Az esomeprazol enantiomer-tisztaságvizsgálata kapilláris elektroforézissel

Papp Lajos Attila, Hancu Gabriel, Kelemen Hajnal, Gyéresi Árpád

Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék

AUTHOR AFFILIATION

„George Emil Palade” University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş,
Department of Pharmaceutical Chemistry

CORRESPONDING AUTHOR

Papp Lajos Attila

Institution, Department: „George Emil Palade” University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş,
Department of Pharmaceutical Chemistry

Postal address (international): „George Emil Palade” University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş, Gh. Marinescu 38, Tîrgu Mureş, 540139, România
Email: lajos.papp@umfst.ro

Determination of enantiomeric purity of esomeprazole by capillary electrophoresis

ABSTRACT

Proton pump inhibitors are the most effective agents used in gastric hyperacidity-related disorders. Omeprazole is a benzimidazole-derivative compound with an asymmetric sulphur in its structure, which generates its chiral character.

Esomeprazole (S-omeprazole) was the first proton pump inhibitor introduced as an enantiomerically pure compound in therapy, after the successful chiral switch of the racemic omeprazole.

This work is aimed at performing a complementary study to an already published chiral separation method of omeprazole. As preliminary analysis, the electrophoretic behavior of omeprazole enantiomers and the possible mechanism of the chiral resolution was studied using different background electrolytes containing different β -cyclodextrin derivatives, as chiral selectors. The robustness of the chiral separation method was tested by applying a Plackett-Burman design. The method was validated according to current ICH guidelines and proved to be reliable, linear, precise and accurate for the determination of 0.2% R-omeprazole as chiral impurity in esomeprazole samples. The validated method was successfully used for the analysis of esomeprazole-containing gastro-resistant tablets.

According to our results, valuable information on the mechanism of chiral separation of omeprazole was gained and the application area of the previously developed method was successfully enlarged. The presented rapid and cost-effective capillary electrophoresis method proved to be suitable for the determination of enantiomeric purity of esomeprazole from pharmaceutical preparations and could represent an alternative for the available compendial methods.

Keywords: capillary electrophoresis, chiral separation, cyclodextrin, esomeprazole

KIVONAT

A protonpumpa-gátlók közé sorolható omeprazol egyike a magas gyomorsav-termeléssel járó kórképek terápiájában alkalmazott leghatékonyabb gyógyszereknek.

A vegyület egy benzimidazol-származék, amely a szerkezetében található aszimmetrikus kén atomnak köszönhetően királis molekula.

A jelen tanulmány célja egy már korábban közölt, az omeprazol királis elválasztását célzó módszer kiegészítése és továbbfejlesztése volt. Munkánk kezdetén az omeprazol enantiomerek elválasztásának lehetséges mechanizmusát tanulmányoztuk különböző, királis szelektorként β -cyclodextrin származékokat tartalmazó háttélektrolitokat alkalmazva. Ezt követően a

DOI: 10.2478/orvtudert-2020-0016

módszer robusztusságát vizsgáltuk egy Plackett-Burman-típusú kísérletterv segítségével, majd a módszer validálása következett a hatályban levő ICH irányelveknek megfelelően. Ezek alapján a módszer megbízhatónak, lineárisnak, precíznek és pontosnak bizonyult 0,2% R-omeprazol, mint királis szennyező, esomeprazol (S-omeprazol) mintából történő meghatározására. A validált módszert sikerrel alkalmaztuk esomeprazol-tartalmú gyógyszerforma vizsgálatára. Eredményeink tükrében sikerült értékes információkat nyernünk az omeprazol királis elválasztásában szerepet játszó

mechanizmusokról, valamint sikerült a már korábban kifejlesztett módszer alkalmazási területét kibővíteni. A bemutatott kapilláris elektroforézis módszer gyors és költséghatékony, alkalmas az esomeprazol hatóanyag-mintából illetve gyógyszerformából történő enantiomer-tisztaságvizsgálatára, mely ugyanakkor az érvényben levő gyógyszerkönyvi módszerek alternatívájaként szolgálhat.

Kulcsszavak: kapilláris elektroforézis, királis elválasztás, ciklodextrin, esomeprazol

Bevezetés

Az omeprazol (S)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metilszulinil]-3H-benzimidazol a protonpumpa-gátlók (proton pump inhibitor, PPI) családjába tartozó hatóanyag, amely a jelenleg elérhető leghatékonyabb gyomorsav-csökkentő szerek közé sorolható. Az esomeprazol volt az első enantiomer-tiszta formában bevezetett protonpumpa-gátló, a racém omeprazolból való kifejlesztését követően, amely ugyanakkor az ún. királis váltás egyik legismertebb példája [1,2].

Az esomeprazol szerkezeti képlete az 1. ábrán látható. Ahogyan a többi PPI, az omeprazol is amfoter jellegű vegyület. A piridin gyűrű bázikus karakterű nitrogénjének pKa értéke 4,06, míg a benzimidazol heterociklus N3 nitrogénje esetében ez 0,79. A molekula gyenge savasságát a benzimidazol gyűrű savas karakterű -NH csoportja biztosítja [3,4].

Az esomeprazol terápiás előnyét az ugyancsak forgalomban levő racém omeprazollal szemben kedvezőbb farmakokinetikája biztosítja, amely az omeprazol sztereoselektív metabolizmusának köszönhető [5].

Az esomeprazol magnézium- és nátriumsója formájában hivatalos az Európai Gyógyszerkönyvben (Esomeprazolum magnesicum trihydricum, Esomeprazolum magnesicum dihydricum és Esomeprazolum natricum) valamint magnézium- és stronciumsója az Egyesült Államok Gyógyszerkönyvében (Esomeprazole Magnesium és Esomeprazole Strontium) [6,7]. Mindkét gyógyszerkönyv előírja az esomeprazol enantiomer-tisztaságvizsgálatát, folyadékkromatográfiás módszerrel, α -1 savas glikoprotein-alapú királis oszlopot alkalmazva.

A kapilláris elektroforézis (CE) számos előnyének köszönhetően az utóbbi évtizedekben a kromatográfiás módszerek (főleg a HPLC) versenyképes alternatívájává vált a királis analízis területén. Előnyei között felsorol-

ható a kis oldószer- és mintaigénye, az általában rövid mérési idő és mindemellett az elválasztás is megfelelő hatékonyságú. Hátránya a kevésbé pontos injektálás, amely a reprodukálhatóság kárára megy, illetve a HPLC-nél általában kevésbé érzékeny detektálás [8].

A leggyakrabban alkalmazott közvetlen királis CE elválasztási módszereknél a királis szelektort a háttérelektrolit tartalmazza. A CE-ben legelterjedtebben alkalmazott szelektorcsalád a ciklodextrineké (CD). Képviselőik szerkezetileg ciklikus oligoszacharidok. Királis szelektorként három alapforma ismeretes: az α -ciklodextrin (α -CD) hat, a β -ciklodextrin (β -CD) hét, míg a γ -ciklodextrin (γ -CD) nyolc α -D-glükopiranoz egységből épül fel. Ugyanakkor az előbb felsorolt, ún. természetes CD-eknek különböző semleges és töltéssel rendelkező származéka is alkalmazást nyert. A szelektor-család számos képviselője sajátos fiziko-kémiai tulajdonságainak köszönhetően nagyszámú királis vegyület enantiomer-elválasztását teszi lehetővé. Az ún. királis felismerés mechanizmusa a CD-ek esetében olyan intermolekuláris kölcsönhatásokra vezethető vissza, mint a zárványkomplex képződés, hidrogén-hidak, vagy dipol-dipol kölcsönhatások, ugyanakkor a CD-származékok esetében ionos (töltéssel rendelkező CD-ek) vagy akár π - π (aromás szubsztituensekkel rendelkező CD-ek) kölcsönhatások is létrejöhetnek [9,10].

A CD-nek széleskörű alkalmazhatóságához hozzájárulnak többek között a vizes közegben való viszonylag jó oldhatóságuk, a minimális elnyelésük az UV tartomány-

1. ábra. Az esomeprazol szerkezeti képlete

ban, ugyanakkor a gyors komplex képzési kinetikájuk. Ezenkívül megemlítendő, hogy a természetes CD-ek származékai további előnyös tulajdonságokkal bírnak: nagyobb stabilitású komplexek létrejötte (a CD üregének megnövelésével, töltéssel rendelkező szubsztituensek esetében pedig ionos kölcsönhatások létrejöttével), megnövekedett oldhatóság stb. Mindemellett a töltéssel rendelkező CD-eknek saját elektroforetikus mozgékonyasága is van, amely egyrészt további elválasztási hatékonyságnövekedést, másrészt töltéssel nem rendelkező mintakomponensek elválasztását is lehetővé teszi [11].

A szakirodalomban több olyan módszer is megtalálható, amely az omeprazol királis elválasztását CE segítségével végzi [12-21].

Egy 1997-ben megjelent tanulmány az omeprazol, pantoprazol és lansoprazol királis elválasztását írja le, királis szelektorként szarvasmarha szérumalbumint alkalmazva [12].

Egy másik közleményben szulfatált β -CD-t alkalmaztak pH-4,0-es foszfát pufferben oldva az omeprazol enantiomerek gyógyszerformából történő meghatározására [13].

Metil- β -CD alkalmazásával, pH-2,2-es foszfát háttérellektrolittal Nevado és munkatársainak sikerült az omeprazol királis elválasztását elvégeznie [14].

Olsson és munkatársai sikeresen választották el az omeprazol és 5-hidroxi-metabolitjának az enantiomereit nemvizes közegű CE segítségével, heptakis-(2,3-di-O-metil-6-O-szulfo)- β -CD-t alkalmazva királis szelektorként [15]; később ugyanaz a kutatócsoport egy vizes közegű CE módszert is közölt, amelyben heptakis-(6-szulfo)- β -CD-t és tömegspektrometriás detektálást alkalmaztak az omeprazol királis elválasztására [16].

Egy másik közlemény az omeprazol és rabeprazol nemvizes-közegű királis elválasztását mutatja be, ahol egy ionos folyadék (egy efedrin-származék sója) egyaránt szolgált háttérellektroltként és királis szelektorként [17].

Guan és munkatársai több PPI (pantoprazol, lansoprazol, omeprazol és tenatoprazol) királis elválasztására alkalmas CE módszert közöltek, amelyben egy duális szelektorrendszer, (réz(II)-hisztidin és hidroxipropil- β -CD) és foszfát puffert (pH-5,0) alkalmaztak [18].

Humán szérumalbumin segítségével, egy 2017-ben publikált tanulmány szerint, sikerült az omeprazol enantiomereket elválasztani. Ugyanebben a tanulmányban a protein-enantiomer komplexek kötési állandóit CE és fluoreszcencia-spektroszkópia segítségével határozták meg [19].

A felsorolt közlemények mindegyike az omeprazol enantiomerek racém mintából történő meghatározását írja le. Jelen pillanatig egy olyan tanulmányt sikerült találnunk, amely az esomeprazol enantiomer-tisztaságvizsgálatát tárgyalja a CE technika segítségével [20]. Ebben 100 mM-s Tris-foszfát (pH-2,5) puffert alkalmaztak, amely királis szelektorként 20 mM 2-hidroxipropil- β -CD-t tartalmaz. Ugyanakkor az említett módszer analízisideje relatíve hosszúnak tekinthető (több mint 17 perc). Mindemellett megfigyelhető, hogy bár a közölt módszerek jelentős része savas vegyhatású háttérellektrolitot és semleges, azaz töltéssel nem rendelkező, CD-t alkalmaz, az elválasztás mechanizmusát, illetve a két, az elválasztás során létrejövő, átmeneti CD-enantiomer komplex tulajdonságait nem vizsgálja.

Kutatócsoportunk egy korábbi közleményében bemutatta egy, az omeprazol királis elválasztására alkalmas CE módszerét, amely a hatóanyag enantiomerek racém mintából való meghatározására alkalmas [21]. A jelen tanulmány célja az omeprazol királis elválasztására alkalmas, korábban közölt CE módszer alkalmazása és validálása az esomeprazol enantiomer-tisztaságvizsgálatára. Célul tűztük ki továbbá a királis elválasztás mechanizmusának vizsgálatát, savas foszfát puffert és királis szelektorként különböző β -CD származékokat alkalmazva.

Anyag és módszer

Reagensok, eszközök és mérési paraméterek

Reagensok: foszforsav (Chimopar, Románia), metanol, nátrium-hidroxid, nátrium-metabiszulfid (Merck, Darmstadt, Németország). A használt reagensok mind analitikai minőségűek voltak.

A vizsgált hatóanyagok: az analitikai tisztaságú racém omeprazolt az Alfa Aesar (Németország), míg az esomeprazol-magnézium dihidrátot a Sigma-Aldrich (Németország) szolgáltatta.

A vizsgálataink során a következő ciklodextrineket alkalmaztuk: természetes béta-ciklodextrin (β -CD, Cyclolab, Magyarország), random metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB, Cyclolab, Magyarország), hidroxipropil-béta-ciklodextrin (HP- β -CD, Sigma Aldrich, Németország) és hidroxietil-béta-ciklodextrin (HE- β -CD, Sigma Aldrich, Németország).

Az elektroforetikus méréseket egy Agilent CE 1600 (Agilent, Németország) típusú CE készülékkel végeztük, amely a Chemstation 7.01 szoftverrel volt felszerelve. A

pufferek pH-ját Terminal 740 (Inolab) pH-méterrel határoztuk meg.

Az elválasztások során 48 cm hosszúságú (effektív hossz: 40 cm), 50 µm belső átmérőjű kvarckapillárisokat alkalmaztunk (Agilent, Németország).

A mintakomponensek hidrodinamikai injektálás útján jutottak a kapillárisba, a detektor pedig a kapilláris katód-felőli végén helyezkedett el.

A detektálás diódasoros detektorral történt, egyszerre több hullámhosszon (210, 240, 300 nm).

A királis elválasztás mechanizmusának vizsgálatára a következő kísérleti körülményeket alkalmaztuk: háttérelektrolit: 25 mM foszforsav (pH=2,5); kapilláris hőmérséklete: 20°C; alkalmazott feszültség 15 kV; injektálási paraméterek: 50 mbar/3 s.

A módszer validálása során a következő kísérleti körülményeket alkalmaztuk: 50 mM foszfát puffer, pH 2,5 + 5 mM nátrium-metabiszulfid; 20 mM RAMEB királis szelektor; alkalmazott feszültség: 20 kV, hőmérséklet: 15°C, injektálási paraméterek: 50 mbar/3 s, UV detektálás.

Puffer- és mintaoldatok előkészítése

A használt puffereket a fent leírt vegyszerekből magunk készítettük és hűtőben tároltuk. A pH beállítására 0,1 M nátrium-hidroxidot alkalmaztunk. A hatóanyagok a savas pH-n való stabilitásának növelése érdekében a háttérelektrolithoz 5 mM nátrium-metabiszulfidot adtunk. A CD tartalmú puffereket minden nap frissen készítettük el, a megfelelő CD mennyiséget direkt módon a pufferben feloldva, 10 perces ultrahangos vízfürdőn való kezeléssel, majd ezek után 45 µm-es membránszűrővel szűrtük, szükség szerint hígítottuk és használtuk fel.

Minden új kapillárist 30 percig 1 M nátrium-hidroxiddal, majd 20-20 percig 0,1 M nátrium-hidroxiddal és vízzel történő mosással készítettünk elő. A kísérletek megkezdése előtt a kapillárist minden nap 10 percig 1 M-os, majd 10 percig 0,1 M-os nátrium-hidroxiddal, végül pedig 10-10 percig vízzel, illetve háttérelektrolittal történő mosásnak vetettük alá. Két injektálás között ugyanakkor 2-1-2 percig 0,1 M nátrium-hidroxidos, vizes, valamint háttérelektrolitos mosással prekondicionáltunk.

A királis szennyező meghatározása céljából 4 mg/mL töménységű metanolos esomeprazol oldatot készítettünk, amelyhez megfelelő mennyiségű racém omeprazol adtunk. A százalékban kifejezett R-omeprazol koncentrációt az előbb említett esomeprazol koncentrációhoz vonatkoztattuk.

A királis elválasztás mechanizmusának tanulmányozása céljából 1 mg/mL töménységű racém omeprazol tör-

zoldatot készítettünk, amelyet megfelelő hígítást, illetve ismert mennyiségű esomeprazol hozzáadását követően injektáltunk. Ennek alapján követni tudtuk az enantiomer-sorrend esetleges változásait az alkalmazott CD típusa, valamint koncentrációja függvényében.

A gyógyszerformából történő meghatározások során 10 tablettát elporítása után egy tablettának megfelelő mintamennyiséget mértünk ki, amelyből a hatóanyagot metanolal vontuk ki, ultrahangfürdő segítségével. Az így kapott oldatokat megfelelő szűrést és hígítást követően, a standard oldatoknál is alkalmazott körülmények között vizsgáltuk.

Kísérleti eredmények kiértékelése, számítások

Az elválasztás során számolt és nyomonkövetett paraméterek között megemlítenő az elválasztási faktor (α), amely a két enantiomer migrációs idejének a hányadosa:

$$\alpha = t_2/t_1, (1)$$

valamint a felbontás:

$$Rs = 2 \cdot (t_2 - t_1)/(w_1 + w_2), (2)$$

ahol: t_1 illetve t_2 a migrációs időket, míg a w_1 és w_2 a két komponens csúcshélességét jelöli.

A mintakomponensek effektív mobilitását a következő képlettel számoltuk:

$$\mu_{eff} = \frac{L \cdot I}{U} \cdot \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) (3)$$

ahol: L a kapilláris teljes hossza, I a kapilláris effektív hossza, U az alkalmazott feszültség, t az analit migrációs ideje, t_{EOF} pedig az elektroosmotikus áramlást jelző, semleges mintakomponens migrációs ideje. Itt megjegyzendő, hogy az általunk alkalmazott savas körülmények között (pH=2,5), az elektroosmotikus áramlás mértéke elhanyagolhatóan alacsony, így mi is eltekintettünk ezen paraméter számításba vételétől.

Wren és Rowe egyenletét (4) alkalmaztuk az enantiomer-szelektor komplexek látszólagos komplexálási állandóinak illetve mobilitásai értékeinek kiszámítására, a kísérleti eredmények (μ_{eff} vs. CD koncentráció) nem lineáris grafikus illesztésével. Erre a célra a Microcal Origin Pro 8 számítógépes programot (OriginLab Corporation, Northampton, MA, US) használtuk

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{szabad} + \mu_c K_C [CD]}{1 + K_C [CD]} (4)$$

ahol: μ_{szabad} a mintakomponens királis szelektor hiányában meghatározott mobilitása, μ_c az enantiomer-CD komplex mobilitása, $[CD]$ a CD koncentráció, K_C a komplex stabilitási állandója.

A módszer robusztusságának vizsgálatára alkalmazott Plackett-Burman-típusú kísérlettervet a Design Expert 7.0 (Stat-Ease, Minneapolis, SUA) számítógépes program segítségével készítettük és értékeltük ki. A módszer validálás statisztikai számításait és kiértékelését Microsoft Excel programmal végeztük.

Eredmények és megbeszélés

A fent leírt módon kísérletileg meghatároztuk a két említett komplexálási paramétert a következő CD-eket alkalmazva: β -CD, HP- β -CD ($M \approx 1460$), HE- β -CD ($M \approx 1367$) és RAMEB ($M \approx 1303$).

A Wren és Rowe által javasolt modell szerint (4), egy enantiomerpár elválasztása kétféle mechanizmuson alapulhat. Az ún. termodinamikai mechanizmus alapját a szelektor-enantiomer komplexek egyensúlyi állandói közötti különbség képezi, míg a másik ún. elektroforetikus mechanizmus pedig az ugyanezen komplexek mobilitási értékei közötti különbség következtében lép fel. Az előbb említett két mechanizmus együttesen is hozzájárulhat a királis elválasztáshoz, ugyanakkor a leggyakrabban a termodinamikai tényező érvényesül hangsúlyosabban [24,25].

Az említett paraméterek kísérleti eredmények alapján történő meghatározása céljából a szakirodalomban különböző lineáris és nem lineáris grafikus módszereket írnak le [24]. Ahhoz, hogy az így kapott eredmények valódi termodinamikai értékeknek tekinthessük, bizonyos ideális feltételeknek kell teljesülniük: az elválasztási közeg csak egyfajta, szerkezetileg homogén királis szelektort tartalmaz (és nem különböző szubsztitúciós mintázattal rendelkező származékokat), valamint az analit ugyancsak egyféle, semleges vagy ionizált formában van jelen, ugyanakkor a modell 1:1 enantiomer-szelek-

tor sztöchiometriát feltételez. Ezen alapfeltételek mellett további kísérleti paraméterek, mint a háttérelektrolit ionerősségének és viszkozitásának változásait stb. is kompenzálni kell [26,27].

Vizsgálataink során nem határoztuk meg a háttérelektrolitok ionerősségét, ugyanakkor mólkoncentrációval számoltunk aktivitások helyett. Mindemellett, a származék CD-ek többkomponensű szelektorok, amelyek különböző szubsztitúciós mintázattal rendelkező CD-ek elegyei. A felsoroltak miatt, a számolt komplexálási paraméterek látszólagosnak tekinthetők, nem valódi termodinamikai értékek, így az alkalmazott kísérleti körülmények keretein belül érvényesek [28,29].

Ezen eredmények alapján értelmezhetőek a királis elválasztásban résztvevő enantiomer-királis szelektor kölcsönhatások valamint meghatározható az adott rendszer optimális szelektor-koncentrációja, amely hozzájárul az elválasztás optimalizálásához. Egy másik fontos szempont, hogy tanulmányozni lehet az esetleges enantiomerek migrációs sorrendjében bekövetkező változásokat, amelyek igen nagy jelentőséggel bírnak az enantiomer tisztaságvizsgálati módszerek esetében [30].

A királis szelektorokat a következő koncentráció-tartományokban alkalmaztuk: 1-40 mM a HP- β -CD, HE- β -CD és RAMEB esetében, illetve 1-12 mM β -CD esetében (tekintettel az utóbbi alacsonyabb oldhatóságára). A meghatározásokat minden CD esetén 7-9 koncentráció értéken végeztük. Itt megjegyzendő, hogy a kísérleti körülmények (CD típusa és koncentrációja) változtatása során nem észleltünk változást az enantiomerek migrációs sorrendjében, így minden esetben a disztomernek tekintett *R*-omeprazol jelent meg először az elektroferogramon, majd azt követően az eutomer esomeprazol.

Ahogy az összesített eredményekből látható (1. táblázat), a természetes β -CD esetében a stabilitási állan-

1. táblázat. Különböző CD rendszerek esetében számított komplexálási paraméterek

Királis szelektor	K_R (M^{-1})	K_S (M^{-1})	μ_R ($cm^2V^{-1}s^{-1} \cdot 10^{-4}$)	μ_S ($cm^2V^{-1}s^{-1} \cdot 10^{-4}$)	R_s
β -CD	$146,82 \pm 6$	$166,84 \pm 5$	$2,11 \pm 0,07$	$2,08 \pm 0,07$	1,44
HP- β -CD	$61,25 \pm 3$	$65,09 \pm 2$	$1,75 \pm 0,12$	$1,65 \pm 0,11$	1,71
HE- β -CD	$47,57 \pm 2$	$48,29 \pm 2$	$1,62 \pm 0,09$	$1,58 \pm 0,08$	0,93
RAMEB	$76,08 \pm 2$	$85,79 \pm 3$	$1,30 \pm 0,06$	$1,25 \pm 0,06$	2,85

Rövidítések: μ_R , μ_S – a két enantiomer-CD komplex számolt látszólagos mobilitása; K_R , K_S – a két enantiomer-CD komplex számolt látszólagos stabilitási állandója, R_s – az illető szelektor alkalmazásával elért maximális felbontás értéke.

2. ábra. K Az omeprazol különböző CD származékok segítségével történő királis elválasztása (elválasztási körülmények: 50 mM-os foszfát puffer, pH 2,5 + 5mM Na₂S₂O₅; alkalmazott feszültség: 20 kV, hőmérséklet: 20°C, hidrodinamikus injektálás: 50 mbar/3 s, UV detektálás: 210 nm)

dók közötti különbség, tehát a termodinamikai mechanizmus a meghatározó a két enantiomer elválasztása tekintetében, míg a két enantiomer-szelektor komplex mozgékonyasága között nincs szignifikáns különbség. A HP-β-CD és RAMEB CD-származékok esetében mindkét mechanizmus (termodinamikai és elektroforetikus) tetten érhető, amely a szakirodalom alapján megfelel a két CD multikomponens jellegének [31]. A HE-β-CD esetében mind az enantiomer-szelektor komplexek stabilitási állandói, mind azok mozgékonyasága nagyon közeli értékek, tehát a két mechanizmus elválasztáshoz való hozzájárulása nem nyilvánvaló és nem is különíthető el. Ezek alapján ugyanakkor érthető a HE-β-CD alkalmazása során észlelt gyenge felbontás is.

A kísérletek alapján, a legjobb felbontási értékeket a már korábban is legmegfelelőbb szelektornak talált RAMEB alkalmazásával sikerült elérni (**2. ábra**).

A elválasztási módszer robusztusságának a bizonyítása céljából egy Plackett-Burman kísérlettervet alkalmaztunk, amelynek során 12 kísérletet végeztünk el a következő öt kísérleti paraméter változtatásával: alkalmazott feszültség ± 1 kV, hőmérséklet $\pm 1^\circ\text{C}$, a háttélelektrolit pH-ja $\pm 0,2$, a háttélelektrolit koncentrációja ± 3 mM, a királis szelektor koncentrációja ± 1 mM. A követett válaszparaméterek az enantiomerek közötti felbontás értéke, valamint a két enantiomer migrációs idejei voltak.

A kísérletterv alapján kapott eredmények (**2. táblázat**) statisztikai kiértékelése céljából, variancia-analízist (ANOVA, 5%-os szignifikancia szintet alkalmazva)

2. táblázat. Az alkalmazott kísérletterv és a kapott eredmények

Standard sorrend	Injektálási sorrend	Pufferkoncentráció (mM)	pH	RAMEB (mM)	Hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)	Feszültség (kV)	t ₁ (perc)	t ₂ (perc)	Rs
7	1	53,00	2,40	19,00	14,00	21,00	7,86	8,26	2,85
12	2	47,00	2,40	19,00	14,00	19,00	7,99	8,37	2,74
9	3	53,00	2,60	21,00	14,00	19,00	7,81	8,23	2,91
4	4	47,00	2,60	19,00	16,00	21,00	7,71	8,10	2,76
8	5	53,00	2,60	19,00	14,00	19,00	7,83	8,20	2,59
1	6	53,00	2,60	19,00	16,00	21,00	7,71	8,14	2,63
10	7	47,00	2,60	21,00	16,00	19,00	7,89	8,29	2,80
5	8	47,00	2,40	21,00	14,00	21,00	7,85	8,27	2,82
6	9	47,00	2,40	19,00	16,00	19,00	7,88	8,29	2,79
3	10	53,00	2,40	21,00	16,00	19,00	7,80	8,21	2,87
2	11	47,00	2,60	21,00	14,00	21,00	7,77	8,15	2,74
11	12	53,00	2,40	21,00	16,00	21,00	7,95	8,35	2,66

3. ábra. 2% *R*-omeprazol tartalmazó esomeprazol minta injektálása után rögzített elektroferogram (elválasztási körülmények ugyanazok, mint a 2. ábra esetében).

végeztünk. Ez a vizsgálat nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a vizsgált analitikai paraméterek fent leírt intervallumokban való változtatása és a nyomon követett válaszparaméterek értékei között. Ezek alapján az alkalmazott elválasztási módszer robusztusnak tekinthető.

A módszert, a hatályban levő ICH irányelveknek megfelelően, a precizitás, linearitás, pontosság illetve a kimutatási és meghatározási határok (LOD, LOQ) meghatározásával validáltuk az *R*-omeprazol esomeprazol mintából történő vizsgálatára.

A módszer linearitását az *R*-omeprazol 8–60 µg/mL (0,2–1,5%) koncentráció-tartományában vizsgáltuk, 4000 µg/mL esomeprazol eutomer jelenlétében, hat koncentrációsinten végzett háromszori injektálás alapján.

Az *R*-omeprazol LOD és LOQ értékeinek meghatározásakor a jel/zaj arány 3:1 illetve 10:1. Az így kapott *R*-omeprazol vonatkoztatott LOQ érték 8 µg/mL, amely vizsgált 4000 µg/mL töménységű esomeprazol minta 0,2%-ának felel meg (3. ábra). A kapott LOD érték 3 µg/mL, amely ugyanazon minta 0,075%-ának felel meg.

Meghatároztuk a módszer ún. napon belüli és napok közötti megbízhatóság (precizitás). Az napon belüli precizitás esetében, egyazon nap, ugyanabból a mintából, 6 meghatározást végeztünk. Az napok közötti precizitás esetében három egymást követő napon napi 6 meghatározást végeztünk, majd a kapott eredmények alapján relatív standard deviációt számoltunk. A meghatározásokat a királis szennyező három koncentrációsintjén végeztük el: 0,20, 0,60, 1,20% az esomeprazol (4000 µg/mL) jelenlétében.

A módszer pontosságát visszanyerési kísérletek alapján vizsgáltuk. 20 mg, esomeprazol tartamú, Nexium gasztroreziptens tablettákból készített mintaoldatokhoz ismert mennyiségű racém omeprazol adtunk (a kalibrációs görbe tartományának három koncentráció szintjén), majd a regressziós egyenlet alapján visszanyerést számoltunk.

Az napon belüli és napok közötti precizitás esetén az RSD értékek 5,5% alattiak, ugyanakkor a pontosság meghatározásánál a visszanyerés minden esetben a $\pm 5\%$ tartományba esett (3. táblázat).

A validált módszer alkalmazhatóságát az esomeprazol gyógyszerformából történő királis tisztaságvizsgálatával teszteltük. Az analíziseket 20 mg-os Nexium gasztroreziptens tabletták háromszori bemérés alapján elvégzett vizsgálatával végeztük. Az így kapott eredmények alapján az *R*-omeprazol 0,2%-nál (Európai Gyógyszerkönyvben és az Egyesült Államok Gyógyszerkönyvében található esomeprazol-magnézium monográfiákban egyaránt előírt határérték) kisebb mennyiségben van jelen a mintában. Ugyanakkor a rögzített elektroferogramok alapján nem észleltünk semmilyen interferenciát a tablettákban eredetileg jelenlevő segédanyagokkal.

3. táblázat. A módszer validálása során kapott eredmények

Paraméter	<i>R</i> -omeprazol
Koncentrációtartomány	8 – 60 µg/mL (0,2 – 1,5%)
Kalibrációs egyenlet	$y=0,142x-0,981$
r^2	0,9991
LOD	3 µg/mL (0,075%)
LOQ	8 µg/mL (0,2%)
Pontosság (Visszanyerés %)	
8 µg/mL (0,20%)	97,28 $\pm$ 2,41
24 µg/mL (0,60%)	99,07 $\pm$ 1,92
48 µg/mL (1,20%)	100,36 $\pm$ 1,71
Napon belüli megbízhatóság (RSD%)	
0,20%	4,11
0,60%	1,98
1,20%	1,27
Napok közötti megbízhatóság (RSD%)	
0,20%	5,17
0,60%	2,42
1,20%	1,85

Következtetés

A jelen tanulmány keretében sikerült az omeprazol királis elválasztására korábban kifejlesztett módszerünket kiegészíteni, annak alkalmazási területét kibővíteni.

Megvizsgáltuk a Wren és Rowe elméletéből eredő két alapvető mechanizmus hozzájárulását az omeprazol enantiomerek elválasztáshoz, királis szelektorként természetes β -CD, illetve ennek három semleges származékát (HP- β -CD, HE- β -CD, RAMEB) alkalmazva. A kapott eredmények egyrészt alátámasztják a korábbi következtetéseinket, miszerint a vizsgált körülmények között a RAMEB bizonyul a legjobb szelektornak, másrészt pedig a szakirodalomban fellelhető, a termodinamikai és elektroforetikus elválasztási mechanizmusok egyidejű fellépésére vonatkozó információkat a többkomponensű CD-ek mint szelektorok tekintetében.

Az elválasztási módszer robusztusságát egy, a korszerű statisztikai kísérlettervezés módszerei közé tartozó, Plackett-Burman-típusú kísérletterv alkalmazásával vizsgáltuk. A validálás eredményeként egy megfelelően lineáris, precíz és pontos módszerhez jutottunk, amely alkalmas az *R*-omeprazol, mint királis szennyező, esomeprazol mintából történő meghatározására.

Mindezek alapján a továbbfejlesztett módszer alkalmas az esomeprazol hatóanyagból, illetve gyógyszerformából történő enantiomer-tisztaságvizsgálatára, ugyanakkor versenyképes alternatívaként szolgálhat a gyógyszerkönyvi HPLC módszerekkel szemben.

Köszönetnyilvánítás

Jelen tanulmány az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztálya és a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara által biztosított támogatás keretén belül készült (támogatási szerződés száma: 99/2019)

Rövidítések jegyzéke

β -CD-természetes béta-ciklodextrin, CD-ciklodextrin, CE-kapilláris elektroforézis, HE- β -CD-hidroxietil-béta-ciklodextrin, HP- β -CD-hidroxipropil-béta-ciklodextrin, HPLC-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, RAMEB-véletlenszerűen metilézett béta-ciklodextrin

Irodalom

- Strand DS, Kim D, Peura DA. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. Gut Liver. 2017 Jan 15;11(1):27–37.
- A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. Nat Rev Drug Discov. 2003 Feb;2(2):132–9.
- Fülöp F, Noszá B, Szász G, Takácsné Novák K. Gyógyszerészi kémia, Semmelweis Kiadó. Budapest; 2010. 455–459.
- Roche VF. The Chemically Elegant Proton Pump Inhibitors. Am J Pharm Educ. 2006 Sep;70:101.
- Andersson T, Weidolf L. Stereoselective Disposition of Proton??Pump Inhibitors. Clin Drug Investig. 2008;28:263–79.
- Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. European Pharmacopoeia 10.0. Strasbourg; 2019.
- United States Pharmacopeial Convention. USP 42 - NF 37 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2019.
- Bernardo-Bermejo S, Sánchez-López E, Castro-Puyana M, Marina ML. Chiral capillary electrophoresis. TrAC Trends Anal Chem. 2020 Mar 1;124:115807.
- Scriba GKE. Chiral recognition in separation science – an update. J Chromatogr A. 2016 Oct;1467:56–78.
- Scriba GKE. Chiral recognition in separation sciences. Part I: Polysaccharide and cyclodextrin selectors. TrAC Trends Anal Chem. 2019 Nov;120:115639.
- Saz JM, Marina ML. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 2016 Oct;1467:79–94.
- Eberle D, Hummel RP, Kuhn R. Chiral resolution of pantoprazole sodium and related sulfoxides by complex formation with bovine serum albumin in capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 1997 Jan;759:185–92.
- Bonato PS, Paia FO. Enantioselective analysis of omeprazole in pharmaceutical formulations by chiral high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. J Braz Chem Soc. 2004 Apr;15:318–23.
- Nevado JJB, Peñalvo GC, Dorado RMR. Method development and validation for the separation and determination of omeprazole enantiomers in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis. Anal Chim Acta. 2005 Mar;533:127–33.
- Olsson J, Stegander F, Marlin N, Wan H, Blomberg LG. Enantiomeric separation of omeprazole and its metabolite 5-hydroxyomeprazole using non-aqueous capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 2006 Oct;1129:291–5.
- Olsson J, Marlin ND, Blomberg LG. Enantiomeric Separation of Omeprazole Enantiomers by Aqueous CE Using UV and MS Detection. Chromatographia. 2007 Sep 3;66:421–5.
- Ma Z, Zhang L, Lin L, Ji P, Guo X. Enantioseparation of rabeprazole and omeprazole by nonaqueous capillary electrophoresis with an ephedrine-based ionic liquid as the chiral selector. Biomed Chromatogr. 2010 Dec;24:1332–7.
- Guan J, Li H, Yan F, Shi S, Wang S. Optimization and validation of a novel CE method for the enantioseparation of pantoprazole and related benzimidazole using a dual chiral selector system. Electrophoresis. 2014 Oct;35(19):2800–6.
- Xu Y, Hong T, Chen X, Ji Y. Affinity capillary electrophoresis and fluorescence spectroscopy for studying enantioselective interactions between omeprazole enantiomer and human serum albumin. Electrophoresis. 2017 May;38:1366–73.

20. Estevez P, Flor S, Boscolo O, Tripodi V, Lucangioli S. Development and validation of a capillary electrophoresis method for determination of enantiomeric purity and related substances of esomeprazole in raw material and pellets. *Electrophoresis*. 2014 Mar;35:804–10.
21. Hancu G, Papp LA, Rusu A. Chiral Separation of the Enantiomers of Omeprazole and Pantoprazole by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia*. 2015 Feb 12;78:279–84.
22. Wren SAC, Rowe RC. Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1992 Jun;603:235–41.
23. Wren SAC, Rowe RC. Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1992 Sep;609:363–7.
24. Chankvetadze B. Chiral Recognition and Enantioseparation Mechanisms in Capillary Electrokinetic Chromatography. In: *Chiral Recognition in Separation Methods*. Berlin, Heidelberg;Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 97–152.
25. Scriba GKE. Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Jun;55:688–701.
26. Ušelová-Včeláková K, Zusková I, Gaš B. Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis*. 2007 Jul;28:2145–52.
27. Müllerová L, Dubský P, Gaš B. Twenty years of development of dual and multiselector models in capillary electrophoresis: A review. *Electrophoresis*. 2014 Oct;35:2688–2700.
28. Dubský P, Dvořák M, Ansorge M. Affinity capillary electrophoresis: the theory of electromigration. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Dec 24;408:8623–41.
29. Müllerová L, Dubský P, Gaš B. Generalized model of electromigration with 1:1 (analyte:selector) complexation stoichiometry: Part II. Application to dual systems and experimental verification. *J Chromatogr A*. 2015 Mar 6;1384:147–54.
30. Hammitzsch-Wiedemann M, Scriba GKE. Mathematical Approach by a Selectivity Model for Rationalization of pH- and Selector Concentration-Dependent Reversal of the Enantiomer Migration Order in Capillary Electrophoresis. *Anal Chem*. 2009 Nov;81(21):8765–73.
31. Dubský P, Svobodová J, Tesařová E, Gaš B. Enhanced selectivity in CZE multi-chiral selector enantioseparation systems: Proposed separation mechanism. *Electrophoresis*. 2010 Mar; 31: 1435–41F.