

Diss. ETH No. 14423

**GAMMA STERILIZATION OF CHLORAMPHENICOL
AND ITS EYE OINTMENT PRODUCTS**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of the Natural Sciences

presented by

LAN HONG

Master of Science, CAS, Beijing
born September 30th, 1961
citizen of China

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Altorfer, Examiner
Prof. Dr. G. Folkers, Co-examiner

Zürich, 2001

Summary

Sterilization with γ rays is a cold process and enjoys a reputation as a reliable, environmentally safe and nontoxic technique. Used for sterilization of pharmaceutical products, however, γ rays could induce the degradation of the active ingredient as well as its excipient vehicle and cause the formation of radiolysis products in such quantities that toxicity must be considered. Radiation sterilization of a pharmaceutical product is permissible only when the absence of deleterious effects on the product has been confirmed experimentally.

The main purpose of this work is to determine the feasibility of γ -radiation sterilization for chloramphenicol and its eye ointment from a chemical view. The experiments implemented in four different parts provide us with important data to assess whether or not γ -radiation renders chloramphenicol and its eye ointment risky or unsafe for human.

Part I: Assay and Impurity Test of Irradiated Chloramphenicol Eye Ointment

A sample preparation method was developed to isolate chloramphenicol and its radiolytic products from a petrolatum ointment base. With this method, eye ointment was suspended in n-hexane at 45 °C, and the target compounds were isolated as residues by centrifugation. It was found that keeping the sample solution at 45°C during sample preparation was essential to ensure a satisfactory isolation. Experimental results and statistic analysis confirmed that the method was valid for both assay and impurity tests.

This isolation method is ideal for assay test and also specific for the extraction of unexpected and complex radiolysis products. For assay test, it has advantages over the pretreatment methods described in *The United States Pharmacopoeia* and *British Pharmacopoeia* in terms of accuracy, precision, and easy handling.

Part II: Identification and Evaluation of Chloramphenicol Radiolysis Products

In order to assess the safety of the radiolysis products and understand radiolysis pathway, the radiolysis products were studied with simultaneously qualitative and

quantitative analyses. Eight radiolysis products, including two new findings, were identified using HPLC-MS and HPLC-DAD. Carbon-carbon rupture reaction and oxidation reaction were found to be the main radiolysis reactions of chloramphenicol powder.

The qualitative and quantitative results were assessed and compared to the threshold requirements of international regulations for impurities in new drug products in order to evaluate the applicability of γ -sterilization for chloramphenicol products. It is concluded that the toxicity of chloramphenicol radiolysis products produced during γ -sterilization process is negligible, and such radiolysis products are safe for human health from a chemical point of view.

Part III: Radiolysis Characterization of Chloramphenicol in Powder and Eye ointment

Radiolysis behaviors of chloramphenicol, in both pure powder state and eye ointment, were investigated systematically. At the reference radiation dose of 25 kGy, the content of CAP decreases by 1.0% in powder state and by 1.2% in eye ointment. The profile of radiolysis products in powder state differs from that in eye ointment state. Hydrophobic radiolysis products of chloramphenicol were observed in eye ointment. Eye ointment base intensified the radiolysis of chloramphenicol during irradiation process.

The microenvironment of chloramphenicol molecule is a key factor governing the radiolysis of chloramphenicol. Oxygen functions as a scavenger and its presence diminishes the radiolysis of chloramphenicol. Residual solvents, in which chloramphenicol is readily soluble, promote radiolytic hydrolysis, while the converses exert no influence on chloramphenicol radiolysis. Inert gas purging or diffusion by exposure to an absorbent can efficiently prevent chloramphenicol powder from radiolysis.

Hydrophobic radiolysis products of chloramphenicol were detected in eye ointment base, however it is difficult to clarify them due to the complexity of eye ointment composition. N-acetyl-L-cysteine can protect chloramphenicol in eye ointment from radiolysis. The use of scavengers or lower irradiation dose could be feasible methods to reduce the radiolysis of chloramphenicol in eye ointment.

Part IV: Radiolysis Characterization of Eye Ointment Base

Gas formation in petrolatum eye ointment products is an unavoidable phenomenon during γ -irradiation. The gas composition was clarified using headspace-gas chromatography-mass spectrometry. Forty-one volatile radiolysis products in irradiated eye ointment base were detected and identified. The main volatile radiolysis products are homologous aliphatic hydrocarbons, which could be divided into groups by their carbon numbers.

The main radiolysis products are assigned to n-alkane and 1-alkene, and 2-methyl-alkane, which are the common radiolysis products of eye ointment base and its ingredient materials (white petrolatum and liquid paraffin, and wool fat). White petrolatum and liquid paraffin have the same radiolysis product profiles, in spite of differences in peak intensity. The profile of wool fat is similar, but with additional acetone as the most prominent radiolysis product. The profile of eye ointment base is a contribution of the radiolysis products of its ingredients.

It is inferred that the rupture of long carbon chains is the main degradation pathway of these materials. There is a close relationship between the mass spectrum of n-alkane and the chromatographic profile of radiolysis products in eye ointment materials. Both are characteristic of abundance of low mass compounds or m/z , having a tendency to just "fall apart". This confirms that the radiolysis mechanism approximates the degradation mechanism of mass spectrum. The fragment pattern in mass spectrometer can therefore be used as a prediction model for radiolysis product study.

GC method demonstrates that component distribution patterns of eye ointment as well as its ingredients have significant differences before and after γ -irradiation. No condensation reaction was observed. The radiolysis products are present at concentrations ranging from 0.21 to 10.9 ppm under the reference radiation dose of 25 kGy. Both qualitative and quantitative data show that irradiated eye ointment is safe for human use.

The radiolysis behavior of cetostearyl alcohol, another ingredient of eye ointment base, was also studied in its pure state, petrolatum ointment, and chloramphenicol eye ointment, respectively. The radiolysis of cetostearyl alcohol was found to occur in all cases. The degree of radiolysis in each case is directly proportional to the radiation dosage.

Forty-two radiolysis products in irradiated cetostearyl alcohol were identified using gas chromatography-mass spectrometry. These products are assigned to n-alkane, n-aldehyde, and 2-methyl-1-alcohol. None of them exhibits safety threat to pharmaceutical applications. Molecular rupture and oxidation of the hydroxyl group of cetostearyl alcohol are also the main radiolysis reaction pathways. There is evidence that different matrixes have little influence on the radiolysis of cetostearyl alcohol, in contrast to that of chloramphenicol.

In conclusion, this study has achieved the development of a set of effective analytical methods, the clarification of the factors responsible for radiolyses of the target compounds, and the elucidation of the relevant radiolysis pathways. The present work has also established criteria for assessing the feasibility of γ -processing for the sterilization of chloramphenicol and its eye ointment products.

Zusammenfassung

Sterilisierung mit γ -Strahlen ist ein antimikrobielles Verfahren, das bei thermolabilen Arzneistoffen zur Anwendung gelangt. Es ist trotzdem nicht auszuschliessen, dass γ -strahlen bei der Sterilisierung von pharmazeutischen Produkten die Zersetzung der Wirkstoffe verursachen können. Die Bildung von Radiolyseprodukten bei der Strahlensterilisation muss vom toxikologischen und analytischen Gesichtspunkt aus genauestens untersucht werden, um die Arzneimittelsicherheit zu gewährleisten. Sterilisierung durch Bestrahlung von pharmazeutischen Produkten ist nur dann zugelassen, wenn experimentell bestätigt worden ist, dass am Produkt keine, oder vernachlässigbare Abbauprozesse stattfinden.

Der Hauptzweck dieser Arbeit ist es, die Eignung der Sterilisierung durch γ -strahlen von Chloramphenicol als Festsubstanz und in Augensalben verarbeitet aus dem Blickwinkel der analytischen Chemie zu bestimmen. Die Experimente, die in vier verschiedene Teile aufgeteilt sind, zeigen analytisch relevante Daten, welche die Entscheidung gestatten, ob γ -strahlen zu Sterilisationszwecken bei Chloramphenicol als Festsubstanz und in Augensalben verarbeitet erfolgreich eingesetzt werden kann.

Teil I:

Methoden und Verunreinigungsteste für bestrahlte Chloramphenicol Augensalben

Es wurde eine Probenvorbereitungs-Methode entwickelt, welche es ermöglichte die Radiolyseprodukte von Chloramphenicol aus einer Augensalbe abzutrennen, deren Struktur aufzuklären und zu quantifizieren. Die Augensalbe wurde in n-Hexan bei 45° C suspendiert und die gewünschten Verbindungen wurden als Rückstand durch Zentrifugation isoliert. Man fand heraus, dass das Erwärmen der Probe auf 45° C während der Probenvorbereitung eine wichtige Voraussetzung war, um die gewünschte Trennung zu erreichen. Experimentelle Resultate und eine statistische Analyse bestätigen, dass sich die Methode für Gehaltsbestimmung und Verunreinigungstest eignet.

Diese entwickelte Isolations-Methode ist eine wichtige Voraussetzung für die Gehaltsbestimmung und auch spezifisch für die Extraktion von unerwarteten und komplexen Radiolyseprodukten von Chloramphenicol. Bezüglich der Gehaltsbestimmung hat sie Vorteile gegenüber den offiziellen Methoden, wie sie in der Pharmakopöe der Vereinigten Staaten und in derjenigen von Grossbritannien, betreffend Anwendbarkeit, Präzision und Richtigkeit, beschrieben ist.

Teil II:

Identifikation und Evaluation der radiolytischen Produkte von Chloramphenicol

Es wurden aufwendige analytische Untersuchungen durchgeführt, um die Radiolyseprodukte zu identifizieren, quantifizieren und die Radiolyseprozesse theoretisch zu interpretieren. Mittels HPLC-MS und HPLC-DAD wurden acht radiolytische Produkte, darunter zwei noch nie beschriebene, identifiziert, in der Struktur aufgeklärt und quantifiziert. Die Hypothese wurde bestätigt, dass Kohlenstoff-Kohlenstoff-Spaltungen und Oxidationen die wichtigsten Reaktionen bei der Bestrahlung von Chloramphenicol als Festsubstanz waren.

Die qualitativen und quantitativen Resultate wurden ausgewertet und verglichen mit den Mindestanforderungen der internationalen Bestimmungen für die Anwendbarkeit von γ -Sterilisierung von Chloramphenicolprodukten. Es war offensichtlich, dass die Toxizität von radiolytischen Chloramphenicolprodukten, welche beim Prozess der γ -

Sterilisierung auftraten, vernachlässigbar ist. Die entstandenen radiolytischen Produkte sind, vom chemischen Blickwinkel aus gesehen, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für die Gesundheit des Menschen unbedenklich und zeigen bei der Anwendung am Auge keine unerwünschten Nebenwirkungen

Teil III: Charakterisierung der Radiolyse von Chloramphenicol in Pulver und Salben

Das radiolytische Verhalten von Chloramphenicol sowohl als Festsubstanz als auch in Salben verarbeitet wurde systematisch untersucht. Bei der Referenzbestrahlungsdosis von 25 kGy verringerte sich der Gehalt von Chloramphenicol (CAP) um 1.0 % in Pulverform und um 1.2 % in der Form der Augensalbe. Das Profil der radiolytischen Produkte in Pulverform unterscheidet sich von demjenigen in Salbenform. Hydrophobe Produkte aus der Chloramphenicolradiolyse konnten in der Augensalbe nachgewiesen werden. Die Augensalbenbasis verstärkte die radiolytische Zersetzung von Chloramphenicol während des Bestrahlungsprozesses.

Die Mikroumgebung der Chloramphenicol-Moleküle ist der entscheidende Faktor, der die radiolytische Zersetzung von Chloramphenicol beeinflusst. Sauerstoff wirkt als Radikalfänger und seine Gegenwart vermindert die radiolytische Zersetzung von Chloramphenicol. Restliche Mengen von Lösungsmitteln, in denen sich Chloramphenicol gut lösen lässt, begünstigen die radiolytische Hydrolyse, während solche Lösungsmittel, in denen sich Chloramphenicol schlecht lösen lässt, keinen signifikanten Einfluss auf die Radiolyse von Chloramphenicol aufgezeigt haben. Begasen mit Inertgas oder Verminderung der Radikal-Diffusion durch die Zugabe von Schutzstoffen kann Chloramphenicol in Pulverform vor der Radiolyse effizient geschützt werden.

Hydrophobe Produkte der Radiolyse von Chloramphenicol wurden in der Augensalbe nachgewiesen, aber es ist analytisch sehr schwierig, diese zu charakterisieren da die Augensalbe eine äusserst komplexe Matrix darstellt. N-Acetyl-L-Cystein kann als Scavenger in Chloramphenicol-Augensalben eingesetzt werden, dadurch kann die Radiolyse signifikant vermindert werden. Geringere Bestrahlungsdosen, z.B. 15 kGy, sind ebenfalls Massnahmen, um die Radiolyse von Chloramphenicol in der Augensalbe zu reduzieren.

Teil IV: Charakterisierung der Radiolyse-Produkte in bestrahlten Salbengrundlagen

Die Bildung von Gasen und anderen leicht flüchtigen Komponenten in Augensalben ist ein nicht zu verhinderndes Phänomen bei der Strahlensterilisation. Die Zusammensetzung der flüchtigen Fraktionen wurde mittels Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie untersucht. Es konnten einundvierzig flüchtige Radiolyseprodukte in der bestrahlten Augensalbengrundlage detektiert und identifiziert werden. Der Hauptteil der flüchtigen Radiolyseprodukte sind homologe aliphatische Kohlenwasserstoffe, die aufgrund ihrer Anzahl Kohlenstoffe in sechs Gruppen eingeteilt werden können.

Der Hauptteil der Radiolyseprodukte gehört zu den Gruppen der n-Alkane, der 1-Alkene, und der 2-Methylalkane, welches die üblichen Radiolyseprodukte der Augensalbenbasis sind und deren Einzelkomponenten (weisses Paraffin, flüssiges Paraffin und Wollfett). Weisses Paraffin und flüssiges Paraffin haben das gleiche Profil an radiolytischen Produkten abgesehen von Unterschieden in der Peakintensität verschiedener Komponenten. Das Profil von Wollfett ist ähnlich aber weist zusätzlich Azeton auf als Hauptprodukt der Radiolyse. Das Profil der Augensalbe ist qualitativ gleich bezüglich der Radiolyseprodukte. es sind jedoch quantitative Unterschiede festzustellen..

Es ist offensichtlich, dass die Spaltung langer Kohlenstoffketten der wichtigste Abbauweg der Salbenbestandteile darstellt. Man kann eine enge Beziehung finden zwischen dem Massenspektrum von n-Alkanen und dem chromatographischen Profil von Radiolyseprodukten in Augensalbenmaterialien. Bei beiden ist die Häufigkeit von Fragmenten mit geringer Massenladungszahl m/z charakteristisch, die gegen höhere Werte hin gegen null gehen. Dies bestätigt, dass der Mechanismus der Radiolyse ähnlich ist wie derjenige der Fragmentierung bei der Aufnahme des Massenspektrums. Somit kann man aufgrund der Fragmentierung im Massenspektrum gewisse Vorhersagen treffen, wie das Spektrum von Produkten bei einer Radiolyse aussehen könnte.

Mit der GC-Methode konnte man demonstrieren, dass sowohl das Verteilungsmuster der Komponenten der Augensalbe als auch dasjenige seiner Inhaltsstoffe keine qualitativen Unterschiede aufweisen, vor und nach der Bestrahlung mit γ -Strahlen. Es wurden keine Kondensationsreaktionen beobachtet. Die Konzentrationen der Radiolyseprodukte liegen zwischen 0.2 und 11 ppm bei der

Referenzstrahlendosis von 25 kGy. Sowohl qualitative als auch quantitative Daten zeigen, dass bestrahlte Augensalbe unbedenklich ist für die Anwendung beim Menschen.

Das radiolytische Verhalten von Ketostearylalkohol, einem anderen Inhaltsstoff der Augensalbengrundlage, wurde ebenfalls in seiner reinen Form, in Paraffinsalbe und in der Chloramphenicolsalbe untersucht. Ketostearylalkohol wurde in allen Fällen in geringen Masse radiolytisch zersetzt. Das Ausmass der Radiolyse ist dabei in jedem Fall direkt proportional zur Strahlendosis.

Mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie konnten zweiundvierzig Radiolyseprodukte in bestrahltem Ketostearylalkohol identifiziert werden. Diese Produkte wurden den n-Alkanen, den n-Aldehyden und den 2-Methyl-1-alkohol zugeordnet. Für keines dieser Produkte ist ein Sicherheitsrisiko bei pharmazeutischen Anwendungen bekannt. Auch beim Ketostearylalkohol gehören das Brechen der molekularen Bindungen und die Oxidation der Hydroxygruppe zu den wichtigsten Radiolysereaktionen. Es gibt Hinweise, dass verschiedene Matrizen einen kleinen Einfluss haben auf die Radiolyse von Ketostearylalkohol, dies im Gegensatz im Gegensatz zu Chloramphenicol.

Zusammengefasst befasst sich diese Studie mit der Entwicklung von verschiedenen geeigneten Analysemethoden, welche es gestatten die für die Radiolyse verantwortlichen Faktoren und die Charakterisierung der relevanten radiolytisch bedingten Abbaumechanismen von Chloramphenicol und Chloramphenicol-Augensalben zu beurteilen. Diese Arbeit hat ebenfalls Kriterien aufgestellt, für die erfolgreiche Anwendung von γ -strahlen zur Sterilisation von Chloramphenicol und seine Augensalbenprodukte.