

# LC-MS/MS-Methodenentwicklung zur Spurenanalytik von Kojisäure in einer Zwischenstufe eines Arzneimittelwirkstoffes

**D'Aiuto Fabio**  
Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber: Dr. Markus Heubes, Dr. Stefan Meisen, Basilea Pharmaceutica International AG  
Experte: Dr. Markus Ehrat, EK Biosciences GmbH  
Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, Hochschule für Life Sciences FHNW

## ZUSAMMENFASSUNG

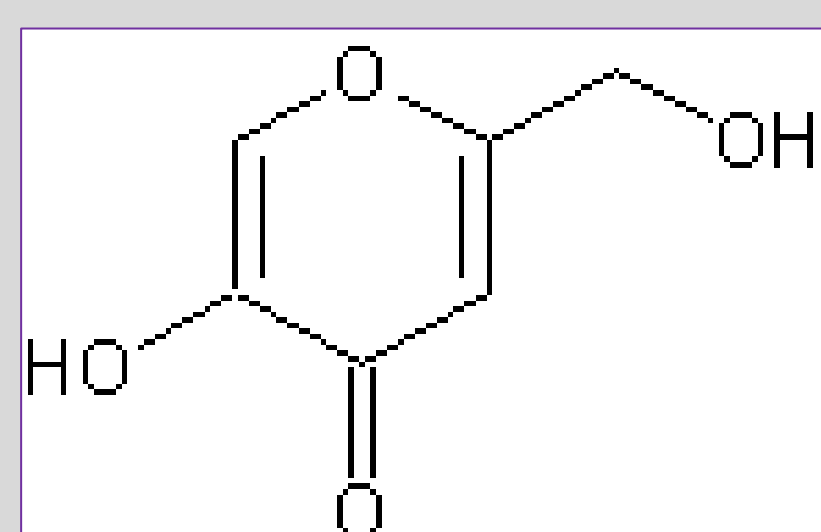
Es wurde eine selektive und robuste chromatographische Methode entwickelt, die zur Kojisäurebestimmung in einer pharmazeutischen Zwischenstufe mittels MS/MS-Detektion für Konzentrationen ab 0.2 ppm geeignet ist. Dabei wurde ein spezielles Verfahren zur Fällung der Matrixbestandteile entwickelt (s. Abb. 4), welches eine Isolierung der Kojisäure erlaubt. Es ließ sich zeigen, dass Gehaltsbestimmungen mittels Standardaddition oder externer Kalibration erfolgen können. Während der Validierung wurden für das Analysenverfahren unter anderem die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision und Wiederfindung als charakteristische Kenngrößen der Methode ermittelt.

## EINLEITUNG

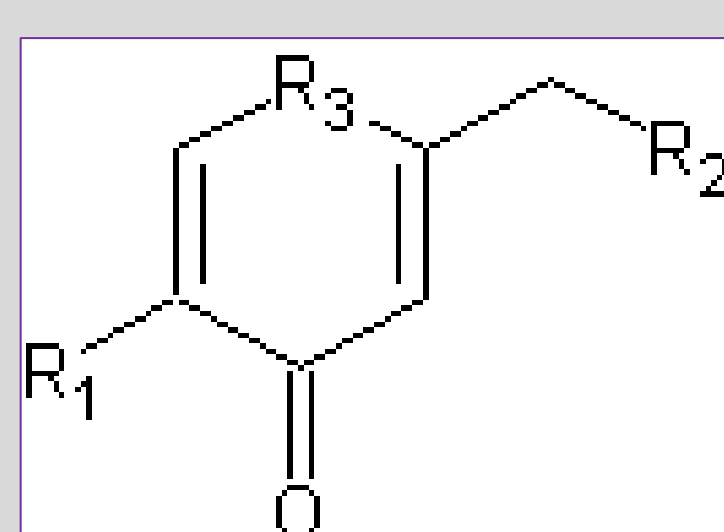
Die Kojisäure (1) ist ein zweifach substituiertes 4-Pyron, welches in den Myzelien verschiedener Pilzkulturen gebildet wird und über Fermentationstechniken gewonnen werden kann.[1] Neben dem verbreiteten Einsatz von Kojisäure in kosmetischen Hautbleichmitteln und ihrem Vorkommen in Lebensmitteln, dienen die Kojisäure und ihre Derivate (2) auch als Syntheserohstoffe in der chemischen und pharmazeutischen Industrie.

Eine toxikologische Studie mit Kojisäure konnte das genotoxische Potential des Moleküls nicht vollständig ausschließen [2]. Des Weiteren wies eine auf QSAR basierende *in-silico* Evaluierung (mittels DEREK Nexus V. 2.0.0) auf eine potentiell genotoxische, chromosomenschädigende Wirkung von Kojisäure hin.

Kojisäure dient als Rohstoff zur Herstellung eines Zwischenproduktes (Struktur analog zu 2), welches für die Synthese eines potentiellen, pharmakologisch aktiven Wirkstoffes (API) eingesetzt wird. Eine geeignete Methode zur Bestimmung der Kojisäure stand bisher nicht zur Verfügung. Daher sollte ein Analysenverfahren zur Gehaltsbestimmung von Kojisäure in dem Zwischenprodukt entwickelt werden, das eine Empfindlichkeit von  $\leq 1$  ppm erreicht.



(1) Kojisäure



(2) Derivate der Kojisäure

## RESULTATE

Zunächst wurde eine geeignete Methode mittels HPLC-DAD entwickelt, die eine chromatographische Trennung des Analyten von Bestandteilen der Probenmatrix mittels einer C18-Phase (Waters Atlantis T3) und einer Gradientenelution mit Wasser (+ 0.1% TFA) und Methanol (+ 0.1% TFA) erlaubt.

Auf Grund des tiefen Grenzwertes von 1 ppm ist ein Quantifizierung mittels massenspektrometrischer Detektion sinnvoll. Deshalb wurde die Trennmethode auf ein Agilent 1260 HPLC-System mit gekoppeltem AB SCIEX QTRAP 4500 Massenspektrometer übertragen, um Kojisäure mit spezifischen MRM-Übergängen (s. Abb. 1 und 2) empfindlich detektieren zu können.

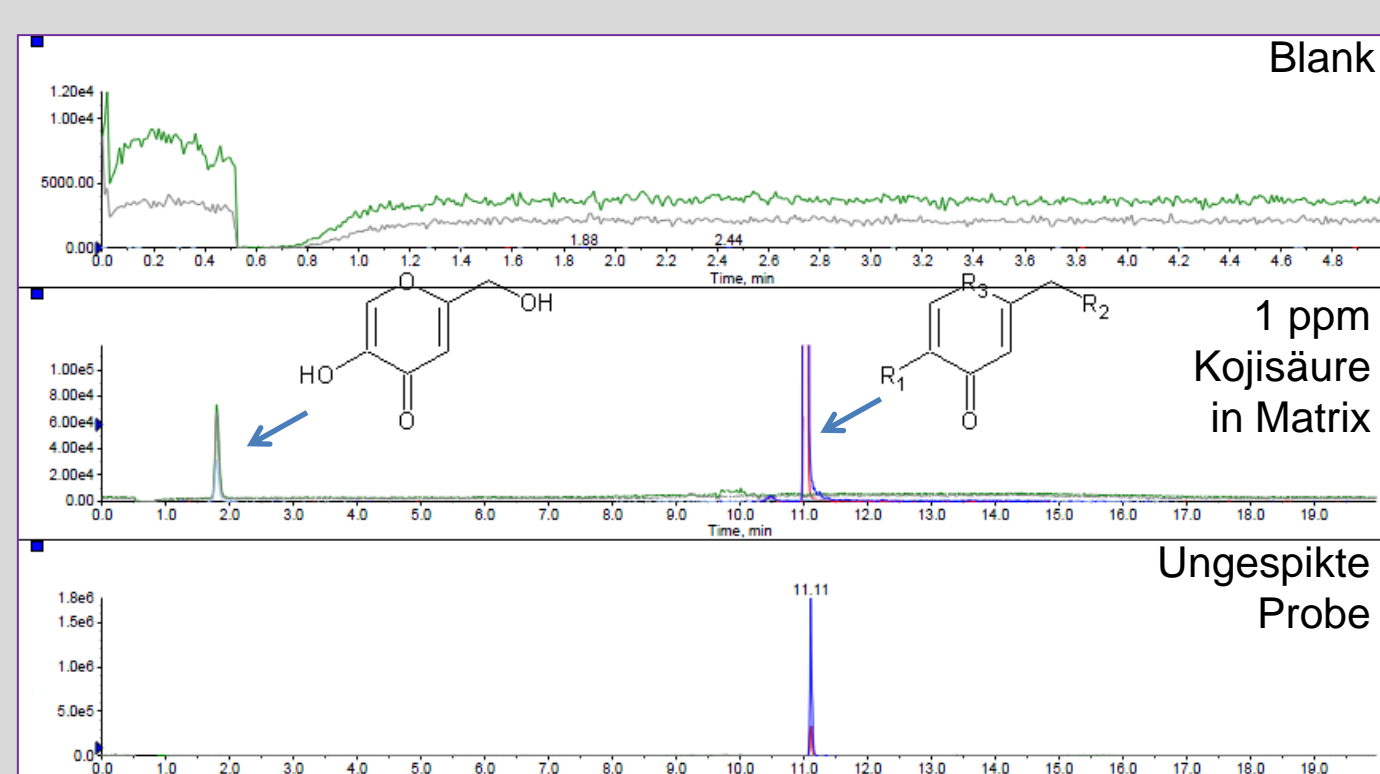


Abb. 1: 1 ppm Kojisäure in Probenmatrix

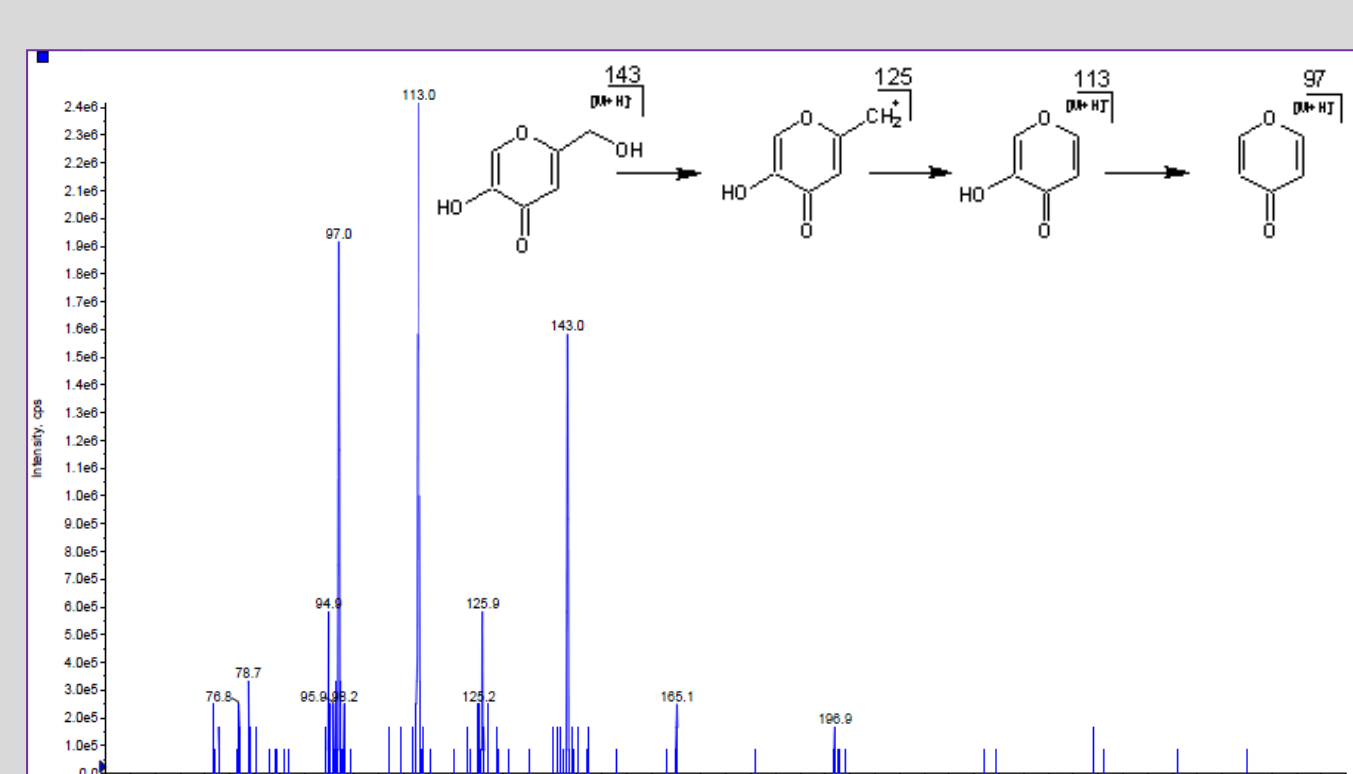


Abb. 2: Fragmentationen der Kojisäure

Um störende Einflüsse von Matrixbestandteilen und hohen organischen Lösemittelanteilen (s. Abb. 3) zu minimieren, wurde eine Methode entwickelt, die zur Isolierung des Analyten aus der Probenmatrix geeignet ist (s. Abb. 4).

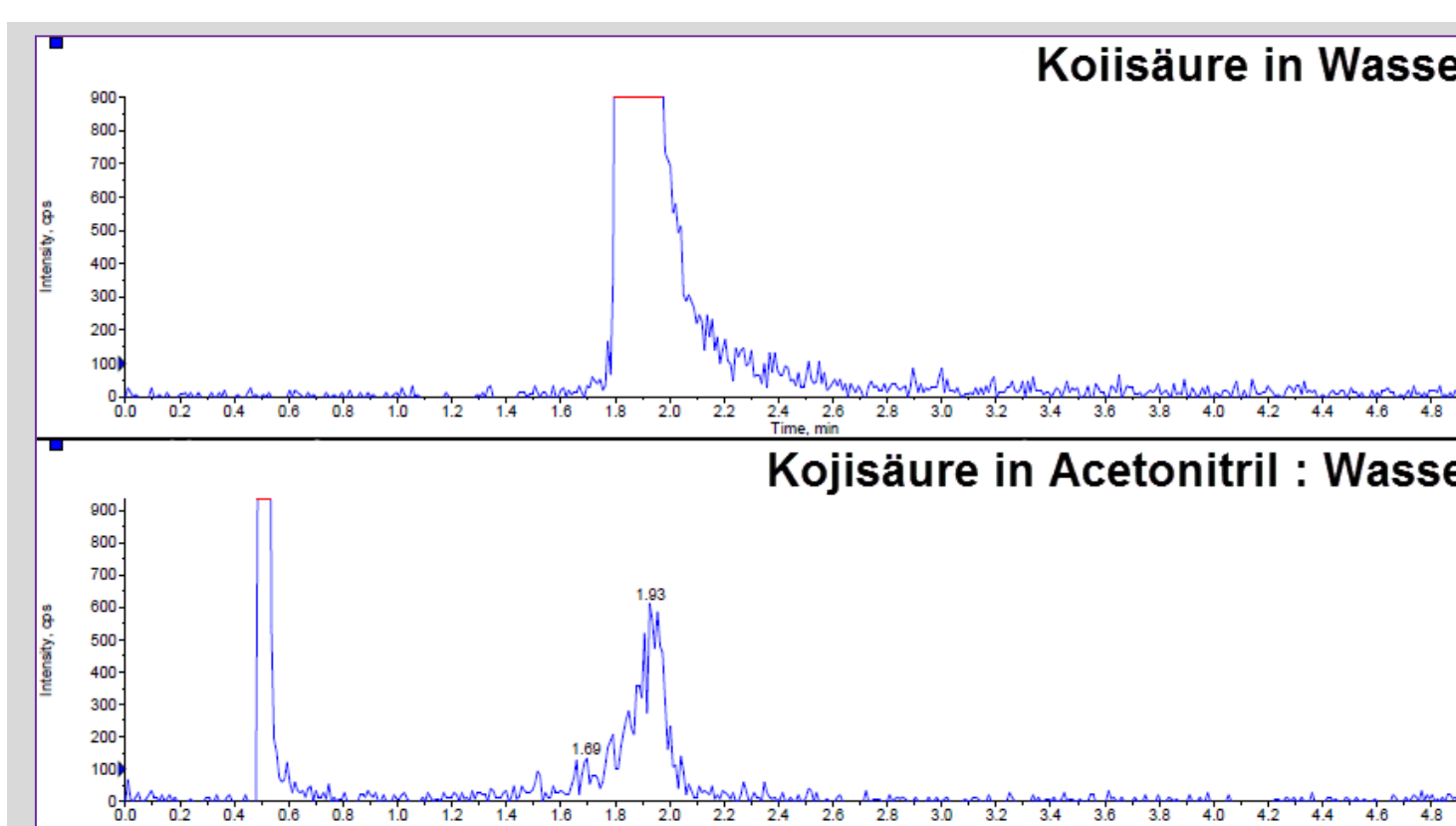


Abb. 3: Kojisäure in H<sub>2</sub>O vs. ACN:H<sub>2</sub>O(1:1) Abb. 4: 1 ppm Spiking von Proben

Durch die entwickelte Fällungsmethode kann der Großteil der Probenmatrix aus der Probe entfernt werden. Nach der Isolierung liegt die Kojisäure in einer für die LC-MS/MS-Analyse geeigneten Lösung (Wasser / DMSO 95:5 v/v) vor. Diese Lösung ist über 24 h sowohl bei 5°C als auch bei 25°C stabil (s. Abb. 5)

Neben Linearität (s. Abb. 6) und Präzision (s. Abb. 7) wurden weitere Parameter validiert (s. Tab. 2). Anschließend wurde ein Limitest für den Grenzwert von 1 ppm durchgeführt und es fand eine Quantifizierung des Kojisäuregehaltes sowohl mittels Standardaddition als auch externer Kalibration (ESTD) an verschiedenen Produktionschargen dreier unterschiedlicher Hersteller statt (s. Tab. 1).

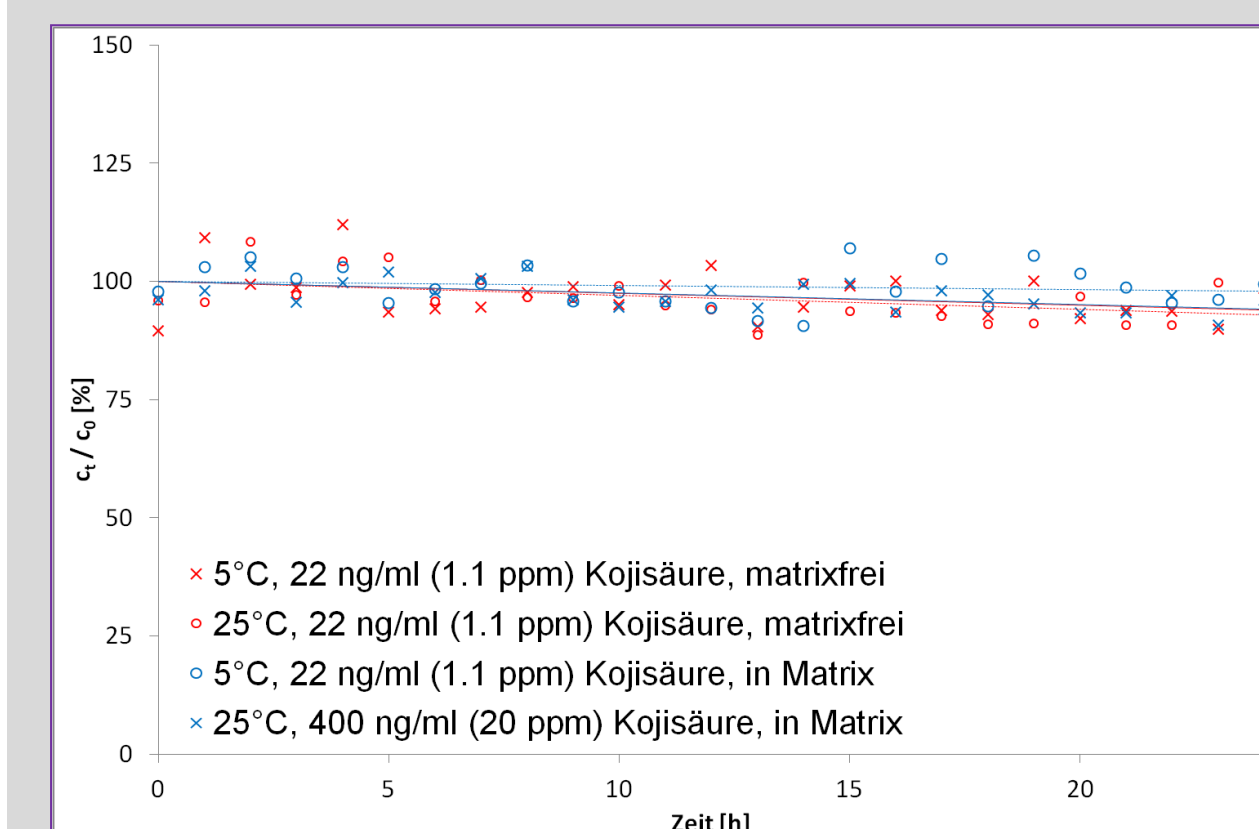


Abb. 5: Stabilität in Lösung

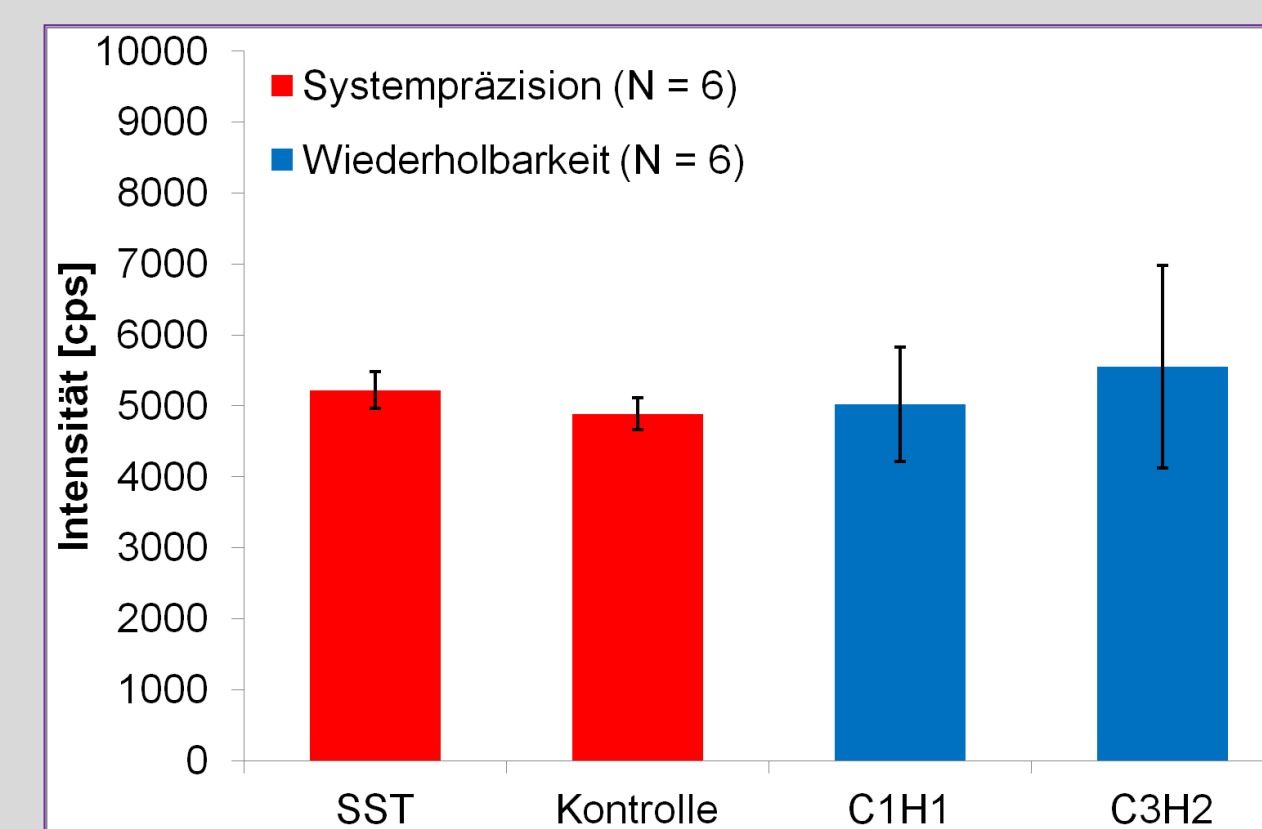


Abb. 7: Präzision der Methode

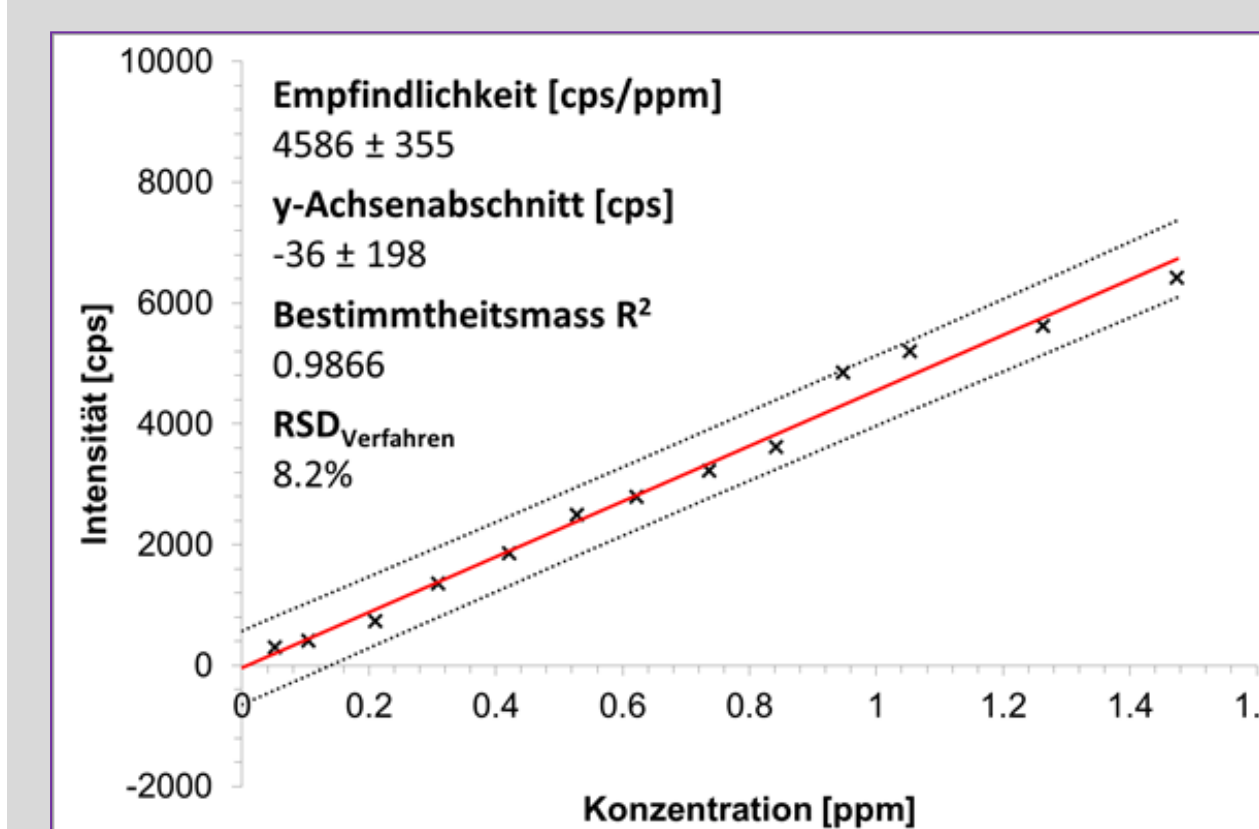


Abb. 6: Linearität ESTD Kojisäure

Tab. 1: Kojisäuregehalt in Proben

Charge	Limit Test	Gehalt	Kalibrierung
C1H1	<1ppm	< 0.2 ppm	ESTD
C1H2	<1ppm	nicht detektiert	ESTD
C2H2	<1ppm	nicht detektiert	ESTD
C3H2	<1ppm	nicht detektiert	ESTD
C4H2	<1ppm	nicht detektiert	ESTD
C1H3	<1ppm	0.04 ppm	Standard-addition

Tab. 2: Zusammenfassung der Validierung

Charakteristische Kenngrösse	Limit	Ermittelter Wert
LOD	S/N $\geq 3$	0.05 ppm (1 ng/ml, 0.01 ng)
LOQ	S/N $\geq 10$	0.2 ppm (4 ng/ml, 0.04 ng)
RSD <sub>Verfahren</sub>	$\leq 30\%$	7.8% – 11.2%
Wiederfindung (ESTD: LOD - 1.5 ppm)	70% – 130%	78% – 126% ( $\emptyset = 86\%$ )
Systempräzision (N=6), ESTD: 1 ppm	$\leq 10\%$ (SST)	RSD = 4.3% – 4.7%
Systempräzision (N=6), Proben < 1 ppm	$\leq 30\%$	RSD = 5.2% – 29.0%
Wiederholbarkeit (N=6), Proben 1 ppm Spike	$\leq 30\%$	RSD = 15.4% – 24.5%

## SCHLUSSFOLGERUNG

Durch das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren, konnte mit ausreichender Nachweisstärke bewiesen werden, dass alle untersuchten Produktionschargen keine toxikologisch relevanten Gehalte an Kojisäure aufweisen.

Überdies weist die beschriebene Methode auf Grund der ermittelten Validierungsdaten zur Robustheit, Selektivität, Präzision und Empfindlichkeit das Potential auf, als generische Methode zur Bestimmung von Kojisäure in unterschiedlichen Anwendungsgebieten zu dienen.

## REFERENZEN

- [1] Rosfarizan Mohamad, M. S. Mohamed, N. Suhaili, und M. S. Madihah, „Kojic acid: applications and development of fermentation process for production“, Biotechnol. Mol. Biol. Rev., Bd. 5, Nr. 2, S. 24–37, Apr. 2010.  
[2] G. J. Nohynek, D. Kirkland, D. Marzin, H. Toutain, C. Leclerc-Ribaud, und H. Jinnai, „An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid“, Food Chem. Toxicol., Bd. 42, Nr. 1, S. 93–105, Jan. 2004