



Analyse van labetalol injectievloeistof 5 mg/ml

Henk van der Lijke

Laboratorium Apotheek
Martiniziekenhuis
Postbus 30033
9700 RM Groningen
h.lijke@mzh.nl

1. Inleiding

1.1 probleemstelling

Labetalol injectievloeistof 5 mg/ml (handelsnaam Trandate®) wordt ondermeer toegediend bij zwangerschapshypertensie. Bij toediening moet de verpleegkundige drie Trandate®-ampullen van 20 ml openbreken, opzuigen in een grote spuit en met behulp van een spuitpomp aan de patiënt toedienen. Om deze toediening te vereenvoudigen en daarmee ook de kans op microbiologische contaminatie te verkleinen, is op de apotheek van het Martiniziekenhuis het idee ontstaan om zelf labetalol 5 mg/ml in injectieflacons van 50 ml te gaan produceren. De leveringsproblemen van Trandate® in het verleden en het kostenaspect speelden ook een rol bij deze beslissing.

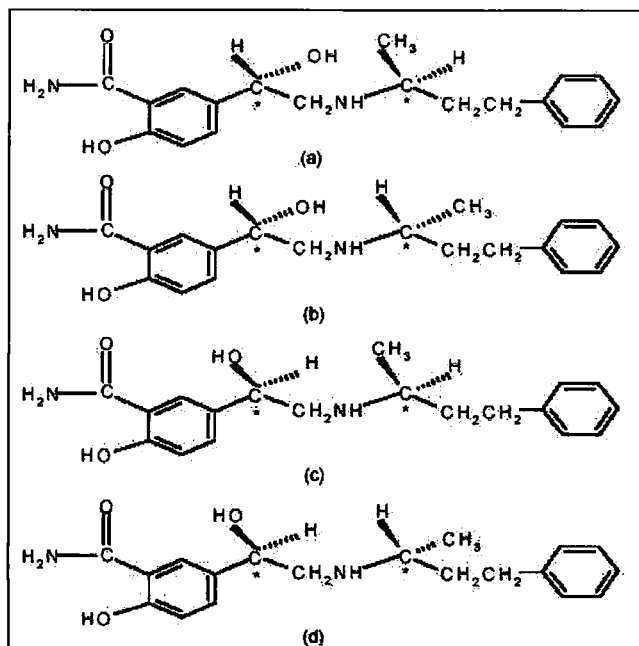
1.2 doelstelling

Om labetalol injectievloeistof op een verantwoorde manier in productie te kunnen nemen, is inzicht in de houdbaarheid vereist. Daarvoor is houdbaarheidsonderzoek noodzakelijk en voor een goed houdbaarheidsonderzoek is een geschikte gevalideerde stabiliteitsindicerende analyse-methode nodig. Dit artikel beschrijft het onderzoek naar de invloed van mogelijke ontledingsproducten op de selectiviteit en specificiteit van de analysemethode (pre-formuleringsonderzoek) en de validatie van de analysemethode.

2. Theorie

2.1 chemische eigenschappen

Labetalol heeft twee benzeenringen dus genoeg conjugatie voor UV-absorptie, wat tot uiting komt in het UV-spectrum dat maxima vertoont bij 206, 234 (schouder) en 307 nm. De stof heeft twee chirale centra (aangeduid met een sterretje in Figuur 1) waardoor er vier stereo-isomeren mogelijk zijn. De vier stereo-isomeren kunnen worden opgedeeld in twee paar enantiomeren. Het R,S- en het S,R- enantiomerenpaar enerzijds en het R,R- en S,S-enantiomerenpaar anderzijds. De paren zijn elkaars diastereomeren. Doordat diastereomeren enigszins van elkaar verschillen in fysische en chemische eigenschappen, is chromatografische scheiding althans in theorie mogelijk.



Figuur 1 Stereochemie van labetalol (a) S,S-labetalol, (b) S,R-labetalol, (c) R,S-labetalol and (d) R,R-labetalol

2.2 farmacologische eigenschappen

Alle vier de stereo-isomeren verschillen van elkaar in werking. Het R,R-isomeer is een niet specifieke β -blokker; het S,R-isomeer blokkeert de α^1 -receptor. Het S,S- en R,S-isomeer zijn nagenoeg onwerkzaam [10]. Door de verschillen in werking is het belangrijk, dat de verhouding van deze stoffen binnen bepaalde grenzen ligt. In de diverse farmacopees [6],[7],[8] wordt dit gecontroleerd, door de diastereomere verhouding van labetalol te bepalen door middel van gaschromatografie.

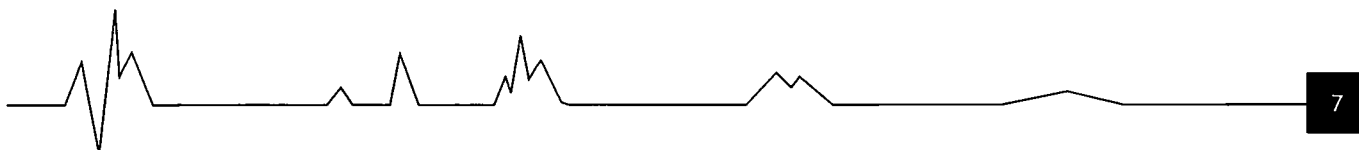
2.3 mogelijke ontledingsproducten

De stof heeft een amidegroep en is daarmee gevoelig voor hydrolyse in zuur en in basisch milieu, waarbij een carboxyl-groep op de hoofdstructuur ontstaat. Deze verwante structuur wordt door de Farmacopee [6],[7] gezien als mogelijke onzuiverheid in de grond-stof. Het is daarnaast bekend, dat de oplossing verkleurd onder invloed van licht.

3. methoden

3.1 keuze van de analysemethode

Om onderscheid te kunnen maken tussen hoofdstof en mogelijke ontledingsproducten is uitgegaan van een chromatografische scheidingsmethode. Hoewel in de



verschillende farmacopees [6],[7],[8] HPLC-methoden zijn beschreven, is uit praktisch oogpunt gekozen voor het eigen psychofarmacasysteem (zie: § 4.2.1)

Voor het preformuleringsonderzoek uit § 3.2 wordt door Yska [1] voorgesteld om ontledingsproducten van onder stresscondities bereide testmonsters ook met een tweede onafhankelijke analysemethode te onderzoeken. Voor dit doel is het STIP-systeem (zie: § 4.2.2) gebruikt. Labetalol komt voor in de STIP-bibliotheek (retentietijd = 2,97 minuten), bovendien is er met dit systeem ervaring met het analyseren van labetalol-injectievloeistof [5].

3.2 methodeontwikkeling

Als leidraad voor het optimaliseren en valideren van de analysemethode, is uitgegaan van de artikelen van Yska [1],[2] en de richtlijnen van Branje [3] en Van der Vaart [4]. Doordat de mogelijke ontledingsproducten niet commercieel verkrijgbaar zijn, worden deze onder stresscondities uit de hoofdstof gegenereerd. De totale methodeontwikkeling bestond uit:

- het uitvoeren van een zgn. preformuleringsonderzoek [3] waarbij mogelijke ontledingsproducten onder stresscondities worden gegenereerd en de invloed van deze stoffen op de selectiviteit en specificiteit van de analysemethode wordt onderzocht
- het uitvoeren van een specificiteitsbepaling [1] met behulp van ontlede testoplossingen uit het preformuleringsonderzoek
- de validatie van de analysemethode [2],[4]

4. Materialen

4.1 reagentia

Zie: Tabel 1 voor de gebruikte reagentia.

4.2 apparatuur

4.2.1 psychofarmacasysteem

pomp: Waters 600S controller/616 pump (gradiënt-pomp),
flow = 1,0 ml/min
injector: Waters 717 plus Autosampler; injectievolume = 20 µl
kolom: Waters Symmetry® C8 5 µm 4,6 x 250 mm, T= 30 °C
detector: Waters 996 Photo Diode Array Detector;
chromatografie bij 206 nm.

4.2.2 STIP-systeem

pomp: Waters 515 HPLC pump (isocratische pomp),
flow = 0,6 ml/min
injector: Waters 717 plus Autosampler; injectievolume = 20 µl
kolom: Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) 4 x 125 mm
detector: Waters 996 Photo Diode Array Detector;
chromatografie bij 206 nm.

Tabel 1 Standaarden en reagentia

bereiding	halffabrikaat	stof	hoeveelheid		charge	leverancier
standaardoplossing 1 voor validatie		labetalolhydrochloride	100 mg		5900/03/05	Merck Generics. B.V.
		gedestilleerd water	20 ml		6092A163	Braun
standaardoplossing 2 & 3 voor validatie		labetalolhydrochloride	500 mg		5900/19/05	Merck Generics. B.V.
		gedestilleerd water	100 ml		6092A163	Braun
Trandate®			25 mg/5ml		B 221196	Glaxo Smith Kline
STIP-loopmiddel	Buffer voor STIP-loopmiddel pH = 3,3	gedestilleerd water	1000 ml	106 ml	6092A163	Braun
		triethylamine	276 µl		1293698	
		fosforzuur 85 %	1200 µl		2005015541	Boom
		acetonitril:		94 ml	U76S	VWR
psychofarmacaloopmiddel	Buffer voor psf.-loopmiddel pH = 3,7	gedestilleerd water	1000 ml	80 %	6092A163	Braun
		natriumdihydrogenfosfaatdihydraat	7,8 g		02I13GO	
		fosforzuur 10 %	ca. 8ml		12-10-2004	MZ
		acetonitril:		20 %	U76S	VWR

5 werkwijze

5.1 preformuleringsonderzoek

Voor het verkrijgen van ontledingsproducten zijn labetaloloplossingen van 5 mg/ml gemaakt in:

- 1 M zoutzuur, bewaard in een waterbad van 90 °C
- 1 M natriumhydroxide, bewaard in een waterbad van 90 °C
- water, bewaard in een waterbad van 90 °C
- 1 % waterstofperoxide bewaard in een stoof van 50 °C
- water, bewaard onder een UV-lamp bij 350 nm bij kamertemperatuur

Van de oplossingen zijn gedurende tien dagen monsters genomen en geanalyseerd. In navolging van Van der Heiden [5] zijn er ook oplossingen gemaakt in 4 M zoutzuur en 4 M natriumhydroxide (beide bewaard bij 90 °C)

5.2 specificiteitsbepaling

De specificiteit van de bepaling is onderzocht door een standaardadditie uit te voeren op een in 1 N HCl ontlede oplossing uit het preformuleringsonderzoek. Hiertoe werd de ontlede oplossing samen met een zuivere labetalol standaard van 5 mg/ml verdund tot een meetoplossing voor HPLC. Chromatogrammen zijn opgenomen van de ontlede testoplossing, de versbereide labetalol standaard en de ontlede oplossing met de standaardadditie.

5.4 validatie

De validatie van de analysemethode is uitgevoerd volgens het schema in tabel 2. Dit schema is door drie analisten met tussenpozen van minimaal één week uitgevoerd. Voor het vaststellen van de parameters wordt gebruik gemaakt van drie verschillende standaardoplossingen afkomstig van twee verschillende charge's labetalol.

6 resultaten/discussie

6.1 preformuleringsonderzoek

6.1.1 psychofarmaca-systeem

Een versbereide labetaloloplossing (5 mg/ml) of een Trandate®-oplossing veroorzaakte op het psychofarmaca-systeem een chromatogram met een dubbele piek met identiek UV-spectrum, dat overeenkwam met het literatuurspectrum van labetalol [10].

In de labetalol oplossingen die in zuur en in basisch milieu (zie § 5.1) waren bewaard, verdween deze dubbele piek binnen enkele dagen en hiervoor in de plaats verscheen een enkele piek met een kortere retentietijd en een iets afwijkend UV-spectrum.

De nieuw gevormde pieken in zuur en basisch milieu waren qua UV-spectrum en retentietijd identiek. Specificiteitsonderzoek volgens [1] (zie: § 5.2) leverde het chromatogram op van Figuur 2.

Het piek-hoogteverschil tussen de labetalol-dubbel-piek voor en na standaardadditie was (binnen 1 %) gelijk aan de piekhoogte van de gebruikte labetalol standaard.

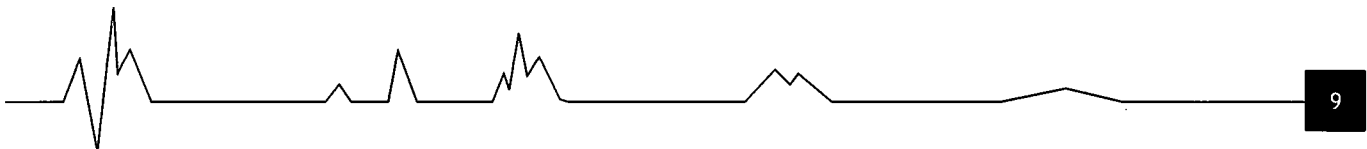
Tabel 2 Validatieschema analysemethode bereidingen

parameter	aantal bepalingen	concentraties	matrix	eisen:
lineariteit: (standaard 1)	kalibratiecurve van 5 punten in duplo	60, 80, 100, 120 en 140 % t.o.v. de gedeclareerde waarde.	oplosmiddel (water)	GOF = significant; LOF = niet significant
juistheid/recovery (standaard 2)	kalibratiecurve van 5 punten in duplo	60, 80, 100, 120 en 140 % t.o.v. de gedeclareerde waarde.	monstermatrix (=water)	recovery = 100 ± 3 % juistheid = 100 ± 3 %
precisie (standaard 3)	standaard in zesvoud in matrix	100 % t.o.v. de gedeclareerde waarde.	monstermatrix (=water)	herhaalb. $\leq \pm 2$ % reproduc. $\leq \pm 3$ %

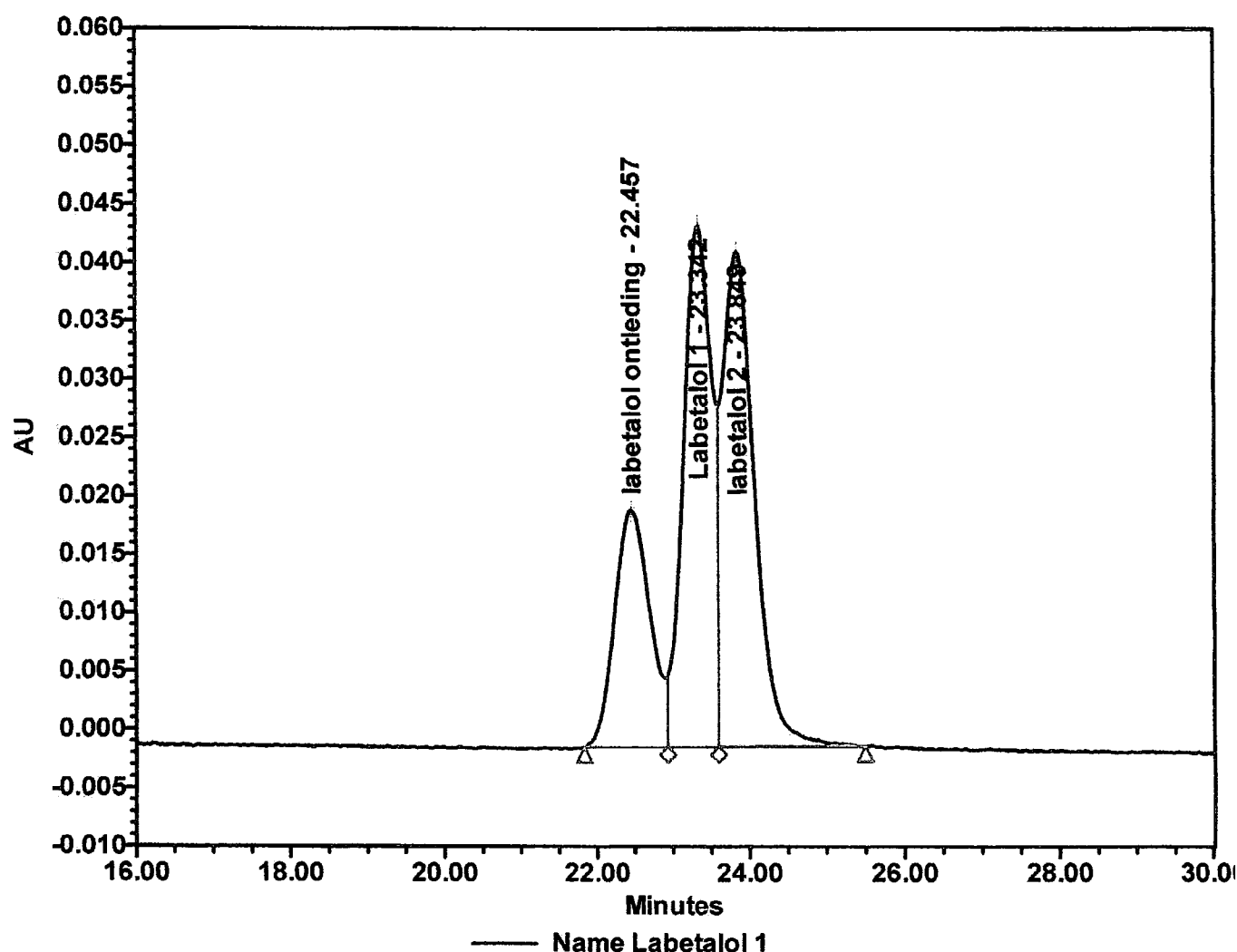
5.3 monsterbewerking

Monsteroplossingen zijn 50 x verdund met gedestilleerd water en vervolgens 10 x doorverdund met loopmiddel. Kalibratiecurves zijn bereid door 0,6 0,8 1,0 1,2 en 1,4 ml standaardoplossing (5 mg/ml) te verdunnen tot 50 ml met gedestilleerd water en vervolgens 10 x door te verdunnen met loopmiddel. De concentraties waren op deze manier 60, 80, 100, 120 en 140 % ten opzichte van de gedeclareerde waarde.

De labetalol uit het preformuleringsonderzoek, die bloot had gestaan aan water (bij 90 °C) en zuurstof (1 % H₂O₂ 50 °C), vertoonden na tien dagen geen verandering ten opzichte van een versbereide standaard. De oplossing die bloot had gestaan aan licht (350 nm), was na één dag perzikachtig-rose verkleurd. Het chromatogram van deze verkleurde oplossing verschilde niet met die van een versbereide vergelijkingsoplossing.



Figuur 2 Chromatogram van de labetalol dubbelpeik (laatste twee) en de ontleding op het psychofarmacasysteem.



6.1.2 STIP-systeem

Een versbereide oplossing van labetalol levert op het STIP-systeem een chromatogram op met één enkele piek met een retentietijd (2,9 min) en een UV-spectrum overeenkomend met dat van labetalol conform de STIP-bibliotheek. Het specificiteitsonderzoek volgens [1] (zie § 5.2) op het STIP-systeem leverde het chromatogram op van Figuur 3. De ontledingspiek komt na 2,2 minuten van het systeem en is volledig gescheiden van de labetalolpiek. Het piekhoogteverschil maar ook het piekoppervlakteverschil tussen de labetalolpiek voor en na standaardadditie was (binnen 1 %) gelijk aan de piekhoogte van de gebruikte labetalol standaard.

In navolging van Van der Heiden [5] zijn op het STIP-systeem labetaloloplossingen geanalyseerd die bewaard zijn in 4 N HCl en 4 N NaOH bij 90 °C. De labetalol van de oplossing bewaard in 4 N HCl was binnen 16 uur volledig overgegaan in de ontledingspiek op 2,2 minuten. In latere metingen was deze ontledingspiek overgegaan in aantal

kleinere pieken. In de labetaloloplossing in 4 N NaOH is in een meting na 4 dagen geen labetalol of herkenbaar ontledingsproduct meer gedetecteerd.

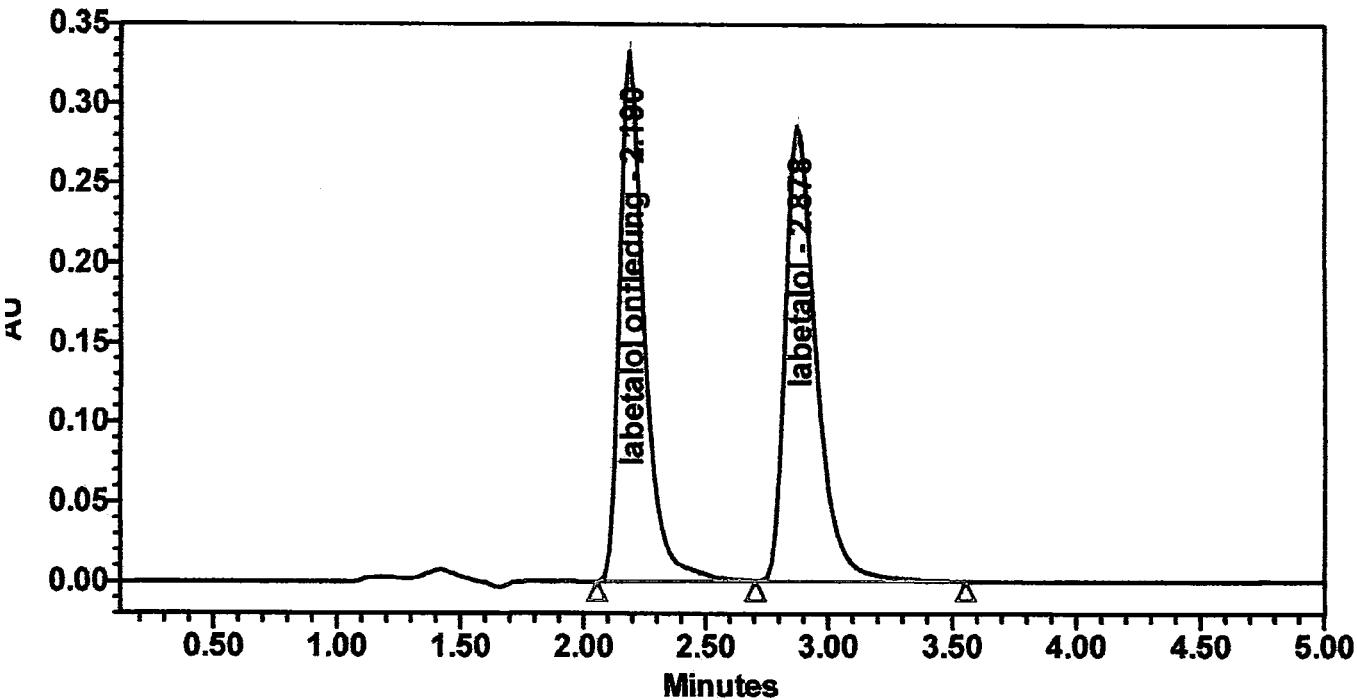
6.2 Validatie

Gezien de betere scheiding en de snellere chromatografie is besloten om de analyse op het STIP-systeem te valideren.

6.2.1 Lineariteit

Figuur 4 en Tabel 3 geven de resultaten van de lineariteitsbepaling weer. De lineariteit wordt vastgesteld door de goodness of fit (GOF) en de lack of fit (LOF) van het gemiddelde van zes ijklijnen uitgevoerd door drie analisten te berekenen en met behulp van variatieanalyse (ANOVA) te toetsen aan de tabelwaarden.

Figuur 3 Specificiteitsonderzoek van labelatol + ontleding op het STIP-systeem.



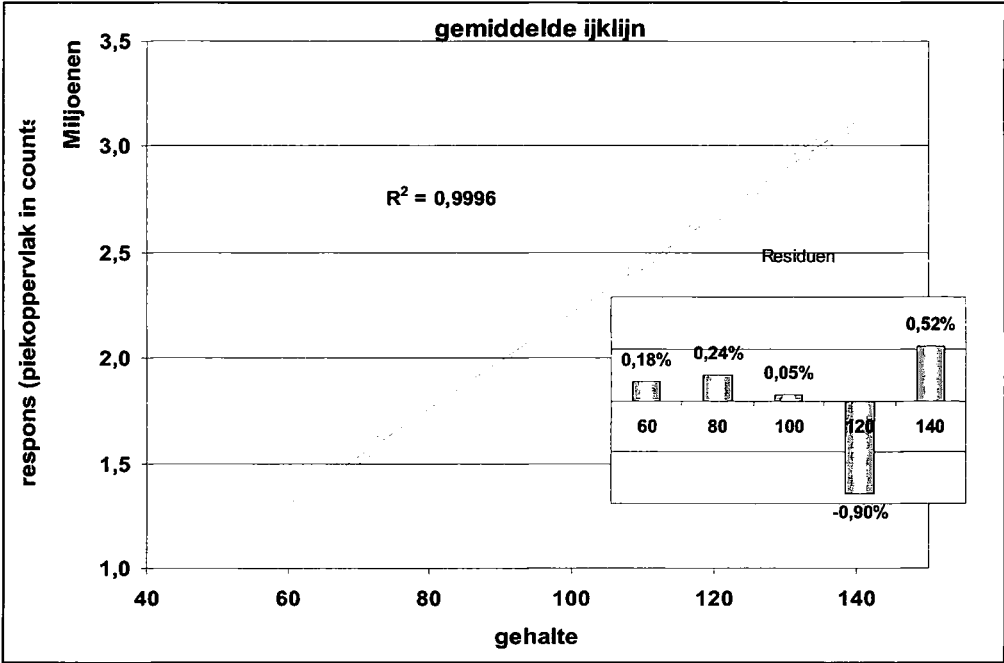
6.2.2 juistheid/recovery

Tabel 4 geeft de parameters weer van de lijn die ontstaat als de responsies (piekoppervlakken) van het gemiddelde van zes “opgewerkte” ijklijnen (y-rec) worden uitgezet tegen de gemiddelde responsies van de ijklijn uit de lineariteitsbepaling. De helling van deze nieuwe lijn (x100 %) is gelijk aan de extractieopbrengst. De y-asafsnede is gelijk aan de onjuistheid van de bepaling.

6.2.3 precisie

Het zes keer herhalen van de bepaling van een 100% monster, door drie verschillende analisten levert de resultaten op uit Tabel 5.

Figuur 4 Gemiddelde kalibratiecurve en labelatol van oplosmiddel



Tabel 3 ANOVA lineariteit gemiddelde labetalol kalibratiecurve in oplosmiddel

ANOVA LINEARITEIT				
SOURCE	SS	Df	MS	F
TOTAL	1,25E+13	29	4,31E+11	
REG	1,24E+13	1	1,24E+13	4397 (GOF)
RES	7,92E+10	28	2,83E+09	
PE	7,19E+10	25	2,88E+09	
LOF	7,30E+09	3	2,43E+09	0,846 (LOF)
Goodness of fit: F-tabel: 10,13 significant verschil !				
Lack of fit: F-tabel: 2,99 geen significant verschil !				

Tabel 4 Juistheid/Recovery-onderzoek

JUISTHEID/RECOVERY	
richtingscoëfficiënt y rec tegen y abs	0,992575 ± 0,024
recovery	99,3 ± 2,4 %
standaarddeviatie richtingscoëfficiënt	0,0076
tabel t-waarde van de ijklijn df = 3	3,1824
snijpunt ij-as:	47569 ± 55588
standaarddeviatie ij-asafsnede	17467
tabel t-waarde van de ijklijn df = 3	3,1824

Tabel 5 ANOVA precisie

ANOVA PRECISIE				
herhaalbaarheid (binnen de dagen)		reproduceerbaarheid (tussen de dagen)		
			totaal	puur
sd	0,6335	sd	2,6991	2,6237
CV	0,63%	CV	2,70%	2,62%

7 Conclusies/aanbevelingen

7.1 Preformulerings- en specificiteitsonderzoek

Het ontledingsproduct uit het preformuleringsonderzoek is, gezien de omstandigheden waarin het ontstond (in zuur en in basisch milieu), waarschijnlijk het hydrolyseproduct beschreven onder § 2.3.

Op beide HPLC-systemen is aangetoond, dat labetalol in een ontlede omgeving specifiek kan worden gemeten. Het STIP-systeem is echter selectiever (voor labetalol en ontledingsproduct) en sneller en daardoor geschikter voor houdbaarheidsonderzoek.

De dubbele labetalolpiek op het psychofarmacasysteem wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de twee diastereomere paren van labetalol. Dit systeem is daarmee wellicht een goed alternatief voor het relatief omslachtige diastereomeer-onderzoek op GC.

Uit de literatuur is voorzover bekend geen duidelijke redenering te vinden, hoe zwaar een stressconditie voor het preformuleringsonderzoek moet zijn. De zwaarte van de stresscondities zijn in dit geval wel zeer bepalend gebleken voor het ontstaan van mogelijke ontledingsproducten. Wordt er voor 4 N zuur en loog [5] in plaats van 1 N zuur en loog [3] gekozen, dan zal er al binnen korte tijd geen duidelijk identificeerbare ontleding meer te zien zijn. Belangrijke ontledingsproducten die onder mildere omstandigheden nog stabiel zijn worden op deze manier gemist.

De verkleuring die onder invloed van UV-licht ontstaat, wordt mogelijk veroorzaakt door de vorming van een ring, die ontstaat als de OH-groep op de linker chirale koolstof (zie: Figuur 1) via een nucleofiele substitutie op de carboxyl-koolstof een vijftring vormt. De concentratie van deze stof was mogelijk te laag om het op HPLC te kunnen detecteren.

7.2 Validatie

Uit de lineariteitsbepaling volgt, dat de goodness of fit significant groter is dan de tabelwaarde en dat de lack of fit significant kleiner is. Hiermee is statistisch aangetoond, dat er geen onverklaarbare spreiding is in de meetpunten. De residuen van de meetpunten zijn bovendien klein (< 1 %) en ze laten geen ronding van de kalibratiecurve zien, waarmee is vastgesteld dat de bepaling lineair is binnen het onderzochte gebied.

De lijn waarbij de responsies van de opgewerkte kalibratiecurves zijn uitgezet tegen de responsies van de curves in oplosmiddel, loopt significant met een helling van 1 door de oorsprong. Dit betekent dat de onjuistheid niet significant is en dat de extractieopbrengst niet significant verschilt van 100 %. Aangezien de ijklijnen voor lineariteit en voor de

recovery op dezelfde manier worden opgewerkt (de matrix van de injectievloeistof is water), mag de extractieopbrengst statistisch gezien niet significant verschillen van de 100 %, wat met deze methode is aangetoond.

De herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid vallen binnen de eis van 2 en 3 % [2].

8 Dankzegging

Dit onderzoek is mede tot stand gekomen dankzij de belangeloze inzet van: André Wieringa (productie), Maurice van Staveren & Monique Waalderbos (validatie), Jan Willem Meints & Hanneke Klok (kritische blik) en Ben Greijdanus & Hermien Pietersma (UMCG: achtergrondmateriaal en referentiestof)

Literatuur

- [1]. J.P. Yska; J. G. Maring; *Het uitvoeren van stabiliteitsonderzoek: een praktische aanpak (deel 1); Analysemethode en referentie-standaarden; Pharmaceutisch Weekblad* nr. 20, 20 mei 2005; 659-661
- [2]. J.P. Yska; J. G. Maring; *Het uitvoeren van stabiliteitsonderzoek: een praktische aanpak (deel 2); Validatie analysemethode en stabiliteitsonderzoek; Pharmaceutisch Weekblad* nr. 28|29, 15 juli 2005; 899-904
- [3]. Branje; J.C.C. van Niel; *Criteria bij het verichten van houdbaarheidsonderzoek; Ziekenhuisfarmacie* 5-1989; 92-96
- [4]. F. J. van de Vaart; *Richtlijnen voor analytische validatie; Pharmaceutisch Weekblad; jaargang 127* nr. 46 1992; 1229-1235
- [5]. Heiden, J van der; Alffenaar, JWC; *Rapid development of pharmacy prepared injection as the solution for Trandate® drug discontinuity.*
- [6]. *Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM); European Pharmacopoeia; 5 ed. 2005*
- [7]. *British Pharmacopoeia Commission (2005); British Pharmacopoeia 2005, 2005 ed.*
- [8]. *The United States Pharmacopeial Convention; The United States Pharmacopeia 2006; USP 29*
- [9]. J.P.M. Andries; A.B. de Vries; *Chemometrie; 1e druk, 2e oplage 2000; blz 42 – 47*
- [10] K. Hartke; e.a.; *Kommentar zur PH. EUR. NT 1998; 11.Lfg. 1999; Labetalolhydrochlorid; monografie nr: 923*