



De analyse van propyleenglycol

A Sinjewel en R.M. Vos

VU medisch centrum

Laboratorium klinische farmacologie en apotheek

Postbus 7057

1007 MB Amsterdam

sinjewel@vumc.nl

rene.vos@vumc.nl

Inleiding

Met belangstelling hebben wij in het laatste Extract de artikelen gelezen over de analyse van alcoholen en metname glycolen [1-2]. In deze artikelen wordt onder andere beschreven dat gaschromatografische analyse van stoffen als ethyleenglycol problemen kan opleveren. Bij het opzetten van een analysemethode voor propyleenglycol (1,2 propaan-diol) hadden we ook problemen door piektailing, maar sterke carry-over maakt gaschromatografische analyse vrijwel onmogelijk. Dit maakte het lastig om een analysemethode te ontwikkelen voor de volgende studie;

Propyleenglycol (1,2 propaan-diol) is een additief dat gebruikt wordt om apolaire geneesmiddelen, bijv. lorazepam, diazepam en fenytoïne in een waterige oplossing te brengen. In deze oplossingen varieert het percentage propyleenglycol tussen de 35 en 80%. Langdurige toediening kan resulteren in accumulatie van propyleenglycol met toxische effecten als nierfunctiestoornissen. In het VUmc zijn er de laatste jaren meerdere studies uitgevoerd waarbij hoge doses lorazepam, en dus ook propyleenglycol, zijn toegediend. Zijn er bij deze patiëntengroep hoge concentraties propyleenglycol aanwezig die gezondheidsschade kunnen toebrengen?

Methodeontwikkeling

Omdat het ontwikkelen van een gaschromatografische methode veel problemen opleverde is er gezocht naar een alternatief. LC-MS is een mogelijkheid, maar ten tijde van de studie was dit nog onvoldoende geïmplementeerd. Door de hoge polariteit van propyleenglycol is vloeistofchromatografie erg lastig. Tevens ontbreekt een chromofoor. De oplossing is uiteindelijk gevonden in derivatisering met benzoyl-chloride in basisch milieu. Door te derivatiseren wordt er een benzeengroep toegevoegd, waardoor er een chromofoor beschikbaar is en een molecuul ontstaat dat retentie geeft op het meest eenvoudige LC systeem.

Derivatisering is een techniek die al sinds de zeventiger jaren van de vorige eeuw wordt gebruikt en vele toepassingen kent. Helaas is de bepalingsgrens in publicaties van de analyse van diolen na derivatisering te hoog voor de gevraagde toepassing [3]. Een tweede nadeel is de beperkte selectiviteit van het derivatiseringsreagens. Co-medicatie kan de analyse sterk verstoren. Na optimalisatie en uitgebreide validatie is er een methode ontwikkeld waarmee concentraties van enkele milligrammen propyleenglycol per liter kunnen worden gemeten. Hier wordt de methode kort beschreven, de volledige methode is gepubliceerd in Chromatographia [4].

Materiaal en Methode

Alle grondstoffen voor het bereiden van standaarden en controles zijn minimaal 99,5% zuiver en afkomstig van Sigma. Overige chemicaliën zijn afkomstig van VWR en HPLC kwaliteit. Door het gebruik van polypropyleen cupjes is alle contact met glazen voorwerpen, waaraan absorptie zou kunnen ontstaan, voorkomen.

Standaarden en controlemonsters

Een propyleenglycol werkoplossing van 0,10 mg/mL werd dagelijks vers bereid door een stockoplossing van 1,00 mg/mL 10 keer te verdunnen met gedeïoniseerd water. Hieruit zijn standaarden in blanco plasma bereid met concentraties van 5, 10, 20, 40, 60 and 100 mg/L. Validatiemonsters zijn gemaakt door blanco plasma te spiken tot concentraties van 10, 50 en 100 mg/L met een tweede charge propyleenglycol grondstof.

Monsterbewerking

- Pipetteer 100 μ L plasma in een polypropyleen cupje.
- Voeg 100 μ L water en 10 μ L interne standaard (ethyleenglycol 0.3 mg/ml) toe en meng.
- Voeg 250 μ L 4 M NaOH en 5 μ L benzoylchloride toe.
- Deriviseer de monsters door 10 minuten te mengen met een rotatiemenger.
- Laat de monsters 10 minuten staan.
- Extraheer met 400 μ L pentaan gedurende 20 minuten met een rotatiemenger.
- Breng het supernatant over in een schoon cupje.
- Blaas droog onder stikstof bij kamertemperatuur.
- Los het residu op in 150 μ L eluens.
- Injecteer 25 μ L op het HPLC systeem.

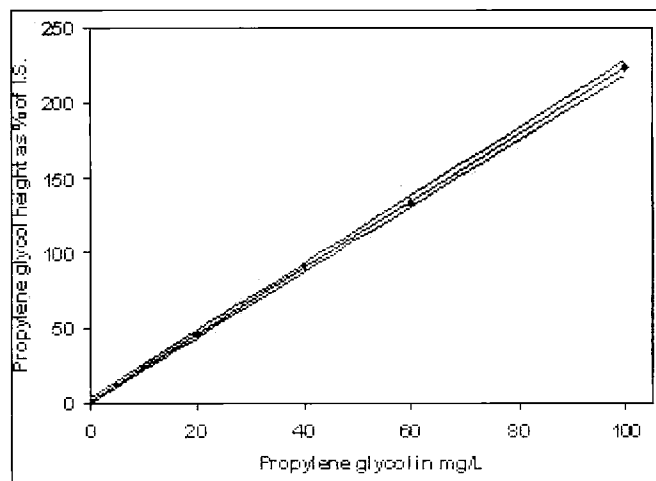
HPLC-systeem

Het HPLC-systeem bestaat uit een UV 6000 LP diode array detector (Thermo-Electron), een Waters 717+ autosampler, een Dionex P680 pomp en een PC met Chromeleon software. Als analytische kolom is gebruik gemaakt van een 100x3 mm Varian Pursuit RP-8 (100 x 3 mm, 5 µm) met een 10x2 mm RP-8 guard kolom. De mobiele fase is een mengsel van 55 v/v % ACN en 45 v/v % water en werd dagelijks vers bereid. De analyse werd uitgevoerd met een flow van 0,75 ml/min bij kamertemperatuur.

Validatie

De methode is uitgebreid gevalideerd. Dit resulteerde in een bepalingsgrens van 1 mg/L en een lineair bereik tot 100 mg/L. Zie figuur 1 voor een kalibratiecurve. De juistheid en precisie van de validatiemonsters zijn weergegeven in tabel 1.

Selectiviteit van de methode is getest voor lorazepam (test concentratie 2 mg/L), ethanol, benzyl alcohol en polyethyleen glycol (PEG). Benzyl alcohol en PEG zijn veelgebruikte additieven bij injectievloeistoffen. Er zijn geen interfererende pieken gevonden bij testconcentraties van 5 g/L. De stabiliteit van de monsters is getest voor patiëntenmateriaal en voor gespikete controlemonsters. Er is geen significante afname geconstateerd gedurende 12 maanden.



Figuur 1. Kalibratiecurve

Concentratie (mg/L)	Intraday		Interday	
	Juistheid	Precisie (C.V.)	Juistheid	Precisie (C.V.)
10	98.9 %	5.0 %	101.0 %	4.7 %
50	94.6 %	7.8 %	96.7 %	7.3 %
100	104.7 %	6.9 %	104.8 %	6.9 %

Tabel 1. Juistheid en precisie van de validatiemonsters.

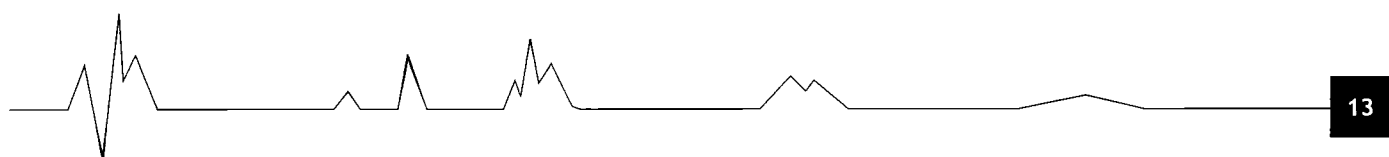
Resultaten

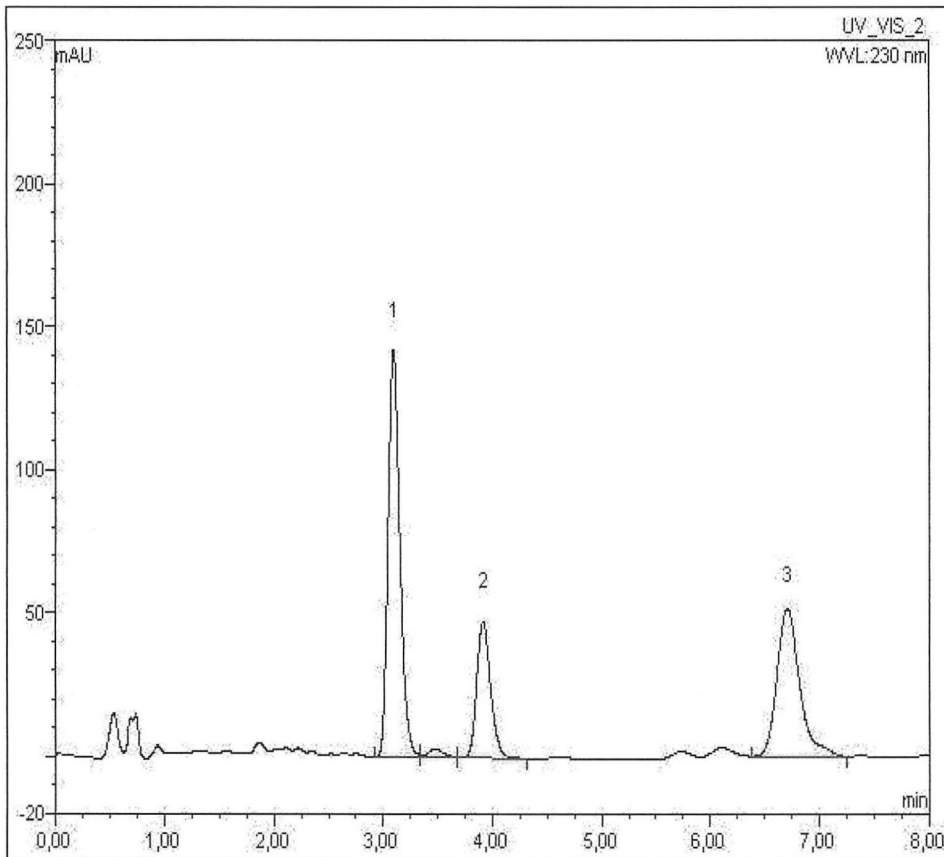
Analyse van alle studiemonsters resulteerde in plasma spiegels van 5-98 mg/L. Een representatief chromatogram van een studiemonster dat 20 mg/L propyleenglycol bevat is weergegeven in fig. 2.

De studie is later uitgebreid met analyse in dialysaat na CVVH (continuous-veno-venous hemofiltration). Na een beperkte validatie is geconstateerd dat de beschreven methode ook geschikt is voor de analyse van propyleenglycol in CVVH vloeistof. Een concentratie-tijd curve is weergegeven in figuur 3.

Conclusie

Met de beschreven methode is het mogelijk om lage concentraties propyleenglycol te meten en deze methode kan worden toegepast bij farmacokinetische studies of bij patiënten met verhoogd risico op accumulatie, bijvoorbeeld door nierfunctiestoornissen. Logischerwijs is het ook mogelijk om de methode te gebruiken voor de analyse van ethyleenglycol met als interne standaard propyleenglycol.

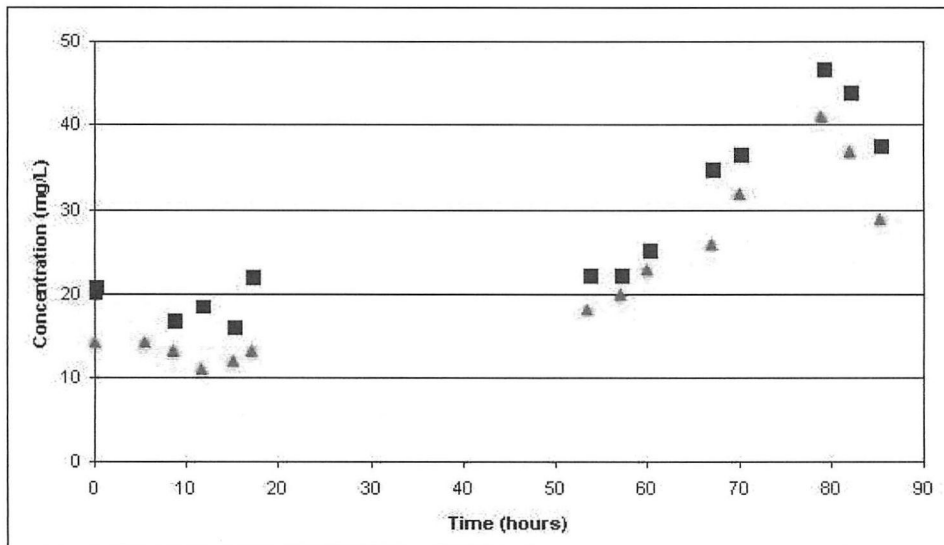




Figuur 2. Studiemonster met een propyleenglycol concentratie van 20 mg/L na derivatisering. Piek 1 = interne standaard, piek 2 = propyleenglycol, piek 3 = onbekend.

Literatuur

1. Bloedalcoholen bepaling met GC-FID op een apolaire kolom. E. Olijslager en R. Langen. *Extract* 2007 18-3 (9-13)
2. Casusbeschrijving ethyleenglycol intoxicatie. M. Kerskes, I. Wiltgen en M. Duisenberg van Essenbergh. *Extract* 2007 18-3 (14-15)
3. Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography. P.A. Vollmer, D.C. Harty, N.B. Erickson, A.C. Balhon en R.A. Dean. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1996 285-2 (370-374).
4. LC determination of propylene glycol in human plasma after pre-column derivatization with benzoyl chloride. A Sinjewel, E.L. Swart, H Lingeman en A.J. Wilhelm. *Chromatographia* 2007 66: 1-2 (103-105)



Figuur 3. Concentratie-tijd curve van een patient met een nierfunctiestoornis. ■ concentratie in plasma, Δ concentratie in CVVH vloeistof.