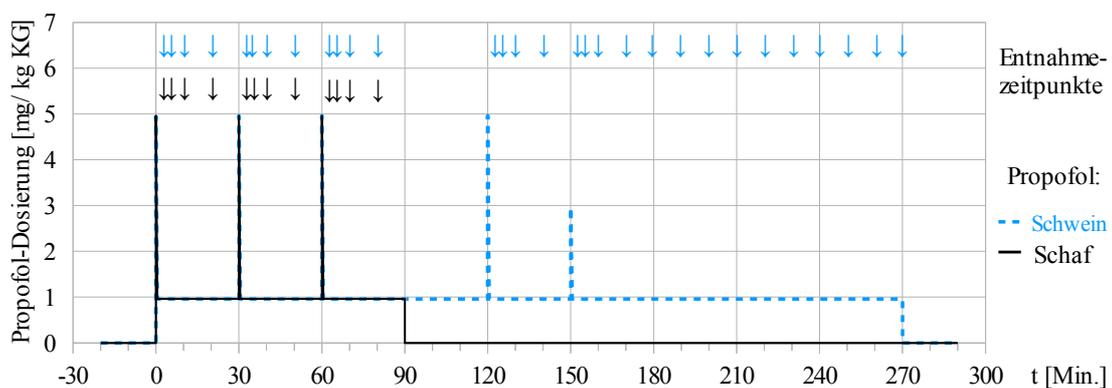


Abb. 8: Propofol-Dosierung und Entnahmezeitpunkte bei Schafen (schwarz) und Schweinen (blau)

Nach Entnahme des Blutes und nochmals nach Eingang der Proben im Labor wurden die Monovetten gut gemischt (mindestens fünf Mal geschwenkt). Für Versuchsteil 1 wurden 300 µl Vollblut (Lithium-Heparin-Röhrchen) entnommen und eingefroren. Das übrige Blut, bzw. in Versuchsteil 2 der komplette Inhalt, sowie die Serum-Monovetten wurden zur Herstellung von Plasma bzw. Serum zentrifugiert (10 Min. bei 3500 g und 0 °C), der Überstand in Aliquote à mindestens 300 µl aufgeteilt und ebenfalls bis zur Analyse tiefgekühlt gelagert (Zeitraum von Blutentnahme bis Lagerung bei - 20 °C in Versuchsteil 2: Plasma 15 – 30 Minuten, Serum 30 – 60 Minuten). Die Bestimmung des kleinen Blutbildes und der klinisch-chemischen Parameter (Versuchsteil 1) erfolgte nach Versuchsende zeitnah zum Laboreingang (Lagerung bis Analyse im Kühlschrank). Das kleine Blutbild wurde mittels Advia 120 Hämatologie-Analysators (Fa. Bayer) nach vollständiger Resuspension des gegebenenfalls vorhandenen Sediments analysiert. Gesamteiweiß und Albumin wurden im Plasma photometrisch mittels Biuret- bzw. Bromkresolpurpur-Methode auf einem Aeroset klinisch-chemischen Analysesystem (Fa. Abbott) bestimmt. Die Urinproben wurden nach Eingang im Labor ebenfalls zentrifugiert (5 Min. bei 3000 g und Raumtemperatur), der Überstand aliquotiert und bis zur Analyse bei - 20 °C gelagert.

2.8 Statistische Auswertung

Die Berechnung der in den Chromatogrammen gemessenen Konzentrationen erfolgte durch den HPLC System Manager (D-7000 Version 4.0). Die statistische Auswertung der Messdaten mit Berechnung von Mittelwert (MW), Variationskoeffizient (VK) und Regressionsanalyse sowie die graphische Aufbereitung wurde mit OpenOffice (Version 3.1) vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau, Optimierung und Validierung einer *Reversed-Phase*-HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofol

Der erste Teil der Arbeit diente der Etablierung und Optimierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der Propofol-Konzentrationen in Blut und anderen biologischen Flüssigkeiten. Zunächst wurde hierfür eine von Kita et al. (2002) publizierte *Reversed-Phase*- (RP-)HPLC-Methode im Institut für Klinische Chemie installiert. Die mit der Originalmethode erzielten chromatographischen Ergebnisse sind an einem typischen Beispiel in Abb. 9a dargestellt.

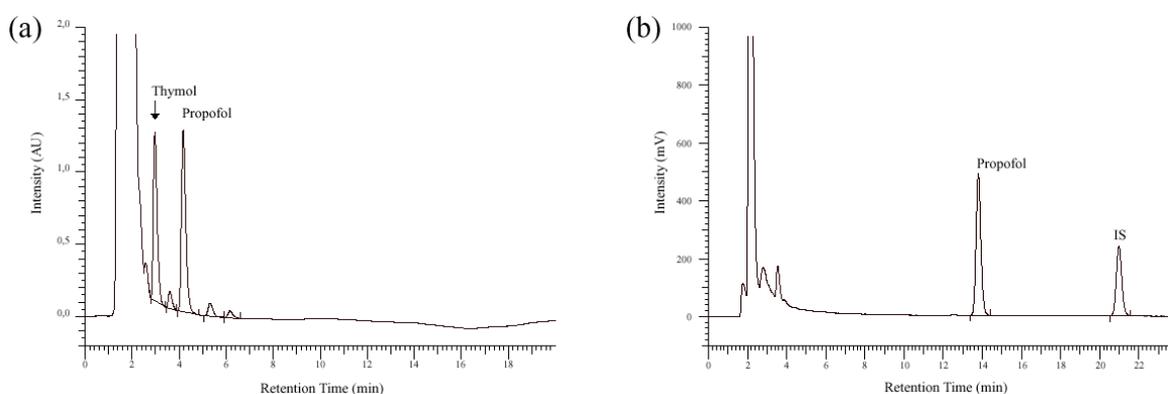


Abb. 9: Chromatogramme Propofol-haltiger Plasmen mittels Methode nach [Kita et al., 2002] (a) und hieraus abgeleiteter optimierter Methode (b)

Propofol eluierte nach etwa 4 Minuten und der Interne Standard Thymol nach ungefähr 3 Minuten (Abb. 9a). Beide Fraktionen erschienen somit frühzeitig nach dem Injektionspeak (ca. 2 Min.) und wurden von anderen im Plasma befindlichen Substanzen überlagert. Durch eine Reihe von Modifikationen wurde die Methode optimiert und zeigte danach eine bessere Auflösung (Abb. 9b), bei der Propofol nach etwa 14 Minuten und der Interne Standard 2,4-Di-tert-butylphenol (IS) nach ungefähr 21 Minuten eluierten. Im Wesentlichen trugen hierzu folgende Modifizierungen bei:

1. Zur Enteiweißung der Probe wurde anstelle des mit Perchlorsäure angesäuerten Methanols reines Methanol eingesetzt. Hierdurch wurden drastische Unterschiede im pH und in der Ionenstärke zwischen injizierter Probe und Eluent vermieden.
2. Statt einer konventionellen C18-Phase (Prontosil) wurde eine polare C18-Säule (Synergi Fusion) eingesetzt und dadurch die chromatographische Trennleistung deutlich verbessert.

3. Der Interne Standard Thymol wurde durch 2,4-Di-tert-butylphenol (IS) ersetzt, das später als Propofol und ohne Interferenz mit der Probenmatrix eluierte.

Zur Quantifizierung von Propofol wurden Kalibrationsmessungen durchgeführt. Hierfür wurde das zum Versuch gehörige Leerplasma bzw. -vollblut mit entsprechenden Standards versetzt und mit der optimierten Methode analysiert.

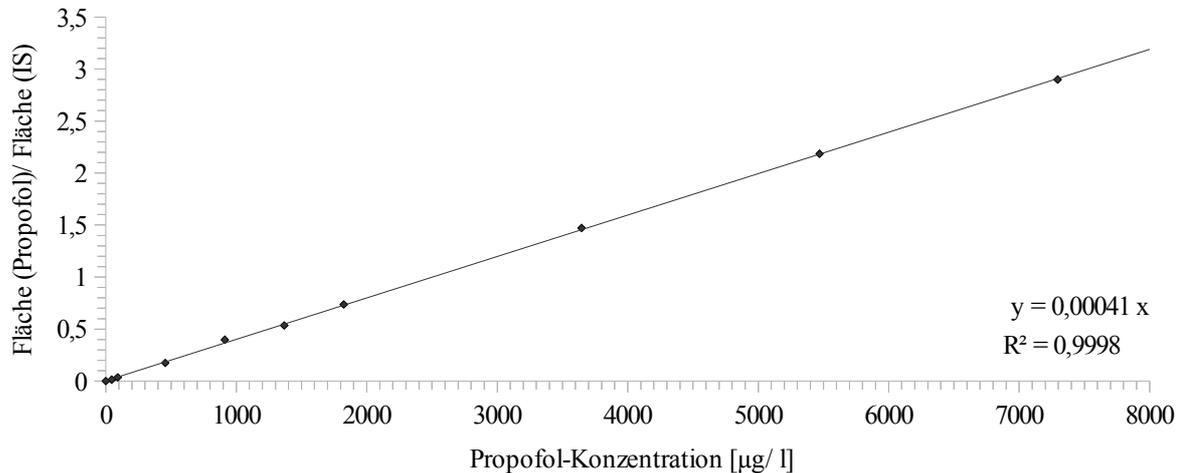


Abb. 10: Linearität der Propofol-Messung am Beispiel einer Kalibrationsgeraden in Schafplasma (Umkehrphasen-Chromatographie mit Fluoreszenz-Detektion)

Die Kalibrationen (Abb. 10) zeigten bis 8000 µg/l einen linearen Zusammenhang mit sehr guter Korrelation ($R^2 \geq 0,99$) zwischen Signal und eingesetztem Propofol. Höher konzentrierte Proben wurden mit Natriumchlorid-Lösung (0,9 % w/v) im Verhältnis 1:1 verdünnt und erneut gemessen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 2 µg/l (3-faches Grundrauschen der Basislinie); die untere Bestimmungsgrenze (kleinste mit ausreichender Präzision quantifizierbare Konzentration) wurde über ein deutliches Ansteigen des Variationskoeffizienten ($VK > 15\%$) bei niedrigen Propofol-Konzentrationen ermittelt und auf 10 µg/l definiert (Abb. 11).

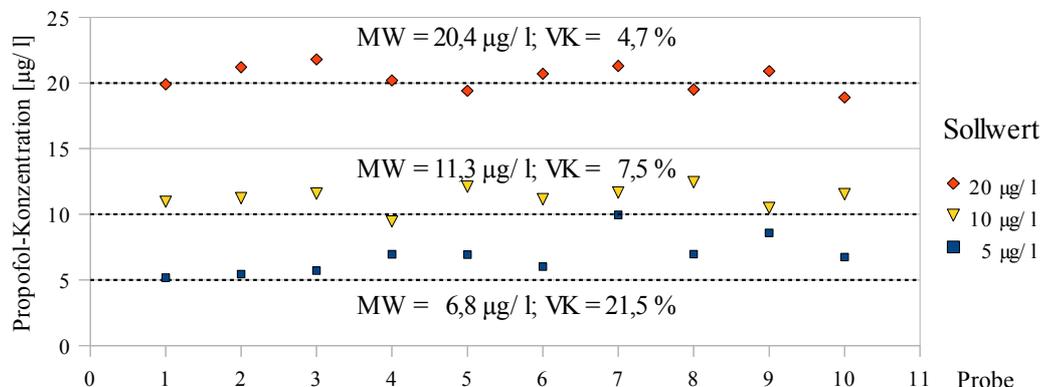


Abb. 11: Bestimmung der kleinsten quantifizierbaren Propofol-Konzentration in humanem Plasma. Dargestellt sind wiederholte Messungen ($n = 10$) dreier Propofol-Konzentrationen mit zugehörigen Mittelwerten (MW) und Variationskoeffizienten (VK).

Die bei jeder Messung mitgeführten Propofol-Kontrollen (n = 24) mit Konzentrationen von 50 bzw. 1000 µg/l zeigten eine Wiederfindung von 100,1 % (96,0 – 118,0 %) bzw. 98,4 % (96,9 – 109,3 %). Diese war unabhängig von der Spezies, von der das für die jeweilige Kalibration verwendete Plasma stammte. Die Präzision der Messungen zwischen den einzelnen Serien wurde mittels wiederholter Analysen genannter Kontrollen bestimmt und ergab Variationskoeffizienten (VK) von 4,9 bzw. 2,9 %; innerhalb einer Serie wurde sie mittels gepoolter Plasmaproben (n = 24) mit mittleren Konzentrationen von etwa 40, 490 bzw. 2850 µg/l mit VK von 2,6; 0,5 bzw. 0,7 % bestimmt (Tab. 7).

Tab. 7: Präzision wiederholter Propofol-Plasmaanalysen (n = 24) zwischen verschiedenen Serien (*inter-assay*) sowie innerhalb der Serien (*intra-assay*)

Proben-Nr.	<i>Inter-assay</i>		<i>Intra-assay</i>		
	Kontrolle 1 [µg/l]	Kontrolle 2 [µg/l]	Pool 1 [µg/l]	Pool 2 [µg/l]	Pool 3 [µg/l]
1	59	1059	44	490	2804
2	50	1063	46	488	2858
3	49	1007	44	489	2861
4	52	983	44	494	2869
5	51	979	45	495	2851
6	51	975	44	495	2857
7	50	1029	41	495	2861
8	49	1037	43	492	2846
9	49	969	43	493	2844
10	51	980	44	485	2846
11	49	1053	42	493	2846
12	50	1044	42	492	2821
13	50	1019	43	492	2820
14	50	1031	46	495	2860
15	56	1029	44	494	2861
16	54	1046	43	493	2891
17	52	1058	43	494	2863
18	52	1050	44	495	2882
19	50	1003	43	491	2834
20	54	1002	43	492	2843
21	51	1032	45	491	2834
22	50	1027	45	492	2833
23	50	1052	43	490	2846
24	48	1057	44	492	
n	24	24	24	24	23
Mittelwert [µg/l]	51,1	1024,3	43,6	492,0	2849,1
Variationskoeffizient [%]	4,9	2,9	2,6	0,5	0,7
Sollwert [µg/l]	50,0	1000,0			
Wiederfindung [%]	102,3	102,4			
min. Wiederfindung [µg/l]; [%]	48; 96,0	969; 96,9			
max. Wiederfindung [µg/l]; [%]	59; 118,0	1063; 106,3			

Mit den erläuterten Modifikationen der Umkehrphasen-Chromatographie-Methode wurden unter realen Studienbedingungen gewonnene Vollblut- und korrespondierende Plasma-proben verschiedener Säugerorganismen (Mensch, Schwein, Schaf und Ziege) untersucht (Abb. 12).

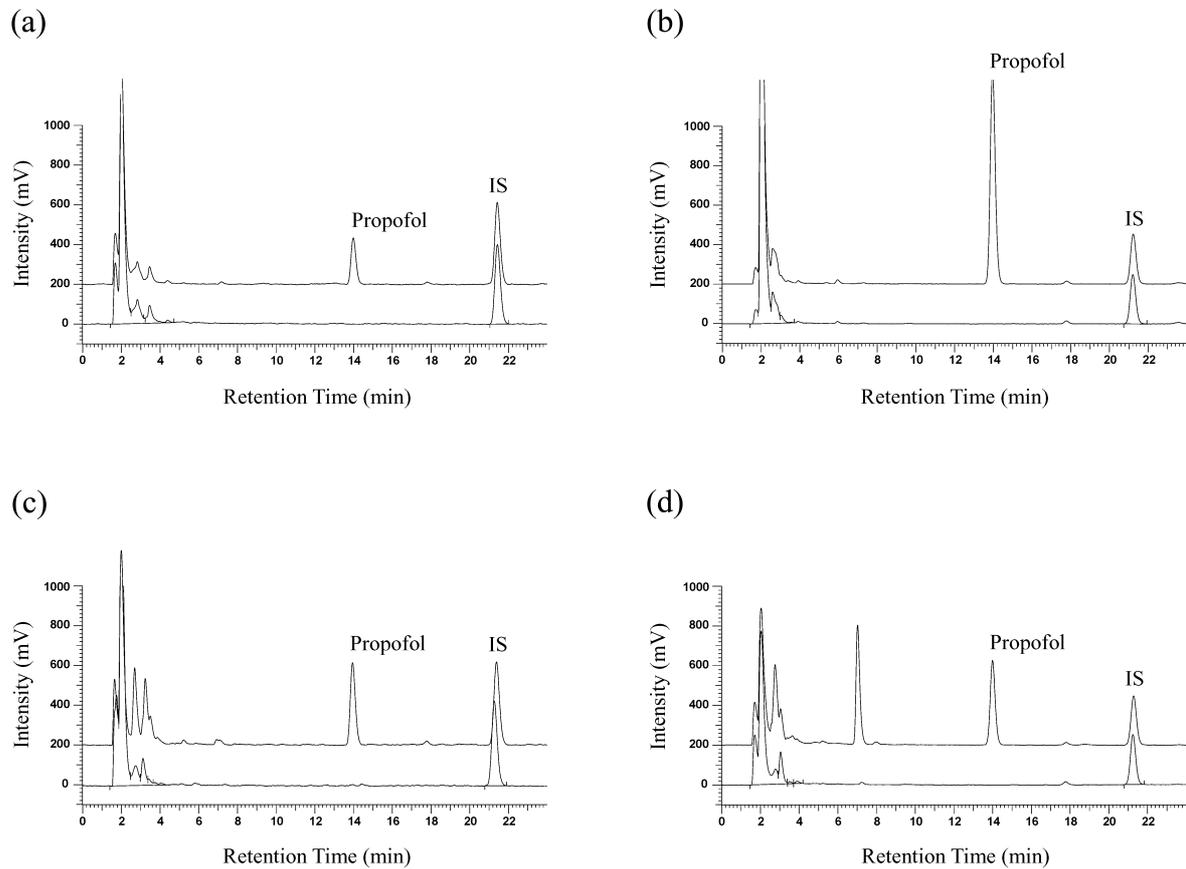


Abb. 12: Typische Chromatogramme von Plasmaproben bei Mensch (a), Schwein (b), Schaf (c) und Ziege (d) vor (untere Linie) und nach 10-minütiger Propofol-Applikation (obere Linie, 200 mV nach oben verschoben)

Propofol konnte in den Proben der vier Spezies mit deutlich isoliertem Signal dargestellt werden, ohne dass in den Leerplasmen (jeweils untere Linie) das Narkotikum nachweisbar war.

Betrachtet man die in den Proben von jeweils fünf Menschen, Schweinen, Schafen und Ziegen nach 10-minütiger Infusion gemessenen Propofol-Konzentrationen (Abb. 13), fällt zunächst eine im Allgemeinen gute Korrelation der Analyseergebnisse zwischen Vollblut (rot) und denen des korrespondierenden Plasmas (blau) – besonders ausgeprägt bei

Menschen und Ziegen – auf, daneben aber auch Spezies- und Subjekt-spezifische Unterschiede.

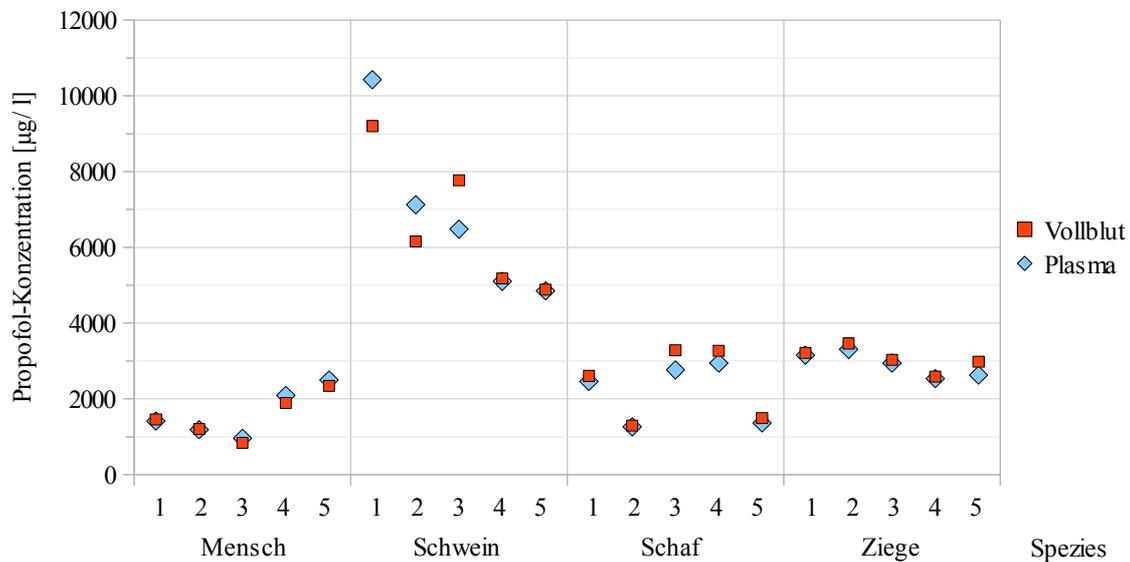


Abb. 13: Propofol-Konzentrationen in Vollblut und Plasma verschiedener Spezies. Dargestellt sind die Mittelwerte (3-fach Analyse) von je fünf Menschen, Schweinen, Schafen und Ziegen nach 10-minütiger Propofol-Infusion (Dosierung Mensch 1 – 4: 3 mg/ kg KG/ Std., Mensch 5: 6 mg/ kg KG/ Std.; Schwein, Schaf, Ziege: 16 mg/ kg KG/ Std.).

Obwohl allen Tieren identische Propofol-Dosierungen appliziert wurden, zeigten nur die Schafe und Ziegen vergleichbare Konzentrationen (etwa 1200 – 3500 µg/ l), wohingegen die Schweine deutlich höhere Propofol-Werte aufwiesen (ca. 4800 – 10500 µg/ l). Die in den menschlichen Proben gemessenen Konzentrationen (etwa 800 – 2500 µg/ l) lagen trotz einer erheblich geringeren Dosierung lediglich leicht unter denen der Schafe und Ziegen.

Ein weiterer Unterschied betrifft die Höhe der Messresultate von Vollblut und korrespondierendem Plasma. So fielen die Propofol-Konzentrationen im Vollblut der Menschen zu meist niedriger aus als im Plasma ($- 4,6 \% \pm 7,6 \%$), wohingegen sie bei Schafen und Ziegen jeweils über denen des Plasmas bestimmt wurden (Schafe: $10,6 \% \pm 8,1 \%$; Ziegen: $7,7 \% \pm 5,8 \%$). Im Gegensatz dazu waren die Messergebnisse der Schweine heterogen ($3,2 \% \pm 16,8 \%$) verteilt, sowohl zwischen Vollblut und Plasma als auch inter-individuell. Die Mittelwerte von Vollblut und Plasma sowie weitergehende Berechnungen und relevante Ergebnisse des kleinen Blutbildes und der klinisch-chemischen Analyse sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Propofol-Konzentrationen in Vollblut und Plasma verschiedener Spezies nach 10-minütiger Propofol-Infusion. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der jeweils drei unmittelbar nacheinander entnommenen Proben von je fünf Menschen, Schweinen, Schafen und Ziegen mit den zugehörigen Variationskoeffizienten (VK), die absoluten und relativen Differenzen zwischen Blut- und Plasmakonzentrationen sowie ausgewählte Ergebnisse des kleinen Blutbildes und der klinisch-chemischen Analyse. (* Mensch 5 erhielt eine abweichende Propofol-Dosis und ist daher vom Spezies-spezifischem MW exkludiert.)

Spezies	Vollblut (Propofol)		Plasma (Propofol)		Differenz (Blut-Plasma) [µg/ l]	Abweichung (Blut/ Plasma) [%]	Hämoglobin [g/ l]	Hämatokrit	Gesamtprotein [g/ l]	Albumin [g/ l]
	MW [µg/ l]	VK [%]	MW [µg/ l]	VK [%]						
Mensch										
1	1459	5,7	1415	3,2	44	3,1	111	0,31	65,9	35,1
2	1207	0,9	1186	1,8	21	1,8	130	0,37	58,9	37,4
3	842	1,3	959	4,8	-117	-12,2	126	0,35	58,3	33,2
4	1893	7,6	2090	6,3	-197	-9,4	123	0,36	64,7	36,3
5	2343*	1,8	2499*	2,2	-156	-6,2	114	0,31	70,5	38,2
MW	1350		1413		-81		121	0,34	63,7	36,0
Schwein										
1	9199	3,8	10427	3,2	-1228	-11,8	104	0,28	58,1	13,2
2	6155	1,0	7127	0,9	-972	-13,6	87	0,32	52,5	13,3
3	7773	2,3	6479	3,0	1294	20,0	94	0,30	69,7	12,1
4	5182	3,5	5103	1,3	79	1,5	114	0,33	71,7	18,1
5	4888	4,0	4852	1,1	36	0,7	103	0,29	64,9	15,7
MW	6639		6798		-158		100	0,30	63,4	14,5
Schaf										
1	2605	3,0	2460	1,5	145	5,9	111	0,37	78,7	12,9
2	1294	3,3	1262	1,3	32	2,5	107	0,30	70,3	11,2
3	3281	1,5	2763	0,4	518	18,7	91	0,28	61,8	9,6
4	3266	0,8	2942	1,1	324	11,0	103	0,31	84,4	11,2
5	1491	2,5	1365	0,9	126	9,2	101	0,30	80,0	13,1
MW	2387		2158		229		103	0,31	75,0	11,6
Ziege										
1	3214	0,9	3153	0,1	61	1,9	80	0,66	71,2	13,8
2	3462	8,3	3305	7,6	157	4,8	79	0,60	57,2	13,0
3	3030	1,7	2945	0,6	85	2,9	94	0,87	78,9	17,1
4	2588	1,3	2535	0,4	53	2,1	84	0,63	79,1	13,9
5	2979	3,5	2627	0,5	352	13,4	98	0,44	74,9	16,1
MW	3055		2913		142		87	0,64	72,3	14,8

Die Mehrzahl der in Tab. 8 aufgeführten Variationskoeffizienten befindet sich in einem Bereich, in dem auch die Variabilität innerhalb einer Serie liegt bzw. unterhalb von 5 %. Die reproduzierbare und damit zuverlässige Bestimmung der Propofol-Konzentration in Vollblut und Plasma scheint somit nicht grundlegend durch prä-analytische Faktoren beeinflusst zu werden. Dennoch fiel bei drei Experimenten (Mensch 1 und 4 sowie Ziege 2) eine

höhere Variabilität von etwa 6 – 8 % auf, die durch Variation im Infusions- oder Abnahmeschema verursacht sein könnte oder auch durch zeitgleiche Elution anderer während der Narkose verabreichter Medikamente. So wurden im vorderen Teil der Chromatogramme (Abb. 12, S. 31) vor allem bei Schafen und Ziegen weitere Peaks beobachtet, deren Untersuchung in Kap. 3.2 beschrieben ist.

3.2 Untersuchungen anderer chromatographischer Fraktionen

Als Versuch, die vor allem bei Schafen und Ziegen in den Chromatogrammen aufgetretenen weiteren Peaks zu identifizieren, wurde die den Tieren verabreichte Begleitmedikation chromatographisch analysiert. Es sollte geklärt werden, ob und wenn ja welche Medikamente unter den Detektionsbedingungen der für Propofol optimierten HPLC-Methode möglicherweise ein Signal generieren können. Hierfür wurde zunächst deren Absorption im UV-Bereich untersucht.

Die UV-Spektren der applizierten Medikamente Atropinsulfat, Diazepam, Ketamin, Rompun und Ringer-Lösung sind in Abb. 14 dargestellt; von Propofol-Lipuro konnte kein Spektrum bestimmt werden, da das Medikament als lichtundurchlässige weißlich-trübe Emulsion vorlag.

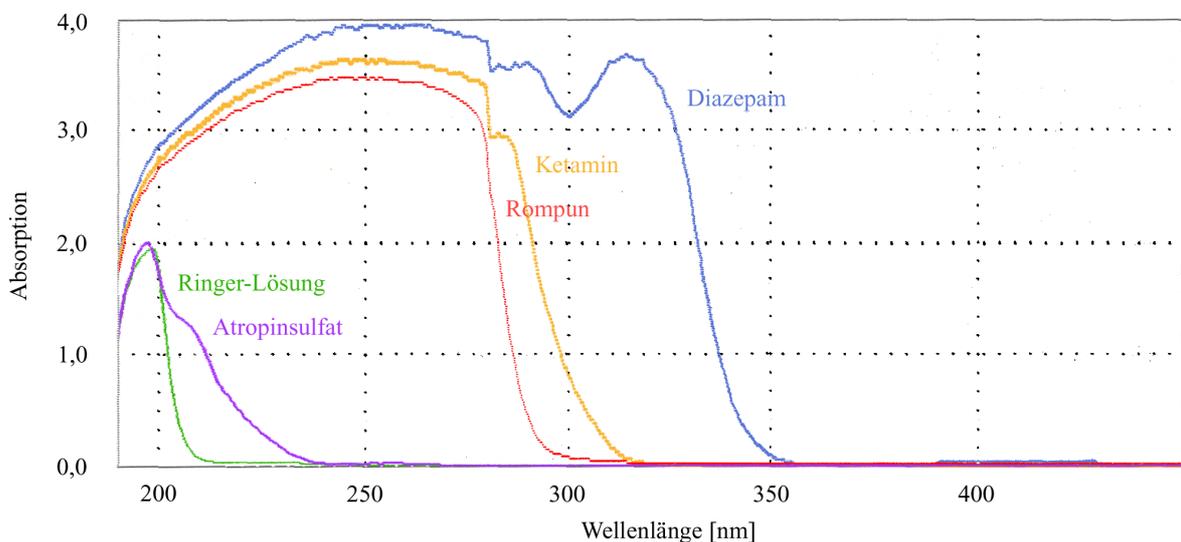


Abb. 14: UV-Spektren von Atropinsulfat, Diazepam, Ketamin, Rompun und Ringer-Lösung gegen das Lösungsmittel (Aqua bidest.; bei Diazepam MeOH) gemessen

Diazepam, Ketamin und Rompun zeigten im Bereich von 270 nm ein UV-Signal, wohingegen Atropinsulfat und Ringer-Lösung bei dieser Wellenlänge kein Licht absorbierten. Mittels HPLC-Methode, mit der auch Propofol gemessen wurde, ergab sich für die Co-Medikation in humanem Leerplasma folgendes Bild (Abb. 15):

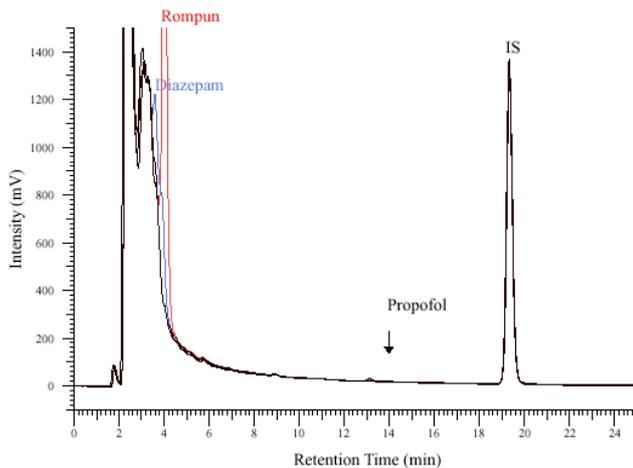


Abb. 15:

Chromatogramm der Begleitmedikation in humanem Leerplasma mittels Fluoreszenz-Detektion. Dargestellt sind fünf übereinander gelegte Chromatogramme unter Zusatz je eines Medikamentes.

Ketamin, Atropinsulfat und Ringer-Lösung lieferten kein detektierbares Signal, während Diazepam (blau) und Rompun (rot) frühzeitig mit Retentionszeiten nach etwa 3,5 und 4 Minuten eluierten. Da die beiden nachweisbaren Substanzen mit Bestandteilen der Plasmamatrix co-eluierten, konnten sie mit der Propofol-Methode nicht quantifiziert werden; die Messungen zeigten aber, dass die in den Chromatogrammen der Propofol-Bestimmung detektierten Medikamente so frühzeitig von der Säule eluierten, dass sie weder das Signal von Propofol noch das des Internen Standards (IS) beeinflussten.

3.3 Analytik des Metaboliten Propofolchinon

3.3.1 Versuch der Messung von Propofolchinon mittels der für Propofol optimierten HPLC-Methode

Um geeignete Detektionsbedingungen für Propofolchinon zu ermitteln, wurde zunächst dessen UV-Spektrum aufgenommen (Abb. 16). Zum Vergleich sind zusätzlich die Spektren von Propofol und des Internen Standards 2,4-Di-tert-butylphenol aufgeführt.

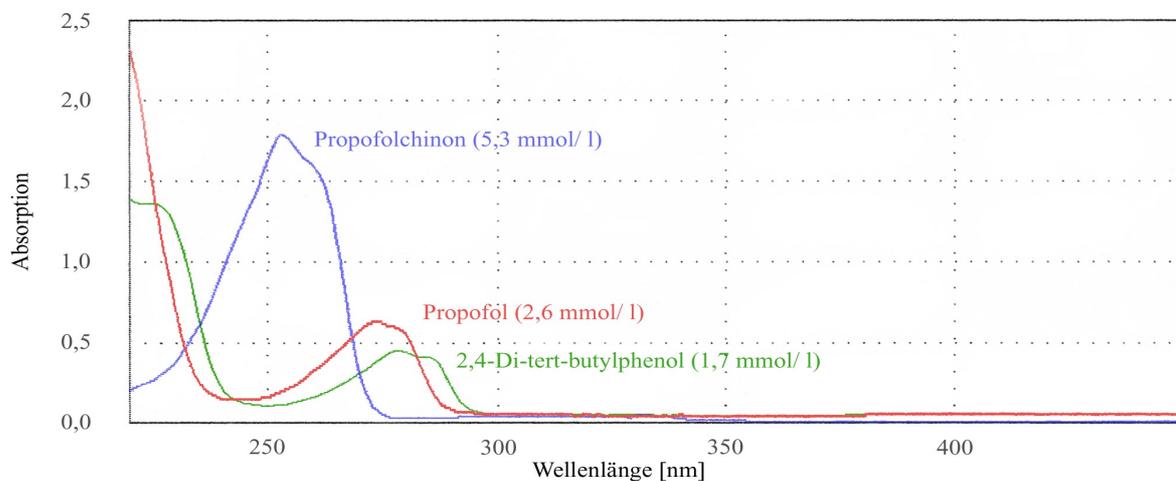


Abb. 16: UV-Spektren von Propofolchinon, Propofol und 2,4-Di-tert-butylphenol jeweils gegen das Lösungsmittel (MeOH) gemessenen

Die Spektren aller abgebildeten Substanzen zeigten bei einer Wellenlänge um 270 nm eine deutliche Absorption. Während sowohl Propofol als auch 2,4-Di-tert-butylphenol etwa in diesem Bereich ein Absorptionsmaximum aufwiesen, lag das von Propofolchinon bei etwa 255 nm.

In ersten – um einen UV-Detektor (270 nm) erweiterten – HPLC-Messungen wurden zunächst einige Urinproben untersucht, da hierin laut Literatur allenfalls sehr geringe Propofol-Konzentrationen (Kap. 1.1.3, S. 10) und somit kaum Interferenzen von Mutter-substanz und Metabolit zu erwarten waren. Der vor und während einer Propofol-Narkose gewonnene Ziegenurin wurde vorbereitet, wie in der Arbeit von Vree et al. (1999) beschrieben (Urin 1 : 9 verdünnt mit 0,2 M KH_2PO_4 -Puffer pH 6,8 und 5 Min. bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert) und mit der für Propofol optimierten Methode analysiert (Abb. 17 und Abb. 18).

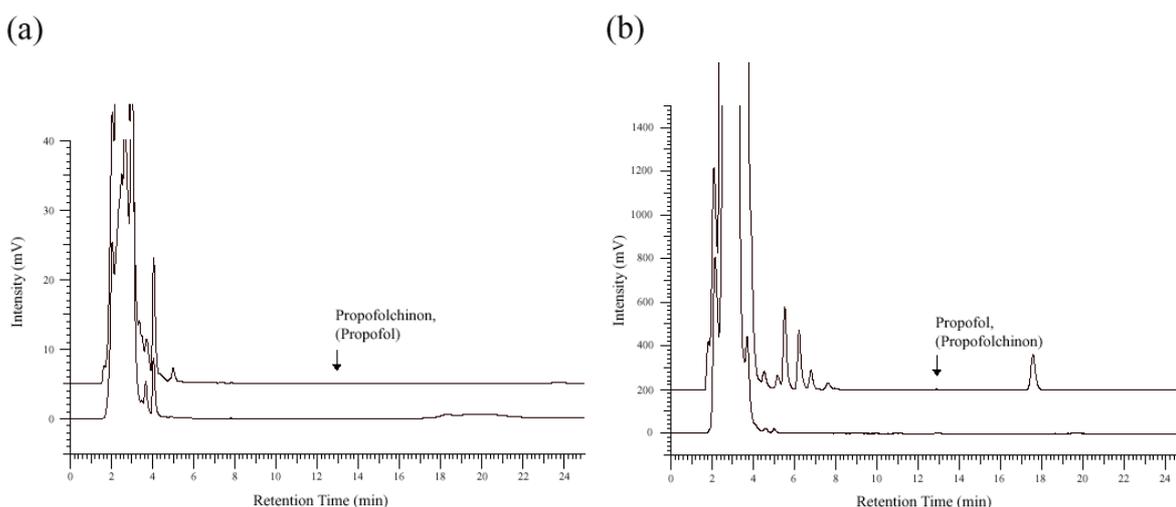


Abb. 17: Chromatogramme von Urinproben vor (unten) und während Propofol-Narkose (oben); (a) UV- und (b) Fluoreszenz-Detektion (obere Linie um 5 bzw. 200 mV nach oben verschoben)

Ohne Zugabe von Propofolchinon oder Propofol fanden sich in den Chromatogrammen (Abb. 17) vor allem in einem Bereich von 2 – 8 Minuten Unterschiede zwischen Leerurin (untere Linie) und unter Narkose gewonnenem Urin (obere Linie). Diese waren in der UV-Messung (Abb. 17a) weniger ausgeprägt als in der Fluoreszenz (Abb. 17b). Nach einer Retentionszeit von etwa 13 Minuten, zu der den Proben zugesetztes Propofol bzw. Propofolchinon eluierten (vgl. Abb. 18), war bei den nativen Proben lediglich in der Fluoreszenz-Messung ein schwaches Signal zu detektieren.

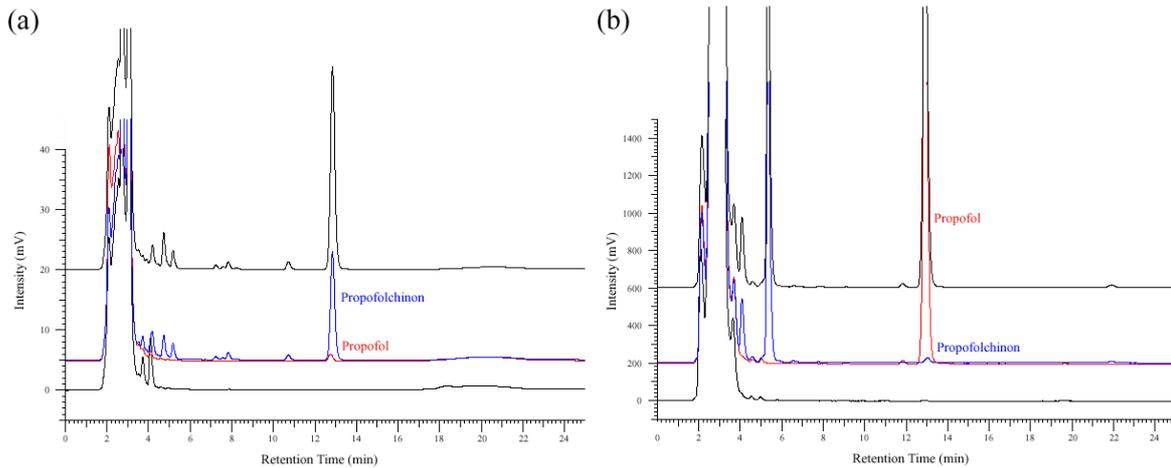


Abb. 18: Chromatogramme von Leerurin (unten), unter Zusatz von Propofolchinon (blau) bzw. Propofol (rot) und beider Substanzen (oben); (a) UV-, (b) Fluoreszenz-Detektion (mittlere Linien um 5 bzw. 200 mV nach oben verschoben, obere um 20 bzw. 600 mV)

Nach Zugabe der Standardsubstanzen konnte Propofolchinon per UV-Detektor (Abb. 18a, blaue Linie) in hoher Intensität nach etwa 13 Minuten gemessen werden, wohingegen Propofol – mit Fluoreszenz (Abb. 18b, rote Linie) nachgewiesen – ein deutliches Signal mit fast identischer Retentionszeit aufwies. Da das jeweils starke Signal das schwache überlagerte (obere, schwarze Linien), wurde versucht die Methode so zu modifizieren, dass beide Substanzen ohne gegenseitige Interferenzen darstellbar waren. Hierfür wurden Änderungen des Lösungsmittelflusses, des gesamten Eluenten oder nur seines pHs, Austausch der Trennsäule und Ähnliches vorgenommen. In Anlehnung an die oben zitierte Arbeit [Vree et al., 1999] wurde beispielsweise der Eluent durch 6 g/l o-Phosphorsäure in Aqua bidest. ersetzt und der Lösungsmittelfluss verändert (Gradient: Eluent zu ACN mit Flussrate von 1 ml/Min., 20 : 80 (v/v) zu Beginn, in 25 Min. verändert zu 60 : 40 (v/v), so für 20 Min., dann für 15 Min. 20 : 80 (v/v), Gesamtzeit 60 Min.) (Abb. 19).

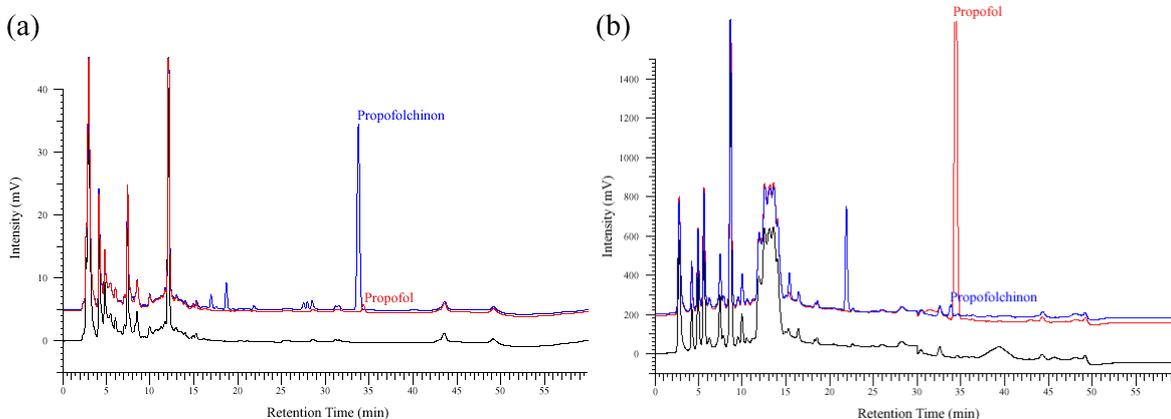


Abb. 19: Chromatogramme von Urinproben vor (schwarz) und nach Zusatz von Propofolchinon (blau) und Propofol (rot); (a) UV-, (b) Fluoreszenz-Detektion (farbige Linien jeweils um 5 bzw. 200 mV nach oben verschoben) (Eluent und Gradient nach [Vree et al., 1999])

Mit den oben geschilderten Modifikationen von Eluent und Lösungsmittelfluss konnte zwar eine Verbesserung der Trennleistung erzielt werden, dennoch waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend, so dass ein Methodenwechsel zur Normalphasen-Chromatographie unternommen wurde (Kap. 3.3.2).

3.3.2 Aufbau, Optimierung und Validierung einer Normalphasen-HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofolchinon

Der zweite Teil der Arbeit diente der Etablierung und Optimierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der Propofolchinon-Konzentration in Plasma ohne Interferenzen mit Propofol zu zeigen. Hierfür wurde eine von Petro et al. (1992) veröffentlichte Normalphasen-(NP-)HPLC-Methode, in der die Trennung verschiedener Phenole beschrieben ist, installiert und für die Analyse von Propofolchinon optimiert. Die wesentlichen Modifikationen waren:

1. Im Gegensatz zur Originalarbeit, in der im Eluenten gelöste Reinsubstanzen untersucht worden sind, sollte hier biologisches Material analysiert werden. Insofern bestand die Vorbereitung der Proben aus einer Enteiweißung mittels Methanol, dem zur Quantifizierung der Analyten ein interner Standard (2,4-Di-tert-butylphenol) zugesetzt war, sowie aus einer Extraktion mittels n-Hexan.
2. Die Analysebedingungen (Wellenlänge) wurden den Erfordernissen der zu untersuchenden Substanzen angepasst und betragen somit nicht 280 nm, sondern analog zur RP-Messung von Propofol (Anregung) zunächst 270 nm. Im Verlauf der Untersuchungen wurde sie auf das photometrisch bestimmte Optimum von Propofolchinon (255 nm) und des Internen Standards (275 nm) korrigiert (Abb. 6, S.24). Die Übersicht der jeweils verwendeten Wellenlänge ist Tab. 13 (S. 68 im Anhang) zu entnehmen.

Mit diesen Modifikationen wurden die unter Propofol-Narkose gewonnenen Plasmaproben von Schafen und Schweinen analysiert. Propofolchinon und Interner Standard konnten als eigenständige Peaks nach etwa 5 bzw. 16 Minuten dargestellt werden. Deutlich von beiden Substanzen getrennt, eluierte Propofol nach etwa 8 Minuten. Als Beispiel folgen typische Chromatogramme von Schafen und Schweinen (Abb. 20).

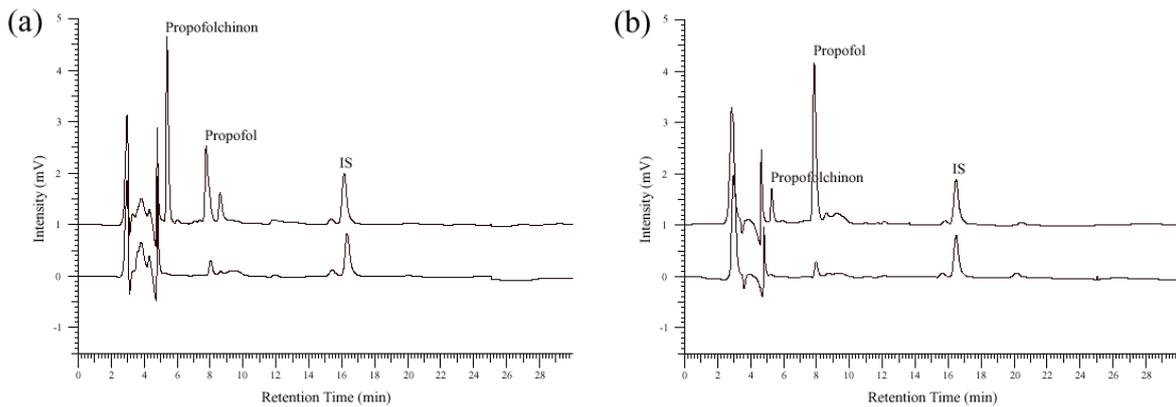


Abb. 20: Typische Chromatogramme von Plasmaproben bei Schaf (a) und Schwein (b) mittels Normalphasen-Chromatographie (UV-Detektion) vor (untere Linie) und nach Propofol-Applikation (obere Linie, um 1 mV nach oben verschoben)

Zur Quantifizierung von Propofolchinson wurden Kalibrationsmessungen durchgeführt. Hierfür wurde das zum Versuch gehörige Leerplasma mit entsprechenden Standards versetzt und mit der optimierten NP-Methode analysiert.

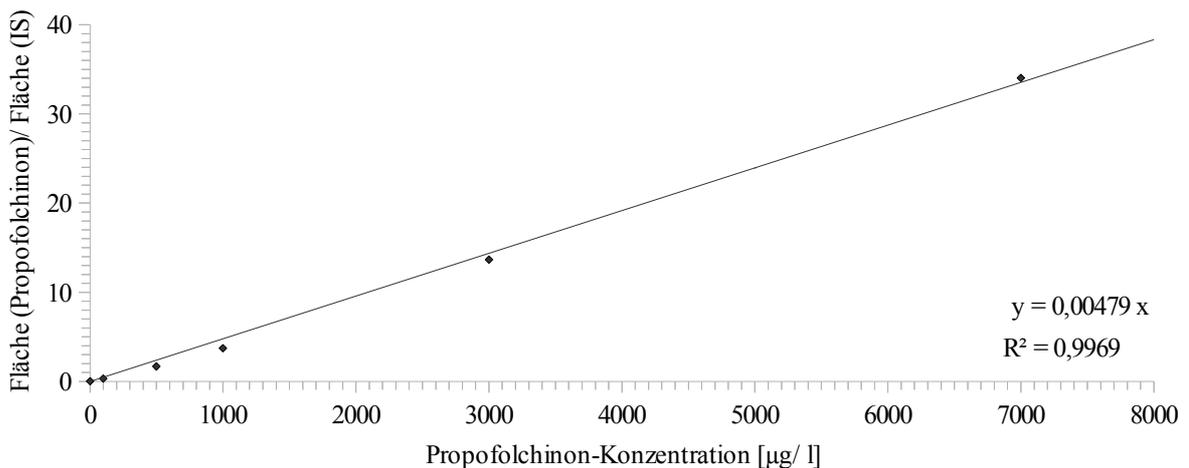


Abb. 21: Linearität der Messung von Propofolchinson am Beispiel einer Kalibrationsgeraden in Schweineplasma (Normalphasen-Chromatographie mit UV-Detektion)

Die Kalibrationen (Abb. 21) wiesen bis 7000 µg/ l einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen Signal und eingesetzter Propofolchinson-Konzentration mit guter Korrelation ($R^2 \geq 0,97$) auf. Die Grenzen der Methode wurden analog zur Umkehrphasen-Chromatographie bestimmt. Insofern wurde die obere Bestimmungsgrenze auf 8000 µg/ l festgelegt, die untere Nachweisgrenze betrug 10 µg/ l (3-faches Grundrauschen der Basislinie) und die untere Bestimmungsgrenze 50 µg/ l (5-fache untere Nachweisgrenze).

Um die Methoden vergleichbar zu halten, wurden die bei jeder Messung mitgeführten Propofolchinson-Kontrollen (200 bzw. 1000 µg/ l) analog zur Umkehrphasen-Chromatographie aus humanem Leerplasma hergestellt und mit der jeweils zur Serie gehörigen

Kalibration der Schweine- bzw. Schafproben gemessen. Während für die Schweine eine Wiederfindung ($n = 19$) von 79,3 % (63,0 – 95,5 %) bzw. 118,7 % (86,2 – 151,6 %) ermittelt wurde, lag die der Schafe ($n = 6$) mit 354,2 % (291,5 – 428,0 %) bzw. 528,1 % (473,0 – 611,3 %) unplausibel hoch (gemessene Daten in Tab. 14, S. 68 im Anhang). Der Vergleich typischer Kalibrationen von Mensch, Schwein und Schaf (Abb. 22) ergab ähnliche Verläufe der Geraden von Mensch und Schwein, aber eine deutlich abweichende für die Schafe, wodurch die auffälligen Werte der Wiederfindung erklärbar wären.

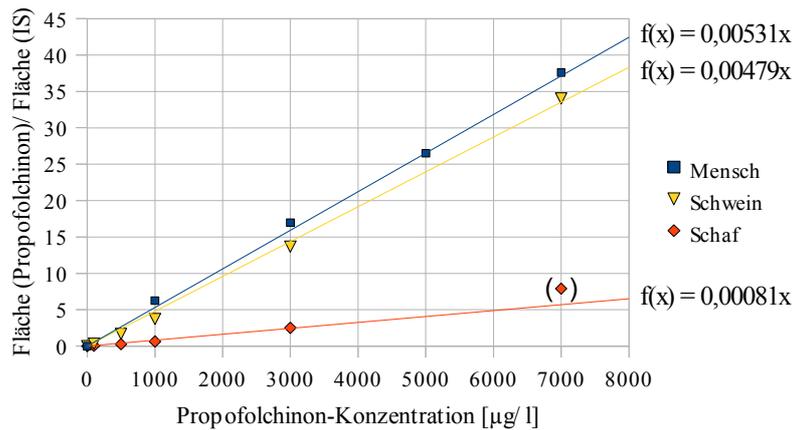


Abb. 22:
Gegenüberstellung der Kalibrationsgeraden in Plasma von Mensch, Schwein und Schaf mittels UV-Detektion bei 255 nm (NP-Chromatographie)

Nach Umrechnung der Kontrollen mittels Kalibration in menschlichem Plasma ergab sich für die mit dem Schafplasma gemessenen Kontrollen eine Wiederfindung von 62,9 % (44,4 – 75,5 %) bzw. 93,8 % (72,1 – 112,4 %) (korrigierte Daten in Tab. 14, S. 68 im Anhang).

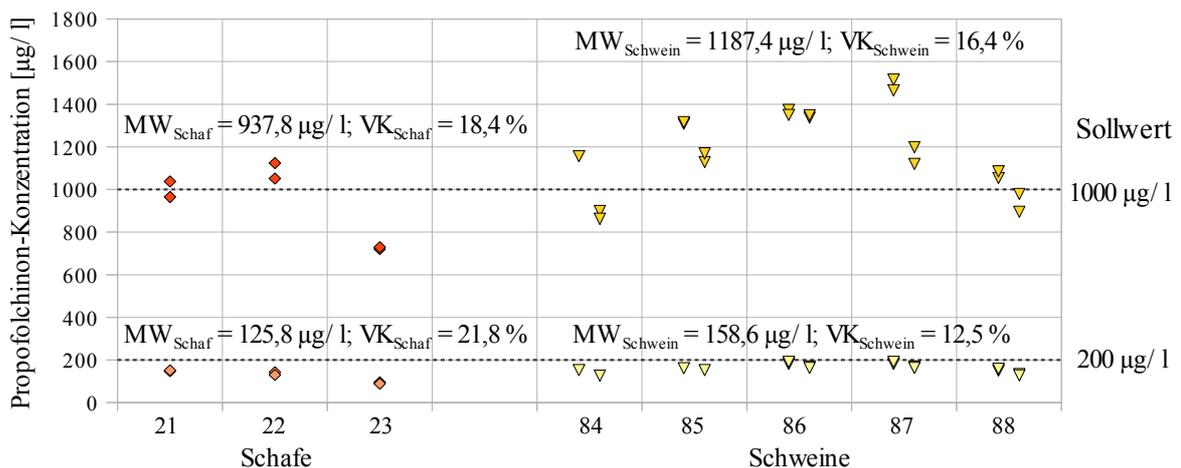


Abb. 23: Präzision wiederholter Propofolchinon-Plasmaanalysen ($n = 6$ bei Schafen; $n = 19$ bei Schweinen) zwischen verschiedenen Serien (*inter-assay*) horizontal sowie innerhalb der Serien (*intra-assay*) vertikal. *Inter-assay*-Mittelwert (MW) und -Variationskoeffizient (VK) sind jeweils pro Konzentration und Spezies aufgeführt.

Die errechnete Wiederfindung der mittels Schafplasma gemessenen und über „Menschenkalibration“ umgerechneten Kontrollen (Abb. 23, Raute) zeigt Werte, die ähnlich um die

Sollwerte (gestrichelte Linien) streuten, wie die der unverändert aufgeführten mit dem Schweineplasma gemessenen Kontrollen (Dreieck). Die Präzision der Messungen innerhalb einer Serie (übereinander liegende Messwerte) ergab für die Schafe einen gemittelten *intra-assay*-Variationskoeffizienten (VK) von 4,3 % (1,8 – 6,9 %) bzw. 3,6 % (0,8 – 5,2 %) und für die Schweine 2,6 % (0,4 – 5,8 %) bzw. 3,9 % (0,4 – 6,3 %).

3.4 Experimentelle Anwendung der vorgestellten Methoden

3.4.1 Bestimmung von Propofol in Plasma und Serum

Die Bestimmung der Propofol-Konzentrationen wurde an zahlreichen unter Propofol-Narkose gewonnenen Plasmaproben (Abb. 24 und Abb. 25) sowie einigen Serumproben (Abb. 25) von je sechs Schafen und Schweinen mittels Umkehrphasen-Chromatographie durchgeführt. Gemäß Entnahmeschema (Tab. 12, S. 67 im Anhang) erfolgte die Analyse des Plasmas in 3-fach-Bestimmung, mit Darstellung der Mittelwerte, sowie 1-fach-Bestimmung der 2 Minutenwerte nach Bolus-Applikation in Plasma und Serum.

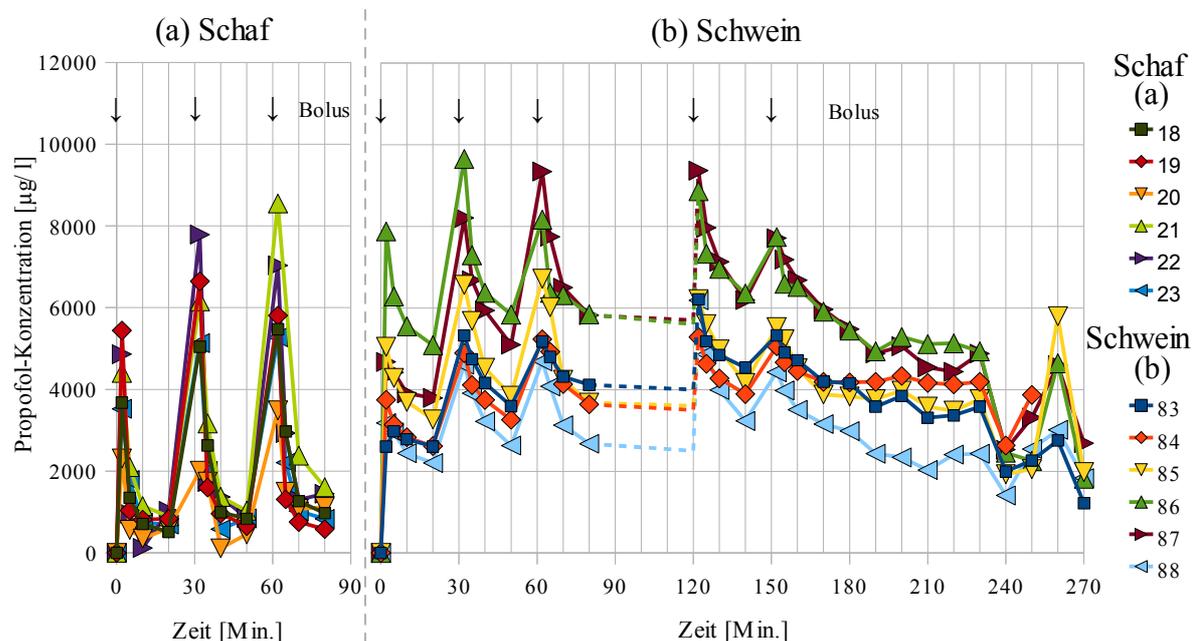


Abb. 24: Propofol-Konzentrationen in Plasma von Schafen (a) und Schweinen (b) mittels Umkehrphasen-Chromatographie (Dosierung: Basalrate 0,96 mg/ kg KG/ Std. und Boli: je 4 mg/ kg KG; fünfter Bolus Schwein: 2 mg/ kg KG)

Im Plasma der Schafe (Abb. 24a) wurde 2 Minuten nach Bolus-Applikation (Pfeil) ein deutlicher Anstieg der Propofol-Konzentrationen auf etwa 3500 – 8500 µg/ l beobachtet. Während der drei nachfolgenden Messungen sanken die registrierten Konzentrationen kontinuierlich bis etwa 500 µg/ l. Einzig das Schaf 20 (orange) wies direkt nach Verab-

reichung der Boli mit Konzentrationen zwischen etwa 2000 – 3500 µg/ l deutlich niedrigere Resultate auf. Auch im Plasma der Schweine (Abb. 24b) wurde jeweils 2 Minuten nach Propofol-Applikation ein deutlicher Anstieg der Propofol-Konzentrationen auf Werte von zumeist ca. 4000 – 8000 µg/ l gemessen, jedoch konnten auch höhere Plasmaspiegel (> 9500 µg/ l) detektiert werden. Während der drei nachfolgenden Analysezeitpunkte sank die nachgewiesene Propofol-Menge kontinuierlich, wobei Werte von 2000 µg/ l nur in Einzelfällen unterschritten wurden. Lediglich die Induktion eines hypovolämischen Schocks 240 Minuten nach Beginn der Propofol-Narkose mit nachfolgendem Volumen- ausgleich bewirkte bei den Schweinen kurzfristig die Messung niedrigerer Konzentrationen. Während die vier ersten Propofol-Boli aus 4 mg/ kg KG bestanden, verursachte die erste Propofol-Applikation Konzentrationen von etwa 3000 – 5000 µg/ l (Schwein 86 ca. 7900 µg/ l), wohingegen mit den drei folgenden Boli (30, 60 und 120 Min.) allgemein höhere Spiegel (ca. 4700 – 9700 µg/ l) erreicht wurden. Der direkte Vergleich der resultierenden Konzentrationen von Bolus 4 (4 mg/ kg KG bei 120 Min.) und Bolus 5 (2 mg/ kg KG bei 150 Min.) zeigte einen etwa halb so starken Anstieg der Messresultate.

Propofol konnte mit der für Propofolchinon optimierten Normalphasen-Chromatographie ebenfalls nachgewiesen bzw. bestimmt werden. Während in der UV-Messung eine Quantifizierung auf Grund von Interferenzen mit Plasmabestandteilen nicht möglich war, zeigten die Fluoreszenz-Analysen diesbezüglich kaum Beeinträchtigungen. Bedingt durch die Erhöhung des Analysevolumens wurde das Propofol-Signal verstärkt und lag vor allem in den Proben der Schweine häufig im Sättigungsbereich. Da die Kalibrationen bis 1800 µg/ l ($R^2 \geq 0,97$) linear waren, wurden bei dem Vergleich der Fluoreszenz-Methoden – Umkehrphase vs. Normalphase – nur Wertepaare < 2000 µg/ l berücksichtigt (Abb. 25).

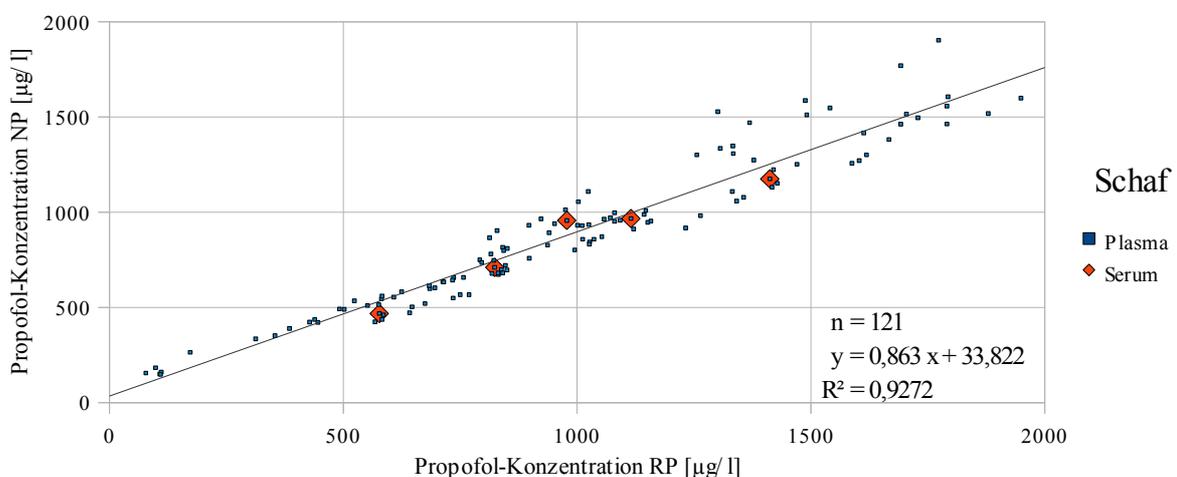


Abb. 25: Vergleich der Fluoreszenz-Methoden – Umkehrphase (RP) vs. Normalphase (NP) – zur Propofol-Bestimmung am Beispiel von Schafproben (Auswahlkriterium: < 2000 µg/ l)

Die Propofol-Konzentrationen der Einzelmessungen sowohl in Plasma (blau) als auch in Serum (rot) von Schafen wiesen eine recht gute Übereinstimmung zwischen den Wertepaaren (n = 121) auf. Tendenziell lagen die mittels Normalphasen-Chromatographie bestimmten Ergebnisse etwa 10 % niedriger als die der Umkehrphase (Analysedaten in Tab. 16 und Tab. 17, ab S. 70 im Anhang).

3.4.2 Bestimmung von Propofolchinon in Plasma und Serum

Die Bestimmung von Propofolchinon mittels Normalphasen-Chromatographie erfolgte an zahlreichen unter Propofol-Narkose gewonnenen Plasmaproben (Abb. 26) sowie einigen Serumproben (Tab. 9) von jeweils sechs Schafen und Schweinen. Sämtliche Proben des ersten Schafs (18) bzw. Schweins (83) hatten orientierenden Charakter (1-fach-Messung) und wurden in der folgenden Tabelle und Abbildung nicht berücksichtigt. Bei den übrigen fünf Tieren der beiden Spezies erfolgten die Plasmaanalysen gemäß Entnahmeschema (Tab. 12, S. 67 im Anhang) in 1-fach-Bestimmung bei Abnahmen 2 Minuten nach Bolus-Applikation und in 3-fach-Bestimmung, mit Darstellung der Mittelwerte, zu allen nachfolgenden Zeitpunkten (Abb. 26).

Tab. 9: Propofolchinon-Konzentrationen in unter Propofol-Narkose zuletzt entnommenem Plasma und Serum von Schafen bzw. Schweinen (Schafe nach 80 Min.; Schweine nach 270 Min.). Aufgeführt sind Einzelmessungen mit daraus berechneten Differenzen und ggf. Variationskoeffizienten (VK).

Schaf Nr.	Propofolchinon		Differenz [µg/l]	VK [%]	Schwein Nr.	Propofolchinon		Differenz [µg/l]
	Plasma [µg/l]	Serum [µg/l]				Plasma [µg/l]	Serum [µg/l]	
19	1035	1089	-54	3,6	84	102	65	37
20	1481	1351	130	6,5	85	85	51	34
21	4181	4111	70	1,2	86	127	64	63
22	738	736	2	0,2	87	129	111	18
23	989	1588	-599	32,9	88	82	81	1

Die Propofolchinon-Konzentrationen in jeweils zuletzt entnommenem Plasma und Serum wiesen bei Schafen und Schweinen – mit Ausnahme von Schaf 23 – eine hohe Kongruenz auf (Tab. 9). Die Variationskoeffizienten der Schafe betragen mit Ausnahme von Schaf 23 bis 6,5 %; die detektierten Spiegel der Schweine zeigten nominell ebenfalls geringe Differenzen, die im Schwankungsbereich einer HPLC-Anlage lagen und zudem geringer ausfielen als die überwiegenden Differenzen der Schafe.

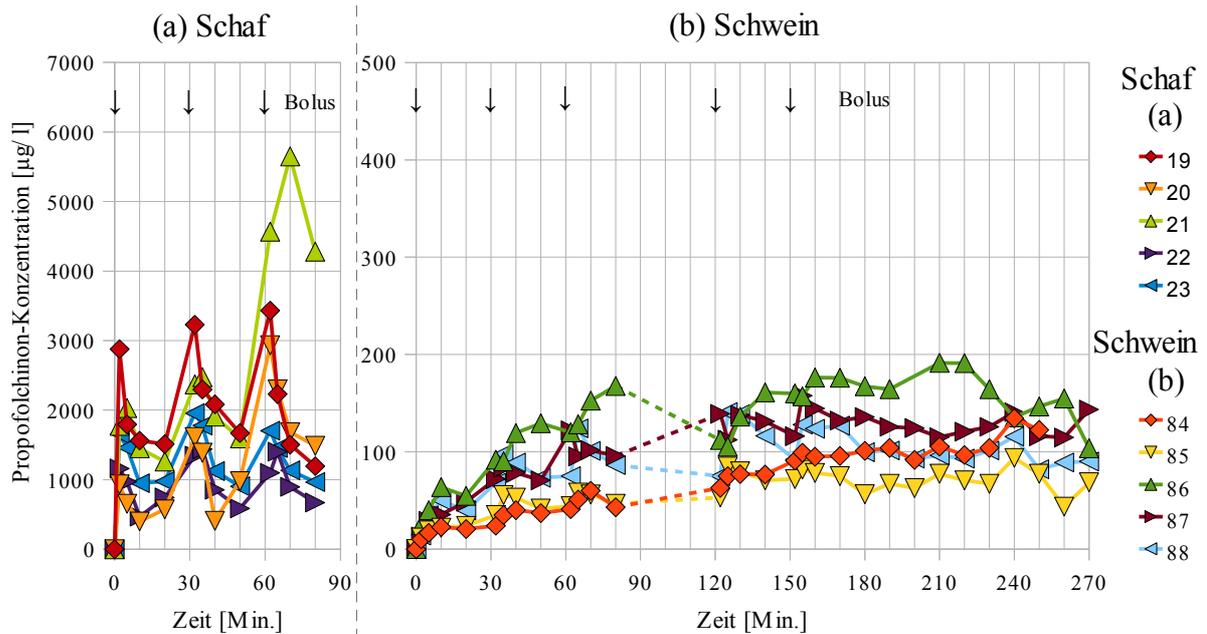


Abb. 26: Propofolchinson-Konzentrationen in Plasma von Schafen (a) und Schweinen (b) mittels Normalphasen-Chromatographie (Dosierung: Basalrate 0,96 mg/ kg KG/ Std. und Boli: je 4 mg/ kg KG; fünfter Bolus Schwein: 2 mg/ kg KG)

Im Plasma der Schafe (Abb. 26a) war 2 Minuten nach Bolus-Applikation (Pfeil) ein deutlicher Anstieg der Propofolchinson-Konzentrationen auf etwa 1000 – 3500 µg/ l zu verzeichnen. Innerhalb der nachfolgenden drei Messzeitpunkte sanken die Plasmaspiegel kontinuierlich bis ca. 500 – 1600 µg/ l ab. Während die Proben der Schafe diesem Verlauf im Allgemeinen folgten, fielen bei Schaf 21 (grün) nach Applikation des dritten Bolus Konzentrationen von über 4000 µg/ l auf. Insgesamt rangierten die meisten der im Schafplasma gemessenen Propofolchinson-Konzentrationen zwischen 1000 – 2000 µg/ l, wohingegen im Plasma der Schweine (Abb. 26b) signifikant niedrigere Mengen etwa bis 200 µg/ l detektiert wurden. So stiegen die Konzentrationen von Propofolchinson bei den Schweinen nach jedem Propofol-Bolus langsam und scheinbar wellenförmig an, wobei die höchsten Werte etwa 10 – 20 Minuten nach Bolus-Applikation erreicht wurden. Während nach dem ersten Bolus „Spitzenkonzentrationen“ bis etwa 60 µg/ l gemessen wurden, erreichten sie nach der zweiten Propofol-Gabe Werte von ca. 40 – 120 µg/ l, um sich dann bei ungefähr 60 – 200 µg/ l einzupendeln (Konzentrationen < 50 µg/ l liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze und stellen insofern nur Näherungswerte dar). Die zum Zeitpunkt des hypovolämischen Schocks (240 Minuten nach Beginn der Propofol-Narkose) gemessenen Konzentrationen zeigten – im Gegensatz zu denen von Propofol – keinen Konzentrationsabfall, sondern allenfalls einen leichten Anstieg. Der Verlauf folgte jedoch keinem einheitlichen Bild (Analysedaten in Tab. 18, S. 72 im Anhang).

3.4.3 Stoffwechselunterschiede bei Schafen und Schweinen

Abschließend folgt die Gegenüberstellung der Propofol- und Propofolchinon-Konzentrationen in Schaf- und Schweineplasma (Abb. 27), wobei in der Abbildung jeweils die Spezies-spezifischen Mittelwerte dargestellt sind.

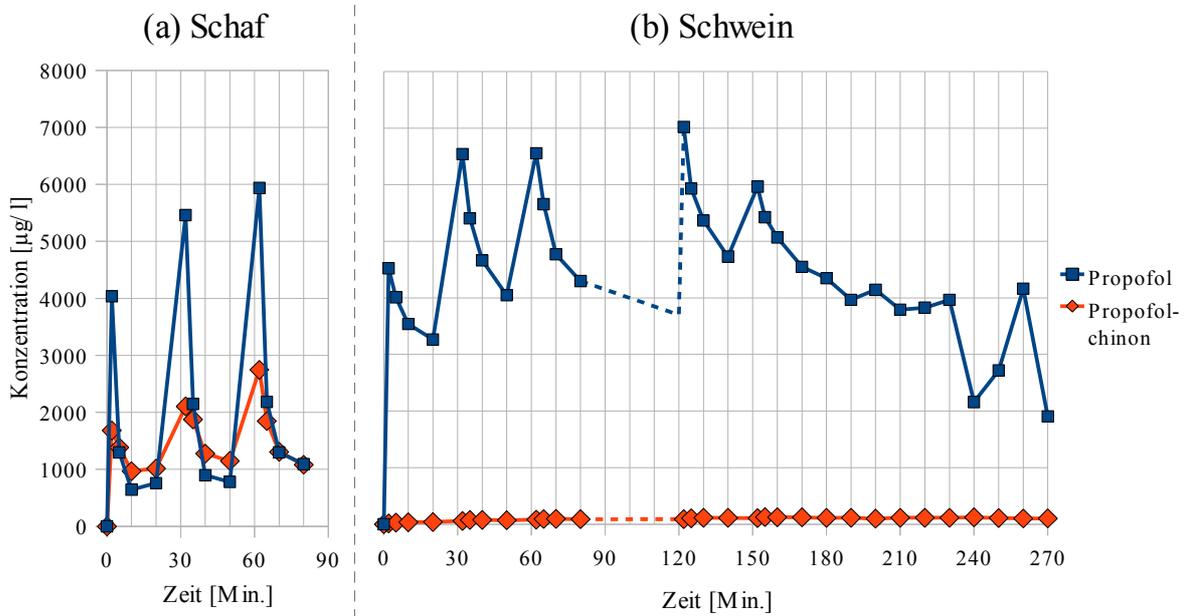


Abb. 27: Gegenüberstellung der Propofol- und Propofolchinon-Konzentrationen in Plasma von Schafen (a) und Schweinen (b) anhand Spezies-spezifischer Mittelwerte. Die Propofol-Bestimmung erfolgte mittels Umkehrphase (Fluoreszenz); die Propofolchinon-Bestimmung mittels Normalphase (UV).

Sowohl im Plasma der Schafe (Abb. 27a) als auch dem der Schweine (Abb. 27b) konnte Propofol (blau) eindeutig nachgewiesen werden. 2 Minuten nach Applikation des jeweiligen Propofol-Bolus wiesen die Schafe vergleichbare Konzentrationen mit denen der Schweine auf. Während die Propofol-Menge bei den Schafen innerhalb von 3 Minuten steil absank, war diese Veränderung bei den Schweinen weniger stark ausgeprägt, wodurch bei ihnen über den gesamten Messzeitraum höhere Konzentrationen detektiert wurden.

Propofolchinon (rot) konnte hingegen vor allem im Schafplasma detektiert werden, in dem bereits direkt nach Bolus-Applikation deutliche Konzentrationen des Metaboliten bestimmt wurden. Im Verlauf der weiteren Analysen nahm das im Schafplasma detektierte Propofolchinon ab, aber im Vergleich zu darin gemessenem Propofol weniger ausgeprägt. Im Gegensatz zu den im Schafplasma erhobenen hohen Propofolchinon-Konzentrationen konnten im Plasma der Schweine über den gesamten Versuchszeitraum nur sehr geringe Mengen des Metaboliten ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung von Propofol

Die Untersuchungen des ersten Teils dieser Arbeit hatten zum Ziel, eine zuverlässige, empfindliche und praktikable HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofol in Blut und anderen biologischen Flüssigkeiten im Institut für Klinische Chemie, Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, zu etablieren, mit deren Hilfe valide Blutkonzentrationen als Bezugswerte für ein Forschungsprojekt zur Atemgasanalytik des Propofols erstellt werden können.

Zum Aufrechterhalten einer Narkose werden bei Menschen Propofol-Spiegel im Blut von etwa 2000 – 6000 $\mu\text{g/l}$ angestrebt [Larsen, 2006], wobei der anästhetische Effekt ab einer Konzentration von etwa 1000 $\mu\text{g/l}$ beginnt [Adam et al., 1983; Kay et al., 1986]. Die eingesetzte Methode sollte vor allem die unter Narkose angestrebten Konzentrationen erfassen, Propofol jedoch darüber hinaus in einem möglichst weiten Bereich zuverlässig bestimmen.

Propofol gilt als verhältnismäßig stabile Substanz. Dieser Umstand wird vor allem in der weitgehenden Thermostabilität deutlich, wodurch Untersuchungen unter anderem per Gaschromatographie möglich sind [Grossherr et al., 2009]. Bei der HPLC-Analyse sind per se zwar keine hohen Temperaturen nötig, aber die Proben werden – wie bei anderen Verfahren auch – in unterschiedlichem Maß Temperaturschwankungen ausgesetzt (z. B. Probenentnahme bis Laboreingang, Probenvorbereitung). In Kombination mit im Untersuchungsmaterial enthaltenen, noch funktionsfähigen Enzymen wäre eine Beeinflussung der Propofol-Konzentrationen denkbar, die in der Literatur jedoch keine Rolle zu spielen scheint. Vielmehr soll das in den Proben enthaltene Propofol eine Lagerung bei Raumtemperatur je nach Quelle von bis zu 6 Stunden bzw. 2 Tagen unverändert überstehen [Vree et al., 1999; Meinitzer et al., 2008]. Bei $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrte Aliquote bzw. bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Standardlösungen sollen über einen Zeitraum von 6 Monaten stabil sein [Dowrie et al., 1996; Cohen et al., 2007], so dass bei den in diesem Projekt untersuchten Proben keine größeren Propofol-Verluste zu erwarten waren.

Laut verschiedener Untersuchungen unterliegt Propofol einem schnellen Metabolismus, dessen stärkste Konzentrationsänderungen direkt nach Propofol-Applikation zu beobachten

sind [Adam et al., 1981; Servin et al., 1988; Cleale et al., 2009]. Um ein möglichst weites Spektrum der unter Narkose auftretenden Konzentrationen zu erfassen, erfolgten die Entnahmen nach Bolus-Applikation engmaschiger und später 10-minütlich (Abb. 8, S. 26), womit sie mit in der Literatur empfohlen Entnahmen alle 2 – 5 Minuten während der Anfangsphase übereinstimmten [Ragno et al., 1997; Dawidowicz et al., 2006]. Häufigere Entnahmen, wie sie in Arbeiten zur Untersuchung der Pharmakokinetik beschrieben wurden [Adam et al., 1983; Kuipers et al., 1999], waren bei diesem Projekt auf Grund parallel durchgeführter Versuche sowie der Mehrfachentnahme von Hand zeitlich nicht zu realisieren. Da die Studie vor allem der Methodenentwicklung und Etablierung dienen sollte, waren Entnahmen zur Darstellung eines allgemeinen zeitlichen Verlaufs ausreichend.

Die Ermittlung der optimalen Wellenlänge zur Bestimmung der Propofol-Konzentrationen mittels UV-Detektor erfolgte photometrisch mittels Wellenlängenscan. Die maximale UV-Absorption wurde in Übereinstimmung mit der Literatur bei 270 nm beobachtet [Heyne et al., 2003; Reiner et al., 2009]; die Fluoreszenz-Wellenlängen mit einer maximalen Absorption bei 270 nm und Emission bei 310 nm einer Literaturabbildung entnommen [Heyne et al., 2006]. Der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) des selbst durchgeführten UV-Scans betrug $\epsilon_{\lambda 270 \text{ nm}} \approx 246 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ und lag damit im Vergleich zu einem in der Literatur beschriebenen Wert ($\epsilon_{\lambda 270 \text{ nm}} = 1100 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$) etwa 4,5-fach niedriger [Reiner et al., 2009].

Propofol wurde besonders häufig mittels Umkehrphasen-Chromatographie untersucht. Während in den Analysen per UV-Detektion, bei denen die Absorption bei 270 nm registriert wurde, die untere Bestimmungsgrenze bei etwa 100 – 120 $\mu\text{g/l}$ lag [Vree et al., 1999; Dawidowicz et al., 2000b], wurde als obere Bestimmungsgrenze 3000 $\mu\text{g/l}$ beschrieben [Plummer 1987; Emara et al., 1999]. Im Gegensatz dazu lieferte die Fluoreszenz-Detektion, bei der vor allem mit 270 – 276 nm angeregt und die Emission bei 310 nm registriert wurde [Favetta et al., 2000; Kita et al., 2002; Allegaert et al., 2007; Grossherr et al., 2007 und 2009], häufig nicht nur spezifischere Messergebnisse, sondern zeigte sich mit einer unteren Bestimmungsgrenze zwischen 5 – 25 $\mu\text{g/l}$ in diesem Fall ebenfalls sensitiver [Reid et al., 1993; Costela et al., 1996; Kita et al., 2002; Kurita et al., 2004]. Zudem war es mittels Fluoreszenz möglich Propofol in einem größeren Bereich zu bestimmen, wie ein linearer Zusammenhang mittels Kalibrationen bis 10000 $\mu\text{g/l}$ belegt [Dowrie et al., 1996].

Im Einklang mit der dargestellten Literatur lieferte die in dieser Arbeit eingesetzte RP-HPLC-Methode mittels Fluoreszenz-Detektor (Anregung 270 nm/ Emission 310 nm)

zuverlässige sowie empfindliche Propofol-Bestimmungen mit einer unteren Bestimmungsgrenze von 10 µg/l. Die Konzentrationen waren in einem weiten Bereich bis 8000 µg/l linear bestimmbar; darüber liegende Konzentrationen konnten verdünnt ebenfalls zuverlässig analysiert werden [Scheel et al., 2006; Grossherr et al., 2007].

Im Allgemeinen werden zur Analyse von Propofol Blut oder Blutprodukte bevorzugt, da diese Proben jederzeit entnommen werden können und deren Gewinnung nicht – wie im Falle von Urin – von anderen Faktoren wie beispielsweise der Nierenleistung abhängig ist. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Urinen (Ziege) wurde in Übereinstimmung mit der Literatur allenfalls eine sehr geringe Elimination von Propofol festgestellt [Simons et al., 1988; Dawidowicz et al., 2002].

Im Gegensatz dazu konnten Propofol-Signale deutlich und mit guter Präzision (VK < 5 %) in Blut und Blutprodukten detektiert werden (Tab. 7, S. 30). Die sowohl in Vollblut als auch in Plasma verschiedener Spezies (Mensch, Schwein, Schaf und Ziege) in 3-fach Bestimmung gemessenen Konzentrationen zeigten eine hohe Übereinstimmung mit nur vereinzelt über 5 % liegenden Variationskoeffizienten (Tab. 8, S. 33), bei denen Variationen im Infusions- und Entnahmeschema nicht ausgeschlossen werden können. Dennoch lagen auch diese Werte im Rahmen anderer Arbeiten, in denen VK bis 10 % angegeben wurden [Fan et al., 1995; Knibbe et al., 1998; Takizawa et al., 2006]. Darüber hinaus konnten zwischen Vollblut und Plasma individuelle und Spezies-spezifische Konzentrationsunterschiede beobachtet werden (Abb. 13, S. 32), deren Abweichungen zum einen sicherlich durch die pro Medium unabhängig voneinander durchgeführten Kalibrationen erklärt werden können, zum anderen aber vermutlich auch Spezies-spezifische Unterschiede des Stoffwechsels und der Elimination widerspiegeln [Grossherr et al., 2007].

So wurde in der Literatur wiederholt auf eine starke Bindung von Propofol beispielsweise an Hämoglobin oder auch Albumin hingewiesen [Mazoit und Samii, 1999; Riu et al., 2000; Schywalsky et al., 2005]. Da aber weder Vollblut noch Plasma (Tab. 8, S. 33) generell höhere Messergebnisse aufwiesen – besonders deutlich erkennbar in den Proben der Schweine (Vollblut etwa 15 % niedriger bis 20 % höher) – ließ sich anhand der hier durchgeführten Messungen kein allgemeingültiger Zusammenhang von detektierter Propofol-Konzentration weder mit Hämoglobin oder Plasma-Albumin noch mit Hämatokrit oder Plasma-Gesamtprotein herstellen. Die Analysen der untersuchten menschlichen Proben zeigten – wenn auch weniger ausgeprägt als bei den Schweinen – ebenfalls kein

einheitliches Bild (Vollblut ungefähr 10 % niedriger bis 5 % höher). Somit konnte weder die Arbeit von Dawidowicz et al. (2000b) mit höheren Konzentrationen in Vollblut, noch die von Fan et al. (1995) mit niedrigeren Ergebnissen in identischem Medium bestätigt werden.

Auf Grund der Kombination aus dargestellter Datenlage und eigener Analysen wurden zur Propofol-Bestimmung im Weiteren Plasmaproben untersucht. Dies geschah zum einen vor dem Hintergrund, dass in der Literatur zahlreiche Vergleichswerte von Plasmaanalysen zur Verfügung standen, zum anderen im Hinblick darauf, dass auch Propofolchinon analysiert werden sollte, von dem angesichts der begrenzten Datenlage nicht bekannt war, ob korpuskuläre Bestandteile die Konzentrationen beeinflussen.

In den untersuchten Plasmaproben – sowohl der Schafe als auch der Schweine (Abb. 24, S. 41) – zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur nach jedem Propofol-Bolus ein deutlicher Anstieg der Plasmaspiegel, deren Konzentrationen in den darauf folgenden Bestimmungen umgekehrt exponentiell abnahmen [Cockshott et al., 1992; Fan et al., 1995; Dowrie et al., 1996]. Die kurz nach Bolus-Applikation detektierten Propofol-Konzentrationen in Schafplasma lagen in den hier durchgeführten Untersuchungen bei etwa 3500 – 8500 µg/l. Vergleichbare Konzentrationen (4800 – 9800 µg/l) wurden beispielsweise bei Correia et al. (1996) nach identischer Bolus-Dosierung oder auch bei Mather et al. (1989) – allerdings unter anderem Infusionsschema – bestimmt (3000 – 10000 µg/l). Im Schweineplasma wurden in dieser Studie nach Bolus-Applikationen von 4 mg/kg KG Konzentrationen von ca. 4000 – 8000 µg/l bestimmt, die in ähnlichem Rahmen auch in der Literatur zu finden sind. So wurden zum Beispiel bei Adam et al. (1980) bei 2,5-fachem Bolus Propofol-Konzentrationen von 15000 µg/l gemessen und bei Cockshott et al. (1992) nach 0,6- bzw. 2,5-fachem Bolus 1100 bzw. 10000 µg/l.

Als Besonderheit fielen in den 240 Minuten nach Beginn der Propofol-Narkose entnommenen Plasmaproben der Schweine (Abb. 24, S. 41) Propofol-Konzentrationen auf, die etwa 50 % niedriger lagen als die 10 Minuten zuvor gewonnenen. Dieser ausgeprägte Abfall der Konzentrationen kann durch gezielte Auslösung eines hämorrhagischen Schocks erklärt werden, der durch Blutverlust in Verbindung mit entsprechendem Infusionsmanagement über einen Verdünnungseffekt zu den niedrigeren Messwerten führt [Kurita et al., 2004]. In den der Hämorrhagie folgenden Analysen war dann ein deutlicher – nicht durch zusätzliche Gabe von Propofol – verursachter Anstieg der gemessenen Konzentrationen zu verzeichnen. Dieses Phänomen wurde schon in der Vergangenheit beobachtet und soll dadurch

zustände kommen, dass der bei starkem Blutverlust eintretende Volumenmangel zum einen nicht mehr adäquat ausgeglichen werden kann und es somit über Minderperfusion der Organe (bis hin zum Kreislaufversagen) auch zu einer Abnahme der Metabolisierung kommt. Zum anderen resultiert aus dem Blutverlust unter anderem eine Hypoalbuminämie, wodurch weniger per Basalrate zugeführtes Propofol gebunden wird [Kazama et al., 2002; Johnson et al., 2003; Kurita et al., 2004].

Im Gegensatz zur RP-HPLC-Methode (Fluoreszenz) konnte Propofol in der mittels UV-Detektion bei 270 nm durchgeführten Normalphasen-Chromatographie in den hier untersuchten Proben bis etwa 2000 µg/l mit einem linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Konzentration und gemessenem Signal bestimmt werden. In der Literatur wurden je nach injizierter Menge Linearitäten auch noch bei höheren Konzentrationen, d. h. bis 3000 bzw. 5000 µg/l, beschrieben [Plummer, 1987; Meinitzer et al., 2008]. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die im Rahmen dieser Studie angewendete Methode in erster Linie für die Bestimmung des oxidativen Metaboliten Propofolchinon optimiert war und die Propofol-Bestimmung nur zweitrangig erfolgte. Insofern wurde im Vergleich zur RP-Methode ein 5-fach höheres Probenvolumen analysiert sowie zusätzlich eine Extraktion durchgeführt und damit in Kauf genommen, dass Propofol in geringerem Umfang zu detektieren sein könnte.

In der Literatur wiesen Proben, die mittels zweier ähnlicher Extraktionsmethoden vorbereitet und per Fluoreszenz- bzw. UV-Detektion analysiert wurden, etwa 3 % höhere Propofol-Konzentrationen in der Fluoreszenz-Messung auf [Plummer, 1987]. Auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lagen die mittels Fluoreszenz gemessenen Konzentrationen höher, jedoch betrug der Unterschied zwischen Fluoreszenz- (RP-Methode) und UV-Detektion (NP-Methode) etwa 10 %. Die stärker ausgeprägte Differenz kann einerseits durch eine abweichende Probenvorbereitung und andererseits durch unterschiedliches Analysevolumen verursacht sein (RP: Proteinfällung, 10 µl vs. NP: Proteinfällung und Extraktion, 50 µl). So sind in der Literatur beispielsweise bei Methoden, die eine Extraktion beinhalten, Verluste zwischen 3 – 10 % beschrieben [Plummer, 1987; Meinitzer et al., 2008].

Zusammengefasst sollte die RP-Methode mittels Fluoreszenz-Detektor verwendet werden, wenn in Proben ausschließlich der Propofol-Gehalt bestimmt werden soll. Diese Methode verfügt nicht nur über die Möglichkeit, das Hypnotikum in weitem Bereich zuverlässig zu bestimmen, sondern bietet zudem Vorteile während der Probenvorbereitung. So besteht bei

ihr auf Grund weniger Arbeitsschritte nur geringer Spielraum für potentielle Fehlerquellen wie beispielsweise Probenverwechslungen oder sich addierende Pipettierungenauigkeiten. Hierdurch ist die RP-Methode mit wenig Personal und Material relativ schnell durchführbar. Soll jedoch nicht nur Propofol, sondern in erster Linie der Metabolit Propofolchinon detektiert werden, ist der NP-Methode mittels in Serie geschalteter Fluoreszenz- und UV-Detektion der Vorzug zu geben. Auch wenn sie sowohl zeit- als auch materialintensiver ist, bietet sie im oben vorgestellten Rahmen die Möglichkeit der Bestimmung der Muttersubstanz sowie des Metaboliten.

4.2 Bestimmung von Propofolchinon

Die Untersuchungen des zweiten großen Bereichs dieser Studie hatten das Ziel, eine zuverlässige, sensitive und praktikable HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofolchinon in Plasma zu entwickeln. Da Propofolchinon als volatiler Metabolit des Hypnotikums beschrieben ist [Harrison et al., 2006], im Gegensatz zum schwer flüchtigen Propofol selbst [Grossherr et al., 2006], könnte die Bestimmung der Propofolchinon-Konzentrationen ebenfalls als Bezugswerte für das Forschungsprojekt zur Atemgasanalytik des Propofols interessant sein.

Die Bestimmung der optimalen Wellenlänge zur HPLC-Analyse der Propofolchinon-Konzentrationen wurde per Wellenlängenscan am UV-Detektor photometrisch ermittelt. Während im Fluoreszenz-Spektrum kein [Favetta et al., 2000a] oder allenfalls ein sehr geringes Propofolchinon-Signal nachweisbar sein soll [Court et al., 1999], wies die Substanz bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messung im UV-Scan ein deutliches Signal mit einer maximalen Absorption bei 255 nm auf. In ähnlicher Weise ist in der Literatur ein um 5 nm zum langwelligen Bereich verschobenes Spektrum mit maximaler Absorption bei 260 nm abgebildet worden [Heyne et al., 2003].

Die Analyse von Propofolchinon erfolgte in der Vergangenheit bei einer Wellenlänge, mit der auch Propofol mittels UV-Detektor (270 nm) gemessen wurde [Vree et al., 1987 und 1999; Favetta et al., 2000a; Heyne et al., 2003], da es in besagten Veröffentlichungen immer auch um die gleichzeitige Bestimmung von Propofol ging. Auf Grund des molekular ähnlichen Aufbaus der beiden Substanzen ist ihre Trennung schwierig und war bisher nur eingeschränkt möglich. Während Propofol und sein Chinon bei Heyne et al. (2003) nur angedeutet getrennt werden konnten, eluierten die Substanzen in anderen

Publikationen, wenn auch vollständig getrennt, eng beieinander bzw. gingen direkt ineinander über [Vree et al., 1987 und 1999; Favetta et al., 2000a].

Neben der geschilderten Problematik, die Trennung der Substanzen betreffend, ist in der Literatur eine weitere Schwierigkeit beschrieben, nach der Propofolchinon in wässriger Lösung instabil sein soll [Vree et al., 1987]. Hierdurch kann der Propofolchinon-Gehalt bei einer Lagerung von 6 Stunden bei Raumtemperatur um bis zu 80 % abnehmen [Vree et al., 1999]. Um die Verluste gering zu halten bzw. im Idealfall zu vermeiden, wurden die Proben bis zur Analyse möglichst kurz bei - 20 °C gelagert und nach der Proteinfällung einer Extraktion zur Überführung des lipophilen Propofolchinons von der wässrigen in die organische Phase unterzogen.

Die jeweils am Anfang und Ende einer Serie gemessenen Konzentrationen der Propofolchinon-Kontrollen (je 200 und 1000 µg/l) wiesen bei Schafen und Schweinen vergleichbare Resultate auf, obwohl zwischen ihrer Messung 17 – 26 Stunden lagen. So betrug die Variationskoeffizienten der Kontrollen innerhalb einer Serie im Mittel 3,0 % (0,4 – 6,9 %). Da keiner der Kontrollblöcke generell höhere Konzentrationen zeigte, ist anzunehmen, dass durch die Probenvorbereitung größere Verluste von Propofolchinon – trotz bekannter Instabilität – bei den Kontrollen und damit ebenfalls bei den Proben einerseits vermieden werden konnten und andererseits weder Propofol noch ein Metabolit innerhalb dieses Zeitraums in bedeutendem Umfang zu Propofolchinon oxidiert wurde.

Mit der in dieser Studie entwickelten Normalphasen-Methode wurde Propofolchinon nach derzeitigem Kenntnisstand der Literatur in diesem Umfang erstmalig von Propofol getrennt, wohingegen mittels der für die Propofol-Analyse optimierten Umkehrphasen-Methode auch nach zahlreichen Modifikationen nur eine angedeutete Trennung möglich war. Während sich die Retentionszeiten in den Arbeiten von Vree et al. (1987 und 1999) und Favetta et al. (2000a) lediglich um etwa 1 Minute unterschieden, eluierte Propofolchinon in der hier verwendeten NP-HPLC-Methode nach etwa 5 Minuten und damit deutlich von Propofol (~ 8 Minuten) getrennt. Im Gegensatz zur qualitativen Analyse von Favetta et al. (2000a) konnte Propofolchinon in dieser Arbeit zudem quantitativ und mit guter Sensitivität analysiert werden. So lag die untere Nachweisgrenze bei 10 µg/l bzw. die untere Bestimmungsgrenze bei 50 µg/l anstatt bei 100 bzw. 138 µg/l [Vree et al., 1999].

Das in der Literatur anhand von Menschenplasma erstellte Profil von Propofolchinon [Vree et al., 1999] zeigte während einer 5-stündigen Propofol-Narkose (Gesamtdosis 3510 mg)

zunächst einen steten Anstieg der Konzentrationen bis zu einem Maximalspiegel bei etwa 1000 µg/l ungefähr 2 Stunden nach Narkosebeginn, der etwa 4 Stunden nach Beendigung der Narkose unter die Nachweisgrenze sank. Vergleichbare Daten anderer Säugetiere lagen nicht vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels unter Propofol-Narkose – bestehend aus Basalinfusion und wiederholten Bolus-Applikationen (Abb. 8, S. 26) – gewonnenem Plasma von Schafen und Schweinen der Verlauf der Propofolchinon-Konzentrationen untersucht. Die Analysen zeigten deutlich, dass der oxidative Stoffwechsel bei Schafen eine erheblich größere Rolle zu spielen scheint als bei Schweinen (Abb. 26, S. 44). So nahmen die Konzentrationen bei den Schweinen langsam und nur in geringem Maße zu, um im Mittel Werte von etwa 100 µg/l nach ca. 1,5 Stunden zu erreichen. Im Gegensatz dazu wurden im Schafplasma direkt nach Bolus-Applikation hohe Propofolchinon-Spiegel mit Spitzenkonzentrationen zwischen etwa 2000 – 3000 µg/l beobachtet, die im Verlauf der Messungen – ähnlich der in anderen Arbeiten gemessenen Propofol-Konzentrationen [Dowie et al., 1996; Dawidowicz et al., 2006] – umgekehrt exponentiell auf etwa 1000 µg/l abnahmen.

Der Versuch, den Propofolchinon-Stoffwechsel im menschlichen Organismus mit dem in Schafen und Schweinen beobachteten zu vergleichen, gestaltet sich schwierig, da in der Arbeit von Vree et al. (1999) nur die einem Menschen (85 kg) über 5 Stunden verabreichte Propofol-Gesamtdosis von 3510 mg angegeben wurde – nicht aber das detaillierte Applikationsschema. Anhand der genannten Daten konnte eine verabreichte Propofol-Dosis von 8,26 mg/kg KG/ Std. berechnet werden (konstante Dosierung vorausgesetzt), worunter nach etwa 1 bzw. 1,5 Stunden Propofolchinon-Konzentrationen von ca. 500 bzw. 800 µg/l gemessenen wurden (Tab. 19, S. 73 im Anhang).

Die in dieser Dissertation untersuchten Schafe erhielten 8,96 mg/kg KG/ Std. (Narkosedauer: 1,5 Std.), wohingegen den Schweinen mit 4,96 mg/kg KG/ Std. (Narkosedauer: 4,5 Std.) scheinbar geringere Mengen Propofol verabreicht wurden. Dieser vermeintliche Unterschied resultierte jedoch aus der über einen längeren Zeitraum ausschließlich per Basalrate durchgeführten Narkose (vgl. Dosierungsschema Abb. 8, S. 26). Berechnet auf eine 1,5-stündige Narkose wurde beiden Tierspezies die identische Propofol-Dosierung von 8,96 mg/kg KG/ Std. appliziert, die damit in einem ähnlichen Bereich lag, wie mittels der Angaben bei Vree et al. (1999) berechnet. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Propofolchinon-Konzentrationen nach etwa einer Stunde Narkose, also zum Großteil durch

Bolusapplikation bedingt, betragen ca. 1000 – 3500 µg/ l bei den Schafen bzw. etwa 40 – 120 µg/ l bei den Schweinen. Zum Vergleich ergaben die ungefähr 1,5 Stunden nach Narkosebeginn bestimmten Propofolchinon-Konzentrationen, die in dieser Versuchsanordnung weitgehend von der Basalrate abhingen, bei den Schafen etwa 700 – 1500 µg/ l bzw. bei den Schweinen ungefähr 45 – 150 µg/ l (Tab. 19, S. 73 im Anhang).

In Zusammenschau der aufgeführten Daten von Schaf und Schwein sowie denen in der Arbeit von Vree et al. (1999) über den Menschen veröffentlichten, kann – unter oben dargestellten Annahmen – der oxidative Stoffwechsel wie folgt eingeschätzt werden:

Oxidation von Propofol zu Propofolchinon: Schwein < Mensch < Schaf

Diese Hypothese sollte jedoch mittels weiterer Untersuchungen bestätigt werden, wobei unter anderem genauere Erkenntnisse zu bei Menschen gemessenen Propofolchinon-Konzentrationen wünschenswert wären.

4.3 Ausblick

Die vorgestellte Umkehrphasen-HPLC-Methode wurde an Proben von Mensch, Schwein, Schaf und Ziege entwickelt und ist zur zuverlässigen Propofol-Bestimmung in unterschiedlichen biologischen Flüssigkeiten geeignet. Sie wird inzwischen regelmäßig zur Generierung von Vergleichswerten für das Kooperationsprojekt zur Atemgasanalyse von Propofol eingesetzt.

Die entwickelte Normalphasen-HPLC-Methode ist in beschriebener Weise zum Nachweis und zur Bestimmung von Propofolchinon geeignet. Mit ihr konnten erste Informationen über die Verstoffwechslung des Metaboliten bei Schwein und Schaf gewonnen werden, wodurch zukünftig pharmakokinetische Untersuchungen von Propofolchinon an diesen und anderen Spezies möglich sind. Auf Grund der im Vergleich zur Muttersubstanz stärker ausgeprägten Flüchtigkeit von Propofolchinon scheinen sogar Untersuchungen per Atemgasanalytik denkbar, für die mit dieser Methode Vergleichswerte generiert werden können.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie diente der Entwicklung einer praktikablen, zuverlässigen und empfindlichen HPLC-Methode zur Bestimmung von Propofol und seinem oxidativen Metaboliten Propofolchinon in biologischen Flüssigkeiten.

Propofol konnte mittels Umkehrphasen-Chromatographie mit einem Fluoreszenz-Detektor (Anregung 270 nm/ Emission 310 nm) in unter Narkose gewonnenem Vollblut, Plasma sowie einiger Serumproben verschiedener Säugetiere zuverlässig bestimmt werden. Die eingesetzte Methode, in der Propofol nach Proteinfällung mit Methanol mit einer Retentionszeit von etwa 14 Minuten analysiert wurde, zeichnete sich durch einfache Handhabung und schnelle Durchführbarkeit aus. Das Hypnotikum konnte in einem Messbereich von 10 – 8000 µg/ l reproduzierbar und mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Vergleichende Messungen von Vollblut und Plasma (Mensch, Schwein, Schaf und Ziege) zeigten im Allgemeinen eine gute Präzision (Variationskoeffizient < 5 %) und weitgehende Übereinstimmung der Konzentrationen, aber auch Spezies- und Subjekt-spezifische Unterschiede. Mittels zahlreicher Plasmaanalysen (Schaf und Schwein) über einen Zeitraum von 1,5 bzw. 4,5 Stunden konnten Änderungen der Narkoseführung anhand gemessener Propofol-Konzentrationen direkt nachvollzogen werden. Im Gegensatz zu den Blutproben konnte in unter Narkose gewonnenem Urin kein signifikantes Propofol-Signal ermittelt werden.

Die Untersuchung von Propofolchinon erfolgte mittels Normalphasen-Chromatographie mit einem UV-Detektor (255 nm) ebenfalls in unter Narkose gewonnenem Plasma und einigen Serumproben von Schweinen und Schafen. Die zur Probenvorbereitung durchgeführte Proteinfällung erfolgte mit Methanol, woran sich eine Extraktion mittels n-Hexan anschloss. Mit dieser zeitlich und materiell aufwendigeren Methode konnte Propofolchinon mit einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten zwischen 50 – 8000 µg/ l mit hinreichend guter Präzision (Variationskoeffizient < 16 %) reproduzierbar bestimmt werden. Die Plasmakonzentration des Metaboliten zeigte Subjekt-, vor allem aber Spezies-spezifische Unterschiede, mit deutlich höheren Konzentrationen in den Proben der Schafe. Änderungen im Narkoseverlauf konnten auch hier anhand gemessener Konzentrationen nachvollzogen werden. Zudem war es mit der für Propofolchinon optimierten Methode mittels seriell angeordnetem Fluoreszenz-Detektor möglich, die Muttersubstanz Propofol in einer Analyse mit einer Retentionszeit von etwa 8 Minuten zeitlich sicher getrennt bis zu Konzentrationen von etwa 2000 µg/ l zuverlässig zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

Adam HK, Glen JB, Hoyle PA:

Pharmacokinetics in laboratory animals of ICI 35 868, a new i.v. anaesthetic agent.
Br J Anaesth 52, 743-746 (1980)

Adam HK, Douglas EJ, Plummer GF, Cosgrove MB:

Estimation of ICI 35,868 (Diprivan R) in blood by high-performance liquid chromatography, following coupling with Gibbs' reagent.
J Chromatogr 223, 232-237 (1981)

Adam HK, Briggs LP, Bahar M, Douglas EJ, Dundee JW:

Pharmacokinetic evaluation of ICI 35 868 in man. Single induction doses with different rates of injection.
Br J Anaesth 55, 97-103 (1983)

Allegaert K, Peeters MY, Verbesselt R, Tibboel D, Naulaers G, de Hoon JN, Knibbe CA:

Inter-individual variability in propofol pharmacokinetics in preterm and term neonates.
Br J Anaesth 99, 864-870 (2007)

Altmayer P, Büch U, Büch HP, Larsen R:

Rapid and sensitive pre-column extraction high-performance liquid chromatographic assay for propofol in biological fluids.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 612, 326-330 (1993)

Atkins PW, Jones L:

Physikalische Gleichgewichte – Wichtige Analyseverfahren 4.
In: Chemie – einfach alles.
2. Aufl., 380-381, Wiley-VCH, Weinheim (2006)

Baker MT, Gregerson MS, Martin SM, Buettner GR:

Free radical and drug oxidation products in an intensive care unit sedative: propofol with sulfite.
Crit Care Med 31, 787-792 (2003)

BfArM: schriftlich erteilte Auskunft des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn) am 06.10.2009

- Buggy DJ, Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG:
Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABAA receptor-mediated inhibition.
Anesthesiology 92, 1067-1073 (2000)
- Christiaens F, Janssenswillen C, Verborgh C, Moerman I, Devroey P, Van Steirteghem A, Camu F:
Propofol concentrations in follicular fluid during general anaesthesia for transvaginal oocyte retrieval.
Hum Reprod 14, 345-348 (1999)
- Cleale RM, Muir WW, Waselau AC, Lehmann MW, Amodie DM, Lerche P:
Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of propofol administered to cats in a novel, aqueous, nano-droplet formulation or as an oil-in-water macroemulsion.
J Vet Pharmacol Ther 32, 436-445 (2009)
- Cockshott ID, Douglas EJ, Plummer GF, Simons PJ:
The pharmacokinetics of propofol in laboratory animals.
Xenobiotica 22, 369-375 (1992)
- Cohen S, Lhuillier F, Mouloua Y, Vignal B, Favetta P, Guitton J:
Quantitative measurement of propofol and in main glucuroconjugate metabolites in human plasma using solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 854, 165-172 (2007)
- Correia D, Nolan AM, Reid J:
Pharmacokinetics of propofol infusions, either alone or with ketamine, in sheep premedicated with acepromazine and papaveretum.
Res Vet Sci 60, 213-217 (1996)
- Costela JL, Jiménez R, Calvo R, Suárez E, Carlos R:
Serum protein binding of propofol in patients with renal failure or hepatic cirrhosis.
Acta Anaesthesiol Scand 40, 741-745 (1996)
- Court MH, Hay-Kraus BL, Hill DW, Kind AJ, Greenblatt DJ:
Propofol hydroxylation by dog liver microsomes: assay development and dog breed differences.
Drug Metab Dispos 27, 1293-1299 (1999)

Dawidowicz AL, Fijalkowska A:

Determination of propofol in blood by HPLC. Comparison of the extraction and precipitation methods.

J Chromatogr Sci 33, 377-382 (1995)

Dawidowicz AL, Fornal E, Mardarowicz M, Fijalkowska A:

The role of human lungs in the biotransformation of propofol.

Anesthesiology 93, 992-997 (2000a)

Dawidowicz AL, Fornal E:

The advantages of cell lysis before blood sample preparation by extraction for HPLC propofol analysis.

Biomed Chromatogr 14, 493-497 (2000b)

Dawidowicz AL, Kalityński R, Trocewicz J, Nestorowicz A, Fijałkowska A, Trela-Stachurska K:

Investigation of propofol renal elimination by HPLC using supported liquid membrane procedure for sample preparation.

Biomed Chromatogr 16, 455-458 (2002)

Dawidowicz AL, Kalitynski R, Fijalkowska A:

Free and bound propofol concentrations in human cerebrospinal fluid.

Br J Clin Pharmacol 56, 545-550 (2003)

Dawidowicz AL, Kalitynski R, Kobielski M, Pieniadz J:

Influence of propofol concentration in human plasma on free fraction of the drug.

Chem Biol Interact 159, 149-155 (2006)

Dowrie RH, Ebling WF, Mandema JW, Stanski DR:

High-performance liquid chromatographic assay of propofol in human and rat plasma and fourteen rat tissues using electrochemical detection.

J Chromatogr B Biomed Appl 678, 279-288 (1996)

Eberhardt M, Linares T, Lindig M, Meier T:

Intravenöse Anästhetika – Hypnotika.

In: Schäfer R, Eberhardt M (Hrsg.), Klinikleitfaden Anästhesie.

4. Aufl., 207-212, Urban & Fischer, München (2002)

- Engelhardt T, Chan MK, McCheyne AJ, Karsli C, Luginbuehl I, Bissonnette B:
The effect of varying continuous propofol infusions on plasma cyclic guanosine 3',5'-monophosphate concentrations in anesthetized children.
Anesth Analg 105, 616-619 (2007)
- Emara S, Saleh G, Fathy M, Bakr MA:
Chromatographic assay and pharmacokinetic studies of propofol in human serum.
Biomed Chromatogr 13, 299-303 (1999)
- Fan SZ, Yu HY, Chen YL, Liu CC:
Propofol concentration monitoring in plasma or whole blood by gas chromatography and high-performance liquid chromatography.
Anesth Analg 81, 175-178 (1995)
- Favetta P, Guitton J, Degoute CS, Van Daele L, Boulieu R:
High-performance liquid chromatographic assay to detect hydroxylate and conjugate metabolites of propofol in human urine.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 742, 25-35 (2000a)
- Favetta P, Dufresne C, Désage M, Païssé O, Perdrix JP, Boulieu R, Guitton J:
Detection of new propofol metabolites in human urine using gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry techniques.
Rapid Commun Mass Spectrom 14, 1932-1936 (2000b)
- Fujita A, Higuchi J, Nagai T, Tokudome S, Sakio H:
A simple method for detecting plasma propofol.
Anesth Analg 90, 1452-1454 (2000)
- Grossherr M, Hengstenberg A, Meier T, Dibbelt L, Gerlach K, Gehring H:
Discontinuous monitoring of propofol concentrations in expired alveolar gas and in arterial and venous plasma during artificial ventilation.
Anesthesiology 104, 786-790 (2006)
- Grossherr M, Spies E, Scheel A, Hengstenberg A, Gehring H, Dibbelt L:
Differences of propofol concentrations in mammalian whole blood and in corresponding plasma samples analyzed by high performance liquid chromatography.
Clin Lab 53, 315-319 (2007)

- Grossherr M, Hengstenberg A, Meier T, Dibbelt L, Igl BW, Ziegler A, Schmucker P, Gehring H:
Propofol concentration in exhaled air and arterial plasma in mechanically ventilated patients undergoing cardiac surgery.
Br J Anaesth 102, 608-613 (2009)
- Guitton J, Buronfosse T, Desage M, Flinois JP, Perdrix JP, Brazier JL, Beaune P:
Possible involvement of multiple human cytochrome P450 isoforms in the liver metabolism of propofol.
Br J Anaesth 80, 788-795 (1998)
- Haeckel R, Schumann G:
Methoden der Meßwerterfassung (Meßmethoden).
In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg.), Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie.
3. Aufl., 120-141, Schattauer, Stuttgart (1995)
- Harrison GR, Critchley AD, Mayhew CA, Thompson JM:
Real-time breath monitoring of propofol and its volatile metabolites during surgery using a novel mass spectrometric technique: a feasibility study.
Br J Anaesth 91, 797-799 (2003)
- Heyne B, Kohnen S, Brault D, Mouithys-Mickalad A, Tfibel F, Hans P, Fontaine-Aupart MP, Hoebeke M:
Investigation of singlet oxygen reactivity towards propofol.
Photochem Photobiol Sci 2, 939-945 (2003)
- Heyne B, Tfibel F, Hoebeke M, Hans P, Maurel V, Fontaine-Aupart MP:
Photochemistry of 2,6-diisopropylphenol (propofol).
Photochem Photobiol Sci 5, 1059-1067 (2006)
- Hiraoka H, Yamamoto K, Miyoshi S, Morita T, Nakamura K, Kadoi Y, Kunimoto F, Horiuchi R:
Kidneys contribute to the extrahepatic clearance of propofol in humans, but not lungs and brain.
Br J Clin Pharmacol 60, 176-182 (2005)

Hoinkis J und Lindner E:

Chemische Gleichgewichte – Chromatographie.

In: Chemie für Ingenieure.

13. Aufl., 164-167, Wiley-VCH, Weinheim (2007)

Johnson KB, Egan TD, Kern SE, White JL, McJames SW, Syroid N, Whiddon D, Church T:

The influence of hemorrhagic shock on propofol: a pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis.

Anesthesiology 99, 409-420 (2003)

Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U:

General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit.

FASEB J 17, 250-252 (2003)

Kay NH, Sear JW, Uppington J, Cockshott ID, Douglas EJ:

Disposition of propofol in patients undergoing surgery. A comparison in men and women.

Br J Anaesth 58, 1075-1079 (1986)

Kazama T, Kurita T, Morita K, Nakata J, Sato S:

Influence of hemorrhage on propofol pseudo-steady state concentration.

Anesthesiology 97, 1156-1161 (2002)

Kita F, Furuno K, Miyawaki T, Shimada M:

Determination of propofol in blood by high performance liquid chromatography.

Okayama Shigakkai Zasshi 21, 191-194 (2002)

Knibbe CA, Koster VS, Deneer VH, Stuurman RM, Kuks PF, Lange R:

Determination of propofol in low-volume samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.

J Chromatogr B 706, 305-310 (1998)

Kretz FJ, Schäffer J:

Pharmakologie – Grundlagen und klinisch-praktische Details – Propofol.

In: Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie.

4. Aufl., 35-36, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2006)

Kuipers JA, Boer F, Olieman W, Burm AG, Bovill JG:

First-pass lung uptake and pulmonary clearance of propofol: assessment with a recirculatory indocyanine green pharmacokinetic model.

Anesthesiology 91, 1780-1787 (1999)

Kurita T, Kazama T, Morita K, Fujii S, Uraoka M, Takata K, Sato S:

Influence of fluid infusion associated with high-volume blood loss on plasma propofol concentrations.

Anesthesiology 100, 871-878 (2004)

Larsen R:

Intravenöse Anästhetika, Benzodiazepine und Neuroleptika – Propofol.

In: Anästhesie.

8. Aufl., 58-61, Elsevier – Urban und Fischer Verlag, München (2006)

Le Guellec C, Lacarelle B, Villard PH, Point H, Catalin J, Durand A:

Glucuronidation of propofol in microsomal fractions from various tissues and species including humans: effect of different drugs.

Anesth Analg 81, 855-861(1995)

Luo AL, Yi J, Guo XY, Ren HZ, Huang YG, Ye TH:

Concentrations of propofol in cerebral spinal fluid: target-controlled infusion.

Chin Med J (Engl) 117, 231-234 (2004)

Mather LE, Selby DG, Runciman WB, McLean CF:

Propofol: assay and regional mass balance in the sheep.

Xenobiotica 19, 1337-1347 (1989)

Mazoit JX, Samii K:

Binding of propofol to blood components: implications for pharmacokinetics and for pharmacodynamics.

Br J Clin Pharmacol 47, 35-42 (1999)

Mazzi G, Schinella M:

Simple and practical high-performance liquid chromatographic assay of propofol in human blood by phenyl column chromatography with electrochemical detection.

J Chromatogr B 528, 537-541 (1990)

- Meinitzer A, Kalcher K, Gartner G, Halwachs-Baumann G, März W, Stettin M:
Drugs and brain death diagnostics: determination of drugs capable of inducing EEG zero line.
Clin Chem Lab Med 46, 1732-1738 (2008)
- Omura K:
Rapid Conversion of Phenols to *p*-Benzoquinones under Acidic Conditions with Lead Dioxide.
Synthesis 8, 1145-1148 (1998)
- Pavan I, Buglione E, Massiccio M, Gregoretti C, Burbi L, Berardino M:
Monitoring propofol serum levels by rapid and sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatography during prolonged sedation in ICU patients.
J Chromatogr Sci 30, 164-166 (1992)
- Petro M, Križanovič K, Ďulák K:
High-performance liquid chromatography of isopropylphenols.
J Chromatogr A 595, 337-339 (1992)
- Plummer GF:
Improved method for the determination of propofol in blood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 421, 171-176 (1987)
- Ragno G, Cicinelli E, Schonauer S, Vetuschi C:
Propofol assay in biological fluids in pregnant women.
J Pharm Biomed Anal 15, 1633-1640 (1997)
- Reid J, Nolan AM, Welsh E:
Propofol as an induction agent in the goat: a pharmacokinetic study.
J Vet Pharmacol Ther 16, 488-493 (1993)
- Reiner GN, Labuckas DO, Garcia DA:
Lipophilicity of some GABErgic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems.
J Pharm Biom Anal 49, 686-691 (2009)

- Riu PL, Riu G, Testa C, Mulas M, Caria MA, Mameli S, Mameli O:
Disposition of propofol between red blood cells, plasma, brain and cerebrospinal fluid in rabbits.
Eur J Anaesthesiol 17, 18-22 (2000)
- Römpp Lexikon Chemie:
10. Aufl., Thieme, Stuttgart (1996-1999)
- Scheel A, Spies E, Großherr M, Gehring H, Seyfarth M, Dibbelt L:
On the determination of propofol in mammalian blood by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.
Clin Chem Lab Med 44, A184 (2006)
- Schumann G:
Chromatographische Verfahren.
In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg.), Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie.
3. Aufl., 172-176, Schattauer, Stuttgart (1995)
- Schywalsky M, Ihmsen H, Knoll R, Schwilden H:
Binding of propofol to human serum albumin.
Arzneimittelforschung 55, 303-306 (2005)
- Sebel PS, Lowdon JD:
Propofol: a new intravenous anesthetic.
Anesthesiology 71, 260-277 (1989)
- Servin F, Desmots JM, Haberer JP, Cockshott ID, Plummer GF, Farinotti R:
Pharmacokinetics and protein binding of propofol in patients with cirrhosis.
Anesthesiology 69, 887-891 (1988)
- Simons PJ, Cockshott ID, Douglas EJ, Gordon EA, Hopkins K, Rowland M:
Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of an oil in water emulsion of ¹⁴C-propofol.
Xenobiotica 18, 429-440 (1988)
- Stetson PL, Domino EF, Sneyd JR:
Determination of plasma propofol levels using gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring.
J Chromatogr 620, 260-267 (1993)

Takizawa E, Hiraoka H, Takizawa D, Goto F:

Changes in the effect of propofol in response to altered plasma protein binding during normothermic cardiopulmonary bypass.

Br J Anaesth 96, 179-185 (2006)

Tswett M:

Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.

Ber Dtsch Botan Ges 24, 316-323 (1906a)

Tswett M:

Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.

Ber Dtsch Botan Ges 24, 384-393 (1906b)

Vetpharm Propofol:

http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00000207/8548_01.htm

(Tag des Zugriffs: 07.07.2010)

Viernstein H, Stumpf C, Spiegl P, Reiter S:

Preparation and central action of propofol/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexes in rabbits.

Arzneimittelforschung 43, 818-821 (1993)

Vree TB, Baars AM, de Grood PM:

High-performance liquid chromatographic determination and preliminary pharmacokinetics of propofol and its metabolites in human plasma and urine.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 417, 458-464 (1987)

Vree TB, Lagerwerf AJ, Bleeker CP, de Grood PM:

Direct high-performance liquid chromatography determination of propofol and its metabolite quinol with their glucuronide conjugates and preliminary pharmacokinetics in plasma and urine of man.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 721, 217-228 (1999)

Wappler F:

Das Propofol-Infusionssyndrom: Klinik, Pathophysiologie und Therapie einer seltenen Komplikation.

Dtsch Arztebl 103, A705-710 (2006)

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tab. 10: Gegenüberstellung der HPLC-Methoden

HPLC-Methode	Umkehrphase		Normalphase
	Versuchsteil 1	Versuchsteil 2	Versuchsteil 2
Spezies	Mensch, Schwein, Schaf, Ziege	Schwein, Schaf	Schwein, Schaf
Material	Vollblut, Plasma, (Urin*)	Plasma, Serum	Plasma, Serum
Bearbeitung			
Probe	Kalibrationsreihe, Kontrolle 1 und 2		
	Vollblut, Plasma	Plasma, Serum	Plasma, Serum
	30 Min. bei Zimmertemperatur auftauen Probe 30 Sek. mischen		
200 µl Probe +	400 µl MeOH/ IS		200 µl MeOH/ IS
	Probe 30 Sek. mischen 20 Min. im Kühlschrank inkubieren 10 Min. bei 20800 g und 4 °C zentrifugieren		300 µl Überstand + 300 µl n-Hexan 30 Min. abgedunkelt über Kopf mischen 5 Min. bei 3000 g u. 4 °C zentrifugieren ≤ 200 µl der oberen Phase analysieren
	Überstand analysieren		
Nachweis	Propofol		Propofolchinon, Propofol
Injektion	10 µl		50 µl
Eluent	0,1 M KH ₂ PO ₄ pH 2,3 + 60 % ACN		n-Hexan + 2 % Dioxan
Flussrate	1,1 bzw. 1,5 ml/ Min.		1,0 ml/ Min.
Detektor	Fluoreszenz (Anregung 270 nm/ Emission 310 nm)		UV <i>Fluoreszenz</i> (255 nm) (270 nm/ 310 nm)

* Die Urinproben wurden zur Methodenentwicklung der Propofolchinon-Messung wie folgt verwendet:

1. 100 µl Urin (Ziege) wurden mit 900 µl 0,2 M KH₂PO₄-Puffer (pH 6,8) verdünnt, zentrifugiert (5 Min. bei 3000 g und Raumtemperatur) und mit der für Propofol optimierten Umkehrphasen-Methode (inkl. UV-Detektor bei 270 nm) analysiert (Abb. 18, S. 37).
2. Urin (Ziege) wurde wie unter 1. vorbereitet und mittels folgender Modifikationen analysiert: Der Eluent wurde durch 6 g/ l o-Phosphorsäure in Aqua bidest. ersetzt und der Lösungsmittelfluss verändert (Gradient: Eluent zu ACN mit Flussrate von 1 ml/ Min., 20 : 80 (v/v) zu Beginn, in 25 Min. verändert zu 60 : 40 (v/v), so für 20 Min., dann für 15 Min. 20 : 80 (v/v), Gesamtzeit 60 Min.) (Abb. 19, S. 37).
3. Methodenwechsel zur Normalphasen-Chromatographie (Tab. 10) mit erfolgreicher Bestimmung von Propofolchinon (Abb. 20, S. 39).

Tab. 11: Übersicht der Blutentnahmen (Mensch, Schwein, Schaf und Ziege) zur Bestimmung der Propofol-Konzentrationen mittels Umkehrphasen-Chromatographie (Versuchsteil 1)

Spezies		Mensch						Schwein							
Zeit [Min.]	Proben-Nr.	Vollblut			Plasma			EDTA	Vollblut			Plasma			EDTA
vor Narkose	A-0	I			1			0-E	I			1			0-E
10	A-1	I	II	III	1	2	3	1-E	I	II	III	1	2	3	1-E

Spezies		Schaf						Ziege							
Zeit [Min.]	Proben-Nr.	Vollblut			Plasma			EDTA	Vollblut			Plasma			EDTA
vor Narkose	A-0	I			1			0-E	I			1			0-E
10	A-1	I	II	III	1	2	3	1-E	I	II	III	1	2	3	1-E

Tab. 12: Übersicht der Blutentnahmen (Schwein und Schaf) zur Bestimmung der Propofol-Konzentrationen mittels Umkehr- und Normalphasen-Chromatographie bzw. Propofolchinon-Konzentrationen mittels Normalphasen-Chromatographie (Versuchsteil 2)

Spezies		Schwein						Schaf					
Zeit [Min.]	Proben-Nr.	Plasma					Serum	Plasma					Serum
vor Narkose	A-0	1	2	3	4	5	0-S	1	2	3	4	5	0-S
1. Bolus: Propofol (0 Min.)													
2	A-I	I						I					
5	A-1	1	2	3				1	2	3			
10	A-2	1	2	3				1	2	3			
20	A-3	1	2	3				1	2	3			
2. Bolus: Propofol (30 Min.)													
32	A-II	II						II					
35	A-4	1	2	3				1	2	3			
40	A-5	1	2	3				1	2	3			
50	A-6	1	2	3				1	2	3			
3. Bolus: Propofol (60 Min.)													
62	A-III	III						III					
65	A-7	1	2	3				1	2	3			
70	A-8	1	2	3				1	2	3			
80	A-9	1	2	3				1	2	3			9-S
4. Bolus: Propofol (120 Min.)													
122	A-IV	IV											
125	A-10	1	2	3									
130	A-11	1	2	3									
140	A-12	1	2	3									
5. Bolus: ½ Propofol (150 Min.)													
152	A-V	V											
155	A-13	1	2	3									
160	A-14	1	2	3									
170	A-15	1	2	3									
180	A-16	1	2	3									
190	A-17	1	2	3									
200	A-18	1	2	3									
210	A-19	1	2	3									
220	A-20	1	2	3									
230	A-21	1	2	3									
240	A-22	1	2	3									
250	A-23	1	2	3									
260	A-24	1	2	3									
270	A-25	1	2	3			25-S						

Tab. 13: Besonderheiten der Messung mittels Normalphasen-Chromatographie

Subjekt-Nr.	Propofolchinon			Propofol		
	Kontrolle 1 [µg/ l]	Kontrolle 2 [µg/ l]	Wellenlänge (UV) [nm]	Kontrolle 1 [µg/ l]	Kontrolle 2 [µg/ l]	Wellenlänge (FL) [nm]
Schaf 19	1500	5500	270	50	1000	270/ 310
Schaf 20	1500	5500	270	50	1000	270/ 310
Schaf 21	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schaf 22	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schaf 23	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schwein 84	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schwein 85	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schwein 86	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schwein 87	200	1000	255	50	1000	270/ 310
Schwein 88	200	1000	255	50	1000	270/ 310

Tab. 14: Präzision wiederholter Propofolchinon-Plasmaanalysen bei Schaf (n = 6) und Schwein (n = 19). Die korrigierten Daten wurden mittels Kalibration des Menschen umgerechnet.

	Schaf				Schwein			
	Nr.	Kontrolle 1 [µg/ l]	Kontrolle 2 [µg/ l]	Kontrolle 1 [µg/ l]	Kontrolle 2 [µg/ l]	Nr.	Kontrolle 1 [µg/ l]	Kontrolle 2 [µg/ l]
		gemessen		korrigiert			gemessen	
	21	782	5126	147	965	84	152	1156
		856	5535	151	1038		126	899
	22	702	6113	143	1124		129	862
		707	5400	130	1051	85	161	1308
	23	620	4730	95	721		162	1316
		583	4783	89	729		152	1129
						86	153	1169
							181	1373
							191	1350
							169	1337
							163	1348
						87	181	1465
							191	1516
							169	1199
							163	1120
						88	150	1054
							159	1085
							134	979
							128	895
n		6	6	6	6		19	19
Mittelwert [µg/ l]		708,3	5281,2	125,8	937,8		158,6	1187,4
Variationskoeffizient [%]		14,2	9,8	21,8	18,4		12,5	16,4
Sollwert [µg/ l]		200,0	1000,0	200,0	1000,0		200,0	1000,0
Wiederfindung [%]		354,2	528,1	62,9	93,8		79,3	118,7
min. Wiederfindung [µg/l]; [%]		583; 291,5	4730;473,0	89; 44,4	721; 72,1		126; 63,0	862; 86,2
max. Wiederfindung [µg/l]; [%]		856; 428,0	6113;611,3	151; 75,5	1124;112,4		191; 95,5	1516; 151,6

Anmerkung: In Tab. 14 sind ausschließlich die Propofolchinon-Kontrollen mit Sollwerten von 200 µg/l und 1000 µg/ l aufgeführt, die der Bestimmung von Wiederfindung und Präzision (Kap. 3.3.2) dienen. Die selten eingesetzten höhere Konzentrationen (vgl. Tab. 13) sind nicht dargestellt.

Tab. 15: Rahmenbedingungen der Chromatographie-Methoden (Umkehrphase vs. Normalphase) zur Messung von Propofol und Propofolchinon. A0 und A1 dienen der Beschreibung der Kalibrationsgeraden.

Propofol – Umkehrphasen-Chromatographie						
	Schaf 18	Schaf 19	Schaf 20	Schaf 21	Schaf 22	Schaf 23
Retentionszeit [Min.]	14,2	14,4	14,3	14,3	14,2	14,2
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	2514	2452	2397	2462	2456	2777
R ²	0,9997	0,9998	0,9987	0,9993	0,9994	0,9992
	Schwein 83	Schwein 84	Schwein 85	Schwein 86	Schwein 87	Schwein 88
Retentionszeit [Min.]	14,7	14,3	14,3	14,4	14,3	14,3
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	2401	2392	2487	2338	2540	2542
R ²	0,9988	0,9995	0,9939	0,9996	0,9994	0,9995
Propofol – Normalphasen-Chromatographie						
	Schaf 18*	Schaf 19	Schaf 20	Schaf 21	Schaf 22	Schaf 23
Retentionszeit [Min.]	7,8	7,8	8,1	8,3	8,3	8,1
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	1766	1487	1522	1437	1724	1463
R ²	0,9971	0,9950	0,9976	0,9939	0,9778	0,9894
	Schwein 83*	Schwein 84	Schwein 85	Schwein 86	Schwein 87	Schwein 88
Retentionszeit [Min.]	7,8	8,4	8,2	8,3	8,2	8,0
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	1528	1310	1374	1178	1179	1310
R ²	0,9885	0,9944	0,9957	0,9983	0,9941	0,9969
Propofolchinon – Normalphasen-Chromatographie						
	Schaf 18*	Schaf 19	Schaf 20	Schaf 21	Schaf 22	Schaf 23
Retentionszeit [Min.]	5,4	5,4	5,4	5,5	5,5	5,4
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	2782	3312	2392	1001	991	1236
R ²	0,9951	0,9916	0,9922	0,9808	0,9891	0,9837
	Schwein 83*	Schwein 84	Schwein 85	Schwein 86	Schwein 87	Schwein 88
Retentionszeit [Min.]	5,4	5,5	5,4	5,4	5,4	5,4
A0 (Konstante)	0	0	0	0	0	0
A1 (1/ Steigung)	1160	208	235	278	277	296
R ²	0,9511	0,9969	0,9923	0,9839	0,9730	0,9770

* Proben wurden nur zur Erprobung der Normalphasen-Chromatographie eingesetzt.

Anmerkung: Die Daten von Schaf 18* und Schwein 83* wurden in der Normalphasen-Chromatographie per 1-fach-Analyse bestimmt. Insofern sind sie in den Abbildungen und sonstigen Tabellen nicht aufgeführt.

Tab. 16: Analysedaten der Propofol-Konzentrationen in arteriellem Plasma von Schaf und Schwein mittels Umkehrphasen-Chromatographie. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der zu- meist 3-fach-Analysen mit zugehörigem Variationskoeffizienten (VK).

Umkehrphase		Schaf 18		Schaf 19		Schaf 20		Schaf 21		Schaf 22		Schaf 23	
Propofol		MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK
		[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]
Zeit [Min.]	Probe												
0	A0 (LP)	< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10	
2	AI	3479		6009		2674		4380		5295		3641	
5	A1	1377	5,0	1087	3,8	675	9,1	2006	13,4	1010	9,0	1783	6,2
10	A2	745	2,4	873	1,1	399	10,7	1045	1,7	117	41,2	736	1,7
20	A3	551	3,7	907	2,5	699	4,5	864	7,2	1089		686	2,4
32	AII	5534		6957		2443		6257		8748		5207	
35	A4	2814	5,2	1644	7,9	2109	7,6	3050	3,3	1865	3,1	2000	7,9
40	A5	1075	1,1	1015	0,6	120	13,5	1348	3,4	1471		546	23,6
50	A6	882	2,4	697	4,9	540	6,2	972	2,6	874	6,7	822	2,2
62	AIII	5985		5589		4136		8886		7718		5340	
65	A7	3176	5,6	1335	6,2	1732	14,7	-		3215	5,8	2165	4,8
70	A8	1395	2,0	753	2,2	1256	1,3	2464	2,8	1394	2,9	983	2,0
80	A9	1045	0,4	579	1,7	1270	2,4	1732	2,1	1619	3,4	777	0,9
Umkehrphase		Schwein 83		Schwein 84		Schwein 85		Schwein 86		Schwein 87		Schwein 88	
Propofol		MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK	MW	VK
		[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]	[µg/ l]	[%]
Zeit [Min.]	Probe												
0	A0 (LP)	< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10	
2	AI	2604		3751		5049		7874		4679		3182	
5	A1	2979	2,0	3142	0,6	4290	0,4	6283	3,1	4422	2,0	2949	2,9
10	A2	2784	0,5	2832	0,1	3703	1,4	5552	2,5	3909	2,4	2442	1,0
20	A3	2607	2,6	2617	0,7	3271	0,8	5086	0,4	3796	1,7	2204	1,4
32	AII	5328		4894		6569		9652		8206		4612	
35	A4	4745	2,8	4111	1,5	5684	0,3	7293	0,7	6678	1,0	3912	2,1
40	A5	4163	0,7	3748	2,4	4532	0,6	6372	3,2	5940	0,7	3225	1,9
50	A6	3597	1,9	3264	1,6	3848	1,3	5839	1,7	5099	1,9	2630	1,9
62	AIII	5180		5234		6718		8166		9344		4694	
65	A7	4802	1,0	4927	1,0	6021	1,6	6373	0,6	7746	1,1	4079	2,0
70	A8	4315	0,7	4136	0,0	4239	0,4	6310	1,3	6499	0,3	3128	0,7
80	A9	4119	1,5	3637	2,9	3683	1,0	5845	1,4	5823	1,2	2675	1,8
122	AIV	6213		5289		6219		8862		9365		6186	
125	A10	5183	3,1	4634	1,6	5606	1,4	7329	1,7	7966	0,8	4867	2,9
130	A11	4852	0,4	4275	0,4	4987	0,9	6961	2,0	7134	1,8	3991	0,8
140	A12	4541	0,8	3890	1,3	4164	0,6	6353	0,1	6193	1,6	3233	0,7
152	AV	5330		5058		5531		7738		7710		4426	
155	A13	4911	2,2	4668	2,3	5230	2,9	6590	0,8	7185	2,4	3979	0,5
160	A14	4719	2,6	4454	0,4	4526	2,1	6516	1,2	6684	1,5	3508	2,1
170	A15	4196	1,2	4190	1,2	3881	1,8	5907	3,1	5963	1,9	3157	1,2
180	A16	4155	0,8	4178	1,5	3832	1,3	5449	0,5	5483	1,6	2985	2,0
190	A17	3582	0,3	4190	2,0	3768	0,7	4936	1,8	4884	2,1	2431	2,9
200	A18	3847	2,7	4336	0,8	3977	2,2	5292	3,2	5065	1,7	2338	1,2
210	A19	3314	0,6	4164	1,3	3581	0,3	5116	1,2	4547	0,8	2031	11,4
220	A20	3368	1,2	4129	3,4	3482	1,9	5135	1,0	4438	0,1	2408	1,1
230	A21	3582	2,5	4190	2,6	3768	1,3	4936	2,4	4884	0,8	2431	2,2
240	A22	1994	1,9	2634	1,2	1928	2,0	2456	3,0	2528	0,4	1410	1,2
250	A23	2265	2,2	3870	2,7	2052	2,3	2254	2,5	3314	0,6	2546	1,4
260	A24	2755	3,5	-		5796	2,0	4647	3,6	4598	1,0	3017	0,9
270	A25	1218	1,1	-		1980	0,6	1814	13,0	2688	0,4	1834	0,2

- Keine Probenentnahme

Tab. 17: Analysedaten der Propofol-Konzentrationen in arteriellem Plasma von Schaf und Schwein mittels Normalphasen-Chromatographie. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der zu- meist 3-fach-Analysen mit zugehörigem Variationskoeffizienten (VK).

Normalphase		Schaf 19		Schaf 20		Schaf 21		Schaf 22		Schaf 23	
Propofol		MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]
Zeit [Min.]	Probe										
0	A0 (LP)	< 10		< 10		< 50 ¹		70 ¹		< 10	
2	AI	3308		1951		2744		3412		2613	
5	A1	954	3,9	519	6,2	1718	9,2	1000	6,3	1454	4,7
10	A2	759	2,5	358	7,7	938	2,4	201	28,2	649	2,0
20	A3	782	5,1	562	3,3	769	7,0	1109		605	1,4
32	AII	4511		1747		2893		4386		2995	
35	A4	1394	9,5	1534	6,6	2154	0,5	1753	9,0	1666	6,7
40	A5	892		153	4,2	1089	3,4	1470		525	21,3
50	A6	498	5,0	450	8,2	858	1,6	911	5,5	689	2,1
62	AIII	3213		2379		3167		3739		3205	
65	A7	1017	12,0	1276	15,6	-		2588	3,6	1698	3,8
70	A8	561	1,8	958	0,6	1768	1,8	1328	1,8	831	3,4
80	A9	441	4,3	989	2,0	1276	1,8	1529	1,2	680	0,3
Normalphase		Schwein 84		Schwein 85		Schwein 86		Schwein 87		Schwein 88	
Propofol		MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]
Zeit [Min.]	Probe										
0	A0 (LP)	< 10		16		< 10		< 10		< 10	
2	AI	2795		2930		3552		2864		2510	
5	A1	2449	0,3	2663	2,6	3413	4,1	2664	0,7	2326	4,1
10	A2	2277	1,2	2376	1,1	3156	4,5	2361	2,4	2040	1,0
20	A3	2129	0,8	2137	1,9	2948	0,7	2268	3,5	1802	3,2
32	AII	3014		2899		3666		3266		2868	
35	A4	2695	2,0	2861	1,4	3342	1,7	3001	1,1	2685	1,6
40	A5	2634	2,2	2421	0,8	3084	3,0	2740	3,5	2378	1,0
50	A6	2333	2,0	2253	2,1	2996	5,7	2563	0,6	2088	2,5
62	AIII	3139		2864		3281		3142		2814	
65	A7	2934	2,0	2749	3,1	3031	1,9	3014	2,6	2689	3,4
70	A8	2726	1,4	2285	3,4	2995	1,7	2820	0,9	2397	2,0
80	A9	2443	2,2	2093	1,6	2881	1,8	2614	1,8	2144	2,1
122	AIV	3106		2880		4084		4264		3222	
125	A10	2886	3,1	2804	2,2	3850	0,3	4145	0,5	2915	0,7
130	A11	2687	1,0	2547	1,0	3716	3,4	4022	0,6	2622	0,8
140	A12	2562	0,5	2367	1,4	3684	2,3	3891	0,5	2334	0,8
152	AV	2923		2688		3953		4216		2641	
155	A13	2838	1,6	2646	1,3	3664	3,5	4098	0,6	2632	2,0
160	A14	2683	3,7	2397	1,4	3778	0,9	4002	0,6	2475	1,3
170	A15	2627	1,4	2200	1,6	3707	0,3	3871	0,9	2192	1,4
180	A16	2598	0,4	2200	1,2	3650	1,4	3842	0,7	2160	0,4
190	A17	2523	4,0	2187	0,9	3507	1,3	3686	1,2	1897	0,5
200	A18	2589	2,0	2235	2,1	3473	10,5	3759	1,7	1816	0,8
210	A19	2547	2,1	2072	1,5	3503	0,7	3624	0,3	1767	
220	A20	2528	2,0	2095	1,3	3505	1,7	3634	1,1	1857	0,8
230	A21	2523	2,9	2187	4,6	3507	2,4	3686	0,9	1897	1,6
240	A22	1846	0,0	1272	2,2	2502	1,4	2780	1,2	1089	1,3
250	A23	2208	0,9	1390	0,8	2344	6,3	3233	6,1	1824	4,6
260	A24	-		2522	4,8	2947	25,1	3763	2,4	2138	8,1
270	A25	-		1312	6,3	1838	21,2	3053	1,4	1383	3,2

¹ Peak von Plasmabestandteilen überlagert, chromatographisch nicht abzugrenzen

- Keine Probenentnahme

Tab. 18: Analysedaten der Propofolchinon-Konzentrationen in arteriellem Plasma von Schaf und Schwein mittels Normalphasen-Chromatographie. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der zumeist 3-fach-Analysen mit zugehörigem Variationskoeffizienten (VK).

Normalphase		Schaf 19		Schaf 20		Schaf 21		Schaf 22		Schaf 23	
Propofolchinon		MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]
Zeit [Min.]	Probe										
0	A0 (LP)	< 50 ¹		< 10		< 50 ¹		< 50 ¹		< 10	
2	AI	2878		932		1776		1161		1659	
5	A1	1794	2,0	654	3,6	2030	11,5	975	14,3	1460	4,8
10	A2	1563	1,0	400	8,6	1452	5,7	468	4,5	950	3,7
20	A3	1512	5,3	574	5,9	1261	6,6	746	30,4	978	7,7
32	AII	3228		1612		2372		1346		1957	
35	A4	2297	5,9	1389	6,8	2475	7,4	1438	25,7	1779	6,6
40	A5	2083	16,2	410	3,1	1907	5,5	855	3,0	1125	3,1
50	A6	1669	3,6	979	5,1	1596	9,8	587	1,6	906	1,9
62	AIII	3432		2932		4565		1098		1705	
65	A7	2230	3,7	2298	24,3	-		1402	8,4	1455	4,1
70	A8	1504	9,7	1685	17,7	5648	3,4	898	18,4	1134	2,4
80	A9	1195	13,1	1487	6,7	4279	3,5	672	11,1	966	2,7
Normalphase		Schwein 84		Schwein 85		Schwein 86		Schwein 87		Schwein 88	
Propofolchinon		MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]	MW [µg/l]	VK [%]
Zeit [Min.]	Probe										
0	A0 (LP)	< 10		< 10		< 10		< 10		< 10	
2	AI	10		12		25		13		14	
5	A1	17	18,3	19	10,8	40	48,2	29	10,3	35	4,4
10	A2	23	12,7	22	9,1	64	64,5	35	6,5	50	34,6
20	A3	21	10,1	24	15,0	55	11,8	49	19,1	40	6,3
32	AII	24		35		92		72		68	
35	A4	35	9,9	56	5,2	90	10,8	84	12,6	98	7,4
40	A5	40	4,3	53	4,0	119	5,7	78	8,7	89	1,9
50	A6	37	4,7	42	16,0	129	13,8	71	9,4	73	5,7
62	AIII	41		44		120		122		75	
65	A7	51	3,4	58	4,6	128	5,8	95	13,7	124	1,6
70	A8	60	17,3	56	4,7	153	8,8	102	1,5	101	1,0
80	A9	43	8,1	47	3,3	168	9,6	96	3,2	86	11,1
122	AIV	63		53		112		139		75	
125	A10	75	1,3	85	3,8	105	9,6	112	1,4	141	17,6
130	A11	77	6,5	80	1,3	136	2,1	138	12,6	139	6,5
140	A12	77	4,2	71	3,6	161	7,0	131	9,3	116	1,0
152	AV	91		72		160		116		92	
155	A13	99	0,0	82	15,2	157		158	8,4	128	2,8
160	A14	95	6,4	78	0,7	176	11,9	145	6,6	124	14,8
170	A15	96	4,8	75	8,3	176	11,3	132	15,2	127	16,1
180	A16	101	10,9	56	5,4	167	10,6	136	10,5	100	4,5
190	A17	104	11,3	67	9,3	164	9,1	126	15,1	101	11,0
200	A18	92	6,4	63	12,9	-		124	11,7	93	31,3
210	A19	105	3,1	77	28,1	191	18,7	115	13,8	96	2,6
220	A20	97	12,9	71	12,4	191	28,9	121	9,6	93	6,5
230	A21	104	6,8	67	31,1	164	14,8	126	6,5	101	10,9
240	A22	134	14,4	94	17,5	135	13,0	141	19,5	116	34,8
250	A23	123	9,5	77	21,0	147	22,4	116	4,7	82	10,3
260	A24	-		44	8,0	155	18,9	115	9,9	89	4,1
270	A25	-		69	20,6	104	19,7	143	9,5	90	14,4

¹ Peak von Plasmabestandteilen überlagert, chromatographisch nicht abzugrenzen

- Keine Probenentnahme

Tab. 19: Gegenüberstellung der Propofol-Narkose bei Schaf, Schwein und Mensch sowie der im Plasma gemessenen Propofolchinon-Konzentrationen

	Schaf	Schwein	Mensch*
Gewicht [kg]	57 – 80	28 – 40	85
Narkosedauer [Std.]	1,5	4,5	5
Basalinfusion [mg/ kg KG/ Std.]	0,96	0,96	n. bek.
Bolusapplikation [mg/ kg KG]	4	4 (2)	n. bek.
Gesamtdosis [mg]	766 – 1075	625 – 893	3510
Dosis [mg/ kg KG/ Std.]	8,96	4,96	8,26
Applizierte Dosis nach 90 Min. [mg]	766 – 1075	376 – 538	n. bek.
Dosis [mg/ kg KG/ Std.]	8,96	8,96	n. bek.
gemessenes Propofolchinon nach ~ 60 Min. [$\mu\text{g}/\text{l}$]	1000 – 3500	40 – 120	~ 500
gemessenes Propofolchinon nach ~ 90 Min. [$\mu\text{g}/\text{l}$]	700 – 1500	45 – 150	~ 800
gemessenes Propofolchinon nach ~180 Min. [$\mu\text{g}/\text{l}$]	-	70 – 180	~1000

* Daten aus [Vree et al., 1999]

- Keine Probenentnahme

7.2 Genehmigungen

Genehmigungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät zu Lübeck und des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein:

Mensch: AZ 06-003 und AZ 07-002 im Bescheid vom 28.02.2006 bzw. 26.01.2007

Schaf: AZ V 312-72241.122-7 (94-8/07) und AZ V 312-72241.122-7 (16-2/09) im Bescheid vom 26.11.2007 bzw. 13.02.2009

Schwein: AZ V742-72241.122-16 (75-9/04) und AZ V742-72241.122-16 (83-9/04) im Bescheid vom 19.11.2004 bzw. 20.04.2005

Ziege: AZ V 742-72241.122-6 (38-5/03) im Bescheid vom 07.07.2003

7.3 Publikationen

Scheel A, Spies E, Großherr M, Gehring H, Seyfarth M, Dibbelt L:

On the determination of propofol in mammalian blood by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.

Clin Chem Lab Med 44, A184 (2006)

Grossherr M, Spies E, Scheel A, Hengstenberg A, Gehring H, Dibbelt L:

Differences of propofol concentrations in mammalian whole blood and in corresponding plasma samples analyzed by high performance liquid chromatography.

Clin Lab 53, 315-319 (2007)

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Seyfarth danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Klinische Chemie durchzuführen. Ich bedanke mich für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Ratschläge und Ermutigungen sowie für die Gelegenheit, einige Ergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Mannheim zu präsentieren.

Herrn Dr. L. Dibbelt danke ich für die kompetente Betreuung sowie die tatkräftige Unterstützung, durch die er mit viel Geduld und Engagement zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Bei Frau E. Spies möchte ich mich herzlich für die Anleitung und Zusammenarbeit im Labor bedanken sowie für die Durchführung der Experimente, als die Examensvorbereitung nicht weiter hinauszuzögern war.

Im übrigen danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die innerhalb und außerhalb des Instituts für Klinische Chemie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Herrn Dr. M. Großherr aus der Klinik für Anästhesiologie für die Probenentnahmen und die darüber hinausgehende gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei meinem Freund M. Schrum für die Unterstützung und die technische Hilfe in Computerfragen bedanken sowie bei meinen Freunden, die mir mit anregenden Diskussionen, Motivation und viel Verständnis zur Seite standen, wenn wieder alles anders kam als erhofft.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter bedanken, die mir stets den Rücken stärkte und ohne deren Verständnis und Unterstützung diese Arbeit sicher nicht beendet worden wäre.