



Gecombineerde analysemethoden voor de routinematige bepaling van cocaïne en benzoylecgonine in cocaïne oplossingen.

F. Smit*, S. Koopmans en J.P. Yska

Klinisch Farmaceutisch Laboratorium
Medisch Centrum Leeuwarden
Postbus 888, 8901 BR Leeuwarden

* Correspondentie

Samenvatting

Een UV-spectrofotometrische bepalingsmethode, gecombineerd met een immunoassay, is opgezet als sneller en minder milieubelastend alternatief voor een RP-HPLC methode, voor de bepaling van cocaïne HCl en het ontledingsproduct benzoylecgonine in oplossingen.

De opgezette UV-spectrofotometrische bepalingsmethode, gecombineerd met een immunoassay is geschikt bevonden voor de kwaliteitscontrole van cocaïne HCl en benzoylecgonine in cocaïne oplossingen.

Sleutelwoorden

Cocaïne HCl; benzoylecgonine; HPLC; UV-spectrofotometrie; immunoassay; methodevergelijking.

Inleiding

Cocaïne HCl wordt als oplossing toegepast bij oppervlakteanesthesie en als diagnosticum bij het syndroom van Horner [1]. De stabiliteit van cocaïne HCl in oplossing is uitgebreid onderzocht. Cocaïne is aan hydrolyse onderhevig. De mate van hydrolyse is sterk afhankelijk van pH en temperatuur. In waterige cocaïne HCl oplossingen treedt bij een pH > 5,5 snelle hydrolyse op [2]. Het gaat in dat geval om niet enzymatische hydrolyse. Deze vorm van hydrolyse resulteert in het ontledingsproduct benzoylecgonine (zie fig. 1). In het lichaam wordt benzoylecgonine gevormd door zowel enzymatische, als niet enzymatische hydrolyse. Daarnaast vindt in het lichaam door enzymatische hydrolyse de vorming plaats van de ontledingsproducten methylecgonine en benzoëzuur en norcocaïne [3].

Tot 2004 werd in het laboratorium van de apotheek van het Medisch Centrum Leeuwarden het gehalte aan cocaïne HCl in waterige oplossingen bepaald door middel van een UV-spectrofotometrische methode. Eventuele ontledingsproducten zijn daarbij echter niet afzonderlijk waar te nemen. Aangenomen wordt dat de molaire absorptie van benzoylec-

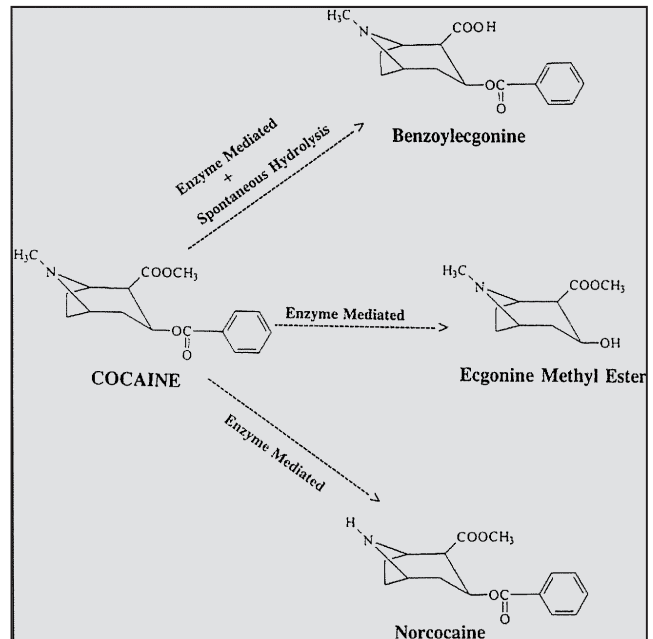


Fig.1: Hydrolyse van cocaïne. In vivo vinden zowel de enzymatische, als de niet enzymatische hydrolyse plaats. In vitro vindt alleen de spontane niet enzymatische hydrolyse plaats. (overgenomen uit [3])

gonine bij 232 nm ongeveer gelijk is aan die van cocaïne HCl [4]. In die wetenschap is een HPLC methode ontwikkeld om cocaïne HCl en haar eventuele ontledingsproducten te kunnen kwalificeren en kwantificeren. Tijdens een intern opgezet houdbaarheidsonderzoek in Cocaïne HCl 4% oogdruppels is gebleken dat er na ontleding 2 pieken ontstaan in het chromatogram.

Op basis van de wetenschap dat in vitro enkel spontane hydrolyse tot benzoylecgonine kan optreden, is de extra piek naast de cocaïne HCl in het chromatogram toentertijd gekwalificeerd als benzoylecgonine. Doordat een gevalideerde referentiestof voor benzoylecgonine niet voorhanden was en zeer moeilijk verkrijgbaar, werd het gehalte benzoylecgonine gekwantificeerd met behulp van een immunoassay bepalingsmethode. De gebruikte assay test specifiek op benzoylecgonine (bij cocaïne gebruik de belangrijkste metaboliet in het lichaam), en kan daarom prima worden gebruikt voor het bepalen van benzoylecgonine in waterige oplossingen.

Tijdens het huidige onderzoek is met een oude, alleen voor

research te gebruiken, referentiestof benzoylecgonine-D3 bevestigd dat de extra piek in het chromatogram inderdaad benzoylecgonine is.

Bij een houdbaarheidsonderzoek dient gebruik te worden gemaakt van een gevalideerde HPLC methode. In dit onderzoek beschrijven wij echter de mogelijkheid om bij voorraadbereidingen van cocaïne HCl oplossingen voor de kwaliteitscontrole van het eindproduct een eenvoudige, minder tijdrovende en minder milieubelastende UV-spectrofotometrische bepaling voor het gehalte cocaïne HCl te gebruiken, met daarnaast een immunoassay bepaling voor het gehalte van ontledingsproduct benzoylecgonine.

Doel

Het vaststellen van de geschiktheid van een immunoassay voor het volgen van de ontleding van cocaïne naar benzoylecgonine in cocaïne HCl oplossingen, naast een snelle gehaltebepaling van cocaïne HCl met behulp van UV-spectrofotometrie.

Methode ontwikkeling

In de wetenschap dat ontleding van een cocaïne HCl oplossing sneller gaat bij hogere pH en hogere temperatuur [2], is als vooronderzoek een cocaïne HCl oplossing geforceerd ontleed met behulp van buffer pH 7 en pH 9, bij kamertemperatuur en bij 80°C. De ontleding ging in alle combinaties echter te snel om voor dit onderzoek geschikt te zijn. Voor dit onderzoek is daarom gekozen voor geforceerd ontleden zonder buffer en alleen bij hogere temperatuur. Hierdoor ontstond een geleidelijke ontleding die goed te volgen was tot een omzetting van ca. 15%. Verder ontleden heeft geen zin gezien het doel van het onderzoek. De eis voor het gehalte cocaïne HCl is immers 90 – 110%.

Onderzoek

Tijdens het onderzoek is in 2 verschillende charges Cocaïne HCl 7% oplossing de ontleding gevolgd. Er is gemeten op tijdstippen verspreid tussen dag 0 en dag 15. De charges stonden hierbij gedurende de dag bij kamertemperatuur en gedurende de nacht bij 80°C. De laatste meting is gedaan na 4 maanden. Tijdens de laatste periode stonden de charges alleen bij kamertemperatuur. Van beide charges zijn op genoemde tijdstippen gehaltebepalingen gedaan met behulp van: HPLC (cocaïne HCl), immunoassay (benzoylecgonine) en UV-spectrofotometrie (totaal cocaïne HCl en benzoylecgonine). In figuur 2 zijn de gehaltebepalingen schematisch weergegeven.

De UV-spectra van cocaïne HCl en benzoylecgonine zijn gelijk en de specifieke extincties van beide stoffen liggen vlak bij elkaar (theoretisch E1% resp. ca. 390 [5] en ca.

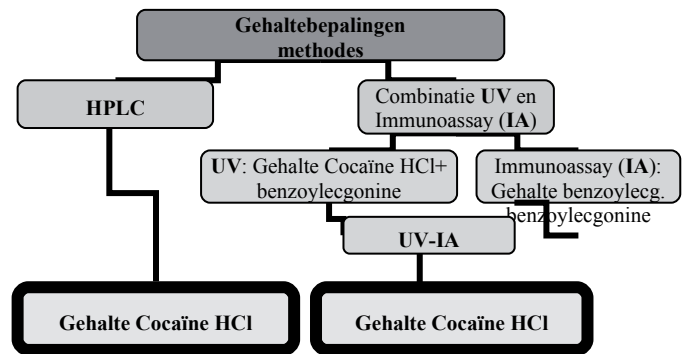


Fig.2: Schematisch overzicht gehaltebepalingen in monsters

376 [6]). Beide stoffen zullen daarom een vergelijkbare bijdrage aan de extinctie in de oplossing leveren, waardoor de totale extinctie nagenoeg hetzelfde zal blijven. Uitgaande van het feit dat 1 mmol cocaïne HCl ontleedt in 1 mmol benzoylecgonine, is het, met immunoassay, gemeten gehalte benzoylecgonine, berekend als percentage van het totaal.

Het totaal, met UV-spectrofotometrie, gemeten gehalte, verminderd met het percentage gevormde benzoylecgonine, gemeten met immunoassay, (UV-IA) is het werkelijke gehalte aan cocaïne HCl in de monsters. Dit berekende, werkelijke gehalte moet gelijk zijn aan het gehalte cocaïne HCl bepaald met HPLC (zie fig.2).

Om in de toekomst een snelle UV-spectrofotometrische bepaling, samen met een immunoassay te kunnen gaan uitvoeren, moeten we beide meetseries (UV-IA en HPLC) met elkaar vergelijken. Voor die vergelijking maken we gebruik van de gepaarde T-toets in EXCEL, dubbelzijdig, met betrouwbaarheidsniveau $\alpha = 0,05$ [7]. Als er geen significant verschillende resultaten gevonden worden, kunnen we concluderen dat de gemiddelde methodejuistheid niet significant van 0 afwijkt. De H0 hypothese wordt gesteld: de beide groepen metingen zijn gelijk. H0 wordt geaccepteerd indien berekende waarde $p > \alpha$.

Materialen / Methoden

Grondstoffen en oplossingen

Grondstoffen:

Cocaïne HCl: Duchefa 249246

Benzoylecgonine-D3: UMCG Groningen, oud, alleen voor research/piek identificatie

Kaliumdiwaterstoffosfaat: Merck 1.04873

Fosforzuur 85%: Merck 1.00573

Triëthylamine: Merck 808352

Kaliumhydroxide: Merck 1.05033

Acetonitril (HPLC): Labscan C02C11X

Steriel water (water voor irrigatie): Baxter TKF7114

Oplossingen:

Buffer pH 3: Los 1,36 g Kaliumdiwaterstoffosfaat op in 900 ml water. Breng op pH 3 met Fosforzuur 85% en vul aan tot 1000 ml met water.

STIP buffer pH 3,3: Voeg aan 1060 ml water 1000 µl Fosforzuur 85% en 300 µl Triëthylamine toe. Breng op pH 3,3 met Kaliumhydroxide 10% oplossing.

Immunoassay reagens:

COCAINE II reagens: Roche 03800130190

Standaard oplossingen

Voor HPLC:

Stockoplossing calibratie Cocaine HCl (ca. 200 mg/l):

Ca. 50 mg (nauwkeurig afgewogen) Cocaine HCl oplossen en aanvullen met buffer pH 3 tot 250,0 ml.

Stockoplossing referentie Cocaine HCl (ca. 200 mg/l):

Ca. 50 mg (nauwkeurig afgewogen) Cocaine HCl oplossen en aanvullen met buffer pH 3 tot 250,0 ml

Werkoplossing 1-puntscalibratie Cocaine HCl

(ca. 0,014 mg/ml):

700 µl stockopl. calibratie aanvullen met eluens tot 10,0 ml.

Werkoplossing referentie Cocaine HCl (ca. 0,010 mg/ml):

500 µl stockopl. referentie aanvullen met eluens tot 10,0 ml.

Voor immunoassaybepaling (COBAS INTEGRA 400):

Calibrator: Preciset DAT Plus I: Roche 03304671190

Controle: Liquicheck Urine Toxicology Control S2 low opiate: BIORAD 467

Werkoplossingen monsters

Opl.a: monster Cocaine HCl 7% 400 x verdunnen met buffer pH 3 voor immunoassaybepaling.

Opl.b: opl.a 20 x verdunnen in eluens voor HPLC bepaling.

Opl.c: opl.a 10 x verdunnen in buffer pH 3 voor UV-spectrofotometrische bepaling.

HPLC bepaling:

Apparatuur: Waters Alliance 2695 HPLC system met Waters 2998 Photodiode Array detector

Software: Waters Empower Pro

Methode: Kolom: 125-4 Lichrospher® 100 RP 18e (5 µm), Merck 50734

Eluens: STIP buffer pH 3,3: Acetonitril met als verhouding 81:19 (mengen op de pomp)

Detectie: PDA detector, $\lambda=235$ nm

Gehaltebepaling cocaine HCl in opl.b berekend met calibratie en t.o.v. referentie.

Immunoassaybepaling benzoylecgonine:

Apparatuur: Roche COBAS INTEGRA 400

Assay: COBAS INTEGRA COCII

Methode: KIMS (Kinetic Interaction of Micro particles in a Solution)

Gehaltebepaling benzoylecgonine in opl.a berekend t.o.v. controle.

UV-spectrofotometrische bepaling:

Apparatuur: Shimadzu UV-1700 UV-VIS Spectrofotometer

Methode: Absorbance, Slit Width: 1,0 nm.

Maxima bij 232 en 275 nm

Extinctiebepaling in opl.c t.o.v. buffer pH 3 bij maximum 232 nm.

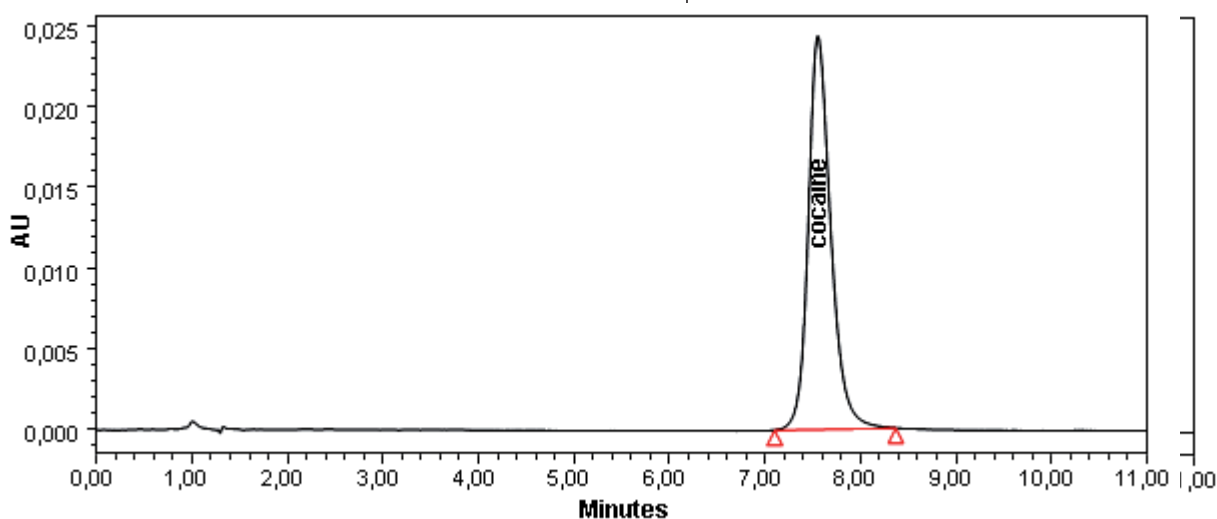
Gehalteberekening aan de hand van E1%.

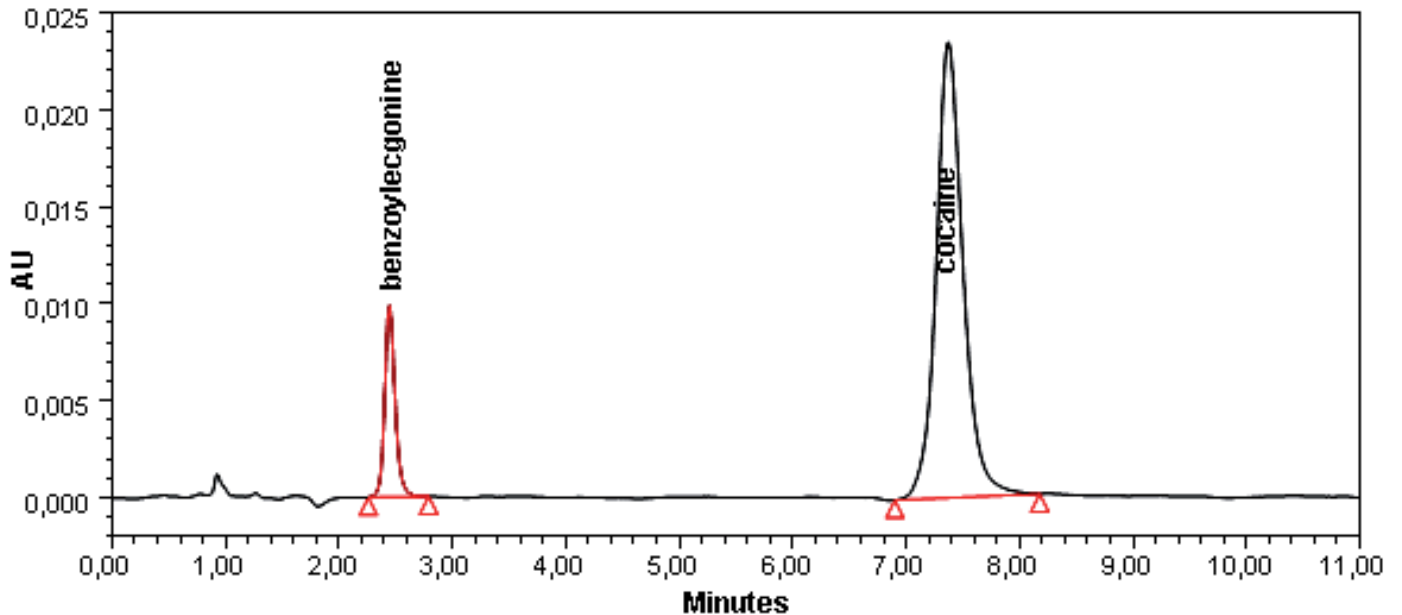
Resultaten en discussie

HPLC:

De pieken gevonden in de HPLC chromatogrammen zijn met behulp van standaarden geïdentificeerd als cocaine HCl en benzoylecgonine. Gedurende het onderzoek werd zoals verwacht de piek van de cocaine HCl steeds lager en de piek van de benzoylecgonine, en dus de ontleding, steeds hoger (zie fig.3a en fig.3b).

Fig. 3a: Chromatogram van Cocaine HCl oplossing direct na bereiding



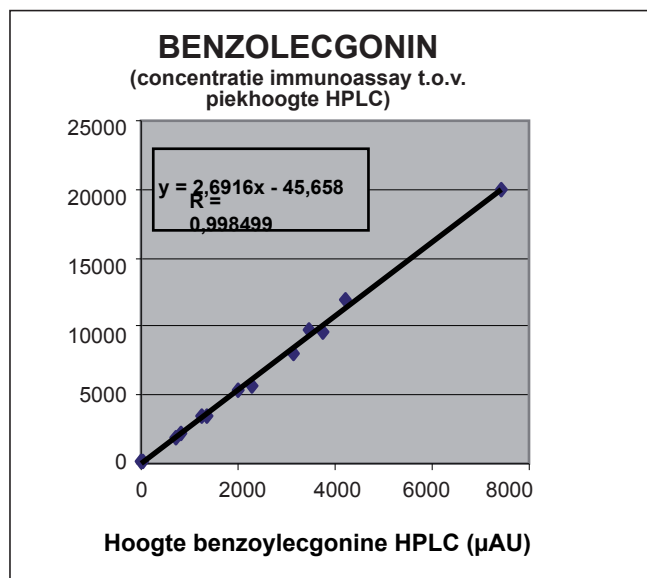


▲ Fig. 3b: Chromatogram van Cocaïne HCl oplossing na geforceerd ontleden bij 80°C

Immunoassay

De gebruikte immunoassay meet specifiek de benzoylecgonine in de oplossing. Deze waarde werd steeds hoger in de loop van het stabiliteitsonderzoek. Deze stijging verliep gelijk aan de stijging van de benzoylecgonine piek in het bijbehorende HPLC chromatogram.

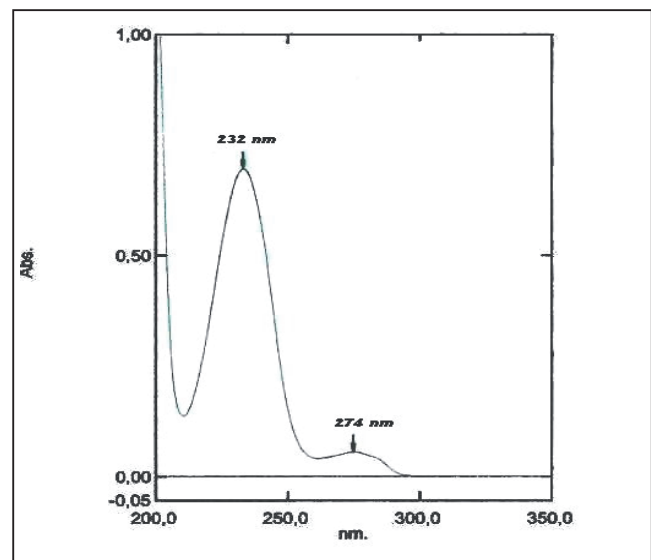
De met de immunoassay gevonden concentratie benzoylecgonine, uitgezet tegen de hoogte van de benzoylecgonine piek in het bijbehorende chromatogram, geeft een lineair beeld (zie fig.4).



▲ Fig. 4: Concentratie benzoylecgonine t.o.v. piekhoogte

UV spectrofotometrie

De gemeten extinctie bij Emax (232 nm) en het daaruit berekende gehalte cocaïne HCl in de oplossing bleef zoals verwacht gedurende het onderzoek constant en daalde niet, ondanks de ontleding gemeten met de andere methodes. De UV-spectrofotometrische bepaling alleen is daarom niet geschikt voor het bepalen van de hoogte van ontleding in een cocaïne HCl oplossing. In figuur 5 is het UV spectrum van een oplossing direct na de bereiding opgenomen



▲ Fig. 5: UV spectrum van Cocaïne HCl 7% oplossing direct na de bereiding (T=0)

In tabel 1 zijn de, met UV-spectrofotometrie berekende, totale gehalten van de oplossing weergegeven gedurende de tijd van het onderzoek alsmede het percentage benzoyllecgonine, gemeten met de immunoassay.

Charge 1: Tijdstip	Gehalte UV %	Percentage benzoyllecgonine (IA) %
T=0	103,1	0,11
T=1 (1 dag)	102,4	1,47
T=2 (3 dgn)	100,8	3,75
T=3 (4 dgn)	102,1	5,67
T=4 (11 dgn)	100,5	6,89
T=5 (14 dgn)	101,5	6,63
T=6 (15 dgn)	101,6	8,51
T=7 (4 mnd)	103,3	13,59
Charge 2: Tijdstip	Gehalte UV %	Percentage benzoyllecgonine (IA) %
T=0	102,4	1,32
T=1 (7 dgn)	101,4	2,46
T=2 (10 dgn)	101,9	2,36
T=3 (11 dgn)	101,9	3,81
T=4 (4 mnd)	102,5	10,47

▲ **Tabel 1: Gehalte cocaïne HCl gedurende het onderzoek in beide charges gemeten en berekend met UV-spectrofotometrie en het bijbehorend percentage benzoyllecgonine gemeten met immunoassay.**

Methodevergelijking

In tabel 2 staan de resultaten van de verschillende gehaltenbepalingen van cocaïne HCl weergegeven. Op verschillende tijdstippen worden de resultaten, verkregen met UV-spectrofotometrie verminderd met het percentage benzoyllecgonine (UV-IA), vergeleken met die van de HPLC methode.

Vergelijking van beide meetmethoden op basis van de meetwaarden (gepaarde T-toets) levert op: $p=0,92$. Omdat $p > \alpha$ (0,05), wordt de hypothese dat beide series meetwaarden gelijk zijn, geaccepteerd.

Tabel 2: Gehalte cocaïne HCl op bepaalde tijdstippen: berekende gehalten UV-Benzoyllecgonine (BE) en gemeten en berekende gehalten met HPLC.

Charge 1: tijdstip	Gehalte UV-IA (%)	Gehalte HPLC (%)
T=0	103,0	104,4
T=1 (1 dag)	100,9	100,2
T=2 (3 dgn)	97,0	96,7
T=3 (4 dgn)	96,4	96,7
T=4 (11 dgn)	93,7	96,3
T=5 (14 dgn)	94,9	93,7
T=6 (15 dgn)	93,0	92,1
T=7 (4 mnd)	89,7	85,9
Charge 2: tijdstip	Gehalte UV-IA (%)	Gehalte HPLC (%)
T=0	101,1	102,7
T=1 (7 dgn)	99,0	101,0
T=2 (10 dgn)	99,6	99,4
T=3 (11 dgn)	98,1	98,5
T=4 (4 mnd)	92,0	91,4

Conclusie

Met dit onderzoek hebben wij vastgesteld dat een gehaltenbepaling van een cocaïne HCl oplossing goed uitvoerbaar is met behulp van een UV-spectrofotometrische methode samen met een specifieke immunoassay voor het bepalen van het ontledingsproduct benzoyllecgonine. Aangetoond is dat de waarden van de benzoyllecgonine gemeten met de immunoassay een lineair verband hebben met de piekhoogte in een HPLC chromatogram. Daarnaast is aangetoond dat de concentratie cocaïne HCl bepaald met UV-spectrofotometrie, verminderd met het percentage ontleding gemeten met de immunoassay, gelijk is aan de concentratie cocaïne HCl bepaald met behulp van de HPLC. Hiermee is een snellere en, door het ontbreken van organische oplosmiddelen, milieuvriendelijker bepaling mogelijk als gehaltenbepaling van een voorraadbereiding cocaïne HCl oplossing.

Voor het uitvoeren van uitgebreid houdbaarheidsonderzoek in cocaïne HCl oplossingen is deze methode niet geschikt en zal moeten worden uitgeweken naar de uitgebreide HPLC bepaling.

Dit onderzoek moet worden gezien als een pilot. Na evaluatie kan vervolgens de methode worden gevalideerd en opgenomen worden in het analysepakket van het laboratorium.

Gebaseerd op onderzoek van F. Smit in het kader van haar opleiding tot Specialist Klinische-Farmaceutische en -Toxicologische Analyse

Literatuur/Referenties

1. *Monografie Informatorium Medicamentorum*, www.kennisbank.knmp.nl , geraadpleegd 17-06-2011
2. *LNA-mededeling cocaïnechloride oogdruppels 5% LNA, februari 2011*, www.kennisbank.knmp.nl , geraadpleegd 17-06-2011
3. Warner, A., Norman, A.B., "Mechanisms of Cocaine Hydrolysis and Metabolism in Vitro and in Vivo: A Clarification." *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000;22:266-70
4. Das Gupta, V., "Stability of cocaine hydrochloride solutions at various pH values as determined by high-pressure liquid chromatography." *International Journal of Pharmaceutics*, 1982;10:249-57+
5. *European Pharmacopoeia 7.0*, Council of Europe, Strasbourg, 2010, p1738
6. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Third ed*, Pharmaceutical Press, London-Chicago, 2010, p687
7. Dr. J.W.A. Klaessens, "Statistiek in het laboratorium met EXCEL", Syntax Media, Arnhem, 2009, p52-55

