

# Bioanalytik von Arzneistoffen

Seminar zum Praktikum „Arzneimittelanalytik“

## Agenda

### **Gliederung**

- Einführung
- Probenvorbereitung
- Analytische Verfahren
  - spektroskopische Verfahren
  - chromatographische Verfahren
  - LC-MS
  - elektrophoretische Verfahren
  - immunochemische Verfahren

# Bioanalytik von Arzneistoffen

## Wichtige biologische Matrices

- Körperflüssigkeiten / Sekrete
  - **Blut / Plasma**
  - Urin
  - Speichel
  - interstitielle Flüssigkeit
  - Cerebrospinalflüssigkeit
  - Magen- / Darminhalt
  - Faeces
- Gewebe / Organe (z.B. Gehirn, Haare)

# Bioanalytik von Arzneistoffen

## • **Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)**

Antiepileptika / Antidepressiva  
Antiasthmaticum Theophyllin  
Zytostatika: Methotrexat, Asparaginase  
Immunsuppressiva: Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil  
Antibiotika: Aminoglykoside

## • **Pharmakokinetische Studien**

im Rahmen der Zulassung  
Therapieoptimierung  
Interaktionsstudien

## • **Studien zum Metabolismus**

## • **Toxikologie**

## • **Forensische Untersuchungen**

# Blut

**Blutvolumen: 7 - 8 % des Körpergewichts = 4 - 6 L**

## ca. 44 % zelluläre Bestandteile

- Erythrozyten      5.2x10<sup>6</sup>/μL (Mann)  
                            4.6x10<sup>6</sup>/μL (Frau)
- Leukozyten      4000 - 10000/μL  
    55 - 70 % neutrophile Granulozyten  
    2 - 4 % eosinophile Granulozyten  
    0 - 1 % basophile Granulozyten  
    25 - 40 % Lymphozyten  
    2 - 6 % Monozyten
- Thrombozyten      140000 - 360000/μL

## ca. 56 % Plasma/Serum

- ca. 900 g/L Wasser
- ca. 9 g/L Elektrolyte  
    Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium  
    Chlorid, Carbonat, Phosphat, Sulfat
- 7 - 18 g/L Lipide, Stoffwechselprodukte
- 65 - 80 g/L Proteine  
    Albumin              40 g/L  
    α<sub>1</sub>-Globuline        3 g/L  
    α<sub>2</sub>-Globuline        7 g/L  
    β-Globuline        9 g/L  
    γ-Globuline        13 g/L

# Urin

**Urinvolumen: ca. 500 - 2000 mL über 24 Stunden**

## anorganische Bestandteile

- Natrium              2.8 - 5.1 g
- Kalium                2 g
- Calcium              0.5 g
- Magnesium          0.25 g
- Ammoniak           0.02 - 0.07 g
- Chlorid               4.3 - 8.5 g
- Sulfat                 3.8 g
- Phosphat             2.9 - 3.8 g

## organische Bestandteile

- Harnstoff            20 - 35 g
- Harnsäure           0.3 - 2.0 g
- Kreatinin            1.0 - 1.8 g
- Kreatin               bis 0.1 g
- Aminosäuren        1 - 3 g
- Glucose               bis 0.16 g
- Ketone                bis 3 g
- Proteine              bis 0.04 g
- Porphyrine          bis 0.0003 g
- Metabolite
- Vitamine, Hormone

# Spektroskopische Verfahren

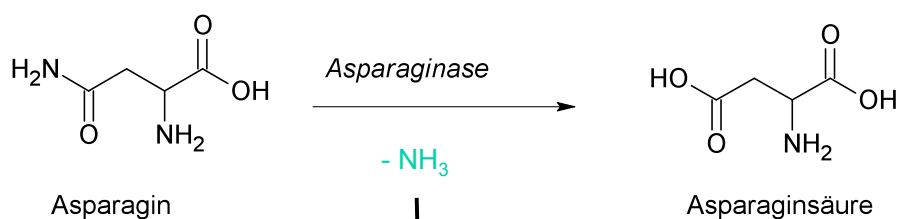
- **UV/VIS-Spektroskopie**

- (Direkte Messung)
- Farbreaktion (Derivatisierung) des Analyten
  - nichtenzymatisch
  - enzymatisch
- enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbreaktion
- enzymatische Reaktion unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$
- Hemmung/Aktivierung einer enzymatischen Reaktion durch Analyt

- **Fluorimetrie**

- Direktmessung
- Farbreaktion (Derivatisierung)

# Spektroskopische Verfahren

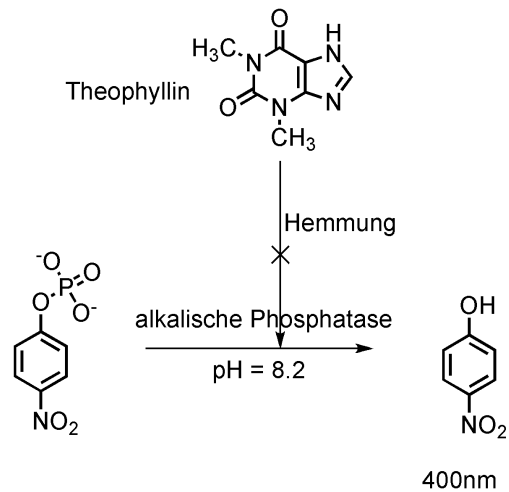


**Umsetzung mit Neßlers Reagenz**

**Photometrische Bestimmung bei 548 nm**

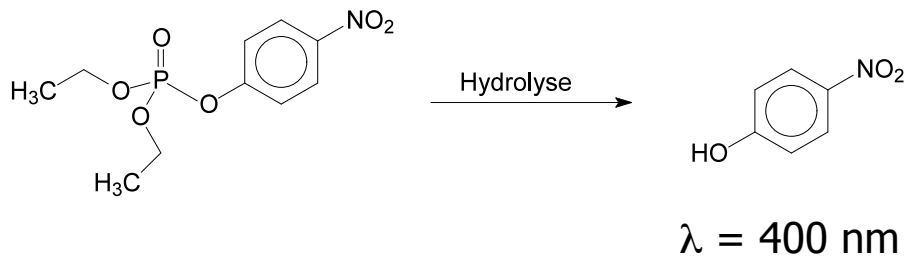
# Spektroskopische Verfahren

## Bestimmung von Theophyllin im Serum



# Spektroskopische Verfahren

## Nachweis von Paraoxon (E605)



# Chromatographische Verfahren

- [Dünnschichtchromatographie (DC)]
- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**
- Gaschromatographie (GC)
  
- Anwendung
  - Drug Monitoring
  - pharmakokinetische Studien
  - Studien zum Metabolismus
  
- Detektion:
  - UV, Fluoreszenz (DC, HPLC)
  - elektrochemisch (HPLC)
  - Massenspektroskopie (HPLC, GC)
  
- Vorteile: robust, selektiv, empfindlich
- Nachteil: relativ großes Probenvolumen

## HPLC-MS-Kopplung

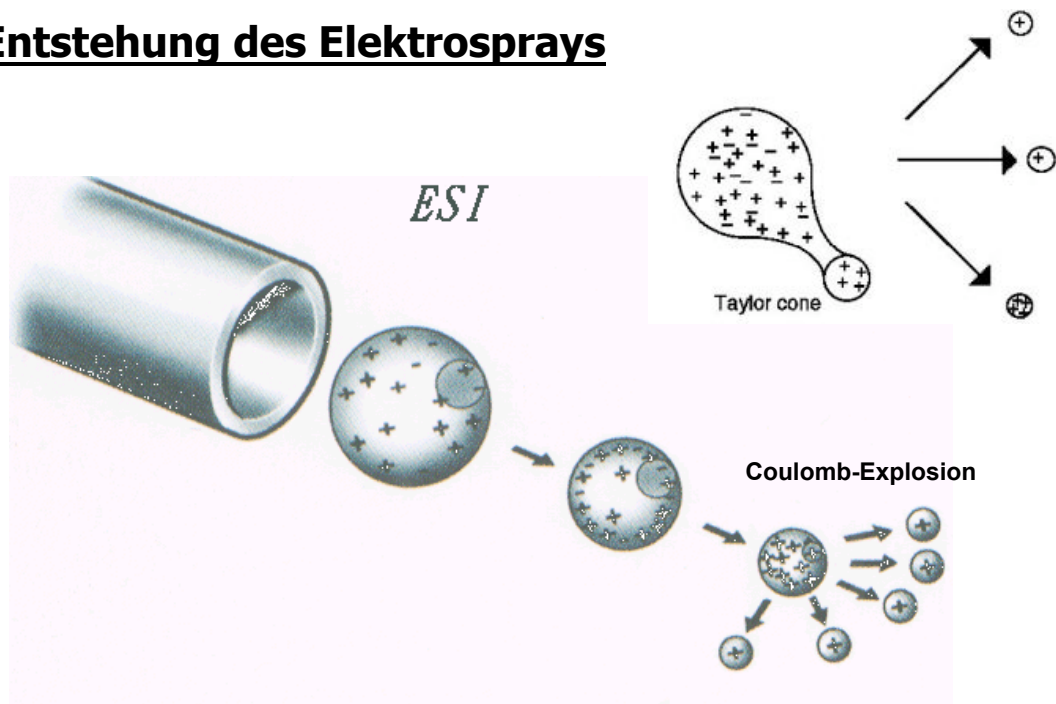
### Grundsätzliche Probleme bei LC-MS

Direkte Kopplung zwischen HPLC und MS meist nicht möglich, weil...

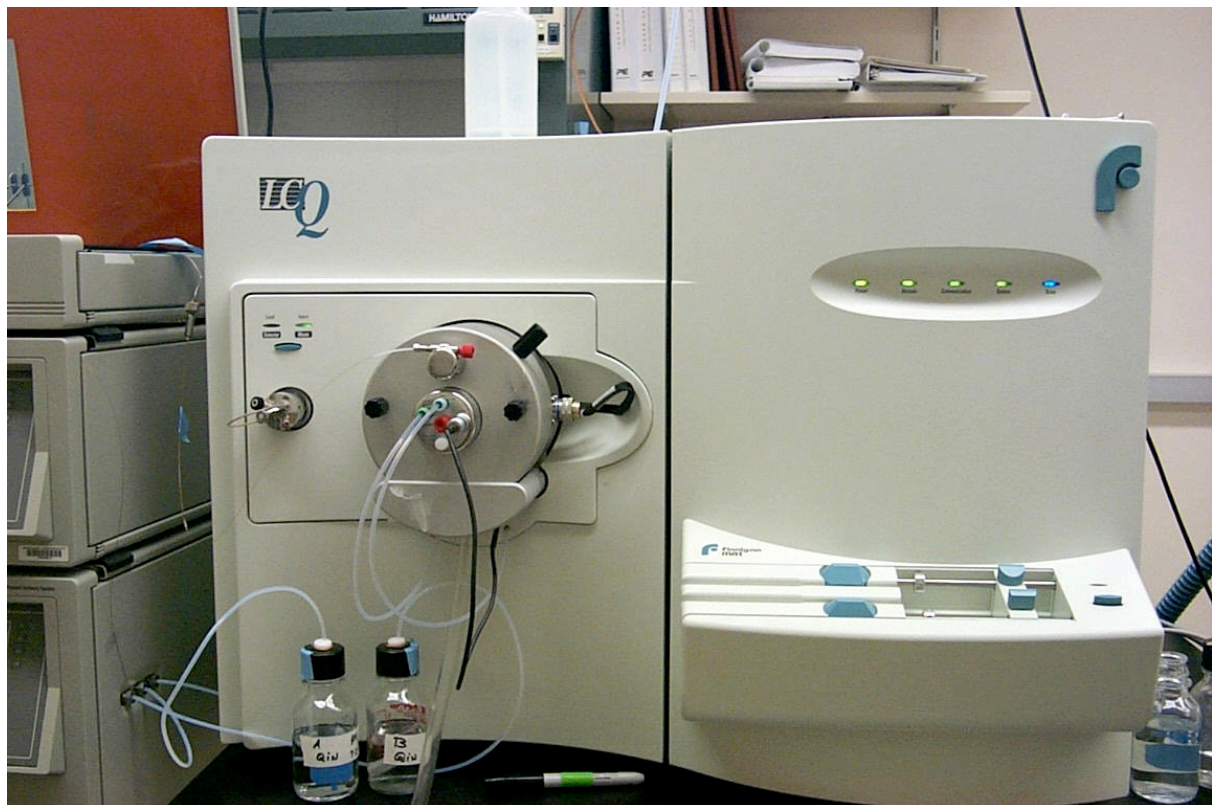
- Inkompatibilität zwischen mobiler Phase und Hochvakuum im MS-Gerät (1 ml/min einer wässrigen mobilen Phasen ergibt ein Gasvolumen von 1200 ml/min!)
- polare, non-volatile Analyten
- non-volatile Pufferzusätze (z.B. Phosphat)

# HPLC-MS-Kopplung

## Entstehung des Elektrosprays



# HPLC-MS-Kopplung



# HPLC-MS-Kopplung

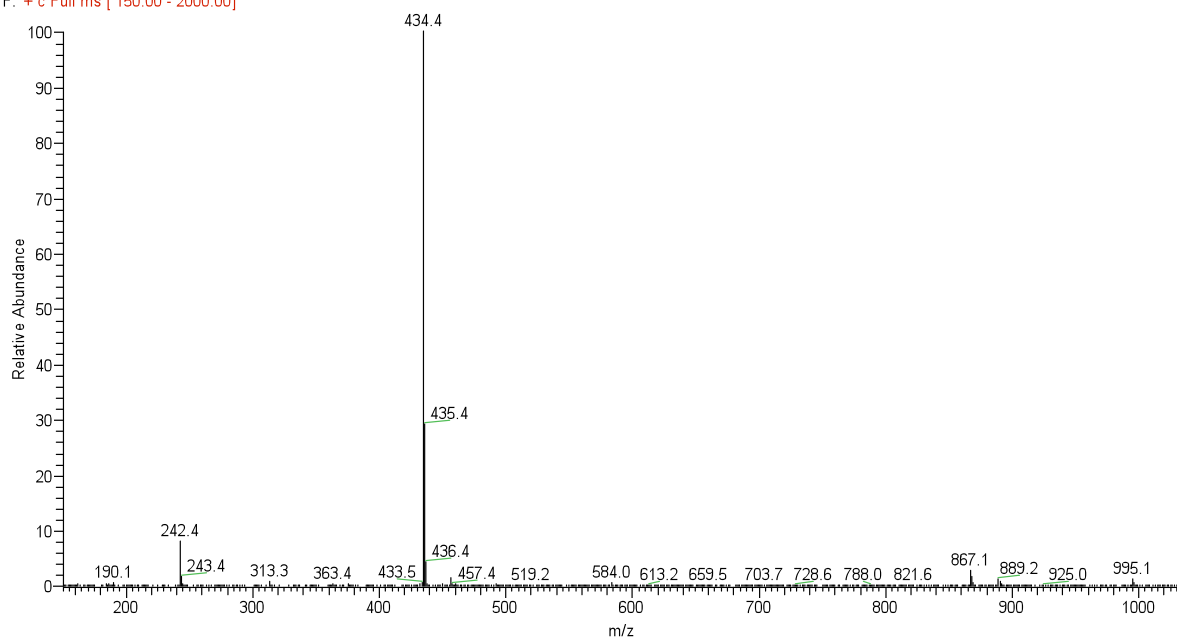
## Elektrospray Interface



# HPLC-MS-Kopplung

## Typische ESI-MS-Spektren

S#: 1-10 RT: 0.01-0.23 AV: 10 NL: 1.00E8  
F: + c Full ms [ 150.00 - 2000.00]





# Chromatographische Verfahren

- [Dünnschichtchromatographie (DC)]
  - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)
  - **Gaschromatographie (GC)**
- 
- Vorteile:       robust, selektiv, empfindlich  
                      minimaler Lösungsmittelverbrauch
  - Nachteil:       meist Derivatisierung der Proben notwendig, da  
                      hydrophile Verbindungen nicht flüchtig genug sind

# Elektrophoretische Verfahren

- “Klassische” Elektrophorese (Gelelektrophorese)
  - Kapillarelektrophorese
    - **Kapillarzonenlektrophorese (CZE)**
    - **Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)**
    - Kapillarelektrochromatographie (CEC)
    - Mikroemulsion-Elektrokinetische Chromatographie (MEEKC)
- 
- Vorteile:       hohe Trennleistung (= schnell)  
                      geringes Probenvolumen  
                      wenig Lösungsmittelverbrauch
  - Nachteile:     geringe Empfindlichkeit

# Probenvorbereitung

- Proteinfällung
  - organische/anorganische Säuren
  - organische Lösungsmittel (z.B. Acetonitril)
- Aufarbeitungsverfahren
  - Flüssig-Flüssig Extraktion (Scheidetrichter bei unterschiedlichen pH-Werten)
  - Festphasenextraktion (SPE)
  - BioTrap® o. restricted access® Vorsäulen
- Derivatisierung
  - bei schlecht detektierbaren Substanzen

## Flüssig/Flüssig versus Festphasenextraktion

### Flüssig/Flüssig-Exkration

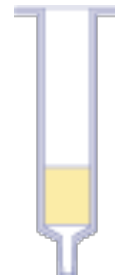
Vorteil	Nachteil
einfache Handhabung	Zeitintensiv
schlichte Geräteausstattung	hoher Lösungsmittelverbrauch
	nicht automatisierbar
	schwierige Phasentrennung
	„dreckige“ Extrakte

### Festphasenextraktion

Vorteil	Nachteil
hoher Probendurchsatz möglich	teure Einwegartikel
Automatisierbarkeit	
„saubere“ Extrakte	
geringer Lösungsmittelverbrauch	

# Festphasenextraktion

- Extraktion mit Hilfe einer stationären Phase
- Mechanismen
  - Verteilung
  - Adsorption
  - Ionenaustausch
  - Affinität
- Vorgehensweise
  - Auswahl der geeigneten Festphase  
(nach Polarität und Eigenschaften der Analyte, z.B. RP, CN, Phenyl, Ionenaustauscher)
  - Konditionierung der Säulen
  - Adsorption von Substanzen
  - Waschen der Säule
  - Desorption der Substanzen
  - Analyse



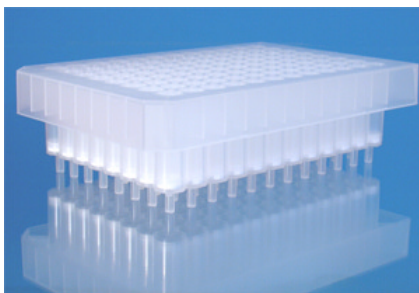
## Festphasenextraktion - Geräte



Extraktionssäule

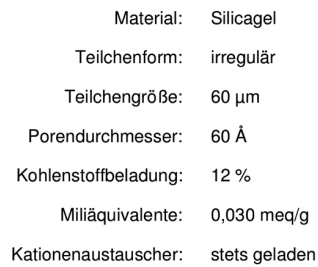


Extraktionskammer



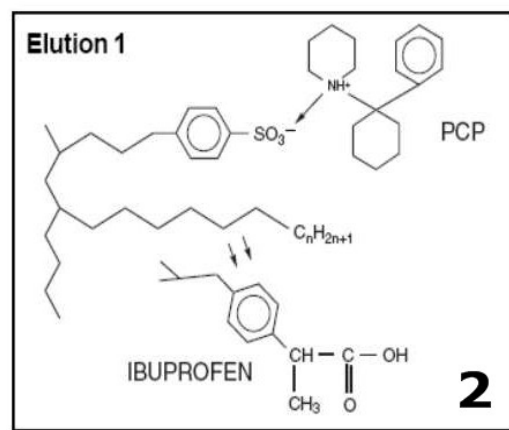
Multi-Titerplatten-Systeme

## mischfunktionelle Phasen



- Mischung aus RP8/SO<sub>3</sub>H -Phase
- Eigenschaften:
  - RP8: lipophile Wechselwirkungen
  - SO<sub>3</sub>H: stets geladener Kationenaustauscher (Benzolsulfonsäure), WW mit protonierten Basen
- Steuerung der Selektivität über pH-Einstellung

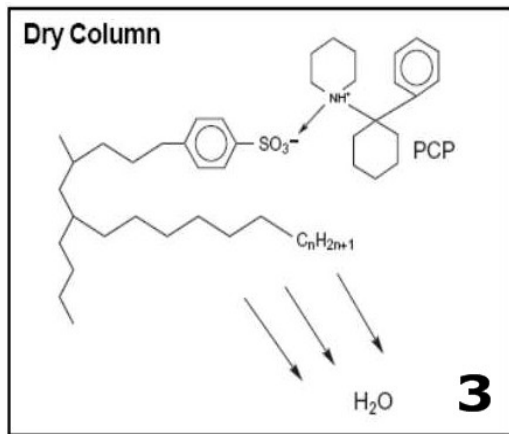
## Applikationsbeispiel Mischphase



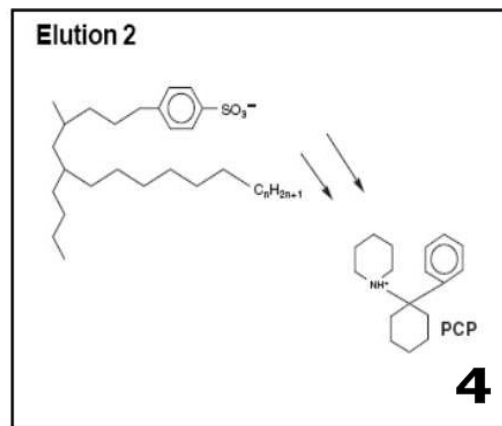
- Elution mit apolarem LM, z.B.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
  - Aufhebung der lipophilen WW
  - ionische WW der protonierten Base bleiben bestehen
- ➔ Elution der Säuren und Neutralstoffe

- Elution mit apolarem LM, z.B.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
  - Aufhebung der lipophilen WW
  - ionische WW der protonierten Base bleiben bestehen
- ➔ Elution der Säuren und Neutralstoffe

# Applikationsbeispiel Mischphase



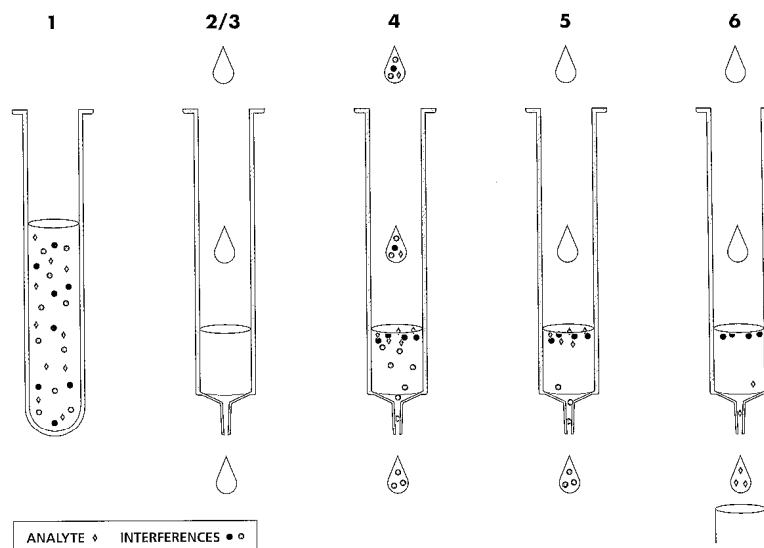
- Trocknen der Säule



- Elution der verbliebenen Basen Kationenaustauscher mit  $\text{NH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{iso-Prop.}$  (ionische und lipophile WW werden unterbunden)

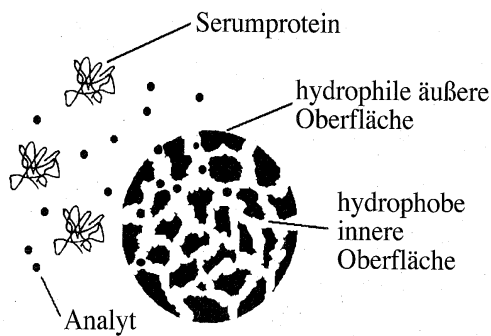
## Festphasenextraktion

### Schema der Festphasenextraktion

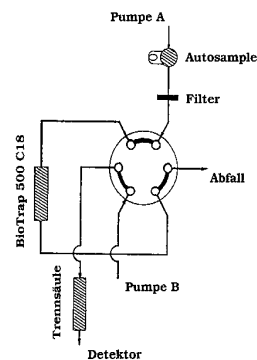


# Festphasenextraktion

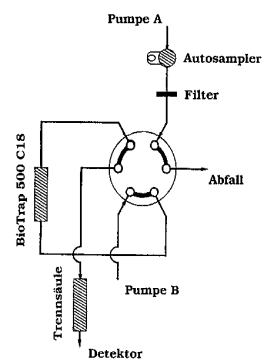
## BioTrap® oder Restricted access® Extraktionssäulen



Extraktionsstellung



Elutionsstellung



## Immunochemische Methoden

- Antigen-Antikörper-Reaktion
- Anwendung: Drug Monitoring, Vorab-Screening von Proben
- Vorteile: keine Probenaufarbeitung, einfach, schnell, empfindlich, automatisierbar
- Nachteile: Kreuzreaktivität (selektiv, aber nicht spezifisch)  
Reproduzierbarkeit (rel. SD's > 20%)

### Einteilung:

Direkte Immunoassays

- Immunkomplexe, Messung des Streulichts

Indirekte Immunoassays

- Analyt konkurriert mit markiertem Substrat

# Immunchemische Methoden

- RIA  
Radioimmunoassay  
sehr empfindlich (wenige ng/l)  
für niedrig dosierte Arzneistoffe,  
z.B. Zytokine
- EMIT  
Chemolumineszenz  
enzymemultiplied Immunoassay  
Anw. bei Methotrexat
- FPIA  
Fluoreszenz/ Polarisation  
Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay  
Anw. bei Theophyllin

Lit.: U. Jaehde et al., Lehrbuch der Klinischen Pharmazie, Wiss. Verlagsgesellschaft 1998, 2003

# Immunchemische Methoden

## Methodenvergleich

	HPLC	CE	Immunoassay
Robustheit	+	-	+
Durchführung/Bedienung	-	-	++
Empfindlichkeit	+	-	+
Selektivität	+	++	--
Probenvolumen	-	+	(-)
Reproduzierbarkeit	+	+	-
Geschwindigkeit	-	+	+
Kosten	-	+	(+)