



Validatie van de spectrofotometrische analyse van tolazoline HCl

Auteur: I. de Lange,
Ziekenhuis Apotheek Gelderse Vallei*

* Correspondentie:
Ziekenhuis Gelderse Vallei, Postbus 9025, 6710 HN EDE

Samenvatting

Tolazoline HCl 10 mg = 1 ml ampullen worden in Ziekenhuis Gelderse Vallei gebruikt als vaatverwijdend middel bij vaatspasmen. Deze ampullen worden in de ziekenhuisapothek bereid. Het gehalte tolazoline HCl in de ampullen werd geanalyseerd met behulp van UV-spectrofotometrie. De analysemethode werd gevalideerd, waarbij de lineariteit, herhaalbaarheid, juistheid, reproduceerbaarheid en specificiteit van de methode zijn vastgesteld. De analysemethode voldeed aan de gestelde eisen.

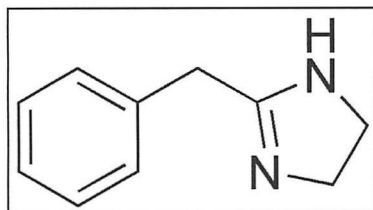
Sleutelwoorden

Validatie, tolazoline HCl, UV-spectrofotometrie

Inleiding

In de ziekenhuisapothek van Ziekenhuis Gelderse Vallei worden tolazoline HCl 10 mg = 1 ml ampullen bereid. Tolazoline wordt in dit ziekenhuis gebruikt als vaatverwijdend middel bij vaatspasmen ten gevolge van contrastmiddelen [1]. Het geneesmiddel is niet geregistreerd en alleen verkrijgbaar als grondstof. Er is geen ander geschikt product in de handel, dus de specialisten in Ziekenhuis Gelderse Vallei hebben de apotheek verzocht deze ampullen te produceren.

Tolazoline, systematische naam 2-benzyl-4,5-dihydro-1H-imidazole, heeft de volgende structuurformule (figuur 1):



Figuur 1
Structuurformule
van tolazoline

De ampullen worden bereid door tolazoline HCl op te lossen in NaCl 0,9%. De ampullen worden na bereiding 15 minuten geautoclaveerd bij 121 °C.

In het kader van GMP-z moeten alle analysemethoden binnen het laboratorium gevalideerd worden. Hierbij wordt gekeken naar de lineariteit van de calibratielijnen, de juistheid en herhaalbaarheid van de methode, de reproduceerbaarheid en de specificiteit [2]. Het vaststellen van de detectielimiet is bij deze analyse niet van belang, omdat de grenzen waar het gehalte van het monster aan moet voldoen op 95 – 105% van het gedeclareerde gehalte gesteld zijn. Deze waarden liggen ruim binnen de gevalideerde calibratielijnen (70 – 130% van gedeclareerd gehalte).

Om over al deze parameters een uitspraak te kunnen doen, werden er twee calibratielijnen gemaakt; een calibratielijnen in het oplosmiddel (in dit geval zoutzuur 0,1 M) en een calibratielijnen in de matrixoplossing (natriumchloride 0,9%). Deze calibratielijnen waren beide gebaseerd op 4 concentraties, in duplo ingewogen. De concentraties die gebruikt werden, waren 70%, 90%, 110% en 130% van de gedeclareerde waarde.

Verder werden er drie monsters in matrixoplossing gemaakt met gehalten van 70%, 100% en 130%. Deze werden voor de juistheid en herhaalbaarheid zesmaal op dezelfde dag gemeten. Hierbij werden zo min mogelijk variabelen ingevoerd. Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid werden deze drie monsters op zes verschillende dagen geanalyseerd, waarbij zoveel mogelijk variabelen werden ingevoerd. Deze variabelen bestonden uit een verschil in gebruikte cuvetten, uitvoerende analisten en charges oplosmiddelen. Om een uitspraak te kunnen doen over de specificiteit werd direct na het analyseren van de calibratielijnen een blanco monster geanalyseerd.

Materialen/methoden

Chemicaliën

De gebruikte tolazoline HCl werd betrokken bij Duchefa, Haarlem en is van USP kwaliteit. Het Z-indexnummer hiervan is 15094197.

De zoutzuur 0,1 M werd zelf bereid, uitgaande van reversed osmose water uit eigen ringleiding en zoutzuur 37% p.a. van Merck, Darmstadt Duitsland met artikelnummer 1.00317.1000.

Voor het bereiden van de matrixoplossing werd gebruik gemaakt van NaCl (PhEur kwaliteit) van Bufa, Nieuwerkerk a/d IJssel met artikelnummer 143413 en reversed osmose water uit eigen ringleiding.

Apparatuur

De validatie werd uitgevoerd op een UV-Vis-spectrofotometer, type Cary 1C van Varian, Middelburg.

Software

Voor het aansturen van de spectrofotometer werd gebruik gemaakt van speciale Cary software, programma Cary WinUV ADL Shell Application, Varian Australia Pty Ltd, versie 02.02(97).

Het uiteindelijke validatierapport werd opgesteld met behulp van Microsoft Excel, waarbij voor het maken van calibratielijnen het programma Calwer 2.2, RIVM Bilthoven Sector 5, maart 1995 gebruikt werd.

Monstervoorbereiding

Voor de calibratielij in oplosmiddel werd de grondstof in duplo ingewogen, in vier concentraties. De tolazoline HCl werd opgelost in 50,0 ml zoutzuur 0,1 M. Deze oplossing werd zonder doorverdunnen geanalyseerd op de UV-Vis-spectrofotometer.

Voor de calibratielij in matrix werd de grondstof in duplo ingewogen, in vier concentraties. Er werd ook een matrix-oplossing gemaakt, die bestond uit 6 gram NaCl, opgelost in 1000 ml reversed osmosewater. De tolazoline HCl werd opgelost in 50,0 ml matrixoplossing. Deze matrixoplossingen zijn vergelijkbaar met de ampullen zoals ze in de apotheek bereid worden.

Van deze oplossingen werd een verdunning gemaakt, zoals die tijdens een reguliere analyse van tolazoline ampullen ook gemaakt wordt. Daarbij werd 1,0 ml oplossing verdund tot 20,0 ml met zoutzuur 0,1 M. Deze verdunning werd geanalyseerd met de spectrofotometer.

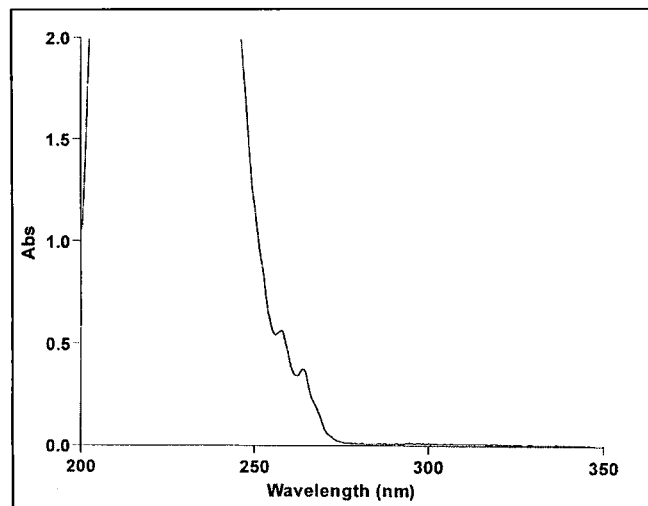
Voor de herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid werd nog een extra monster in matrix gemaakt; een 100% monster. Hiervoor werd 500,0 mg tolazoline HCl opgelost in 50,0 ml zoutzuur 0,1 M. Hiervan werd 1,0 ml oplossing verdund tot 20,0 ml met zoutzuur 0,1 M. Deze oplossing werd geanalyseerd op de spectrofotometer.

Voor de punten 70% en 130% werd gebruik gemaakt van monsters uit de matrix-calibratielij.

Voor de specificiteit werd 1,0 ml matrixoplossing verdund tot 20,0 ml met zoutzuur 0,1 M, dat direct na het opnemen van de calibratielij geanalyseerd werd met de spectrofotometer.

Analyse

Voor de analyse van tolazoline HCl werd de blanco cuvet gevuld met zoutzuur 0,1 M en de meetcuvet werd gevuld met de te bepalen oplossing. Vervolgens werd een spectrum opgenomen in het golflengtegebied van 350 – 200 nm (figuur 2).



Figuur 2
UV-spectrum van tolazoline

De absorptie werd bepaald bij het maximum op 256 nm.

Eisen

Voor de herhaalbaarheid werd als eis gesteld dat de variatie-coëfficiënt kleiner is dan 5%.

Voor de juistheid werd de eis gesteld dat de gedeclareerde waarde binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval van het gevonden gehalte moet liggen.

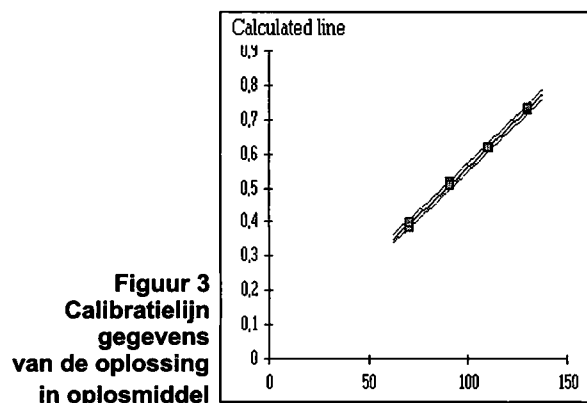
De eis die voor de reproduceerbaarheid gesteld werd, is dat de variatiecoëfficiënt kleiner dan 10% is.

Resultaten en discussie

Calibratielijnen

Voor de calibratielijnen werd de gevonden absorptie uitgezet tegen het gehalte. Dit verband zou recht evenredig moeten zijn [2], met een snijpunt door 0. Dit leverde de volgende calibratielijnen op (figuur 3 en tabel 1):

Voor de oplossing in oplosmiddel:



Figuur 3
Calibratielij
gegevens
van de oplossing
in oplosmiddel

2:Yi=b0+b1*Xi	
b0	-0,004402
b1	0,0056717
Sd-res.	0,0055283
R ²	0,9985713

Tabel 1
Calibratielijn gegevens van de oplossing in oplosmiddel

Om te bepalen of deze calibratielijn ook daadwerkelijk door 0 gaat, werd een F-test uitgevoerd. Daarbij wordt de vergelijking van de calibratielijn die door 0 gaat, vergeleken met een calibratielijn met een asafsnede. Er werd een eerstegraads vergelijking vergeleken met een tweedegraads vergelijking (tabel 2).

compare 1st-2nd	
F-calculated	0,24
F-tab. (0.05; 1, n-2)	5,99
F-calculated < F-tabel	
Best Fit	1

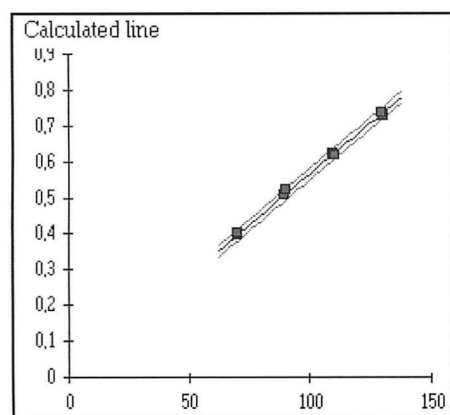
Tabel 2
F-test van de calibratielijn in oplosmiddel

Hieruit blijkt dat de berekende F kleiner is dan de F uit de tabel. Daarom mag gesteld worden dat deze calibratielijn door 0 gaat.

Hetzelfde geldt voor de calibratielijn in matrix (figuur 4 en tabel 3):

2:Yi=b0+b1*Xi	
b0	0,0144368
b1	0,0055066
Sd-res.	0,0058684
R ²	0,998295

Tabel 3
Calibratielijn gegevens van de oplossing in matrix



Figuur 4
Calibratielijn van de oplossing in matrix

Ook hierbij werd een F-test uitgevoerd (tabel 4):

compare 1st-2nd	
F-calculated	2,29
F-tab. (0.05; 1, n-2)	5,99
F-calculated < F-tabel	
Best Fit	1

Tabel 4
F-test van de calibratielijn in matrix

Ook hieruit blijkt dat de berekende F kleiner is dan de F uit de tabel. Daarom mag gesteld worden, dat deze calibratielijn door 0 gaat. Nu is het nog de vraag of deze beide calibratielijnen wel met elkaar vergeleken mogen worden. Bij de analyse van tolazoline ampullen wordt de tolazoline HCl namelijk berekend op een in oplosmiddel gemaakte standaard. Hiervoor is een calibratielijn gemaakt, waarin de absorptie van het monster in oplosmiddel is uitgezet tegen de absorptie van het vergelijkbare monster in matrix. Indien dit een lijn oplevert die een richtingscoëfficiënt heeft van 1 en een snijpunt van 0, dan mag worden gesteld, dat beide calibratielijnen gelijk zijn. Een monster in matrix mag dan worden berekend op een standaard in oplosmiddel. Met behulp van de statistiek module in Excel is berekend, wat het 95% betrouwbaarheidsinterval van de richtingscoëfficiënt b1 is en wat de asafsnede b0 is (tabel 5).

95% betrouwbaarheidsinterval b0 en b1			
b0	-0,048011	-	0,011609
b1	0.976602	-	1.079688

Tabel 5
Vergelijking oplosmiddel tov matrix

Uit tabel 5 blijkt dat 0 binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval van de asafsnede ligt en 1 ligt binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval van de richtingscoëfficiënt. Daarmee is aangetoond dat de standaard en het monster met elkaar vergeleken mogen worden.

Herhaalbaarheid en juistheid

De herhaalbaarheid van een analyse zegt iets over de variatie in de metingen van het apparaat. De juistheid van een analyse geeft aan hoe betrouwbaar een gevonden waarde is.

De herhaalbaarheid en juistheid worden bepaald aan de hand van een zestal metingen van drie oplossingen, uitgevoerd op dezelfde dag [2]. Hierbij zijn zo weinig mogelijk variabelen ingevoerd.

	70%	100%	130%
n	6	6	6
gemiddelde (%)	70,12	99,43	130,02
variatiecoëfficiënt	0,62	0,44	0,46
ondergrens 95% b.i.	69,27	98,57	128,86
bovengrens 95% b.i.	70,97	100,29	131,19

Tabel 6
Herhaalbaarheid en juistheid

Uit tabel 6 blijkt dat alle gevonden waarden aan de gestelde eisen voldoen.

Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van een analyse laat zien, hoeveel spreiding er in de gehele analyse is.

De reproduceerbaarheid wordt bepaald, door drie oplosingen te analyseren met zoveel mogelijk variabelen.

Er wordt op zes verschillende dagen een duplo meting gedaan, door diverse analisten, waarbij de doorverdunding gemaakt wordt met verschillende charges oplosmiddel. De metingen worden met diverse cuvetten uitgevoerd.

	70%	100%	130%
n	12	12	12
gemiddelde (%)	69,97	99,63	129,84
variatiecoëfficiënt	0,66	0,52	0,62
ondergrens 95% b.i.	69,06	98,62	128,25
bovengrens 95% b.i.	70,88	100,63	131,42

Tabel 7
Reproduceerbaarheid

Alle gevonden waarden uit tabel 7 blijken aan de eis te voldoen.

Specificiteit

De specificiteit van een analyse geeft aan of de analyse gestoord wordt door andere componenten, zoals ontledingsproducten of hulpstoffen, of dat de analyse alleen de beoogde component meet.

De specificiteit is bepaald door een meting van een blanco oplosmiddel, direct na het analyseren van het hoogste punt van de calibratielijn. Hiermee wordt eigenlijk alleen een uitspraak gedaan over het optreden van carry-over. Bij de analyse van tolazoline was de carry-over <4%.

Een UV-analyse is in dit golflengtegebied nooit specifiek, omdat zeer veel geneesmiddelen absorptie geven in dit gebied. Ontledingsproducten van een stof lijken vaak op de uitgangsstof, waardoor het spectrum niet veel zal verschillen. Om deze componenten van elkaar te onderscheiden, kan beter gebruik gemaakt worden van HPLC. Dit is zeker aan te bevelen als er een shelf-life-onderzoek opgezet wordt om de houdbaarheid van de tolazoline ampullen te

onderbouwen. Immers, bij een shelf-life-onderzoek wordt juist onderzocht of er ontledingsproducten ontstaan. Specificiteit is dan zeer belangrijk.

Conclusie

Volgens de huidige normen van het farmaceutisch laboratorium van ziekenhuisapotheek Gelderse Vallei voldoet deze analysemethode. Indien de normen in de toekomst aangepast worden, zal deze validatie mogelijk uitgebreid moeten worden.

Er moet een HPLC-methode opgezet worden, om een uitspraak te kunnen doen over de aanwezigheid van ontledingsproducten. Dit is belangrijk voor een shelf-life-onderzoek. Met de gebruikte UV-methode zijn ontledingsproducten niet aantoonbaar.

De auteur wil de volgende mensen bedanken voor hun werkzaamheden aan de analyse:

A. de Jong, A.M. Kleinhout-Van Vuuren, J.M. Boerrigter-Roosendaal, klinisch farmaceutisch analisten Ziekenhuis Apotheek Gelderse Vallei, Ede.

Literatuur

- [1] *Informatorium Medicamentorum 2006, KNMP, 1030*
- [2] *J.P. Yska et al, Pharmaceutisch weekblad 28/29 2005, 899-901*