



Validatie van een UV-methode voor de bepaling van ketamine (als HCl) in ampullen

A.M.Kleinhout-van Vuuren.

Laboratorium apotheek Ziekenhuis Gelderse Vallei,
postbus 9025, 6710 HN Ede.

Samenvatting

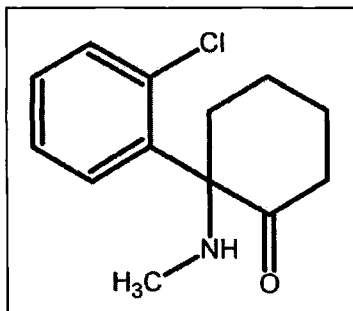
In ziekenhuis Gelderse Vallei worden ampullen ketamine (als HCl) 50 mg/ml bereid. In het kader van GMP-z is er begonnen met de validatie van de analysemethoden van de parenteralia. De bestaande UV-methode voor ketamine werd gevalideerd. De validatieparameters lineariteit, juistheid, precisie, gevoeligheid (bepalingsgrens) en robuustheid voldeden aan de gestelde eisen. De specificiteit en de selectiviteit van de bepaling moet nader worden onderzocht.

Sleutelwoorden

Ketamine (als HCl), validatie, UV-methode.

Inleiding

Ketamine (figuur 1) wordt toegepast als anaestheticum bij kortdurende diagnostische procedures en chirurgische ingrepen, waarbij geen spierrelaxatie nodig is. Lage doseringen ketamine worden ook gebruikt als co-anaestheticum. Verder is het middel opgenomen in het landelijke protocol van de ambulancediensten [1]. Ketamine wordt zowel in ziekenhuis Gelderse Vallei als bij de ambulancedienst van Ede toegepast als anaestheticum.

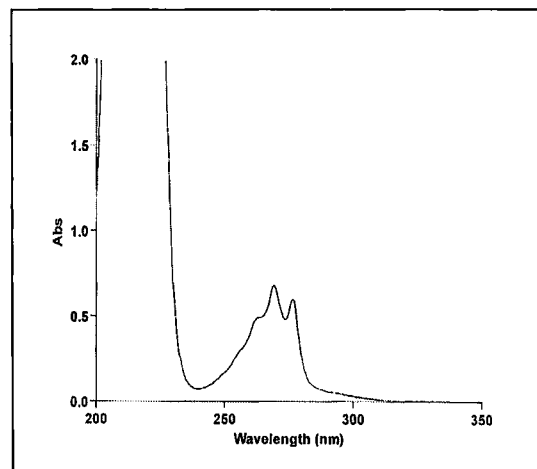


Figuur 1 Structuurformule ketamine

De werking van ketamine treedt in na circa 1 minuut en houdt circa 5-10 minuten aan [2]. Ketamine wordt in de lever geconjugeerd. De metabolieten hebben een

analgetische werking, waardoor dit het enige anaestheticum is, waarvan de analgetische werking langer aanhoudt dan de hypnotische werking.

De productieafdeling van de apotheek van ziekenhuis Gelderse Vallei produceert ampullen met 1 ml ketamine (als HCl) oplossing overeenkomend met een concentratie van 50 mg/ml ketamine. Het kwaliteitssysteem schrijft voor, dat alle analysemethoden worden gevalideerd. De validatie van de analyse van de ketamine ampullen vindt plaats met behulp van UV-VIS-spectrometrie. Bij binnenkomst van een grondstof in de apotheek wordt de grondstof gekeurd. Als er van een grondstof een product wordt gemaakt waarop een gehaltecontrole via UV plaats vindt, wordt er van de grondstof een standaardoplossing gemaakt. Deze standaardoplossing komt overeen met het gehalte van de uiteindelijke verdunning van het te bereiden product. Het UV-spectrum (figuur 2) en de absorptie waarde van de standaardoplossing (100%) worden opgeslagen in de computer die gekoppeld is aan de spectrofotometer. Als een product ter keuring wordt aangeboden, wordt een verdunning vergeleken met het opgeslagenspectrum en absorptiewaarde van de standaardoplossing.



Figuur 2 UV spectrum ketamine

Materialen/methoden

Bereiding ketamine (als HCl) 50 mg=1 ml, ampul:

Ketamine-ampullen 50 mg=1 ml bevatten naast ketamine alleen water. De pH ligt tussen 3.0 en 5.0. De ampullen worden 15 minuten bij 121° C gesteriliseerd.

Analysemethode standaardoplossing 100% (waterig):

Er wordt een standaardoplossing 100 % gemaakt door 57,7 mg ketamine HCl op te lossen in 200,0 ml HCl 0,1 M. Van deze oplossing wordt tegen een blanco oplossing (HCl 0,1 M) een absorptiespectrum (200 nm - 350 nm) opgenomen. De absorptie wordt gemeten bij het absorptie maximum 269 nm.

Analyse methode ketamine (als HCl) 50 mg=1 ml, ampul (matrix):

1,00 ml van een ampul ketamine (als HCl) 50 mg=1 ml wordt verdund tot 200,0 ml met HCl 0,1 M. Van deze oplossing wordt tegen een blanco oplossing (0,1 M HCl) een absorptiespectrum (200 nm - 350 nm) opgenomen. Het absorptiespectrum wordt vergeleken met het absorptiespectrum van de standaard 100%. De absorptie wordt gemeten bij het absorptie maximum 269 nm.

Apparatuur en hulpmiddelen:

Spectrofotometer Type Cary 1C, Varian, Middelburg, Nederland; software spectrofotometer Cary WinUV ADL Shell Application, Varian, Australia Pty Ltd, versie 02-02(97); cuvetten: Kwarts cuvetten 1.000 cm; software gebruikt voor validatie berekeningen Calwer 2.2 RIVM sector 5, maart 1995, Bilthoven, Nederland; Microsoft Excel 2003.

Reagentia:

Ketamine HCl material no. 700932, Fagron GmbH E& Co. KG, Barsbüttel, Duitsland; HCl 0.1 M (21,6 ml zoutzuur rokend 37% p.a. art 1.00317 Merck, Darmstadt, Duitsland in 2500,0 ml reversed osmose water, laboratorium apotheek).

Validatie

De validatie is uitgevoerd volgens de daartoe geldende richtlijnen voor analytische validatie [3-4]. De volgende parameters zijn onderzocht: lineariteit, juistheid, precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid), specificiteit, selectiviteit, gevoeligheid (bepalingsgrens) en robuustheid. De validatieberekeningen worden uitgevoerd met behulp van Calwer 2.2 software (lineariteit) en Excel.

De lineariteit van een analysemethode is de eigenschap dat er binnen de bepalingsgrenzen een rechtlijnig verband bestaat tussen de respons en de concentratie van de te bepalen component. Er wordt zowel naar de lineariteit van de waterige standaardlijn (standaardoplossing) gekeken als naar de lineariteit van de matrix-standaardlijn (product) (F-test, eis: niet significant). Hiertoe worden 8 standaardoplossingen afgewogen, 2 standaarden 70%,

2 standaarden 90%, 2 standaarden 110% en 2 standaarden 130%. De matrixstandaarden, bereid als het product (uitgezonderd de sterilisatiestap), worden vervolgens nog 200 maal verdund met HCl 0,1 M. Bovendien wordt er gekeken of beide lijnen ten opzichte van elkaar significant verschillen. Hiertoe worden de absorptie waarden van de matrixstandaarden uitgezet tegen de absorptiewaarden van de waterige standaarden. De lijn, die hieruit moet volgen, heeft een richtingscoëfficiënt van 1 en een asafsnee van 0 (eis: richtingscoëfficiënt 0 en asafsnee 1 liggen binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval). Opmerking: er wordt gesproken over een waterige calibratielijn en matrix-calibratielijn. Met matrix wordt de oplossing van het product bedoeld, waarin de te bepalen stof is opgelost. In dit geval is de matrix water.

De juistheid van een analysemethode is de mate van overeenstemming tussen het gemiddelde van een reeks meetwaarden en de werkelijke waarde (eis: gedeclareerde waarde binnen 95% betrouwbaarheidsinterval).

Herhaalbaarheid is de precisie verkregen met de methode op identiek materiaal onder zoveel mogelijk dezelfde omstandigheden (eis: VC < 5%). De juistheid en herhaalbaarheid zijn uitgevoerd door in zesvoud een lage (70%), een midden (100%) en een hoge (130%) matrix standaard te bepalen. De metingen zijn uitgevoerd op één dag, door één analist, met dezelfde charge zoutzuur en dezelfde type cuvetten.

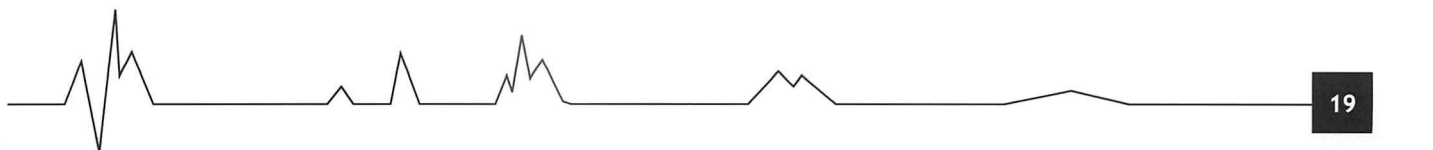
Reproduceerbaarheid is de precisie verkregen met de methode op identiek materiaal onder variabele omstandigheden (eis: VC < 10 %). De reproduceerbaarheid is uitgevoerd door in zesvoud een lage (70%), een midden (100%) en een hoge (130%) matrix standaard te bepalen. Er is gevarieerd in dag, analist, charge zoutzuur en leverancier van cuvetten. Drie metingen zijn op dag 1 gedaan en drie metingen op dag 2.

Een analysemethode is specifiek als de methode alleen reageert op de te bepalen component.

Een analysemethode is selectief als de methode met gedefinieerde waarschijnlijkheid en juistheid, de te bepalen component kan onderscheiden van verwante verbindingen en matrixcomponenten.

De detectiegrens is de laagste concentratie die met gedefinieerde statische waarschijnlijkheid met de analysemethode kan worden aangetoond. Echter bij deze methode is dit niet van belang, omdat de detectiegrens veel lager zal zijn dan het te verwachten gehalte (100%).

Het bepalingbereik is het interval tussen de laagste en de hoogste concentratie van de te bepalen component waarvoor de methode gevalideerd is. Wij gaan bij een farmaceutisch analyse uit van een bereik van 70% tot 130%.

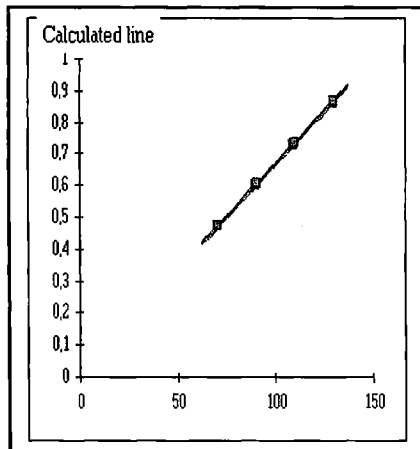


Voor bestaande voorraadbereidingen kan de historie gebruikt worden om de robuustheid van het gehele bereidings- en analysetraject van een product te beoordelen [3]

Resultaten en discussie

Lineariteit:

De analyse is uitgevoerd op vier verschillende concentraties ketamine, die in duplo ingewogen zijn. Dit levert een regressielijn op van een waterige standaardreeks met een correlatiecoëfficiënt van 0,9999 (figuur 3) en een matrix-regressielijn met een correlatiecoëfficiënt van 0,9985 (figuur 4). Toetsing door middel van de F-toets levert een F van 3,72 (waterige) en een F van 0,00 (matrix) op. De F-toetsen geven aan, dat de lijn niet significant afwijkt van een rechte. Daarnaast is ook aangetoond dat beide regressielijnen ten opzichte van elkaar niet significant verschillen (figuur 5). De regressielijn van water versus matrix heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,9986, een asafsnede b_0 van -0,0071 en een richtingscoëfficiënt b_1 van 1,0243. Een asafsnede van 0 en een richtingscoëfficiënt van 1 vallen binnen het berekende 95% betrouwbaarheidsinterval (tabel 1). De huidige wijze van werken, een verdunning van een ampul (matrix) aflezen tegen standaard oplossing (waterig) is toegestaan.

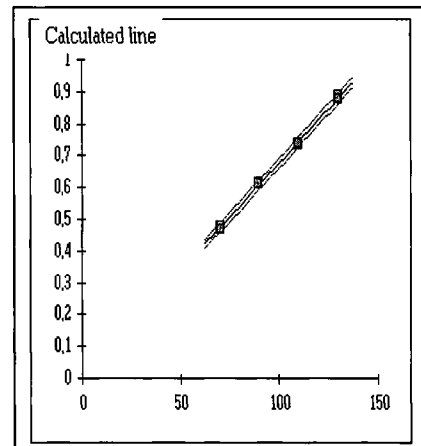


Figuur 3 waterige regressielijn

1: $Y_i = b_1 * X_i$	
b1	0,0066785
Sd-res.	0,0024429
2: $Y_i = b_0 + b_1 * X_i$	
b0	0,0065227
b1	0,0066164
Sd-res.	0,0020728
R ²	0,9998507
compare 1st-2nd	
F-calculated	3,72
F-tab. (0.05; 1, n-2)	5,99
F-calculated < F-tabel	
Best Fit	1

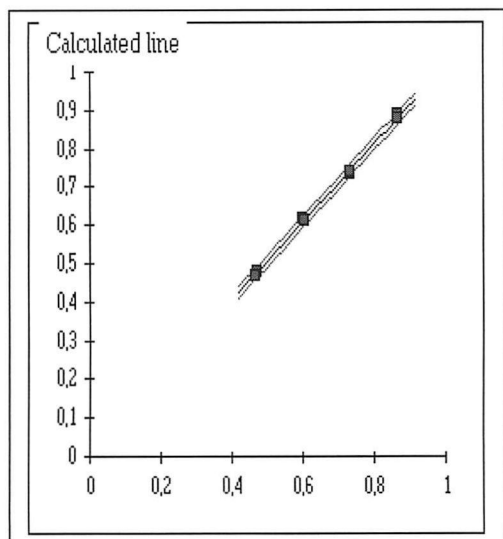
Regressielijn water versus matrix		
	b0	b1
Ondergr. 95% b.i.	-0.0335	0.9856
Bovengr. 95% b.i.	0.0192	1.0628

Tabel 1 95% betrouwbaarheidsinterval voor asafsnede b_0 en richtingscoëfficiënt b_1



Figuur 4 matrix-regressielijn

1: $Y_i = b_1 * X_i$	
b1	0,0067725
Sd-res.	0,0062399
2: $Y_i = b_0 + b_1 * X_i$	
b0	-0,000525
b1	0,0067775
Sd-res.	0,0067386
R ²	0,9985194
compare 1st-2nd	
F-calculated	0,00
F-tab. (0.05; 1, n-2)	5,99
F-calculated < F-tabel	
Best Fit	1



1:Yi=b1*Xi	
b1	1,0140718
Sd-res.	0,0063258
2:Yi=b0+b1*Xi	
b0	-0,007141
b1	1,0242597
Sd-res.	0,0065959
R^2	0,9985814
compare 1st-2nd	
F-calculated	0,44
F-tab. (0.05; 1, n-2)	5,99
F-calculated < F-tabel	
Best Fit	1

Figuur 5
regressielijn water versus matrix

Validatierapport				
Bepaling	Ketamine			
Bepalingsmethode	UV			
Herhaalbaarheid	70%	100%	130%	
n	6	6	6	
Gemiddelde(%)	68.83	100.30	129.27	
Variatiecoëff.	1.58	0.43	0.33	
Ondergr. 95% b.i.	66.70	99.45	128.43	
Bovengr. 95% b.i.	70.96	101.14	130.12	
Reproduceerbaarheid	70%	100%	130%	
n	6	6	6	
Gemiddelde(%)	69.57	100.10	129.02	
Variatiecoëff.	1.75	0.75	0.52	
Ondergr. 95% b.i.	67.19	98.63	127.70	
Bovengr. 95% b.i.	71.95	101.57	130.35	

De juistheid en precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid):

In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van de berekening voor de juistheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. De absorptiewaarden zijn afgelezen op de matrix-regressielijn (70%-90%-110%-130%).

Op alle niveau's (laag, midden, hoog) voldoen de standaarden aan de gestelde eisen.

Specificiteit:

De ampul ketamine bevat enkel ketamine en water. Het is mogelijk dat er ontledingsproducten van ketamine ontstaan. Deze eventuele ontledingsproducten kunnen absorptie vertonen bij 269 nm, echter het is ook mogelijk dat ze niet meetbaar zijn met UV. Een HPLC methode kan een mogelijkheid zijn om ketamine en eventuele ontledingsproducten te scheiden van elkaar. De aanwezigheid of afwezigheid van ontledingsproducten, die absorberen bij 269 nm geeft informatie over de specificiteit van deze UV bepaling.

Tabel 2 Resultaten juistheid, herhaalbaarheid en

Selectiviteit:

In november 2006 is er een versneld houdbaarheids-onderzoek uitgevoerd op de ketamine ampullen. Hierbij werden de ampullen een week bij 80° C geplaatst. Er was geen verschil (afname $\geq 5\%$) aantoonbaar tussen het niet verhitte monster (gehalte 99,0%) en het verhitte monster (gehalte 100,4%). Bovendien bleef het UV-spectrum onveranderd. Dit kan duiden op een zeer stabiel product of dat de UV-methode niet stabiliteitsindicierend is. Over de selectiviteit kan geen eenduidige uitspraak worden gedaan. Worden er met een HPLC-methode ontledingsproducten in het gekraakte monster aangetoond, dan is de UV-methode voor ketamine niet selectief.

Bepalingsgrenzen:

Het bepalingbereik is vastgesteld op 70% (onderste bepalingsgrens) en 130% (bovenste bepalingsgrens).

Robuustheid:

Tabel 3 geeft de resultaten van de gehalten weer die in het verleden zijn gemeten.

Tabel 3 Resultaten gehalte bepaling ketamine (als HCl) 50 mg=1 ml ampul.

Ketamine (Historie uit Proaz)			
Analysenummer	Chargenummer	Gehalte(%)	
061705	06120420	98.9	
061470	06102423	100.2	
060711	06042817	101.6	
060402	06021702	100.9	
041285	04091003	100.6	
040892	04070201	96.3	
031789	03121503	96.0	
030788	03052202	96.7	
022622	99110806	97.4	
021778	02060709	101.8	herkeuring
016640	01101604	100.2	

Het gemiddelde gehalte van de metingen $n=10$ (herkeuring uitgesloten) is 99,3% en de VC is 2,2%. Dit is een goede indicatie dat de robuustheid van het gehele bereidings- en analysetraject van de ampul ketamine voldoende is.

Conclusie

In dit artikel wordt de validatie van een UV-methode beschreven voor het bepalen van het gehalte ketamine (als HCl) in ketamine ampullen. De validatie parameters lineariteit, juistheid, precisie, gevoeligheid (bepalingsgrens) en robuustheid voldoen aan de gestelde eisen. De specificiteit en de selectiviteit van de bepaling moet nader onderzocht worden.

Mijn dank gaat uit naar de heer A. de Jong en mevrouw I. de Lange, beiden klinisch farmaceutisch analist van het laboratorium van de apotheek, ziekenhuis Gelderse Vallei voor het uitvoeren van de validatie.

Literatuur

- [1] KNMP: *Informatorium Medicamentorum 2006*: 23.
- [2] *Ziekenhuis Gelderse Vallei: Formularium 2006-2008*: 45.
- [3] DJ Touw e.a.: *Retrospectieve validatie van een productie en analyse traject. Pharm Weekblad 2005(28/29): 902-904.*
- [4] FJ van der Vaart, e.a.: *Richtlijnen voor analytische validatie. Pharm. Weekblad 1992(46): 1229-1235.*