

Wahlqualifikationseinheit lfd. Nr. 25

„Durchführen pharmakokinetischer Arbeiten“

Laut Ausbildungsrahmenplan zu vermittelnde Fertigkeiten und Kenntnisse:

- a) Körperflüssigkeiten gewinnen und aufarbeiten
- b) Wirkstoffe in Körperflüssigkeiten bestimmen
- c) Metaboliten von Wirkstoffen bestimmen
- d) Kinetiken durchführen

Beispiel für eine betriebliche Umsetzung

Gliederung der Umsetzungshilfe

- [Organisatorische und sicherheitstechnische Hinweise](#)
- [Übersicht über die vermittelten Praxis- und Theorieinhalte](#)
- [Verwendete Materialien / Medien](#)
- [Arbeitsanweisungen und Hinweise für den Ausbilder](#)

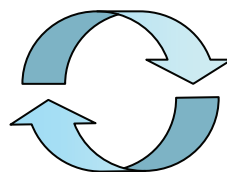
Weitere Hinweise

Die in dieser Umsetzungshilfe genannten Inhalte werden für alle Auszubildenden eines Lehrjahres im Ausbildungslabor vermittelt und durch die Aufenthalte in den einzelnen Forschungsabteilungen vertieft und geübt.

Arbeitsanweisungen werden nicht für alle Versuchsteile eingesetzt, sondern die durchzuführenden Praxisinhalte werden teils auch gemeinsam entwickelt. Zur Weiterentwicklung der Organisationsfähigkeit und der Informationsbeschaffung erarbeiten die Auszubildenden Teile des Versuchs anhand zielführender Fragen selbständig.

Betrieb

Ausbildungsrahmenplan Nr. 25



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 10](#)

Organisatorische Hinweise

Dieser Wahlbaustein baut auf grundlegenden Kenntnissen im Bereich der Arbeit mit Tieren auf. Der Versuch muss in der Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums genehmigt worden sein.

Zur Recherche der benötigten Informationen sind ein PC mit Internetanschluss und/oder entsprechende Literatur notwendig.

Der Versuch ist so aufgebaut, dass er mit minimalem apparativem Aufwand durchgeführt werden kann. Das Hauptaugenmerk liegt nicht auf der Steuerung einer komplexen HPLC-Anlage, sondern in der selbständigen Erarbeitung des Tierversuchs, der Aufarbeitung der Proben und einer einfachen Trennung. Somit wird auch nur eine einfache HPLC-Anlage bestehend aus Pumpe, Probenventil, Säule, UV-Detektor und Schreiber vorausgesetzt.

Bei der Arbeitssicherheitsunterweisung müssen der Umgang mit Hochdruckapparaturen, Verwendung und Entsorgung von Lösemitteln und die Vorschriften bei Arbeiten mit Tieren und mit Körperflüssigkeiten beachtet werden.

**Theoretische und praktische Inhalte zur
Wahlqualifikationseinheit lfd. Nr. 25
„Durchführen pharmakokinetischer Arbeiten“**

a) Körperflüssigkeiten gewinnen und aufarbeiten

Theorie: Wiederholung Probennahme, Lagerung von Proben

Praxis: Retrobulbäre Blutentnahme, Gewinnung von Serum, Ausfällen der Proteine und Ausschütteln der organischen Bestandteile in Ethylacetat

**b) Wirkstoffe in Körperflüssigkeiten bestimmen
und**

c) Metaboliten von Wirkstoffen bestimmen

Theorie: Einführung in die HPLC, Aufbau einer HPLC, Eluentensysteme, Säule und Säulenmaterialien, Kenngrößen, Auswertung von Chromatogrammen.

Praxis: Erarbeiten eines Trennungssystems (RP, RT, isokratisch, MetOH/H₂O), Erstellen einer Kalibriergeraden von Phenacetin/Paracetamol im Leerserum.

d) Kinetiken durchführen

Theorie: Wiederholung der Kenngrößen der Pharmakokinetik aus dem Anfangsunterricht Pharmakologie. Erarbeitung von Zeitschema und Dosierung durch die Azubis, Recherche im Internet zu Phenacetin und Paracetamol.

Praxis: Durchführung eines Tierversuchs: Applikation von Phenacetin, Gewinnung von Serum zu bestimmten Zeiten, Messung des Serumspiegel von Phenacetin und Paracetamol mittels HPLC nach den in a)-c) erarbeiteten Vorgehensweisen. Auswertung der Messwerte und Darstellung der Ergebnisse in Excel.

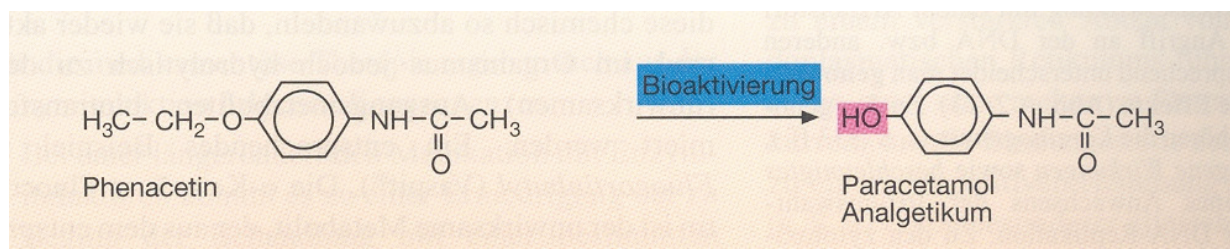
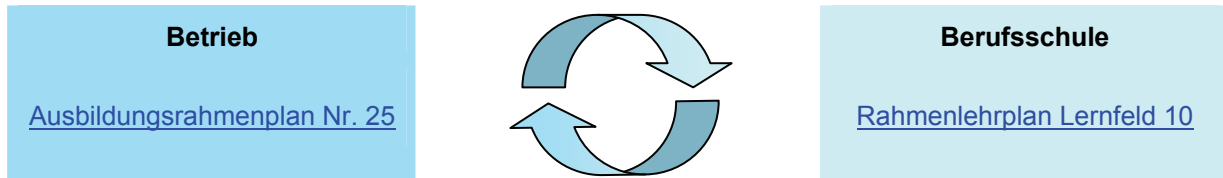
Tiere, Materialien und Geräte:**Tierversuch:**

- Ratten, zu Beginn des Versuchs nüchtern
- Narkoseplätze für kurzzeitige Inhalationsnarkose
- Tupfer
- Kapillaren
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Tischzentrifuge
- Satz Eppendorf-Pipetten mit Spitzen
- Kühlschrank

HPLC:

- HPLC-Anlage
- Methanol, HPLC-grade
- Ethylacetat, HPLC-grade
- Hochreines Wasser, HPLC-grade
- Filtrationseinheit und Filter zur Entgasung des Laufmittels
- Schüttler
- (Hamilton)spritze zur Probenaufgabe am Probenventil
- Vorrats- und Abfallgefäße für Laufmittel

Nachweis von Phenacetin und dessen Metaboliten Paracetamol in Rattenserum mittels HPLC



Phenacetin wurde früher als Analgetikum verwendet. Auf Grund seiner hohen Nierentoxizität wurde nach einer verträglicheren Alternative gesucht, die als Paracetamol bekannt geworden ist. Die Hauptwirkung des Phenacetins wird heute Paracetamol zugeschrieben, zu dem Phenacetin in der Leber umgewandelt (metabolisiert) wird.

Arbeitsauftrag:

- (1) Machen Sie sich im Team anhand der Gerätebeschreibungen mit der **HPLC-Anlage 1** vertraut.
- (2) Recherchieren Sie im Internet die Prinzipien der Trennung an RP-Phase Chromatographie-Säulen.
- (3) Recherchieren Sie im Internet die Sicherheitsdatenblätter für Phenacetin und Paracetamol, sowie die pharmakologischen und pharmakokinetischen Kennzahlen der beiden Wirkstoffe.
- (4) Wählen Sie eine Dosis für Phenacetin, bei der **keine toxischen Effekte** zu erwarten sind!
- (5) Erarbeiten Sie ein Versuchschemata, in dem Sie die Dosierung, Applikation und Blutentnahmen festhalten.
- (6) Wählen Sie eine geeignete Laufmittel - Zusammensetzung (Methanol/Wasser), mit der Sie anhand der Kenndaten der Chromatogramme eine gute Trennung der erwarteten Komponenten (Wirkstoff, Metabolit, Extraktionsmittel) in angemessener Zeit (< 10 min je Trennvorgang!) erreichen.
- (7) Dotieren Sie Null-Serum mit Phenacetin und Paracetamol, und erstellen Sie eine Kalibriergerade für den Konzentrationsbereich, in dem die Substanzen im Tierversuch zu erwarten sind.
- (8) Besprechen Sie das gewählte Trennverfahren, die Probenvorbereitung und die Planung des Tierversuchs mit dem betreuenden Ausbilder.

- (9) Durchföhierung des Tierversuchs, Bestimmung der Wirkstoff- und Metabolitkonzentrationen, Auswertung.
- (10) Bereiten Sie eine 10-minütige. Präsentation vor, in der Sie den anderen Arbeitsgruppen Ihren Versuch und die Ergebnisse präsentieren. Formulieren Sie neben den erzielten Erfolgen auch die Schwierigkeiten und Ihre Lösungsvorschläge!

Durchföhierung:

1. Tierversuch

Einer Ratte wird per os Phenacetin verabreicht. Da Phenacetin sich nicht vollständig in Wasser löst, wird der Wirkstoff zu einer 1%igen Thylose-suspension aufbereitet, um eine reproduzierbare Applikation zu ermöglichen.

Der Ratte wird in festgelegten Zeitabständen retrobulbär Blut abgenommen und Serum gewonnen.

2. HPLC

2.1. Probenaufarbeitungen

Serum wird in Eppendorfreaktionsgefäßen mit **gesättigter Ammoniumsulfatlösung** und **Essigsäureethylester (Ethylacetat)**

5 min geschüttelt und dann 10 min in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert.

Es müssen sich zwei Phasen bilden. Die überstehende organische Lösung wird sorgfältig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß abgefüllt. (Lagerung im Kühlschrank, falls nicht sofort die Analyse erfolgt.)

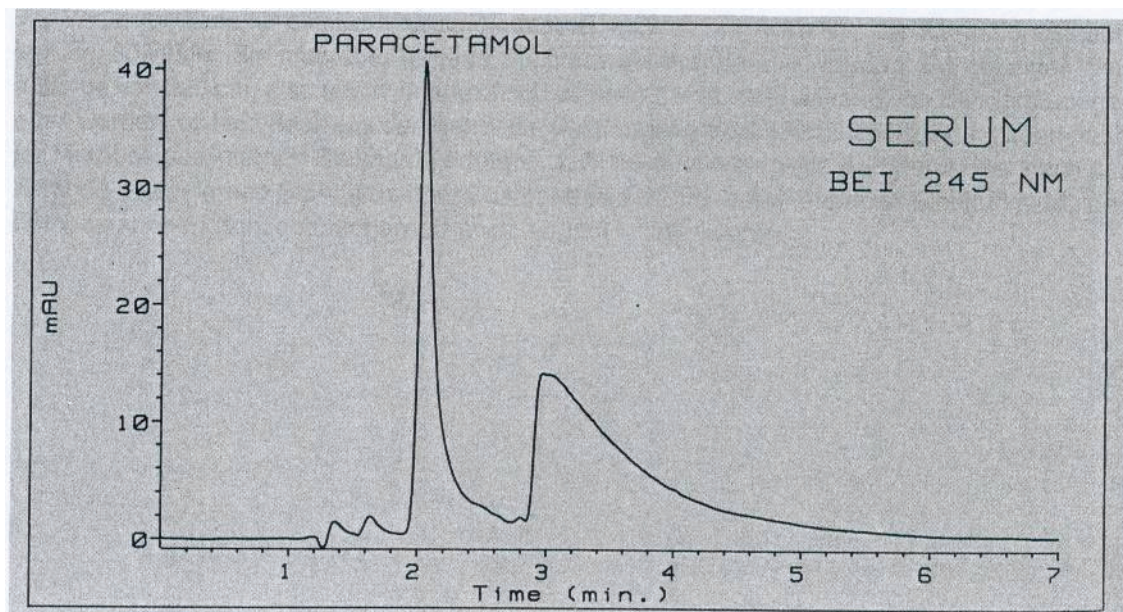
Phenacetin und Paracetamol werden nach Bedarf eingewogen und in Methanol (HPLC-grade) gelöst. Für die Verdünnung der beiden Standard-Substanzen sind jeweils nur Pipetten zu verwenden, die ausschließlich für eine Substanz gekennzeichnet werden!! Verschleppung ist ein ernsthaftes Problem!

2.2. Chromatographiebedingungen

Säule:	Standard RP C-18, 5 µm (125x4 mm)
Fließmittel:	Wasser/Methanol (??) (V/V)
Flussrate:	? ml/min
Detektor:	UV 245 nm
Dosiervolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	RT

2.3. Mögliche Ergebnisse:

Die Abbildung zeigt das Chromatogramm eines Serums mit 20 µg/ml Paracetamol. Es können ohne weiteres noch Konzentrationen von 1 µg/mL erfasst werden. Der nachfolgende Peak wird durch den Essigester verursacht. Dieser stört die Bestimmung aber nicht. Die quantitative Bestimmung wird nach der Methode des externen Standards mit dotierten Serumproben durchgeföhrt, die immer parallel chromatografiert werden. Es ist so eine Kontrolle der Extraktion möglich.



3. Auswertung:

- Grafik des Konzentrationsverlaufs der beiden Wirkstoffe im Serum über der Zeit.
- Diskussion der Ergebnisse. Erstellen von Verbesserungsvorschlägen.