

HPLC-methoden in de kwaliteitscontrole

Corrie Haring
Laboratorium Apotheek Haagse Ziekenhuizen

Inleiding

In de loop der jaren is de HPLC-techniek steeds vaker toegepast bij de kwaliteitscontrole van farmaceutische preparaten. Om een goede en uniforme uitvoering van HPLC-analyses te kunnen borgen was er behoefte aan algemene richtlijnen. Een HPLC-methode heeft immers veel variabelen: de mobiele fase, de stationaire fase, standaarden, dataverwerking. Wanneer is een HPLC-systeem geschikt voor de uit te voeren analyse? Hoe is dit te beoordelen en aan welke eisen moet worden voldaan?

Op basis van wat beschreven is in de Europese Farmacopee (methode 2.2.29. Liquid chromatography en 2.2.46. Chromatographic separations techniques) en op basis van onze ervaringen hebben we een aantal uitgangspunten geformuleerd.

HPLC-eluens

Het is belangrijk zoveel mogelijk uit te gaan van HPLC-zuivere chemicaliën (dat wil zeggen vrij van stabilisatoren en transparant in het golflengtegebied). De componenten van de mobiele fase worden op basis van gewicht bij elkaar gevoegd omdat het afmeten van volumina met maatcilinders minder reproduceerbaar is. Het instellen van de pH gebeurt in de waterige fase, daarna worden de organische componenten toegevoegd. Het gebruik van een vaste stof maakt het noodzakelijk om het eluens te filtreren over een 0,45 µm filter. Uiteindelijk vindt het ontgassen plaats met behulp van een ultrasoon.

Normaliter houden we een houdbaarheidstermijn van 1 jaar aan. Het is gebleken dat er bacteriegroei optreedt als het eluens minder dan 20% modifier bevat, dit proberen we te voorkomen door de fles vooraf te spoelen met een ontsmettingsvloeistof en te laten drogen (b.v. alcohol 70%).

HPLC-kolommen

Het gebruik van 1 kolom per preparaat is niet goed bevallen. De frequentie waarmee de farmaceutisch preparaten worden gemaakt, is laag. De kolom ligt dan lange tijd in ruste hetgeen de piekvorm niet ten goede komt. Als een kolom met verschillende mobiele fases gebruikt wordt, blijken de retentietijden niet stabiel te zijn. Uiteindelijk is gekozen voor het gebruik van 1 kolom per eluens waarmee wel verschillende preparaten geanalyseerd kunnen worden.

De te analyseren monsters zijn helder en vrij van deeltjes, in plaats van een voorkolom wordt gebruik gemaakt van een inline filter.

Detectiemethode

De Diode Array Detectie is de standaard detectiemethode. De mogelijkheid om op elk moment in het chromatogram een spectrum op te nemen, wordt gebruikt om een uitspraak te doen over de piekzuiverheid en de piekidentiteit. In het algemeen is de eis voor zowel de piekzuiverheid >998 als de librarymatch >998 (de parameters kunnen maximaal 1000 zijn).

In enkele uitzonderlijke gevallen maken we gebruik van een fluorescentie detector.

Geschiktheid van het HPLC-systeem

De Europese farmacopee schrijft voor dat de system suitability test (SST) een vast onderdeel dient te zijn van een chromatografische methode. De farmacopee beschrijft criteria waarmee de geschiktheid van het systeem beoordeeld kan worden. Hiervoor komen parameters zoals de druk, de retentietijd, de resolutie en de pieksymmetrie in aanmerking. Tevens geeft de farmacopee aan welke speelruimte er is om aan gestelde criteria te voldoen. De parameters worden immers beïnvloed door factoren zoals het eluens (samenstelling, pH, ionsterkte), de kolom (temperatuur, dimensie, drager) en de flow. De farmacopee beschrijft waarbinnen de factoren bij isocratische vloeistofchromatografie aangepast mogen worden. De meest eenvoudige aanpassingen zijn:

Flow	± 50%
Temperatuur	± 10%
Eluens	pH (waterige fase eluens) ± 0,2 eenheid
	zout concentratie buffer ± 10%
	laagste component ± 2% absoluut
	nieuwe component ± 10% absoluut

Afhankelijk van de frequentie waarmee het HPLC-systeem gebruikt wordt en de ervaring kan de analist kiezen hoe de geschiktheid van het HPLC-systeem te volgen gedurende de chromatografische procedure.

De geschiktheid van een HPLC-systeem wordt getest zodra de basislijn stabiel is. Na een proefinjectie wordt de geschiktheid beoordeeld aan de hand van de druk, retentietijd, pieksymmetrie en resolutie.

Een plotseling afwijkende druk kan een aanwijzing zijn voor een lekkage of verstopping in het chromatografische systeem. Een trendmatige verhoging van de druk kan veroorzaakt worden door een verouderde kolom.

Een afwijkende retentietijd kan wijzen op een afwijking in eluens of kolom. De flow wordt dusdanig aangepast dat de retentietijd van de te bepalen component in het ingestelde tijdvenster van de dataverwerking valt.

Een afwijking of trend in de pieksymmetrie is een goede indicatie voor het vervangen van de kolom of het eluens. Normaliter is de eis voor de pieksymmetrie tussen 0,8 en 1,5.

Een te lage resolutie kan verholpen worden door nieuw eluens of een nieuwe kolom. Bij gelijke signalen moet de resolutie groter zijn dan 1,5 voor een basislijn scheiding.

Op grond van de historie worden er per analysemethode criteria voor de geschiktheidstest vastgesteld.

Kalibratie

Het injectievolume van de autosamplers is goed reproduceerbaar zodat besloten is te kwantificeren zonder het toevoegen van een interne standaard. Controle op de reproduceerbaarheid vindt plaats door eisen te stellen aan de variatiecoëfficiënt van meervoudige injecties.

Uitgaande van een primaire standaardstof worden twee onafhankelijke standaarden bereid, de eerste op 80-90% en de tweede op 110-120% van de te meten concentratie. Bij de bereiding wordt minimaal 50 mg afgewogen. De dataverwerking geeft in het rapport van de standaarden de verhouding van het gemeten oppervlak en de concentratie weer. De verhouding van standaard 2 mag niet meer dan 2% verschillen van die van standaard 1.

De kalibratielijijn wordt berekend op de twee standaarden zonder de oorsprong, het signaal van de te bepalen component bevindt zich naar verwachting tussen die van de twee standaarden. In geval dat niet zo is, wordt de kalibratielijijn berekend op de twee standaarden en de oorsprong.

Preparaat

Het te keuren preparaat wordt in tweevoud geanalyseerd. Het preparaat wordt zodanig verdund dat er in maximaal 10 µl tussen 0,1 en 1 µg van de te bepalen component op de kolom gebracht wordt. De meetoplossing wordt afhankelijk van de precisie in meervoud geïnjecteerd. Als de relatieve standaarddeviatie van drie injecties >0,52% is, wordt het aantal injecties per monster verhoogd van drie naar zes.

Gegevensverwerking

De retentietijd en het spectrum van het chromatografisch signaal worden gebruikt voor de identificatie van de te bepalen component. Zowel voor de librarymatch als voor de piekpurity is de algemene eis ≥ 998 .

De kwantificering gebeurt aan de hand van het piekoppervlak met een specifieke integratiemethode. Per preparaat is een standaard integratiemethode vastgesteld die alleen door de beheerder gewijzigd mag worden.

Om een verloop in de chromatografische eigenschappen van het HPLC-systeem te kunnen signaleren, wordt aan het einde van de serie opnieuw de twee standaarden geïnjecteerd. Het verschil tussen de standaard aan het begin en het einde van de serie mag niet meer dan 2% bedragen.