

# Entwicklung und Validierung einer UHPLC-MS/MS Methode zur Ermittlung der Pharmakokinetik von antiviralen Aciclovir-Cremen

Schimek Denise<sup>1,2</sup>, Bodenlenz Manfred<sup>1</sup>, Sinner Frank<sup>1,3</sup>, Christoph Magnes<sup>1</sup>, Kevin A. Francesconi<sup>2</sup>, Reingard Raml<sup>1\*</sup>

## Probennahme im Gewebe

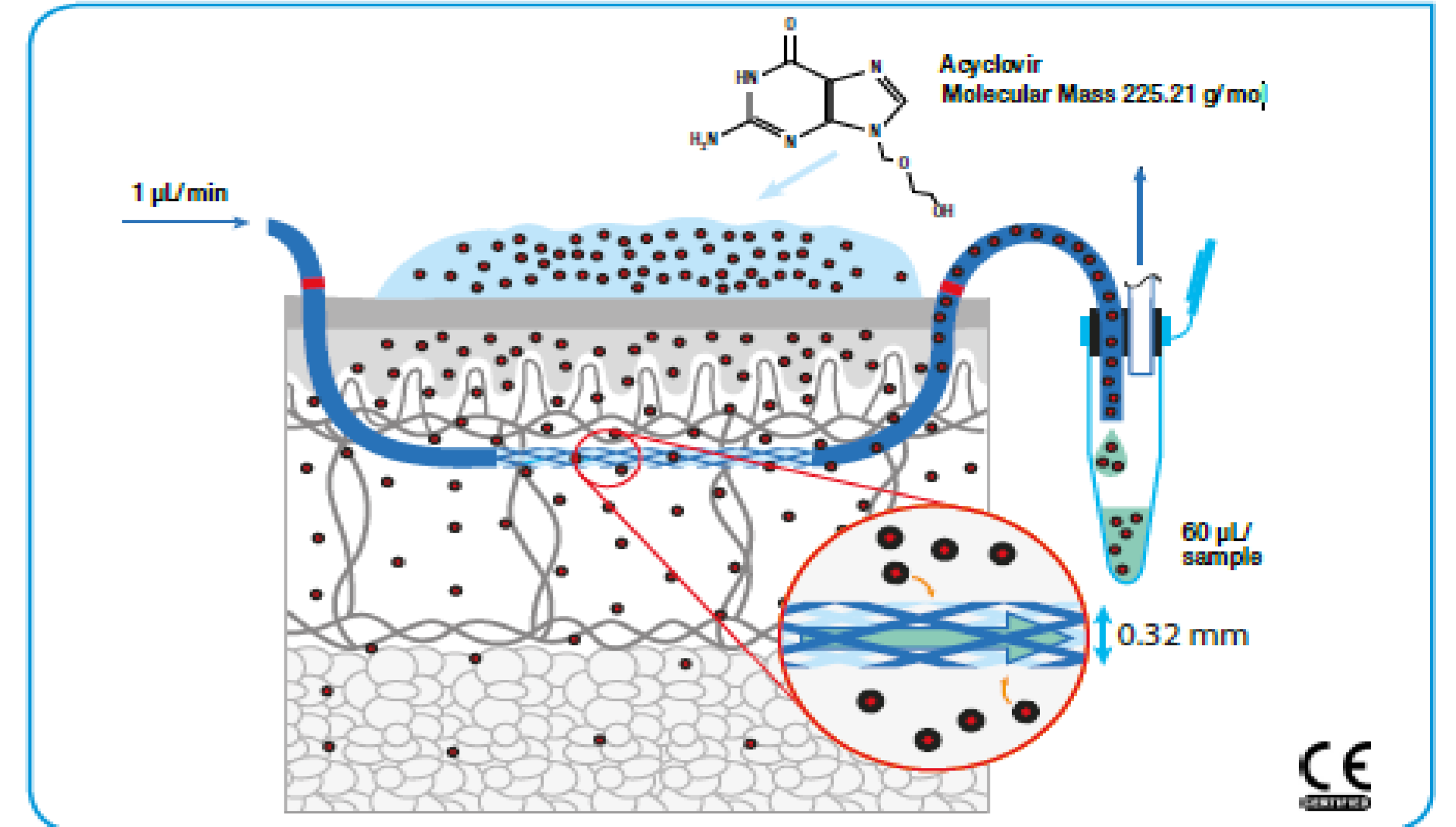
Die Pharmakokinetik (PK) von topischen Medikamenten direkt an deren Wirkort in der Haut zu ermitteln, ist eine herausfordernde Aufgabe.

Meist kann nur eine geringe Menge des Wirkstoffes die Schutzschicht der Haut, das Stratum corneum, überwinden und an den eigentlichen Wirkort, die lebenden Zellen der Epidermis und Dermis, gelangen.

Eine Möglichkeit PK in vivo in menschlicher Haut zu ermitteln ist die offene Mikroperfusion (OFM). Diese minimal-invasive katheterbasierte Methode ermöglicht den kontinuierlichen Zugang zum Zielgewebe. Dabei wird mit einer Flussrate von 1 µl/min verdünnte interstitielle Flüssigkeit gewonnen.

Die gewonnenen dOFM-Proben stellen hohe Anforderungen an den analytischen Prozess

- Hoher benötigter Probendurchsatz
- Kleine Probenvolumina (60 µL)
- Hohe Sensitivität und Selektivität



## Zielsetzung

Entwicklung einer analytischen Methode zur Ermittlung der Bioäquivalenz von topischen Aciclovir-Generika aus dOFM-Proben im Rahmen einer klinischen Studie.

## Methodenentwicklung und Validierungsergebnisse

### Probendurchsatz pro Tag

Automatisierte Schritte von Hamilton MICROLAB® STARlet Liquid handling workstation

- Herstellung von Standards und QCs,
  - Transfer von Proben in eine 96-Well-Platte
  - Zugabe von Internem Standard.
- 231 Proben in 8 Stunden!

### Festphasenextraktion (SPE) für kleine Probenvolumina

µ-Elution SPE Platten (2mg SPE Material) im 96-Well-Format ermöglichen die Probenvorbereitung von 20µL Probenvolumina

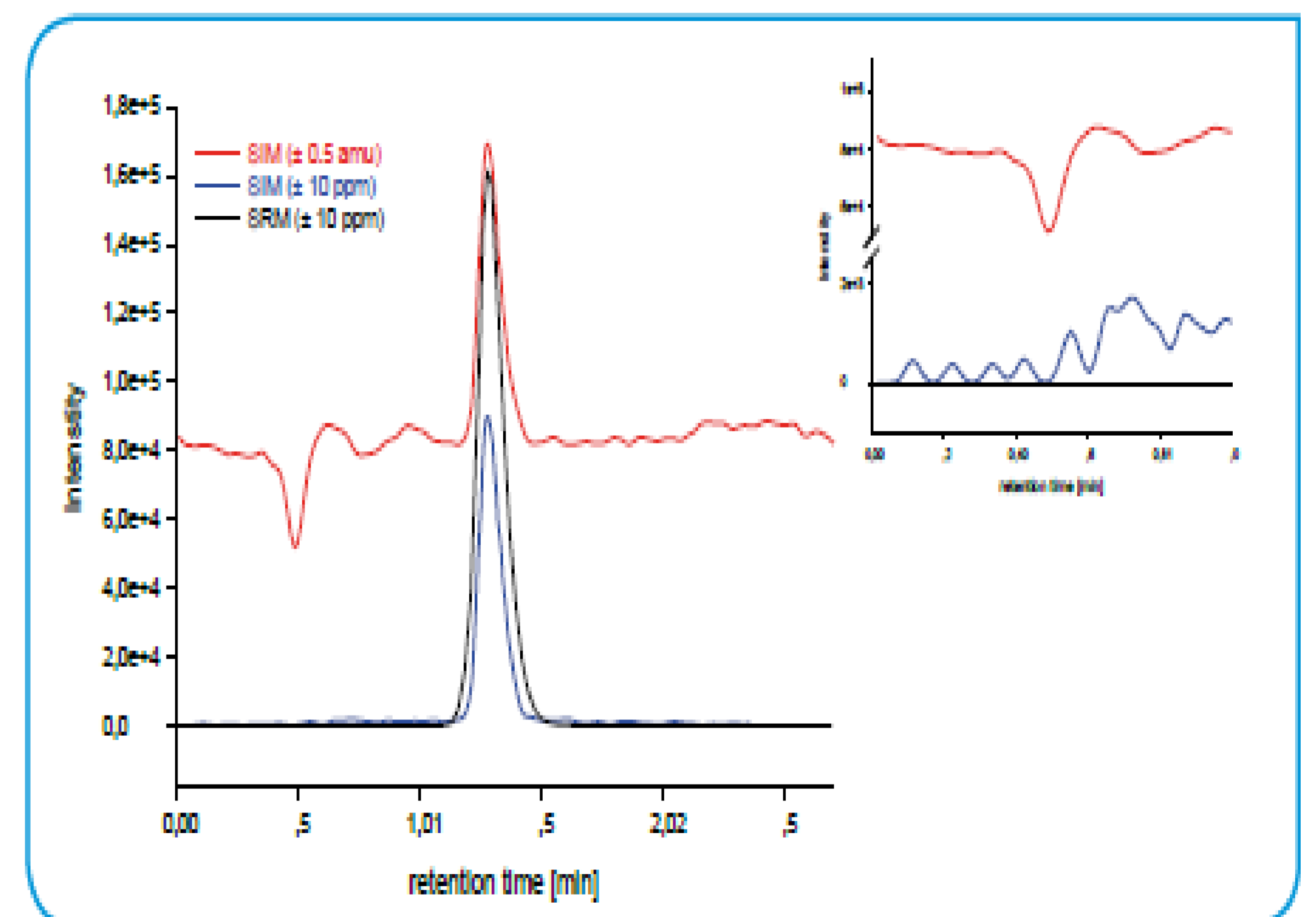
### Hohe Sensitivität und Selektivität

Die Verwendung des targeted-MS<sup>2</sup> Messmodus der Thermo QExactive, ermöglichte eine hochauflösende Detektion des Fragment-Ion, die signifikante Reduktion des Hintergrundrauschens ergab eine erhöhte Sensitivität<sup>1,2</sup>.

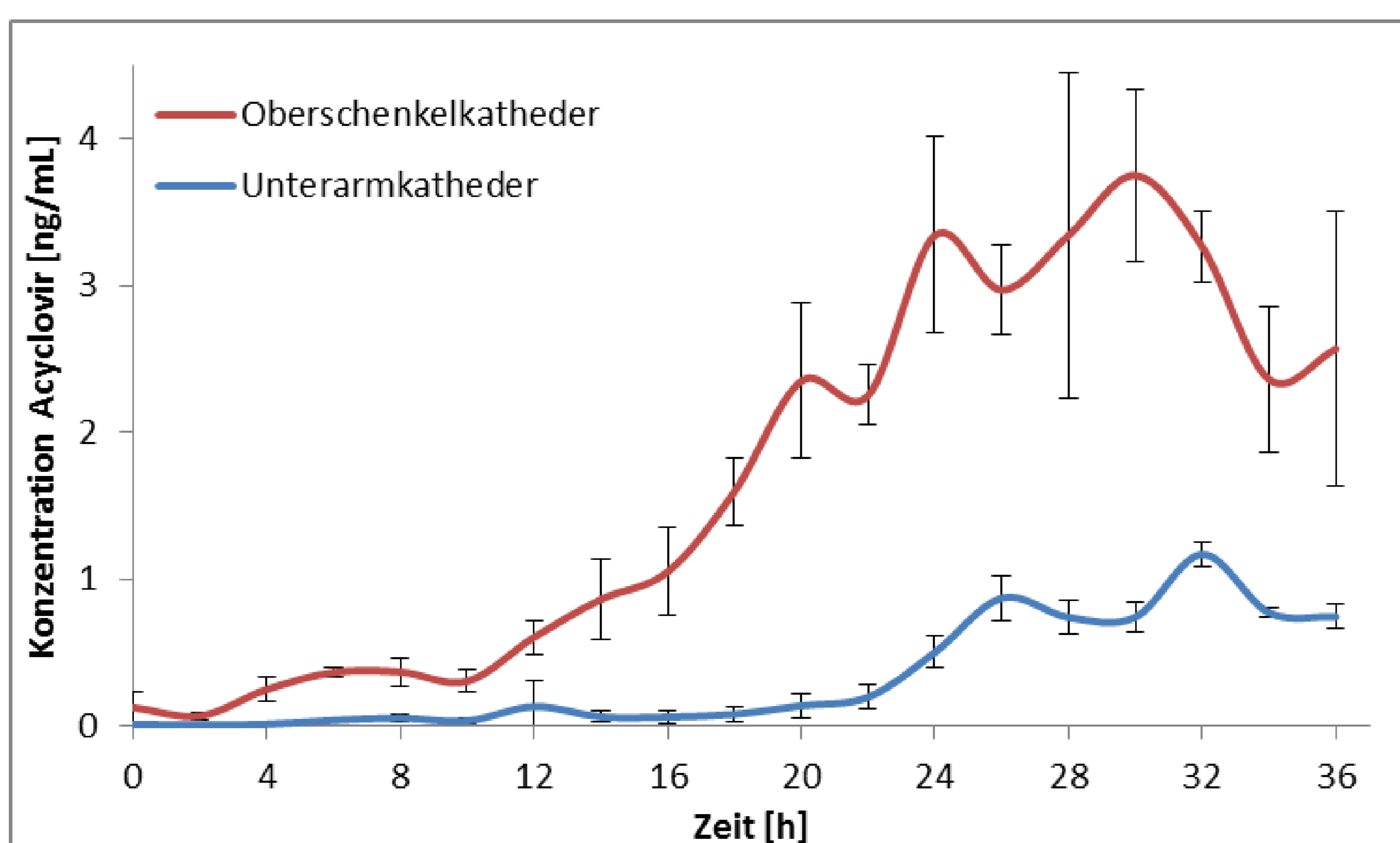
### Validierungsergebnisse

Aciclovir kann in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 25 ng/mL quantifiziert werden. Die Validierung aller Parameter wurde anhand von FDA-Richtlinien durchgeführt und eine Richtigkeit 99%-109% und eine Präzision 6-11% ermittelt.

10 ng/mL Standard im  
SIM (± 0.5 amu) SIM (± 10 ppm) SRM (± 10 ppm)



## Konzentrationsverlauf am Wirkort



Mittelwert und Standardabweichungen der Aciclovir-Konzentrationen über 3 Katheder, jeweils am Unterschenkel und Oberarm gesetzt, Daten sind nicht Ausreißer-bereinigt

Die Pharmakokinetik von topisch appliziertem Aciclovir wurde erstmals an seinem Wirkort im Menschen ermittelt. Die erhaltenen Konzentrations-Zeitprofile werden eine Aussage zur Bioäquivalenz topischer Aciclovir-Generika ermöglichen.

## Experimentelles

Probenvorbereitung: Waters µElution SPE starker Kationenaustauscher MCX SPE, Protokoll: Probenauftrag (20µL); Waschen mit 5% Ameisensäure in MeOH, MeOH, Elution mit 2,5% NH<sub>3</sub> in MeOH; Chromatographische Bedingungen: Acquity UPLC BEH C18 Säule (1.0 mm x 50 mm, 1.7 µm) 10% MeOH in H<sub>2</sub>O (Isokratisch; 3.7 min). Flussrate 300 µL/min; Injektionsvolumen: 3 µL; Säulenofentemperatur: 40°C; MS Bedingungen: Targeted-MS<sup>2</sup> positive Polarität, Auflösung 35.000, AGC target 3e5, Maximale Injektionszeit 200 ms, Isolationsfenster 0.4 m/z, NCE 20.0



<sup>1</sup>Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH, HEALTH-Institute for Biomedicine and Health Sciences, Graz, Austria

Reingard Raml

<sup>2</sup> Division of Endocrinology and Metabolism, Dept. of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria

## Referenzen

- [1] Kannefi, R., Rajesh, R., Aravinda Raj, J.R. & Bhatt, P. a. Chromatographia 70, 407-414 (2009)  
[2] Shao, C. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques 03, 1-6 (2012)

## Danksagung

Finanziell unterstützt wurde diese Arbeit durch Food and Drug Administration Agency (FDA).