



SPE Monstervoorbewerking van antivirale middelen Indinavir als modelstof

Rick Langen en
Marjolijn van Essenberg.

Laboratorium van de Ziekenhuis-
apotheek Midden-Brabant,
Dr. Deelenlaan 5, 5042 AD, Tilburg.
RLangen@zamb.tsz.nl

Inleiding

Indinavir (Crixivan[®]) is één van de zogenaamde proteaseremmers. Deze middelen remmen een belangrijke stap in de vermenigvuldiging van het HIV-virus en worden daarom gebruikt bij de behandeling van HIV-infecties bij patiënten met AIDS. Proteaseremmers moeten altijd in combinatie met andere antiretrovirale middelen worden gebruikt aangezien anders zeer snel resistentie kan optreden. Proteaseremmers hebben als belangrijkste bijwerkingen verhoging van lipidenpiegels, lipodystrofie, en verhoging van het glucosegehalte. Indinavir kan bovendien aanleiding geven tot indinavir kristallen in de urine; veel drinken is noodzakelijk om dit te voorkomen [1]. Er zijn vele redenen die het meten van bloedspiegels bij proteaseremmers rechtvaardigen, o.a.: grote interindividuele variatie in farmacokinetiek, duidelijke relatie tussen spiegel en effect (remming vermenigvuldiging HIV-virus), kleine therapeutische breedte. Hierdoor bepaalt de uitkomst van de spiegelbepaling mede het beleid van de arts. De

therapeutische spiegel is sterk afhankelijk van het tijdstip van afname. Aangezien de patiënten vaak een zeer ingewikkeld en strak medicatie- en voedingsschema hebben, moet hier niet door de afname in geïnterfereerd worden. Afname kan in principe op elk willekeurig moment geschieden. Het exacte afname tijdstip moet echter wel bekend zijn om interpretatie van de spiegels mogelijk te maken. De gemiddelde spiegels variëren tussen 150 µg/L en 8 mg/L [2].

De in dit artikel beschreven studie omvat alleen de optimalisatie en validatie van de monstervoorbewerking van indinavir met vaste fase extractie (SPE). Het uiteindelijke doel is dat de ontwikkelde monstervoorbewerking gebruikt zal gaan worden voor meerdere antivirale middelen. Vanwege de overzichtelijkheid is gekozen om te starten met alleen indinavir. De structuurformule van indinavir is gegeven in figuur 1 (hieronder). De chromatografie die gebruikt wordt om de optimale SPE condities vast te stellen is al eerder beschreven [3]. Deze chromatografie heeft echter onvoldoende scheidend vermogen voor een algeheel omvattende analysemethode voor antivirale middelen.

Materiaal en methoden

Monstervoorbewerking
Monstervoorbewerking wordt ge-

automatiseerd uitgevoerd met een Gilson[®] ASPECT[™] XL SPE automaat (Gilson International, Rijswijk). De gebruikte SPE cartridges zijn 3 mL 60 mg Oasis[™] Hydrophilic Lipophilic Balanced (HLB) cartridges (Waters, Etten-Leur, part no: WAT094226).

HPLC

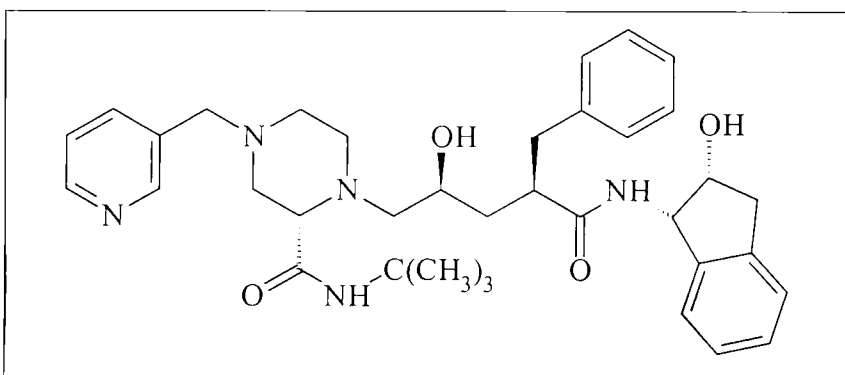
De monstervoorbewerking is geoptimaliseerd met behulp van een bestaand chromatografie systeem en bestaat uit een Shandon Hypersil BDS C₈ 5 µm 150x4,6 mm kolom (Aurora Borealis, Schoonebeek). De loopvloeistof heeft een stroomsnelheid van 1,0 mL/min en is samengesteld uit 73 mM fosfaatbuffer pH 3,4: acetonitril (62:38 v/v) (alle chemicaliën zijn afkomstig van Baker, Deventer). Detectie vindt plaats bij 205 nm, het injectievolume is 30 µL [3]. Indinavir is beschikbaar gesteld door Merck Sharp & Dohme BV, Haarlem.

Resultaten en discussie

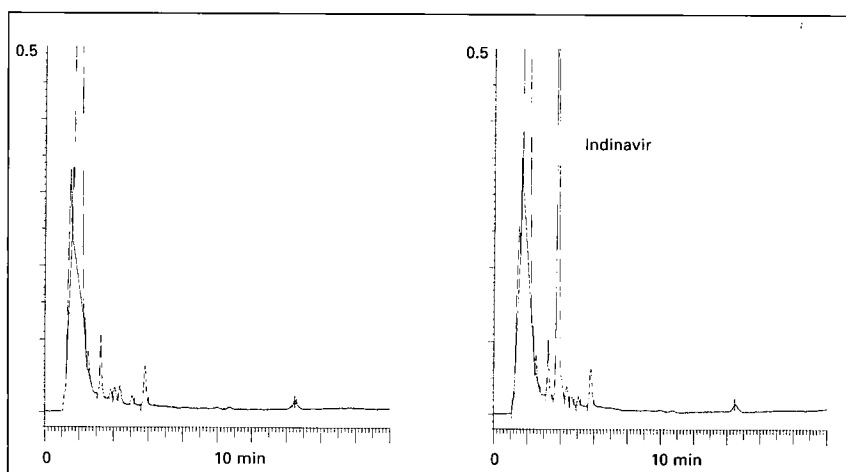
Methode ontwikkeling
1-dimensionaal

Bij een 1-dimensionale methode ontwikkeling wordt er vanuit gegaan dat, tijdens het wassen en het elueren van de component van de SPE fase, gebruik wordt gemaakt van hetzelfde retentiemechanisme. Een component wordt opgebracht op de SPE pakking. De pakking wordt gewassen met een vloeistof met een zwakke elutie sterkte (bv. 5% methanol in water). De component wordt geëluëerd van de pakking door een vloeistof met een krachtige elutie sterkte (bv. 100% methanol). In zowel de wasstap als de elutiestap is de vertraging van de component gebaseerd op hetzelfde retentiemechanisme.

Voor indinavir is de volgende procedure gebruikt. De cartridges worden geconditioneerd door achtereenvol-



Figuur 1. Structuurformule van indinavir (Crixivan[®])



Figuur 2. 1-D SPE extract van blanco plasma (links) en 10 mg/L indinavir in blanco plasma.

gens te spoelen met 1 mL methanol en 1 mL demiwater. Het monster wordt geladen door het opbrengen van een mengsel bestaande uit 1 mL serum, 100 µL interne standaard, 20 µL fosforzuur (85%) (verstoring geneesmiddel-eiwit interactie) en 1 mL demiwater. Nadat de cartridge is gewassen met 1 mL 5% methanol wordt indinavir geëluëerd met 1 mL methanol. Het eluaat wordt gedroogd bij 40 °C onder stikstof gas en opgelost in 100 µL loopvloeistof.

Een chromatogram van blanco plasma en een standaard 10 mg/L indinavir in blanco plasma zijn gegeven in figuur 2. De extractieopbrengst is ongeveer 85% maar de zuiverheid van het blanco plasma extract is als onvoldoende beoordeeld. Het chromatogram van het blanco plasma extract vertoont een basislijn met meerdere kleine pieken tussen 3 en 6 minuten en een laat eluerende piek op 14,5 minuten.

Methode ontwikkeling 2-dimensionaal

Met 2-dimensionale methode ontwikkeling wordt aangeduid dat voor de was en elutie stap gebruik wordt gemaakt van een ander retentie-mechanisme.

Door het gecombineerde hydrofiele en lipofiele karakter van het polymere Oasis™ HLB pakkingsmateriaal kan gebruik gemaakt worden van de pKa waarde van de component om de

was- en elutiestap te optimaliseren. In tabel I wordt schematisch uitgelegd hoe dit voor zuren, neutrale en basische componenten werkt [4]. Door in de wasstap (Was 2 in tabel I, zie hieronder) een pH te kiezen waardoor de component neutraal wordt ($pH < pK_a$ voor zuren en $pH > pK_a$ voor basen) zal de component een binding aangaan met het lipofiele deel van het pakkingsmateriaal van de cartridge. Door nu met een aantal verschillende sterktes wasvloeistoffen de wasvloeistof met de sterkste waseigenschappen te kiezen, zonder dat er verlies van de component optreedt, wordt de meest optimale samenstelling van de wasvloeistof bepaald. Waters geeft in de bijgeleverde product-

informatie aan dat 10 verschillende vloeistofsamenstellingen variërend van 0 tot 100% (CH_3OH) in water, oplopend in stappen van 10% (CH_3OH), getest kunnen worden. Afhankelijk van het basisch of zuur karakter van de component wordt de pH van de wasvloeistof ingesteld. Na de wasstap kan de samenstelling van de elutievloeistof geoptimaliseerd worden. Hierbij wordt de component geïoniseerd ($pH > pK_a$ voor zuren en $pH < pK_a$ voor basen). De retentie van de component wordt nu bepaald door diens hydrofiele karakter. Waters geeft ook nu weer aan dat 10 verschillende elutie samenstellingen variërend van 0 tot 100% CH_3OH in water, oplopend in stappen van 10% CH_3OH , getest kunnen worden. Afhankelijk van het basisch of zuur karakter van de component wordt de pH van de wasvloeistof ingesteld. In geïoniseerde vorm is de component meer hydrofiel en zal bij een lager percentage CH_3OH in de elutievloeistof al elueren, terwijl de meer lipofiele storende componenten op het pakkingsmateriaal achter blijven. De samenstelling die de gewenste balans geeft tussen extractieopbrengst en afwezigheid van storende componenten is de geschikte samenstelling voor de elutie [4].

Indinavir heeft een basisch karakter en zal bij een $pH > pK_a$ neutraal zijn

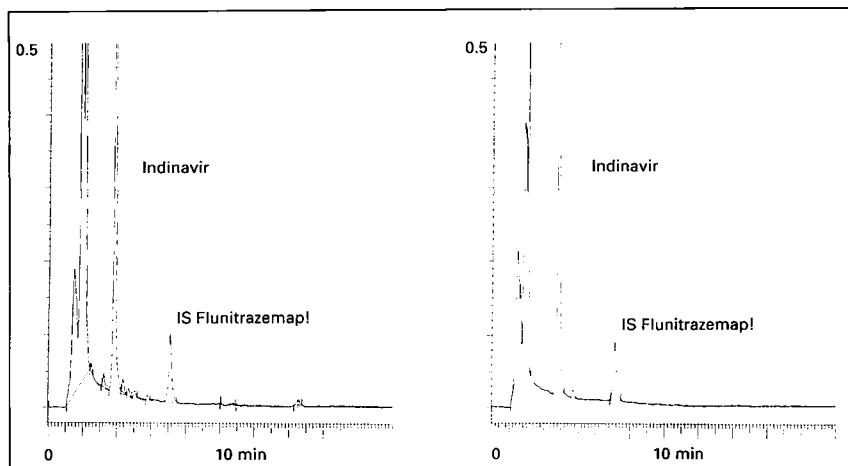
• Conditioneren		
• Laden monster		
• Was 1 1 mL 5% CH_3OH		
Zure componenten	Neutrale	Basische componenten
• Was 2 Zuur in CH_3OH /water	• Was 2 Zuur/base in CH_3OH /water	• Was 2 Base in CH_3OH /water
• Elutie Base in CH_3OH /water	• Elutie Hoog % org. oplosmiddel	• Elutie Zuur in CH_3OH /water

Tabel I.

Handleiding 2-D SPE methodeontwikkeling Oasis™ HLB volgens Waters.

Was 2; Wasstap met een zo hoog mogelijk % CH_3OH , zodat storende componenten elueren terwijl de te analyseren component achterblijft.

Elutie; Elutie met een zo laag mogelijk % CH_3OH van de te analyseren component, terwijl de storende componenten achterblijven.



Figuur 3.
Chromatogrammen van 10 mg/L indinavir in blanco plasma na wassen met 10% basische methanol in water (links) en 50% basische methanol in water (rechts).

(pKa 6,2 en 3,8). Hierdoor zal indinavir een interactie met het lipofiele deel van het vaste fase extractiemateriaal aan gaan. Getest zijn de volgende wasvloeistoffen: 1 mL 2% NH_4OH :10% methanol:water; 1 mL 2% NH_4OH :25% methanol:water en 1 mL 2% NH_4OH :50% methanol:water. Elutie vond plaats met 1 mL 2% CH_3COOH : CH_3OH . De chromatogrammen van 10 mg/L indinavir in blanco plasma na wassen met 1 mL 10% en 50% basische methanol in water zijn gegeven in figuur 3 (hierboven). Uit de chromatogrammen blijkt dat de basislijn na wassen met 50% basische methanol in water rustiger is. In de chromatogrammen wordt nog gebruik gemaakt van flunitrazepam als interne standaard. In een later stadium is gekozen voor een andere interne standaard (imipramine) omdat flunitrazepam niet bestand bleek tegen de pH wisselingen.

Volgens Waters is het nu mogelijk om de elutie stap op een dergelijke manier te optimaliseren dat er een minimum aan storende componenten wordt geëluëerd [4]. Hiertoe wordt wederom het gehalte in organisch oplosmiddel gevarieerd. In onze beleving is deze benadering niet toepasbaar als naast opzuivering van het monster ook concentrering wordt nagestreefd. Bij concentrering wordt het eluaat niet

rechtstreeks in een HPLC systeem geïnjecteerd maar ingedampt en in een kleiner volume opgelost voor injectie. Hoe hoger het percentage water in het eluaat, des te lastiger dit indampen zal zijn. We hebben gekozen voor een andere benadering. Elutie van storende componenten na SPE wordt voorkomen door te elueren met een minimale hoeveelheid organisch oplosmiddel. Dit organisch oplosmiddel moet voor een basische component als indinavir wel zuur zijn. Indinavir zal bij een pH waarde onder zijn pKa waarde positief geladen zijn. Door te elueren met een zo gering mogelijke hoeveelheid elutievloeistof wordt voor-

komen dat storende componenten eveneens elueren. Door te elueren met 0,25, 0,5, 0,75 en 1 mL 2% CH_3COOH :methanol is gezocht naar een compromis tussen zuiverheid van het extract en extractieopbrengst. In figuur 4 (hieronder) zijn de chromatogrammen gegeven van 10 mg/L indinavir in blanco plasma na SPE en elutie met 0,25 en 0,75 mL 2% CH_3COOH :methanol. Er is gekozen voor 0,75 mL omdat dit een zuiver extract geeft bij een hoge extractieopbrengst.

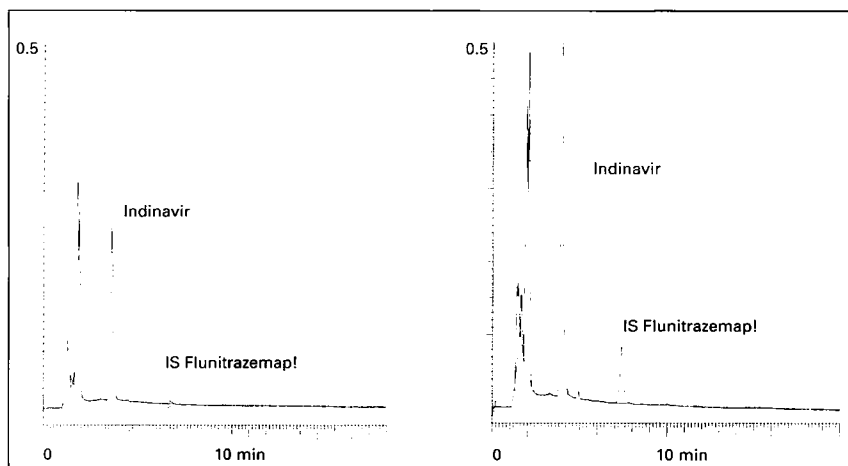
De voorgestelde SPE methode is schematisch weergegeven in tabel II op de volgende pagina.

Validatieparameters

De methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende regelgeving [5]. De validatieparameters zijn gegeven in tabel III, die onderaan de volgende pagina staat.

Conclusie en discussie

De voorgestelde SPE methode is geschikt voor monstervoorbewerking van indinavir. Inmiddels hebben wij de analyse van saquinavir, ritonavir en nelfinavir met dezelfde monstervoorbewerking opgestart en nemen deel aan een extern kwaliteitscontroleprogramma voor antivirale middelen. Als in de inleiding aangegeven beschikt het voor deze studie gebruikte chromatografische systeem



Figuur 4.
Chromatogrammen van 10 mg/L indinavir in blanco plasma na SPE en elutie met 0,25 mL (links) en 0,75 mL (rechts) 2% CH_3COOH :methanol.

• Conditioneren	1 mL CH ₃ OH
	1 mL H ₂ O
• Laden	1 mL serum
	100 µL IS (25 mg/L imipramine)
	20 µL H ₃ PO ₄ (85%)
	1 mL H ₂ O
• Wassen	1 mL 2% NH ₄ OH:50% CH ₃ OH:water
• Elutie	0,75 mL 2% CH ₃ COOH:CH ₃ OH
Na drogen bij 40 °C onder N ₂ (g), oplossen in 100 µL loopvloeistof	

Tabel II. 2-D SPE methode voor indinavir m.b.v. Oasis™ HLB cartridges.

over onvoldoende scheidend vermogen. Wij maken nu voor de analyse van antivirale middelen gebruik van een gradiënt systeem. Oasis™ HLB levert extra selectiviteit ten opzichte van C₁₈ SPE materiaal door gebruik

te maken van het ionogeen karakter van de te analyseren component. Een mixed mode fase als Narc® van de firma Baker of Bond Elute Certify® van Varian maakt eveneens gebruik van het zuur of basisch

Indinavir [mg/L]	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %	Extractieopbrengst % (VC %)
0,25	110,3	1,1	6,7	93,6 (6,4)
0,50	106,8	1,8	5,5	91,8 (5,5)
1,00	106,5	1,5	4,6	89,9 (7,5)
2,50	107,6	0,9	4,6	85,8 (2,3)
5,00	105,8	1,6	4,5	88,3 (5,9)
10,00	102,8	1,0	3,3	91,9 (1,6)
IS (imipramine)	99,8 (8,5)			
Detectiegrens	0,04 mg/L			
Bepalingsgrenzen	0,2-15,0 mg/L			
Voor alle bepalingen n=6				

Tabel III. Validatieparameters.

karakter van de te analyseren component. Deze kolommen zijn echter gebaseerd op een pakkingsmateriaal met een silica skelet, met alle beperkingen van dien [6]. Waters bracht als eerste leverancier dit soort polymere 'mixed mode' HLB pakkingsmaterialen op de markt. Meerdere leveranciers zijn inmiddels gevolgd. Tot slot nog een boodschap: Het pakkingsmateriaal is bestand tegen pH extremen. Let erop dat de te onderzoeken component dit ook is. Of zoals in ons geval de interne standaard.

Literatuur

- [1] Informatorium Medicamentorum 2003. KNMP, 's Gravenhage
- [2] Burger DM, Hugen PWA, Aarnoutse RE, Wuis EW, Hekster, Ya en Koopmans, PP. Goede redenen voor spiegelbepalingen. Pharm Weekbl 2001;136:163-168.
- [3] Langen MCJ. Bepaling van TCA zoals deze voorkomen in de KKG test sera. Extract 1992;3:15-19.
- [4] Productinformatie Oasis™ HLB, Waters, Etten-Leur.
- [5] FDA. Guidance for Industry; Analytical procedures and methods validation; chemistry, manufacturing and controls documentation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- [6] Langen MCJ. Presentatie SPE – Solid Phase Extraction, Themamiddag NVK-FAZ Monstervoorbewerking, 14 mei 1998, Utrecht.