



Verslag discussie-ochtend standaarden

Piet de Goede, Laboratorium apotheek,
A.Z.V.U.,
De Boelelaan 1117, 1081 HV
Amsterdam.

Verslag discussieochtend standaarden, die gehouden werd bij NOVON te Amersfoort op 23 mei 1997.

Voor deze discussieochtend waren een 3-tal sprekers (Harrie van As, AZM; Piet Bouma, AZG; Piet de Goede, AZVU) uitgenodigd om iets te vertellen over hoe zij omgaan met standaarden en alles wat daar mee samenhangt. Tevens had de analysecommissie een enquête gehouden met vragen over standaarden zoals, hoe maakt, bewaart, gebruikt en controleert men ze. In dit verslag wordt zoveel mogelijk per onderdeel samengevat van wat de sprekers verteld hebben, omdat er veel overlappingen zijn.

Grondstoffen

Hoe komt men bijv. aan zuivere stof om standaarden te maken. Het kan zijn dat de stof reeds in de apotheek aanwezig en gekeurd is. Als dit niet het geval is, kan de stof besteld worden bij een fabrikant, middels een standaardbrief, waarop alleen de naam van de fabrikant en de stof

behoeven te worden ingevuld en waarin verklaard wordt, dat de stof alleen voor onderzoekdoeleinden wordt gebruikt en niet aan mens of dier wordt toegediend.

bijvoorbeeld Sigma, hoewel hier een aardig prijskaartje aan kan hangen. In het verleden is meer dan eens gezegd -en ook nu kwam dat aan de orde- of stoffen niet centraal

NAAM	LAMOTRIGINE		NUMMER 786
DATUM	07-05-1997		STOCKOPL WERKOPLOSSING 1000 mg/l NR mg/l NR 49
LEVERANCIER BRUTOFORM MOLGEW MOL+ZOUT	WELCOME 430C78 C9H7Cl2N5 256,10 256,10		BIJZONDERHEDEN
OPLOSMID.	ETHANOL		HOUDBAARHEID 3 maanden tot nu toe
VERVALDATUM STOCKOPL	VERVALDATUM WERKOPL 13-08-1997		
STANDOPL mg/l NR	mg/l NR	INWEEGFACT VOOR	NVT
STANDOPL mg/l NR	mg/l NR	INWEEGFACT IS	1,000
BEWAAROPL mg/l NR	mg/l NR		
INW DAT 24-01-1997 INWEEG STANDOPL 50,2 mg PAR HG OPM in 50,0 ml ETHANOL			
INW DAT 13-05-1997 INWEEG STANDOPL 50,1 mg PAR HG OPM in 50,0 ml ETHANOL			

Figuur 1: Dbase bestand gegevens grondstof en oplossing.

Deze brief dient ondertekend te worden door een apotheker en kan dan naar de fabrikant worden opgestuurd. Als het ook om metaboliëten gaat, wordt dat in dezelfde brief kenbaar gemaakt, omdat deze commercieel haast niet te verkrijgen zijn. Daarentegen bestaat voor vele moederstoffen ook de mogelijkheid om deze commercieel te verkrijgen,

ingekocht en gedistribueerd kunnen worden. Daarbij is de naam van de KKG wel eens gevallen, maar tot nu toe staat geen enkele instantie of ziekenhuis te trappelen om dit op zich te nemen, nog afgezien van het vele werk dat het met zich meebrengt. Elk ziekenhuis is dus zelf verantwoordelijk voor de gebruikte stof.

Binnenkomst van de stof

Als de grondstof binnenkomt, wordt deze m.b.v. een database programma gearchiveerd (bijv. programma de Weezenlanden). Hoe de stof bewaard moet worden, staat vaak op het bijgeleverde certificaat. De stof kan daarbij bijvoorbeeld over gebracht worden in een reactievial (Eppendorf) van polystyreen en onder stikstof bewaard worden in een bruin flesje bij 4°C of gewoon bij kamertemperatuur. Opslag bij een temperatuur van 4°C heeft als voordeel de grotere stabiliteit, maar als nadeel het aantrekken van vocht. Opslag bij -80°C kan tevens worden overwogen en toegepast. De bewaartermijn kan op de gegevens van de leverancier berusten of door eigen waarneming vastgesteld worden. Vervolgens werd nog opgemerkt dat koelkasten en diepvriezers in verband met GLP een temperatuur signalering dienen te hebben.

Keuring

Analytisch onderzoek op de stof kan worden verricht of achterwege worden gelaten. In verband met het jarenlang bewaren van de stof, zal deze ongeacht zijn analyse certificaat gekeurd dienen te worden. Deze keuring kan geschieden via cap. GLC of HPLC met diode array. Het voordeel van diode array is, dat in het geval van meerdere pieken via het spectrum bekeken kan worden of dit afgeleiden zijn van de moederstof. Met behulp van capillaire GLC beschikt men over een systeem met een hoog schotelgetal en daarmee een goede resolutie om eventuele afbraakproducten te kunnen ontdekken. Bij een frequent en adequaat bestelsysteem en het aanwezig zijn van een analyse certificaat kan men wellicht controles achterwege laten. Een voorbeeld van een grondstof en oplossing in een dbase bestand zou er als volgt uit kunnen zien. (zie fig. 1 op pag. 15)

Standaardoplossing

Er wordt een hoeveelheid stof (deze kan van te voren 24 uur gedroogd worden op silicagel of fosforpentoxi-

de) afgewogen op een analytische balans en verdund met oplosmiddel. De minimale inweeg hoeveelheid is uiteraard afhankelijk van het aantal milligrammen stof dat men heeft en of de stof gemakkelijk te verkrijgen is. Bij metaboliëten gaat men al snel over naar kleine hoeveelheden i.v.m. de moeilijke verkrijgbaarheid. De minimale inweeg hoeveelheid over de 3 ziekenhuizen varieerde van 1-25 mg. Als oplosmiddelen worden vooral methanol, ethanol en water gebruikt. Het water wordt soms basisch of zuur gemaakt om bepaalde stoffen goed te doen oplossen (bij stoffen zoals amitriptyline worden een paar druppels 0.1 M HCl en bij barbituraten wordt een druppel loog toegevoegd, in beide gevallen worden zouten gevormd, die goed oplossen. In het AZG lost men veel op in water, terwijl het AZM de voorkeur geeft aan ethanol en water en het AZVU aan methanol. Uiteraard wordt de keuze van het oplosmiddel bepaald door de toepassing en door specificaties (oplosbaarheid en houdbaarheid). Ten aanzien van methanol werd opgemerkt door het AZM, dat dit een toxisch karakter heeft en daarom als oplosmiddel beter vermeden kan worden. In zijn algemeenheid wordt gestreefd naar een stockoplossing van 1 mg/ml. Van deze oplossing kan een werkoplossing gemaakt worden met een concentratie afhankelijk van de te verwachten conconcentratie van het farmacon in de matrix. Het oplosmiddel hoeft in principe niet hetzelfde te zijn als van de stockoplossing.

Bewaring

De stockoplossing/werkoplossing wordt in het AZG bewaard in ampullen van glas of plastic bij een vastgestelde bewaar temperatuur. In het AZM wordt de oplossing bewaard in EXOLUTE-buizen met een gestandaardiseerd lab-etiket bij 4°C en in het AZVU in bruine 50 ml flesjes voorzien van een dop met een teflon inlay om verdamping tegen te gaan bij 4°C. Ten aanzien van koel-/vriezkasten kan opgemerkt worden dat deze explosie beveiligd dienen te

zijn, als daar alcoholische of vergelijkbare oplossingen in worden bewaard.

Houdbaarheid

De stabiliteit en daaraan verbonden bewaartermijn wordt experimenteel bepaald, waarbij meestal de volgende technieken gebruikt worden: HPLC met STIP, capillaire GLC en spectrofotometrie m.b.v. $E_{1cm}^{1\%}$. Is er niets bekend (in het geval van een nieuw te bepalen stof) dan zal de oplossing herhaalde malen vers bereid en vergeleken moeten worden met de vorige oplossing om zodoende inzicht in mogelijke afbraak te verkrijgen. De algemene bewaar termijn voor stockoplossingen wordt gesteld op 1 jaar. In het AZVU en AZM wordt dan een nieuwe stock bereid en vergeleken met de vorige. In het AZG wordt na het bereiken van de expiratedatum de stockoplossing opnieuw gekeurd, veelal m.b.v. de spectrofotometer en bij goedkeuring wordt de expiratie-tijd verdubbeld. De bewaartermijn van de werkoplossing wordt evenzo experimenteel bepaald, via het gebruikte analytische systeem of HPLC-STIP, door deze te vergelijken met de vorige werkoplossing. Op deze manier kan men vaststellen hoeveel maanden de werkoplossing houdbaar is, dit kan worden vastgelegd in het werkvoorschrift. In het AZVU wordt een termijn van 3 maanden aangehouden, waarna controle plaatsvindt.

Standaarden in matrix

Bij de eigenlijke bepaling wordt veelal gebruik gemaakt van een meerpunts calibratielijijn in de matrix (minimaal 3 concentratieniveaus), waarbij de blanco matrix als controle kan worden meegenomen. Om een bepaling te kunnen uitvoeren zal men, indien deze niet voorhanden zijn, dus eigen standaarden in de matrix moeten maken. Er bestaan verschillende manieren om eigen standaarden in serum/plasma te maken.

Dat kan zijn door:

-Directe toevoeging van een hoe-

veelheid werkoplossing van een farmacon in methanol/ethanol/water aan serum/plasma (maximale toevoeging < 50 ul).

-Eerst een hoeveelheid werkoplossing in een glazen buis droog te blazen en dan een bepaalde hoeveelheid serum/plasma toe te voegen, waarbij er vanuit gegaan wordt dat het farmacon niet vluchtig is of - indien dat wel het geval is- de werkoplossing door te verdunnen met water en serum/plasma, waarbij uiteindelijk de matrix bijna volledig uit serum/plasma bestaat.

-Serum/plasma na toevoeging van het farmacon in een geschikt oplosmiddel, uit te vullen in flacons en te vriesdrogen en later door toevoeging van een exacte hoeveelheid

water weer op te lossen. In het geval van immuno-assays kan men gebruik maken van de externe ijklijn.

-Door de verkrijgbaarheid van externe referenties (zoals bijv. de KKG of BIORAD) heeft men de mogelijkheid om bepalingen hier op uit te rekenen.

Bij alle routine bepalingen dient een onafhankelijke controle te worden meegenomen, die als een patiëntmonster beschouwd kan worden, dat kan uit een pool van patientensera zijn, een KKG-referentie of een eigen controle (bereid uit een apart ingewogen stock). Deze controles worden uitgevuld in polystyreen buisjes en bij -20°C bewaard of zijn in gevriesdroogde vorm aanwezig en worden bewaard bij 4°C.

Algemene opmerkingen

Met dit verslag is getracht, enig inzicht te geven in hoe om te gaan met standaarden. Er kan rustig gesteld worden dat het controleren van oplossingen (stock-/werk-) een tijdrovende bezigheid is, die uiteraard zeer noodzakelijk is, omdat standaardoplossingen het hart van de bepaling zijn. Het zou mijnsinziens goed zijn als wij naar aanleiding van deze dag bepaalde conclusies zouden kunnen trekken om daar mee aan de slag te kunnen gaan. Vragen betreffende de grondstoffen, manier van controleren, stabiliteit, bewaren, enz. houden velen bezig. Wellicht kan de analysecommissie hier het voortouw in nemen.