

Sarah Wilkes – AIOS Ziekenhuisfarmacie  
Inge Wilbrink-Pijffers – Analist KFTL  
22-11-2016 PUOZ labdag

# Validatie analyse vrije concentratie

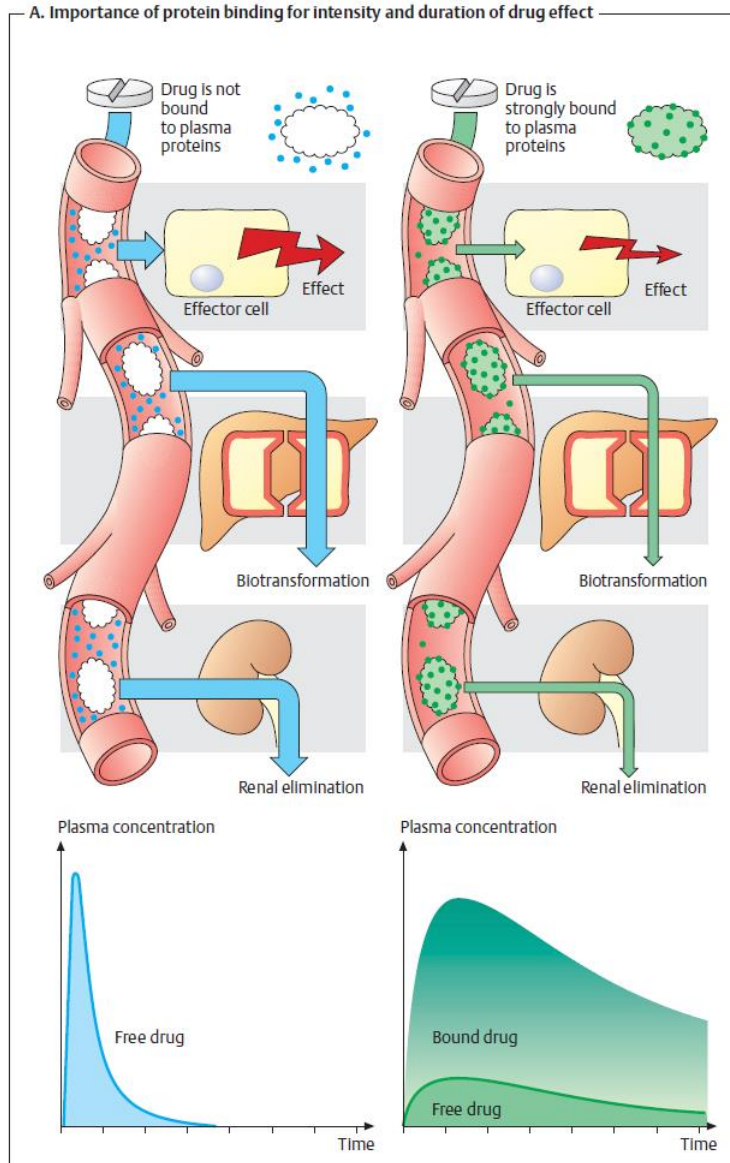
*Voorbeeld flucloxacilline*

# Overzicht presentatie

- Theoretische achtergrond
- Doel van het onderzoek
- Brainstormen (15 min)
- Validatie<sup>[12]</sup> in het Deventer Ziekenhuis
  - Methode / werkwijze
  - Resultaten
  - Discussie / conclusie
- Bevindingen brainstormen (15 min)

# Theoretische achtergrond I

De vrije concentratie is werkzaam



# Theoretische achtergrond II

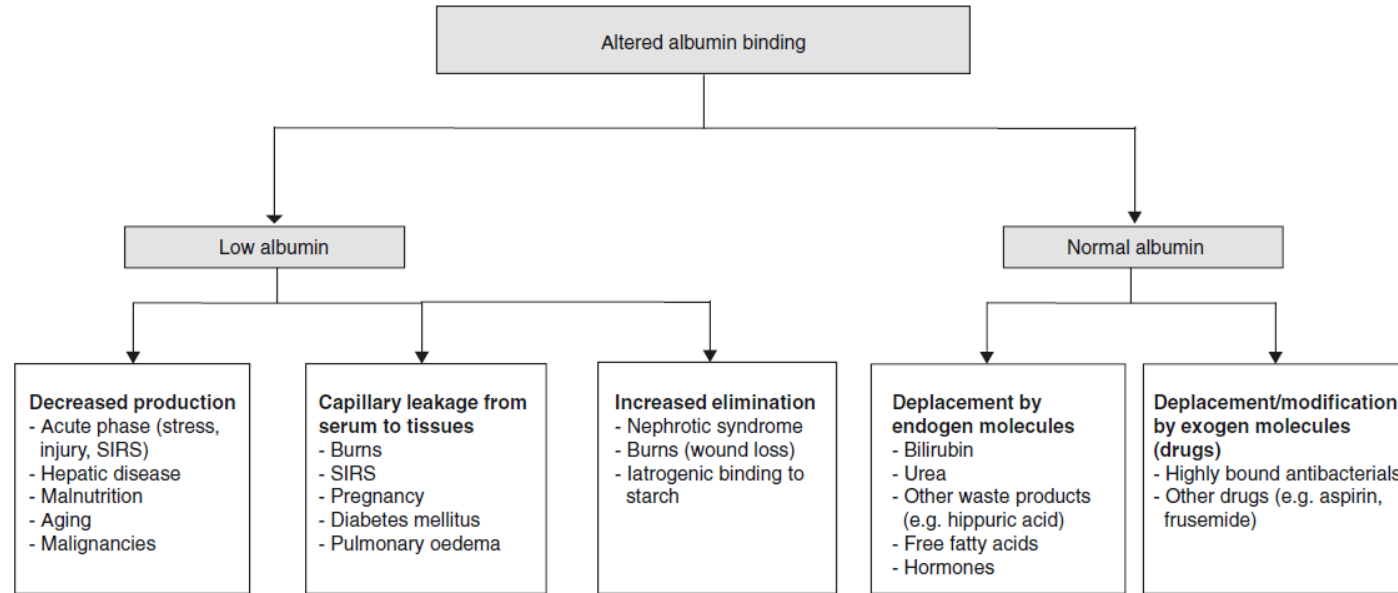


Fig. 3 Main factors responsible for alterations in drug–albumin binding [52]. SIRS systemic inflammatory response syndrome

# Theoretische achtergrond III

Vrije concentratie van belang bij

- Sterke eiwitbinding
  - Flucloxacilline 95%
  - Valproïnezuur 90%
  - Fenytoïne 90%

Invloed op de eiwitbinding

- Temperatuur
- Concentratie

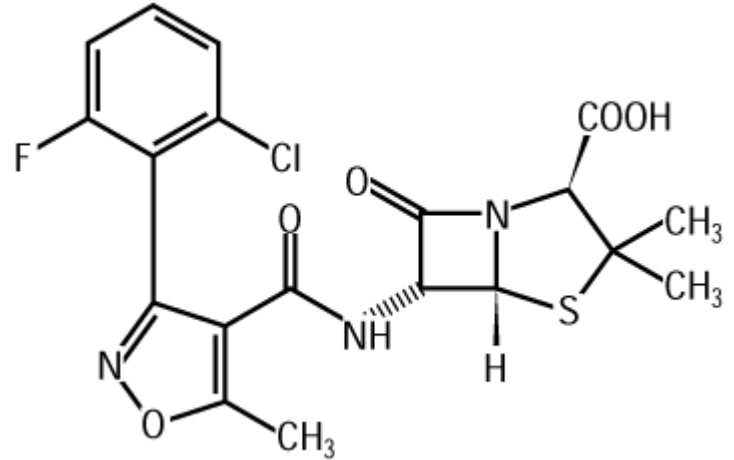
## Kinetische gegevens

<b>Resorptie</b>	oraal ca. 55% (nuchter).
<b>T<sub>max</sub></b>	i.m. ca. ½ uur, oraal 1 uur.
<b>V<sub>d</sub></b>	ca. 0,24 l/kg. Bij neonaten: ca. 0,45 l/kg.
<b>Eiwitbinding</b>	ca. 95%.

# Theoretische achtergrond

## Flucloxacilline

- Antibioticum
  - Tegen stafylokokken
  - Bijvoorbeeld: erysipelas (wondroos)
  
- Registratie-onderzoek over kinetiek flucloxacilline
  - Totale concentratie
  - Ongebonden concentratie



# Doel van het onderzoek

*Belangrijke parameters bij bepalen/valideren vrije concentratie flucloxacilline*

- Veel lagere concentraties vrij dan totaal (flucloxacilline: factor 0,05<sup>[7][8][9]</sup>)
- Verschillende ijklijnen voor verschillende concentraties
- Temperatuur
- Flucloxacilline zeer instabiel<sup>[11]</sup>
- Adhesie filter
- Matrix / opwerking<sup>[13]</sup>



# Interactieve gedeelte

*Brainstormen*



# Validatie in het Deventer Ziekenhuis

*Vrije concentratie flucloxacilline*

# Methode / Werkwijze I

- Tegelijkertijd ook totale flucloxacilline concentratie in serum gevalideerd
- Materiaal
  - HPLC Shimadzu Prominence
  - Kolom, Chromsep Pursuit XRS C18 10cm
  - Dataverwerking, LC Solutions
  - Microcentrifuge, Abbott
  - Centrifuge, Sigma
  - Centrifree Ultrafiltratie Units, Millipore
- Interne standaard, dicloxacilline<sup>[11]</sup>
- Instellingen HPLC - DAD
  - Kolomoven, 40 °C
  - Golflengte, 220 nm
  - Flow, 0,8 ml/min
  - Injectievolume, 10 µl
  - Runtijd, 7 min
  - Kaliumdiwaterstoffosfaatbuffer pH 3.0 / CH<sub>3</sub>CN

63:37

# Methode / Werkwijze II

- Opwerking<sup>[13]</sup>
  - Filtratie over Centrifree Ultrafiltratie filter
    - 500 µl serum/plasma, 10 min bij 1500 G en 25 °C
  - IJklijn in water
  - Controles in water
  - 50 µl filtraat + 15 µl IS werkoplossing (5 mg/l)

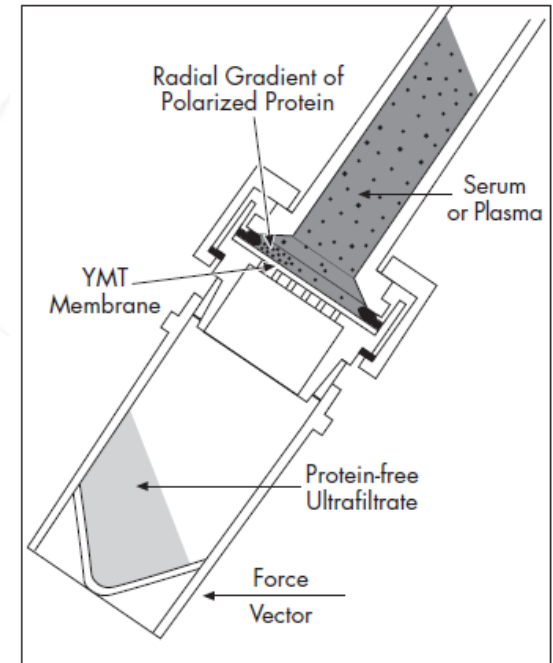


Figure 3. Polarization control, using a 35° fixed-angle rotor.

# Methode / Werkwijze III

## *Lineariteit, juistheid, herhaalbaarheid en specificiteit*

- 6 punts ijklijn met concentratiebereik van 0,25 – 6 mg/l
- Deze wordt gedurende 3 dagen in enkelvoud geanalyseerd
- Blanco monster zonder IS na hoogste standaard om carry-over te testen
- 6 verschillende blanco patiëntenserummonsters geanalyseerd
- 3 concentraties, low / medium / high, gedurende 3 dagen in zesvoud meten

## *Interne kwaliteitscontroles*

- In water
- Twee concentraties
- Gedurende 3 dagen in duplo bepaald

## *Externe kwaliteitscontroles*

- Oplossing van extern lab
- Twee concentraties in duplo gemeten over 3 dagen

# Methode / Werkwijze IV

## *Scheidingsmethode herhaalbaarheid*

- 2 concentraties in 6voud over filter, gedurende 3 dagen
- Concentraties in filtraat bepaald

## *Scheidingsmethode adhesie filter*

- 2 concentraties in water in 3voud bereid en over filter
- Concentraties in filtraat bepaald

# Methode / Werkwijze V

## *Stabiliteitsonderzoek*

- In serum, 2 concentraties in triplo
  - 4 uur KT
  - 24 uur KK
  - 24 uur autosampler (opgewerkt)
  - 1 maand -80 °C

## *Vries / dooi*

- Low / high invriezen
- Gedurende 3 dagen ontdooien, in triplo bepalen en restant invriezen

## *Verdunning*

- Validatie werkstandaard >150% van hoogste standaard
- 4 keer verdund en gemeten op ijklijn vrij flucloxacilline
- Onverdund gemeten op ijklijn van totaal flucloxacilline

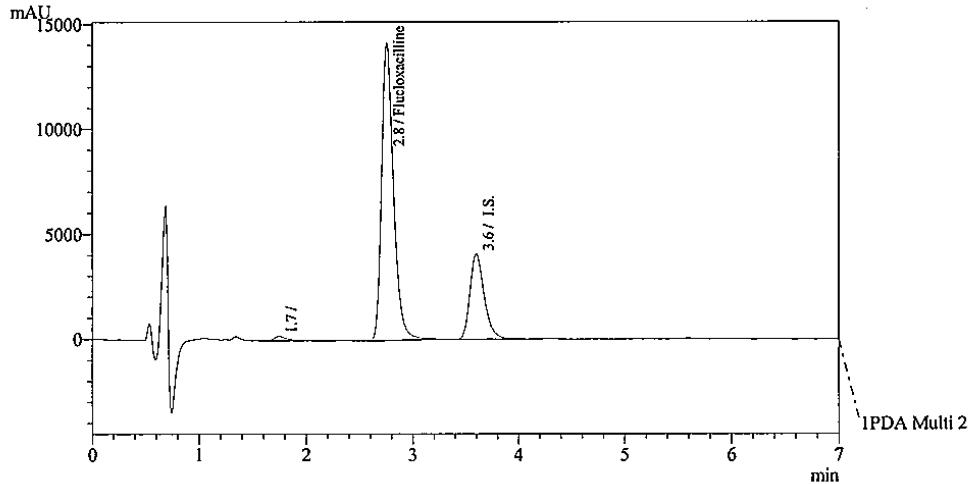
# Methode / Werkwijze VI

Parameter	Eis
Lineariteit	$R > 0.990$ Terugberekening op ijklijn 85 – 115 % LOF, GOF en 0 in 95% BI intercept
LOQ	Passend bij MIC
Within run accuracy	Gehalte 85 – 115 %
Between run accuracy	Gehalte 85 – 115 %
QC (intern en extern)	Gehalte 85 – 115 %
Within run precision	$VC < 15 \%$
Between run precision	$VC < 15 \%$
Carry over	Respons blanco $< 20 \%$ LOQ Respons IS $< 5\%$ IS
Adhesie filter	Gehalte centrifugaat 90 – 110%
Between run precision scheidingsmethode	$VC < 10 \%$
Stabiliteit	Gehalte 85 – 115 %
Vries – dooi	Gehalte 85 – 115 % na 2 vriesdooicycli
Verdunning (vaststellen UOQ)	Gehalte verdund 85 – 115 % Gehalte onverdund 85 – 115 %

# Resultaten I

## Chromatogram

Sample Information C:\LabSolutions\Data\flucloxacilline\STD\_6\_V.lcd  
Acquired by : inge Sample Name : STD\_6\_V STD\_6\_V Verdunningsfactor: 1  
Vail# : 18 Injection Volume : 10 uL  
Method Filename : Flucloxacilline\_vrij\_IW.lcm  
Batch Filename : 20161027\_v.lcb Report Filename : Default.lcr Date Acquired : 10/



1 PDA Multi 2 / 220nm 4nm

### Quantitative Results

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Resolution	Conc.
1	Flucloxacilline	2.8	110130	14177	4.746	4.48
2	I.S.	3.6	37789	4065	3.584	0.00

- Resolutiefactor = >1,5
- Piekzuiverheid voldoet



# Resultaten II

## *Lineariteit*

- $R = 0,9902$
- Terugberekening op ijklijn = 93,2% - 109,1%
- LOF, GOF en BI intercept voldoen

>0,990  
85% - 115%

## *Within run accuracy*

- Low = 106,7 – 102,0 – 104,7 %
- Medium = 102,6 – 103,8 – 100,0 %
- High = 108,6 – 105,9 – 102,4 %
- QC low = 108,3 – 101,9 – 87,9 %
- QC high = 105,3 – 108,7 – 90,2 %

eis = 85% - 115%

## *Between run accuracy*

- Low = 104,5%
- Medium = 102,1%
- High = 105,6 %
- QC low = 99,4%
- QC high = 101,4%

eis = 85% - 115%

# Resultaten III

## *Within run precision*

eis = VC < 15%

- VC Low = 4,8 - 1,7 - 3,4 %
- VC Medium = 6,5 - 3,0 - 8,2 %
- VC High = 3,8 - 3,9 - 3,9 %

## *Between run precision*

eis = VC < 15%

- VC Low = 3,9 %
- VC Medium = 6,1 %
- VC High = 3,9 %

## *Externe QC*

eis = 85 - 115 %

- Low = 110,8 - 102,5 - 90,2 %
- High = 102,6 - 98,8 - 90,6 %

# Resultaten IV

## LOQ

- LOQ = 0,25 mg/l vrije concentratie

## Carry over

- Blanco's voldoen,
- Respons = 0% LOQ
- Respons = 0% IS

## Adhesie filter

- Gehalte centrifugaat LOW = 90,7 – 93,3 – 94,8 %
- Gehalte centrifugaat HIGH = 96,6 – 96,0 – 90,9 %
- Ijklijn gefilterd en niet gefilterd komen overeen

laagste MIC = 0,25 mg/l [1][2]

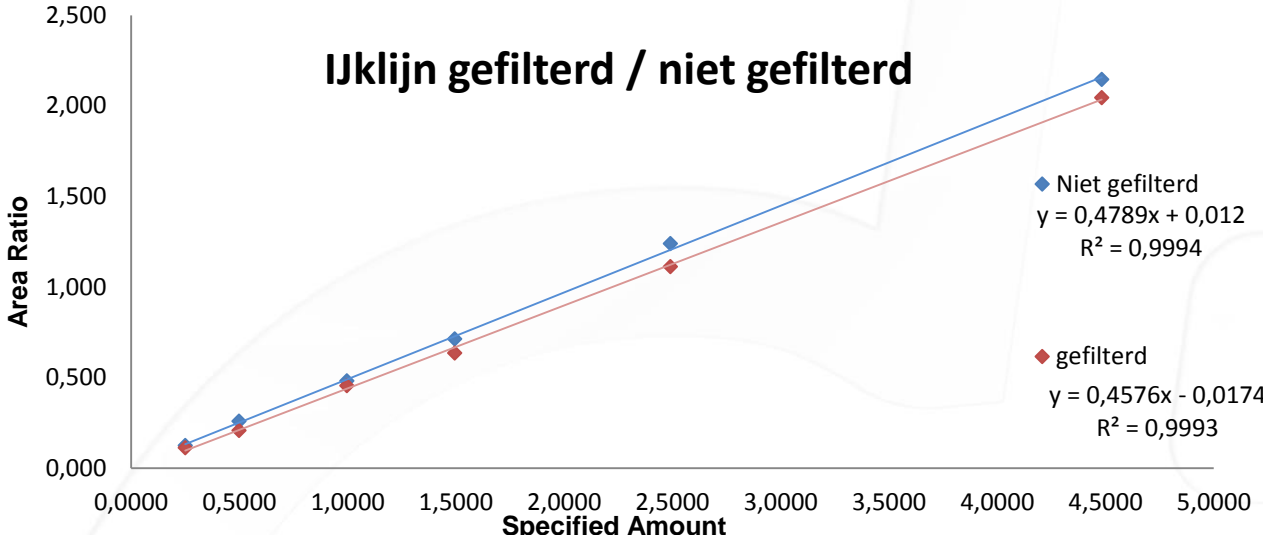
respons blanco <20% LOQ  
respons IS <5% IS

eis = 90-110%

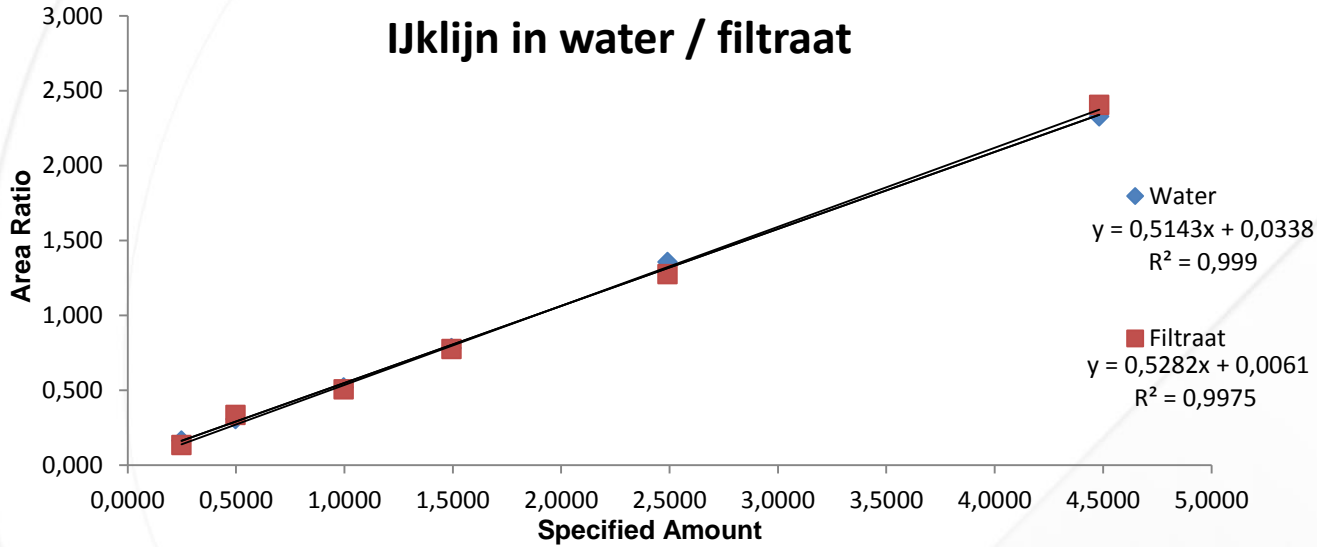
eis = 90-110%

# Resultaten V

## Ijklijn gefilterd / niet gefilterd



## Ijklijn in water / filtraat



# Resultaten VI

## *Between run precision scheidingsmethode*

- VC low = 11,7%
- VC high = 13,6%
- Vrije fractie = 6,8%

eis = VC < 10%

eis = VC < 10%

ca 5% volgens literatuur<sup>[7][8][9]</sup>

## *Stabiliteit*

eis 85 – 115%

- Na 24 uur autosampler = 106,4%
- Na 4 uur kamertemperatuur = 95,0%
- Na 24 uur koelkast = 108,7%
- Na 1 maand vriezer (-80°C) = 100,8%

# Resultaten VII

## *Vriesdooicycli*

- Na 2 vriesdooicycli
  - Gehalte laag = 93,2 – 119,2 – 119,2 %
  - Gehalte hoog = 96,4 - 93,8 – 102,3 %

eis = 85-115%

## *Verdunning*

- Gehalte onverdund = 96,0 – 101,5 %
- Gehalte verdund = 111,1 – 110,6 %

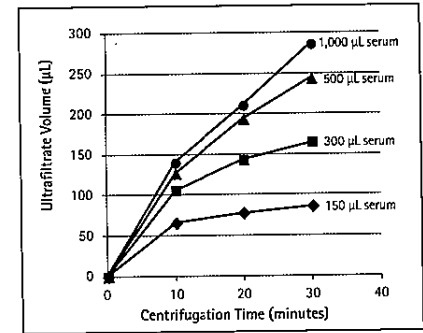
eis = 85-115%

UOQ = 6 mg/l

# Discussie

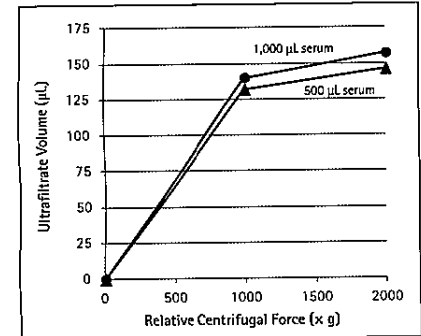
- IJklijn eerst in serum
- Optimalisatie filtratieproces
- Between run precision scheidingsmethode VC >10%
- Gehalte L na 2 keer vriesdooien voldoet niet

Typical Ultrafiltration Rates



Conditions: 33° fixed-angle rotor, 25 °C, 1,000 × g

Effect of Relative Centrifugal Force



Conditions: 33° fixed-angle rotor, 25 °C, 10 minute spin

# Conclusie

- Methode gevalideerd!
- Patiëntmonsters kunnen worden bepaald







# Bevindingen brainstormen

# Referenties

1. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men.* **WA, Craig.** *sl : Clin. Infect. Dis.*, 1998, Vol. 26, pp. 1–10.
2. *Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of ‘bug and drug’.* **GL, Drusano.** *sl : Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, Vol. 2, pp. 289–300.
3. *Population pharmacokinetics at two dose levels and pharmacodynamic profiling of flucloxacillin.* **Landersdorfer CB, Kirkpatrick CM, Kinzig-Schippers M, Bulitta JB, Holzgrabe U, Drusano GL, Sörgel F.** 9, 2007, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 51, pp. 3290-3297.
4. **Leder K, Turnidge JD, Korman TM, Grayson ML.** The clinical efficacy of continuous-infusion flucloxacillin in serious staphylococcal sepsis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 43, 1999, pp. 113-118.
5. **Howden BP, Richards MJ.** The efficacy of continuous infusion flucloxacillin in home therapy for serious staphylococcal infections and cellulitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48, 2001, pp. 311-314.
6. *Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo.* **Merrikin DJ, Briant J, Rolinson GN.** *sl : J Antimicrob Chemother*, 1983, Vol. 11, pp. 233–238.
7. *The binding of isoxazolyl penicillins to human serum proteins.* **U., Ulmann.** *sl : Arzneimittelforschung*, 1977, Vol. 27, pp. 2136–2138.
8. *Flucloxacillin, a new isoxazolyl penicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin.* **Sutherland R, Croydon EA, Rolinson GN** *sl : Br Med J*, 1970, Vol. 4, pp. 455–460.
9. *Dicloxacillin and flucloxacillin: pharmacokinetics, protein binding and serum bactericidal titers in healthy subjects after oral administration.* **Roder BL, Frimodt-Moller N, Espersen F et al.** *sl : Infection* 1995, 23, Vol. 107–112.
10. *The pharmacokinetics of once-daily dosing of ceftriaxone in critically ill patients.* **Joynt GM, Lipman J, Gomersall CD et al.** *sl : J Antimicrob Chemother*, 2001, Vol. 47, pp. 421–429.
11. *Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics.* **Uildemolins M, Roberts JA, Wallis SC, Rello J, Lipman J.** 8, *sl : J Antimicrob Chemother*, 2010, Vol. 65, pp. 1771-1778.
12. *Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation.* [Online] 2001. [Citaat van: 3 mei 2016.]
13. <http://www.merckmillipore.com/NL/en/product/Centrifree-Ultrafiltration-Device>