

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Studiu Analitic al unor Antibiotice Aminoglicozidice

---

Doctorand **Balázs Szaniszló**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Marius Bojiță**

---



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	17
<b>1. Considerații generale</b>	19
1.1. Reprezentanții clasei antibioticelor aminoglicozidice	19
1.2. Farmacocinetica antibioticelor aminoglicozidice	24
1.3. Farmacodinamia aminoglicozidelor	25
1.4. Farmacoterapia antibioticelor aminoglicozidice	26
1.5. Farmacotoxicologia aminoglicozidelor	29
1.6. Interacțiunile medicamentoase ale aminoglicozidelor	30
<b>2. Caracterizarea analitică a antibioticelor aminoglicozidice</b>	31
2.1. Proprietățile fizico-chimice ale antibioticelor aminoglicozidice	31
2.2. Analiza calitativă a antibioticelor aminoglicozidice	32
2.2.1. Metode spectrale	33
2.1.1.1. Analiza prin spectrometrie în infraroșu	33
2.2.2. Metode cromatografice	33
2.2.2.1. Analiza prin cromatografie în strat subțire	33
2.3. Analiza cantitativă a aminoglicozidelor	34
2.3.1. Metode spectrale	34
2.3.1.1. Cuantificarea prin spectrofotometrie UV-Vis	34
2.3.1.2. Cuantificarea prin spectrometrie în infraroșu	34
2.3.2. Metode cromatografice	35
2.3.2.1. Dozarea aminoglicozidelor prin cromatografie în strat subțire de înaltă performanță	35
2.3.2.2. Dozarea aminoglicozidelor prin cromatografie de lichide	35
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	39
<b>1. Obiective</b>	41
<b>2. Metodologie generală</b>	42
<b>3. Studiul 1. Separarea unor aminoglicozide prin cromatografie în strat subțire</b>	43
3.1. Introducere	43
3.2. Obiective	43
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	45
3.5. Discuții	47
3.6. Concluzii	48
<b>4. Studiul 2. Caracterizarea unor aminoglicozide prin spectrometrie în infraroșu și infraroșu apropiat</b>	49
4.1. Introducere	49
4.2. Obiective	49
4.3. Material și metodă	50
4.4. Rezultate	51
4.5. Discuții	58
4.6. Concluzii	59
<b>5. Studiul 3. Caracterizarea unor aminoglicozide prin analiză termică</b>	61
5.1. Introducere	61
5.2. Obiective	61
5.3. Material și metodă	62

5.4. Rezultate	62
5.5. Discuții	66
5.6. Concluzii	66
<b>6. Studiul 4. Analiza spectrofotometrică a unor antibiotice aminoglicozidice</b>	67
6.1. Introducere	67
6.2. Obiective	71
6.3. Material și metodă	71
6.4. Rezultate	74
6.4.1. Determinarea aminoglicozidelor prin spectrofotometrie nederivată	74
6.4.2. Determinarea aminoglicozidelor prin spectrofotometrie derivată	77
6.5. Discuții	81
6.6. Concluzii	82
<b>7. Studiul 5. Determinarea amikacinei din materii prime și soluții injectabile prin cromatografie de lichide</b>	83
7.1. Introducere	83
7.2. Obiective	84
7.3. Material și metodă	84
7.4. Rezultate	86
7.5. Discuții	90
7.6. Concluzii	91
<b>8. Discuții generale</b>	93
<b>9. Concluzii generale</b>	95
<b>10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	97
<b>REFERINȚE</b>	99

**CUVINTE CHEIE:** antibiotice aminoglicozidice, spectrometrie IR, analiză termică, spectrofotometrie UV-Vis, HPLC.

# INTRODUCERE

Antibioticele aminoglicozidice (aminoglicozidele) sunt produși naturali bacterieni sau produși de semisinteză cu proprietăți bactericide și administrare parenterală sau locală. Aminoglicozidele naturale reprezintă amestecul unor substanțe înrudite, ce rezultă din biosinteză controlată. Astfel, neomicina reprezintă amestecul format din neomicina B, neomicina C și neomicina A (neamina), gentamicina este alcătuită din gentamicinele C1, C1a, C2 (componente majore), respectiv C2a, C2b (componente minore), iar kanamicina este formată din kanamiciele A (componenta majoră), B și C. Cele mai utilizate aminoglicozide semisintetice sunt amikacina, tobramicina și netilmicina.

Aminoglicozidele sunt agenți antibacterieni cu indice terapeutic mic, prezentând efecte adverse severe precum: insuficiența renală sau ototoxicitatea. În vederea lărgirii spectrului antibacterian și a creșterii eficienței terapeutice, uneori aminoglicozidele se asociază cu alte antibiotice.

Proprietățile fizico-chimice ale antibioticelor aminoglicozidice impun o abordare specială în ceea ce privește analiza lor fizico-chimică. Insolubilitatea în majoritatea solvenților organici, capacitatea redusă de a absorbi lumina UV-Vis, dar și faptul că multe aminoglicozide reprezintă amestecuri de substanțe provenite din biosinteză duc la dificultăți în aplicarea unor tehnici frecvent utilizate în analiza medicamentelor, precum: extracțiile lichid-lichid, determinările spectrofotometrice directe sau anumite tipuri de cromatografie.

**OBIECTIVE:** Farmacopeea Europeană, Farmacopeea Americană, Farmacopeea Britanică sau Farmacopeea Română împreună cu datele din literatura de specialitate oferă date valoroase despre analiza cantitativă și calitativă a antibioticelor aminoglicozidice. În cadrul studiului doctoral mi-am propus completarea acestor date și a opțiunilor analitice cu tehnici noi, performante, respectând prevederile privind siguranța și eficiența actului terapeutic și cele privind bunele practici de fabricație și de laborator.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei prezintă o sinteză a datelor din literatură privind principalele aspecte legate de analiza antibioticelor aminoglicozidice.

Antibioticele aminoglicozidice sunt pulberi cristaline a căror culoare poate varia de la alb la slab gălbui, solubile în apă, greu solubile sau insolubile în solvenți organici. Aminoglicozidele sunt substanțe optic active.

Conform literaturii de specialitate printre metodele analitice utilizate în vederea determinării calitative a aminoglicozidelor se numără metodele cromatografice în strat subțire și metode spectrometrice în infraroșu prin metoda includerii în bromură de potasiu. Dozarea antibioticelor aminoglicozidice a fost posibilă cu ajutorul metodelor spectrale IR cu transformată Fourier.

Prezența cromoforilor din structura streptomisinei face posibilă determinarea cantitativă a acesteia prin spectrofotometrie UV-Vis direct, însă dozarea aminoglicozidelor 2-dezoxistreptaminice poate fi realizată doar indirect, după complexare cu ioni de  $\text{Cu}^{2+}$  și un ligand auxiliar, tartratul de sodiu și potasiu.

Cromatografia în strat subțire de înaltă performanță cuplată cu densitometrie sau fluorodensimetrie a fost utilizată pentru identificarea și determinarea cantitativă a neomicinei, amikacinei, gentamicinei și netilmicinei din preparate farmaceutice, sau chiar din probe biologice.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) este frecvent utilizată pentru determinarea calitativ-cantitativă a antibioticelor aminoglicozidice. Se folosesc detecția în UV-Vis, fluorimetria, detecția electrochimică sau spectrometria de masă. Detecția în UV-Vis presupune derivatizare prealabilă cu reactivi purtători de grupări cromofore. În acest scop se folosesc 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenul (DNFB) sau acidul 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonic (TNBS). Detecția cu detectori de fluorescență se poate utiliza după derivatizare cu reactivi de fluorescență. Cei mai frecvent folosiți sunt 9-fluorenilmetil clorformatul (FMOC-Cl) și o-ftaldialdehida (OPA) cu 2-mercaptoetanol.

# CONTRIBUȚII PERSONALE

## Studiu 1. Separarea unor aminoglicozide prin cromatografie în strat subțire

### Introducere

În analiza antibioticelor aminoglicozidice, metodele CSS pot fi utilizate în vederea separării analitului dintr-o matrice farmaceutică, la identificării analitului, sau pentru controlul impurităților.

În acest studiu mi-am propus realizarea unei metode HPTLC unice, care să permită separarea și identificarea simultană a amikacinei, neomicinei și gentamicinei din probe de substanțe farmaceutice active și din produse farmaceutice.

### Material și metodă

S-au utilizat plăci cromatografice HPTLC de dimensiunile 10x10 cm, de tipul HPTLC silica gel 60, respectiv HPTLC silica gel F<sub>254</sub> (Merck, Germania). Aplicarea benzilor s-a realizat cu ajutorul aplicatorului semiautomat Camag Linomat 5 (Camag, Germania), prevăzut cu seringă Hamilton de 500 μL (Camag, Germania). Vizualizarea în UV s-a realizat la 254 nm.

Soluția injectabilă de gentamicină 80 mg/2 mL a fost achiziționată de pe piața farmaceutică locală.

S-a utilizat o fază mobilă formată din 1-butanol, metanol, acid acetic glacial și apă purificată 1:1:1:2. Soluțiile de referință au avut concentrația 5 mg aminoglicozid/mL apă:metanol 4:1.

Soluțiile probă de gentamicină au fost preparate prin dizolvarea substanțelor active sau diluarea soluțiilor injectabile la o concentrație de 2 mg/mL folosind un amestec apă:metanol 4:1.

Soluțiile de analizat au fost aplicate cu ajutorul aplicatorului semiautomat Camag Linomat 5. S-au aplicat câte 4 μL din fiecare soluție, cu o viteză de 2 μL/minut.

Plăcile cromatografice au fost lăsate să migreze 7 cm. Plăcile au fost vizualizate la lumina UV la 254 nm, apoi au fost pulverizate cu o soluție de ninhidrină și expuse timp de 15 minute la 105°C.

### Rezultate

Decelarea antibioticelor aminoglicozidice la lumină UV pe plăcile HPTLC fluorescente de tipul silica gel F<sub>254</sub> nu a fost posibilă. Ca urmare, vizualizarea spoturilor s-a realizat după pulverizare cu soluție de ninhidrină și expunere la căldură. Spoturile cromatografice datorate diferitelor fracții aminoglicozidice s-au colorat în galben-brun-cărămiziu.

Spotul corespunzător amikacinei, de culoare galben-brun a avut valoarea R<sub>f</sub> de 0,42. Pentru gentamicină s-au obținut trei spoturi cu valori R<sub>f</sub> 0,19 (spot galben-brun), 0,31 (spot galben-brun), respectiv 0,37 (spot cărămiziu). Spoturile obținute pentru neomicină au avut valori R<sub>f</sub> de 0,18 (spot galben), 0,27 (spot galben-cărămiziu), respectiv 0,35 (spot brun).

Metoda a fost utilizată la identificării amikacinei și neomicinei din substanțe farmaceutice active, respectiv a gentamicinei din substanțe farmaceutice active și soluții injectabile.

## Studiu 2. Caracterizarea unor aminoglicozide prin spectrometrie în infraroșu și infraroșu apropiat

### Introducere

Ph Eur și BP prevede în cazul amikacinei identificarea prin metoda dispersiei în pastile de bromură de potasiu. Față de această metodă, utilizarea dispozitivelor ATR (attenuated total reflectance) prezintă o serie de avantaje: viteza determinărilor crește, este posibilă adaptarea la monitorizări în timp real în flux continuu și este redus de asemenea cantitatea de deșeuri.

În studiul de față mi-am propus analiza spectrelor IR și NIR ale streptomycinei, neomicinei, gentamicinei, kanamicinei și amikacinei, colectate cu ajutorul dispozitivelor ATR și realizarea unor metode de identificare pentru aceste aminoglicozide.

### Material și metodă

Spectrometrul IR utilizat a fost de tipul Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific, SUA), iar spectrometrul NIR de tipul Antaris II FT-NIR Analyzer (Thermo Scientific, SUA). Spectrele IR au fost prelucrate cu ajutorul programului Omnic (Thermo Scientific, SUA), iar spectrele NIR cu programul Antaris (Thermo Scientific, SUA).

Spectrele IR respectiv NIR au fost colectate direct pe pulberile de substanțe de referință, fără prelucrare prealabilă. Spectrele colectate au reprezentat media a 32 colectări individuale. Domeniul spectral de lucru a fost 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  pentru IR și 4000 - 10000  $\text{cm}^{-1}$  pentru NIR.

## Rezultate

### *Spectrele IR ale aminoglicozidelor*

Benzile de absorbție dominante în spectrele IR ale antibioticelor aminoglicozidice corespund grupărilor -OH, respectiv -NH<sub>2</sub>. Abundența acestora face ca domeniul 2800-3300  $\text{cm}^{-1}$  să prezinte benzi de absorbție largi în cazul fiecăreia dintre aminoglicozidele studiate. În cazul amikacinei peste benzile de absorbție ale grupărilor hidroxil și amino se adaugă și banda corespunzătoare grupării amidice, de origine sintetică. Pe domeniul 1300-1650  $\text{cm}^{-1}$  găsim benzile de absorbție specifice grupărilor eter (din structura aminozaharurilor constitutive), amino primare și secundare, respectiv amidică substituită în cazul amikacinei. Benzile de absorbție compuse ce apar pe domeniul 900-1200  $\text{cm}^{-1}$  sunt caracteristice clasei. La aceste numere de undă absorb atât grupările amino primare, amino secundare, hidroxil alifatic, grupările eterice și glicozidice, cât și gruparea amidică din structura de semisinteză a amikacinei.

### *Spectrele NIR ale aminoglicozidelor*

Între 4400 și 4700  $\text{cm}^{-1}$  antibioticele aminoglicozidice prezintă benzi de absorbție de combinație de intensitate mare, largi, caracteristice clasei, datorate legăturilor din scheletul moleculelor aminoglicozidice.

Regiunile cele mai importante din punct de vedere analitic din spectrul NIR al aminoglicozidelor apar între 5000 - 7000  $\text{cm}^{-1}$ . Acestea reprezintă benzi de absorbție combinate și sunt datorate grupelor funcționale amino și hidroxil, iar lungimile de undă la care apar variază în funcție de efectele electronice din moleculă. Astfel de benzi intense apar între 4919 - 5096  $\text{cm}^{-1}$ , 6576 - 6996  $\text{cm}^{-1}$ . Benzile largi, cu maxime de absorbție între 8296 și 8476  $\text{cm}^{-1}$  sunt datorate legăturilor din catenă și reprezintă banda a doua armonică pentru legăturile C-H. O bandă slabă, însă caracteristică aminelor apare în cazul kanamicinei la 9616  $\text{cm}^{-1}$  (a doua bandă armonică a legăturii N-H).

În cadrul acestui studiu am arătat că spectrele colectate cu ajutorul dispozitivelor ATR pot fi folosite în vederea identificării aminoglicozidelor, iar metodele de colectare ale spectrelor sunt echivalente cu metode mai laborioase. Spectrele colectate în cadrul studiului pot fi utilizate ca referințe în vederea identificării aminoglicozidelor studiate din probe necunoscute.

## Studiu 3. Caracterizarea unor aminoglicozide prin analiză termică

### Introducere

Antibioticele aminoglicozidice reprezintă structuri complexe, labile, totuși, literatura de specialitate oferă puține date despre comportamentul lor în timpul expunerii la temperaturi ridicate.

În acest capitol mi-am propus realizarea unui studiu TG/DSC pentru amikacină, kanamicină, gentamicină, neomicină și streptomycină pe intervalul 25-400°C, în vederea stabilirii punctului (intervalului) de topire și a temperaturii de descompunere, respectiv în vederea estimării profilului de descompunere.

### Material și metodă

Termogravimetrul utilizat a fost de tipul Mettler Toledo TMA/SDTA 841e (Mettler Toledo, SUA). S-au utilizat creuzate de alumina de 70  $\mu\text{L}$ . Analizorul DSC folosit a fost de tipul Mettler Toledo 822, pentru care s-au utilizat creuzete de 40  $\mu\text{L}$ , confecționate din alumina. Termogramele au fost prelucrate și interpretate cu ajutorul programului STARe SW 9.00. Substanțele utilizate în studiu au fost de puritate analitică.

Termogramele TG și DSC au fost înregistrate pe domeniul de temperatură 25-400°C. În cazul analizelor TG cantitatea de probă a fost de aproximativ 5 mg. În cazul termogramelor DSC în creuzetele de alumina s-a adus o cantitate de aproximativ 2 mg probă. Atât în cazul analizelor DSC, cât și în cazul analizelor TG s-a utilizat atmosfera dinamică de N<sub>2</sub> (purjare cu un debit de 50 mL/min), iar viteza de încălzire a fost 10°C/min.

### Rezultate

Antibioticele aminoglicozidice au prezentat o pierdere inițială de masă (fenomen endoterm) pe domeniul 40-170°C. Aceasta a reprezentat între 5,1% (kanamicină sulfat) și 12,8% (amikacină sulfat). Această pierdere de masă se traduce prin pierderea apei adsorbite ca umiditate (între 40-105°C) și pierderea apei din rețeaua cristalină (între 105-170°C).

Pe domeniul 174,3-192,4°C aminoglicozidele studiate au prezentat un pic endoterm neînsoțit de pierdere de masă. Acesta poate fi asociat cu o modificare în aranjarea rețelelor cristaline ale substanțelor studiate.

Topirea antibioticelor aminoglicozidice a fost însoțită de descompunere, cu pierderi semnificative de masă. Astfel, intervalul de topire în cazul amikacinei sulfat pornește de la 244,8°C, în cazul gentamicinei sulfat la 241,5°C, în

cazul kanamicinei sulfat la 284,7°C, în cazul neomicinei sulfat la 219,7°C iar în cazul streptomycinei sulfat la 215,0°C. Pierderea de masă semnificativă asociată descompunerii antibioticelor aminoglicozidice se datorează în parte pierderii grupărilor -OH și -NH<sub>2</sub> sub formă de apă și probabil un amestec format din amoniac și N<sub>2</sub>. La temperaturi mai mari are loc carbonizarea aminoglicozidelor cu pierdere ulterioară de masă sub formă de apă și oxizi de carbon.

Datele obținute în cadrul studiului subliniază faptul că aminoglicozidele sunt substanțe termic instabile, modificările fizico-chimice începând să apară de la 40°C. Studiul evidențiază de asemenea faptul că aminoglicozidele rețin cantități importante de apă în structura lor, ceea ce impune controlul strict al umidității în cazul acestor substanțe.

## **Studiu 4. Analiza spectrofotometrică a unor antibiotice aminoglicozidice**

### **Introducere**

Antibioticele aminoglicozidice 2-dezoxistreptaminice nu prezintă spectre de absorbție UV-Vis care să permită determinarea lor prin metode spectrofotometrice în acest domeniu. Determinarea lor este însă posibilă în prezența ionilor metalici bivalenți, cu care aminoglicozidele formează complecși colorați.

Obiectivele acestui studiu au fost realizarea unor metode spectrofotometrice și spectrofotometrice derivate, care să permită dozarea neomicinei, kanamicinei, gentamicinei și amikacinei în prezența ionilor de Cu<sup>2+</sup>. De asemenea, mi-am propus realizarea unui studiu asupra cineticii de formare a combinațiilor complexe aminoglicozid-ioni Cu<sup>2+</sup>.

### **Material și metodă**

Analizele au fost efectuate utilizând un spectrofotometru de tip Agilent 8453 și programul de calcul Chemstation (Agilent Technologies, Germania). Spectrele au fost înregistrate pe domeniul UV-Vis 200-800 nm.

Cinetica de formare și degradare a combinațiilor complexe aminoglicozid-Cu<sup>2+</sup> a fost stabilită cu ajutorul unui spectrofotometru Spectronic Genesys 5 (Milton Roy).

În cadrul studiului a fost studiată formarea complecșilor aminoglicozid-Cu<sup>2+</sup> în prezența unor solvenți organici (acetona, metanol, etanol) la diferite valori de pH. În cazul neomicinei solvenul potrivit s-a dovedit a fi amestecul apă:metanol în raport de 4:1, în timp ce în cazul kanamicinei, gentamicinei și amikacinei s-a utilizat soluție NaOH 10 mM. Sursa de ioni de Cu<sup>2+</sup> utilizat a fost CuCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, iar concentrația optimă s-a dovedit a fi 0,1 mg/mL.

Spectrele au fost înregistrate în cazul fiecărui analit pe domeniul spectral 200-800 nm și prelucrate atât direct, prin metode nederivate, cât și folosind derivata de ordin I al spectrelor colectate. Lungimile de undă optime pentru cuantificare pe spectrele nederivate (A) au fost 260 nm în cazul neomicinei, 230 nm în cazul gentamicinei, 280 nm pentru kanamicină, respectiv 325 nm pentru amikacină. În cazul spectrofotometriei derivate de ordin I (dA) lungimile de undă care au prezentat specificitate maximă au fost 277 nm în cazul neomicinei, 291 nm în cazul gentamicinei, 290 nm pentru kanamicină, respectiv 284 nm pentru amikacină.

Pentru intervalul 5-15 minute după preparare nu au existat modificări semnificative în stabilitatea combinațiilor complexe, astfel am considerat acest interval potrivit pentru citirea probelor pentru fiecare antibiotic aminoglicozidic inclus în studiu.

### **Rezultate**

În ceea ce privește spectrofotometriei nederivate dreptele de calibrare obținute au prezentat factori de corelare mai mici decât limita impusă de  $r > 0,9985$ , astfel aceste drepte de calibrare nu au putut fi considerate valide.

Deoarece spectrofotometria nederivată nu a oferit rezultate satisfăcătoare, s-a încercat cuantificarea aminoglicozidelor studiate prin spectrofotometrie derivată, folosind derivatele de ordinul I al spectrelor colectate. Factorul de corelare obținut astfel a fost  $r > 0,998$  pentru fiecare analit inclus în studiu (amikacină, kanamicină, gentamicină, neomicină). Au fost calculate ecuațiile dreptelor de calibrare pentru fiecare caz. Regăsirea a fost între 99,89%-100,84% în cazul neomicinei, 97,26%-101,11% pentru gentamicină, 99,17%-101,64% în cazul kanamicinei și 98,56%-102,16% în cazul amikacinei. Pentru fiecare metodă a fost stabilită repetabilitatea și precizia intermediară. Abaterile standard relative obținute pentru analize efectuate în aceleași zile a fost între 1,40-2,32% pentru neomicină, 1,00-1,63% pentru gentamicină, 0,27-0,88% pentru kanamicină și 1,16-1,59% pentru amikacină. În cazul preciziei intermediare valorile RSD% au fost 1,90% pentru neomicină, 1,27% pentru gentamicină, 1,18% pentru kanamicină și 1,25% în cazul amikacinei.

Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ) au fost evaluate pe baza raportului dintre semnal și zgomotul de fond al liniei de bază. Valorile obținute pentru aminoglicozidele incluse în studiu au fost:

- neomicină: LOD=0,025 mg/mL, LOQ=0,075 mg/mL;
- gentamicină: LOD=0,006 mg/mL, LOQ=0,020 mg/mL;
- kanamicină: LOD=0,009 mg/mL, LOQ=0,029 mg/mL;

- amikacină: LOD=0,004 mg/mL, LOQ=0,013 mg/mL.

Metodele analitice realizate în cadrul studiului pot fi aplicate în analiza de rutină a aminoglicozidelor din substanțe farmaceutice active.

## **Studiu 5. Determinarea amikacinei din materii prime și soluții injectabile prin cromatografie de lichide**

### **Introducere**

Literatura de specialitate prezintă pentru analiza antibioticelor aminoglicozidice o serie de metode bazate pe separare HPLC și detecție UV-Vis precedate de derivatizare pre-coloană. Complexitatea proceselor de derivatizare fac însă aceste metode greu de reprodus, iar cantitățile mari de reactivi de derivatizare utilizați pot duce la interferențe și probleme în ceea ce privește specificitatea. În vederea rezolvării acestor neajunsuri mi-am propus realizarea unei metode analitice HPLC-UV-Vis folosind ca agent de derivatizare 2,4-dinitro-1-fluoro-benzen, care să permită determinarea cantitativă a amikacinei din substanțe farmaceutice și soluții injectabile. De asemenea, în vederea obținerii unei metode cu specificitate și reproductibilitate crescută, mi-am propus reducerea cantității de agent de derivatizare față de datele întâlnite în literatura de specialitate.

### **Material și metodă**

Sistemul cromatografic utilizat a fost de tipul Waters 2695 (Waters, SUA), cuplat cu detector Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, SUA).

Separarea a avut loc în gradient, timpul de rulare a fost de 35 minute. Ca fază mobilă A s-a utilizat apă purificată:acid acetic glacial=300:1, iar ca fază mobilă B acetonitril:acid acetic glacial=300:1. Coloană cromatografică a fost de tipul octadecilsilan, 250 mm X 4,6 mm, diametrul particulelor 5 μm (Xterra, Waters, SUA). Debitul a fost de 1mL/min. Detecția a fost realizată la 354 nm cu ajutorul detectorului cu șir de fotodiode.

### **Rezultate**

În cadrul studiului a fost realizată o metodă HPLC-UV Vis, care permite dozarea amikacinei după derivatizare folosind 2,4-dinitro-1-fluoro-benzen. Metoda utilizează o cantitate de agent de derivatizare mult redusă față de metodele descrise în literatura de specialitate, îmbunătățind astfel parametrii de performanță a metodei. Metoda a fost validată, prezintă liniaritate pe domeniul 80-120 μg/mL ( $r=0,99925$ ). Regăsirea medie a fost între 99,55 - 100,58%. Limita de detecție și limita de cuantificare au fost 1,6 μg/mL și 4,8 μg/mL. Metoda realizată permite determinarea cantitativă a amikacinei din substanțe farmaceutice active și din preparate farmaceutice parenterale. Se pretează de asemenea la studiul stabilității soluțiilor parenterale de amikacină.

## **Concluzii generale**

Principalele direcții de cercetare propuse în cadrul tezei de doctorat au fost caracterizarea fizico-chimică a antibioticelor aminoglicozidice în vederea obținerii informații noi asupra comportamentului acestora, respectiv realizarea unor metode analitice noi, care să permită determinarea calitativă și cantitativă a aminoglicozidelor din diverse matrici.

Identificarea antibioticelor aminoglicozidice este posibilă cu ajutorul tehnicilor cromatografice (cromatografie în strat subțire de înaltă performanță și cromatografie de lichide de înaltă presiune - folosind parametrii de retenție) și a celor spectrale (spectrometrie în infra-roșu și infra-roșu apropiat sau spectrofotometrie UV-Vis - cu ajutorul factorului de similitudine F). Analiza termică (termogravimetria și analiza calorimetrică diferențială) prin suprapunerea profilului probelor cu cel al referințelor permite confirmarea identității.

În vederea evaluării comportamentului fizico-chimic al aminoglicozidelor s-a utilizat analiza termică. Determinarea cantității de apă reținută în structura aminoglicozidelor, dar și indicii asupra modului de reținere a fost realizată folosind analiza termogravimetrică. Combinarea tehnicilor termogravimetrice cu analiza calorimetrică diferențială a permis stabilirea profilului de degradare termică a antibioticelor aminoglicozidice. Informațiile obținute prin calorimetria diferențială pot fi utilizate de asemenea în analiza interacțiunilor aminoglicozidelor, în posibile asocieri cu excipienți farmaceutici sau alte substanțe farmaceutice active.

Analiza cantitativă a antibioticelor aminoglicozidice a fost realizată cu ajutorul spectrofotometriei UV-Vis respectiv cu ajutorul cromatografiei de lichide cuplate cu spectrofotometrie UV-Vis. Metodele au fost validate conform prevederilor stabilite de către ghidurile International Conference on Harmonisation.



ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

# Analytical Study of some Aminoglycosidic Antibiotics

---

PhD Student **Balázs Szaniszló**

---

Scientific Coordinator **Prof. Dr. Marius Bojița**

---

CLUJ-NAPOCA 2013



# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW</b>	17
<b>1. General Considerations</b>	19
1.1. Representatives of the aminoglycosidic antibiotics	19
1.2. Pharmacokinetics of the aminoglycosidic antibiotics	24
1.3. Pharmacodynamics of the aminoglycosidic antibiotics	25
1.4. Pharmacotherapy of the aminoglycosidic antibiotics	26
1.5. Pharmacotoxicology of the aminoglycosidic antibiotics	29
1.6. Drug interactions of the aminoglycosidic antibiotics	30
<b>2. Analytical Characterization of the aminoglycosidic antibiotics</b>	31
2.1. Physico-chemical properties of the aminoglycosidic antibiotics	31
2.2. Qualitative analysis of the aminoglycosidic antibiotics	32
2.2.1. Spectral methods	33
2.2.1.1. Infra-red spectral analysis	33
2.2.2. Chromatographic methods	33
2.2.2.1. Thin layer chromatographic methods	33
2.3. Quantitative analysis of the aminoglycosidic antibiotics	34
2.3.1. Spectral methods	34
2.3.1.1. Quantitative analysis using UV-Vis spectrophotometry	34
2.3.1.2. Quantitative analysis using infra-red spectrometry	34
2.3.2. Chromatographic methods	35
2.3.2.1. Quantitative analysis using high performance thin layer chromatography	35
2.3.2.2. Quantitative analysis using liquid chromatography	35
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	39
<b>1. Objectives</b>	41
<b>2. General methodology</b>	42
<b>3. Study 1. thin layer chromatographic separation of some aminoglycosidic antibiotics</b>	43
3.1. Introduction	43
3.2. Objectives	43
3.3. Material and method	44
3.4. Results	45
3.5. Discussions	47
3.6. Conclusions	48
<b>4. Study 2. Infra-red and near infra-red spectrometric characterization of some aminoglycosidic antibiotics</b>	49
4.1. Introduction	49
4.2. Objectives	49
4.3. Material and method	50
4.4. Results	51
4.5. Discussions	58
4.6. Conclusions	59
<b>5. Study 3. Characterization of some aminoglycosidic antibiotics using thermal analysis</b>	61
5.1. Introduction	61
5.2. Objectives	61

5.3. Material and method	62
5.4. Results	62
5.5. Discussions	66
5.6. Conclusions	66
<b>6. Study 4. Spectrophotometric analysis of some aminoglycosidic antibiotics</b>	67
6.1. Introduction	67
6.2. Objectives	71
6.3. Material and method	71
6.4. Results	74
6.4.1. Determination of aminoglycosides by non-derivative spectrophotometry	74
6.4.2. Determination of aminoglycosides by derivative spectrophotometry	77
6.5. Discussions	81
6.6. Conclusions	82
<b>7. Study 5. Determination of amikacin form active substances and parenteral solutions using liquid chromatography</b>	83
7.1. Introduction	83
7.2. Objectives	84
7.3. Material and method	84
7.4. Results	86
7.5. Discussions	90
7.6. Conclusions	91
<b>8. General discussions</b>	93
<b>9. Final conclusions</b>	95
<b>10. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	97
<b>REFERENCES</b>	99

**KEYWORDS:** aminoglycosidic antibiotics, infra-red spectrometry, thermal analysis, UV-Vis spectrophotometry, HPLC.

# INTRODUCTION

Aminoglycosidic antibiotics (aminoglycosides) are natural or semisynthetic products of parenteral or topic use. Natural aminoglycosides are usually a mixture of chemically related compounds resulting from controlled biosynthesis: neomycin is the mixture of neomycin B, neomycin C and neomycin A (neamine), gentamicin is composed of gentamicins C1, C1a, C2 (major components), and C2a, C2b (minor components), while kanamycin is the mixture of kanamycins A (major component), B and C. The most widely used semisynthetic aminoglycosides are amikacin, tobramycin and netilmicin.

Aminoglycosides have a small therapeutic index and present severe side effects: renal failure and ototoxicity. In order to widen the antimicrobial spectrum of aminoglycosides, they are often associated with other antibiotics.

The physico-chemical properties of the aminoglycosidic antibiotics request a special approach regarding their physico-chemical analysis. Their insolubility in the majority of the organic solvents, their limited capacity to absorb UV-Vis light, and the fact that many of the aminoglycosides are mixtures of different compounds of biosynthetic origin lead to difficulties in applying basic analytical methods such as liquid-liquid extractions, direct spectrophotometry or some types of chromatography.

**OBJECTIVES:** The European Pharmacopoeia, The US Pharmacopeia, The British Pharmacopoeia and the Romanian Pharmacopoeia along with the specialized literature present valuable information on the qualitative and quantitative analysis of the aminoglycosidic antibiotics. The aim of my PhD thesis was to develop new, up-to-date, efficient methods, suitable for the analysis of the aminoglycosidic antibiotics, according to the provisions of Good Manufacturing Practice and Good Laboratory Practice.

## THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW

The first part of the doctoral thesis presents a literature review regarding the physico-chemical analysis of the aminoglycosidic antibiotics.

Aminoglycosides are white or slightly yellow crystalline powders, soluble in water and slightly soluble or insoluble in organic solvents. Aminoglycosides are chiral (optically active) substances.

Qualitative determination of the aminoglycosidic antibiotics can be performed by thin layer chromatography and infra-red spectral methods, using potassium bromide dispersions. Quantitation of aminoglycosides is possible using Fourier-transformed infra-red spectroscopy.

The presence of chromophore structures in the streptomycin molecule allows direct determination using UV-Vis spectrophotometry, but quantitation of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycosides can be performed only indirectly, after complexation using  $\text{Cu}^{2+}$  ions and auxiliary ligands such as sodium potassium tartrate.

High performance thin layer chromatography coupled with densitometry or fluorodensitometry was used for identification and quantitative determination of neomycin, amikacin, gentamicin and netilmicin from pharmaceutical preparations or biological samples.

High performance liquid chromatography (HPLC) is widely used for the qualitative-quantitative determination of aminoglycosidic antibiotics. Detection can be performed using spectrophotometric, fluorimetric, electrochemical detectors or mass spectrometry. UV-Vis spectrophotometric detection requests derivatisation of the aminoglycosides using chromophore structure bearing reagents. For this purpose 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) or 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid (TNBS) were used. Fluorescence detectors can be used after introduction of fluorescent groups to the aminoglycosidic molecules. Frequently used reagents in the fluorimetry of the aminoglycosides are 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) and o-phthaldialdehyde (OPA) with 2-mercaptoethanol.

# PERSONAL CONTRIBUTIONS

## Study 1. Thin layer chromatographic separation of some aminoglycosidic antibiotics

### Introduction

Thin layer chromatography (TLC) methods were previously used to separate the aminoglycosidic antibiotics from different matrices, to identify them, or for the control of impurities.

The aim of this study was to develop a novel HPTLC method for the simultaneous separation and identification of amikacin, neomycin and gentamicin from samples of active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical products.

### Material and method

During this study 10x10 cm sized HPTLC silica gel 60 F and HPTLC silica gel 60 F<sub>254</sub> chromatographic plates were used (Merck, Germany). Samples were applied using a Camag Linomat 5 (Camag, Germany) type semi-automatic sampler, fitted with a 500 µL Hamilton syringe (Camag, Germany). The fluorescent plates were visualized under 254 nm UV backlight.

Gentamicin parenteral solutions of 80 mg/2 mL were acquired from local pharmacies.

The mobile phase was a mixture of 1-butanol, methanol, glacial acetic acid and purified water 1:1:1:2. Reference solutions of 5 mg aminoglycoside/mL were prepared in a mixture of purified water:methanol 4:1.

Gentamicin test solutions were prepared by dissolving active pharmaceutical ingredients or diluting parenteral solutions to a concentration of 2,0 mg/mL using a mixture of purified water:methanol 4:1.

4 µL of each test and reference solution were applied to the chromatographic plates using a Camag Linomat 5 sampler. Sampling speed was 2 µL/minute.

The chromatographic plates were developed over a path of 7 cm. The plates were visualized under 254 nm UV light, than sprayed with a ninhydrin solution and exposed for 15 minutes to 105°C.

### Results

Visualization of the aminoglycosidic antibiotics was not possible on the F<sub>254</sub> HPTLC plates under UV backlight. Therefore, the chromatographic plates were sprayed with ninhydrin solution and exposed to 105°C. As a result, the chromatographic spots due to aminoglycosidic fractions turned yellow-brown-red.

The spot due to amikacin had a yellow-brown color and an R<sub>f</sub> value of 0,42. For gentamicin three spots were observed, with R<sub>f</sub> values of 0,19 (yellow-brown color), 0,31 (yellow-brown) and 0,37, respectively (red-brown). Spots due to neomycin had R<sub>f</sub> values of 0,18 (yellow), 0,27 (yellow-brown) and 0,35 (brown).

The developed method was used for the identification of amikacin, neomycin from active ingredients and gentamicin from active ingredients and parenteral solutions.

## 2. Infra-red and near infra-red spectrometric characterization of some aminoglycosidic antibiotics

### Introduction

According to Ph Eur and BP identification of amikacin can be performed by IR spectrometry using the potassium bromide inclusion technique. Compared to the compendial method, ATR (attenuated total reflectance) dispositives present a set of advantages: increased speed of the determination, possible adaptation to real-time monitoring of processes, decrease in solid waste.

In this study an IR and NIR spectral analysis of streptomycin, neomycin, gentamicin, kanamycin and amikacin was conducted using ATR sampling technique. Also, suitable identification methods were developed for the studied aminoglycosides by the presented technique.

### Material and method

IR spectra were acquired using a Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific, USA) spectrometer and processed using the Omnic (Thermo Scientific, USA) software, while NIR spectra were acquired with an Antaris II FT-NIR Analyzer (Thermo Scientific, USA) and processed using an Antaris (Thermo Scientific, USA) software.

IR and NIR spectra were acquired from the test sample powders, without any further sample preparation. Collected spectra represented an average of 32 individual collections. Spectral ranges were 500 - 4000 cm<sup>-1</sup> for IR spectra and 4000 - 10000 cm<sup>-1</sup> for NIR spectra.

## Results

### *IR spectra of aminoglycosides*

Dominant absorption bands in IR spectra of aminoglycosidic antibiotics correspond to –OH and –NH<sub>2</sub> groups. The 2800-3300 cm<sup>-1</sup> domain present therefore wide absorption bands in each of the studied cases.

In the case of amikacin, in addition to the bands due to hydroxyl and amino groups, a band corresponding to the synthetic amidic group can be distinguished.

The 1300-1650 cm<sup>-1</sup> domain presents a series of bands characteristic for etheric bonds (from the constituent aminosugars), for primary and secondary amines, and for the amidic substituent in the case of amikacin.

Absorption bands of the 900-1200 cm<sup>-1</sup> domain are characteristic for the aminoglycosidic class and are due to superposition of bands corresponding to primary and secondary amino groups, aliphatic hydroxyl, etheric and glycosidic groups.

### *NIR spectra of aminoglycosides*

Between 4400 and 4700 cm<sup>-1</sup> aminoglycosidic antibiotics present intense, wide combination bands characteristic for the class, due to the common molecular aminoglycosidic nature.

The most important spectral regions of the aminoglycosidic spectra can be found between 5000 - 7000 cm<sup>-1</sup>. These regions represent the combination bands due to the –OH and –NH<sub>2</sub> groups and depend on the molecular effects specific for each compound. Such intense bands appear in the 4919 - 5096 cm<sup>-1</sup> and 6576 - 6996 cm<sup>-1</sup> regions.

The wide bands with absorption maxima between 8296 and 8476 cm<sup>-1</sup> represent the second overtone region for C-H bonds of the aminoglycosides. A weak but characteristic band for amines appear in the case of kanamycin at 9616 cm<sup>-1</sup> (second overtone for N-H bonds).

As part of this chapter new IR spectral methods were developed for the identification of aminoglycosides using ATR approach. The presented methods proved to be sufficiently specific and comparable to compendial IR methods. Collected spectra of the studied aminoglycosides can be used as references in current identifications.

## Study 3. Characterization of some aminoglycosidic antibiotics using thermal analysis

### Introduction

Aminoglycoside antibiotics are complex thermolabile structures, however, the literature provides a small amount of data on their behavior when exposed to high temperatures.

The aim of this study was to establish the melting points (melting ranges), decomposition temperatures and estimate the decomposition profiles for amikacin, kanamycin, gentamicin, neomycin and streptomycin by thermogravimetry and differential scanning calorimetry (TG/DSC) on the 25-400°C temperature range.

### Material and method

In the study a Mettler Toledo TMA/SDTA 841e (Mettler Toledo, USA) type thermogravimeter was used with alumina 70 µL crucibles. A Mettler Toledo 822 calorimeter and 40 µL aluminum crucibles were used for DSC studies. Thermograms were processed using STARe SW 9.00 software.

Thermograms were recorded on the 25–400°C range. Samples were of approximately 5 mg in case of TG studies, and of approximately 2 mg in case of DSC studies. Analysis were conducted in N<sub>2</sub> atmosphere, using a 50 mL/min rate. The heating rate was 10°C/min.

### Results

The aminoglycoside antibiotics showed an initial weight loss (endothermic process) between 40-170°C. This represented between 5,1% (kanamycin sulfate) and 12,8% (amikacin sulfate) of the sample masses. This mass loss can be explained by loosing adsorbed humidity (40-105°C) and loss of water from the crystalline structure (between 105-170°C).

On the 174,3-192,4°C domain the studied aminoglycosides showed an endothermic peak not associated with mass losses. These can be associated with a change in the arrangement of the crystalline network of the aminoglycosidic antibiotics.

The melting of aminoglycosidic antibiotics was accompanied by decomposition with significant loss of mass. The melting range for amikacin sulfate starts at 244,8°C, for gentamicin sulfate at 241,5°C, for kanamycin sulfate at 284,7°C, for neomycin sulfate at 219,7°C and for streptomycin sulfate at 215,0°C. Significant mass loss associated with decomposition of aminoglycoside antibiotics is partly due to loss of -OH as water and -NH<sub>2</sub> groups probably as a mixture of ammonia and N<sub>2</sub>. At higher temperatures carbonization occurs with subsequent loss of mass in the form of water and carbon oxides.

The results stresses that aminoglycosides are thermally unstable substances that undergo physicochemical changes at temperatures low as 40°C. The study also shows that aminoglycosides retain large quantities of water, therefore a strict control of moisture is required for these substances.

## Study 4. Spectrophotometric analysis of some aminoglycosidic antibiotics

### Introduction

Due to weak absorbances on the UV-Vis domain, direct spectrophotometric determination of 2-deoxystreptaminic aminoglycosides is not possible. UV-Vis absorbances of aminoglycosides can be enhanced in the presence of metallic ions such as  $\text{Cu}^{2+}$ .

The aim of the present chapter of the thesis was to develop spectrophotometric methods for the quantitative determination of neomycin, kanamycin, gentamicin and amikacin in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions and to evaluate the stability of the aminoglycoside- $\text{Cu}^{2+}$  complexes.

### Material and method

Determinations were conducted using an Agilent 8453 spectrophotometer (Agilent Technologies, Germania). Data was processed using Chemstation software. Spectra were recorded on the UV-Vis 200-800 nm domain.

Kinetics of the aminoglycoside- $\text{Cu}^{2+}$  complexes were studied using a Spectronic Genesys 5 (Milton Roy) spectrophotometer.

Formation of aminoglycoside- $\text{Cu}^{2+}$  complex formation was studied using different solvent mixtures (acetone, methanol, ethanol) at different pH values. In the case of neomycin optimum solvent proved to be purified water:methanol 4:1 mixture, while in the case of amikacin, kanamycin and gentamicin 10 mM sodium hydroxide was used. To obtain an optimum  $\text{Cu}^{2+}$  ion concentration,  $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  was added to a 0,1 mg/mL concentration.

Spectra were recorded on the 200-800 nm domain and processed both directly and via the first derivative. On the non-derivative method (A) optimum wavelengths were 260 nm for neomycin, 230 nm for gentamicin, 280 nm for kanamycin and 325 nm for amikacin. In the case of the derivative method (dA) results were optimum at 277 nm for neomycin, 291 nm for gentamicin, 290 nm for kanamycin and 284 nm for amikacin.

At 5-15 minutes after the preparation of the test solutions no significant modifications were observed regarding optical stability, therefore the mentioned timeframe was considered suitable to conduct all quantitative determinations.

### Results

Regarding the non-derivative spectrophotometric methods, linearity was unsatisfactory, the coefficients of correlation being below the  $r=0,9985$  in all cases. These methods were not considered valid.

Since non-derivative spectrophotometry did not provide valid quantitative determination methods, quantitation of aminoglycosides was performed using the first derivative of the spectra. The coefficient of correlation in this case was  $r>0,998$  for each studied aminoglycosidic compound (amikacin, kanamycin, gentamicin and neomycin). The equation of the calibration curve was calculated in each case. Recoveries were between 99,89%-100,84% for neomycin, 97,26%-101,11% for gentamicin, 99,17%-101,64% for kanamycin and 98,56%-102,16% for amikacin. Repeatability and intermediate precision was assessed for each analyte. Intra-day RSD% values were between 1,40-2,32% for neomycin, 1,00-1,63% for gentamicin, 0,27-0,88% for kanamycin and 1,16-1,59% for amikacin. In case of intermediate precision RSD% were 1,90% for neomycin, 1,27% for gentamicin, 1,18% for kanamycin, 1,25% for amikacin.

Limits of detection and limits of quantitation were evaluated based on the signal-to-noise ratio:

- neomycin: LOD=0,025 mg/mL, LOQ=0,075 mg/mL;
- gentamicin: LOD=0,006 mg/mL, LOQ=0,020 mg/mL;
- kanamycin: LOD=0,009 mg/mL, LOQ=0,029 mg/mL;
- amikacin: LOD=0,004 mg/mL, LOQ=0,013 mg/mL.

The developed methods were used for the determination of the mentioned aminoglycosides from active pharmaceutical ingredients.

## Study 5. Determination of amikacin form active substances and parenteral solutions using liquid chromatography

### Introduction

According to the scientific literature a number of HPLC - UV-Vis methods coupled with pre-column derivatisation can be used for the quantitative analysis of aminoglycosidic antibiotics. Complex derivatisation procedures are difficult to reproduce, while the use of large amounts of derivatisation reagents can lead to interferences and specificity problems.

In order to resolve these drawbacks, in the present chapter a HPLC - UV-Vis method using 2,4-dinitro-1-fluorobenzene as derivatisation agent is presented for the quantitative determination of amikacin from active pharmaceutical ingredients and parenteral preparations. To obtain improved specificity and reproducibility the amount of the derivatisation agent was optimized and significantly reduced in comparison previous studies.

## **Material and method**

Chromatographic separation and detection was achieved using a Waters model 2695 (Waters, USA) chromatographic system and a Photodiode Array Detector model 996 (Waters, USA). Separation was performed in gradient, in 35 minutes. Mobile phase A was purified water:glacial acetic acid=300:1 while mobile phase B was acetonitrile:glacial acetic acid=300:1. An ODS, 250 mm X 4,6 mm, 5 µm particle size (Xterra, Waters, USA) chromatographic column was used. Flow rate was 1mL/min. Detection was performed at 354 nm using the photodiode UV-Vis detector.

## **Results**

In this study a HPLC - UV-Vis method was presented for the determination of amikacin using pre-column derivatisation with 2,4-dinitro-1-fluorobenzene. The amount of derivatisation reagent was significantly reduced in comparison to previously described methods, thus improving performance parameters of the presented analytical method.

The method was validated and proved to be linear on the 80-120 µg/mL domain ( $r=0,99925$ ). Average recovery was between 99,55 - 100,58%. The limit of detection and quantification were 1,6 µg/mL and 4,8 µg/mL respectively.

The presented method proved to be suitable for the quantitative determination of amikacin from active pharmaceutical ingredients and parenteral formulations. The method can be used for the stability study of amikacin in parenteral solutions.

## **Final conclusions**

The main research directions proposed in the thesis were physicochemical characterization of the aminoglycosidic antibiotics and the development of new analytical methods allowing qualitative-quantitative determination of aminoglycosides in various matrices.

Identification of aminoglycosidic antibiotics can be performed using chromatographic methods (thin layer chromatography and high performance liquid chromatography - via retention parameters) and spectral techniques (infrared and near infrared spectrometry or UV-Vis spectrophotometry - using the similarity factor). Thermal analysis (thermogravimetry and differential scanning calorimetry) can be used to confirm the identity of the samples by comparison to reference thermograms. Thermal analysis was also used to evaluate the physico-chemical behavior of the aminoglycosides and to acquire additional data on the mechanisms regarding water retention of these substances. Evaluation of the thermal degradation of aminoglycosidic antibiotics was possible by combining thermogravimetric and differential scanning calorimetry. Information obtained by differential scanning calorimetry can also be used to analyze the interactions of aminoglycosides in association with pharmaceutical excipients and other active pharmaceutical substances.

Quantitative analysis of aminoglycoside antibiotics was performed using UV-Vis spectrophotometry respectively liquid chromatography coupled with UV-Vis spectrophotometry. The developed methods were validated according to guidelines of the International Conference on Harmonization.