



HPLC bepaling van gentamicine na derivatisering met ortho-phthalaataldehyde

Hugo M. Ranft

Abstract: Een reversed-phase high-performance liquid chromatografische bepaling is opgezet voor gentamicine na derivatisering. De derivatisering is uitgevoerd met OPA (ortho-phthalaataldehyde) reagens. gentamicine bestaat uit een 3-tal actieve componenten (gentamicine C1 (20-40 %), gentamicine C1A (10-30 %) en gentamicine C2 (40-60 %)). De bepaling is uitgevoerd met een Hypersil C18 150 mm * 4.6 µm 5 mm id. kolom. Detectie wordt uitgevoerd via UV-detectie bij 330 nm. De methode is opgezet ter vervanging van de huidige gehaltebepaling voor gentamicine. De gebruikte toedieningsvorm van gentamicine is 10 mg/10 ml. De oude bepaling verliep via immuno-assay-meting en had een niet acceptabele afwijking van meer dan 10%. Omdat de declaratie van het preparaat als totaal gentamicine-gehalte wordt opgegeven, is dit als wens neergelegd voor de nieuwe bepaling. Door het vergelijken van responsfactoren (die vergelijkbaar zijn met molaire extinctiecoëfficiënten) is het bewijs geleverd dat de afzonderlijke actieve componenten als 1 totaal gentamicinegehalte berekend mogen worden. Het meetbereik voor gentamicine C1, C1A en C2 is respectievelijk vastgesteld op 0.08 – 0.67, 0.06 – 0.50 en 0.11 – 0.87 mg/ml. Tevens voldoen de inter- en intradag variaties op 3 verschillende niveaus (80, 100 en 120 % van de declaratie) aan de gestelde eis van < 3%. De juistheid voldoet ook aan de gestelde eisen. Het meetbereik is vastgesteld op 0.3 – 2.0 mg/ml voor gentamicine. De inter- en intradag variaties en juistheid voldoen hier eveneens op de 3 verschillende niveaus aan de gestelde eis < 3%.

Sleutelwoorden

gentamicine, derivatisering, opa, vloeistofchromatografie

Inleiding

Het klassieke begrip antibioticum (1) heeft betrekking op stoffen van organische oorsprong die ziekteverwekkers (met name bacteriën) bestrijden, dit naast chemotherapeutica. Een voorbeeld van deze laatste categorie zijn middelen als Salvarsan en de groep van de sulfonamiden.

Tegenwoordig wordt dit onderscheid niet meer gemaakt en spreekt men bij alle stoffen die aan mensen kunnen worden toegediend om bacteriële infecties te bestrijden over antibiotica. Met de term chemotherapeutica wordt tegenwoordig meer de antikankermiddelen bedoeld. Er zijn 2 belangrijke

groepen antibiotica: de bacteriedodende (bactericide) en de bacterieremmende (bacteriostatisch).

Het eerste antibioticum, penicilline, werd in 1928 door Alexander Fleming ontdekt als de werkzame stof van de penseel-schimmel. Pas in 1941 verschenen de eerste publicaties over toepassingen bij de mens. De ontdekking van antibiotica betekende een doorbraak in de bestrijding van ziektekiemen.

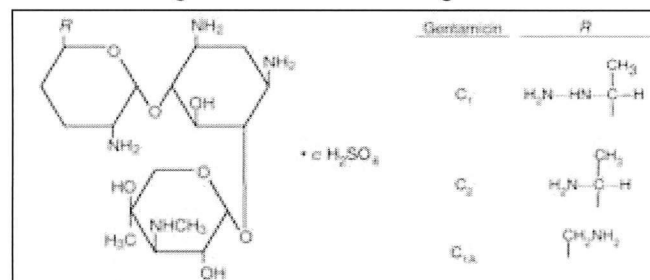
Antibiotica kunnen in meer of mindere mate micro-organismen beïnvloeden en worden op grond daarvan ingedeeld naar de breedte van het werkings spectrum. Dit spectrum is in 4 hoofdgroepen onder te verdelen t.w. smalspectrum (o.a. benzylpenicilline), minder smalspectrum (o.a. ampicilline), breedspectrum (tetracyclines en aminoglycosiden) en deelspectrum hoofdzakelijk werkend op de Gram-negatieve bacteriën of werking op een bepaald micro-organisme.

Gentamicine is een antibioticum dat onder de breedspectrumantibiotica van de aminoglycoside groep valt. Deze stoffen remmen de eiwitsynthese van de bacteriën door zich te binden aan het 30S-ribosoom en interfereren met het translatie proces. Gentamicine is binnen ons ziekenhuis een veel toegepast antibioticum.

Gehaltebepalingen van gentamicinehoudende producten worden op dit moment uitgevoerd met een TDX-analyser. Uit kwaliteitsoogpunt en dan in het bijzonder vanuit de GMP-Z is dit niet langer verantwoord. De spreiding van de methode bedraagt meer dan 10%. Hierdoor is op het QC lab dan ook de vraag neergelegd om een robuuste gevalideerde methode op te zetten.

Gentamicinesulfaat is een stof die uit een 3-tal componenten bestaat die alle 3 actief zijn. Deze componenten worden in fig. 1 weergegeven.

Fig. 1 structuurformules gentamicinesulfaat



Deze 3 gentamicinecomponenten komen in de volgende verhouding voor: C1 20 – 40%, C1A 10 – 30 % en C2 40 – 60 %. De exacte verhouding is vastgesteld op basis van piekoppervlakteverhouding. De opdracht omschrijft dat, indien mogelijk, de 3 componenten als 1 gehalte gentamicine moet worden weergegeven. Het bewijs hiervoor kan geleverd worden door de afzonderlijke specifieke extinctie-coëfficiënten (Es) met elkaar te vergelijken. Deze parameter is verweven in de wet van Lambert-Beer (2,3) ($E = E_s \cdot l \cdot c$). In het geval van een HPLC-bepaling is dit af te leiden uit de respons factor (piekarea = $R_f \cdot l \cdot c$). Indien de Es (R_f) van de 3 componenten statistisch gelijk zijn ($VC < 7.5\%$) is het bewijs geleverd dat ze hetzelfde zijn. Indien dit het geval is mogen de afzonderlijke gehalten worden opgeteld tot een totaal gehalte gentamicine.

Uit de structuurformule blijkt dat gentamicine geen tot zeer weinig UV-absorptie (ontbreken van chromofore groepen) zal vertonen. Literatuuronderzoek (4) heeft uitgewezen dat fluorescentiedetectie veruit het meest wordt toegepast. Voor het kwantificeren van gentamicine ontbreekt een dergelijke soort detectiemethode op het lab (Aanschaf zou een relatief dure oplossing zijn). Een andere optie is om de detectie toch via UV uit te voeren waarbij gentamicine wordt gederivatiseerd. De achterliggende gedachte hierbij is om via een thermische reactie een andere wel UV-actieve stof, in dit geval thioglycolzuur (fig. 2) met o-phthalaaldehyde (opa (fig. 3)), in de gentamicinesulfaatstructuur in te bouwen. Het opa zal in basisch milieu reageren met de primaire amine groepen van gentamicinesulfaat. De nu gevormde producten kunnen via HPLC-UV detectie bepaald en gekwantificeerd worden. Fig. 4 laat het op 1 primair amine gederivatiseerde gentamicine zien.

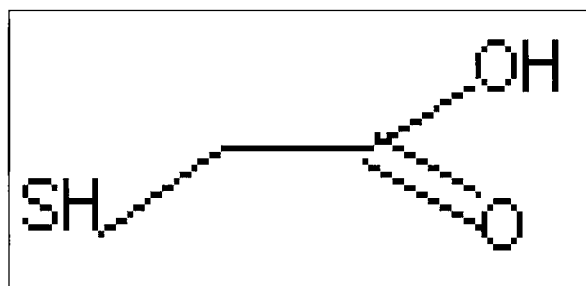


Fig. 2 structuurformule van thioglycolzuur

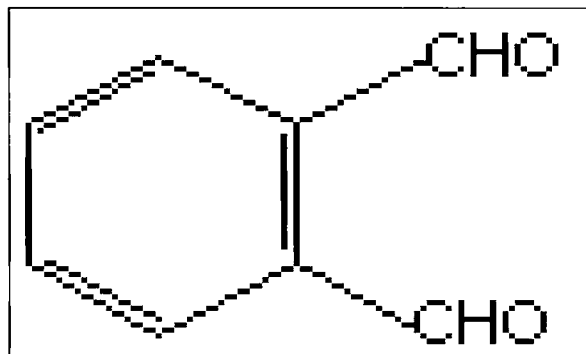


Fig. 3 structuurformule van opa

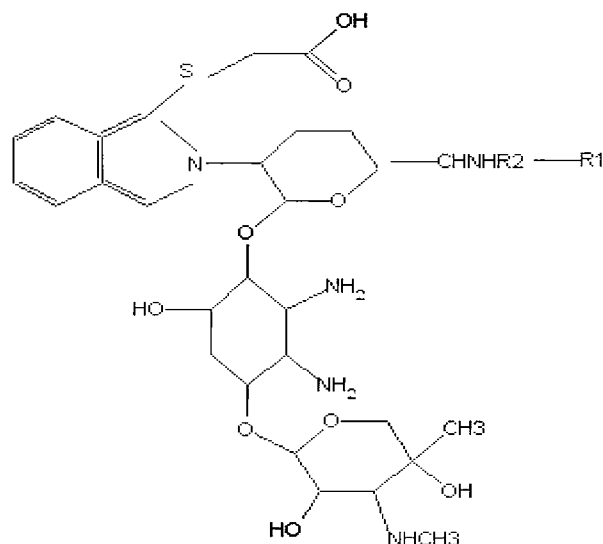


Fig. 4 structuurformule van gederivatiseerde gentamicine op 1 primaire aminogroep

Methode/werkwijze

Reagentia:

Gentamicine 40 mg/ml ampul (Cetrafarm) gecertificeerd.
Methanol HPLC-grade (Merck).
Aziijnzuur p.a. (Merck).
Natriumhydroxide p.a. (Merck).
O-phthalaaldehyd for synthesis (Merck).
Boorzuur p.a. (Merck).
Octaansulfonzuur p.a. voor ion-pair chromatography (Merck).
Thioglycolzuur synthese kwaliteit (Merck).
2-Propanol p.a. (Merck).
Boorzuur 0.4 M: 2,47 g boorzuur in 100 ml water.
Natronloog 8 M: 32 g natriumhydroxide in 100 ml water.
Derivatiseringsreagens: 1 g o-phthalaaldehyde in 5 ml Methanol. Voeg hieraan toe 95 ml boorzuur 0.4 M. Breng op pH 10.4 met 8 M NaOH. Voeg hieraan toe 2.00 ml thioglycolzuur en breng op pH 10.4 met 8 M NaOH.

Standaarden

Stockoplossing:

Verdun 4.00 ml uit een 40 mg gentamicine/ml ampul naar 50.0 ml en vul aan met demiwater. (concentratie 3.2 mg gentamicine/ml)

Werkoplossing:

Std 1 Verdun 1.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.
Std 2 Verdun 2.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.
Std 3 Verdun 3.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Std 4 Verdun 4.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Std 5 Verdun 5.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Std 6 Verdun 6.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Std 7 Verdun 7.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Std 8 Verdun 8.00 ml stock in 50.0 ml maatkolf en vul aan met demi water.

Uit piekarea verhoudingen zijn de volgende concentraties voor de afzonderlijke componenten bepaald:

Gentamicine C1:

(std1 $\approx$ 0,084 mg/ml, std2 $\approx$ 0,167 mg/ml, st3 $\approx$ 0,251 mg/ml, std4 $\approx$ 0,335 mg/ml, std5 $\approx$ 0,419 mg/ml, std6 $\approx$ 0,502 mg/ml, std7 $\approx$ 0,586 mg/ml en std8 $\approx$ 0,670 mg/ml).

Gentamicine C1A:

(std1 $\approx$ 0,063 mg/ml, std2 $\approx$ 0,126 mg/ml, st3 $\approx$ 0,189 mg/ml, std4 $\approx$ 0,252 mg/ml, std5 $\approx$ 0,315 mg/ml, std6 $\approx$ 0,378 mg/ml, std7 $\approx$ 0,441 mg/ml en std8 $\approx$ 0,504 mg/ml).

Gentamicine C2:

(std1 $\approx$ 0,109 mg/ml, std2 $\approx$ 0,219 mg/ml, st3 $\approx$ 0,328 mg/ml, std4 $\approx$ 0,437 mg/ml, std5 $\approx$ 0,547 mg/ml, std6 $\approx$ 0,656 mg/ml, std7 $\approx$ 0,765 mg/ml en std8 $\approx$ 0,874 mg/ml).

De gehalten zijn omgerekend naar de absolute declaratie van 1 mg/ ml Gentamicine.

Monsters:

Er wordt gewerkt met productiemonster van 10 mg/ 10 ml.

Verdun 25.0 ml monster naar 100.0 ml en los op en verdun met demiwater.

Apparatuur

Het HPLC-systeem (4) is een modulair Agilent HP1100 met VWD (variabele golflengte detector). De analytische kolom is een Hypersil BDS C18 150 mm * 4.6 5 μ m voor IPC (lon-

pair chromatography). Het eluens bestaat uit een mengsel van 700 ml Methanol, 250 ml Aqua dest, 50 ml azijnzuur en 1 g octaansulfonzuur. De flow bedraagt 1.5 ml/min. Detectie vindt plaats bij 330 nm. Het injectievolume is 20 μ l. De analysetijd onder deze omstandigheden is 15 min.

Onder deze omstandigheden zullen de 3 componentpieken elueren op: component C1: 8.0 min, component C1A: 10.56 min en component C2: 12.67 min. De analyse zal uitgevoerd worden op basis van piekoppervlakken.

Derivatisering

Pipetteer 10.0 ml monster of werkstandaard in een maatkolf van 25.0 ml. Voeg hieraan toe 5 ml 2-propanol en 4.00 ml derivatisering reagens. Vul aan met 2-propanol. Meng en vul aan. Zet deze oplossingen gedurende 15 min in een waterbad van 60 °C. Laat afkoelen en injecteer.

Resultaten/Discussie

Prevalidatie:

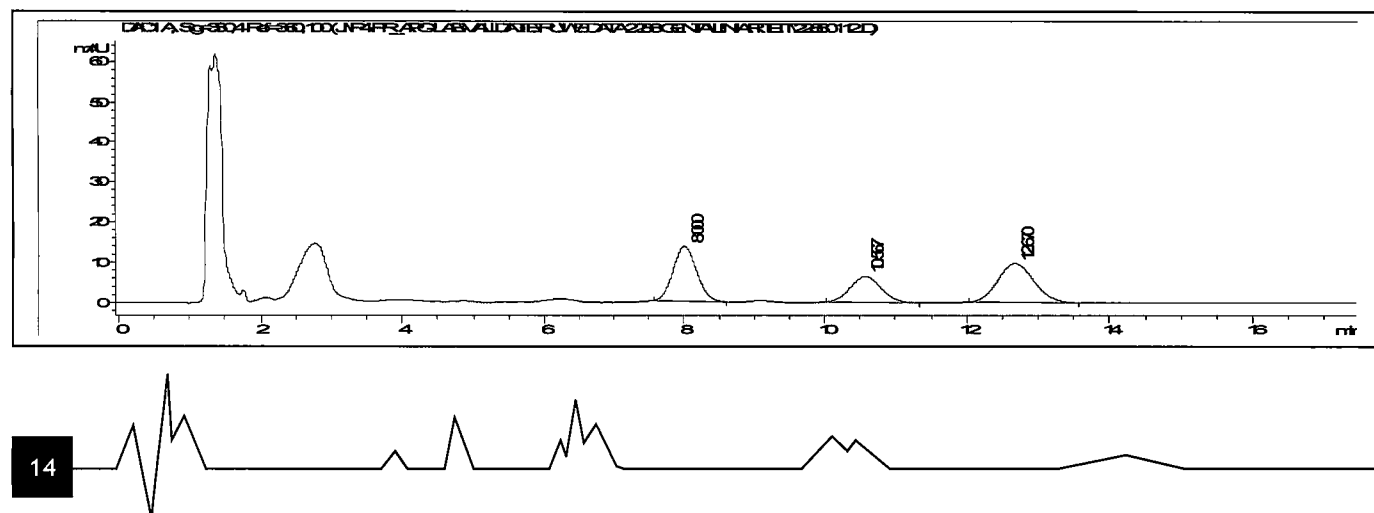
De eerste stap is om de methode te controleren op specificiteit en selectiviteit. Voor de specificiteit is in 6-voud een blanco matrix monster bereid zonder gentamicine.

De selectiviteit van de methode is vastgesteld door gentamicinesulfaat onder stresscondities weg te zetten.

Deze stresscondities waren: zuur, loog, verhoogde temperatuur (78 °C), UV licht en zuur bij een temperatuur van 78 °C.

Uit de specificiteitstesten is gebleken dat er geen interactie zal optreden. Er is geen storing van de matrix aangetoond. De monsters voor de selectiviteit hebben eveneens geen noemenswaardige problemen laten zien. De ontwikkelde methode is dus selectief en specifiek te noemen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de validatie geen problemen zal geven.

Fig. 5 chromatogram gentamicine na derivatisering standaard 3



Validatie (5):

1. Lineariteit:

Voor het bepalen van de lineariteit is een stockoplossing gemaakt. Hieruit zijn in 3-voud 8-punts kalibratielijnen gemaakt welke gebaseerd zijn op 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 en 200 % van het gedeclareerde gehalte. De eis die hier aangesteld wordt is $R > 0.999$. Toetsing vindt plaats via Anova-berekening.

Voor het bepalen van de individuele gehalten is de volgende berekening toegepast:

$\text{pa C1} / (\text{pa C1} + \text{pa C1A} + \text{pa C2}) \cdot 100 \cdot \text{gehalte standaard} \cdot x \cdot \text{vm}$

Hierin is pa het piekarea en x std 1, std 2 enz. en vm verdunningsfactor monster.

Dit resulteerde in onderstaande kalibratiecurves.

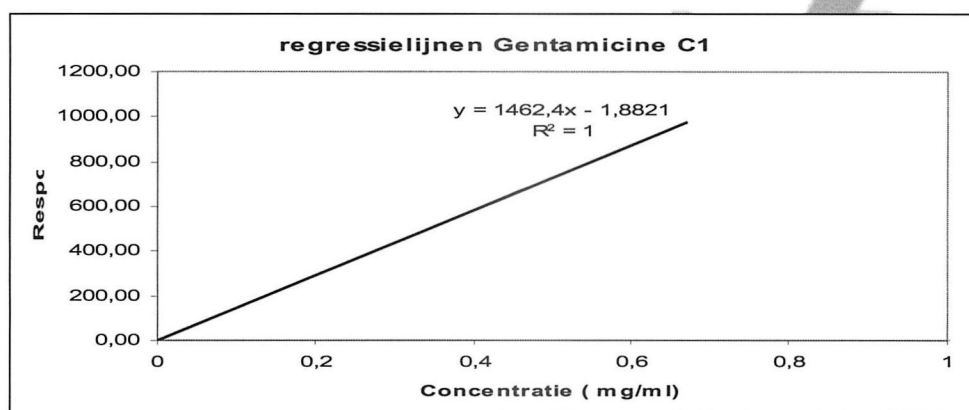


Fig. 6 Liniariteit van de 3-voudige kalibratielijijn van Gentamicine C1.

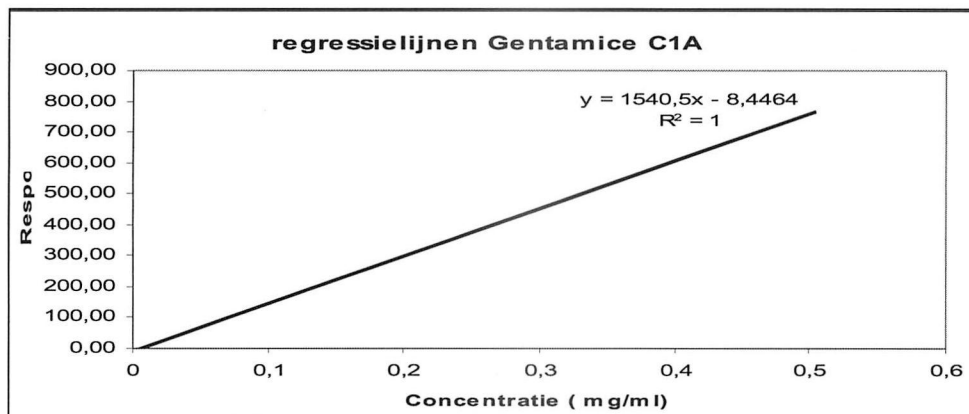


Fig. 7 lineariteit van de 3-voudige kalibratielijijn van Gentamicine C1A

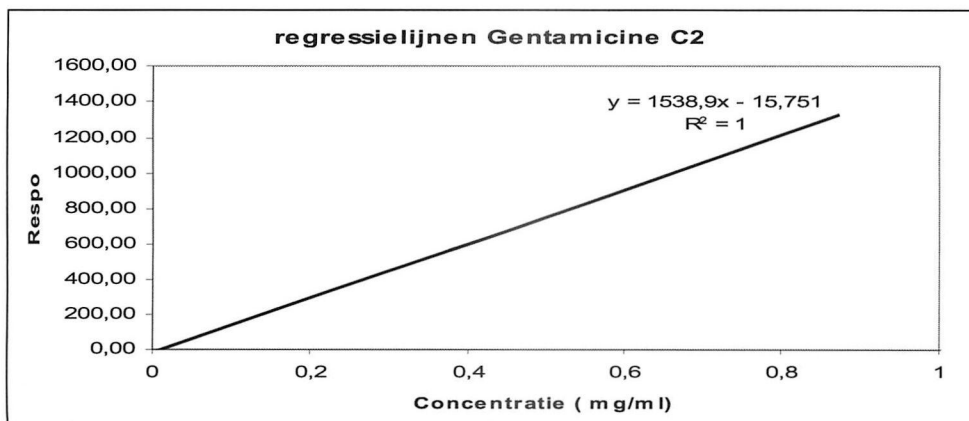


Fig. 8 lineariteit van de 3-voudige kalibratielijijn van gentamicine C2

parameter	Comp C1	Comp C1A	Comp C2
Bereik (mg/ml)	0.08 – 0.67	0.06 – 0.50	0.11 – 0.87
As afsnede	Geen significante afwijking t.o.v. "0"	Geen significante afwijking t.o.v. "0"	Geen significante afwijking t.o.v. "0"
Correlatiecoëfficiënt.	0.9997	0.9997	0.9994
Lack Of Fitt	Geen LOF	Geen LOF	Geen LOF

Tabel 1: Overzicht liniariteits parameters berekend via Anova.

Voor het bepalen van de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid zijn een 3-tal zelf gemaakte productie monsters gemaakt met concentraties van 80, 100 en 120 % van het gedeclareerde gehalte.

1. Herhaalbaarheid (interdag variatie):

De herhaalbaarheid werd bepaald door de concentratie van de zelf gemaakte productiemonsters over 3 dagen elk 6 keer te bepalen via de te valideren methode. De eis die hier aan gesteld wordt is een variatiecoëfficiënt < 3%. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Component		80%	100 %	120 %
C1	CV within (%)	0,48	0,55	0,63
C1A	CV within (%)	0,48	0,34	0,48
C2	CV within (%)	0,35	0,75	0,66

Tabel 2: Overzicht herhaalbaarheid op 3 niveaus bij n = 18

1. Reproduceerbaarheid (intradag variatie):

De reproduceerbaarheid werd bepaald door de concentratie van de zelf gemaakt productiemonsters over 3 dagen elk 6 keer te bepalen via de te valideren methode. De eis die hier aangesteld wordt is een variatiecoëfficiënt < 3%. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Component		80%	100 %	120 %
C1	CV between (%)	0,49	0,27	0,72
C1A	CV between (%)	0,20	0,48	0,67
C2	CV between (%)	0,11	0,22	0,91

Tabel 3: Overzicht reproduceerbaarheid op 3 niveaus bij n = 18

1. Juistheid:

De juistheid werd bepaald door de concentratie van de zelf gemaakte productiemonsters over 3 dagen elk 6 keer te bepalen via de te valideren methode. De gemiddelde waarde van elk niveau werd vergeleken met de werkelijke waarde.

	C1	C1A	C2
Juistheid 80 % (mg/ml)	0.269 ± 0.001	0.202 ± 0.005	0.351 ± 0.001
Juistheid 100 % (mg/ml)	0.332 ± 0.001	0.251 ± 0.007	0.436 ± 0.002
Juistheid 120 % (mg/ml)	0.390 ± 0.002	0.296 ± 0.001	0.516 ± 0.003

Tabel 4: Overzicht juistheid op 3 niveaus bij n = 18

Bewijsvoering om individuele gehalten te mogen samenvoegen.

Zoals in de inleiding werd beschreven moet het bewijs worden geleverd via een vergelijk van de specifieke extinctiecoëfficiënt. Deze factor is vergelijkbaar met de respons factor van een chromatografische bepaling. De respons factor van de gevalideerde methode is als volgt berekend: $R_f = \text{Abs}/(l \times c)$

Hierin is:

R_f de respons factor

Abs de piek-area van het individuele kalibratiepunt

l de weglengte van de meetcel van de detector

c de concentratie van het individuele kalibratiepunt

De responsfactoren van alle kalibratielijnen van elke afzonderlijke component zijn statistisch getoetst. Hierdoor waren 72 meetgegevens voorhanden. Dit heeft geleid tot het volgende resultaat:

Parameter	Resultaat	Eis
Overall gemiddelde factor	6.76 E-4	----
CV within run	6.0 %	CV < 7.5 %
CV between run	0.55 %	CV < 7.5 %
CV overall	6.55 %	CV < 7.5 %
N	72	----

Tabel 5: Overzicht respons factor vergelijk

Nu bewezen is dat de 3 componenten met elkaar verrekend mogen worden leiden bovenstaande resultaten uit de tabellen 1, 2, 3, 4, en 5 tot de volgende overall resultaten voor de totale gentamicinedeclaratie.

Parameter	Resultaat	Eisen
<i>Lineariteit</i>		
Bereik	0.3 – 2.0 mg/ml	----
<i>Nauwkeurigheid</i>		
CV within run 80 %	0.30 %	CV < 3 %
CV within run 100 %	0.51 %	CV < 3 %
CV within run 120 %	0.57 %	CV < 3 %
CV between run 80 %	0.09 %	CV < 3 %
CV between run 100 %	0.24 %	CV < 3 %
CV between run 120 %	0.70 %	CV < 3 %
Juistheid 80 % (mg/ml)	0.821 ± 0.003	----
Juistheid 100 % (mg/ml)	1.019 ± 0.004	----
Juistheid 120 % (mg/ml)	1.20 ± 0.01	----

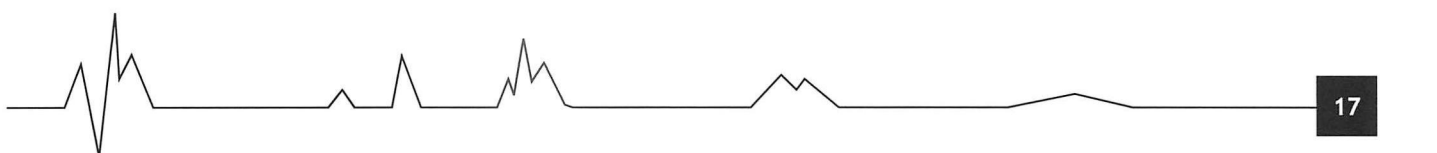
Tabel 6: Overzicht van individuele resultaten tot totale gentamicinegehalte

Parameter	1.0 µg/ml	4.0 µg/ml	8.0 µg/ml
Juistheid (µg/ml)	0.96 ± 0.05	4.12 ± 0.08	8.06 ± 0.18
CV within run (%)	1.90	1.41	1.43
CV between run (%)	4.06	0.94	1.03

Tabel 7: Overzicht van nauwkeurigheid TDX (6)

Conclusies

1. Gentamicine bepalen na derivatisering is een prima alternatief indien er geen fluorescentiedetector voorhanden is. Het is een weinig bewerkelijke methode die snel uitvoerbaar is. De bepaling wordt uitgevoerd via meting op piekoppervlak.
2. Via prevalidatie is de ontwikkelde methode specifiek (geen matrix verstoring) en selectief (geen afbraakproducten van gentamicine die de methode storen) bevonden. Omdat gentamicine uit een 3-tal actieve componenten bestaat is de verhouding van de individuele componenten bepaald aan de hand van de piekoppervlaktes t.o.v. het totale piekoppervlak van de 3 gentamicinecomponenten. De validatie is uitgevoerd voor alle 3 de individuele gentamicine componenten op 3 verschillende niveaus. De methode is op alle punten valide.
3. De vraagstelling of de 3 individuele gentamicine componenten als 1 totaal gehalte weergegeven mag worden kan positief worden beantwoord. Via vergelijk van de respons factoren (een afgeleide van de specifieke extinctiecoëfficiënt uit de wet van Lambert-Beer), zijn geen aanwijsbare redenen gevonden om dit niet te doen.
4. Doorrekening van de 3 componenten naar het totale gentamicine gedeclareerde gehalte voldoet aan alle gestelde eisen.



5. Er is aangetoond dat de HPLC-methode de voorkeur geniet boven de TDx-methode. Vergelijk tussen de variaties op diverse niveaus blijkt dit te onderbouwen. De HPLC-resultaten vertonen aanmerkelijk minder spreiding dan die van de leverancier opgeeft voor de TDx (zie hiervoor tabel 6 en 7).

Referenties

1. **Informatorium medicamentorum 2005; Winap**
2. **Toegepaste analytische chemie, 3de druk, C.J.G. Altmann, J.J.G. Corbeij en P.I. Schröder.**
3. **Principles of instrumental analysis, 4de editie, D.A. Skoog en J.J. Leary**
4. **Stability indicating HPLC methods for drug analysis, second edition, Q.A. Xu en L.A. Trissel**
5. **Dictaat validatie, Specialistische cursus 2007, P. Koopmans**
6. **Bijsluiter van de Gentamicine bepaling TDx, Abbott Laboratories Diagnostics Division.**