



Stabiliteitsonderzoek van geneesmiddelen in olieachtige injecties.

C.M.M. Haring¹ en Dr. D.J. Touw².

¹ Stichting Apotheek Haagse Ziekenhuizen

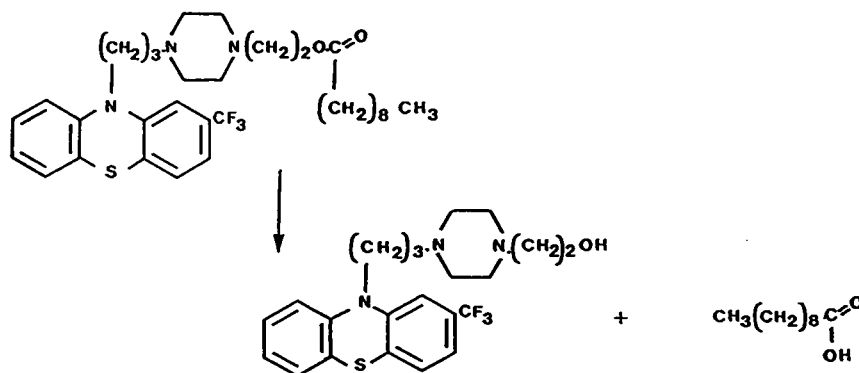
² Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit

Samenvatting

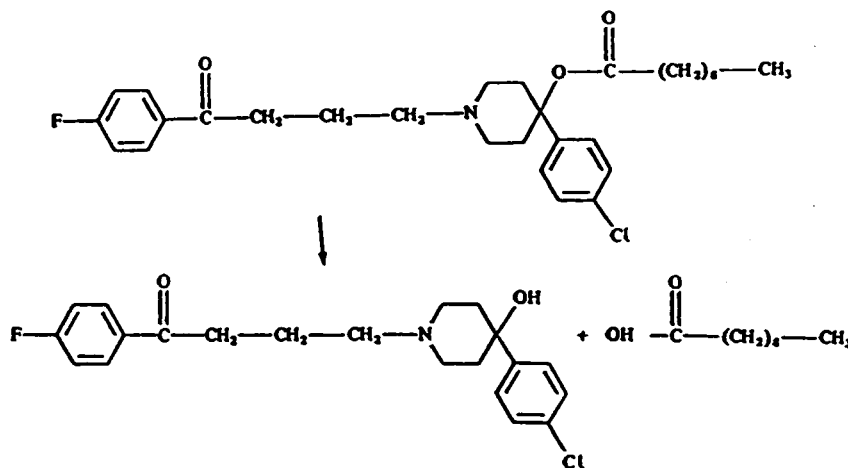
In ziekenhuisapotheken worden nauwelijks bereidingen en analyses van niet-waterige injecties uitgevoerd. Tegenwoordig is het gebruikelijk een houdbaarheidsonderzoek uit te voeren alvorens een nieuw preparaat in productie te nemen. In dit artikel wordt een methode beschreven om de stabiliteit van twee, in productie te nemen, intramusculaire injecties vast te kunnen stellen. De HPLC-methode is gevalideerd en geschikt om de ontledingsproducten te kwantificeren in Flufenazine (-decanoaat) 1 ml = 100 mg Intramusculair en in Haloperidol (als decanoaat) 1 ml = 100 mg Intramusculair.

Inleiding

De psychiatrie maakt o.a. gebruik van geneesmiddelen om psychoses te onderdrukken, de zogenaamde anti-psychotica. Naast tabletten als toedieningsvorm zijn er ook depotpreparaten in de vorm van intramusculaire injecties. Deze worden toegepast als er twijfel bestaat over de therapietrouw. Bovendien kan de onderdrukking van de psychose bij deze toedieningsvorm één tot zes weken aanhouden [1]. Voorbeelden van dergelijke depotpreparaten zijn de decanoaat-esters van flufenazine en haloperidol. De injectie bestaat uit een oplossing van het niet-werkzame flufenazinedecanoaat of haloperidoldecanoaat in sesamolie. Na intramusculaire toediening treedt verzeping van de ester op en komt het actieve bestanddeel (flufenazine of haloperidol) vrij (zie figuur 1a/1b).



Figuur 1a; verzeping van flufenazinedecanoaat



Figuur 1b; verzeping van haloperidoldecanoaat

Flufenazine en haloperidol vertonen ernstige bijwerkingen zoals parkinsonisme (stijfheid van spieren, geen gelaatsmimiek en trillen) en verkramping van lichaamsdelen. Met name dit laatste kan leiden tot zeer pijnlijke dwangstanden. Om bijwerkingen te voorkomen mag er in het injectiepreparaat niet te veel van het vrije anti-psychoticum beschikbaar zijn. Voor het flufenazinedecanoaatpreparaat dat 100 mg/ml bevat is het maximum op 4 mg flufenazine-dihCl per ml gesteld (BP'88). Voor het haloperidoldecanoaatpreparaat dat 141 mg/ml bevat is het maximum op

1 mg haloperidol per ml gesteld (huisnorm).

Toen in 1989 flufenazinedecanoaat en haloperidoldecanoaat als grondstof in de handel verkrijgbaar werden, wilde de AHZ zelf de bereiding van de intramusculaire injecties ter hand nemen. Zoals het een moderne apotheek betaamt, moest naast de keuring van de grondstoffen en de injecties ook de stabiliteit van de injecties onderzocht worden. Dit kan aan de hand van een versneld houdbaarheidsonderzoek bij hogere temperaturen en/of een shelf-life onder-

zoek bij de bewaar temperatuur. Aangezien er geen ervaringen zijn met versneld houdbaarheidsonderzoek van oliepreparaten, is voor de onderhavige producten gekozen voor shelf-life onderzoek. In dit onderzoek was de hoeveelheid vrij anti-psychoticum maatgevend voor de stabiliteit.

Flufenazinedecanoaat ontleeft onder invloed van licht (fotolyse), in aanwezigheid van peroxiden (oxidatie) en in alkalisch milieu (hydrolyse) [2]. Van haloperidoldecanoaat is slechts bekend dat ontleding via hydrolyse tot vrij haloperidol kan leiden [3].

In de Britse Pharmacopee van 1988 is een monografie van flufenazinedecanoaat als grondstof en als injectie opgenomen. Voor het onderzoek naar het vrije flufenazine wordt een twee-dimensionale DLC-methode en voor het gehalte van flufenazinedecanoaat een perchloorzuurtitratie beschreven. De monografie van flufenazinedecanoaat is tevens uitgangspunt geweest voor het onderzoek van haloperidoldecanoaat. De in de monografie beschreven analysemethoden zijn echter niet geschikt voor een houdbaarheidsonderzoek. De perchloorzuurtitratie is niet specifiek genoeg en de DLC-methode is niet toereikend om de hoeveelheid vrij anti-psychoticum te kwantificeren. Om een uitspraak over de houdbaarheid te kunnen doen, is gezocht naar een HPLC-methode. De HPLC-methode is gevalideerd volgens de geldende normen [4] en vervolgens toegepast bij de shelf-life onderzoeken.

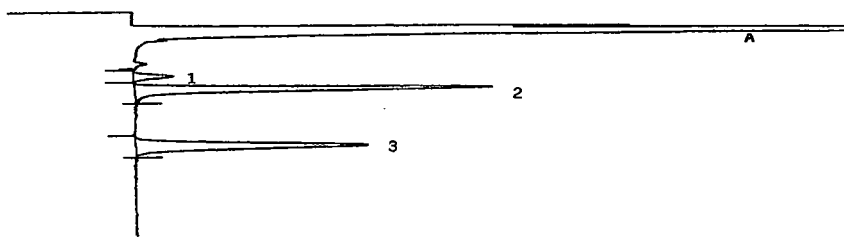
Materialen

referentiestoffen

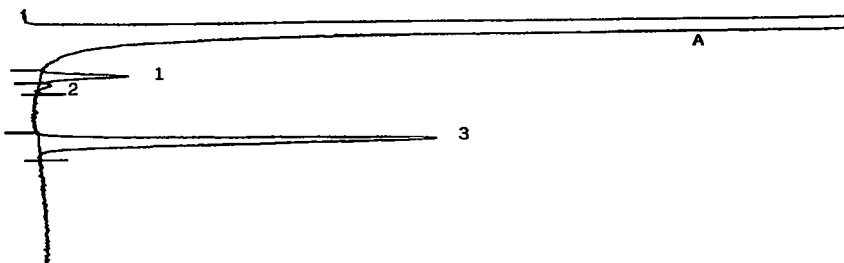
Flufenazinehydrochloride (USP) SQ004918 (BRISTOL-MYERS SQUIBB), haloperidol (DUCHEFA), flufenazinedecanoaat (DUCHEFA), haloperidoldecanoaat (BUFA), promazinehydrochloride (PHARMACHEMIE), sesamololie (OPG), benzylalkohol reïnst (MERCK)

chemicaliën

dichloormethaan (Rathburn),



Figuur 2a; chromatogram van flufenazinedecanoaatpreparaat met 3,4 mg flufenazine-diHCl per ml (1= matrixcomponent?, 2= flufenazine, 3= interne standaard).



Figuur 2b; chromatogram van haloperidoldecanoaatpreparaat met 0,03 mg haloperidol per ml (1= matrixcomponent?, 2=haloperidol, 3= interne standaard).

methanol lichrosolv, 96% v/v ethanol p.a., diethylamine p.a., 100% azijnzuur p.a. (allen van Merck).

HPLC systeem

De mobiele fase is een mengsel van 450 ml waterverzadigde dichloormethaan, 450 ml gedroogde dichloormethaan, 100 ml methanol en 1,5 ml buffer pH 3,2. De mobiele fase is onder vacuüm gefilterd door een 0,5 µm type FH filter (Millipore FHUP04700).

Buffer pH 3,2 = 30% azijnzuur/diethylamine tot pH 3,2 (ca. 20:1). Na een 1 cm voorkolom met pelliculair silica werd een analytische kolom met Lichrosorb Si 60 (100 mm x 3 mm) gebruikt (Chrompack).

De gebruikte apparatuur bestond uit een model 300 pomp (Separations), een 717 plus injector (Waters), 757 detector (Kratos) en een chromjet integrator (Spectra Physics).

Methoden

Flufenazine is lichtgevoelig en dus werd de invloed van het licht zoveel mogelijk uitgesloten door o.a. alle oplossingen in bruinekleurd glaswerk te bereiden.

HPLC-methode

De referentiestoffen werden opgelost in en doorverdund met eluens; zonodig werd een referentiestof opgelost in 96% ethanol en verder verdund met eluens. Bij een flow van 1,5 ml/min werd 10-50 µl van de te meten oplossing in het HPLC-systeem geïnjecteerd. De detectie vond plaats door absorptiemeting bij 254 nm. De concentraties zijn aan de hand van de piekhoogten berekend.

Validatie

Om de selectiviteit te kunnen beoordelen zijn alle componenten van de intramusculaire injecties apart opgelost, doorverdund en geïnjecteerd. De detectiegrens is bepaald uit het gemiddelde ruisniveau van blanco injecties (n=24) + 3 maal de standaarddeviatie van het ruisniveau. De lineariteit is vastgesteld door vijf verschillende concentraties in duplo te meten. Voor flufenazine kwamen de concentraties overeen met 1%, 2%, 3%, 4% en 5% ontleding en voor haloperidol met 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% en 2.0% ontleding. De lineariteit is m.b.v. regressieanalyse gecontroleerd.

Bij drie concentratieniveaus is de

herhaalbaarheid bepaald door 1 oplossing 6 maal te injecteren.

Gehaltebepaling t.b.v. shelf-life Standaardoplossingen

Standaard F1: 85 mg flufenazinedi-
hydrochloride werd nauwkeurig
afgewogen, opgelost in en aange-
vuld tot 50,0 ml met 96% ethanol.
Standaard F2: 25,0 ml standaard F1
werd verdund tot 50,0 ml met 96%
ethanol.

Standaard H1: 25 mg haloperidol
werd nauwkeurig afgewogen, opge-
lost in en aangevuld tot 50,0 ml met
96% ethanol.

Standaard H2: 10,0 ml standaard H1
werd verdund tot 50,0 ml met 96%
ethanol.

Interne standaard IS1: 15 mg proma-
zine HCl in 50 ml 96% ethanol.

Interne standaard IS2: 10 ml IS1
werd verdund tot 50 ml met 96%
ethanol.

Ijklijnen

De flufenazine-ijklijn werd bereid
door m.b.v. een HPLC-spuut resp. 10
 μ l standaard F2, 20 μ l standaard F2,
30 μ l standaard F2, 20 μ l standaard
F1, 30 μ l standaard F1 en 40 μ l stan-
daard F1 in 10 ml maatkolffjes te
pipetteren. Hieraan werd 50 μ l IS1
toegevoegd en vervolgens aan-
gevuld met eluens. Er werd 10 μ l in
de HPLC geïnjecteerd.

Voor de haloperidol-ijklijn werd
m.b.v. een HPLC-spuut resp. 10 μ l
standaard H2, 25 μ l standaard H2, 50
 μ l standaard H2, 20 μ l standaard H1,
30 μ l standaard H1 en 40 μ l stan-
daard H1 in 10 ml maatkolffjes gepi-
petteerd. Hieraan werd 50 μ l IS2 toe-
gevoegd en vervolgens aangevuld
met eluens. Hiervan werd 50 μ l in de
HPLC geïnjecteerd.

Monstervoorbewerking

Het derde ijkpunt werd 10 maal geïn-
jecteerd en aan de hand van de piek-
hoogteverhouding werd de variatie-
coëfficiënt berekend. Uit tabel 1 werd
afgelezen hoeveel monsters flufenazi-
ne bepaald moeten worden om een
significant meetverschil van 4% vast
te kunnen stellen. Bij haloperidol

Tabel 1: De statistisch significante meetverschillen in procenten bij een
gegeven variatiecoëfficiënt (VC) en bij N-voudige analyses.

VC N	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	5,0
2	0,95	1,8	2,7	4,5	9,0	14	18	22	45
3	0,25	0,50	0,74	1,2	2,5	3,7	5,0	6,2	12
4	0,16	0,32	0,48	0,80	1,6	2,4	3,2	4,0	8,0
5	0,12	0,25	0,37	0,60	1,2	1,9	2,5	3,1	6,2
10	0,07	0,14	0,21	0,40	0,70	1,1	1,4	1,8	3,6

Tabel 2: validatiegegevens [7]

	flufenazine		haloperidol	
detectiegrens	3,5 ng/10 μ l		5,4 ng/50 μ l	
	d.i. 0,4% ontleding		d.i. 0,1% ontleding	
ijklijn	$Y = -0.026 + 0.462X$		$Y = 0.088 + 0.9815X$	
bereik	0-6% ontleding		0-2% ontleding	
regressie	$r = 0.9959$		$r = 0.9979$	
herhaalbaarheid	ontl.	VC	ontl.	VC
(n=6)	1%	1.3%	0.1%	1,4%
	3%	1.0%	1.0%	0.7%
	5%	0.9%	2.0%	0.6%

werd van een significant meet-
verschil van 1,0% uitgegaan.

M.b.v. een Finn-pipet werd 0,25 ml
van de flufenazinedecanoaat injectie
in een 25 ml maatkolf gepipetteerd.
De pipettip werd 3x met eluens
nagespoeld en de maatkolf werd
met eluens aangevuld. Hiervan werd
m.b.v. een glazen pipet 1,0 ml in een
10 ml maatkolf gepipetteerd, 50 μ l
IS1 toegevoegd en aangevuld met
eluens. Er werd 10 μ l in de HPLC
geïnjecteerd.

M.b.v. een Finn-pipet werd 0,25 ml
van de haloperidoldecanoaat injectie
in een 25 ml maatkolf gepipetteerd.
De pipettip werd 3x met eluens
nagespoeld en de maatkolf werd
met eluens aangevuld. M.b.v. een
glazen pipet werd 1,0 ml hiervan in
een 10 ml maatkolf gepipetteerd, 50
 μ l IS2 toegevoegd en aangevuld met
eluens. Er werd 50 μ l in de HPLC
geïnjecteerd.

Resultaten

component	R_t (min)
sesamolie	0.4
flufenazinedecanoaat	0.5
haloperidoldecanoaat	0.5
benzylalcohol	0.5
flufenazine	1.7
haloperidol	1.7
promazine	2.8

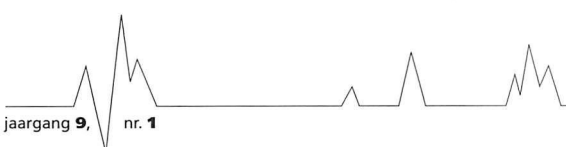
Flufenazine en haloperidol zijn
gescheiden van de decanoaat- ester
en van de matrix componenten (zie
figuur 2). In beide preparaten is een
extra piekje op $R_t = 1.3$ min waar-
neembaar; de identiteit van deze
piek moet nog nader onderzocht
worden. De overige validatieresulta-
ten staan vermeld in tabel 2. De
detectiegrens ligt ruim onder de
maximaal toelaatbare concentratie.
De lineariteit is m.b.v. de lack of fit
test getoetst [7].

Het shelf-life onderzoek is in 1994
gestart en wordt in twee charges,
bereid met verschillende charges
grondstof, uitgevoerd [5]. Zodra
het shelf-life onderzoek afgerond is
(het laatste meetpunt is in januari
1998) zullen de resultaten in
Ziekenhuisfarmacie gepubliceerd
worden.

Discussie

Depotpreparaten bestaande uit de
(onwerkzame) ester van een sterk
werkzame verbinding zijn onderhe-
vig aan ontleding in de toedienings-
vorm.

De stabiliteit wordt bij voorkeur
bepaald door de ontstane ontle-
dingsproducten te meten; indien dit
niet mogelijk is dan is de afname



van de gedeclareerde component maatgevend voor de stabiliteit. In eerste instantie is getracht een RP-HPLC methode te ontwikkelen waarin zowel de vrije vorm als de decanoaat-ester te kwantificeren was. Flufenazine en haloperidol bleken dan weinig en de decanoaat-esters juist veel retentie te hebben. De matrix van de intramusculaire injectie is niet mengbaar met de in de RP-chromatografie gebruikelijke mobiele fasen zodat de te bepalen componenten uit de matrix geëxtraheerd moeten worden. We vonden geen geschikte RP-methode: er was onvoldoende scheiding tussen de matrix en flufenazine resp. haloperidol en -zoals verwacht werd- was de monstervoorbewerking door de extractie niet alleen lastig maar ook slecht reproduceerbaar. Dit deed ons ondanks de negatieve milieu-aspecten besluiten onze SP-methode te proberen, die met succes toegepast wordt bij bloedspiegelbepalingen van tricyclische anti-depressiva. Om ook flufenazinedecanoaat en haloperidol-decanoaat kwantitatief met de SP-methode te kunnen analyseren zijn diverse modificaties van de mobiele fase geprobeerd. Voldoende retentie van de decanoaat-esters ging echter altijd ten koste van de retentie en de piekvorm van flufenazine/haloperidol. Omdat we geen idee hadden wat het effect van de olieachtige matrix op de levensduur van de kolom zou zijn, is de conditie van de kolom vóór en na het validatieonderzoek vastgelegd conform de test van de fabrikant. De conditie van de kolom veranderde nauwelijks; ook de druk bleef constant.

Het validatieonderzoek is op oudere apparatuur uitgevoerd dan het shelf-life onderzoek. De detectiegrens in het shelf-life onderzoek bleek aanzienlijk lager te liggen; ook de ijklijnen hadden een betere regressiecoëfficiënt ($r > 0,9992$). Tegenwoordig wordt i.p.v. de detectiegrens de Lower Limit of Quantitation (LLQ) gezien als een geschikte parameter voor de laagst detecteerbare hoeveelheid [6]. De LLQ is uit de kalibratielijnen van het shelf-life onderzoek te berekenen. Om tijdens het shelf-life onderzoek (3 jaar) steeds dezelfde referentiestof te kunnen gebruiken, moet deze hiervoor gereserveerd worden en tenminste zolang houdbaar zijn. Op grond van DLC-onderzoek hebben we het meetbereik van flufenazine in het shelf-life onderzoek verruimd. Dit was het eerste shelf-life onderzoek dat in de AHZ is uitgevoerd volgens de NVZA-richtlijnen [5] en de opzet kan op een paar punten verbeterd worden. Zo is in dit onderzoek de herhaalbaarheid van de HPLC-methode in plaats van de herhaalbaarheid van de analysemethode bepaald; immers de monstervoorbewerking is ook onderdeel van de methode. Ten tweede is het onderzoek geheel gericht geweest op de ontleding naar de vrije anti-psychotica, mogelijke andere ontledingen (signaal op $R_t=1,3$ min) zijn niet volgens het NVZA-protocol [5] nagegaan. Tenslotte moeten de voorschriften en de instructies voor iedereen heel duidelijk zijn om te voorkomen dat meetwaarden niet vergelijkbaar zijn en er te weinig

ampullen voor de laatste metingen overblijven.

Conclusie

Met de HPLC-SP-methode voor de bepaling van tricyclische anti-depressiva kunnen de concentraties flufenazine en haloperidol in intramusculaire injecties betrouwbaar gemeten worden.

Literatuur

1. "Informatorium Medicamentorum" 1993, Koninklijke Nederlandse Maatschappij ter bevordering der Pharmacie.
2. Clarke G., "Fluphenazine Decanoaat", *Analytical Profiles of Drug Substances* 9, 1980.
3. Rompay J. van, "Purity determination and evaluation of new drug substance", *J. of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, vol 4, no 6, 1986.
4. "Document analytische validatie" 1991, studiegroep Kwaliteit in Farmaceutische Analyse.
5. Beijnen J.H., Branje J.Ph.A., van Niel J.C.C. en Touw D.J., "Protocol stabiliteitsonderzoek van geneesmiddelen in waterige oplossingen" 1993.
6. Kucharczyk N., "Estimation of the lower limit of quantitation, a method detection performance parameter for biomedical assays, from calibration curves", *J. Of Chromatography, Biomedical Applications*, 612 (1993) 71-76.
7. Kamperveen M., "Bepaling van ontledingsprodukten in olieachtige toedieningsvormen m.b.v. HPLC", HLO-stageverslag 1992.