

# Analyse und Bewertung chiraler Arzneimittel in biologischen Proben

Gesa Schad

Shimadzu Europa GmbH

Projekte in Arzneimittelforschung und -sicherheit verfolgen die Entwicklung von neuen und sichereren Arzneimitteln, Therapeutika und Diagnostika. Im Verlauf der Entwicklung aktiver pharmazeutischer Wirkstoffe (API = active pharmaceutical ingredient) spielen Stereoisomere eine wichtige Rolle mit medizinischen und regulativen Auswirkungen. So haben Enantiomere im Wesentlichen identische physikalische und chemische Eigenschaften, zeigen aber dennoch potenziell große Unterschiede in der Toxizität.

Die stereoisomere Zusammensetzung eines Arzneimittels mit einem chiralen Zentrum sollte daher gut dokumentiert werden. Um die Pharmakokinetik eines einzelnen Enantiomers oder einer Enantiomerenmischung zu beurteilen, müssen die Hersteller schon in frühen Stadien der Arzneimittelentwicklung quantitative Tests für die einzelnen Enantiomere schaffen.

Eine der Herausforderungen bei chiralen Trennungen besteht darin, dass Enantiomere die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften aufweisen, so dass sie sich nur in einer chiralen Umgebung trennen lassen.

Für chromatographische Trennungen sind chirale stationäre Phasen verfügbar, die es erlauben, Stereoisomere zu trennen. Um jedoch die stationäre Phase mit der optimalen Selektivität für das jeweilige chirale Trennproblem zu bestimmen, werden gewöhnlich Screening-Läufe durchgeführt, die mehrere chirale Säulen gleichzeitig untersuchen. Die Normalphasen-HPLC ist oft die Methode der Wahl, allerdings erweist sich heutzutage die SFC (superkritische Flüssigkeitschromatographie) häufig als die überlegene Technik.

Dieser Artikel beschreibt ein Beispiel für Selektivität und Empfindlichkeit bei der Medikamentenspiegelüberwachung in einer biologischen Probe. Ebenso zeigt er die Auswertungsergebnisse der analytischen Methode als Anwendungsbeispiel für die pharmakokinetische Erforschung chiraler Arzneimittel

mit Hilfe der SFC/MS/MS – im Anschluss an die Auswahl einer geeigneten Säule.

## Analyse von Omeprazol in einer Blutplasmaprobe

Die Eignung von SFC für die Bestimmung von Arzneimittelkonzentrationen in menschlicher Plasma-Matrix wurde anhand des enantiomeren Medikaments Omeprazol, ein sehr bekannter Protonenpumpeninhibitor, als Beispiel untersucht. Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur von Omeprazol. Für die Aufarbeitung der Blutplasmaprobe wurden 20 µl Plasma mit 250 µl Acetonitril zur Proteinfällung gemischt. Der Überstand wurde mit 28 %-iger wässriger Ammoniaklösung alkalisiert. 3 µl der sich ergebenden Probenlösung wurden zur Analyse injiziert. Die Untersuchungsbedingungen für die SFC-MS/MS Analyse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Während eines vorausgegangenen Säulen-Screenings war die Daicel CHIRALPAK® IC-3-Analysesäule als die geeignetste Trennsäule ermittelt worden. Die Messung wurde mit einem Shimadzu LCMS-8050-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt (Abbildung 2).

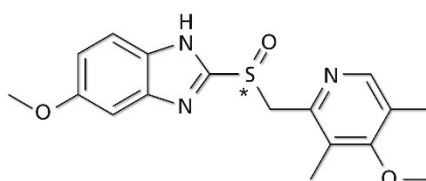


Abb. 1: Struktur und chirales Zentrum von Omeprazol.



Abb. 2: Das Nexera UC SFC-MS-System

Tab. 1: Analysebedingungen

Säule	CHIRALPAK®, IC-3 (100 × 3,0 mm, 3 µm)
Mobile Phase	CO <sub>2</sub> / Methanol (80 : 20 v/v)
Flussrate	3 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	3 µl
BPR-Druck	10 MPa
BPR-Temperatur	50 °C
Detektor	LCMS-8050 (ESI, MRM mode)
Make-up Lösemittel	Methanol
Make-up Flussrate	0,1 ml/min

Eine Kalibrationskurve wurde mit menschlichen Plasmaproben erstellt, die 1, 2, 10, 20 und 100 µg/l eines Omeprazolstandards enthielten. Abbildung 3 zeigt die MRM-Chromatogramme der mit 2 µg/l bzw. 20 µg/L versetzten Proben und die gute Trennung der zwei Omeprazol-Enantiomere (A) und (B). Die Linearität der Kalibration betrug für beide Isomere R<sup>2</sup> > 0,99.

Die Methode erzielte eine gute Reproduzierbarkeit, welche mit fünf Injektionen einer 2 µg/l Probe getestet wurde. Es ergaben sich

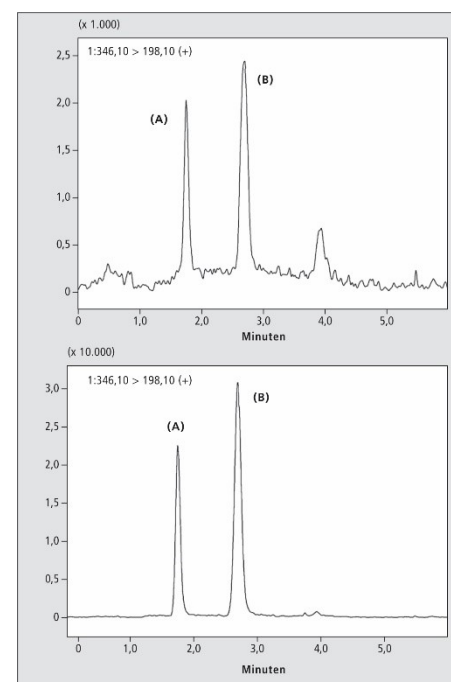


Abb. 3: Chromatogramm einer Plasmaprobe versetzt mit a) 2 µg/l und b) 20 µg/l Omeprazol analysiert mit Nexera UC-MS/MS

RSD-Werte der Peakfläche von 4,4 % für beide Omeprazol-Enantiomere (A) und (B). Die Wiederfindung wurde anhand einer 10 µg/l Probe im Vergleich zur Analyse der Stammlösung ermittelt. Wiederfindungsraten von 101,1 % bzw. 100,5 % wurden ermittelt.

#### Analyse von Rabeprazol in einer Plasmaprobe

Das als Inhibitor der Magensäuresekretion bekannte Rabeprazol besitzt eine ähnliche chemische Struktur wie Omeprazol, was die Möglichkeit einer erfolgreichen chiralen Trennung unter ähnlichen Analysebedingungen vermuten lässt. Rabeprazol wurde daher in einer Plasmaprobe analysiert, indem die gleichen analytischen Bedingungen eingesetzt wurden wie sie im vorangehenden Abschnitt für Omeprazol beschrieben wurden. Die chemische Struktur von Rabeprazol ist in Abbildung 4 wiedergegeben, woraus sich die strukturelle Ähnlichkeit zu Omeprazol leicht erkennen lässt.

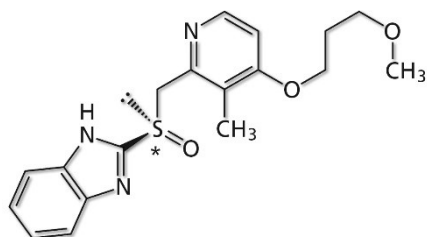


Abb. 4: Struktur und chirales Zentrum von Rabeprazol

Die Kalibrationskurve wurde mit menschlichen Plasmaproben erzeugt, die 0,3, 1, 3, 10 und 30 µg/l des Rabeprazol-Standards enthielten. Abbildung 5 zeigt die MRM-Chromatogramme der mit 3 µg/l bzw. 30 µg/l versetzten Proben. Die beiden Rabeprazol-Enantiomere (A) und (B) sind gut getrennt. Die Linearität der Kalibration betrug für beide Isomere  $R^2 > 0,99$ .

Die Methode war gut reproduzierbar, was anhand von fünf Injektionen einer 10 µg/l Probe und resultierenden RSD-Werten der Peakfläche von 1,8 % und 2,4 % für Rabeprazol (A) bzw. (B) gezeigt wurde. Die Wiederfindung betrug verglichen mit der Analyse der Stammlösung 102,5 % und 100,1 %. Tabelle 2 fasst Linearität, Peakflächenreproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate für jede Verbindung zusammen. Diese Ergebnisse belegen die Eignung dieser Methode für die praktische Analyse von Plasmaproben.

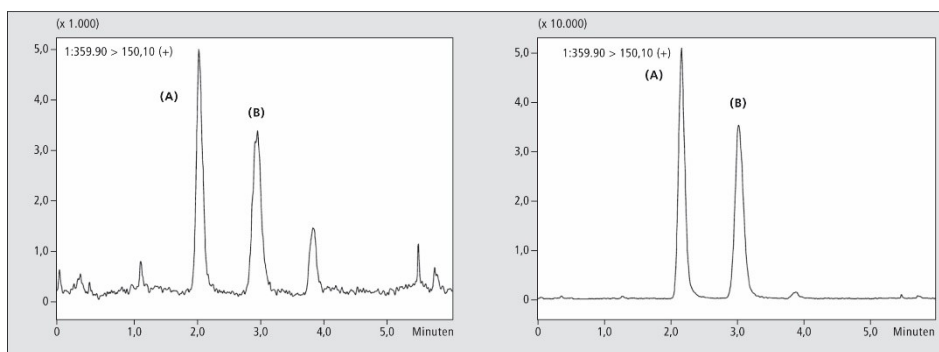


Abb. 5: Chromatogram einer Plasmaprobe versetzt mit a) 3 µg/l und b) 30 µg/l Rabeprazol analysiert mit Nexera UC-MS/MS

Tab. 2: Linearität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate der Analyse von Omeprazol und Rabeprazol in Plasmaproben

	Linearität ( $R^2$ )	Reproduzierbarkeit (% RSD Peakfläche)	% Wiederfindungsrate (4)
Omeprazole (A)	0,99996 (1)	4,4 (3)	101,1
Omeprazole (B)	0,99998 (1)	4,4 (3)	100,5
Rabeprazole (A)	0,99996 (2)	1,8 (4)	102,5
Rabeprazole (B)	0,99999 (2)	2,4 (4)	100,1