

# Bioanalytik von Arzneistoffen

Seminar zum Praktikum „Arzneimittelanalytik“

## Agenda

### Gliederung

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

## Wichtige biologische Matrices

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

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

Antiepileptika / Antidepressiva  
Antiasthmatisches 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       $5.2 \times 10^6/\mu\text{L}$  (Mann)  
                         $4.6 \times 10^6/\mu\text{L}$  (Frau)
- Leukozyten        4000 - 10000/ $\mu\text{L}$   
                        55 - 70 % neutrophile Granulozyten  
                        2 - 4 % eosinophile Granulozyten  
                        0 - 1 % basophile Granulozyten  
                        25 - 40 % Lymphozyten  
                        2 - 6 % Monozyten
- Thrombozyten      140000 - 360000/ $\mu\text{L}$

## 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  
                         $\alpha_1$ -Globuline    3 g/L  
                         $\alpha_2$ -Globuline    7 g/L  
                         $\beta$ -Globuline       9 g/L  
                         $\gamma$ -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

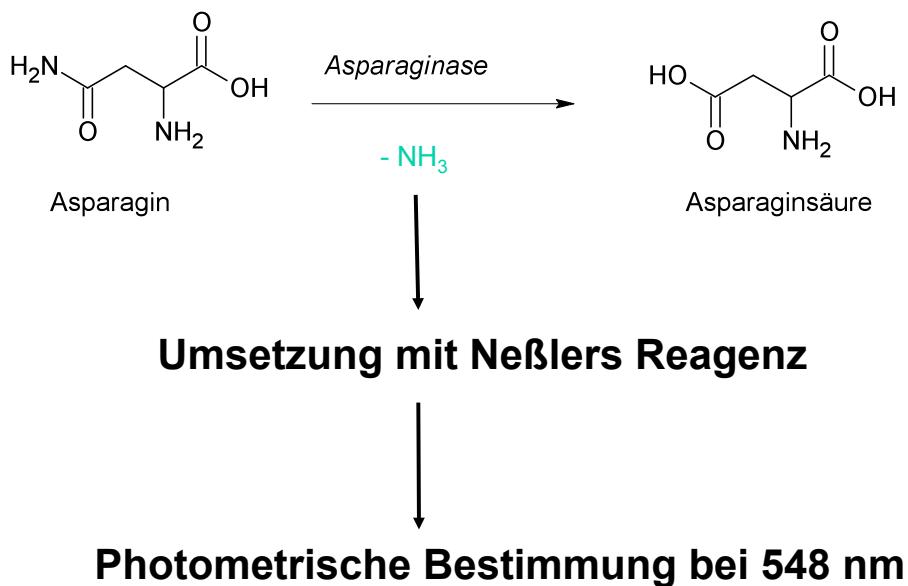
## organische Bestandteile

- 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

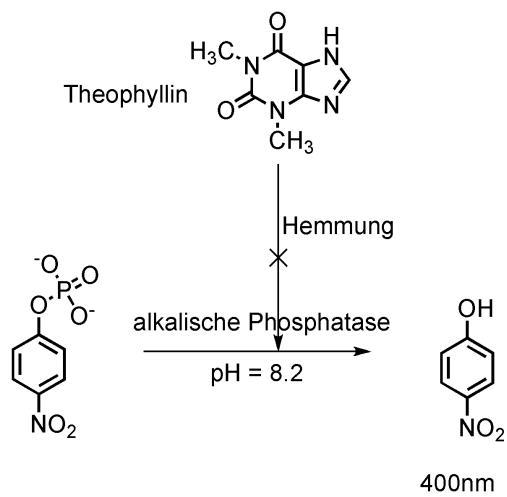
- **UV/VIS-Spektroskopie**
  - (Direkte Messung)
  - Farbreaktion (Derivatisierung) des Analyten
    - nichtenzymatisch
    - enzymatisch
  - enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbreaktion
  - enzymatische Reaktion unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup>/NADH+H<sup>+</sup>
  - Hemmung/Aktivierung einer enzymatischen Reaktion durch Analyt
- **Fluorimetrie**
  - Direkthemessung
  - Farbreaktion (Derivatisierung)

# Spektroskopische Verfahren



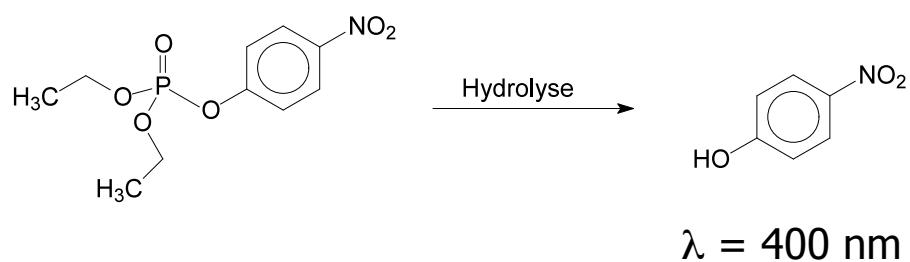
# Spektroskopische Verfahren

## 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

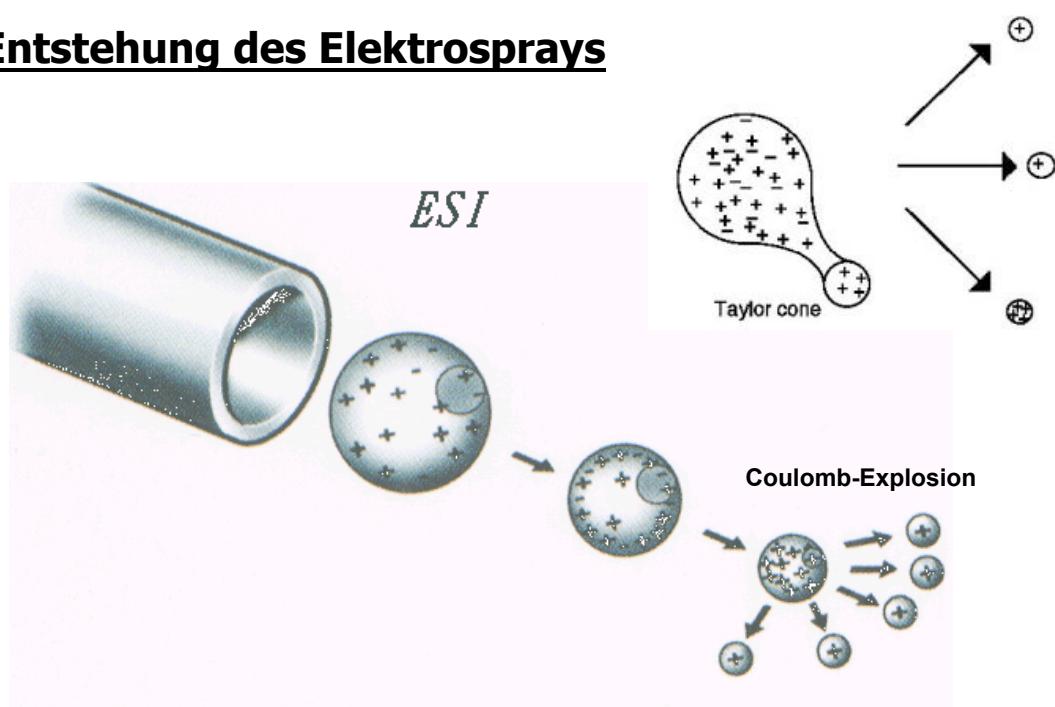
### Grundsätzliche Probleme bei LC-MS

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

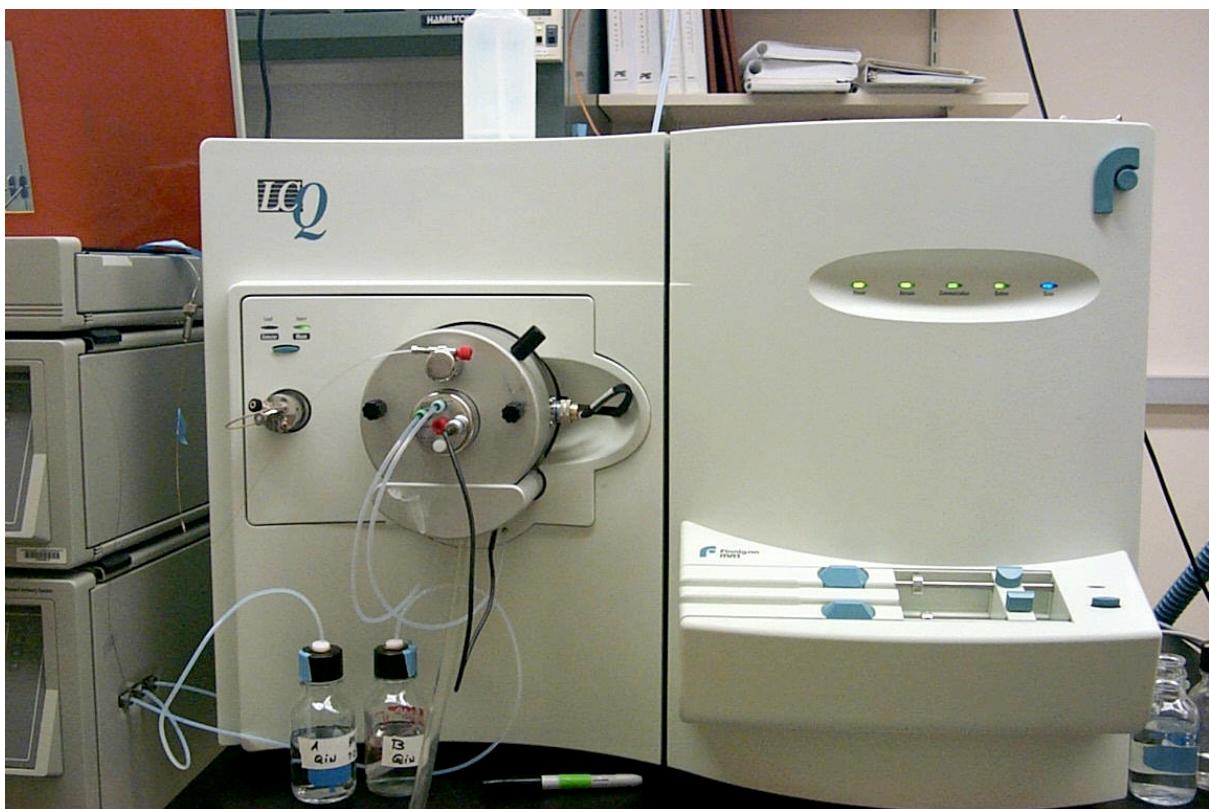
- Inkompatibilität zwischen mobiler Phase und Hochvakuum im MS-Gerät (1 ml/min einer wässrigen mobilen Phasen ergibt ein Gasvolumen von 1200 ml/min!)
- polare, non-volatile Analyten
- non-volatile Pufferzusätze (z.B. Phosphat)

# HPLC-MS-Kopplung

## Entstehung des Elektrosprays



# HPLC-MS-Kopplung



# HPLC-MS-Kopplung

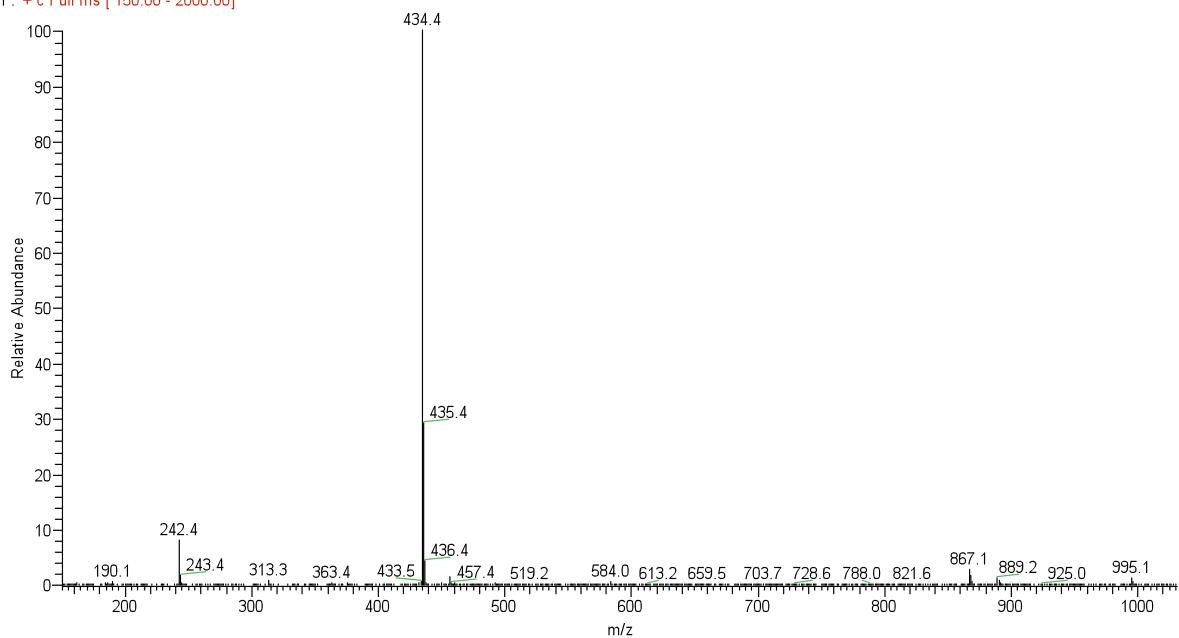
## Elektrospray Interface



# 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
    - **Kapillarzonenelektrophorese (CZE)**
    - **Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)**
    - Kapillarelektronachromatographie (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

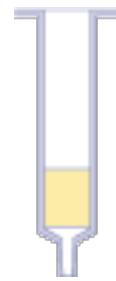
Vorteil	Nachteil
einfache Handhabung	Zeitintensiv
schlichte Geräteausstattung	hoher Lösungsmittelverbrauch
	nicht automatisierbar
	schwierige Phasentrennung
	„dreckige“ Extrakte

### 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

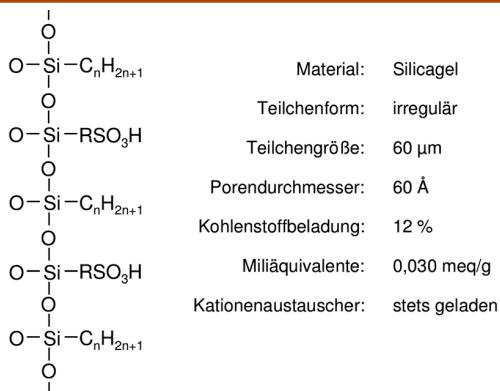


Extraktionskammer



Multi-Titerplatten-Systeme

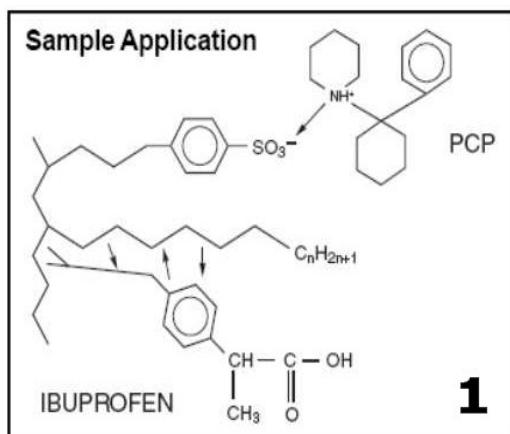
# mischfunktionelle Phasen



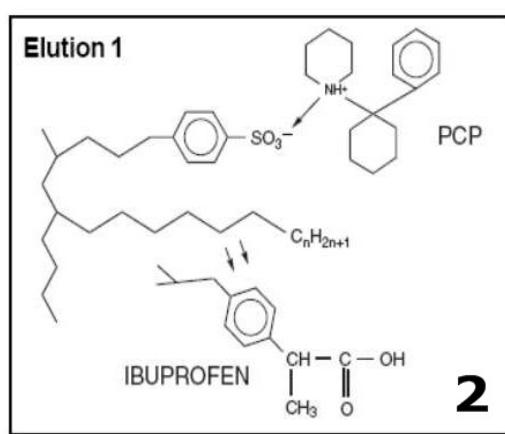
Material: Silicagel  
Teilchenform: irregulär  
Teilchengröße: 60 µm  
Poredurchmesser: 60 Å  
Kohlenstoffbeladung: 12 %  
Miliäquivalente: 0,030 meq/g  
Kationenaustauscher: stets geladen

- 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



**1**

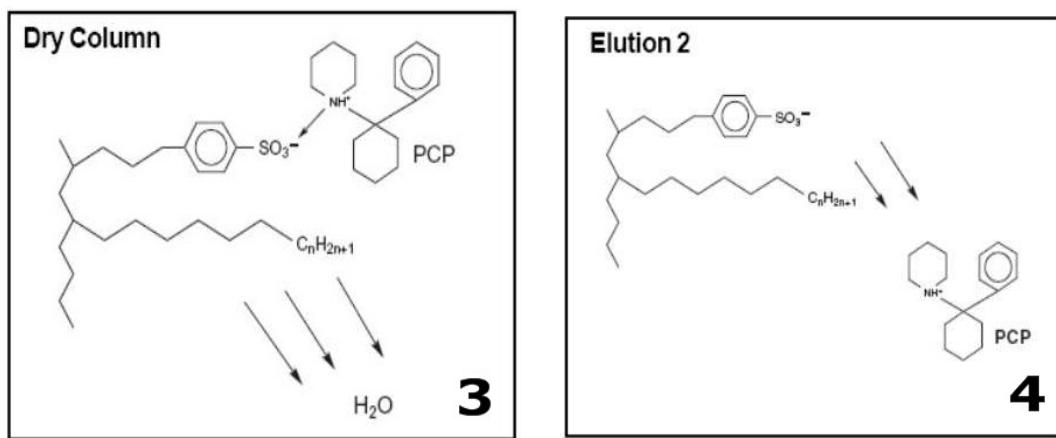


**2**

- Konditionierung der Säulen auf pH=3
- Aufgeben der Analysenlösung
- Ibuprofen ist ungeladen, bindet an RP8
- PCP liegt protoniert vor, WW mit SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

- Elution mit apolarem LM, z.B. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Aufhebung der lipophilen WW
- ionische WW der protonierten Base bleiben bestehen
- ➔ Elution der Säuren und Neutralstoffe

# Applikationsbeispiel Mischphase

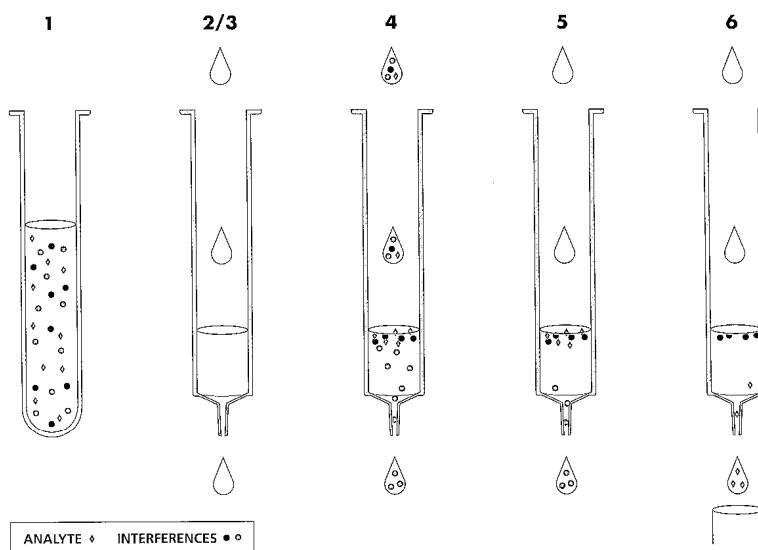


- Trocknen der Säule

- Elution der verbliebenen Basen Kationenaustauscher mit  $NH_3/CH_2Cl_2$ /iso-Prop. (ionische und lipophile WW werden unterbunden)

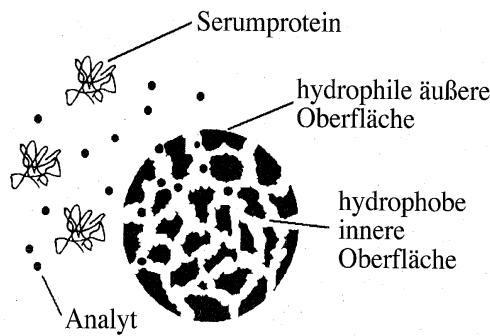
# Festphasenextraktion

## Schema der Festphasenextraktion

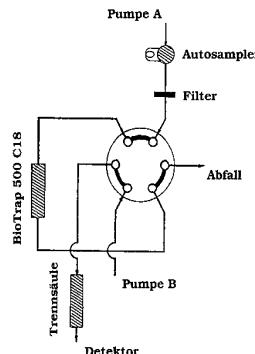


# Festphasenextraktion

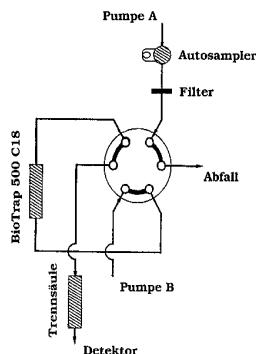
## BioTrap® oder Restricted access® Extraktionssäulen



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

# Immunoassays

- 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

# Immunoassays

## Methodenvergleich

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