



Bio-farmaceutische Bepaling van Geneesmiddelen:

Hoe doen we dit?

Deel Ia

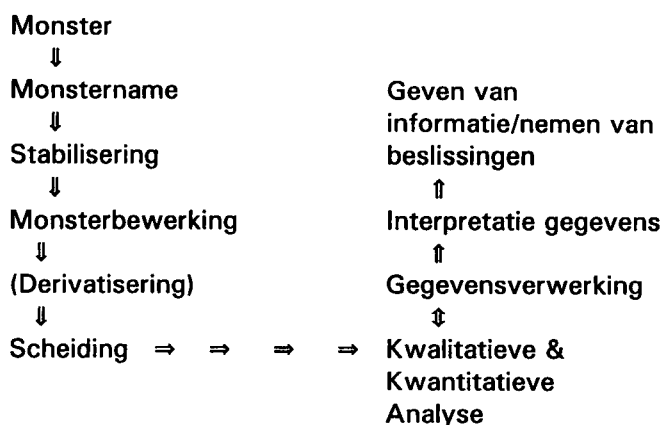
H. Lingeman, Vrije Universiteit,
Amsterdam

Het opzetten van een kwantitatieve bepalingsmethode voor geneesmiddelen in farmaceutische preparaten of biologische monsters, met behulp van een (vloeistof)chromatografische scheidingsmethode, is niet altijd zo eenvoudig als het op het eerste gezicht lijkt. Er komt vaak nogal wat bij kijken zoals bijvoorbeeld de monstername, monsterbewerking, kwaliteitsaspecten, metabolisme / ontleding en methode ontwikkeling. Daarnaast zijn de eigenschappen van de monsters (b.v. fysisch-chemische eigenschappen van zowel de analieten als van de matrix, de keuze van het monster en/of de matrix, de monstername technieken, monsteropslag / stabiliteit, de chemicaliën en containers die voor de monsterbewerking worden gebruikt, de basis apparatuur en de gebruikte technieken, de complexiteit van de monsters, de solubilisering en analiet-matrix binding) van groot belang bij het opzetten van een geschikte analytische methode.

Al deze facetten worden uitgebreid besproken in Deel IV (Monsterbewerking in de Chromatografie) van de serie 'Chromatografie in de Praktijk' die uitgegeven wordt door ten Hagen Stam in Den Haag.

In het hierna volgende artikel zal aan de hand van enkele praktische voorbeelden worden geprobeerd een beeld te scheppen hoe een chromatografische methode zou kunnen worden ontwikkeld. De gewenste achtergrondinformatie kan in de meeste gevallen worden gevonden in de genoemde serie 'Chromatografie in de Praktijk'.

MONSTER ANALYSESHEMA



Schema 1

Inleiding

In de meeste gevallen kan een biologisch of farmaceutisch monster niet rechtstreeks worden geïnjecteerd in een (vloeistof)chromatografisch systeem. Het monster zal vaak ongewenste matrixcomponenten bevatten die de scheiding en/of de detectie verstoren of het chromatografische systeem kunnen verstopen of beschadigen. Bij de bepaling van sterk werkzame geneesmiddelen of bij de bepaling van ontledingsproducten of metabolieten is de concentratie in een aantal gevallen zo laag dat het monster eerst geconcentreerd moet worden alvorens

een analyse kan worden uitgevoerd. Het gevolg is dat er één of meerdere monsterbewerkingsstappen moeten worden uitgevoerd om het monster in een geschikte vorm te brengen alvorens injectie in het (vloeistof) chromatografisch systeem kan plaatsvinden.

Iedere chromatografische methode bestaat dus uit een aantal stappen waarvan de monsterbewerking een belangrijk onderdeel is. Een overzicht van de verschillende stappen in een analyse is te zien in Schema 1. Belangrijk hierbij is dat de monsterbewerking zelf ook weer uit drie ver-

ROL VAN MONSTERBEWERKING IN CHROMATOGRAPHISCH PROCES

	Monster	Monsterbewerking	Scheiding	Detectie	Dataverwerking
Beschikbare selectiviteit	geen	weinig	redelijk	redelijk	weinig
Beschikbaar aantal vrijheids graden	geen	veel	redelijk	weinig	weinig
Kosten	n.v.t.	redelijk	redelijk	weinig tot veel	weinig tot veel

Tabel 1

schillende stappen bestaat:

- Stabilisering van het monster (b.v. voorkomen van ontleding);
- Initiële monsterbewerking (b.v. verwijderen van storende matrix componenten, oplossen);
- Selectieve monsterbewerking (b.v. concentreren, opzuiveren).

Het belang van een goede monsterbewerking kan ook geïllustreerd worden aan de hand van de selectiviteit, het aantal vrijheidsgraden en de kosten die verschillende stappen in het analytische proces met zich meebrengen. In Tabel 1 is terug te vinden dat als de juiste combinatie van technieken wordt gekozen, in het bijzonder het aantal vrijheidsgraden en de selectiviteit die beschikbaar is tijdens de monsterbewerking een extra dimensie geven aan het totale proces.

Gedurende de laatste jaren zijn er belangrijke technologische ontwikkelingen geweest op chromatografisch gebied, maar de ontwikkelingen op het gebied van de monsterbewerking zijn hierbij achter gebleven, met als resultaat dat monsterbewerking en/of -concentrerings vaak de beperkende stap is tegenwoordig. Het resultaat is dat:

- de isolering en bepaling van lage concentraties van organische verbindingen een echte uitdaging is;
- hoe lager de concentratie van de verbinding die gemeten moet worden, des te langer het duurt om een methode te ontwikkelen;
- de monsterbewerking altijd moet worden aangepast aan het uit-

eindelijke doel van de analyse;

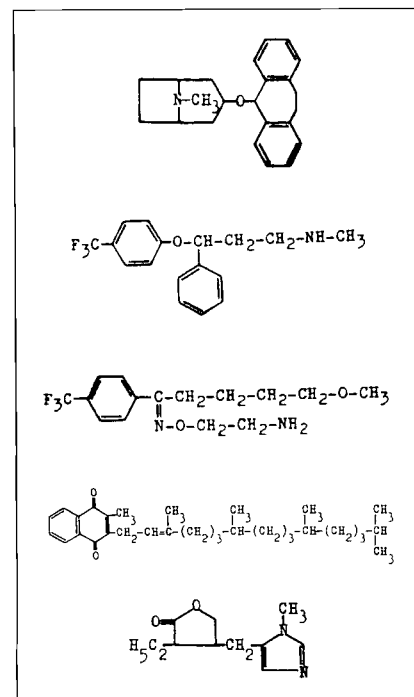
- men altijd de meest eenvoudige monsterbewerking moet kiezen die nog in overeenstemming is met het doel van de methode;
- er altijd een evenwicht moet worden gezocht tussen de selectiviteit van de monsterbewerking en die van de chromatografische analyse.

Samenvattend betekent dit dat te weinig monsterbewerking kan resulteren in storingen tijdens de analyse, maar dat te veel monsterbewerking kan resulteren in onderschatting van de mogelijkheden van de chromatografische analyse.

Aangezien als algemene trend kan worden opgemerkt dat monsters steeds complexer worden en de concentraties die bepaald moeten worden steeds kleiner, en de factoren tijd en geld een steeds grotere rol gaan spelen, wordt monsterbewerking steeds belangrijker. In dit artikel zal dan ook met name aandacht worden besteed aan de monstervoorbewerking en hoe deze op een strategische wijze kan worden aangepakt (Schema 2).

Vragen bij het Opzetten van een Bio-analytische / Farmaceutische Strategie

Het opzetten van een strategie om nieuwe (vloeistof)chromatografische (LC) methoden te ontwikkelen voor exogene verbindingen in een biologische matrix en/of geneesmiddelen in een farmaceutische bereiding zal gedaan worden aan de hand van enkele vragen en een paar prakti-



Bijlage 1. Structuurformules van boven naar beneden van deptropine, fluoxetine, fluvoxamine, fytomenadion en pilocarpine.

sche voorbeelden.

Dit betekent dat voor de bio-farmaceutische bepaling van enkele psychofarmaca / antidepressiva (b.v. fluoxetine, fluvoxamine) en enkele geneesmiddelen in een farmaceutische bereiding (b.v. mixtura deptropini citratis, guttae vitamine K₁, pilocarpine oogdruppels) getracht zal worden om een verband te leggen tussen de molecuulstructuur, fysisch-chemische eigenschappen en de bepalingsmethode.

De structuurformules van de verschillende verbindingen zijn gegeven in Bijlage 1.

DOEL MONSTERBEWERKING

- verwijderen van ongewenste of storende matrixcomponenten;
- monster in oplossing brengen vooraf gaande aan de injectie in een chromatografisch systeem;
- monsterconcentrerings voor verbeterde detectiegevoeligheid;
- verbetering van de nauwkeurigheid en precisie van de totale analyse;
- verwijdering van vaste deeltjes die het chromatografisch systeem kunnen verstopen of beschadigen;
- stabiliseren van het monster met betrekking tot hydrolyse, fotolyse, enzymatische ontleding, enz.

Schema 2

Pemphidine (25 ^a)	11.0	Proguanil (22.5 ^a)	2.3	Sulphaphenazole (27 ^a)	7.5
Penicillamine	1.8		10.4	Sulphathiazole (25 ^a)	7.1
	10.5	Promazine (25 ^a)	9.4	Sulphipyrizone (22 ^a)	2.8
	7.9	Promethazine (25 ^a)	9.1	Talbutal (20 ^a)	7.9
Pentazocine (20 ^a)	8.0	Propicillin (25 ^a)	2.7	Tartaric Acid (25 ^a)	3.0
	10.0	Propofol			4.4
Pentobarbitone (20 ^a)	8.0	Propyl Hydroxybenzoate	9.5	Taurine (25 ^a)	1.5
Perphenazine (24 ^a)	7.8	(22 ^a)	8.4	Terbutaline (20 ^a)	10.0
Petidine (10 ^a)	6.5	Propylthiouracil (25 ^a)	8.7		11.0
Phenadoxone	6.9		10.3		
Phenazone (25 ^a)	1.5	Propylthiopyridine (25 ^a)	2.3	Tetracycline (25 ^a) (acidic)	3.3
Phenethazine	7.6	Pseudoephedrine	1.0	(acidic)	7.7
Phenethylamine (25 ^a)	2.7	Pyranol	11.0	(basic)	10.0
Phenofarma (32 ^a)	2.7	Pyridoxine (25 ^a) (—N=)	5.0	Tetramisole (20 ^a)	7.8
	11.8	(—OH)	9.0	Thebaine (20 ^a)	8.2
Phenindamine (25 ^a)	7.8	Pyrimethamine (20 ^a)	7.0	Thiethylamine (25 ^a)	8.9
Pheniramine	4.2	Pyrobutamine (25 ^a)	8.8		
(25 ^a)	9.3	Quinalbarbitone (20 ^a)	7.9	Thiobromine (25 ^a)	<1
Phenmetrazine (25 ^a)	8.4	Quinidine (25 ^a)	4.2		
Phenobarbitone (25 ^a)	7.4		4.1	Theophylline (25 ^a)	<6
Phenol (25 ^a)	10.0	Quinine (20 ^a)	4.2		10.6
Phenolphthalein (25 ^a)	9.7		8.5	Thiamine (20 ^a)	7.8
Phenoxymethylpenicillin (25 ^a)	10.1	Reserpine (20 ^a)	7.6	Thiopentone (20 ^a)	4.6
	9.1	Resorcinol (20 ^a)	9.5	Thiorazine (24 ^a)	7.3
Phenylbutazone (20 ^a)	4.4		10.1	Thioridazine (25 ^a)	2.1
Phenylephrine (20 ^a) (—OH)	8.9	Riboflavin (20 ^a)	19.9	Thionylamine (25 ^a)	2.9
(—NH ₂)	10.1		10.2		
Phenylmercuric Nitrate (20 ^a)	3.3	Riboflavin Phosphate		Tolazoline (20 ^a)	10.6
Phenylmethyldibutylbarbitic Acid		(Sodium Salt) (20 ^a)	10.5	Tolbutamide (25 ^a)	5.3
(25 ^a)	7.7			Tranexamic Acid (20 ^a)	4.5
Phenylpropanolamine (20 ^a)	9.4				
Phenylthioaxamide	7.1	Saccharin (25 ^a)	1.6	Triacetylpromine	8.2
Phenyltolin (—OH)	8.3	Salicylic Acid (25 ^a)	3.0	Triamterene	2.6
Phloretin (17 ^a)	8.0		13.4	Trichloroacetic Acid (25 ^a)	<1
		Sechubarbitone (20 ^a)	8.0	Trichloromethane (25 ^a)	7.8

spectroscopische eigenschappen zijn opgenomen. In de 'Martindale' is een tabel opgenomen waarin pKa waarden gevonden kunnen worden, terwijl in 'Clarke' gegevens over oplosbaarheid, analyse en detectie gevonden kunnen worden (zie bijlage 2 op pagina 11).

De 'Merck index' geeft vanzelfsprekend uitgebreide informatie omtrent de naam, formule, molecuulgewicht, voorkomen van zouten, pKa, oplosbaarheid, stabiliteit, etc. van de verbinding.

Een aantal van deze vragen zullen nu wat verder worden uitgewerkt aan de hand van de voorbeelden:

In met name de Merck index, maar ook in de andere genoemde handboeken zijn de volgende gegevens over *Deptropine* te vinden:

Chemical

Abstracts: 3-(10,11)-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepteen-5-yloxy)tro-paan
Brutoformule: C₂₂H₂₇NO
Molecuulgewicht: 333,5
Zouten: diwaterstofcitraat
Voorkomen: wit / kristallijn
pKa: 9,7 - 9,9
Oplosbaarheid: zeer slecht in water en alcohol, niet in ether en chloroform

over *Vitamine K1* zijn de volgende gegevens te vinden:

Chemical

abstracts: 2-methyl-3-(3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl)-1,4-naftochinon
Brutoformule: C₃₁H₄₆O₂
Molecuulgewicht: 450,7
Voorkomen: geel/visceus/olie
pKa: ?
Oplosbaarheid: onoplosbaar in water, 1:70 in alcohol, gemakkelijk oplosbaar in ether

Bewaren: en chloroform
buiten invloed van licht

en over *Pilocarpine* is tot slot het volgende te vinden:

Chemical

abstracts: (+)-5-[4-ethyl-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-3-furyl)-methyl]-1-methyl-imidazol
Brutoformule: C₁₁H₁₆N₂O₃
Molecuulgewicht: 208,3
Zouten: hydrochloride, nitraat
Voorkomen: kleurloze kristallen of olie
pKa: 7,2 / 12,6
Oplosbaarheid: oplosbaar in water, ethanol, ether en chloroform
Stabiliteit: hydrolyse pH > 8

A Hoe te beginnen! Het opzoeken van de structuurformules, algemeen gangbare namen, officiële naam en molecuulgewicht kan gebeuren in de bovengenoemde handboeken. Belangrijk is hierbij dat de officiële naam (chemical abstracts naam) informatie geeft over welke groepen er in het molecuul aanwezig zijn, maar dit is bijna nooit de naam waaronder de verbinding bekend is. Daarom is het ook belangrijk de algemeen gebruikelijke namen op te zoeken. Hierbij is het weer belangrijk dat in een aantal gevallen de Engelse literatuur een andere naamgeving gebruikt dan de Amerikaanse. Acetaminophen en paracetamol is bijvoorbeeld dezelfde verbinding, hetzelfde geldt voor adrenaline en epinephrine. Verder is in de naam terug te vinden of een verbinding een chiraal centrum (b.v. pilocarpine) heeft. Belangrijk is om te onthouden dat in verschillende boeken verschillende namen voor dezelfde verbinding worden gebruikt en dat het daarom noodzakelijk is om altijd via de index verbindingen op te zoeken.

De structuur van de verbinding is

met name van belang voor de functionele groepen die aanwezig zijn en voor de zuur / base eigenschappen. Deze eigenschappen zullen onder het 'hoofdje' functionele groepen worden besproken.

Het molecuulgewicht lijkt in eerste instantie niet zo belangrijk te zijn. Dat is het ook niet zolang het molecuulgewicht < 500 is. Echter bij verbindingen met een molecuulgewicht > 500, kunnen er problemen ontstaan indien de monsterbewerking wordt uitgevoerd met vaste stof-vloeistofextractie (SPE) of bij de LC, omdat het dan in een aantal gevallen belangrijk is om sorbentia (stationaire fase) te gebruiken met grotere poriën. Dit betekent weer dat het belangrijk is dat indien eiwitten en andere macromoleculen niet kwantitatief worden verwijderd tijdens de monsterbewerkingsprocedure, het noodzakelijk is om andere LC kolommen te gebruiken.

Dit probleem doet zich voor indien gebruik gemaakt wordt van speciale kolommen die geschikt zijn voor de directe injectie van eiwit bevattende monsters. Bij deze zogenaamde 'Restricted Access Materials (RAM)' worden inderdaad fasen met grotere poriën gebruikt om allerlei verstoppingen te voorkomen.

Misschien wel het belangrijkste gegeven dat uit de naam / structuur van een verbinding kan worden gehaald is het feit of er zouten van deze verbinding bekend zijn. Bijvoorbeeld van deptropine is het diwaterstofcitraat bekend en van pilocarpine zijn het hydrochloride en nitraat zout bekend. Aan de andere kant is van fenobarbital het natrium zout bekend.

In het algemeen kan gesteld worden dat een verbinding waarvan een zout bekend is, dat is afgeleid van een zuur (b.v. hydrochloride, nitraat, sulfaat, citraat, formiaat, maleaat, tartraat, succininaat) zelf een base is, en dat deze verbinding dus in zuur milieu positief geladen zal zijn. Een verbinding waarvan een zout bekend is, dat is afgeleid van een

base (b.v. natrium, kalium, magnesium, calcium) is zelf een zuur, hetgeen betekent dat deze verbinding in basisch milieu positief geladen zal zijn. Bij welke pH de verbindingen nu precies geladen of ongeladen zijn hangt af van de pKa van de verbinding (zie Sectie C).

Meestal zijn er zouten van een verbinding bekend als de moederverbinding slecht of relatief slecht in water oplosbaar is en zijn de overeenkomstige zouten, in principe, beter oplosbaar in water.

B Voorkomen, kleur en geur van een verbinding! Het uiterlijk van een verbinding geeft een aantal belangrijke aanwijzingen over de technieken die gebruikt kunnen worden en over problemen die zich tijdens de analyse kunnen voordoen. Aan de hand van dezelfde voorbeelden zal dit worden verduidelijkt.

Deptropine is een wit kristallijne verbinding. Dat het een witte verbinding is betekent dat deze analiet in het ultra-violet (UV) gebied van het spectrum licht zal absorberen en niet in het zichtbare gedeelte, dus indien LC met absorptiedetectie wordt toegepast zal een golflengte

van < 350 nm moeten worden gekozen. Het is een vaste kristallijne stof verbinding. Dit betekent dat de verbinding bij kamertemperatuur waarschijnlijk stabiel zal zijn en dat het monster dus waarschijnlijk zonder problemen ingedampt of drooggedampt kan worden.

Vitamine K1 is een gele visceuze olie. De verbinding heeft een gele kleur, dit betekent dat het licht zal absorberen in het zichtbare gedeelte van het spectrum, namelijk bij de complementaire kleur van geel. Het is een olie, afwegen van een monster kan dus op problemen stuiten, maar belangrijker is dat er problemen kunnen optreden met de stabiliteit van de verbinding. Dit laatste blijkt ook inderdaad het geval te zijn want onder het 'hoofdje' bewaren is te vinden 'buiten invloed van licht'. Deze opmerking kan een tweetal dingen betekenen: vitamine K1 zou kunnen oxyderen onder invloed van de zuurstof die in de lucht aanwezig is of het zou kunnen ontleden onder invloed van de UV straling die in zon- of kunstmatig licht aanwezig is. De monsters moeten dus in het donker worden bewaard, kunnen niet zondermeer worden ingedampt of

drooggedampt en ook tijdens de monsterbewerking en verdere analyse kan het zijn dat het monster afgeschermd moet worden van direct licht.

Bij pilocarpine komen we nog een ander probleem tegen. Bij stabiliteit staat gegeven dat de analiet hydrolyseert bij een pH >8. Dit betekent dat bijvoorbeeld een vloeistof-vloeistofextractie (LLE), SPE of LC scheiding uitgevoerd moet worden bij een pH van 7 of lager, dit om te voorkomen dat de verbinding tijdens de monsterbewerking of de analyse ontleedt.

Hydrolyse reacties vinden meestal plaats in water, maar ook in andere oplosmiddelen die protonen kunnen donoren, zoals methanol en ethanol, kunnen hydrolyses optreden. Dit betekent dat het oplosmiddel waarin de stamoplossingen worden bereid en bewaard met grote zorg gekozen moeten worden en dat de stabiliteit altijd moet worden gecontroleerd.

Een algemene regel is dat oplossingen het beste in het donker en in de koelkast kunnen worden bewaard.

(Wordt vervolgd)