



Dexamethason-Chlooramfenicol-Polymixine B 0,5 mg/ml-2,5 mg/ml-10.00 IE/ml oordruppel

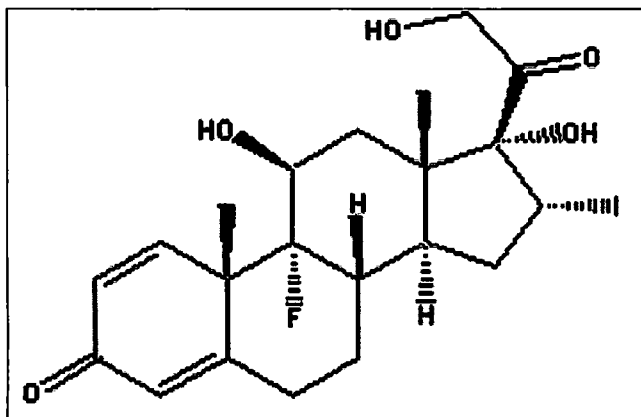
Hai Holthuysen, Vera Godding

Laboratorium Apotheek Viecuri Medisch Centrum
voor Noord-Limburg
Tegelseweg 210, 5912 BL Venlo
hholthuysen@viecuri.nl

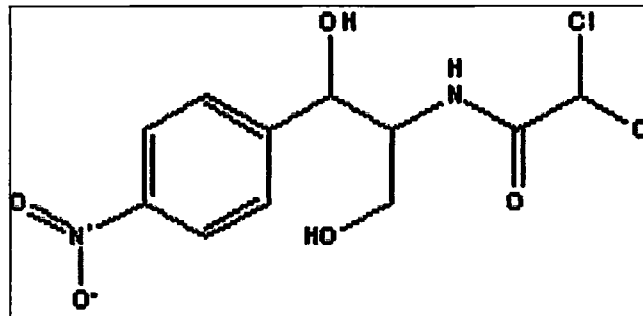
Inleiding

De combinatie van een corticosteroïd met een antimicrobieel middel is zelden geïndiceerd in het oor. Deze oordruppels vinden wel toepassing bij chirurgische ingrepen aan het middenoor, bij posttraumatische aandoeningen en in sommige gevallen van otitis externa waarbij een conservatieve behandeling onvoldoende werkzaam is.

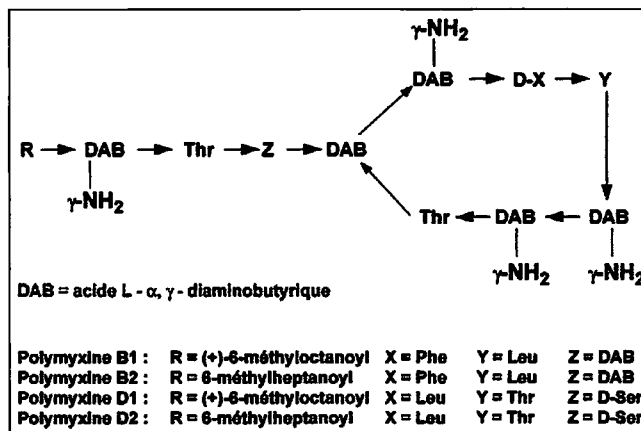
Zoals te zien in de onderstaande structuurformules handelt het om drie totaal verschillende componenten, waarbij de structuur van Polymixine B bijzonder in het oog springt. Polymixine B sulfaat is een mengsel van polypeptides, dat bestaat uit polymixine B1, B2, B3 en B1-l. Polymixine B1 is hierin het hoofdbestanddeel. Volgens de Merck Index 11e editie heeft polymixine B1 de brutoformule $C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$ en een molecuulmassa van 1202. Deze grote molecuulmassa (> 500) maakt polymixine eigenlijk ongeschikt voor een kwantitatieve analyse waarbij gebruik wordt gemaakt van reversed phase chromatografie. Dexamethason en chlooramfenicol hebben beiden een molecuulgewicht kleiner dan 500 en vormen geen probleem bij het opzetten van een chromatografische analyse. Tijdens het uitgevoerde onderzoek kwam naar voren dat het toch mogelijk is polymixine B1 te bepalen, weliswaar semi-kwantitatief. Derhalve werden de vrijgifte grenzen voor polymixine B1 verruimd van de REFPA eis 90 – 110% voor apotheekbereidingen naar de eigen apotheeknorm 80 – 120%.



Dexamethason



Chlooramfenicol



Polymixine B-sulfaat

Materialen en methode

HPLC-systeem

Het HPLC systeem bestaat uit een Alliance 2695 Separation Module met een 996 Photo Diode Array detector. De analytische kolom is een Symmetry C8 (150 x 3,9 mm i.d), 5 μ m (Waters, Etten-Leur, part no. WAT 200655). Het eluens bestaat uit een mengsel van een 0,1 M KH_2PO_4 buffer op pH = 2,3 gebracht met fosforzuur 17% en acetonitril in een verhouding 81-19. De flow bedraagt 2,0 ml/min. De detectie vindt plaats bij 254 nm voor dexamethason DNF, 278 nm voor chlooramfenicol en 210 nm voor polymixine B1 sulfaat. Het injectievolume is 30 μ l.

Grondstoffen en reagentia

Kaliumdiwaterstoffosfaat (Bufa B.V.)
 Lichrosolv® Acetonitril (VWR International)
 Methanol p.a. (VWR International)
 Fosforzuur 85% p.a. (VWR International)
 Dexamethason dinatriumfosfaat (Bufa B.V.)
 Chlooramfenicol (Bufa B.V.)
 Polymyxine B sulfaat (Fagron)
 Clozapine
 Interne standard (istd) = Clozapine (1,0 mg/ml in methanol)

Standaarden:

Los op in afzonderlijke maatkolven:
 Weeg af 16,41 mg dexamethason DNF en los op in 25,0 ml methanol (oplossing A).
 Weeg af 62,18 mg chlooramfenicol en los op in 25,0 ml methanol (oplossing B).
 Weeg af 31,13 mg polymyxine B sulfaat en los op in 25,0 ml water (oplossing C).

Standaard 50% : 0,5 ml opl. A + 0,5 ml opl. B +
 0,5 ml opl. C + 0,2 ml istd ad
 10,0 ml eluens

Standaard 100% : 1,0 ml opl. A + 1,0 ml opl. B +
 1,0 ml opl. C + 0,2 ml istd ad
 10,0 ml eluens

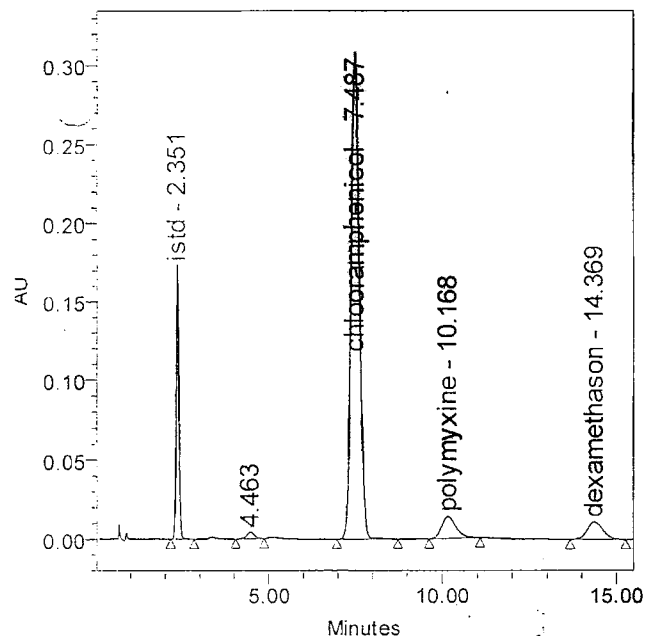
Standaard 150% : 2,0 ml opl. A + 2,0 ml opl. B +
 2,0 ml opl. C + 0,2 ml istd ad
 0,0 ml eluens

Monster:

Monster : 1,0 ml monsteroplossing +
 0,2 ml istd ad 10,0 ml eluens.

Chromatogram

Chromatogram van 100% standaard.



De validatie

De methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende instructie in het laboratorium. Deze is afgeleid van het standaard werkvoorschrift "validatie analysemethoden" SOP 005 van de KNMP.

1. De kalibratiecurve

Er werd een kalibratiecurve gemaakt met concentraties 50,75,100,150 en 200% ten opzichte van het gedeclareerde

gehalte. De punten werden in triplo geanalyseerd. Zie voor de gegevens van de ijklijn de onderstaande tabel.

2. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid werd bepaald door de concentratie niveaus 50, 100, 200% zes maal volgens de bestaande methode uit te voeren. Als eis geldt dat de relatieve standaarddeviatie (R.S.D.) kleiner moet zijn dan 2% voor dexamethason DNF en Chlooramfenicol en <5% voor polymyxine B. Zie voor de waarden van de R.S.D. de onderstaande tabel.

Eis ijklijn	C.C. > 0,99	GOF	R.S.D. < 3%	Bias <3%
Dexamethason DNF	0,9994	21.546	accoord	accoord
Chlooramfenicol	1,0000	479.489	accoord	accoord
Eis ijklijn	C.C > 0,98	GOF	R.S.D. < 10%	Bias <10%
Polymyxine B1	0,9869	978,46	accoord	accoord

Eis herhaalbaarheid	R.S.D <2%	R.S.D <2%	R.S.D <2%
Concentratie	50%	100%	200%
Dexamethason DNF	0.61	0.48	0.41
Chlooramfenicol	0.17	0.30	0.06
Eis herhaalbaarheid	R.S.D <5%	R.S.D <5%	R.S.D <5%
Concentratie	50%	100%	200%
Polymyxine B1	0.99	0.40	1.65

3. Juistheid (recovery)

In vijf afzonderlijke maatkolven werd een hoeveelheid matrix afgewogen overeenkomend met de theoretische hoeveelheid matrix in het monster dat voor de analyse in gebruik wordt genomen. Hieraan werd toegevoegd hoeveelheden van het werkzaam bestanddeel overeenkomend met 50,75,100,150 en 200% van de concentratie van het gedeclareerde gehalte. De afzonderlijke concentraties werden aansluitend geanalyseerd volgens het te valideren voorschrift. Als eis geldt dat de gemiddelde recovery gelijk moet zijn aan $100 \pm 2\%$ voor dexamethason DNF en chlooramfenicol en $100 \pm 10\%$ voor poly-myxine. Zie voor de juistheid de onderstaande tabel.

Eis juistheid	98-102%	98-102%	98-102%	98-102%	98-102%
Concentratie	50%	75%	100%	150%	200%
Dexamethason DNF	98.82	98.25	98.72	99.46	99.46
Chlooramphenicol	101.27	100.10	100.78	101.46	100.46
Eis juistheid	90-110%	90-110%	90-110%	90-110%	90-110%
Concentratie	50%	75%	100%	150%	200%
Polymyxine B1	96.72	97.21	101.02	105.24	107.64

De conclusie

Het is mogelijk om met bovenstaande methode dexamethason DNF, chlooramfenicol en polymyxine B1 sulfaat gelijktijdig te bepalen m.b.v. een reversed phase HPLC systeem. Gelet op de eigenschappen van polymyxine B1 sulfaat hebben wij voor deze component gekozen voor een semi-kwantitatieve methode. Tijdens het onderzoek kwam aan het licht dat de retentietijd van polymyxine B1 sterk veranderd, zelfs bij de kleinste wijziging in de samenstelling van het loopmiddel. Om de verhouding in het loopmiddel constant te houden moet tijdens de analyse gebruik worden gemaakt van een gradiëntpomp waarbij de buffer fractie en de acetonitril fractie door de pomp worden gemengd in de verhouding 81-19.

Literatuur

1. Informatorium Medicamentorum 2005; Winap.
2. CombiROM Winap.