

BISOPROLOL FUMARAAT METHODE OPTIMALISATIE EN VALIDATIE MET BEHULP VAN HPLC-UV/DAD TEN BEHOEVE VAN VRIJGIFTE IN DE EUROPESE MARKT

AFSTUDEERSCRIPTIE

Naam:	Thor Reijs
Student nummer:	s1087970
Begeleider hogeschool:	Elise van der Hout
Begeleiders stage:	Nick Dusoswa en Arjen van Loon

1. VOORWOORD

Iedereen heeft wel eens de mythe van de feniks gehoord. De vogel die na zijn dood het eenzame verbrandingsproces ingaat om later uit zijn eigen as herboren te worden. De bekendste metafoor komt uit de Griekse mythologie, wat spreekt over de Feniks als een legendarische vogel met een zeer sterke symbolische en verdiepende boodschap: hoop houdt nooit op! We kunnen onszelf altijd herbouwen, de obstakels in ons leven overwinnen zelfs uit het puin van onze "as". Velen van ons konden zich identificeren aan de feniks. Zeker tijdens de laatste paar jaren durende Covid; tijden waarbij ons menselijk welzijn op veel manieren werd beïnvloed.

Bij de Feniks denken we aan vleugels spreiden en vliegen, maar we staan vaak niet stil bij het opstaan uit de as. Dit is wel een passende manier om deze scriptie in te leiden, waarbij ik kort wil reflecteren op mijn "feniks-fase". Voor mij persoonlijk was het alsof ik mijn vleugels voelde, maar niet kon vliegen. Het vak wat ik op de middelbare school en het MBO met twee vingers in mijn neus met passie doorliep werd op het andere moment mijn grootste vijand. Ik zag mijn dromen in as veranderen, de as van onrecht, verraad en wantrouwen waren de laatste jaren de boventoon aan het voeren in mijn leven. Het gevolg was dat ik mijn passie (bijna) verloor, met als gevolg dat ik weinig motivatie en energie had om deze laatste fase van afstuderen opnieuw te doorlopen. Mijn begeleider Arjen van Loon begon me weer te laten inzien dat chemie niet alleen een "vak" maar ook een kunst is. Deze passie heeft hij langzaam weer weten aan te wakkeren in mij. Langzaam begon ik mijn passie bij Innogenerics terug te krijgen.

Naast hem zijn er nog andere mensen die hebben geholpen de as van mijn vleugels af te vegen. De tweede persoon die ik wil bedanken is Nick Dusoswa. Hij was het meest betrokken tijdens deze stageperiode. Hem wil ik bedanken voor zijn geduld, tijd moeite en goede begeleiding op de labzaal en ik zal de discussies over kaas ontzettend missen. Verder wil ik Patrick van Vliet ook bedanken waarbij ik af en toe kon sparren als Arjen en Nick er niet waren. Uiteraard grote dank voor Nadine Rutgers voor haar kritische opbouwende kijk op mijn resultaten en labjournaal. En alle overige collega's ook bedankt voor hun behulpzaamheid, wijsheid die ze me hebben meegegeven en goede vibe op de werkvloer. Ik wens hen allemaal veel succes en geluk in de volgende stap in hun carrière en verdere leven. Vanuit Hogeschool Leiden wil ik Jacco de Haas bedanken voor zijn geduld, tijd, motivatie en meedenken om zaken goed in te delen, en hulp dat ik op tijd mijn rust moet nemen. Verder wil ik mijn afstudeerdocent Elise bedanken voor haar hulp, geduld, maar ook voor het opnieuw herstelde vertrouwen in de Hogeschool. Verder wil ik mijn mentor Karsten Kaspers bedanken dat hij me de laatste tijd goed heeft opgevangen wanneer het bedrijf een heftige klap moest incasseren, en in deze fase enorm betrokken was bij mij. Ook wil ik mijn moeder voor haar steun en motivatie bedanken en heeft klaargemaakt voor dit leven. Mijn tante Hanneke Reijs die er op moeilijke momenten voor mij was. Daarnaast wil ik zulke lieve bijzondere vrienden van mij bedanken die mij rugdekking hebben gegeven in voor mij een zware tijd. De as is van de vleugels, deze feniks vliegt naar de horizon, stronger than ever!

2. SAMENVATTING/ABSTRACT

2.1 SAMENVATTING

Er is een HPLC-UV/VIS/DAD-methode geoptimaliseerd en gevalideerd voor de gehaltebepaling van Bisoprolol Fumaraat (BF). De maatschappelijke relevantie hiervan is dat Innogenerics door een gevalideerde methode Europese bevoegdheid krijgt/heeft om farmaceutische middelen van buiten de EU vrij te geven op de Europese markt.

Er werden twee verschillende methodes met elkaar vergeleken en geoptimaliseerd. Dit werd gedaan door voor beide methoden een gradiënt-elutie uit te voeren en de daarmee opgedane kennis werd gebruikt om te optimaliseren. Door verschillende eluens-samenstellingen, verandering in flow, kolomtemperatuur en verschillende hoeveelheden triethylamine toe te passen werd een methode ontwikkeld en gevalideerd. De robuustheid werd bepaald aan de hand van design of experiments (DoE) met de Zorbax-kolom. Dit werd gedaan door de pH van de buffer, kolomtemperatuur en flow 10% te verhogen/verlagen.

De methode werd gevalideerd door de lineariteit te bepalen met BF-standaarden. De correlatiecoëfficiënt was 0,9999, waarbij de kalibratiepunten willekeurig zijn verdeeld. De methode is lineair. Om de juistheid van de methode te bepalen werd de *accuracy* bepaald door placebo in te wegen en te spiken met BF-standaard corresponderend met 50%, 100% en 150% van de labelclaim voor bisoprolol en de recovery bepaald. Er werd uitgegaan van 1,25 en 10 mg BF-tabletten. Bij de 1,25 mg tabletten werden recovery's gevonden tussen de 99,35% en 100,08%. Voor de 10 mg tabletten werd een recovery gevonden tussen 100,28% en 100,83%. De herhaalbaarheid werd bepaald door elk monster 6x op te werken en te analyseren. De resultaten zijn waarden tussen 94,99% en 100,28%. De oplossingen waren op kamertemperatuur 72 uur houdbaar voor de standaarden, en voor de testoplossingen 44 uur.

De gevalideerde methode is isocratisch met eluens bevattend 25% Acetonitril 75% ELGA-water, bevattend 15 mM Ortho-fosforzuur en 0 mL triethylamine/L eluens; deze heeft een pH 3,00 in combinatie met een Zorbax XBD-kolom 3,0 mm*150 mm; 4,6 µm; De instellingen zijn een kolomtemperatuur van 20 graden Celsius, gemeten op 225 nm (DAD-detector), met een analysetijd van 10 minuten isocratisch met een flow van 0,500 mL/min.

2.2 ABSTRACT

An HPLC-UV/VIS/DAD-method is optimized and validated for the determination of Bisoprolol fumarate (BF) content in tablets of different doses. This is relevant for European society because Innogenetics could get the authority by this method to approve pharmaceuticals that are made outside the EU and selling those on the European market.

Two analytical methods were compared and optimized. With the use of a gradient/isocratic method. The method was further optimized by trial and error. Comparing eluent-ratio's, changing the flow rate, temperatures and applying different volumes of triethylamine to optimize and validate the method.

The robustness was determined with a design of experiments for the Zorbax-column. This was done by using eluent of pH 2,70 and 3,30, flows of 0,45 ml/min and 0,55 mL/min and temperatures of 15 and 25 °C. The method was robust.

The method was validated by determining the linearity by measuring different standards of BF. The accuracy was determined by using amounts of placebo without BF and adding different amounts of BF equal to about 50%, 100% and 150% amount of the label claim and determining the recovery. The results were between 99,35% and 100,08% with the 1,25 mg tablets. For the 10 mg tablets the recovery was between 100,28 and 100,83%. The repeatability was determined by preparing a sample six times. The results of all the tablets were between a range of 95,02% and 100,31%

The stability of the standard-solutions is stable for at least 72 hours at room temperature. The test-solutions were stable at room temperature for 44 hours.

The validated method is by using an eluent of pH 3,00 which includes 25% ACN, 75% purified water containing 15 mM of ortho-phosphoric acid and 0 ml of triethylamine. The column was a Zorbax XBD 3,0 mm*150 mm; 4,6 µm. The settings used were an analysis time of the method was 10 minutes with a column-oven temperature of 20 degrees Celsius. The injection volume was 10 µl. The wavelength was 225 nm using a DAD-detector and a flow rate of 0,500 ml/min.

.

3. LIJST MET AFKORTINGEN

ACN	Acetonitril
BF	Bisoprolol Fumaraat
DoE	Design of Experiments
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KC	Kleurcode
Mk	Maatkolf
OFAT	One factor at a time
OFZ	Ortho-fosforzuur
Pip	Pipet
PVDF	polyvinylidene fluoride
TEA	Triethylamine
T1	Oplossing 1 ml triethylamine
T4	Oplossing 4 ml triethylamine
TVC	Tabletverdunnings- coëfficiënt
Vpip	Volume pipet
Vmk	Volume maatkolf
WWPTFE	Water wettable polytetrafluorethylene



4. INHOUDSOPGAVE

1. Voorwoord.....	1
2. Samenvatting/abstract.....	2
2.1 Samenvatting	2
2.2 Abstract.....	3
3. Lijst met afkortingen	4
4. Inhoudsopgave.....	5
5. Inleiding.....	7
6. Experimenteel	11
6.1 Methode-optimalisatie	12
6.2 Apparaatinstellingen (validatie assay).....	20
6.3 Lineariteit.....	20
6.4 Accuracy	21
6.5 Precisie assay	22
6.8 Houdbaarheid oplossingen	25
7 Resultaten en discussie	26
7.1 Methode-optimalisatie	26
7.2 Robuustheid	36
7.3 Lineariteit.....	39
7.4 Accuracy assay	44
7.5 Herhaalbaarheid assay	45
7.6 filtertest assay	52
7.7 Houdbaarheid.....	54
8 Conclusies en aanbevelingen voor vervolgonderzoek 2x.....	56
9. Referenties.....	58
10.Bijlagen	60
A Methode-optimalisatie	60
B Chromabond TEA.....	62
C ruwe data linearitet Assay	64
C1: Regressie-analyse Gehalte standaarden oplopend gemeten.....	65
Bijlage C2: Regressie-analyse gehalte standaarden aflopend gemeten.....	66
Bijlage C3: regressie-analyse gemiddelde assay	67

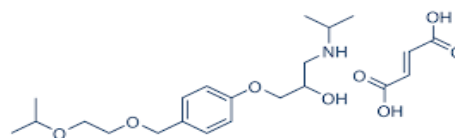
Bijlage C4: storingen regressie-analyses assay oplopende en aflopende concentraties gemeten.....	68
Bijlage C5 (vervolg): storingen regressie-analyses assay gemiddelde.....	68
C6 Chromatogrammen	69
D: Ruwe data accuracy	75
D1 Chromatogrammen	75
E Ruwe data Herhaalbaarheid 1,25 mg	79
E1 Chromatogrammen.....	80
F Ruwe data Herhaalbaarheid 2,50 en 3,75 mg.....	83
F1 Herhaalbaarheid 2,50 5 ^e opwerking herhaald	83
F2 Chromatogrammen.....	84
G Ruwe data Herhaalbaarheid 5,00 en 7,50 mg	89
G1 Chromatogrammen	90
H Ruwe data Herhaalbaarheid 10 mg.....	95
H1 Chromatogrammen	96
I Filtertesten.....	99
J Voorbeeldberekeningen.....	103
J1 gehalte	103
J2 Berekening O-fosforzuur	105

5. INLEIDING

Een hoge bloeddruk (hypertensie) verhoogt de kans op hart- en vaatziekten¹. Dit is gedeeltelijk een gevolg van ongezonde leefgewoontes als overmatig vet en zout eten, weinig lichaamsbeweging, en roken¹. In de aders kunnen stoffen als cholesterol en calcium neerslaan tegen de aderwand, dat plaques worden genoemd².

Plaques vernauwen aders, waardoor de bloeddruk hoger wordt³. Hierdoor kan pijn op de borst (angina pectoris)

ontstaan,⁴ maar plaques kunnen ook resulteren in een hartinfarct wanneer de plaques in de coronair arteriën zitten en daarmee zuurstoftoevoer naar het hart blokkeren. Daarnaast zorgt een verhoogde bloeddruk ervoor dat het hart harder moet werken dan bij een normale bloeddruk. Kortom, een hoge bloeddruk is een belangrijk klinisch probleem.



Figuur 1: structuurformule bisoprolol fumaraat

Eén van de manieren om hoge bloeddruk te behandelen is met behulp van bètablokkers. Wanneer deze bètablokkers worden toegediend, worden minder signalen naar het hart verstuurd waardoor het minder arbeid hoeft verricht te worden, en dus de pijn verlicht⁵, en uiteindelijk verlaagt dit de kans op hart- en vaatziekten. Er zijn verschillende bètablokkers, waaronder: Metoprolol en propranolol. Door een breed assortiment van bètablokkers te produceren kunnen er zoveel mogelijk patiënten geholpen worden. Een ander voorbeeld van een bètablokker is (RS)-1-[4-[[2-(1-Methylethoxy) ethoxy] methyl] phenoxy]-3-[(1 methyl ethyl) amino] propan-2-ol. Ook wel bekend als Bisoprolol.

Bisoprolol komt voor in de vorm van (Bisoprolol fumaraat (BF)) (Figuur 1). Het is oplosbaar in water, chloroform, methanol en ethanol. Dit maakt het ook geschikt om onder andere met HPLC te analyseren. Bisoprolol is vooral bruikbaar voor mensen met een chronische hartaandoening⁶.

Pharmdos is de opdrachtgever die BF op de Nederlandse markt wil brengen, komend uit een fabriek in India (Medreich). Om deze medicijnen op de markt te brengen moeten deze gekeurd en getest worden volgens Europese wetgeving. Binnen Europa zijn deze eisen te vinden in de European Pharmacopoea (EP). Innogenerics wordt ingeschakeld om het product goed te keuren zodat het in Europa op de markt gebracht kan worden. Daarom moet er onder andere een analysemethode ontwikkeld en gevalideerd worden welke de hoeveelheid BF exact kan bepalen. De bisoprololtabletten van Medreich komen voor in zes sterktes van 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 7,50 en 10 mg Bisoprolol Fumaraat.

Bij de productie en verkoop van farmaceutische middelen worden strenge eisen gesteld. Bij de productie van in dit geval bisoprololtabletten ontstaan verschillende bijproducten (related substances/impurities), welke ook in de EP beschreven zijn. Deze producten kunnen ook ontstaan bij degradatie van Bisoprolol, i.e. bij langere opslag. Onzuiverheden kunnen bij kleine hoeveelheden al een drastisch effect hebben op de veiligheid van een medicijn⁷.

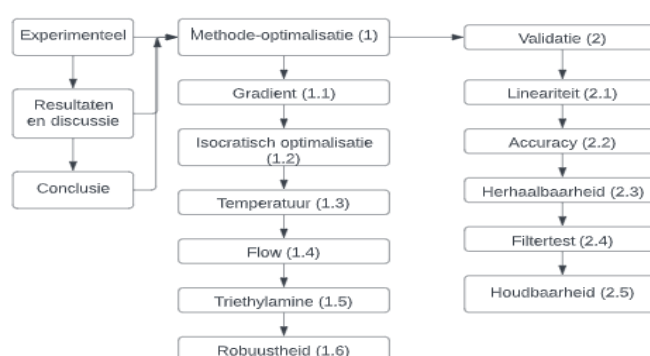
In deze studie wordt related substances buiten beschouwing gelaten. Om de juiste analysetechniek te bepalen moet er gekeken worden naar verschillende factoren. Door middel

van een goede literatuurstudie werd de juiste analysetechniek bepaald voor dit specifieke doel (bepaling van Bisoprolol). Bisoprolol is een organisch molecuul. Het komt voor in de vorm van Bisoprolol fumarate (BF) (figuur 1). Het molecuul is UV-actief, wat inhoudt dat het UV (Ultraviolet)-licht kan absorberen. Een grotere hoeveelheid bisoprolol betekent dat er meer UV-licht geabsorbeerd wordt. Hiermee is dus een verband gebracht tussen de concentratie en de absorptie van Bisoprolol; dit wordt ook wel de wet van Lambert-Beer genoemd⁸.

Er zijn meerdere mogelijkheden om een Bisoprolol-gehalte te bepalen. Enkele voorbeelden zijn: HPLC (High Performance Liquid Chromatography), HPTLC (High performance thinlayer liquid chromatography), LC-MS (liquid chromatography mass spectroscopy) en CE (capillary electrophoresis). De voorkeur gaat uit naar LC-MS. Het voordeel van LC MS is dat er fragmentatiepatronen herkend kunnen worden. Er moet hierbij rekening gehouden worden dat het molecuul-ion $M+1$ tot $M+3$ kan zijn (vanwege de protonering van het aanwezige zuur in het eluens⁷). In de farmacie wordt LC-MS niet heel vaak gebruikt, omdat de concentraties die in de farmaceutische industrie hoger zijn dan bij MS van toepassing is. Bij CE is er het voordeel dat er meer piekcapaciteit is. De nadelen van CE zijn, dat er minder mobiele fases geïmplementeerd kunnen worden en er beperkingen zijn vanwege capillair-dikte. Bij HPLC is er meer kolomkeuze⁹.

De keuze voor LC-UV is gemaakt, omdat deze beschikbaar is op het laboratorium. LC-MS is niet beschikbaar. In het dossier van het bedrijf staat HPLC-UV. Vanwege GMP-regelgeving kan daar niet te veel van worden afgeweken. Innogenics is een bedrijf dat werkt onder GMP (Good Manufacturing Practice)¹⁰ en GLP (Good Laboratory Practice)¹¹. Dit zijn normeringen en regels die worden opgelegd, zodat alles gecontroleerd/traceerbaar is. Men zou het een standaard norm kunnen noemen. Een onderdeel van GMP is dat er volgens een dossier gewerkt moet worden en Innogenics mag niet afwijken van het dossier. Dit betekent dat alle condities, kolommen etc. van tevoren zijn gekozen en in het dossier zijn vastgelegd. Afwijken hiervan kan niet. Er kunnen wijzigingen doorgevoerd worden, maar dat kost tijd en geld.

Aan de hand van het flowdiagram (figuur 2) wordt het verslag op deze manier opgebouwd, voor experimenteel, resultaten/discussie en conclusie. Hierbij wordt eerst het proces van de optimalisatie behandeld en daaropvolgend de validatie.



Figuur 2: Flowdiagram opbouw verslag en gedane experimenten.

Vanwege recente omstandigheden is er echter meer ruimte om de methode te optimaliseren naar eigen wens/gebruik. Dus er zijn afwijkingen van het dossier gemaakt welke relevant zijn voor de inhoud van de scriptie/dit onderzoek, maar verder niet voor het bedrijf. De afwijkingen van het dossier zijn als volgt: er zijn twee kolommen vergeleken (Zorbax Eclipse

XBD en Chromobond C18). De methode is geoptimaliseerd wanneer er een snelle analysetijd is. Dit wordt gedefinieerd als een analysetijd van maximaal 30 minuten is. Als er grote hoeveelheden monsters geanalyseerd moeten worden kost dat veel tijd, geld en chemicaliën. Deze tijd moet efficiënt gebruikt worden om snel resultaat te leveren. Dit resulteert in snelle rapportage. Wat profijt heeft voor de klant en het bedrijf. Een ander criterium is: Bisoprolol moet goed gekwantificeerd worden. Dit betekent dat de andere chemische componenten geen invloed mogen hebben op de kwantificering van Bisoprolol. Hieronder valt, dat er voldoende resolutie moet zijn tussen Bisoprolol en de overige componenten. Om deze resolutie te bereiken worden verschillende eluens-samenstellingen met elkaar vergeleken om zo de resolutie te optimaliseren. Een resolutie van 1,5 of groter tussen bisoprolol of een andere piek is geschikt. Bij deze resolutie kan Bisoprolol goed geïntegreerd worden, wat zorgt voor een nauwkeuriger resultaat. Snelheid, efficiëntie en kwaliteit zijn dus de speerpunten voor deze optimalisatie. Om deze speerpunten volledig tot hun recht te laten komen moet de juiste eluens-samenstelling gevonden worden tussen polaire en apolaire oplosmiddelen. Dit zorgt in de combinatie met de kolom voor een scheiding waarbij voldoende resolutie is om te kwantificeren (lang genoeg in de kolom voor scheiding en dus kwantificeren), maar een niet al te hoge analysetijd heeft, omdat de resolutie te hoog (analiet te lang in de kolom) is. Het resultaat van een korte analysetijd is dus: meer monsters analyseren en dus sneller resultaat verkrijgen.

Verder worden ook verschillende flows en temperaturen met elkaar vergeleken. Een hogere flow zorgt voor een snellere analysetijd. Het nadeel is wanneer de flow te hoog wordt er onvoldoende scheiding/resolutie is tussen de componenten. Het kwantificeren is dan niet nauwkeurig. Door met verschillende temperaturen te experimenteren wordt een mengsel minder viskeus. Het gevolg is dat de pomp in de HPLC minder arbeid hoeft te verrichten en de kolom minder druk ervaart. Dit zorgt ervoor dat de kolom langer meegaat. Een andere factor voor de methode-optimalisatie is om verschillende hoeveelheden triethylamine (TEA) toe te voegen aan het eluens. Triethylamine wordt gebruikt om tailing te voorkomen bij amino-bevattende componenten. TEA reduceert dus de retentie, met als gevolg scherpere pieken. Er wordt bepaald of de hoeveelheid triethylamine verschilt in relatie tot de piekbreedte.

De robuustheid wordt bepaald. Dit wordt gedaan door een design of experiments toe te passen bij de Zorbax-kolom methode¹². Er wordt gekeken welke factoren de meeste invloed hebben op de bepaling van het piekoppervlak van Bisoprolol fumarate. Dit wordt gedaan met een full factorial design waarbij pH, flow en temperatuur met elkaar worden vergeleken. Hierbij wordt 10% afgeweken (omhoog en omlaag) van elke vastgestelde parameter. Van de resultaten die worden verkregen met DoE wordt een contourplot gemaakt waarbij de parameters die het meeste invloed hebben op het resultaat grafisch wordt weergegeven. Door deze grafische weergave kan bepaald worden welke vervolgstappen ondernomen kunnen worden om de methode verder te optimaliseren. Bij de Chromobond-methode wordt één parameter veranderd per keer door OFAT (one factor at a time) toe te passen¹³.

Verder moet de methode gevalideerd worden. De parameters waarop wordt gevalideerd zijn: lineariteit, accuracy, herhaalbaarheid, houdbaarheid en filtertest. De lineariteit wordt bepaald door verschillende kalibratiestandaarden te maken van BF en de absorptie te meten.

De lijn moet lineair zijn. De correlatiecoëfficiënt moet minimaal 0,9999 zijn. In het residu-plaatje moeten alle meetpunten willekeurig verdeeld zijn ten opzichte van de kalibratiereeks. Als laatste moet het snijpunt in de kalibratiereeks irrelevant zijn. De eis die er voor geldt is dat het snijpunt max 0,5% mag afwijken van de absorptie van het middelste kalibratiepunt (100% van de labelclaim).

Voor de accuracy wordt met placebo en spiken van BF-standaard de recovery-bepaald. De recovery moet tussen de 98 en 102% van de labelclaim zijn.

Voor de herhaalbaarheid worden de monsters in zesvoud opgewerkt en geanalyseerd. Het gevonden gehalte wordt vergeleken met de labelclaim (LC). De waarden moeten tussen de 95% en 100% zijn met een betrouwbaarheidsinterval van 95%.

De houdbaarheid van de oplossingen wordt bepaald door standaarden en een monster op te werken. In een periode van drie dagen worden deze monsters gemeten en vergeleken met de standaarden die op dezelfde dag zijn bereid. Het procentuele verschil tussen de oude en verse oplossing mag niet hoger zijn dan 0,5%.

Er wordt een filtertest toegepast door verschillende volumes opgewerkte monstervolumes door een PVDF (polyvinylidene fluoride)-filter te filtreren en vergeleken met een gecentrifugeerde monsteroplossing. Het procentuele verschil tussen het gecentrifugeerde monster en gefiltreerde monster mag niet boven de 0,5% zijn.

6. EXPERIMENTEEL

Op moment van schrijven van dit gedeelte is een groot deel van het onderzoek gedaan op basis van eisen die in het dossier beschreven staan. Hierdoor was het toentertijd niet mogelijk om af te wijken van het dossier. Waar mogelijk wordt in deze studie aangegeven wanneer wordt afgeweken van het dossier.

Voor de optimalisatie van de methode en de validatie worden verschillende chemicaliën gebruikt die in tabel 1 staan omschreven. Voor de bepaling van BF werd ook gebruik gemaakt van verschillende apparatuur (tabel 2).

Tabel 1: gebruikte chemicaliën voor methode-optimalisatie en validatie

Chemicaliën	CAS-nummer	Fabrikant	Zuiverheid (%)
Bisoprolol fumaraat	104344-23-2		99,88
Ortho-fosforzuur	7664-38-2	VWR Chemicals	85% ρ 1,96 kg/l
Di-ammoniumwaterstoffosfaat	7783-28-0	VWR Chemicals	99,0%
Natronloog	-	-	10 mol/l
Acetonitril	75-05-8	Supelco	
ELGA-water		ELGA	15-18,2 M Ω /cm
Demiwater		-	-
Triethylamine	121-44-8	Supelco	99,5
Buffer pH 2,00 Citroenzuur/NaOH/HCl		Supelco	
Buffer pH 4,00 Citroenzuur/NaOH/HCl		Supelco	
Buffer pH 7,00 Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄		Supelco	
Buffer pH 9,00 Boorzuur/KCl/NaOH		Supelco	

Tabel 2: Apparatuur

Apparaat	Onderdeel	Merk en type
HPLC	Degasser	Thermo Scientific/ Dionex Ultimate 3000
	Pomp	
	Column compartiment (oven)	
	DAD-detector	
	Autosampler	
Analytische balans		Metler Toledo XPE 205 + Sartorius
Bovenweger		Sartorius
Microbalans		Sartorius
pH-meter + elektrode		780 pH-meter Metrohm
Ultrasoonbad		Elmasonic S300H
Centrifuge		Beckman Coulter
ELGA purelab ultra		ELGA
PVDF-filters		
WWPTFE-filters		

Voor de integratie van de chromatogrammen en berekende piekoppervlakten werd gebruik gemaakt van Chromeleon V7.

6.1 METHODE-OPTIMALISATIE

Om de methode te optimaliseren werden de volgende onderzoeken gedaan:

- Vergelijking van kolommen
- Gradiënt + eluenssamenstellingen
- Injectievolumes
- Vergelijken hoeveelheden triethylamine (TEA)
- Robuustheid

Om de methode die in het Innogenerics-dossier beschreven staat te optimaliseren werd deze vergeleken met een andere methode volgens tabel 3.

Tabel 3: Overzicht verschillende methoden

Kolom	Eluens	Temperatuur (°C)	Flow (ml/min)	λ (nm)	injectie volume	Analyse tijd (min)
RP Zorbax XDB Eclipse C ₁₈ *4,6 mm*150 mm, 4,6 μ m ¹⁴	15 mM Ortho-fosforzuur, in 75% water en 25% acetonitril ¹⁴	20 ¹⁴	1,00 ¹⁴	226 ¹⁴	20 ¹⁴	15 ¹⁴
Chromo-bond Prontosil C ₁₈ 4,6 mm*250 mm, 4,6 μ m ¹⁵	75% ortho-fosforzuur Buffer + Di-ammoniumwaterstoffosfaat (pH 5,60), 25% Acetonitril, 2 ml triethylamine/L ¹⁵	35 ¹⁵	1,00 ¹⁵	225 ¹⁵	10 ¹⁵	15 ¹⁵

*De Zorbax-kolom van 4,6 mm was niet beschikbaar op het bedrijf. Dus er werd een kolom gekozen met een i.d. van 3,00 mm. Het gevolg is dat het injectievolume in de loop van de tijd aangepast kan/moest worden, om overbelading op de kolom te voorkomen.

6.1.2 BEREIDING OPLOSSINGEN

Zorbax-methode eluens

Er werd in een 1L fles 250 ml acetonitril gedaan, waarbij 750 ml ELGA-water is toegevoegd. Hierbij werd 1 ml Ortho-fosforzuur (OFZ) toegevoegd en 2 ml triethylamine. Er werd 85% ortho-fosforzuur druppelsgewijs toegevoegd om het eluens te stellen op pH 3,00. Het eluens werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een WWPTFE (water wettable polytetrafluorethylene)-filter 0,45 μ m.

Chromobond-methode eluens

Voor de buffer werd in een 1 l fles 980 ml ELGA-water gedaan. Hierbij werd 6,6 g di-ammoniumwaterstoffosfaat toegevoegd. Vervolgens werd 2 ml triethylamine toegevoegd, waarbij met Ortho-fosforzuur 85% de pH gesteld op pH 5,60 $\pm$ 0,02.

Het eluens werd bereid door in 1 l fles 250 ml acetonitril en 750 ml buffer toe te voegen. Het eluens werd gefiltreerd door een WWPTFE-filter 0,45 μ m.

Standaarden

De standaardoplossingen werden bereid door in duplo 50 mg standaard in te wegen en over te brengen in een maatkolf van 50 ml. Er werd 30 ml eluens (Chromobond-methode) toegevoegd en voor 5 minuten geultrasoneerd om op te lossen. Er werd aangevuld met eluens en gehomogeniseerd. Vervolgens werd 5 ml van de bereide oplossing gepipetteerd, overgebracht in een 100 ml maatkolf en aangevuld met eluens. Dit geeft een standaardoplossing met een eindconcentratie van 5 mg/100 ml. Tenslotte werd 12 ml van de oplossing in een centrifugebuis gedaan van 15 ml en gecentrifugeerd voor 10 minuten op 3500 rpm voorafgaand aan analyse⁹. Voor de standaarden werd een correctiefactor gebruikt van 0,9988. Deze factor werd gebruikt om te corrigeren op de zuiverheid van BF (99,88%). De concentratie van de standaarden werden berekend volgens vergelijking 1.

$$C_{\text{standaard}} = a * \frac{0,9988}{10} * \frac{5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \quad 1)$$

Hierin is

a = inweeg monster (mg)

10 = omrekeningsfactor om de concentratie te berekenen in mg/100 ml.

6.1.3 GRADIËNT

Zorbax

Om de methode te optimaliseren, werd een scouting-gradiënt opgesteld. Dit werd gedaan door als eluens A (95% water:5% ACN) en eluens B (95% ACN:5% water) te gebruiken. Voor eluens A werd in 1 L fles 950 ml ELGA-water gedaan, waaraan 50 ml acetonitril is toegevoegd. Hieraan werd 1,0 ml 85% Ortho-fosforzuur (15 mM). Deze oplossing werd op pH gebracht tot 3,00 door druppelsgewijs 10 M NaOH toe te voegen. Dit werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een 0,45 µm WWPTFE-filter.

Voor eluens B werd in 1 L fles 50 ml ELGA-water gedaan, waarbij 950 ml acetonitril is toegevoegd. Hieraan werd 1,0 ml 85% orthofosforzuur toegevoegd. De concentratie van het fosforzuur in het eluens was 15 mM. Dit werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een 0,45 µm WWPTFE-filter.

Chromobond

Voor de chromobond werd als eerst een buffer bereid door 6,6 g di-ammoniumwaterstoffsosfaat in te wegen en over te brengen in een fles van 1,00 l. Met een maatcilinder werd 980 ml ELGA-water toegevoegd met 2 ml triethylamine. De oplossing werd op pH gebracht tot $5,60 \pm 0,02$ door 85% orthofosforzuur toe te voegen. Voor eluens A werd met een maatcilinder 50 ml acetonitril in 1L fles gedaan. Hier werd 950 ml bufferoplossing aan toegevoegd. De oplossing werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een $0,45 \mu\text{m}$ WWPTFE-filter.

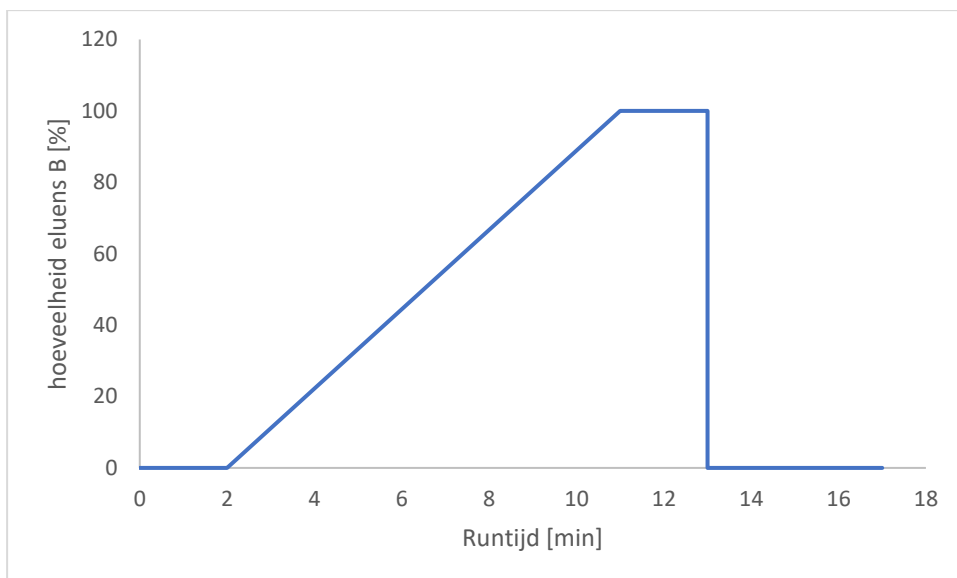
Voor eluens A werd met een maatcilinder 50 ml acetonitril in 1 l fles gedaan. Hier werd 950 ml bufferoplossing aan toegevoegd. De oplossing werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een $0,45 \mu\text{m}$ WWPTFE-filter.

Voor eluens B werd met een maatcilinder 450 ml acetonitril in 1 l fles gedaan. Hier werd 550 ml bufferoplossing aan toegevoegd. De oplossing werd gehomogeniseerd en gefiltreerd door een $0,45 \mu\text{m}$ WWPTFE-filter.

De instellingen voor de HPLC-analyse zijn beschreven in tabel 4. Het gradiënt werd uitgevoerd volgens figuur 3.

Tabel 4: Instellingen gradiënt elutiemethode Zorbax kolom

Parameter	Waarde (Zorbax) ¹³	Waarde (Chromobond) ¹⁴
Flow (ml/min)	1,00	1,00
Kolomtemperatuur (°C)	20	35
Injectievolume (µl)	20	20
Golfenlgte (nm) ch1/ch2	225/226	226
Analysetijd (min)	15	15
Percentage eluens A	95% water/5% ACN met 15 mM OFZ pH 3,00	95% buffer pH 5,60/5% ACN met
Percentage eluens B	95% ACN/5% water met 15 mM OFZ pH 3,00	45% ACN/ 55% buffer pH 5,60



Figuur 3: Gradiënt-elutie Zorbax methode en Chromobond-methode, waarbij eluens A 95% water:5% ACN is en Eluens B 95% ACN:5% water

Vervolgens werd er isocratisch gemeten op basis van deze eluens-samenstellingen (tabel 5 Zorbax-kolom en tabel 6 Chromobond-kolom).

Tabel 5: Gemeten eluens-samenstellingen isocratisch Zorbax

% B	Gecorrigeerde eluens-samenstelling (Zorbax)
10	14% ACN: 86% buffer
20	23% ACN: 77% buffer
30	32% ACN: 68% buffer
40	41% ACN: 59% buffer
50	50% ACN: 50% buffer

Tabel 6: gecorrigeerde eluenssamenstellingen chromobond

% B	Gecorrigeerde eluenssamenstellingen (Chromobond)
10	9% ACN: 91% buffer
20	13% ACN: 87% buffer
40	21% ACN 79% buffer
50	25% ACN: 75% buffer
60	29% ACN: 71% buffer
80	37% ACN: 63% buffer
100	45% ACN: 55% buffer

Op basis van deze eluens samenstellingen werd er gekozen om 23% ACN:77% H₂O te gebruiken met de Zorbax-methode. Daar van uit werd verder geoptimaliseerd met temperatuur en flow (tabel 7). Vanuit dat uitgangspunt werd een “ideale methode” bepaald.

Tabel 7: Optimalisatie temperaturen/flow

Flow (ml/min)	Temperatuur (°C)
1,00	20
1,00	25
0,500	20
0,800	20
0,500	25
1,00	30
1,00	35
1,00	40

6.1.4 TRIETHYLAMINE

De bereiding van het eluens komt overeen met de bereiding van 6.1.3 Er werden twee flessen bereid met 1 ml triethylamine (oplossing T1) en 4 ml triethylamine (oplossing T4). Op basis hiervan werden deze oplossingen in de volgende verhoudingen gemengd (tabel 8).

Tabel 8: Bereiding oplossing TEA-experimenten

V TEA	% Oplossing T1	% Oplossing T4
1	100	0
2	67,7	32,3
3	32,3	67,7
4	0	100

6.1.4 ROBUUSTHEID

Zorbax

Om de robuustheid te bepalen werd een design of experiments (DoE) opgezet. Hiervan werd uitgegaan van de volgende methode (resultaten methode-optimalisatie/tabel 9). Op basis van deze parameters werd 10% afgeweken per parameter (tabel 10). Toen werd er een full factorial design opgesteld (in Minitab) om de robuustheid te bepalen (tabel 11). Dit is ook de volgorde waarbij de experimenten zijn uitgevoerd. Voor de verwerking van de resultaten werd Minitab gebruikt.

Tabel 9: Uitgangspunt geoptimaliseerde methode

Parameter	Waarde
Flow (ml/min)	0.500
Kolomtemperatuur (°C)	20
pH	3,00

Tabel 10: Factoren full factorial design robuustheid Zorbax-Kolom

Parameter	Laag (-)	Waarde (0)	Hoog (+)
Flow (ml/min)	0.450	0.500	0.550
Kolomtemperatuur (°C)	15	20	25
pH	2.70	3,00	3,30

Tabel 11: full factorial design robuustheid Zorbax kolom

Temperatuur (°C)	Flow (ml/min)	pH
15	0.450	2.70
15	0.550	2.70
15	0.450	3.30
15	0.550	3.30
25	0.550	3.30
25	0.550	2.70
25	0.450	2.70
25	0.450	3.30

Er werden 3 blanco's geïnjecteerd om het systeem de tijd te geven voor het herconditioneren voor de analyse. Daarna werden standaarden in duplo geïnjecteerd en twee monsters (1,25 mg tabletten) opgewerkt volgens §6.2.2.4. In duplo werd 5,00 mg standaard ingewogen en overgebracht in een 100 ml maatkolf, waarbij 70 mL eluens werd toegevoegd en voor 20 minuten geultrasoneerd, en vervolgens aangevuld tot de streep en gehomogeniseerd (tabel 12).

Tabel 12: Inwegen voor de bepaling van de robuustheid Zorbax kolom

	Standaard	Monster
Inweeg 1 (mg)	5.0280	877,42
Concentratie 1 (mg/100 ml)	5.0220	4,9792
Inweeg 2 (mg)	4.9270	884,76
Concentratie 2 (mg/100 ml)	4.9211	5,0208

Chromobond

Om de robuustheid te bepalen werden drie parameters veranderd ten opzichte van de reguliere methode (tabel 13). Bij verandering van elke parameter werd deze volgorde aangehouden voordat de monsters werden gemeten, om het HPLC-systeem tijd te geven om opnieuw te laten herconditioneren. Dit werd gedaan op de volgende wijze: twee keer een blanco injectie, een standaard in duplo, met afsluitend het monster in duplo. Deze stappen werden herhaald bij de verandering van elke parameter. Als monster werd gebruik gemaakt van 1,25 mg tabletten in duplo. Er werd hiervoor gekozen omdat deze eindconcentratie in het midden zat ten opzichte van de overige eindconcentraties op basis van de kalibratiereeks (zie alinea lineariteit).

Tabel 13: overzicht parameters bepaling robuustheid voor de assay

Parameterwijziging	(+)	0	(-)
Kolomtemperatuur T (°C)	30	35	40
Golflengte UV-detector (λ)	224	226	228
flow (μ in ml/min)	0,900	1000	1,100

Voor de robuustheid werden 1,25 mg tabletten (B20531) opgewerkt met standaarden (tabel 14).

Tabel 14: Inwegen standaarden en monster voor de bepaling van de robuustheid met chromobond-kolom

Monster	Inweeg (mg)	C (mg/100 ml)
Standaard 1	5,028	5,0220
Standaard 2	4,927	4,9211
B20531-1	877,42	4,9792
B20531-2	884,76	5,0208

6.2 APPARAATINSTELLINGEN (VALIDATIE ASSAY)

Als kolom voor de HPLC (merk en type) werd een Chromobond C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm gebruikt. Nadat de kolom werd voorgespoeld (zie bijlage x) werd 75% fosfaatbuffer pH 5,6 en 25% acetonitril als mobiele fase gebruikt (zie §2.1.1 bereiding eluens). Het gehalte/Assay is doormiddel van een socratische methode gemeten. De kolom-oven werd ingesteld op 35°C. De flow werd ingesteld op 1,0 ml/min. De UV-Detector werd ingesteld op een golflengte van 226 nm. Er werd 10 µl geïnjecteerd fabrikant/type autosampler. De analysetijd was 17 minuten. Tenzij anders aangegeven.

6.3 LINEARITEIT

Om de lineariteit van BF te bepalen werden kalibratiestandaarden gemaakt. Er werd 249,03 mg BF-standaard afgewogen en overgebracht in een maatkolf van 250 ml. Er werd 170 ml eluens toegevoegd en geultrasoneerd voor 5 min op kamertemperatuur. De oplossing werd aangevuld met eluens en gehomogeniseerd met zwenken. De concentratie van de stockoplossing was 100 mg/100 ml. Vanuit de stock-oplossing werden twaalf kalibratiestandaarden gemaakt volgens het verdunningsschema in tabel 15. De kalibratie-oplossingen werden twee keer gemeten. Eerst van lage concentratie naar hoge concentratie en vervolgens vice versa.

Tabel 15: Verdunningsschema voor de bepaling van de lineariteit assay BF op basis van stock-oplossing (100 mg/100 ml)

N	% BF*	C BF mg/100 ml	V pipet (ml)	V maatkolf (ml)
1	10	(0,5 mg/100 ml)	5 van 5,0 mg/100 ml	50
2	20	(1,0 mg/100 ml)	2	200
3	40	(2,0 mg/100 ml)	2	100
4	60	(3,0 mg/100 ml)	3	100
5	80	(4,0 mg/100 ml)	2	50
6	100	(5,0 mg/100 ml)	5	100
7	120	(6,0 mg/100 ml)	3	50
8	140	(7,0 mg/100 ml)	5 + 2	100

Tabel 15 (vervolg): Verdunningsschema voor de bepaling van de lineariteit assay BF op basis van stock-oplossing (100 mg/100 ml)

N	% BF*	C BF mg/100 ml	V pipet (ml)	V maatkolf (ml)
9	150	(7,5 mg/100 ml)	5 +2,5	100
10	160	(8,0 mg/100 ml)	4	50
11	180	(9,0 mg/100 ml)	9	100
12	200	(10 mg/100 ml)	5	50

* Als een percentage van 5 mg/100 ml BF (100%) (testoplossing).

De kalibratie-oplossingen werden twee keer gemeten. Van lage concentratie naar hoge concentratie en de tweede keer andersom.

6.4 ACCURACY

De accuracy van een analytische methode geeft aan hoe dicht een testresultaat dat door de methode is verkregen past bij de werkelijke waarde. Er werd een stockoplossing bereid (98,49 mg/100 ml). Er werd 98,61 mg BF ingewogen en overgebracht in een 100 mL maatkolf. Er werd 70 ml eluens toegevoegd en geultrasoniseerd voor 5 minuten om de BF op te lossen. Dit werd aangevuld en gehomogeniseerd met eluens. De accuracy werd bepaald door placebo (matrix minus analiet) in te wegen in een maatkolf. Hieraan werd een hoeveelheid BF-standaard stock toegevoegd (tabel 16) en aangevuld met eluens. Er werden spikemonsters bereid (50%, 100% en 150%). De hoeveelheden die werden gespiked zijn ten opzichte van de eindconcentratie BF verdunde testoplossing. De individuele recovery van elke gespiketete sample moet tussen de 98%-102% zijn. Om de slope te bepalen werden er standaarden gemeten (inwegen en concentratie tabel 17).

Tabel 16: Verdunningsschema accuracy assay waarbij het percentage gespiketete BF-standaard is weergegeven, hoeveelheid ingewogen placebo en aangevuld volume.

Tabletsterkte (mg)	% Gespiked	m placebo (mg)	V pip (ml)	V mk (ml)	C (mg/ 100 ml)
1,25	50	171,11	2,5	100	2,4623
	100	343,93	2,5	50	4,9246
	150	1027,1	2	20	7,3869
10	50	327,96	2	100	1,9698
	100	329,41	3	50	3,9397
	150	493,35	4	50	5,9095

Tabel 17: Inwegen standaarden voor bepaling slope (accuracy) 1,25 mg en 10 mg tabletten

Standaard	m (mg)	C (mg/100 ml)
1	49,68	4,9621
2	50,78	5,0719

6.5 PRECISIE ASSAY

Herhaalbaarheid

Bij herhaalbaarheid werd hetzelfde monster een aantal keer opgewerkt en gemeten in een korte tijd door dezelfde analist. Om dit doel te bereiken moesten er zogenoemde testoplossingen bereid worden. De testoplossingen werden als volgt bereid: Tien tabletten van elke tabletsterkte (tabel 18) werden in zesvoud afgewogen en opgewerkt en het gemiddeld tabletgewicht werd bepaald (tabel 19 en vergelijking 2, $n=10$). Dus van zes keer werden 10 tabletten wat 1,25 mg BF bevat, zes keer 10 tabletten wat 2,50 mg BF bevat etc.

Tabel 18: Overzicht van de batchnummers in relatie tot de verschillende tabletsterktes afkomstig van Medreich voor de bepaling van de herhaalbaarheid

Tabletsterkte BF (mg)	Tabletgewicht (mg)	Batchnummer
1,25	87	B20531
2,50	87	D10997
3,75	87	B11063
5,00	87	D01064
7,50	134	B10565
10,00	174	B01135A

Tabel 19: overzicht inweeg tabletten van verschillende sterkte BF in mg op basis van 10 tabletten voor elke opwerking voor de bepaling van de herhaalbaarheid

Tabletsterkte BF (mg)	Inweeg 1 (mg)	Inweeg 2 (mg)	Inweeg 3 (mg)	Inweeg 4 (mg)	Inweeg 5 (mg)	Inweeg 6 (mg)	$\bar{x}_w$ (mg)
1,25	876,30	872,50	873,40	875,20	872,20	870,6	87,34
2,5	875,05	872,20	876,18	876,65	877,20	876,54	87,56
3,75	887,94	892,31	894,43	895,97	896,33	895,6	89,38
5	880,07	880,01	881,07	887,20	881,95	883,77	88,23
7,5	1341,69	1344,49	1350,28	1348,85	1350,3	1347,31	134,72
10	1775,0	1770,6	1777,3	1772,1	1777,0	1775,0	177,45

$$\overline{m\bar{x}} = \frac{\sum m \text{ 10 tabletten per tabletsterkte (mg)}}{n} \quad 2)$$

Nadat de tabletten werden ingewogen, werden ze overgebracht in een 250 mL maatkolf. Er werd 170 mL eluens toegevoegd. Daarbij werd geultrasoneerd voor 20 min en tussentijds werd gezwenkt. De maatkolven werden aangevuld met eluens en gehomogeniseerd.

Van elke testoplossing werd 12 mL in een 15 mL centrifugebuis gedaan en voor 10 minuten gecentrifugeerd op 3500 rpm. Voor de 2,5 mg tabletten werden 30 ml centrifugebuizen gebruikt en 30 ml in de centrifugebuis gedaan.

Na centrifugering werd er verdund. Van elke tabletsterkte werd een andere verdunningsfactor gebruikt en krijgen de testoplossingen dus verschillende eindconcentraties. De verdunningen van elke tabletsterkte werd omgezet naar een TVC (tabletverdunningscoëfficiënt; vergelijking 3).

$$TVC = \frac{a*100*b}{c*d} \quad 3)$$

Hierin is:

a = tabletsterkte (mg)

b = pipetvolume verdunning (ml)

c = volume maatkolf testoplossing (250 ml)

d = maatkolf verdunning testoplossing (ml)

Voorbeeldberekening TVC van 2,50 mg tabletsterkte:

$$TVC (2,50 \text{ mg tablet}) = \frac{2,50 * 100 * 10}{250 * 20}$$

Met de TVC werd de theoretische concentratie bepaald (C in mg/100 ml) op basis van de labelclaim. Deze waarde was nodig om het gehalte in de tabletten van elke sterkte te bepalen. Een verdunningsschema met de TVC van elke tabletsterkte is weergegeven in tabel 20.

Tabel 20: Verdunningsschema voor de bepaling van bisoprolol fumarate in overeenkomst met 10 tabletten voor gehalte-bepaling, inclusief berekende TVC op basis van volume monsteroplossing (250 ml) en verdunning per tabletsterkte.

m tabletsterkte BF (mg)	V _{pip} verdunning (ml)	V _{mk} Verdunning (ml)	C (mg/100 ml)	TVC
1,25	n/a	n/a	5	0,5
2,5	10	20	5	0,5
3,75	10	20	7,5	0,75
5	5	20	5	0,5
7,5	5	25	6	0,6
10	5	50	4	0,4

n/a = geen verdunning toegepast. Als waarde werd 1 ingevoerd worden voor de berekening van de TVC (testverdunningscoëfficiënt).

Om het gehalte te bepalen werden verschillende standaarden bereid (tabel 21).

Tabel 21: Inwegen standaarden herhaalbaarheid

Tabletsterkte (mg)	m standaard (mg)	C standaard (mg/100 ml)
1,25	47,82	4,776
	48,12	4,806
2,5	47,45	4,739
	50,54	5,048
3,75	47,45	4,739
	50,54	5,048
5	49,50	4,944
	49,54	4,948
7,5	49,50	4,944
	49,54	4,948
10	50,82	5,076
	50,37	5,031

Filtertest

Om te bepalen of het efficiënter is om te centrifugeren of te filtreren werd een filtertest uitgevoerd met een PVDF-filter. Dit werd gedaan door voor de standaarden (tabel 22) en de eerste twee monsters van de herhaalbaarheid (zie tabel 19). Na opwerking werd elke oplossing apart in een bekersglas gedaan. Enkele ml werd verworpen voordat 15 ml voor het filter heen ging.

Tabel 22: inweeg BF-standaard voor filtertest

Standaard	m BF (mg)	C BF (mg/100 ml)
1	49,17	4,9111
2	49,61	4,9550

1.25 mg testoplossing filtertest

3 ml werd door het filter gebracht en verworpen. Er werd een vial (1) genomen en door het filter 1 mL in gedaan. 1 ml werd door hetzelfde filter gehaald en in een vial gedaan (2), wat resulteert in 4 ml verworpen vloeistof in totaal. Dit werd herhaald voor de volgende vial (3), zodat 5 ml vloeistof verworpen werd voor analyse.

10 mg testoplossing

Er werd 3 ml verworpen waarbij vervolgens 15 ml door het filter ging voordat er werd verdund volgens tabel 18. Dit werd herhaald, waarbij 4 ml en 5 ml verworpen.

6.8 HOUDBAARHEID OPLOSSINGEN

Om de stabiliteit van de oplossingen te bepalen werden monsters gemeten op t0, t24 uur, t44 uur en t72 uur. Vervolgens werden de piekoppervlaktes bepaald en met elkaar vergeleken. De monstervoorbewerking is gedaan volgens 6.1.3. Er werden standaarden en 5,00 mg tabletten (monster 1 en 2 van de herhaalbaarheid) in duplo opgewerkt en gemeten (tabel 23).

Tabel 23: Inwegen monster en standaarden met eindconcentratie om de houdbaarheid van de oplossingen te bepalen op kamertemperatuur.

	standaard	Monster
Inweeg 1 (mg)	49,50	880,1
Concentratie 1 (mg/100 ml)	4,9441	4.9871
Inweeg 2 (mg)	49,54	880,1
Concentratie 2 (mg/100 ml)	4,9481	4,9868

7.1 METHODE-OPTIMALISATIE

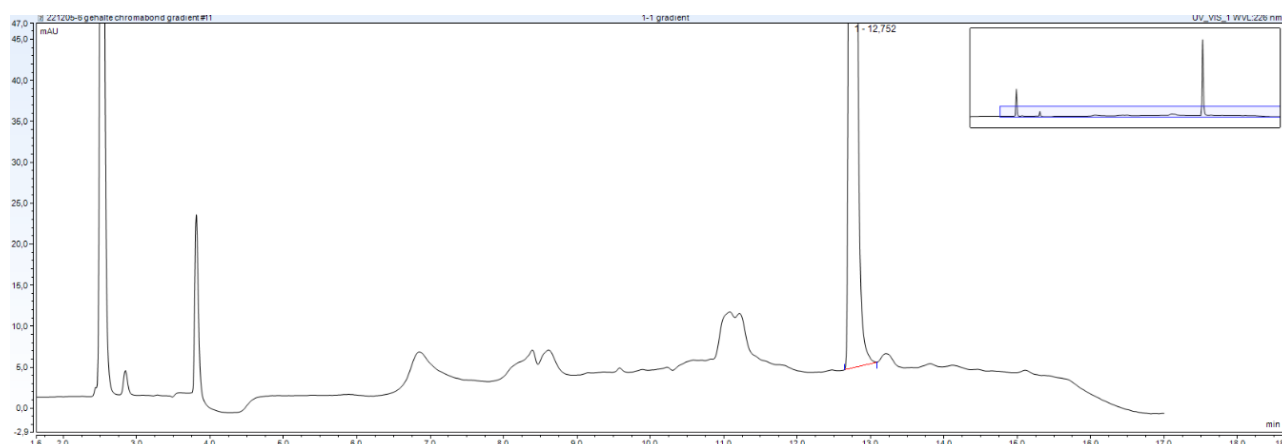
Bij de methode optimalisatie werden naar verschillende zaken gekeken:

- Gradiënt
- Isocratisch
- Temperatuur
- Flow
- Hoeveelheden triethylamine

7.1.1 GRADIENT

Er werd een gradiënt-elutie toegepast voor beiden kolommen (Chromobond figuur 4 en Zorbax; figuur 5).

Chromobond



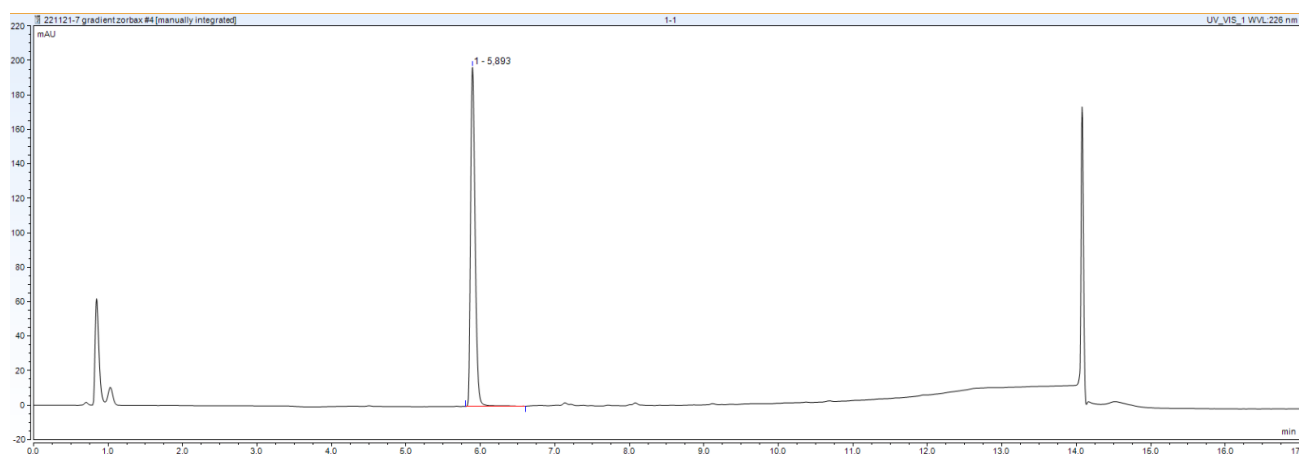
Figuur 4: Gradiënt chromobond-methode waarbij runtijd van 17 min is, temperatuur op 35 graden met een flow van 1,0 ml/min, injectievolume 10 ul. Fumaarzuur op 2,5 min; Ghostpieken op 4 min, 7 min, 8 min en 11 min. Bisoprololpiek op 12 min. Pieken worden weergegeven als functie van absorptie.

Op basis van de resultaten in figuur 4 is te zien dat er een piek is bij 2,5 minuut. Dit is de piek van fumaarzuur. Met DAD is te zien dat er een absorptie is bij 208 nm. Dit is een aanvullende bevestiging dat het fumaarzuur is. Een aanbeveling is om een spike-monster te maken waarbij extra fumaarzuur wordt toegevoegd. Wanneer er een hoger piekoppervlak is in vergelijking met het oorspronkelijke monster, is het nog een bevestiging dat het fumaarzuur is. De piek bij 12,7 min is de bisoprolol-piek. Met DAD is een absorptie bij 225 nm gevonden. Dit bevestigt ook deze bevinding. De overige pieken zijn gevolgen van baseline-drift. De hoeveelheid acetonitril neemt toe tijdens de run. Dit betekent ook dat er een sterker eluens nodig is om de elutie van bisoprolol te versnellen. Het gevolg is dat de analysetijd korter is. De overige pieken zijn toe te schrijven aan het feit, dat er meer organisch oplosmiddel in het systeem

aanwezig is. Dit zorgt ervoor dat de absorptie toeneemt en meer pieken zichtbaar zijn (baseline-drift). Ook wordt er gemeten op 226 nm, dit heeft als effect dat er pieken zichtbaar zijn wanneer het percentage ACN groter is.

Zorbax

In figuur 5 wordt het gradiënt weergegeven met de Zorbax-kolom waarbij tot 50% eluens B (95% water:5% ACN) wordt gebruikt.



Figuur 5: Gradiënt elutie van monster 1,25 mg tablet. met behulp van de Zorbax-methode waarbij runtijd van 17 min is, temperatuur op 20 graden met een flow van 1,0 ml/min, injectievolume 10 ul. Fumaarzuur op 1 min; Bisoprolol op 5,8 min en . Pieken worden weergegeven als functie van absorptie.

In figuur 5 werden fumaraat en bisoprolol geëluëerd tussen 0%-100% eluens B (95% ACN/5% water + 13 mM fosforzuur pH 3,00) bij een runtijd van 17 min. Er werden twee pieken geëluëerd. De eerste piek (1 min) was fumaarzuur en de andere piek (6 min) was bisoprolol. Met behulp van DAD (diode array detector) was te zien dat de piek bij één minuut fumaarzuur was. Deze piek had maximale absorptie bij een golflengte van 208 nm. Dit was ook te zien in de literatuur, waarbij fumaarzuur (vertoont absorptie bij 208 nm)¹⁶ ook wordt geabsorbeerd bij 208 nm. Een andere manier waarop men aan kan tonen of fumaarzuur aanwezig is, is door het sample te spiken met fumaarzuur. Hierdoor wordt het piekoppervlak van fumaarzuur groter, omdat de concentratie ook hoger is^{16, 17}. Bisoprolol was de 2^e piek bij 6,0 min. De absorptie was maximaal bij een golflengte van 225 nm¹³. De log K_{ow} van fumaarzuur is 0,46¹⁴. De log K_{ow} van Bisoprolol is 2,2¹⁸. Een hogere K_{ow} betekent dat het analiet meer affiniteit vertoont met (de stationaire) een organische fase¹⁹. Dit betekent dat een component met een hoge K_{ow} meer retentie vertoont met de kolom¹⁹. Het gevolg is dat de retentietijd bij Bisoprolol langer is in vergelijking met fumaarzuur.

Om te bepalen of er gradiënt gemeten moest worden of isocratisch werd Δt (verschil tussen eerste en laatste eluerende piek)/tG (totale analysetijd) bepaald.

$$5,893 - 1 = 4,893 \text{ min}$$

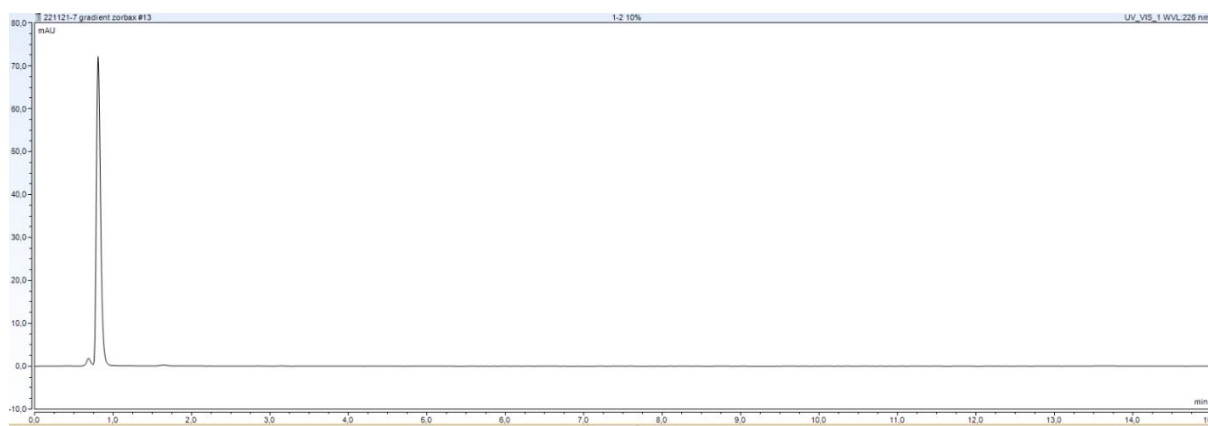
$$4,893/17 = 0,288$$

Op basis van het chromatogram waarbij 10% ACN werd gebruikt is alleen de piek van fumaarzuur te zien. Dit betekent dat bisoprolol te veel retentie had met de kolom, waardoor het te lang duurde voordat deze werd geëluëerd. Dit is ook te zien in de opkomende blanco, waarbij 20% eluens B werd gebruikt. Dit deel van de piek werd pas gedetecteerd terwijl het systeem werd doorgespoeld. Er werd vervolgens 20% eluens B toegepast. In het chromatogram is te zien dat er een piek ontstaat bij 14 min. Dit valt toe te schrijven aan het effect van baseline-drifting. Hierdoor werd het percentage acetonitril kleiner. Het gevolg is dat er minder UV licht wordt geabsorbeerd. Dit effect is ook zichtbaar in het chromatogram.

7.1.2 ISOCRATISCH OPTIMALISATIE

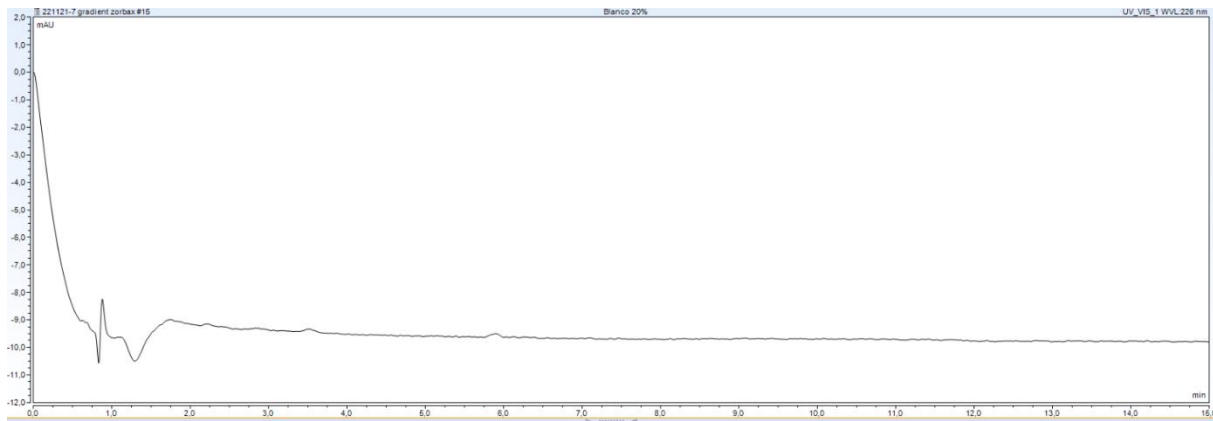
Voor de resultaten van de isocratische optimalisatie werden in stappen van 10% eluens B toename geoptimaliseerd. 1^e run 10% Eluens B, 2^e run 20% B etc. Hierbij werden twee blanco's geïnjecteerd voor een volgende sample werd geanalyseerd om het systeem schoon te spoelen en te herconditioneren. Alle analyses hadden een runtijd van 17 min.

Chromobond



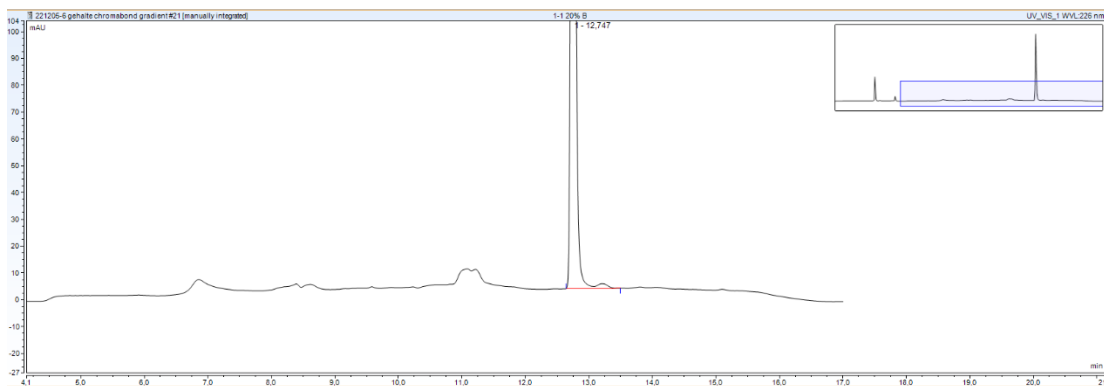
Figuur 6: injectie monster 1,25 mg tablet. 10% Eluens B Chromobond bij 25 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 µl geïnjecteerd. Fumaarzuurpiek bij 1 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

In het chromatogram (figuur 6) waarbij 10% ACN werd gebruikt is alleen de piek van fumaarzuur te zien. Dit betekent dat bisoprolol te veel retentie had met de kolom, waardoor het te lang duurde voordat deze werd geëluëerd. Dit is ook te zien aan het begin van de opkomende blanco, waarbij 20% eluens B werd gebruikt. Dit deel van de piek werd pas gedetecteerd terwijl het systeem werd doorgespoeld en was niet zichtbaar in het chromatogram (figuur 5). Er werd vervolgens 20% eluens B toegepast.



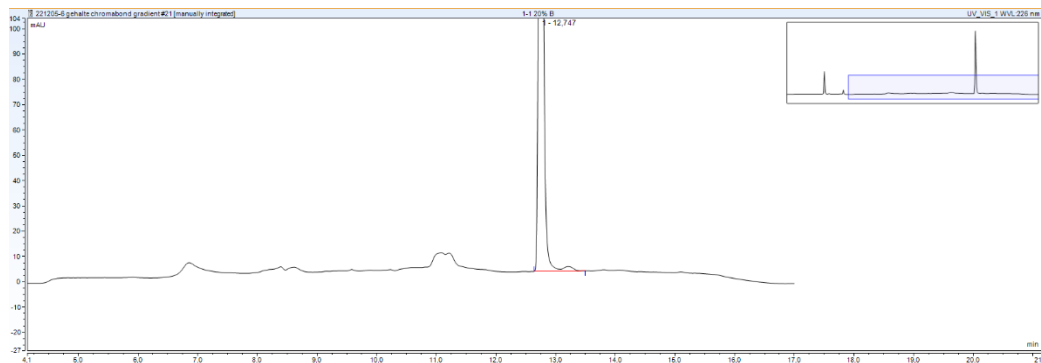
Figuur 7: blanco injectie imonster 1,25 mg tablet. 20% Eluens B Chromobond bij 25 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. Bisoprololpiek bij 0-1,5 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

In dit chromatogram (figuur 7) is te zien dat een deel van bisoprolol is geëluëerd vanaf 0 tot 1,5 minuut. In dat gedeelte van het chromatogram is de zien dat een deel van bisoprolol nog wordt geëluëerd. Dit bevestigt dat 10% B onvoldoende is om bisoprolol te elueren. Analysetijd verlengen is een optie, maar levert een langere analysetijd op wat overbodig is. Het is dan beter om meer organisch oplosmiddel toe te voegen zodat bisoprolol minder retentie vertoont met de kolom.



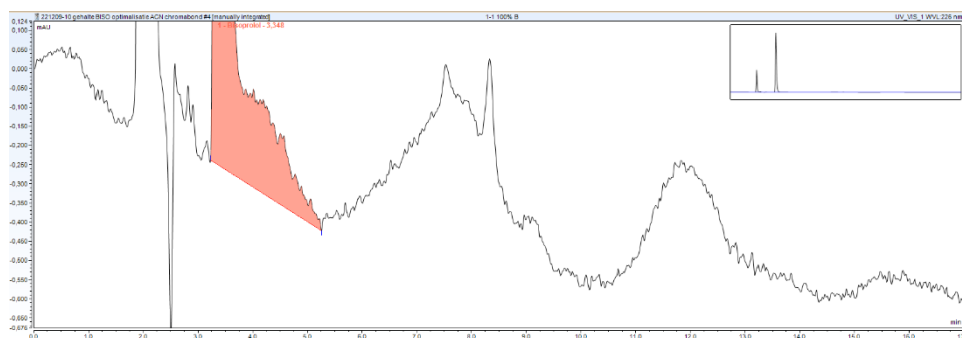
Figuur 8: injectie monster 1,25 mg tablet. 20% Eluens B Chromobond bij 25 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. bisoprololpiek bij 12,7 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Er zijn twee pieken zichtbaar in het chromatogram (figuur 8). Bij 3 min (fumaarzuur) en Bisoprolol bij 12 minuten. Er is veel lege ruimte in het chromatogram. Dit betekent dat er meer organisch oplosmiddel gebruikt moet worden.



Figuur 9: injectie monster 1,25 mg tablet. 40% Eluens B Chromobond bij 25 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. bisoprololpiek bij 12,7 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

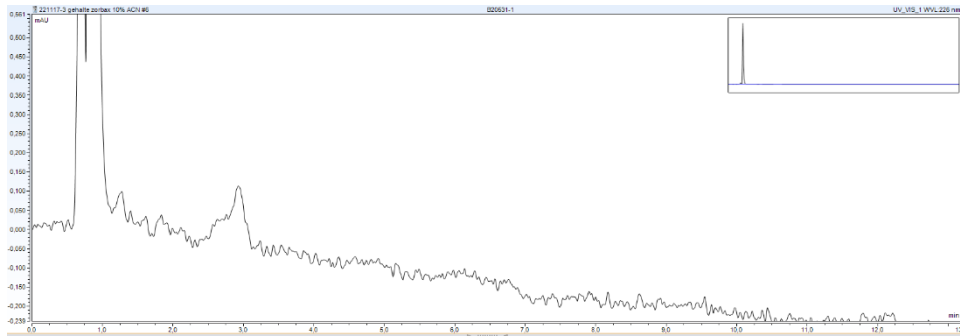
In figuur 9 is een piek bij 12 minuten (fumaarzuur). De tweede piek is bisoprolol. Verder zijn er kleinere pieken te zien. Dit kan toegeschreven worden aan het effect van baseline-drifting.



Figuur 10: injectie monster 1,25 mg tablet. 80% Eluens B Chromobond bij 25 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. bisoprololpiek bij 12,7 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Fumaarzuur elueert bij 1,00 min zoals te zien is in figuur 10. Bisoprolol bij 3,5 min. Er is voldoende resolutie tussen de pieken. Verder zijn er kleinere pieken te zien. Dit is toe te schrijven aan ruis van het signaal. Er is te ver ingezoomd op dit chromatogram, om de piek goed te integreren.

Zorbax



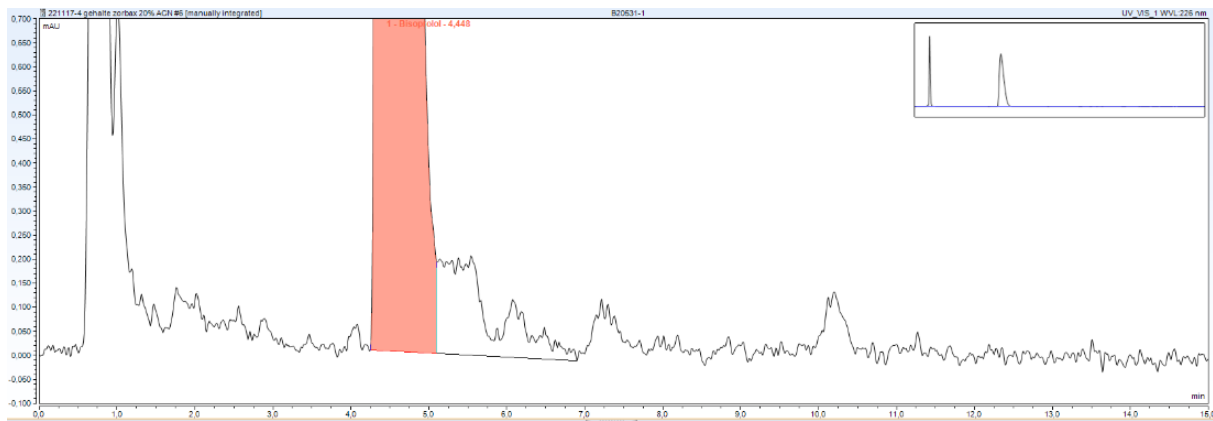
Figuur 11: injectie monster 1,25 mg tablet. 10% Eluens B Zorbax-kolom bij 20 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. fumaarzuurpiek bij 1 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Op het chromatogram (figuur 11) is alleen de piek van fumaarzuur te zien bij 1 min. Dit betekent dat het analiet in de kolom zit. Wanneer 10% eluens B wordt gebruikt moet de analysetijd verlengd worden voordat bisoprolol wordt geëluëerd. Er moet een hoger percentage ACN toegevoegd worden om de retentietijden/resolutie kleiner te maken.



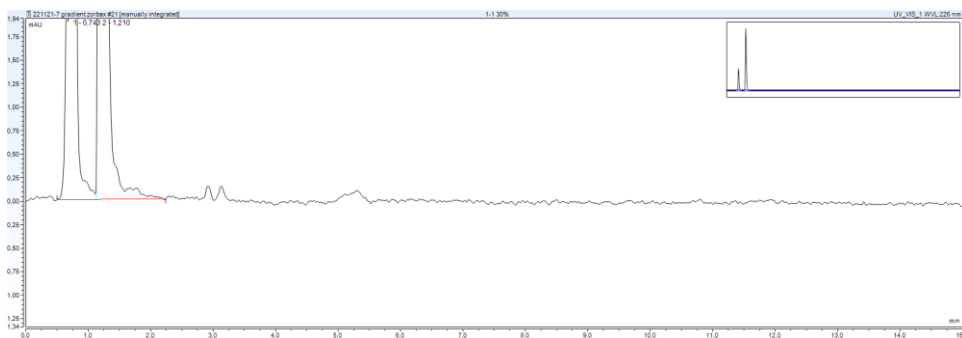
Figuur 12: injectie monster 1,25 mg tablet. 20% Eluens B Zorbax-kolom bij 20 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. Bisoprololpieken bij 1, 2, 2,8 en 3,2 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Zoals te zien is in figuur 12 nadat 20% eluens B werd gebruikt werd bisoprolol van alle voorgaande monster geëluëerd. Dit geeft nog een bevestiging dat 10% ACN te zwak is voor een goede socratische methode.



Figuur 13: injectie monster 1,25 mg tablet. 20% Eluens B Zorbax-kolom bij 20 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. fumaarzuurpiek bij 1 min en bisoprolol bij 4,5 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Het chromatogram (figuur 13) van 20% eluens B liet voldoende resolutie zien tussen de piek van fumaraat en bisoprolol. Bisoprolol heeft een retentietijd van 4,00 minuten. Er was een bepaalde vorm van tailing te zien bij Bisoprolol, wat te maken heeft met een te kleine kolom of buffercapaciteit. Om dit effect te reduceren werd een kleiner injectievolume (10 ul) gebruikt.



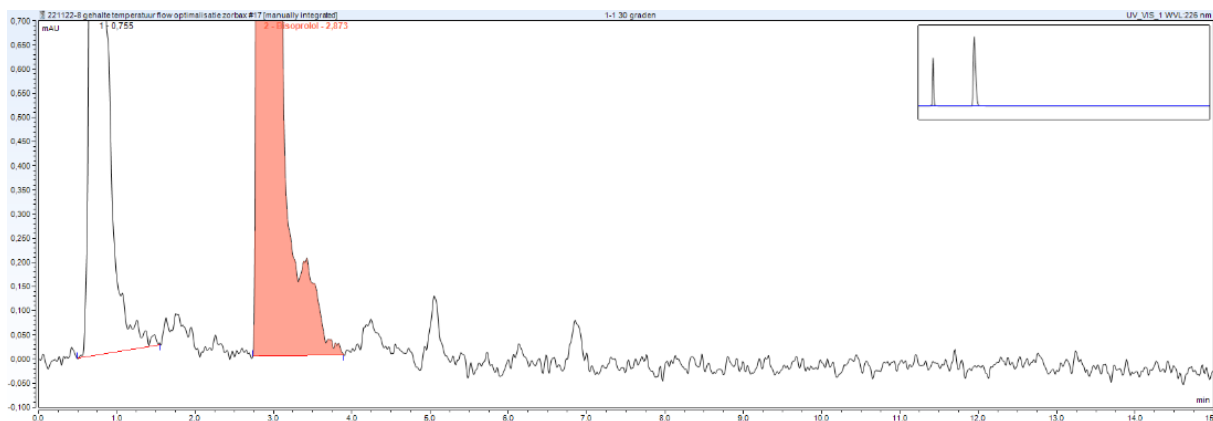
Figuur 14: injectie monster 1,25 mg tablet. 30% Eluens B Zorbax-kolom bij 20 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 10 ul geïnjecteerd. fumaarzuurpiek bij 1 min en bisoprololpiek bij 1,2 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Bij figuur 14 ontstaan co-eluerende pieken bij 30%. De resolutie is $<1,5$. Dit betekent dat de scheiding onvoldoende is en dat het analiet te veel retentie vertoont met het eluens t.o.v. de kolom.

40% eluens B en 50% eluens B is experimenteel uitgevoerd, maar heeft hetzelfde resultaat als figuur 14. Het is niet relevant om deze resultaten te bediscussiëren.

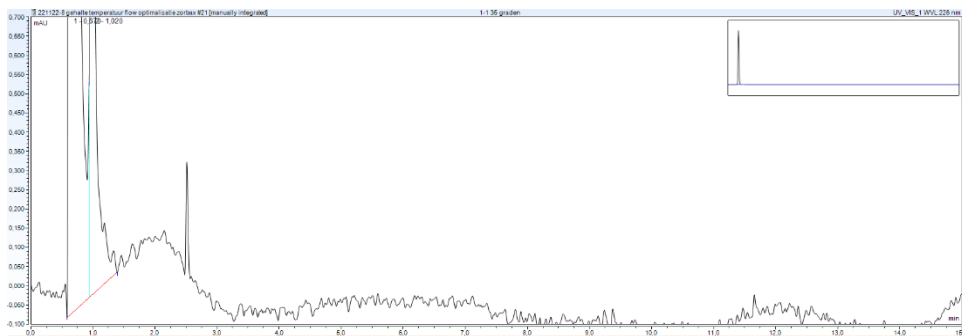
7.1.3 TEMPERATUUR

In deze paragraaf worden verschillende temperaturen van de Zorbax kolom met elkaar vergeleken.



Figuur 15: chromatogram zorbax-kolom injectie monster 1,25 mg tablet. 25% Eluens B Zorbax-kolom bij 30 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. fumaarzuurpiek bij 1 min en bisoprolol bij 2,8 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

De resolutie tussen deze pieken is voldoende, zoals te zien is in figuur 15. Het risico is wel dat wanneer de methode onvoldoende robuust is er co-elutie kan ontstaan.



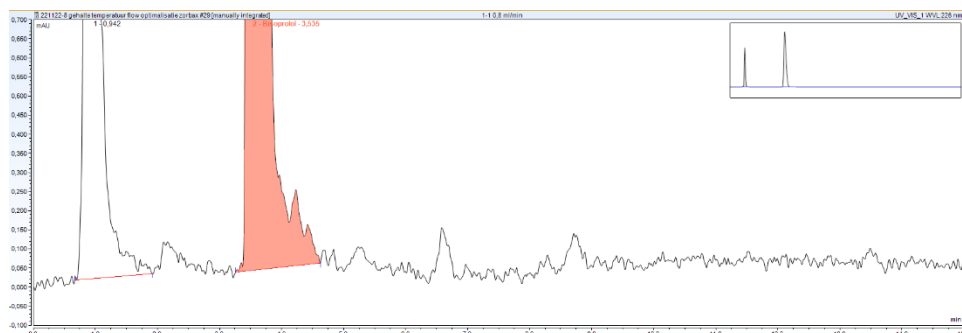
Figuur 16: chromatogram zorbax-kolom injectie monster 1,25 mg tablet. 25% Eluens B Zorbax-kolom bij 35 graden Celsius, flow 1,0 ml/min. 20 ul geïnjecteerd. Fumaarzuurpiek en bisoprolol bij 1 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Er is 1 piek te zien bij 1 minuut met een bijbehorende schouderpiek bij figuur 16. Dit betekent dat bisoprolol niet is gescheiden van het fumaarzuur. De resolutie is onvoldoende. Dit betekent dat een hogere temperatuur (≥ 35 graden Celsius) te weinig scheiding geeft.

Bij 40 graden is het resultaat hetzelfde als in figuur 19. Dit resultaat wordt dus niet vertoond/gediscussieerd.

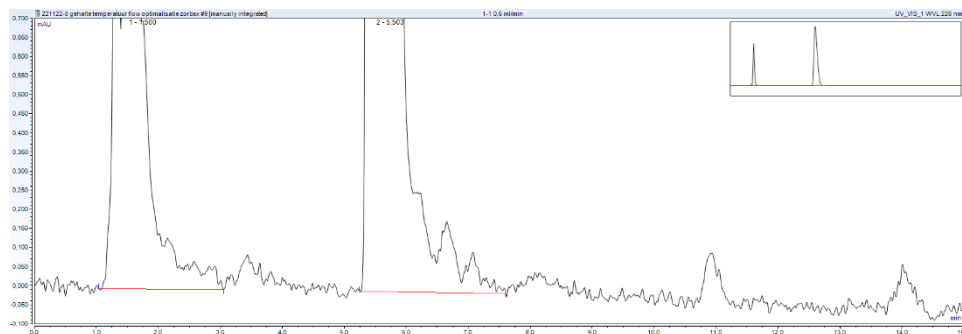
7.1.4 FLOW

In deze paragraaf worden de verschillende flows met elkaar vergeleken (0,800 ml/min en 0,500 ml/min) van de zorbax-kolom.



Figuur 17: 20 graden; 25% ACN; 0,800 ml/min Zorbax-kolom. 10 μ l geïnjecteerd fumaarzuurpiek zichtbaar bij 1 min en bisoprololpiek bij 4 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

Er is voldoende resolutie tussen de pieken en voldoende scheiding bij figuur 17. Er zijn kleinere pieken zichtbaar, dat te identificeren is als ruis van het signaal.



Figuur 18: 20 graden; 25% ACN; 0,500 ml/min Zorbax-kolom. 10 μ l geïnjecteerd fumaarzuurpiek zichtbaar bij 1 min en bisoprololpiek bij 4 min. Absorptie wordt weergegeven als functie van de concentratie.

De resolutie tussen deze pieken is voldoende in figuur 18. Het risico is wel dat wanneer de methode onvoldoende robuust is er co-elutie kan ontstaan.

Bij de Zorbax-kolom kan de analysetijd korter gemaakt worden. Een voorstel is om een runtijd toe te passen van 7 minuten. Hierdoor is er speling met een kleine verschuiving van retentietijden en dat is te ondervangen.

7.1.5 OPTIMALISATIE TRIETHYLAMINE

De resultaten voor het experiment met triethylamine is omschreven in tabel 24.

Tabel 24: resultaten optimalisatie met triethylamine vergelijking Zorbax-kolom (Z) en chromobond-kolom (C). Waarbij piekbreedte de beslissende factor was.

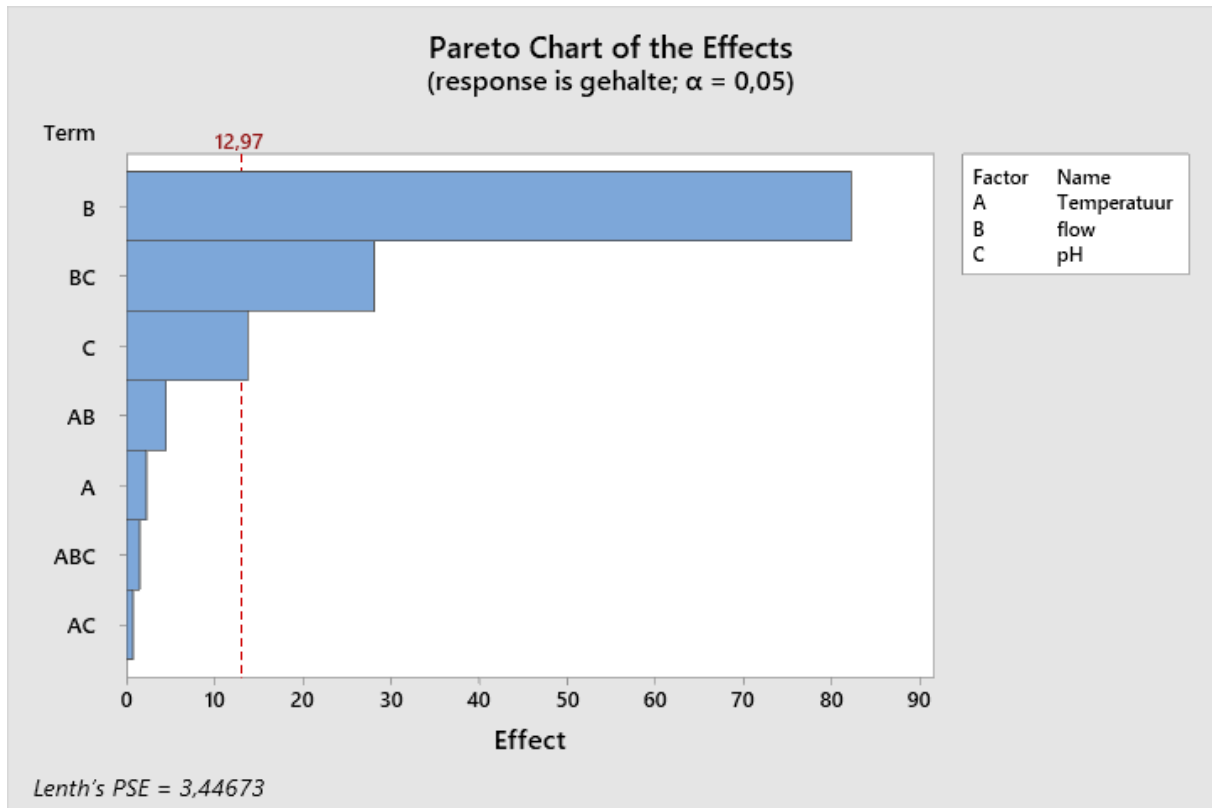
Monster	V TEA (ml)	Retentietijd (min)	Piekbreedte decimaal/sec
1-1Z	0	5,503	0,400/24
1-2Z		5,515	0,398/23
1-1C		Niet geëluëerd	Niet geëluëerd
1-2C		Niet geëluëerd	Niet geëluëerd
1-1	1	7,567	0,486/29
1-2		7,573	0,483/29
1-1C		12,627	0,387/23
1-2C		12,632	0,387/23
1-1	2	7,448	0,434/26
1-2		7,452	0,431/26
1-1C		12,633	0,386/23
1-2C		12,637	0,386/23
1-1	3	7,375	0,412/25
1-2		7,378	0,409/25
1-1C		12,678	0,387/23
1-2C		12,682	0,387/23
1-1	4	7,288	0,399/24
1-2		7,292	0,397/24
1-1C		12,748	0,390/23
1-2C		12,753	0,389/23

Op basis van de resultaten is te zien dat er geen elutie plaatsvindt bij de chromobond-methode wanneer 0 ml triethylamine (TEA) wordt gebruikt. Wanneer er een blanco (5x geïnjecteerd) wordt gebruikt met 2 ml triethylamine is te zien dat alle pieken worden geëluëerd. Dit geldt ook bij 1, 3 en 4 ml triethylamine. Bij de Zorbax-kolom wordt Bisoprolol wel geëluëerd wanneer 0 ml TEA wordt gebruikt. Dit heeft te maken met het feit dat de kolom een X-bridge bevat en dubbel ge-endcapped is. Wanneer bij de chromobond triethylamine wordt toegevoegd zijn alle piekbreedtes hetzelfde. Het grootste verschil tussen de Zorbax en Chromobond-kolom in relatie tot de piekbreedte is maximaal zes seconden. Het meest geschikte is om de Zorbax-methode te gebruiken zonder triethylamine. Dit bespaart chemicaliën en geld.

7.2 ROBUUSTHEID

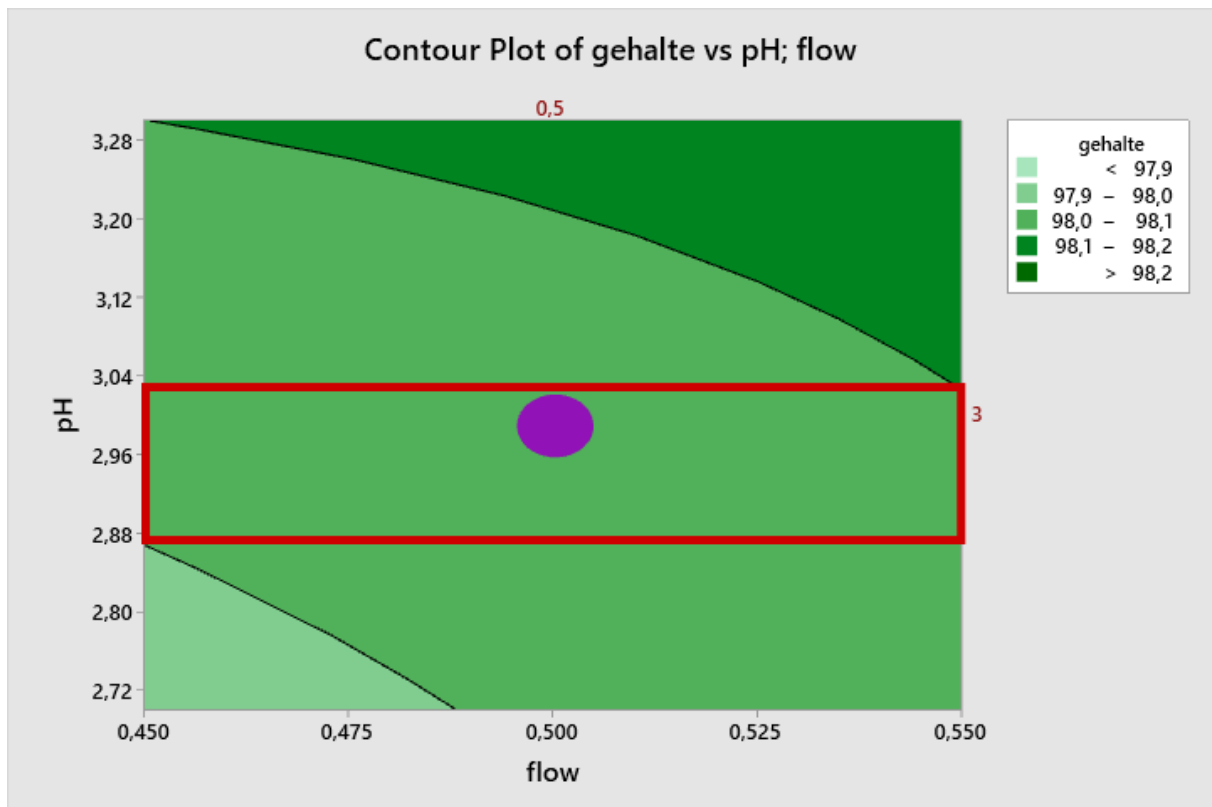
Zorbax

Voor het robuustheidsonderzoek van de Zorbax-kolom werd een pareto-chart (figuur 19) opgezet in Minitab om te bepalen welke factoren een interactie met elkaar hadden.



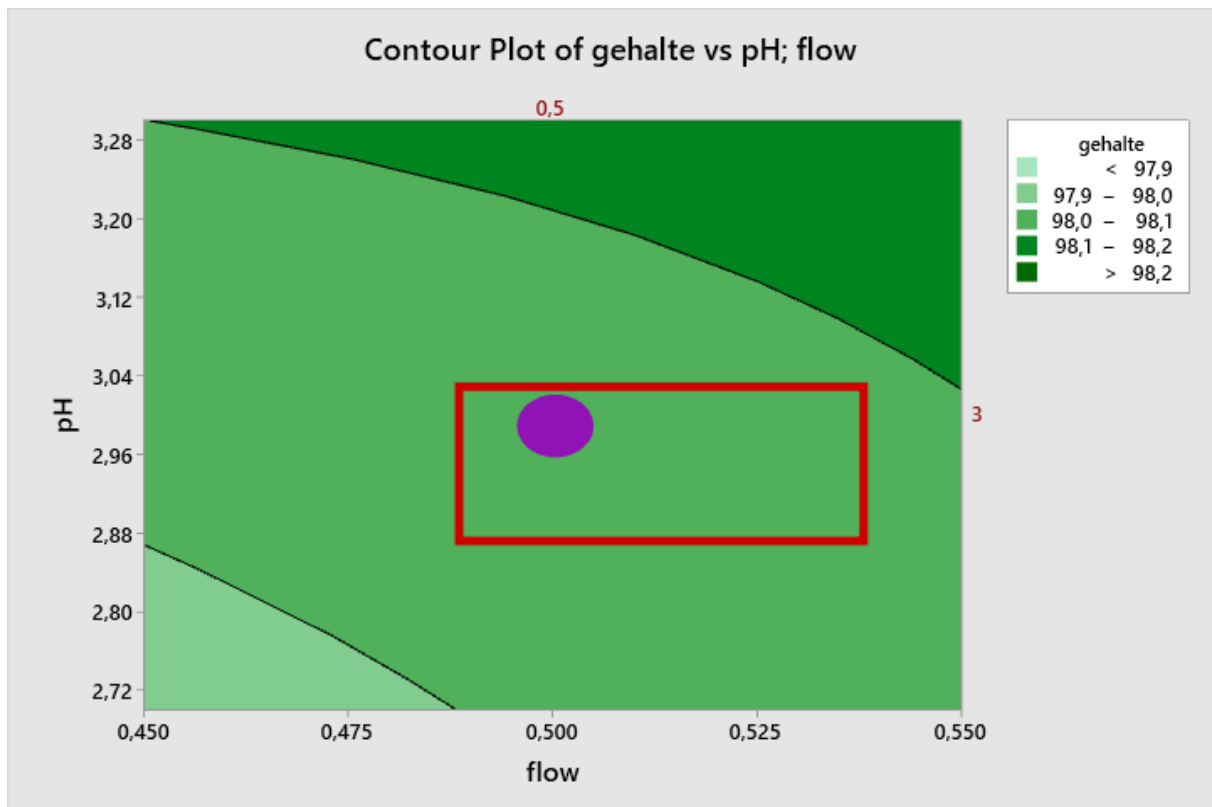
Figuur 19: Pareto-chart Interactie-effect van de flow, pH en Temperatuur.

Op basis van figuur 19 is te zien dat de flow, versmelting Flow-pH en pH zijn de drie grootste effecten m.b.t. het piekoppervlak als respons. De flow en flow-PH hebben het grootste effect.



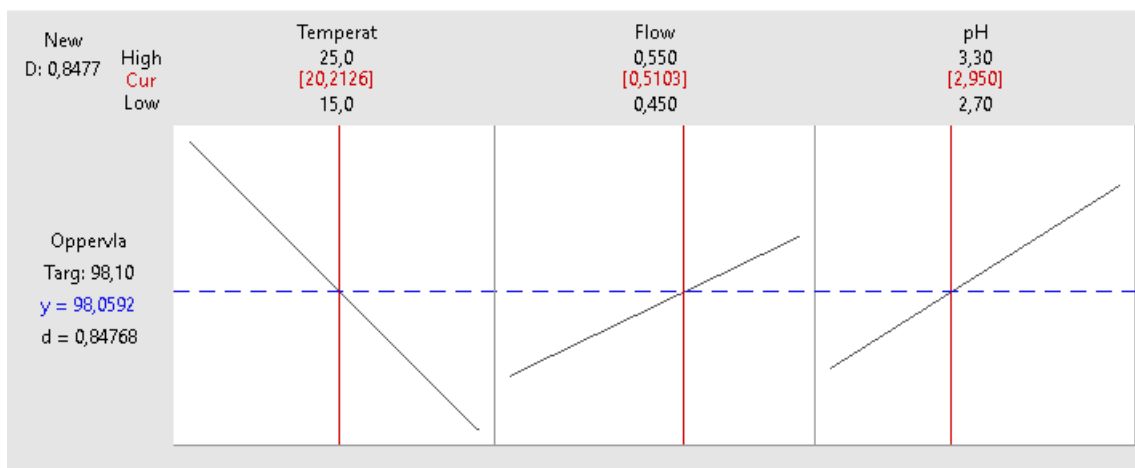
Figuur 20: Contour diagram Zorbax-kolom, waarbij de flow is uitgezet tegenover de PH. Paars zijn de standaardcondities van de methode (pH 3,00 en flow 0,500 ml/min).

Op basis van de resultaten in figuur 20 is het kader bepaald tussen pH 2,88 en 3,04. Met een flow tussen de 0,450 ml/min en 0,55 ml/min. Het kader kan verder verkleind worden om spreiding in de metingen te voorkomen.



Figuur 21: Contour diagram robuustheidsonderzoek Zorbax waarbij flow en pH zijn uitgezet als functie van het piekoppervlak.

Op basis van dit resultaat is ook te zien dat de flow het grootste effect heeft op de respons. Dit bevestigt ook de pareto-kaart (figuur 19). Uit het resultaat van figuur 21 is te zien dat de methode robuust is. Bij een kader van 0,489 ml/min – 0,537 ml/min pH 2,88 – 3,02. Een aanbeveling is om 0,510 ml/min en pH 2,95 te gebruiken. Hiermee wordt de spreiding ook kleiner (figuur 22).



Figuur 22: Plot respons-optimizer bij flow 0,510 ml/min en pH 2,95

Chromobond

De resultaten voor de bepaling van de robuustheid zijn weergegeven in tabel 26. Hierbij werd gekeken naar de invloed van de golflengte, temperatuur en golflengte.

Tabel 26: Resultaten robuustheidsonderzoek assay gehalte is weergegeven ten opzichte van elke geteste parameter.

sample	Originele methode	224 nm	228 nm	0,900 ml/min	1,100 ml/min	T 40 graden	T 30 graden
5 mg-1	100,004	99,980	99,891	100,182	99,234	99,995	99,538
5 mg-2	99,219	99,221	99,210	98,435	99,240	99,125	98,966

De flow van 1,100 ml/min heeft het grootste effect bij het gehalte. Deze heeft namelijk een afwijking van 0,76%. Alle resultaten vallen binnen de eis met betrekking tot het gehalte van 95%-105%. De methode is robuust.

7.3 LINEARITEIT

Op basis van de bereidde oplossingen (zie tabel 15), werden de volgende piekoppervlaktes van bisoprolol fumarate bepaald (tabel 27).

Tabel 27: Gemeten standaarden (n) met gemeten piekoppervlaktes bisoprolol (mAU*min) van standaarden bisoprolol fumarate als functie voor de concentratie bisoprolol fumarate (mg/100 ml).

N	C (%) en (mg/100 ml)	C BF gecorrigeerd (mg/100 ml)	1 ^e Piekoppervlak Bisoprolol (mAU*min)	2 ^e Piekoppervlak Bisoprolol (mAU*min)	Gemiddeld Piekoppervlak Bisoprolol (mAU*min)
1	10 (0,5000)	0,4969	1,3987	1,4211	1,4099
2	20 (1,000)	0,9937	2,7873	2,8048	2,7961
3	40 (2,000)	1,9875	5,6167	5,6275	5,6221
4	60 (3,000)	2,9812	8,3404	8,3630	8,3517
5	80 (4,000)	3,9749	11,1526	11,1292	11,1409
6	100 (5,000)	4,9687	13,9345	13,9572	13,9459
7	120 (6,000)	5,9624	16,7797	16,7815	16,7806
8	140 (7,000)	6,9561	19,5230	19,5356	19,5293
9	150 (7,500)	7,4530	20,8278	20,9337	20,8808
10	160 (8,000)	7,9498	22,2611	22,4694	22,3652
11	180 (9,000)	8,9436	24,9459	24,9495	24,9477
12	200 (10,00)	9,9373	27,7779	27,8050	27,7915

De kalibratiereeks werd opgesteld op basis van de gecorrigeerde concentratie BF. Dit werd berekend volgens vergelijking 4.

$$C_{\text{gecorrigeerd}} (mg/100 ml) = \frac{m_{\text{inweeg}} * V_{\text{pip}} (dil.) * 0.9988}{V_{\text{stock}} (l) * 10 * V_{\text{mk}} (dil.)} \quad 4)$$

Hierin is:

m inweeg = Massa inweeg BF in mg (249,03 mg)

V_{pip} dil = pipetvolume verdunning (ml)

V stock = Volume stockoplossing in l (0,25 l)

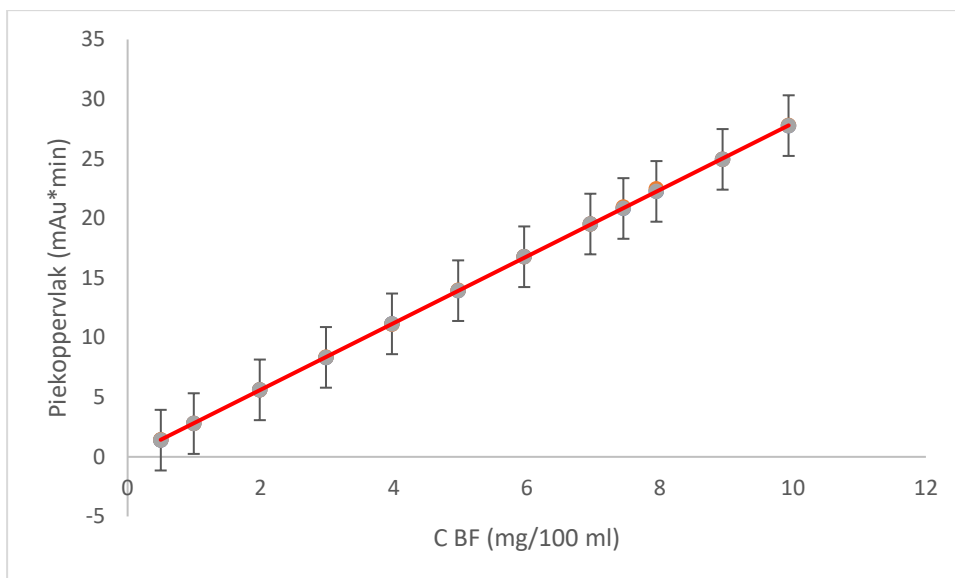
V_{mk} = Volume maatkolf standaard (ml)

0,9988 = correctiefactor zuiverheid BF-standaard (99,88%/100%)

Voorbeeld (0,5 mg/100 ml standaard)

$$C_{\text{gecorrigeerd}} = \frac{249,03 \text{ mg} * 5 \text{ ml} * 0.9988}{0,25 \text{ L} * 10 * 1000 \text{ ml}} = 0,4975 \text{ mg/100 ml}$$

Op basis van deze resultaten werd een kalibratiereeks opgesteld waarbij de bekende concentratie werd uitgezet tegenover het piekoppervlak (figuur 24).



Figuur 24: Kalibratiereeks van de standaarden waarbij Concentratie is uitgezet tegenover het piekoppervlak.

Oplopend gemeten Aflopend gemeten Gemiddelde
 Trendlijn oplopend Trendlijn aflopend Trendlijn gemiddelde

De kalibratielijnen zijn opgesteld in de vorm $y = ax + b$ waarbij de fout van elke factor is weergegeven (tabel 28). De oplopende en aflopende meetpunten/regressielijn vallen overlappen de gemiddelde trendlijn en zijn niet zichtbaar in figuur 24.

Tabel 28: coëfficiënten en fouten kalibratiereeks lineariteit oplopend, andersom en gemiddeld.

Regressielijn	a	Fout a	B	Fout b	R ²
Regressielijn oplopend	2,7930	0,004348	0,04064	0,02621	0,9999
Regressielijn aflopend	2,7997	0,007176	0,04181	0,04325	0,9999
Gemiddeld	2,7964	0,005158	0,04123	0,03109	0,9999

Er is een correlatie tussen de concentratie en het piekoppervlak. Deze correlatie is zichtbaar in figuur 25. Op basis van deze gegevens wordt in het bijschrift de functie van deze vergelijking weergegeven van de gemiddelde uitkomst van de twee coëfficiënten.

Om te bepalen of het snijpunt van de lijn analytisch relevant is wordt de volgende vergelijking 6 gebruikt:

$$afw = \frac{A_{100}}{b} * 100\% \quad 5)$$

Hierin is

Afw. = afwijking berekend

A₁₀₀ = absorptie bij middelste kalibratiepunt in de kalibratiereeks

b = snijpunt van de kalibratiereeks

$$afw = \frac{13,94585}{0,041227237} * 100\% = 0,2956\%$$

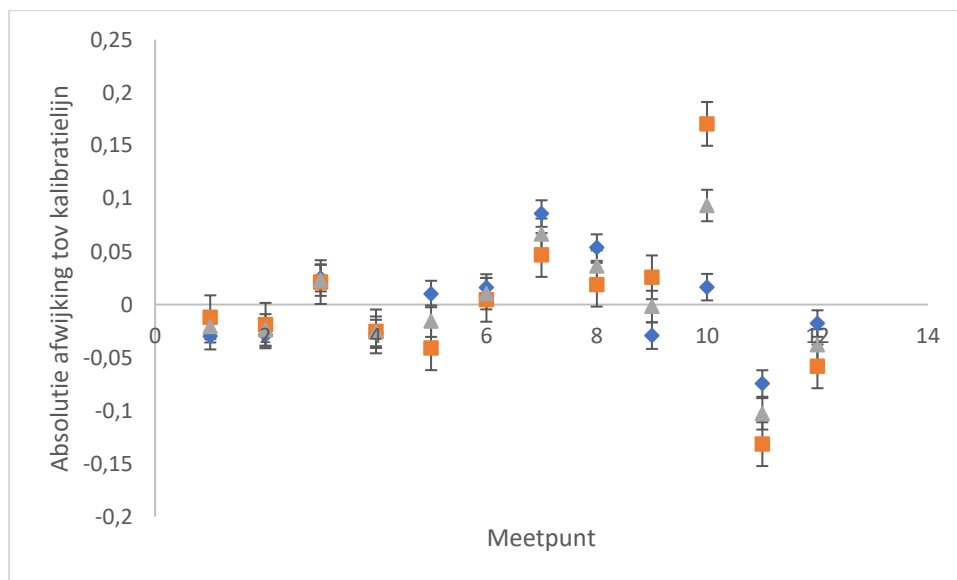
De afwijking is 0,2956% van de absorptie, kleiner dan 0,5%. Snijpunt is dus analytisch irrelevant. Dus de kalibratiereeks kan door 0 geforceerd worden. Hierbij wordt de formule van de kalibratiereeks:

$$A = 2,7964C (\pm 0,0052) + 0,03109 (\pm 0,031)$$

Hierin is

A = absorptie/peikoppervlakte

C = concentratie bisoprolol fumarate in mg/100 ml



Figuur 25: storingsgrafieken regressieanalyses van oplopend, aflopende concentraties en gemiddelde.

◆ oplopend gemeten ■ aflopend gemeten ▲ gemiddeld

In figuur 25 is te zien dat het geen patroon bevat in de kalibratielijnen c.q. willekeurig verdeeld. In het hele figuur is geen parabolisch verband. De kalibratiereeks is dus volledig lineair, wat betekent dat deze lijn geschikt is om regressieanalyse toe te passen¹⁷.

Bepaling LOD en LOQ

Om de LOD en LOQ te bepalen zijn de relevante gegevens weergegeven in tabel 28.

Tabel 28: Bepaling LOD en LOQ voor de verschillende kalibratiereeksen

Regressielijn	Standaardfout regressie	A	LOD (mg/100 ml)	LOQ (mg/100 ml)
Oplopende concentratie	0,04858	2,7930	0,05740	0,1739
Aflopende concentratie	0,07875	2,7997	0,09283	0,2813
Gemiddelde concentratie	0,05982	2,7964	0,07060	0,2139

Voor de bepaling van de LOD werd vergelijking 6 gebruikt:

$$LOD = 3,3 * \frac{S_R}{a} \quad 6)$$

Hierin is:

LOD = limit of detection (mg/100 ml)

S_R = Fout in regressielijn

a = slope van de kalibratielijn

Voorbeeld:

$$LOD = 3,3 * \frac{0,048578036}{2,793032386} = 0,05740 \text{ mg/100 ml}$$

De berekening van de LOQ is hetzelfde van de LOD, in plaats van 3,3 wordt voor de LOQ 10 gebruikt.

De LOD van deze methode is 0,05740 mg/100 ml.

De LOQ van deze methode is 0,2139 mg/100 ml. Dit betekent dat er gekwantificeerd kan worden in deze orde-grootte. Een aanbeveling voor een vervolg onderzoek is: kleinere monster-hoeveelheden gebruiken.

7.4 ACCURACY ASSAY

Om de accuracy te bepalen moest de slope (S) bepaald worden. Dit werd gedaan op basis van de standaarden die werden gemeten tijdens de analyse (tabel 29 en 30). S werd berekend op basis van vergelijking 7.

Tabel 29: Gemeten standaarden voor de bepaling van de slope voor de accuracy

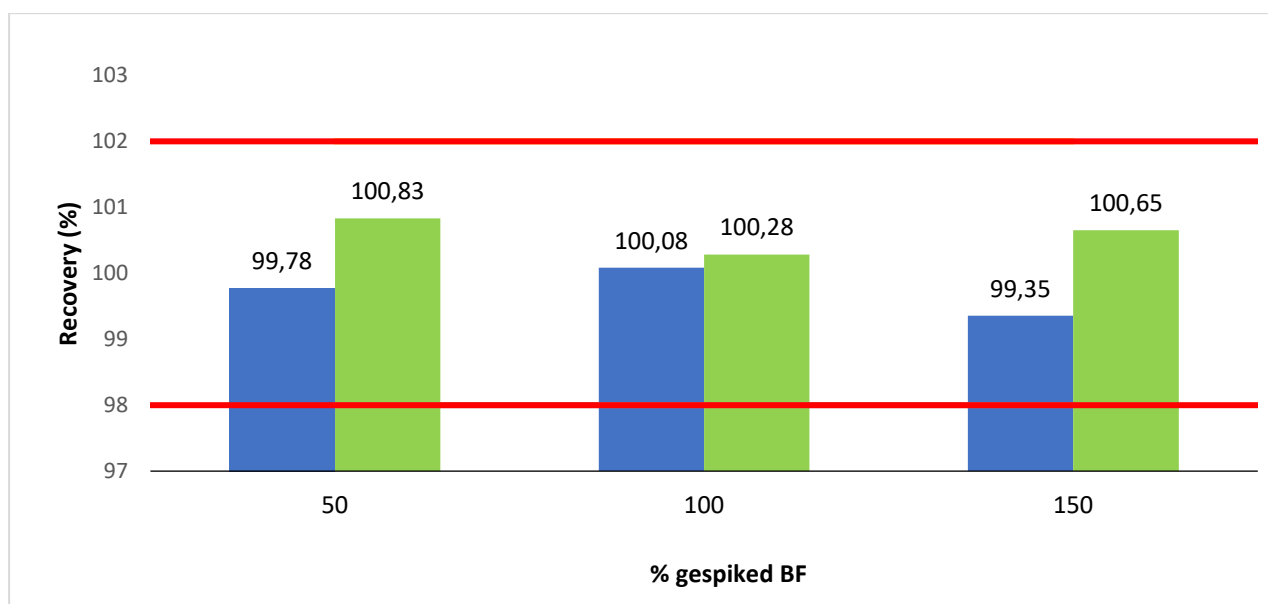
m standaard (mg)	C Standaard (mg/100 ml)	A standaard (mAU*min)	S mAU*min/mg/100 ml
49,68	4,9620	14,01	2,820
50,78	5,0719	14,01	

$$S = \frac{A_{st\ gem}}{c_{st\ gemiddeld}} \quad 7)$$

Tabel 30: Resultaten accuracy met bijbehorende recovery

Sample	Slope	A gevonden	A theoretisch	Recovery (%)
50% 1,25 mg	2,820	6,937	6,943	99,78
50% 10 mg		5,600	5,554	100,83
100% 1,25 mg		13,92	13,89	100,08
100% 10 mg		11,14	11,11	100,28
150% 1,25 mg		20,70	20,83	99,35
150% 10 mg		16,79	16,66	100,65

De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 26. Deze resultaten zijn opgesteld op basis van de resultaten die verkregen zijn in bijlage. Er werd 2x achter elkaar standaard 1 gemeten. Op basis daarvan werd de slope bepaald en daarmee werd gerekend.



Figuur 26: resultaten van de recovery van de bepaling van de accuracy van BF representatief aan 1,25 mg tabletten en 10 mg tabletten en gespiked met 50%, 100% en 150% BF standaard volgens tabel 16.

■ 1,25 mg ■ 10 mg — bovengrens (105%) — ondergrens (95%)

In dit gedeelte worden de resultaten weergegeven van de accuracy, en vergeleken met de waarden uit tabel. Elke individuele recovery moet tussen de 98% en 102% zijn. Op basis van de resultaten van figuur 26 is te zien dat er een hogere recovery is bij de 10 mg placebo-monsters in vergelijking met 1,25 mg tabletten. Dit heeft te maken met het feit dat er meer placebo is ingewogen en het volume inneemt in de maatkolf. Dit resulteert dat de werkelijke concentratie BF kleiner wordt ten opzichte van de theoretische waarde. Hierdoor werd een hogere recovery (>100%) teruggevonden.

De juiste eindconcentraties van de 10 mg tabletten is gemeten, maar er werd teveel placebo ingewogen. Dit kwam omdat de verdunningsfactor niet is meegenomen bij een verdund placebo-mengsel. Met dit gegeven wanneer de juiste hoeveelheden placebo is ingewogen bij de 10 mg tabletten is de verwachting dat er een hogere recovery wordt teruggevonden. Er kon geen statistiek toegepast worden om de accuracy nog nauwkeuriger te bepalen, vanwege te weinig placebo.

7.5 HERHAALBAARHEID ASSAY

Vanuit de waarden (massa opwerking en gemiddeld gewicht) in tabel 18 werden de verschillende piekoppervlaktes bepaald van deze tabletsterktes. De gevonden piekoppervlakten en gehalten zijn weergegeven in tabel 32. Om de theoretische waarde te vergelijken met de praktische waarde moest de werkelijke concentratie bepaald worden. Dit werd gedaan door het percentage te bepalen van het gemeten piekoppervlak ten opzichte van het theoretisch piekoppervlak (tabel 31 en 32). De slope/gevoeligheid (S) werd berekend volgens vergelijking 6. Deze werd vervolgens gebruikt om het gehalte te bepalen van de tabletten (tabel 32). Om het gehalte te bepalen werd de vergelijking 8 gebruikt:

$$G = \frac{Agev * \overline{m\bar{x}}}{S * I * TVC} * 100\% \quad 8)$$

$Agev$ = Gevonden piekoppervlak van het monster (tabel 32)

$\overline{m\bar{x}}$ = Gemiddeld gewicht opwerking tabel 18.

S = slope in AU/g/100 ml (zie tabel 32); berekend volgens vergelijking 4

I = inweeg opwerking (mg) (zie tabel 18)

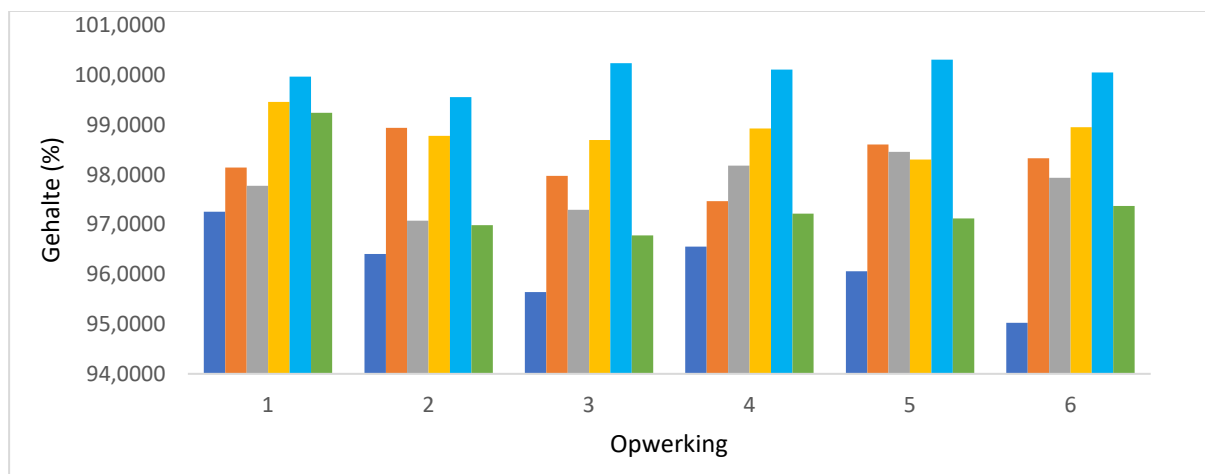
TVC = testverduunningscoëfficiënt (tabel 20).

Tabel 31: overzicht van de concentraties van bisoprolol fumarate en bijbehorende piekoppervlakten voor de bepaling van de slope om het gehalte bisoprolol te bepalen voor de herhaalbaarheid

Tabletsterkte (mg)	Standaarden	
	c st (mg/100 ml)	A st
1,25	4,7763	13,451251
	4,8115	13,51376
2,50	4,7045	13,317065
	5,0540	14,074609
3,75	4,7045	13,31707
	5,0540	14,074609
5,00	4,9441	13,906261
	4,9481	13,871627
7,50	4,9441	13,912722
	4,9481	13,878779
10,00	5,0759	14,76282
	5,0310	14,038128

Tabel 32: Resultaten herhaalbaarheid in percentage t.o.v. theoretische waarde en in mg/tablet. KC (kleurcode) correspondeert met de specifieke tabletsterkte in figuur 29.

Tablet sterkte (mg)	Slope (AU*min/g /100 ml)	KC	Eenheid	1	2	3	4	5	6
1,25	2,8124		%	97,2614	96,4102	95,641	96,5573	96,0597	95,023
			mg	1,2158	1,2051	1,1955	1,2070	1,2007	1,1878
2,5	2,807		%	98,145	98,9456	97,9767	97,4699	98,6094	98,3322
			mg	2,4536	2,4736	2,4494	2,4367	2,4652	2,4583
3,75	2,813		%	97,7817	97,0798	97,2988	98,1851	98,4602	97,9422
			mg	3,6668	3,6405	3,6487	3,6819	3,6923	3,6728
5	2,795		%	99,4678	98,7857	98,7027	98,9317	98,3077	98,9565
			mg	4,9734	4,9393	4,9351	4,9466	4,9154	4,9478
7,5	2,8022		%	99,9751	99,5655	100,243	100,113	100,314	100,058
			mg	7,4981	7,4674	7,5182	7,5085	7,5236	7,5044
10	2,8473		%	99,2462	96,9891	96,784	97,2203	97,126	97,3737
			mg	9,9246	9,6989	9,6784	9,72200	9,7126	9,7374



Figuur 27: gehalte van de herhaalbaarheid voor BF van alle tabletsterktes in percentage. Waarbij elke kleur in het diagram een tabletsterkte symboliseert en grafisch is weergegeven op basis van tabel 32.

De resultaten in figuur 27 voldoen allemaal aan de eis waarin ze vallen tussen de 95% tot 105%. Om te controleren of de resultaten geen uitbijters bevatten worden ze opnieuw gesorteerd op oplopende volgorde (tabel 33).

Tabel 33: resultaten gehaltes in mg van iedere tabletsterkte gesorteerd voor uitbijtertest²⁰.

Sterkte	N	1,25 mg	2,50 Mg	3,75 Mg	5,00 mg	7,50 Mg	10,00 mg
Hoeveelheid BF t.o.v. LC (mg) gesorteerd	1	95,023*	97,4699	97,0798*	98,3077	99,5655*	96,7840*
	2	95,641	97,9767	97,2788	98,7027	99,9751	96,9891
	3	96,0597	98,1450	97,7817	98,7857	100,0580	97,126
	4	96,4102	98,3322	97,9422	98,9317	100,113	97,2203
	5	96,5573	98,6094	98,1851	98,9565	100,243	97,3737
	6	97,2614*	98,9456*	98,4602*	99,4678*	100,314*	99,2462*

Waardes aangeduid met een asterisk (*) in tabel 33 worden doormiddel van de Dixon Q-toets (95% betrouwbaarheidsinterval) getoetst. De volgende hypothese wordt opgesteld:

H_0 : De waarde is geen uitbijter.

H_1 : De waarde is wel een uitbijter.

Als gevolg of H_0 wordt geaccepteerd of verworpen worden de volgende stappen ondernomen:

- 1) De waarde is geen uitbijter in reeks. Q-toets niet toegepast/voortgezet.
- 2) $* \rightarrow H_0/H_1$: Op basis van volgende meetwaarde die H_1 bevatte werd als gevolg opnieuw een Q-toets uitgevoerd nadat de waarde is verworpen. Vervolgens wordt weergegeven of de nulhypothese wordt verworpen of geaccepteerd.

Deze waarden werden getoetst (tabel 34) en weergegeven (tabel 35).

Tabel 34: toets waarden uitbijtertest²¹⁻

n	Toets waarde (95% BI)
5	0,710
6	0,625

Wanneer de eerste waarde verdacht is wordt, nadat de waarden zijn gesorteerd. Vervolgens werd vergelijking 9 gebruikt om de Q-waarde uit te rekenen.

$$Q = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad 9)$$

Vergelijking 10 wordt gebruikt wanneer n een verdachte waarde is.

$$Q = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad 10)$$

Tabel 35: Overzicht toetsing nulhypothese van de herhaalbaarheid van verschillende tabletsterktes

Sterkte	N	1,25 Mg	2,50 mg	3,75 mg	5,00 mg	7,50 mg	10,00 Mg
Gehalte (%) gesorteerd	1	0,3146 H ₀	0,3435 H ₀	0,1586 H ₀	0,3405 H ₀	0,5471 H ₀	0,0833 H ₀
	2	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
	3	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
	4	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
	5	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	*0,2600→ H ₀
	6	0.0952 H ₀	0.4408 H ₀	0,1993 H ₀	0,2278 H ₀	0,3146 H ₀	0,7605 H ₁

Nadat de uitbijters werden bepaald werd het gemiddelde gehalte en bijbehorende standaarddeviatie bepaald. Op basis van de resultaten omschreven in tabellen werd het gemiddelde percentage BF berekend voor de tabletten van elke sterkte. Vervolgens werd het gehalte berekend van elke tabletsterkte in percentage en mg BF/tablet (tabel 36). Met deze gegevens werd een t-toets toegepast en een 95% betrouwbaarheidsinterval berekend (tabel 37).

Tabel 36: Gemiddeld percentage BF per sterkte en mg BF/tablet op basis van de herhaalbaarheid waarbij n=6

Tabletsterkte (mg)	mg BF/tablet	Gemiddeld % BF	RSD
1,25 mg	1,20	96,16	0,81
2,5 mg	2,46	98,25	0,52
3,75 mg	3,67	97,79	0,54
5,00 mg	4,94	98,86	0,38
7,50 mg	7,50	100,04	0,27
10,00 mg	9,62	97,46	0,22

Tabel 37: Resultaten t-toets voor de herhaalbaarheid van verschillende tabletsterktes.

Tabletsterkte (mg)	mg BF/tablet (95% BI)	Gemiddeld % BF	Stdev	Tber	t tabel
1,25 mg	1,20 ± 0,03	96,16	0,78	0,283	2,571 ²²
2,5 mg	2,46 ± 0,03	98,25	0,51	0,0575	
3,75 mg	3,67 ± 0,05	97,79	0,53	0,0145	
5 mg	4,94 ± 0,05	98,86	0,38	0,00431	
7,5 mg	7,50 ± 0,05	100,04	0,27	0,00066	
10 mg*	9,62 ± 0,06	97,2	0,22	0,00058	2,776 ²³

*Deze waarden zijn bepaald op basis van n=5 nadat de Dixon Q-test werd toegepast, is het gemiddelde en standaarddeviatie opnieuw berekend.

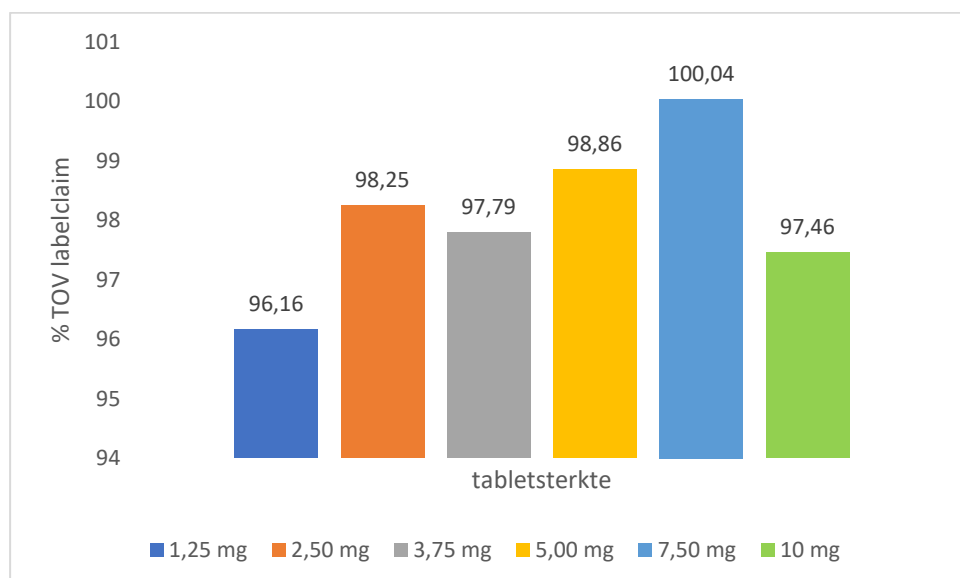
95% Betrouwbaarheidsinterval (BI) is berekend via vergelijking 11:

$$95\% BI = \bar{x} \pm t.s \quad 11)$$

Voorbeeld:

$$1,20 \pm 2,571 \cdot 0,01 \rightarrow 1,20 \text{ mg} \pm 0,03 \text{ mg}$$

Het gehalte in percentage is grafisch weergegeven in figuur 28.

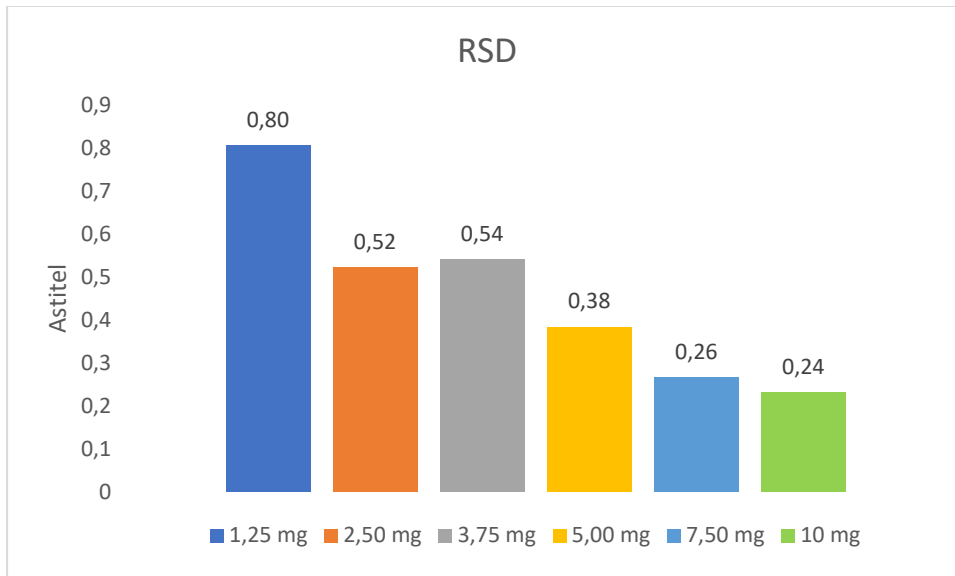


Figuur 28: hoeveelheid BF in percentage per sterkte t.o.v. labelclaim

Vervolgens werd de RSD (relatieve standaarddeviatie) bepaald van de verschillende tabletsterktes (figuur 29). De eis moet <1,2 zijn.

De RSD is berekend met vergelijking 12

$$RSD = \frac{STDEV}{Gemiddelde} * 100\% \quad 12)$$

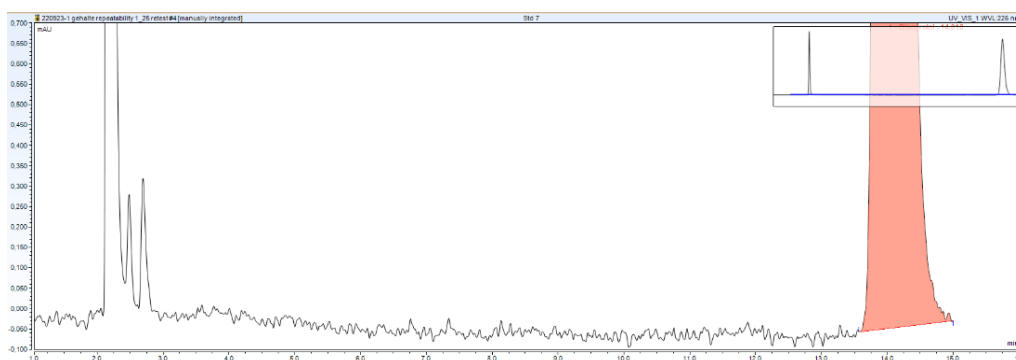


Figuur 29: relatieve standaarddeviaties van verschillende tabletsterktes op basis van gemiddeld gehalte in percentage.

De eis van de relatieve standaarddeviatie (RSD) moet <1,2% zijn. Alle RSD's vallen binnen deze specificatie, zoals te zien is in figuur 29.

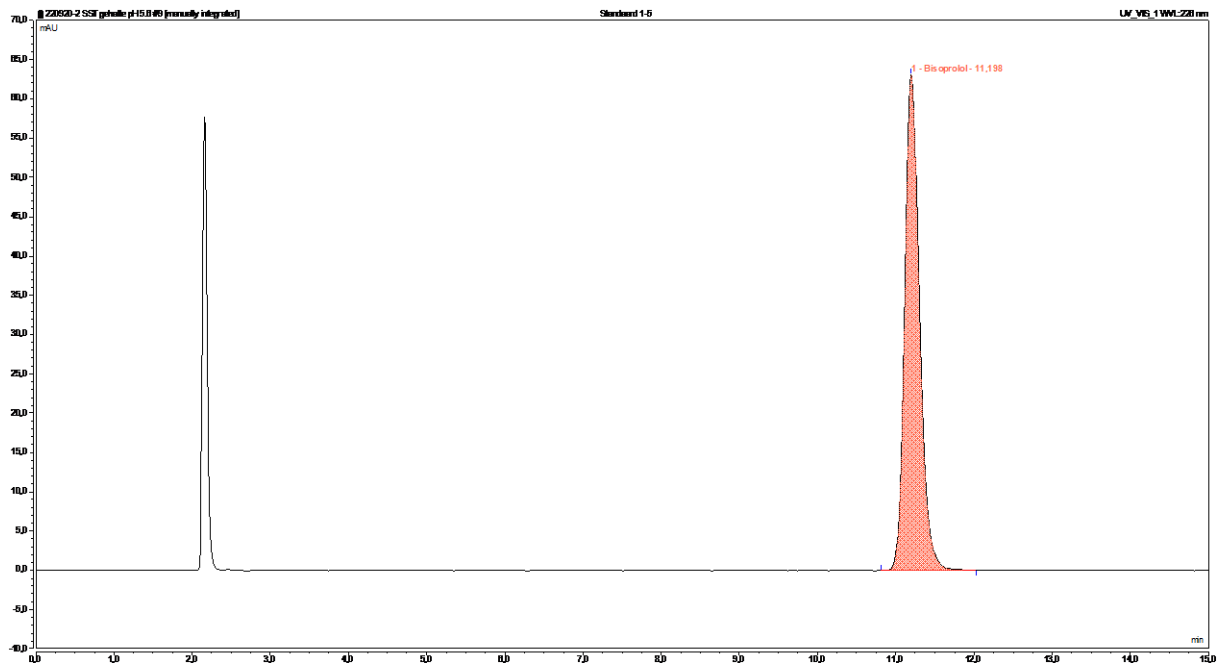
Afwijkende retentietijden

Bij de herhaalbaarheid van de 1,25 mg tabletten was er te zien, dat er fluctuerende retentietijden zijn (figuur 30).



Figuur 30: herhaalbaarheid 1.25 mg tabletten. Gemeten bij 35 graden Celsius; flow 1,0 ml/min. Buffer pH 5,60 25% ACN; runtijd 15 min.

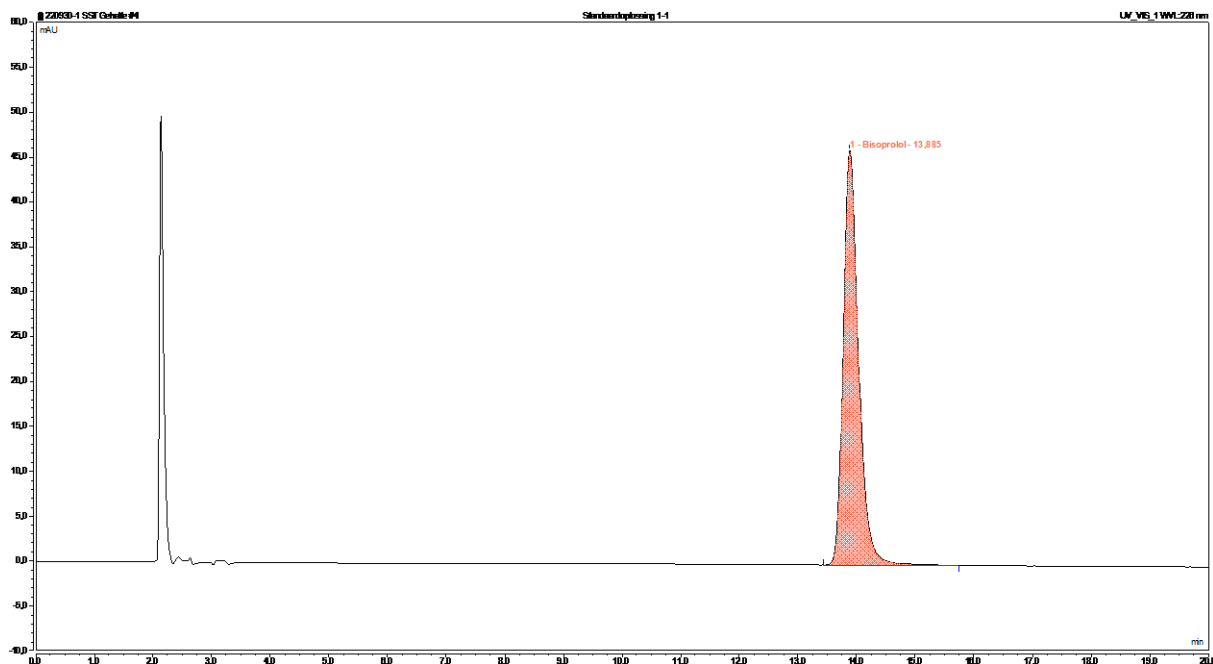
Bisoprolol was zichtbaar bij 15 min. Dit was rond het einde van de run. Het risico is dat de integratie van de piek niet accuraat kan zijn. De runtijd werd veranderd van 15 minuten naar 17 minuten. Deze keuze werd gemaakt, omdat er niet van het dossier afgeweken mocht worden. Dus het was beter om de runtijd te verlengen.



Figuur 31: testanalyse buffer pH 5,60 standaard 5,00 mg/100 ml bisoprolol fumaraat.

In figuur 31 is te zien dat er een retentietijd is van 12 minuten bij een buffer van pH 5,60. In vergelijking met figuur 30 waarbij dezelfde pH was kan men concluderen dat de buffer niet goed is.

De buffer werd bereid door een andere analist om te verifiëren of er een fout is gemaakt bij de bereiding van de buffer (figuur 32).



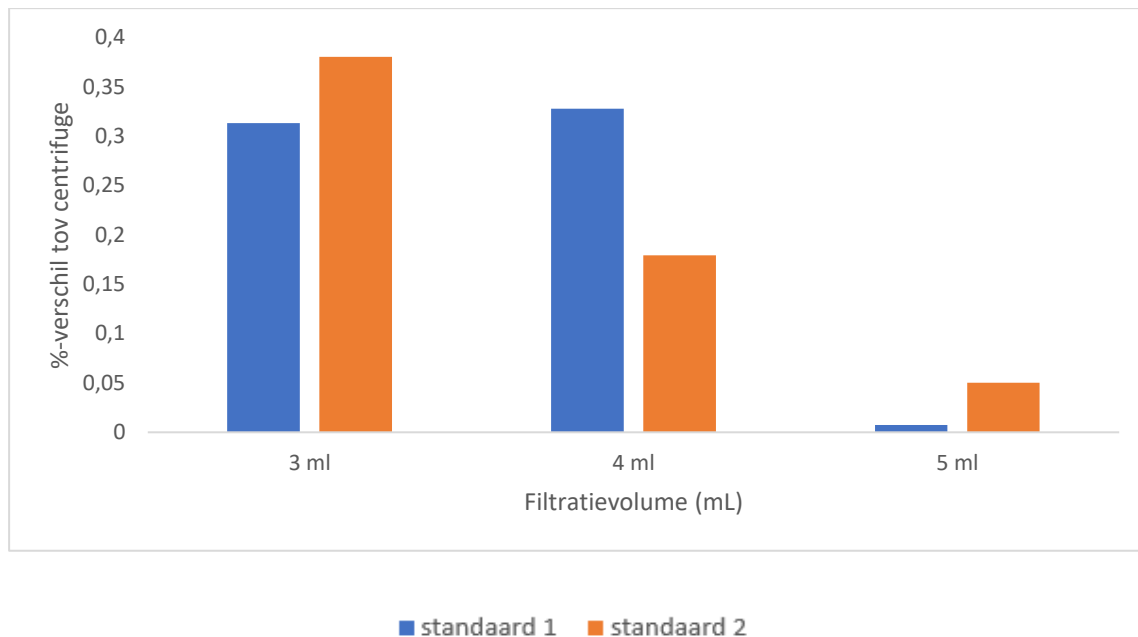
Figuur 32: Chromatogram standaardoplossing door andere analist. 25% acetonitril 75% buffer pH 5,60; temperatuur 35 graden Celsius; flow 1,0 ml/min.

Bij deze analist in figuur 32 elueerde Bisoprolol bij 13 minuten. Dit geeft de bevestiging dat de buffer zelf niet goed is wat in het dossier is opgegeven²⁴. Een andere oorzaak dat retentietijden fluctueren is lekkage. Dit was niet het geval, omdat er een lekdetectie is bij de HPLC. Deze was niet afgegaan. Een andere voorzaak is dat het eluens niet goed is gemengd. Verschillende keren op dezelfde dag werd het eluens opnieuw bereid, goed gemengd. De retentietijden bleven nog steeds fluctueren.

De pK_a van BF is 9,67²⁵. De buffer van pH 5,60 zit beneden de pK_a van BF. Dit kan resulteren in fluctuerende retentietijden.

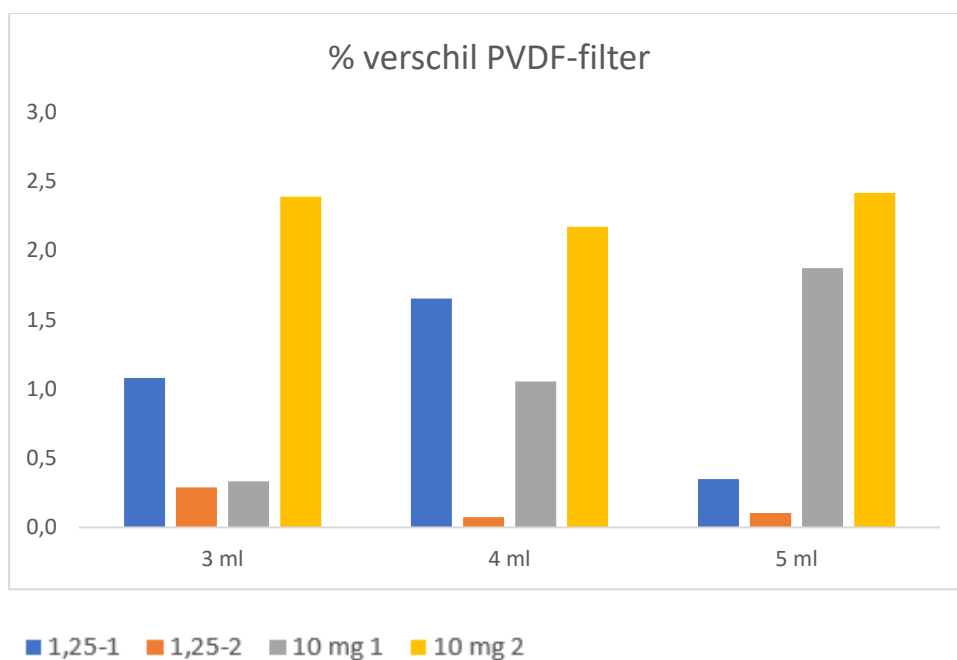
7.6 FILTERTEST ASSAY

Voor de filtertest werd 3-5 ml verworpen voordat er werd verdund. Het gemeten piekoppervlak werd vergeleken met de gecentrifugeerde standaard (figuur 33). Het procentuele verschil ten opzichte van de gecentrifugeerde standaard is weergegeven in figuur 34.



Figuur 33: %-verschil filtertesten standaarden

De filtertest voor de standaarden (figuur 33) is succesvol, want bij alle drie de volumes vallen de waarden onder de eis van <0,5%.



Figuur 34: filtertest 1,25 mg tabletten en 10 mg tabletten waarbij 3, 4 en 5 ml is verworpen voor verdunning en analyse

Bij de monsters (figuur 34) is bij het tweede monster van de 1,25 mg tabletten onder de 0,5%. Bij de eerste opwerking en de 10 mg tabletten was het procentueel verschil boven de 0,5%. Alleen bij de eerste opwerking was bij 3 mL verwerpen het percentage <0,5%. Het effect is toe te schrijven aan de inhomogeniteit van het monster en dat het filter wordt verzadigd. Om

dit percentage te verkleinen kan als aanbeveling gedaan worden door de monsters te centrifugeren en vervolgens te filtreren. Een andere reden hiervoor is dat de kans dat de kolom wordt verstopt kleiner is en dus langer meegaat.

Op basis van de resultaten in figuur 34 is te zien dat hoe meer volume er vooraf wordt verworpen, des te kleiner het procentueel verschil is. Het filter is onvoldoende verzadigd, waardoor het procentuele verschil hoger lijkt dan wanneer minder volume wordt verworpen.

7.7 HOUDBAARHEID

Voor de houdbaarheid werden monsters en standaarden (tabel 38 en tabel 39) gemeten op t₀, t₄₄ uur en t₇₂ uur.

Tabel 38: Resultaten houdbaarheid oplossingen van de standaarden BF

Standaard	m (mg)	C (mg/100 ml)	A t ₀	A t ₄₄	A t ₇₂
1	49,50	4,9441	13,906261	13,897113	13,902628
2	49,54	4,9481	13,871627	13,875216	13,834826
3	50,11	5,0050	13,992994*	-	13,902628**
4	50,54	5,0479	14,142998*	-	13,834826**

*Deze waarden werden gebruikt om het gehalte te bepalen bij t₄₄ uur.

**Deze waarden komen voort uit t=48 uur vanwege een tekort aan standaard

Tabel 39: Resultaten gehalte bepaling in relatie tot stabiliteit van de oplossingen. Hierbij werden 5,00 mg tabletten gebruikt met batchnummer D01064. Oplossingen werden gemeten bij drie verschillende tijdstippen, en procentueel verschil werd bepaald.

Monster	Standaard 1	Standaard 2	D01064-1	D01064-2
Massa (mg)	49,5	49,54	880,07	880,01
A t ₀	13,906261	13,871.627	13,929574	13,833099
Gehalte (%)	-	-	99,21131507	98,52418626
A t ₄₄ *	13,897113	13,875216	13,914227	13,777839
Gehalte (%)	100,4306962	100,1913931	99,43017656	98,45555663
%-verschil	0,43	0,19	0,22	0,07
A t ₇₂ **	13,902628	13,834826	13,982377	13,882533
Gehalte	100,6740611	99,33166748	101,3528046	100,6290743
%-verschil	0,24	0,86	2,15	2,13

Op basis van de resultaten zijn de standaarden 72 uur houdbaar op kamertemperatuur op de labtafel. De monsters zijn 44 uur houdbaar. Voor de monsters kan het beter zijn om ze in de koelkast en of donker te bewaren.

Omdat er te weinig standaard was om de houdbaarheid te bepalen over t72 uur werd er besloten om oudere standaarden te gebruiken die 48 uur goed zijn. Aan de hand daarvan werd de stabiliteit bepaald.

Het gehalte werd bepaald op basis van vergelijking 7 waarbij de TVC 0,5 is.

Om de methode te optimaliseren werden twee HPLC-methodes met elkaar vergeleken, met twee verschillende kolommen en eluens-samenstellingen. De eerste was de chromobond-kolom met een temperatuur van 35 °C met 25% fosfaatbuffer met een pH van 5,60 en 75% acetonitril. De tweede methode was met een Zorbax-Eclipse XBD C₁₈-kolom, waarbij een eluens werd gebruikt van 25% water bevattend 15 mM orthofosforzuur en 75% acetonitril. De retentietijd was 12 minuten. De fluctuerende retentietijden van de chromobond-kolom gaven aan dat de methode niet robuust is. Bij de methode van de chromabond wordt een buffer van pH 5,60 gebruikt. Deze buffert niet bij deze pH. De pK_a van Bisoprolol is 9.67. Dus de buffer functioneert ver buiten de pK_a van BF.

Een voorstel voor de chromobond-kolom is, om de buffercapaciteit te bepalen, en of de stabiliteit van de buffer effect heeft op deze fluctuerende retentietijden. Een andere aanbeveling is om meer acetonitril te gebruiken om de analysetijd te verkorten. Met de huidige buffer daarentegen is dat niet aan te raden. De toepassing bij de optimalisatie van meer/minder acetonitril wordt meer relevant, wanneer men zeker is dat het huidige eluens stabiel is.

De retentietijd van bisoprolol is tussen de 11 en 15 minuten bij een flow van 1,0 mL/min en een kolomtemperatuur van 35 °C, en een eluentsamenstelling van 25% acetonitril en 75% buffer en 2 mL triethylamine/L. Een andere aanbeveling is om meer acetonitril te gebruiken om de analysetijd te verkorten. Met de huidige buffer daarentegen is dat niet aan te raden. De toepassing/optimalisatie van meer/minder acetonitril wordt meer relevant wanneer men eerst zeker is dat het huidige eluens stabiel is. Een alternatief voor de Chromobond kolom is de Zorbax-kolom. Het was te overwegen de Zorbax-kolom te gebruiken en de methode opnieuw te valideren, omdat de retentietijden velen malen stabiel zijn bij het gebruik van laatstgenoemde kolom.

Bij de Zorbax-kolom en het eluens is de retentietijd 4,3 minuten. Dit werd bereikt door gebruik te maken van een eluens van 25% acetonitril en 75%, waaraan fosforzuur werd toegevoegd met een eindconcentratie van 15 mM en 2 mL triethylamine/L. De analysetijd was 15 minuten met een kolomtemperatuur van 20°C, een flow van 0,500 ml/min. De retentietijden zijn stabiel en de resolutie tussen fumaarzuur en bisoprolol is boven de 1,5. Een volgende optimalisatiestap is om een interne standaard toe te passen.

Hierdoor kan de spreiding van de duplo bij de systeemtest verkleind worden. Bij de Zorbax-kolom moet de accuracy, lineariteit, stabiliteit van de oplossingen en herhaalbaarheid bepaald worden om de validatie te voltooien. Na deze stap zou de huidige Zorbax-methode geschikt zijn om het gehalte Bisoprolol fumarate te bepalen.

De analysetijd was 17 minuten. Dit kan verkort worden tot 7 a 10 min. Dit bespaart tijd, chemicaliën en geld.

Voor de lineariteit bij de chromabond-methode werden verschillende kalibratie-standaarden gemeten. Hierbij werd een correlatiecoëfficiënt van 0,9999 gevonden. Dit voldoet aan de eis voor de correlatiecoëfficiënt binnen Innogenics. De punten van alle kalibratielijnen zijn

willekeurig verdeeld in het residu-plaatje. Dit betekent dat de lijn geschikt is om de concentratie te bepalen en lineair is. De afwijking van de lijn was 0,2956%. Dit valt onder het criterium van $<0,5\%$ zodat deze niet analytisch relevant is. Dit betekent dat de lijn door 0 geforceerd mag worden. De LOD en LOQ werden bepaald op basis van de standaardfout van de regressielijn en de richtingscoëfficiënt van de kalibratiereeks (gemiddelde). De LOD was 0,07060 mg/100 ml. De LOQ was 0,2139 mg/100 ml.

De accuracy werd bepaald door te spiken met bisoprolol fumaraat standaard in combinatie met een placebo-mengsel. Voor de accuracy (op basis van de methode met de chromabond-kolom) is de recovery tussen de 99,35% en de 100,65%, dit valt binnen de specificatie van 98%-102%. De recovery is bij sommige samples hoger dan 100% vanwege het volume placebo dat in de maatkolf zit. Hierdoor was de gevonden concentratie BF hoger dan wat in theorie was berekend. Een aanbeveling voor een vervolgonderzoek is om meerdere keren de accuracy te bepalen waardoor statistiek toegepast kan worden en dus de spreiding bepaald kan worden en waarschijnlijk kleiner wordt. Verder is het raadzaam om de accuracy te bepalen voor de Zorbax-kolom/methode. Dit werd in dit onderzoek niet gedaan vanwege een tekort aan placebo. Om de accuracy te bepalen is het verder raadzaam om een standaard-additiemethode toe te passen in tweevoud of drievoud met het monster. Hierdoor zijn er genoeg metingen om statistiek toe te passen en is er een alternatief voor het tekort aan placebo.

De herhaalbaarheid werd met de chromabond-methode gedaan. Het monster werd zes keer opgewerkt en geanalyseerd. Alle tabletten bevatte een gehalte tussen de 95%-105%. Om dit verder te bevestigen moet een volgende analist deze methode uitvoeren. Voor de herhaalbaarheid is het een aanbeveling om een gehalte-spreiding analyse toe te passen. Hiermee wordt bedoeld dat er 30 tabletten worden vernalen en de hoeveelheid van 10 tabletten in poedervorm wordt afgewogen. Op deze manier wordt de inhomogeniteit van het tabletpoeder geminimaliseerd. Een ander voordeel is dat het contactoppervlak groter wordt van het oplosmiddel, en er meer bisoprolol fumaraat wordt opgelost. Een volgende aanbeveling is om dezelfde test te laten doen door een andere analist met een andere HPLC. Dit met als doel om te controleren of de methode daadwerkelijk accuraat is.

Voor de filtertest werden standaarden en 1,25 mg tabletten opgewerkt. De standaarden hadden een procentueel verschil van onder de 0,5%. De monsters waren boven de 0,5%. Dit betekent dat voor het monster beter is om op te werken met centrifugeren. Filtratie kan na centrifugeren worden toegepast, zodat de kolom minder snel verstopt raakt en dus langer meegaat.

Voor de houdbaarheid van de oplossingen werden standaarden en monsters (1,25 mg BF-tabletten) opgewerkt en gemeten bij $t=0$, $t=44$ en $t=72$. Er kan met zekerheid worden gesteld dat de oplossingen 44 uur houdbaar zijn voor de monsters, Het procentueel verschil tussen $t=0$ en $t=72$ was 2,15%. Hierbij werd uitgegaan dat de monsters werden bewaard op de labtafel bij kamertemperatuur. Verdere aanbevelingen zijn om monsters op te werken en te bewaren in het donker (labkastje) en in de koelkast (4°C). De kans is dat de oplossingen langer houdbaar blijven.

9. REFERENTIES

- [1] <https://www.thuisarts.nl/hoge-bloeddruk> Geraadpleegd op 7-06-22
- [2] <https://www.medtronic.com/nl-nl/patienten/aandoeningen/kransslagader-aandoening.html> Geraadpleegd op 07-06-22
- [3] <https://www.hartstichting.nl/hart-en-vaatziekten/slagaderverkalking> Geraadpleegd op 07-06-22
- [4] https://www.hartpatienten.nl/hartpatienten/aandoeningen/?gclid=Cj0KCQjwgO2XBhCaARIsANrW2X1GES3fCoqMTILcDhFiOe5aEhQRdb6jHM0LE9R2a2LCo3Sybb8i-DQaAkZdEALw_wcB#angina-pectoris Geraadpleegd op 07-06-22
- [5] <https://www.hartstichting.nl/hart-en-vaatziekten/behandelingen/medicijnen/betablokkers> Geraadpleegd op 07-06-22
- [6] <https://www.nhs.uk/medicines/metoprolol/side-effects-of-metoprolol/> Geraadpleegd op 07-06-22
- [7] <https://link.springer.com/article/10.1007/s00769-006-0095-y#:~:text=Pharmaceutical%20impurities%20are%20the%20unwanted,safety%20of%20the%20pharmaceutical%20products>. Geraadpleegd op 08-08-22
- [8] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977007147> Geraadpleegd op 28-12-22
- [9] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis#:~:text=CE%20has%20a%20greater%20peak,is%20simpler%20for%20the%20operator](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis#:~:text=CE%20has%20a%20greater%20peak,is%20simpler%20for%20the%20operator).
- [10] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice>
- [11] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-laboratory-practice-compliance> Geraadpleegd op 26-12-22
- [12] <https://www.win.tue.nl/~adibucch/6BV04/DOEbookletUmetrics.pdf> geraadpleegd op 23-01-23
- [13] https://www.researchgate.net/publication/262017631_Application_of_Experimental_Design_and_Response_Surface_Technique_for_Selecting_the_Optimum_RP-HPLC_Conditions_for_the_Determination_of_Moxifloxacin_HCl_and_Ketorolac_tromethamine_in_Eye_Drops geraadpleegd op 13-12-22
- [14] https://watermark.silverchair.com/jaoac0042.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhWErcy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAsowggLGBgkqhkiG9w0BBwagggK3MIICswIBAD

[CCAqwGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMZhfaBxNIe0hZqppjAgEQgII
CfYwAtwBHcWqPjInKVtrHZAUETqnv7GSI5QfQtW9O8CBx](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fumaric-acid#section=LogP) geraadpleegd op 13-12-22

[15] <https://www.pharmascholars.com/articles/validated-and-stability-indicating-liquid-chromatography-method-for-quantification-of-bisoprolol-fumarate-in-tablet-dosa.pdf> geraadpleegd op 13-12-22

[16] <https://spectrabase.com/spectrum/4U531rlq88K> Geraadpleegd op 07-12-22

[17] <https://www.glsciences.com/viewfile/?p=LT192> Geraadpleegd op 07-12-22

[18] <https://www.phmethods.net/articles/establishing-pharmaceutical-brand-variability-for-bisoprolol-fumarate-and-hydrochlorothiazide-combinations-as-an-applied.pdf> Geraadpleegd op 07-12-22

[19] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fumaric-acid#section=LogP> geraadpleegd op 07-12-22

[20] Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium Dr. J,W,A Klaessens blz. 64 3e druk; geraadpleegd op 08-01-23

[21] Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium Dr. J,W,A Klaessens blz. 257 3e druk; geraadpleegd op 08-01-23

[22] Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium Dr. J,W,A Klaessens blz. 85 3e druk; geraadpleegd op 13-12-22

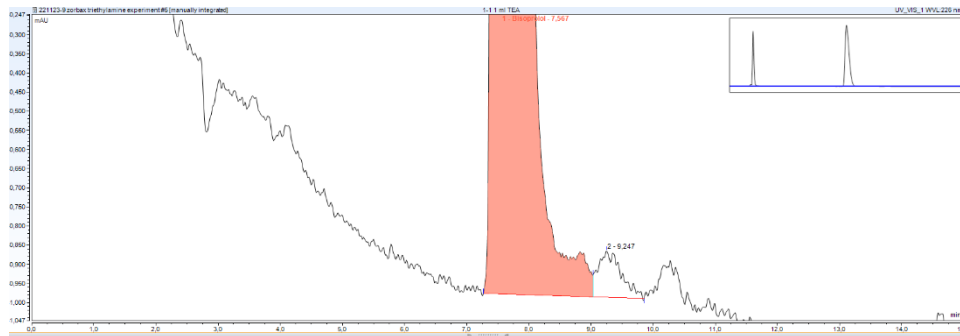
[23] Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium Dr. J,W,A Klaessens blz. 266 3e druk; geraadpleegd op 02-12-22

[24] https://www.researchgate.net/publication/283052643_Common_Reasons_for_HPLC_Retention_Time_Drift_Variation_or_Change Geraadpleegd op 23-01-23

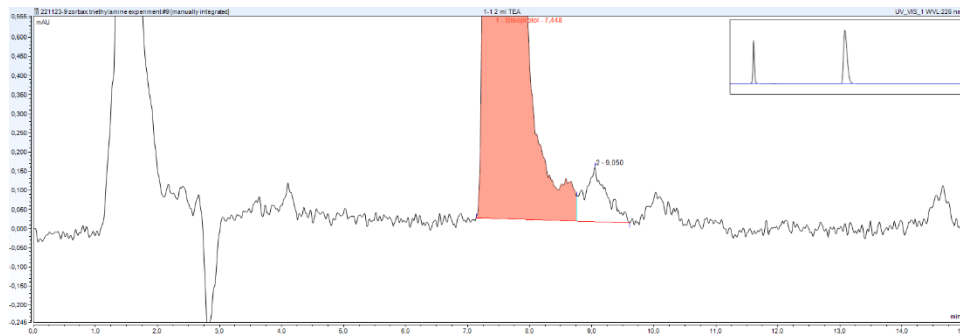
[25] <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001015> Geraadpleegd op 23-01-23

A METHODE-OPTIMALISATIE

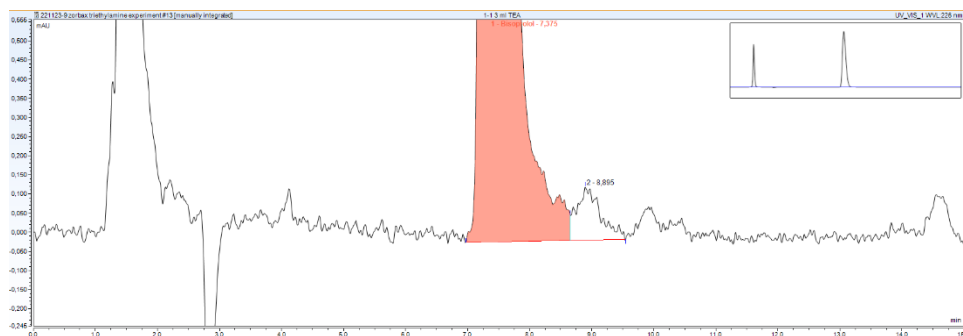
Zorbax TEA



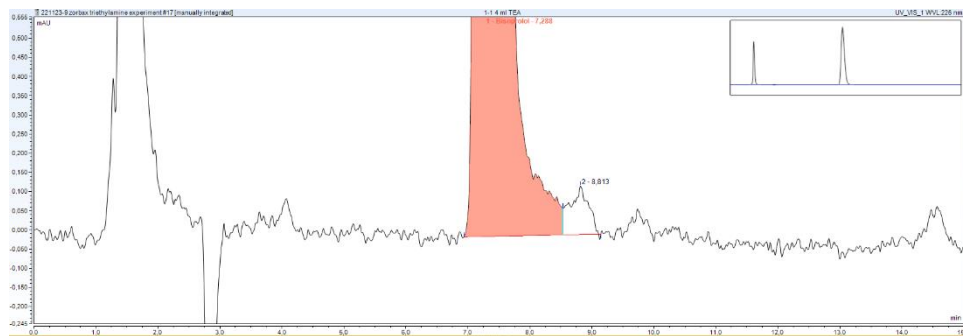
Figuur 35: Chromatogram monster 1,25 mg tablet 25% ACN 75% water buffer pH 3,00 temperatuur 20 graden Celsius; 1 ml triethylamine (Zorbax-kolom)



Figuur 36: Chromatogram monster 1,25 mg tablet 25% ACN 75% water buffer pH 3,00 temperatuur 20 graden Celsius; 2 ml triethylamine (Zorbax-kolom)

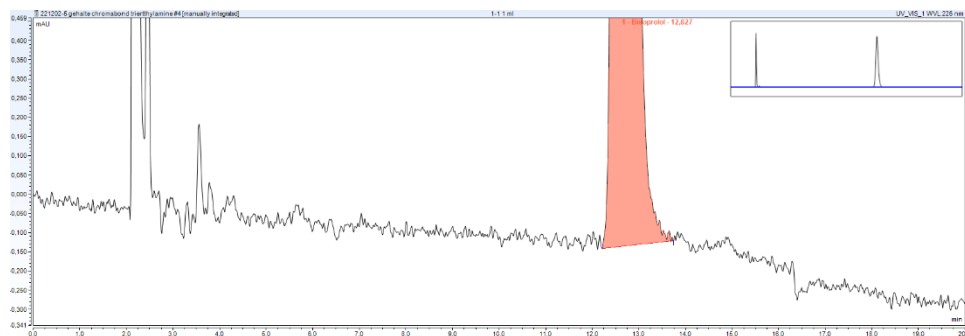


Figuur 37: Chromatogram monster 1,25 mg tablet 25% ACN 75% water buffer pH 3,00 temperatuur 20 graden Celsius; 3 ml triethylamine (Zorbax-kolom)

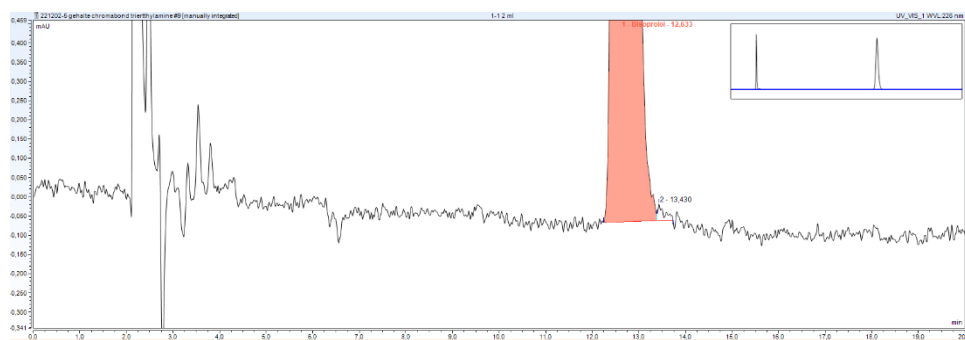


Figuur 38: Chromatogram monster 1,25 mg tablet 25% ACN 75% water buffer pH 3,00 temperatuur 20 graden Celsius; 4 ml triethylamine (Zorbax-kolom)

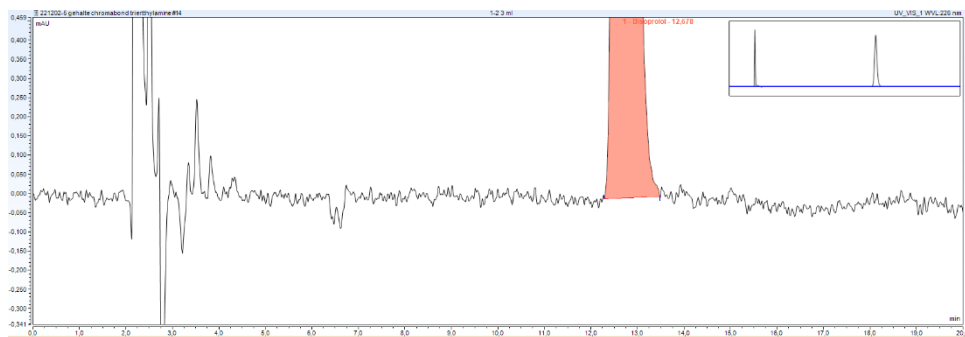
B CHROMABOND TEA



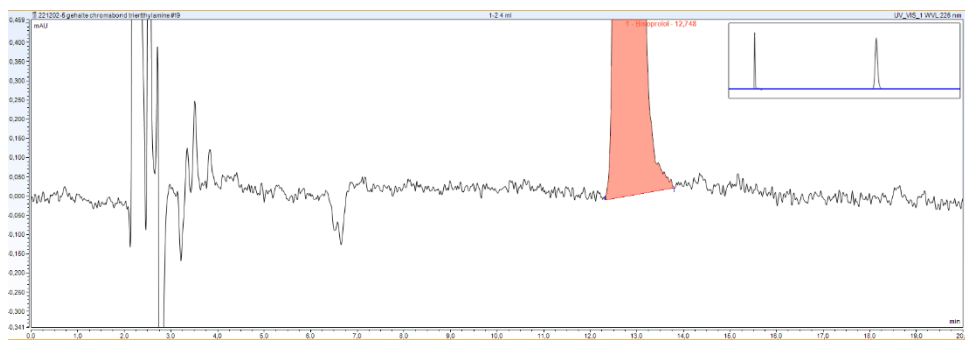
Figuur 39: Chromatogram chromobond-methode toepassing 1 ml TEA



Figuur 40: Chromatogram Chromobond-methode toepassing 2 ml TEA



Figuur 41: Chromatogram Chromobond-methode 1,25 mg tablet BF; 3 ml TEA toegepast



Figuur 42: Chromatogram Chromobond-methode 1,25 mg tablet BF; 4 ml TEA toegepast

C RUWE DATA LINEARITET ASSAY

Path:2022_ Validatie RD\BISOPD\220913-02 Gehalte
220913-3 Gehalte linearity

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:01 PM

RSD gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijls
Uitgewerkt: Thor Reijls
Labjournaal: labj027 blz 88 tm 91
Data bij charge/sampler.: validatie

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Area mAU*min UV_VIS_1 Bisoprolol	RSD %	Manipulated? UV_VIS_1
1	RB2	01	13,09,22 15:52	Blanco	n.a.	n.a.	FALSE
2	RB3	02	13,09,22 16:09	10% 0,5 mg/100 ml	1,398677	n.a.	FALSE
3	RB4	03	13,09,22 16:25	20% 1 mg/100 ml	2,787371	n.a.	TRUE
4	RB5	04	13,09,22 16:42	40% 2 mg/100 ml	5,616731	n.a.	TRUE
5	RB6	05	13,09,22 16:58	60% 3 mg/100 ml	8,340385	n.a.	TRUE
6	RB7	06	13,09,22 17:15	80% 4 mg/100 ml	11,152611	n.a.	TRUE
7	RB8	07	13,09,22 17:31	100% 5 mg/100 ml	13,934519	n.a.	TRUE
8	RC1	08	13,09,22 17:47	120% 6 mg/100 ml	16,779692	n.a.	TRUE
9	RC2	09	13,09,22 18:04	140% 7 mg/100 ml	19,523008	n.a.	TRUE
10	RC3	10	13,09,22 18:20	150% 7,5 mg/100 ml	20,827793	n.a.	TRUE
11	RC4	11	13,09,22 18:36	160% 8 mg/100 ml	22,261133	n.a.	FALSE
12	RC5	12	13,09,22 18:53	180% 9 mg/100 ml	24,945942	n.a.	TRUE
13	RC6	13	13,09,22 19:09	200% 10 mg/100 ml	27,777941	n.a.	TRUE
14	RC7	14	13,09,22 19:26	Blanco	n.a.	n.a.	FALSE
15	RC8	14	13,09,22 19:42	Blanco	n.a.	n.a.	FALSE
16	RD1	15	13,09,22 19:58	200% 10 mg/100 ml	27,805032	n.a.	TRUE
17	RD2	16	13,09,22 20:15	180% 9 mg/100 ml	24,949539	n.a.	TRUE
18	RD3	17	13,09,22 20:31	160% 8 mg/100 ml	22,469377	n.a.	TRUE
19	RD4	18	13,09,22 20:47	150% 7,5 mg/100 ml	20,933709	n.a.	TRUE
20	RD5	18	13,09,22 21:04	140% 7 mg/100 ml	19,535576	4,89	TRUE
21	RD6	19	13,09,22 21:20	120% 6 mg/100 ml	16,781529	n.a.	TRUE
22	RD7	20	13,09,22 21:37	100% 5 mg/100 ml	13,957172	n.a.	TRUE
23	RD8	21	13,09,22 21:53	80% 4 mg/100 ml	11,129150	n.a.	TRUE
24	RE1	22	13,09,22 22:09	60% 3 mg/100 ml	8,362977	n.a.	TRUE
25	RE2	23	13,09,22 22:26	40% 2 mg/100 ml	5,627456	n.a.	TRUE
26	RE3	23	13,09,22 22:42	20% 1 mg/100 ml	2,804814	47,34	TRUE
27	RE4	24	13,09,22 22:59	10% 0,5 mg/100 ml	1,421050	n.a.	TRUE
28	RE5	25	13,09,22 23:15	Blanco	n.a.	n.a.	FALSE
29	RE6	25	13,09,22 23:31	Blanco	n.a.	n.a.	n.a.

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,500 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...8,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
8,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels
14,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels

Figuur 43: Ruwe data lineariteit assay

C1: REGRESSIE-ANALYSE GEHALTE STANDAARDEN OPLOPEND GEMETEN

SAMENVATTING UITVOER

<i>Gegevens voor de regressie</i>	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt	
R	0,999986134
R-kwadraat	0,999972269
Aangepaste kleinste kwadraat	0,999969495
Standaardfout	0,048578036
Waarnemingen	12

Variantieanalyse

	<i>Vrijheidsgraden</i>	<i>Kwadratensom</i>	<i>Gemiddelde kwadraten</i>	<i>F</i>	<i>Significantie F</i>
Regressie	1	850,9319294	850,9319294	360591,03	4,03618E-24
Storing	10	0,023598256	0,002359826		
Totaal	11	850,9555277			

	<i>Coëfficiënten</i>	<i>Standaardfout</i>	<i>T- statistische gegevens</i>	<i>P-waarde</i>	<i>Laagste 95%</i>	<i>Hoogste 95%</i>
Snijpunt	0,045425884	0,027999019	1,622409844	0,1357808	-0,016959818	0,107812
Variabele X 1	2,789374429	0,004645146	600,4923201	4,036E-24	2,779024399	2,799724

BIJLAGE C2: REGRESSIE-ANALYSE GEHALTE STANDAARDEN AFLOPEND GEMETEN

SAMENVATTING UITVOER

<i>Gegevens voor de regressie</i>	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,999963736
R-kwadraat	0,999927474
Aangepaste kleinste kwadraat	0,999920221
Standaardfout	0,078752573
Waarnemingen	12

Variantieanalyse

	<i>Vrijheidsgraden</i>	<i>Kwadratensom</i>	<i>Gemiddelde kwadraten</i>	<i>F</i>	<i>Significantie F</i>
Regressie	1	855,07261	855,07261	137871,18	4,93843E-22
Storing	10	0,062019678	0,006201968		
Totaal	11	855,1346297			

	<i>Coëfficiënten</i>	<i>Standaardfout</i>	<i>T- statistische gegevens</i>	<i>P-waarde</i>	<i>Laagste 95%</i>	<i>Hoogste 95%</i>
Snijpunt	0,041062453	0,045390777	0,904643095	0,3869299	-0,060074501	0,142199
Variabele X 1	2,796152816	0,007530506	371,3100842	4,938E-22	2,779373803	2,812932

BIJLAGE C3: REGRESSIE-ANALYSE GEMIDDELDE ASSAY

SAMENVATTING UITVOER

<i>Gegevens voor de regressie</i>	
Meervoudige correlatiecoëfficiënt	
R	0,999979023
R-kwadraat	0,999958047
Aangepaste kleinste kwadraat	0,999953852
Standaardfout	0,059822413
Waarnemingen	12

Variantieanalyse

	<i>Vrijheidsgraden</i>	<i>Kwadratensom</i>	<i>Gemiddelde kwadraten</i>	<i>F</i>	<i>Significantie F</i>
Regressie	1	853,0010135	853,0010135	238353,59	3,19822E-23
Storing	10	0,035787211	0,003578721		
Totaal	11	853,0368007			

	<i>Coëfficiënten</i>	<i>Standaardfout</i>	<i>T- statistische gegevens</i>	<i>P-waarde</i>	<i>Laagste 95%</i>	<i>Hoogste 95%</i>	<i>Laagste 95,0%</i>
Snijpunt	0,043244169	0,034479963	1,254182576	0,2382995	-0,033581976	0,12007	-0,03358198
Variabele X 1	2,792763622	0,00572036	488,2146964	3,198E-23	2,780017867	2,805509	2,780017867

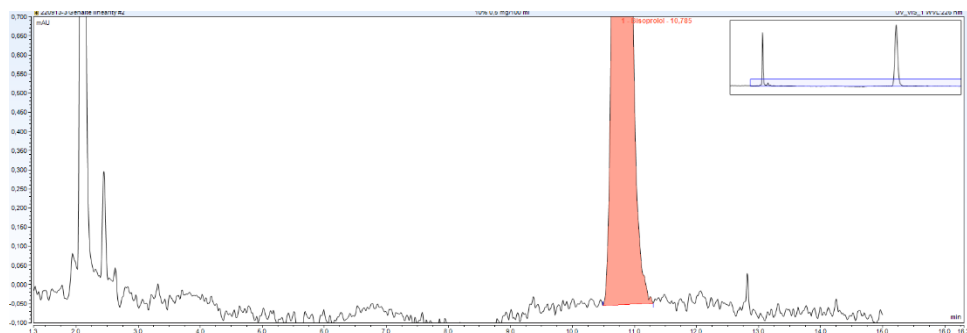
BIJLAGE C4: STORINGEN REGRESSIE-ANALYSES ASSAY OPLOPENDE EN AFLOPENDE CONCENTRATIES GEMETEN

<i>Waar neming</i>	Oplopende concentratie			Aflopende concentratie		
	<i>Voorspelde Y</i>	<i>Storingen</i>	<i>Standaard Storingen</i>	<i>Voorspelde Y</i>	<i>Storingen</i>	<i>Standaard storingen</i>
1	1,431369451	-0,032369451	-0,698862472	1,430373965	-0,00437	-0,058251476
2	2,817313017	-0,019313017	-0,416971642	2,819685478	-0,02569	-0,342073348
3	5,58920015	0,01379985	0,297941322	5,598308503	0,009691	0,129069156
4	8,361087284	-0,034087284	-0,735950805	8,376931527	-0,03393	-0,451892361
5	11,13297442	0,007025583	0,151683649	11,15555455	-0,03655	-0,486825208
6	13,90486155	0,01713845	0,370022328	13,93417758	-0,00318	-0,042318249
7	16,67674868	0,082251317	1,775821254	16,7128006	0,052199	0,695179704
8	19,44863582	0,055364184	1,195323039	19,49142363	0,033576	0,447162497
9	20,83457938	-0,003579383	-0,077279546	20,88073514	0,067265	0,895818108
10	22,22052295	0,04047705	0,87390706	22,27004665	0,159953	2,130222292
11	24,99241008	-0,085410083	-1,8440196	25,04866968	-0,12967	-1,726911241
12	27,76429722	-0,041297216	-0,891614586	27,8272927	-0,08929	-1,189179874

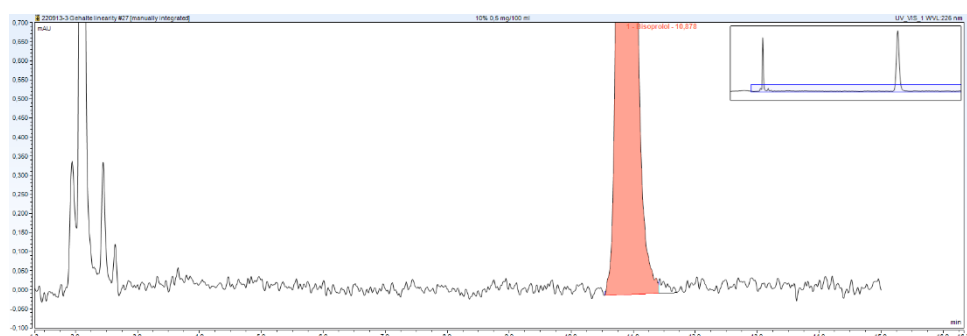
BIJLAGE C5 (VERVOLG): STORINGEN REGRESSIE-ANALYSES ASSAY GEMIDDELDE

<i>Waarneming</i>	gemiddelde concentratie		
	<i>Voorspelde Y</i>	<i>Storingen</i>	<i>Standaardstoringen</i>
1	1,430871708	-0,018371708	-0,322093494
2	2,818499248	-0,022499248	-0,394457676
3	5,593754327	0,011745673	0,2059256
4	8,369009406	-0,034009406	-0,59625421
5	11,14426448	-0,014764485	-0,258851513
6	13,91951956	0,006980436	0,122381281
7	16,69477464	0,067225357	1,178597559
8	19,47002972	0,044470278	0,779654636
9	20,85765726	0,031842739	0,558268127
10	22,2452848	0,100215199	1,756976742
11	25,02053988	-0,10753988	-1,885393318
12	27,79579496	-0,065294959	-1,144753733

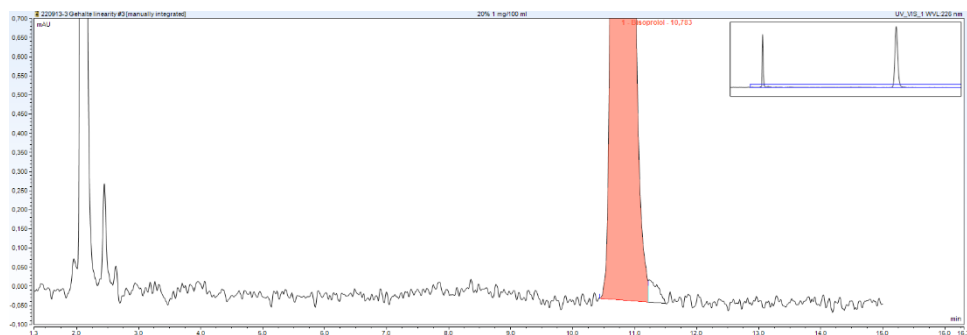
C6 CHROMATOGRAMMEN



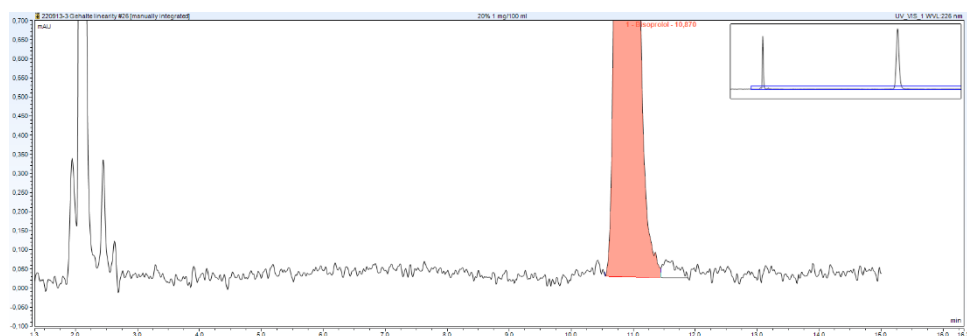
Figuur 44: Chromatogram standaard 0,5 mg/100 ml



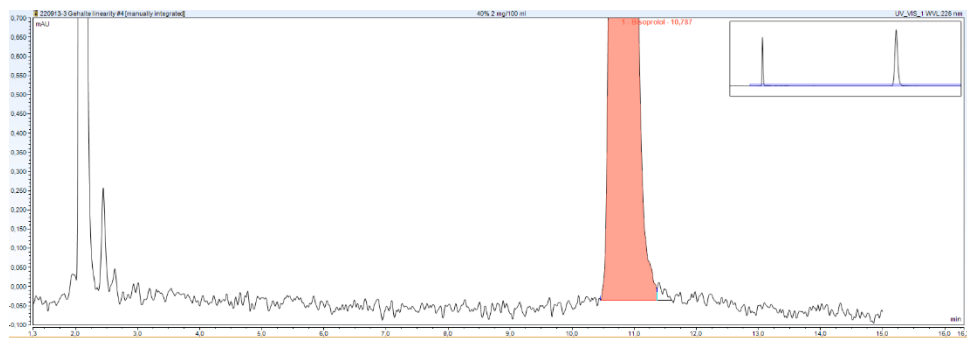
Figuur 45: Chromatogram standaard 0,5 mg/100 ml 2e meting



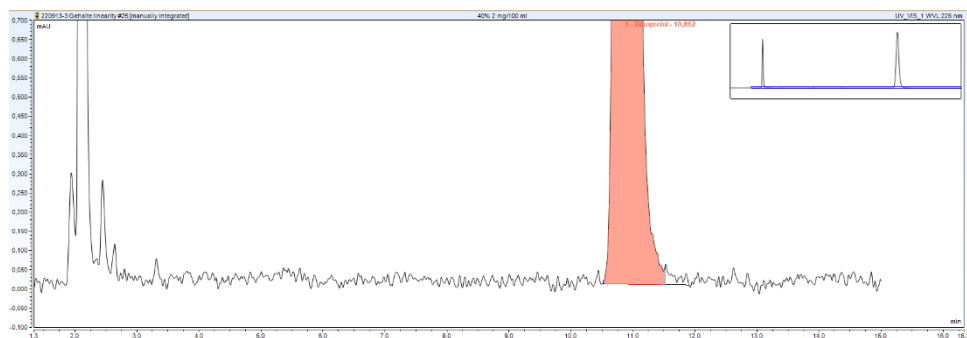
Figuur 46: Chromatogram standaard 1,0 mg/100 ml



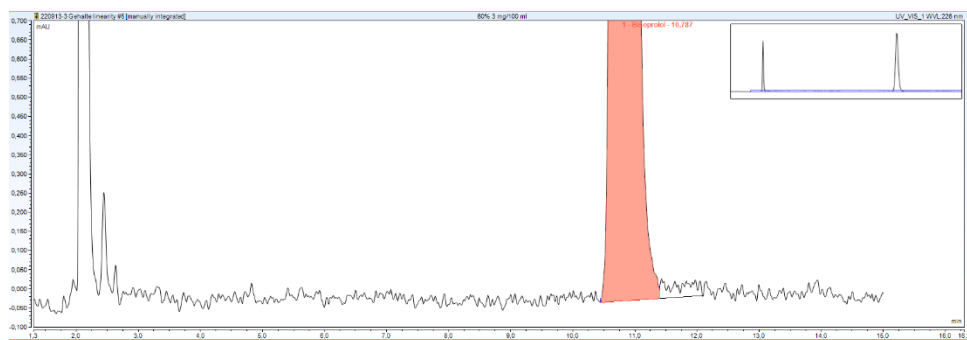
Figuur 47: Chromatogram standaard 1,0 mg/100 ml 2e meting



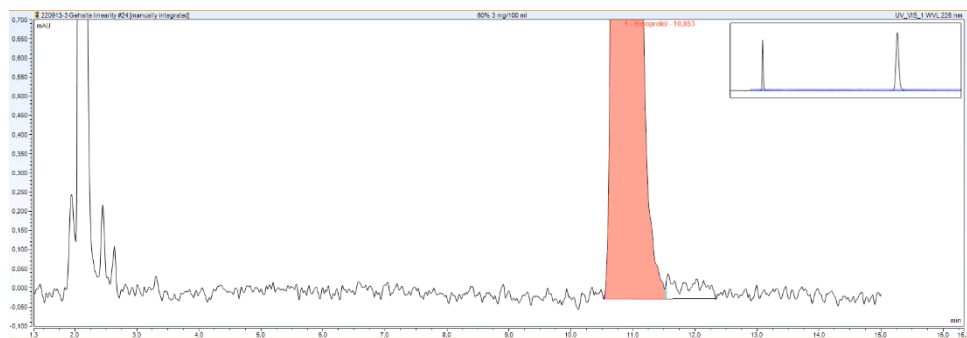
Figuur 48: Chromatogram standaard 2,0 mg/100 ml



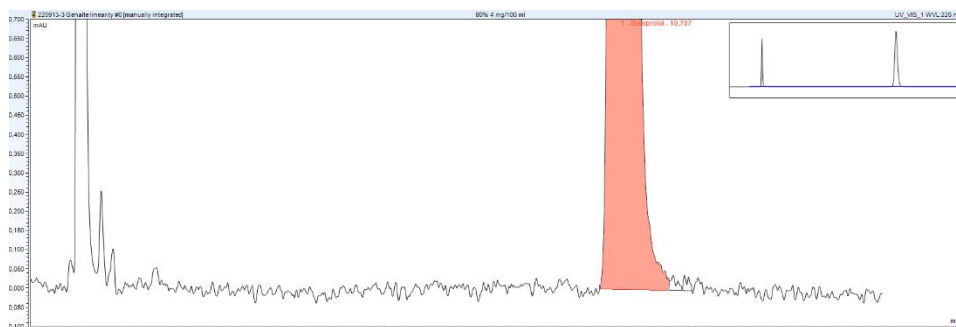
Figuur 49: Chromatogram standaard 2,0 mg/100 ml 2e meting



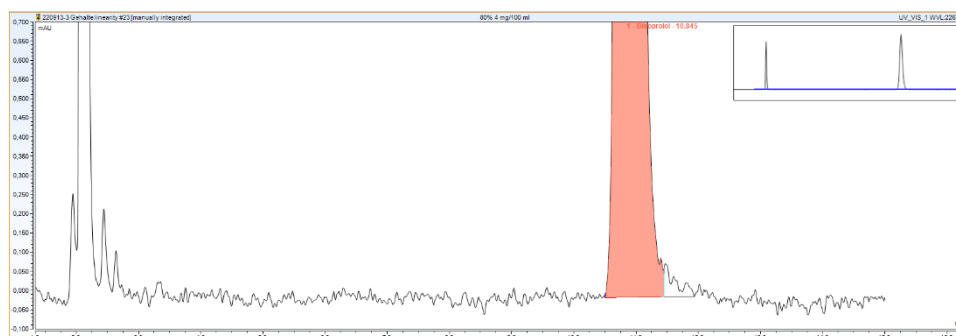
Figuur 4: Chromatogram standaard 3,0 mg/100 ml



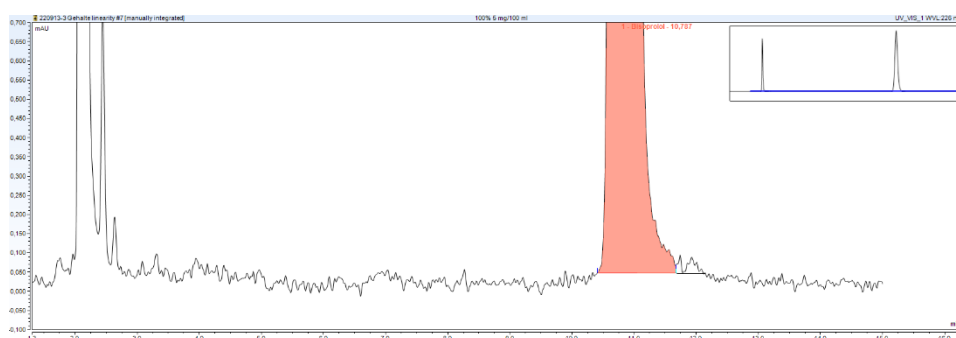
Figuur 51: Chromatogram standaard 3,0 mg/100 ml 2e meting



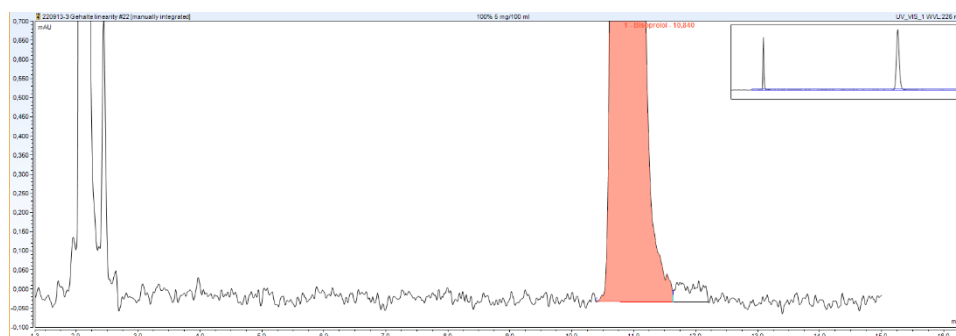
Figuur 52: Chromatogram standaard 4,0 mg/100 ml



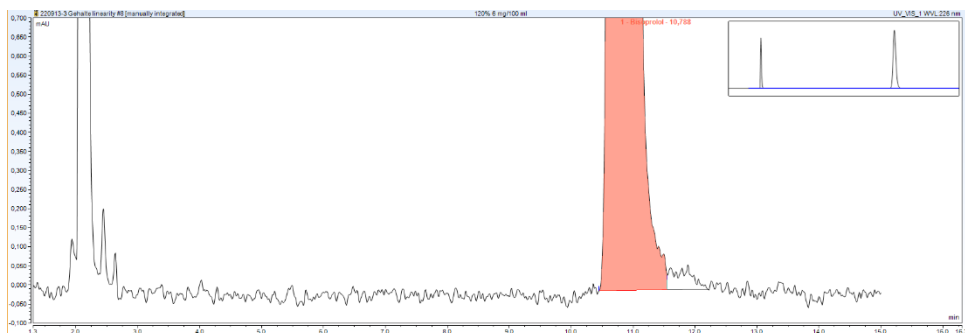
Figuur 53: Chromatogram standaard 4,0 mg/100 ml 2e meting



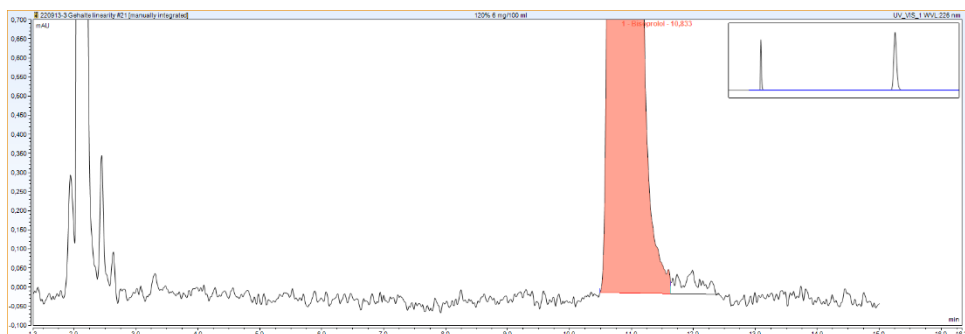
Figuur 54: Chromatogram standaard 5,0 mg/100 ml



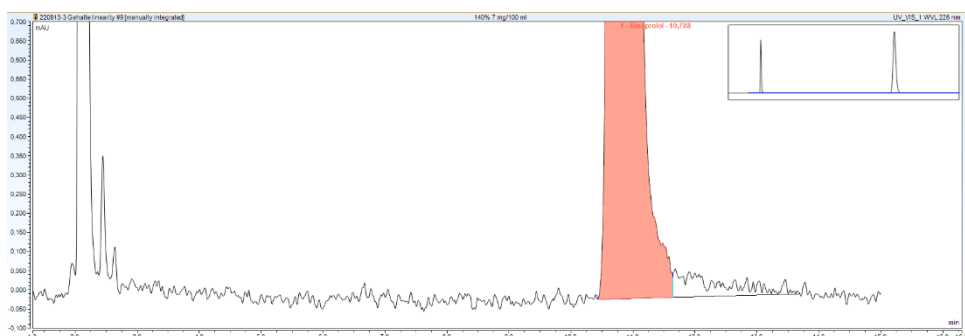
Figuur 55: Chromatogram standaard 5,0 mg/100 ml 2e meting



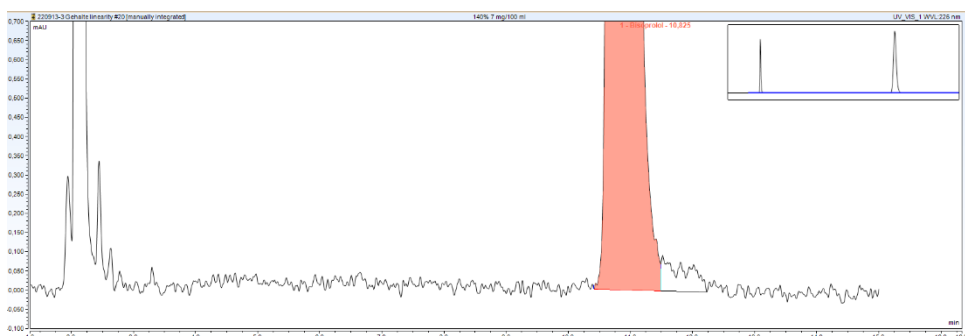
Figuur 56: Chromatogram standaard 6,0 mg/100 ml



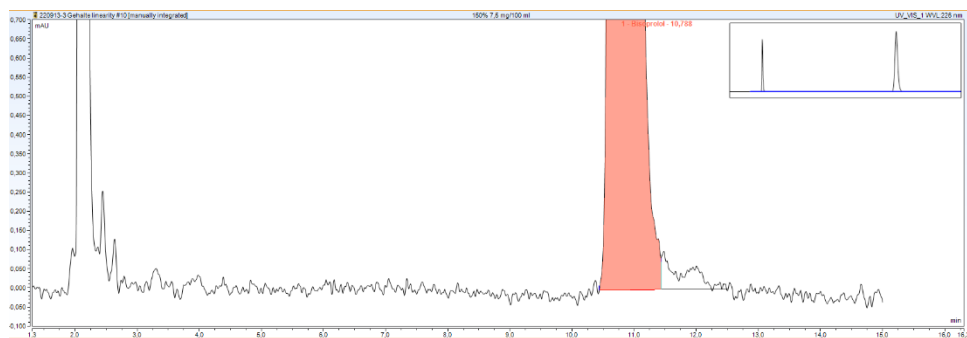
Figuur 57: Chromatogram standaard 6,0 mg/100 ml 2e meting



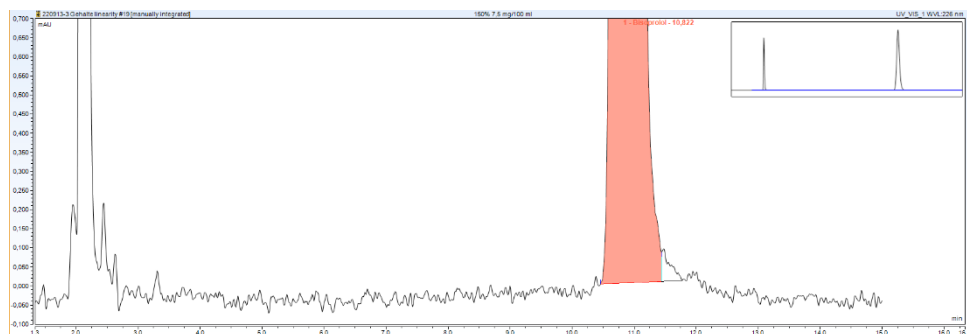
Figuur 58: Chromatogram standaard 7,0 mg/100 ml



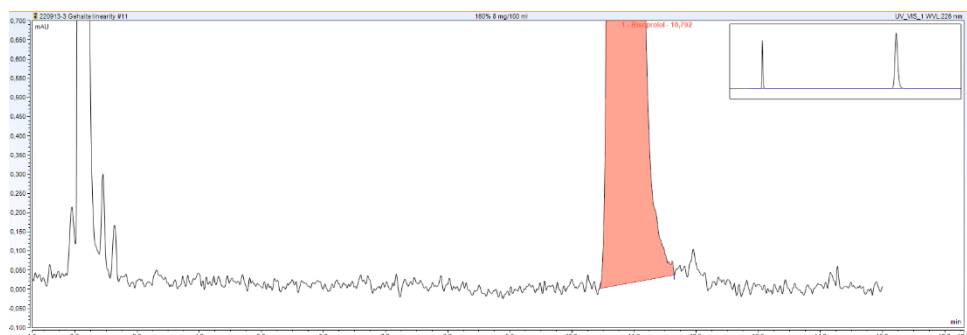
Figuur 59: Chromatogram standaard 7,0 mg/100 ml 2e meting



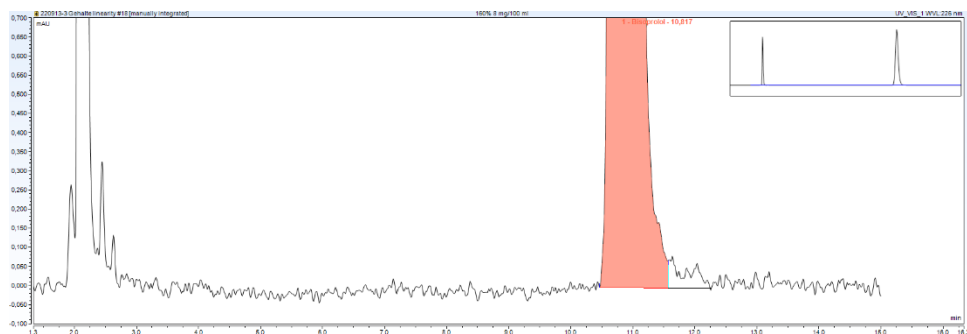
Figuur 5: Chromatogram standaard 7,5 mg/100 ml



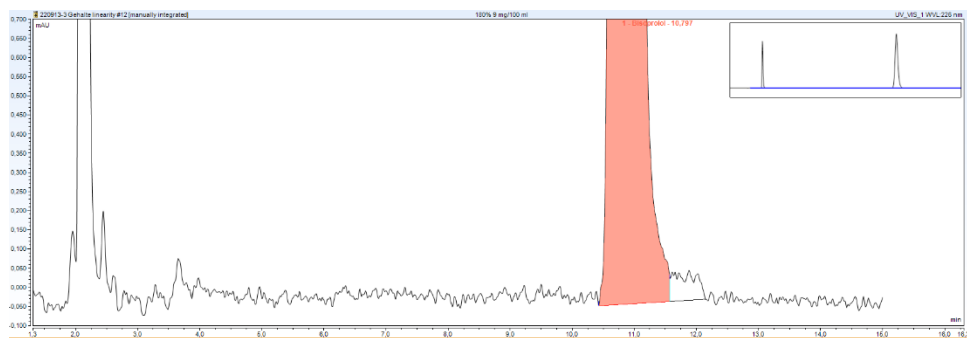
Figuur 6: Chromatogram standaard 7,5 mg/100 ml 2e meting



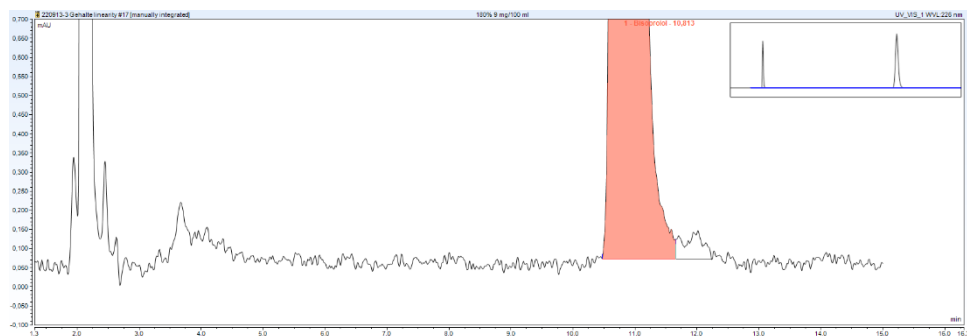
Figuur 62: Chromatogram standaard 8,0 mg/100 ml



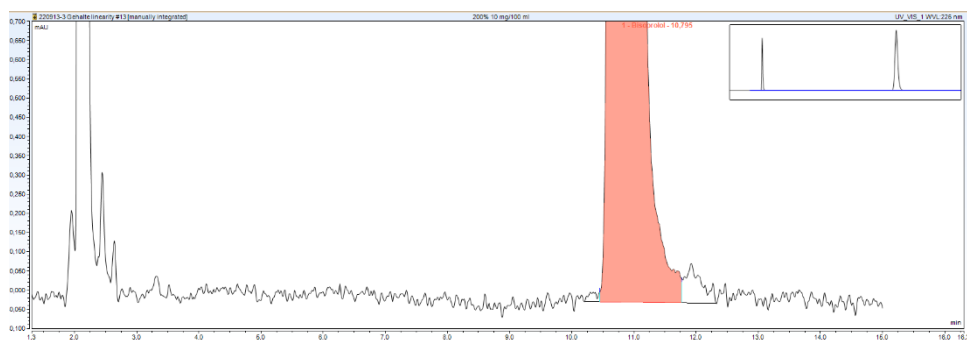
Figuur 63: Chromatogram standaard 8,0 mg/100 ml 2e meting



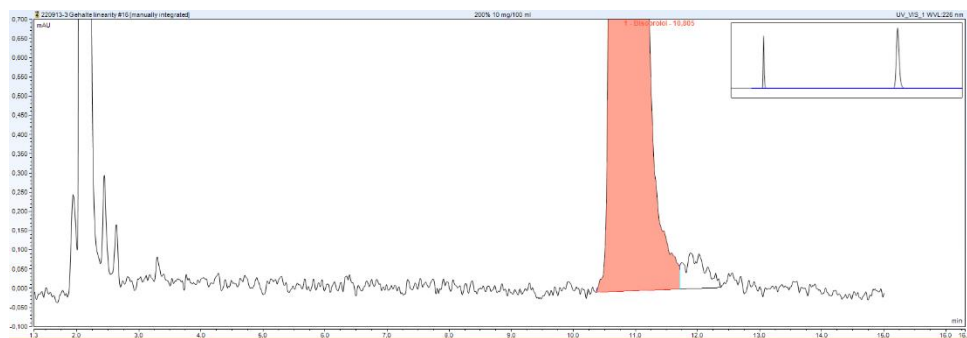
Figuur 64: Chromatogram standaard 9,0 mg/100 ml



Figuur 65: Chromatogram standaard 9,0 mg/100 ml 2e meting



Figuur 66: Chromatogram standaard 10,0 mg/100 ml



Figuur 67: Chromatogram standaard 10,0 mg/100 ml 2e meting

D: RUWE DATA ACCURACY

Path: 2022\Validatie RD\BISOPD\220913-02 Gehalte
220914-1 Gehalte accuracy

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:02 PM

RSD gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

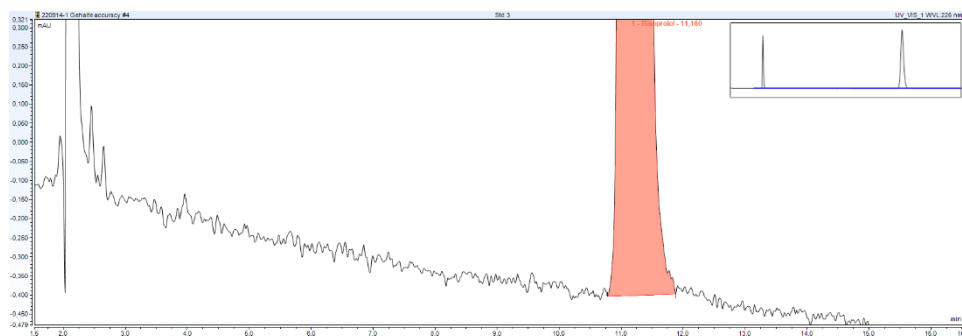
Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijs
Uitgewerkt: Thor Reijs
Labjournaal: labj027 biz 91 tm 95 en biz 104
Data bij charge/samplenr.: Validatie

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Area mAU*min UV_VIS_1 Bisoprolol	RSD %	Manipulated? UV_VIS_1
1	RE7	01	14,09,22 17:14	blank	n.a.		FALSE
2	RE8	01	14,09,22 17:30	blank	n.a.		FALSE
3	GA1	01	14,09,22 17:47	blank	n.a.	n.a.	FALSE
4	GA2	02	14,09,22 18:03	Std 3	14,007358		FALSE
5	GA3	02	14,09,22 18:19	Std 3	14,008981	0,01	FALSE
6	GA4	03	14,09,22 18:36	1,25 mg 50% spike BF	6,937419	n.a.	TRUE
7	GA5	04	14,09,22 18:52	10 mg 50% spike BF	5,600154	n.a.	FALSE
8	GA6	05	14,09,22 19:08	1,25 mg 100% spike BF	13,923501	n.a.	TRUE
9	GA7	06	14,09,22 19:25	10 mg 100% spike BF	11,139588	n.a.	FALSE
10	GA8	07	14,09,22 19:41	1,25 150% spike BF	20,704180	n.a.	TRUE
11	GB1	08	14,09,22 19:58	10 150% spike BF	16,787096	n.a.	TRUE
12	GB2	09	14,09,22 20:14	Std 4	14,284594		FALSE
13	GB3	09	14,09,22 20:30	Std 4	14,306036	0,11	TRUE
14	GB4	10	14,09,22 20:45	blank	n.a.	n.a.	n.a.
15	GB5	11	14,09,22 20:46	low flow	n.a.	n.a.	n.a.

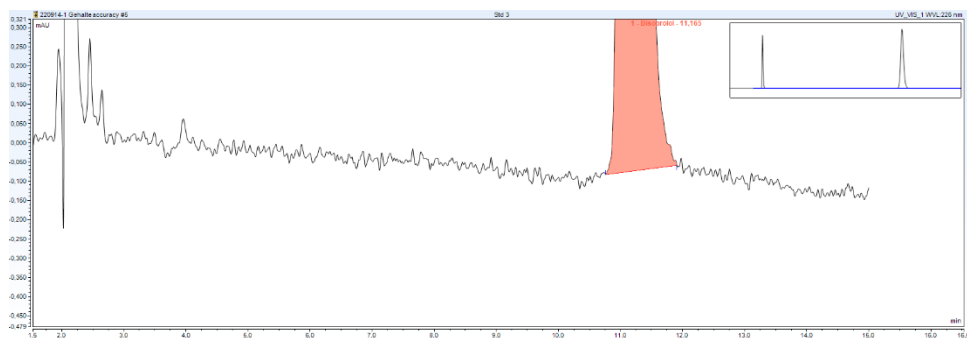
Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,500 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...8,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
8,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels
14,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels

Figuur 68: ruwe data 1,25 mg voor de accuracy van 1,25 mg en 10 mg tabletten BF

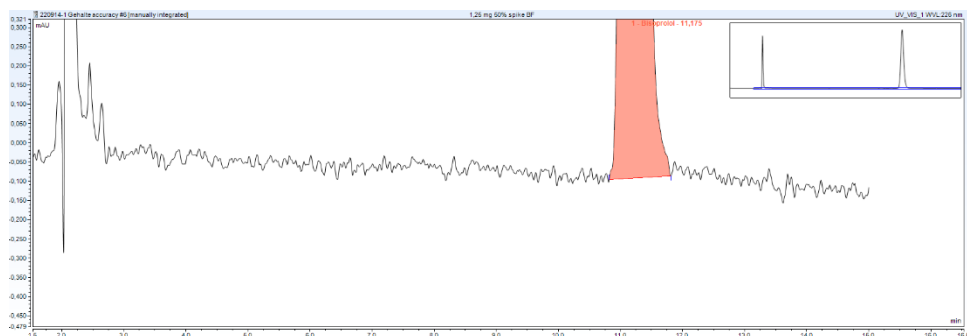
D1 CHROMATOGRAMMEN



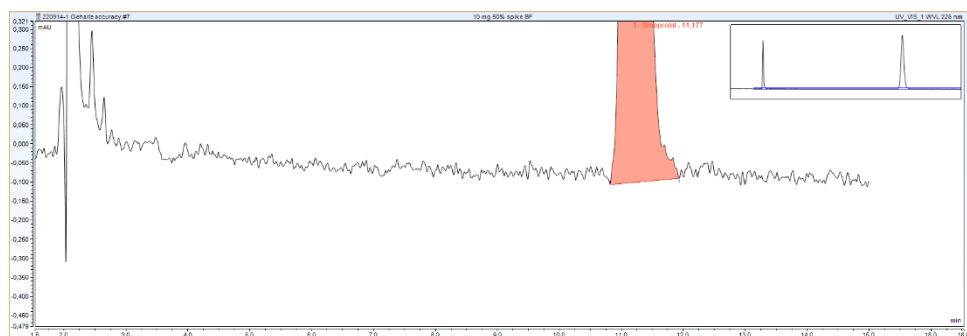
Figuur 69: Chromatogram standaard 1 voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg en 10 mg tabletten



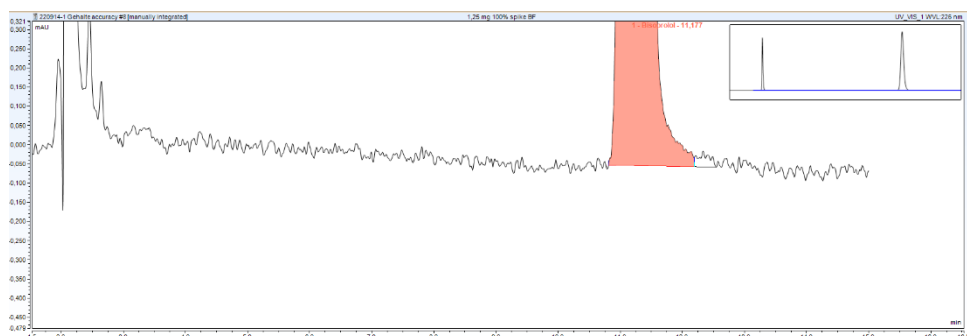
Figuur 70: Chromatogram standaard 1 duplo voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg en 10 mg tabletten



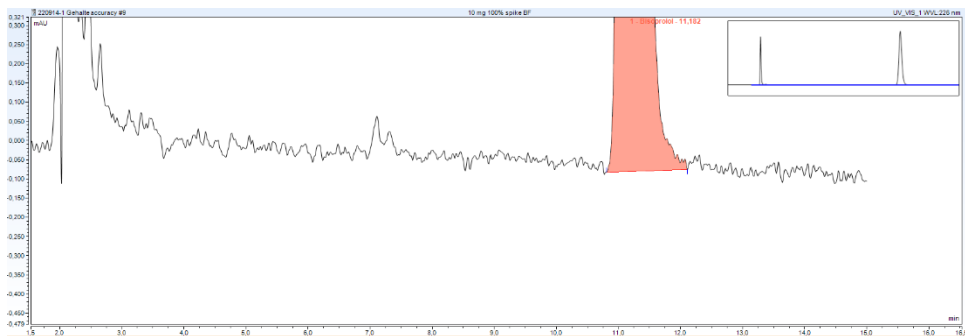
Figuur 71: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg tabletten 50% BF gespiked



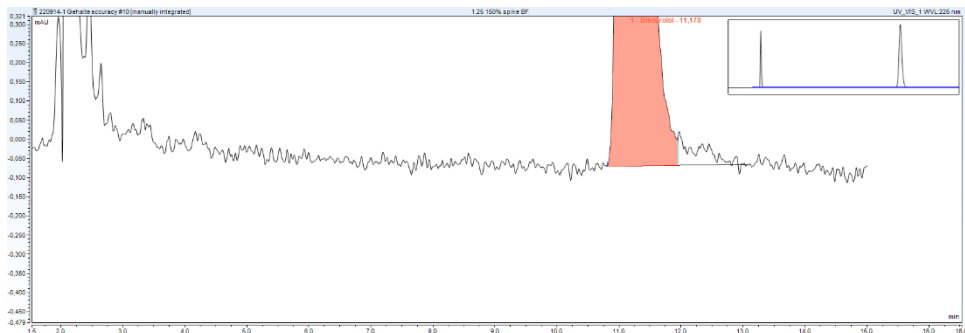
Figuur 72: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 10 mg tabletten 50% BF gespiked



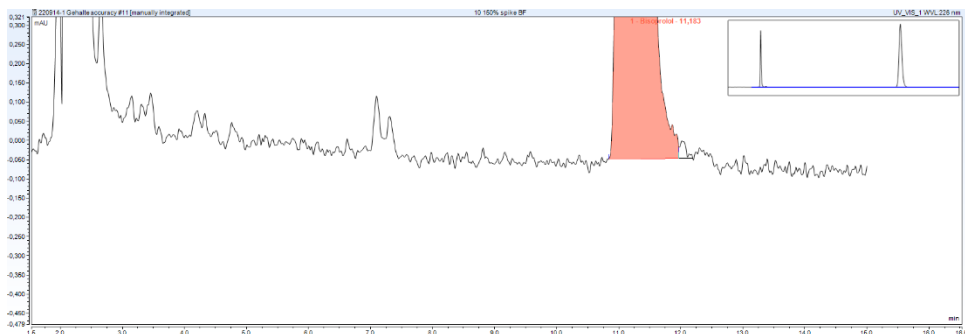
Figuur 7: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg tabletten 100% BF gespiked



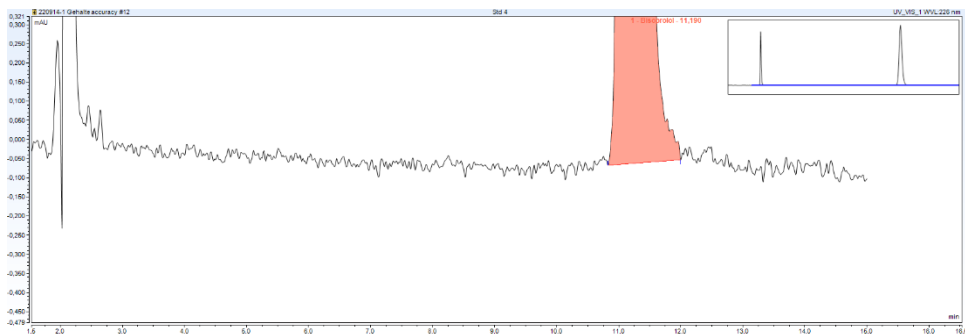
Figuur 8: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 10 mg tabletten 100% BF gespiked



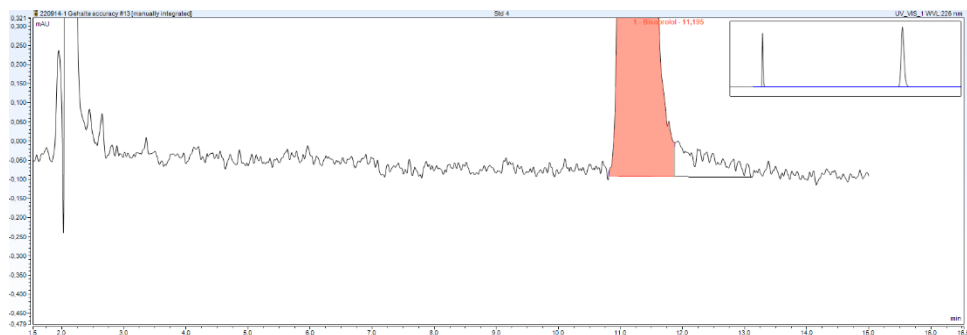
Figuur 75: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg tabletten 150% BF gespiked



Figuur 76: Chromatogram voor de bepaling van de accuracy van 10 mg tabletten 150% BF gespiked



Figuur 9: Chromatogram standaard 2 voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg en 10 mg tabletten



Figuur 78: Chromatogram standaard 2 duplo voor de bepaling van de accuracy van 1,25 mg en 10 mg tabletten

E RUWE DATA HERHAALBAARHEID 1,25 MG

Path:2022_Validatie RD\BISOPD\220913-02 Gehalte
220923-1 gehalte repeatability 1_25 retest

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:03 PM

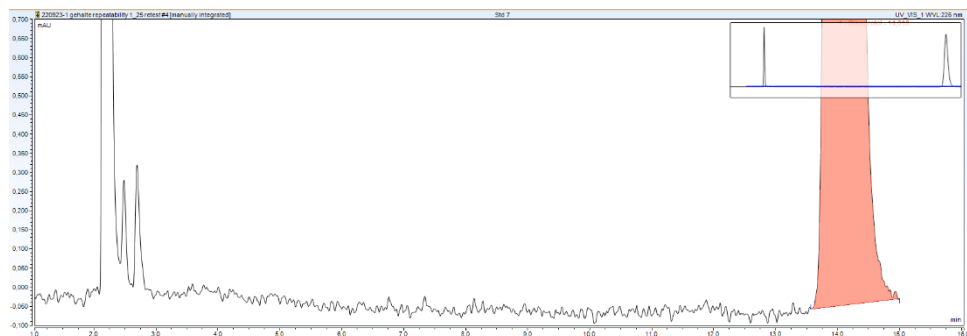
RSD gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijjs
Uitgewerkt: Thor Reijjs
Labjournaal: Labj 027 blz 109 tm blz 111
Data bij charge/samplenr.: validatie

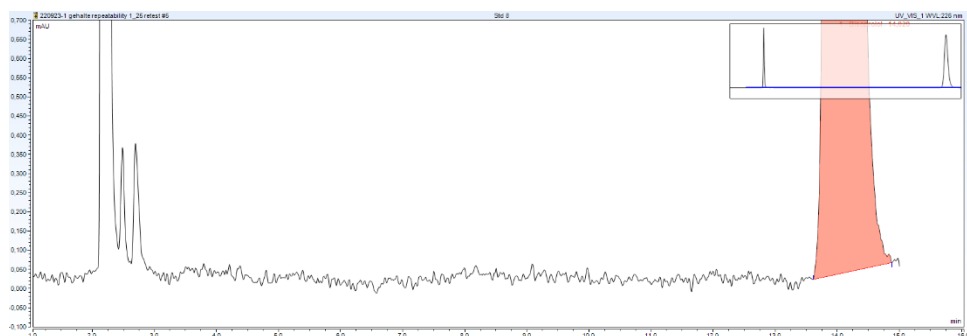
Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Area mAU*min UV_VIS_1 Bisoprolol	RSD %	Manipulated? UV_VIS_1
1	BC6	01	23,09,22 14:10	blanco	n.a.		FALSE
2	BC7	01	23,09,22 14:27	blanco	n.a.		FALSE
3	BC8	01	23,09,22 14:43	blanco	n.a.	n.a.	FALSE
4	BD1	02	23,09,22 15:00	Std 7	13,456205		TRUE
5	BD2	02	23,09,22 15:16	Std 8	13,513760	0,30	FALSE
6	BD3	03	23,09,22 15:33	B20531-1	13,725502		FALSE
7	BD4	03	23,09,22 15:51	B20531-2	13,546384		TRUE
8	BD5	03	23,09,22 16:10	B20531-3	13,452161		TRUE
9	BD6	03	23,09,22 16:29	B20531-4	13,609031		TRUE
10	BD7	03	23,09,22 16:48	B20531-5	13,492486		TRUE
11	BD8	03	23,09,22 17:07	B20531-6	13,322388	1,02	TRUE
12	BE1	04	23,09,22 17:26	Std 7	13,516822		TRUE
13	BE2	04	23,09,22 17:45	Std 8	13,534071	0,09	TRUE
14	BE3	05	23,09,22 18:04	Blanco	n.a.	n.a.	FALSE
	Ret. Time	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel		
	min						
	<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels		
	<Initial>	Smoothing Width	0,500 [min]	Any	All Channels		
	<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels		
	0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels		
	0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels		
	6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels		

Figuur 79: ruwe data voor de herhaalbaarheid van de 1,25 mg tabletten BF

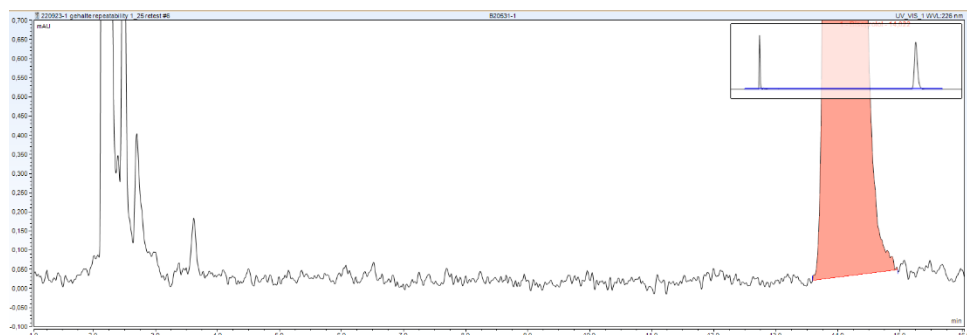
E1 CHROMATOGRAMMEN



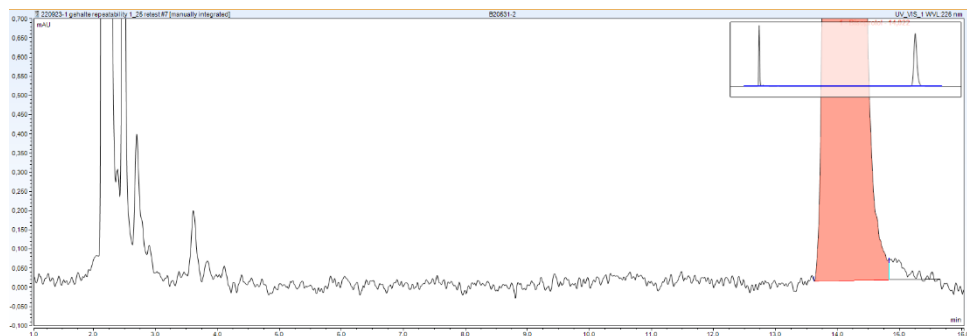
Figuur 80: chromatogram standaard voor bepaling van de slope voor de herhaalbaarheid van 1,25 mg tabletten



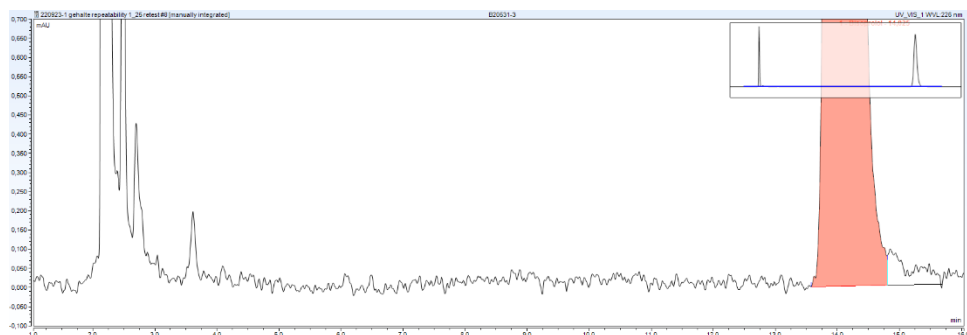
Figuur 10: chromatogram standaard voor bepaling van de slope voor de herhaalbaarheid van 1,25 mg tabletten



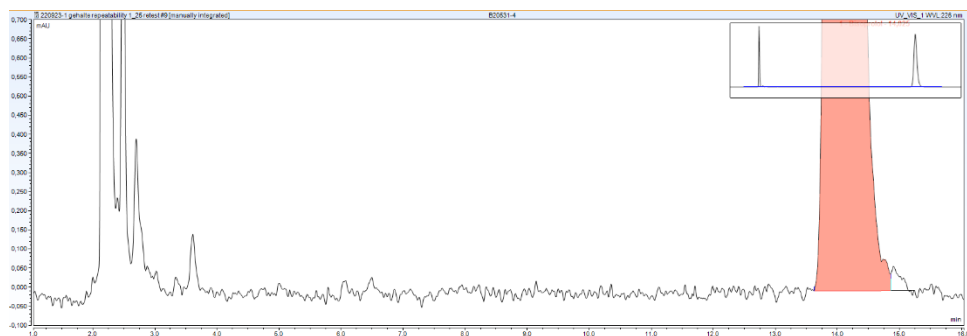
Figuur 82: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 1e opwerking



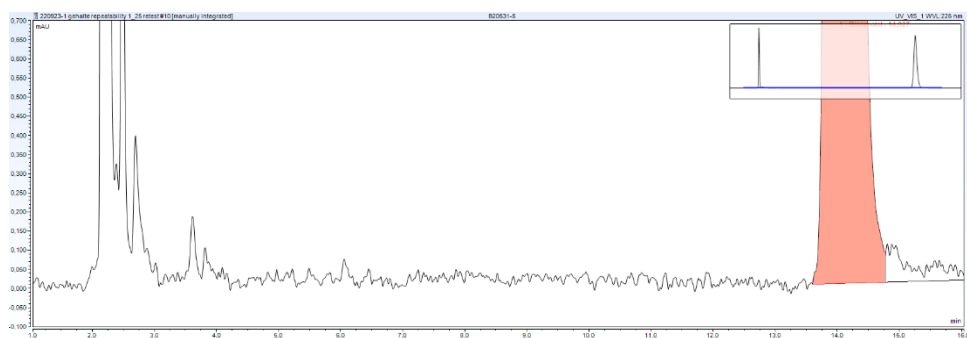
Figuur 83: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 2e opwerking



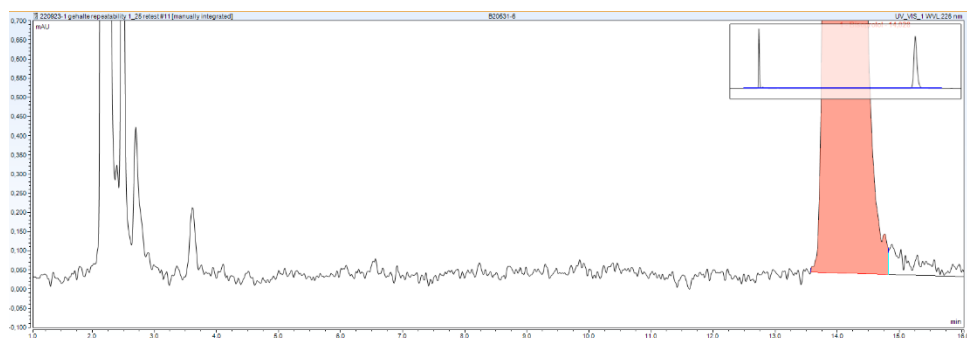
Figuur 84: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 3e opwerking



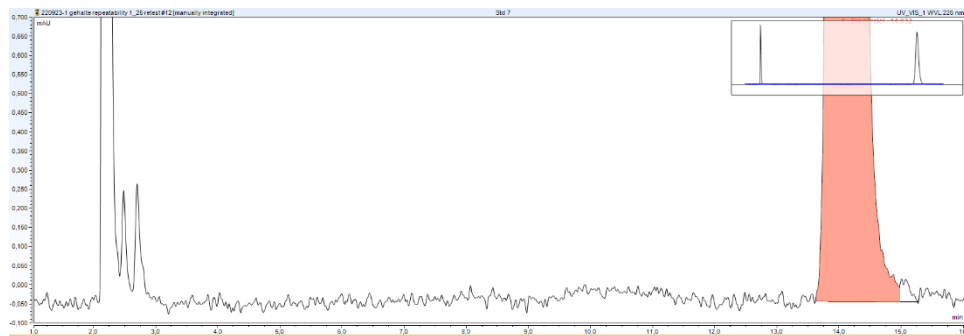
Figuur 85: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 4e opwerking



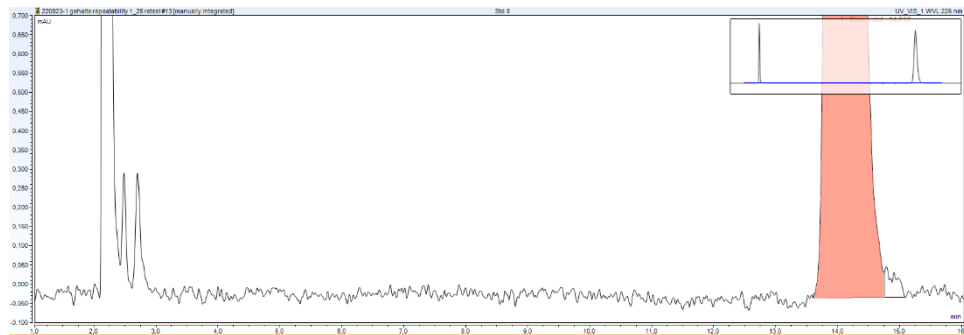
Figuur 86: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 5e opwerking



Figuur 87: Chromatogram herhaalbaarheid 1,25 mg tablet BF 6e opwerking



Figuur 88: chromatogram standaard voor bepaling van de slope voor de herhaalbaarheid van 1,25 mg tabletten (sequence afsluiten)



Figuur 89: chromatogram standaard voor bepaling van de slope voor de herhaalbaarheid van 1,25 mg tabletten (sequence afsluiten)

F RUWE DATA HERHAALBAARHEID 2,50 EN 3,75 MG

Path: 2022\Validatie RD\BISOPD\221010-02 Gehalte TR
221014-6 gehalte repeatability 2,50 mg en 3,75 mg

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:07 PM

RSD gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml/min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijls
Uitgewerkt: Thor Reijls
Labjournaal: labj027 blz 123 t/m blz126
Data bij charge/samplenr.: validatie

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Area mAU*min UV_VIS_1 Bisoprolol	RSD %	Manipulated? UV_VIS_1
1	GA1	01	14,10,22 17:21	blanco	n.a.		FALSE
2	GA2	01	14,10,22 17:42	blanco	n.a.		FALSE
3	GA3	01	14,10,22 18:04	blanco	n.a.		FALSE
4	GA4	02	14,10,22 18:25	std 7	13,344072	n.a.	TRUE
5	GA5	02	14,10,22 18:47	Std 8	14,119556	3,99	TRUE
6	GA6	03	14,10,22 19:08	D10997-1	13,756198		TRUE
7	GA7	03	14,10,22 19:29	D10997-2	13,832291		TRUE
8	GA8	03	14,10,22 19:51	D10997-3	13,759346		TRUE
9	GB1	03	14,10,22 20:12	D10997-4	13,695509		TRUE
10	GB2	03	14,10,22 20:33	D10997-5	11,119838		TRUE
11	GB3	03	14,10,22 20:55	D10997-6	13,814938	8,13	TRUE
12	GB4	04	14,10,22 21:16	Std 7	13,395853		TRUE
13	GB5	04	14,10,22 21:38	Std 8	14,125844	3,75	TRUE
14	GB6	05	14,10,22 21:59	B11063-1	20,451044		TRUE
15	GB7	05	14,10,22 22:20	B11063-2	20,404160		TRUE
16	GB8	05	14,10,22 22:42	B11063-3	20,498777		TRUE
17	GC1	05	14,10,22 23:03	B11063-4	20,721115		TRUE
18	GC2	05	14,10,22 23:24	B11063-5	20,787539		TRUE
19	GC3	05	14,10,22 23:46	B11063-6	20,661319	0,76	TRUE
20	GB4	06	15,10,22 00:07	Std 7	13,392087		TRUE
21	GB4	06	15,10,22 00:29	Std 7	13,409943	0,09	TRUE
22	GA1	07	15,10,22 00:50	blanco	n.a.		FALSE
23	GA2	07	15,10,22 01:11	blanco	n.a.	n.a.	FALSE
24	GA3	08	15,10,22 01:33	low flow	n.a.	n.a.	n.a.

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 11: Ruwe data voor de bepaling van de herhaalbaarheid van 2,75 mg en 3,75 mg tabletten BF

F1 HERHAALBAARHEID 2,50 5^E OPWERKING HERHAALD

Path: 2022\Validatie RD\BISOPD\221010-02 Gehalte TR
221017-8 repeatability 2,5-5 over

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:08 PM

Summary gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

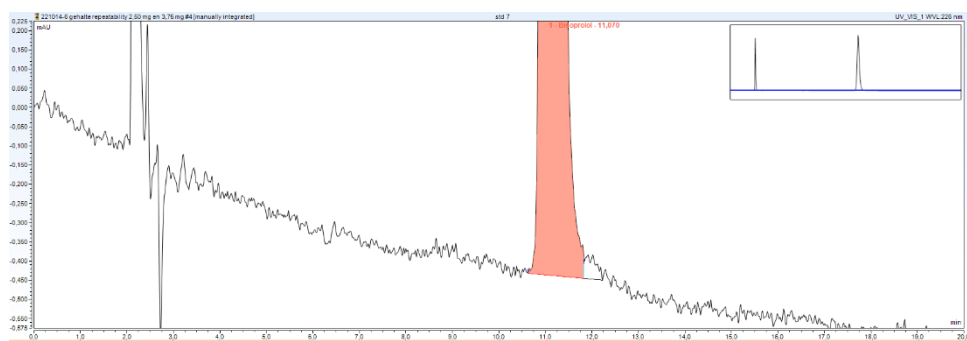
Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml/min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijls
Uitgewerkt: Thor Reijls
Labjournaal: labj027 blz 126 t/m blz128
Data bij charge/samplenr.: validatie
Calibration mode: Group

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Weight mg/100ml	Amount % UV_VIS_1 Bisoprolol	Average % UV_VIS_1	Manipulated? UV_VIS_1	Var.Coeff. % UV_VIS_1 Bisoprolol
1	GC4	01	17,10,22 18:22	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	n.a.
2	GD3	02	17,10,22 18:43	Std 1	5,0060	1,00		TRUE	0,078
3	GD4	02	17,10,22 19:04	Std 2	5,0230	1,00	1,0	TRUE	0,078
4	GB2	03	17,10,22 19:26	D10997-5 mg oud	5,0089	79,31	79,3	TRUE	0,078
5	GD5	04	17,10,22 19:47	D10997-5 mg nieuw	5,0089	98,58	98,6	TRUE	0,078
6	GD3	05	17,10,22 20:09	Std 1	5,0060	1,00		TRUE	0,131
7	GD4	05	17,10,22 20:30	Std 2	5,0230	1,00	1,0	TRUE	0,131
8	RA7	06	17,10,22 20:50	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	RA8	07	17,10,22 20:51	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	RB1	08	17,10,22 20:52	low flow	1,0000	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 12: ruwe data herhaling 5^e opwerking

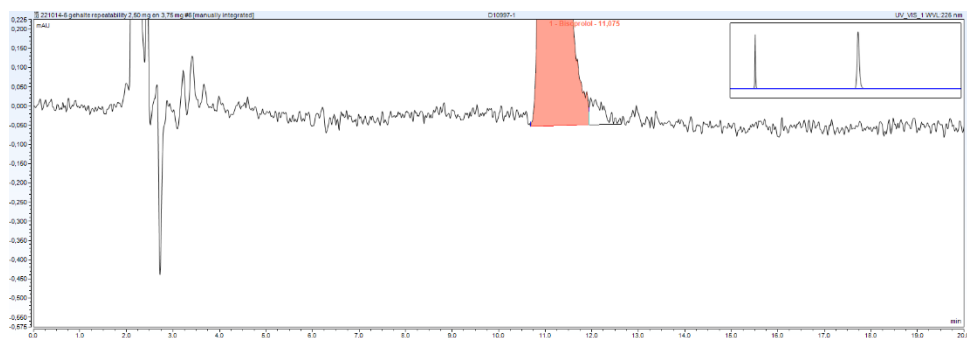
F2 CHROMATOGRAMMEN



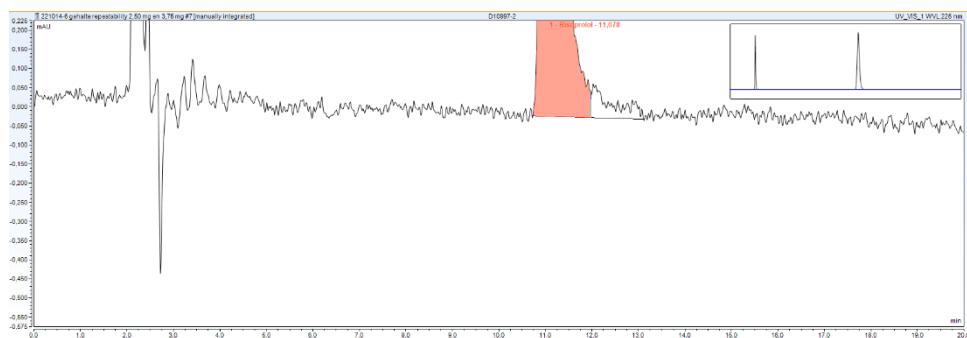
Figuur 92: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 2,50 en 3,75 mg tabletten BF



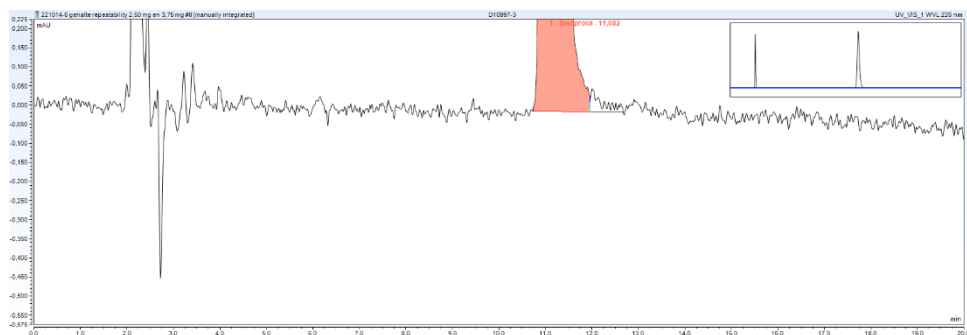
Figuur 13: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 2,50 en 3,75 mg tabletten BF



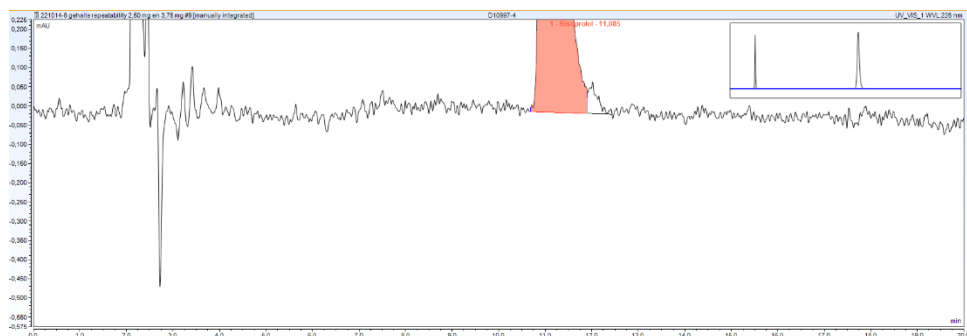
Figuur 14: Chromatogram 1e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



Figuur 95: Chromatogram 2e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



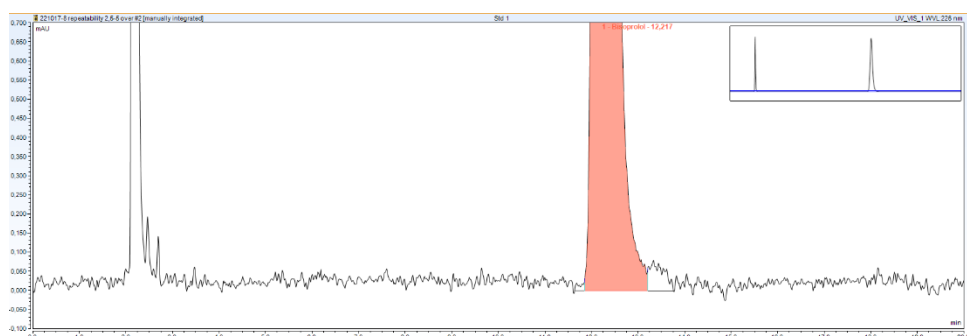
Figuur 96: Chromatogram 3e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



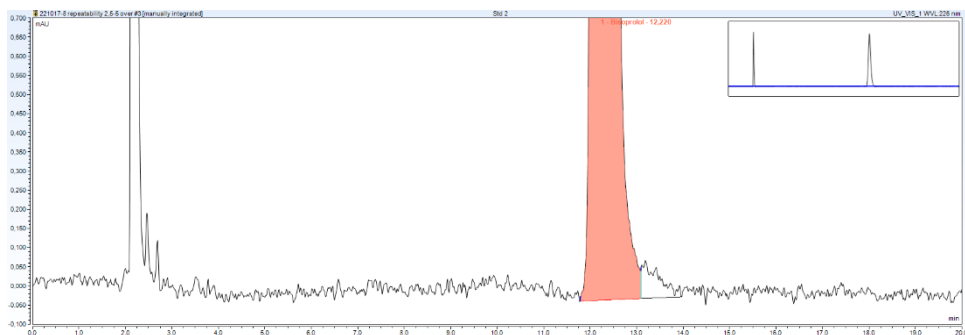
Figuur 97: Chromatogram 4e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



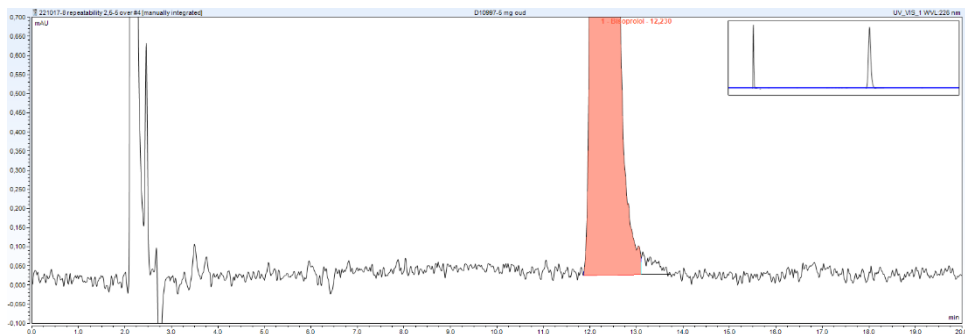
Figuur 98: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



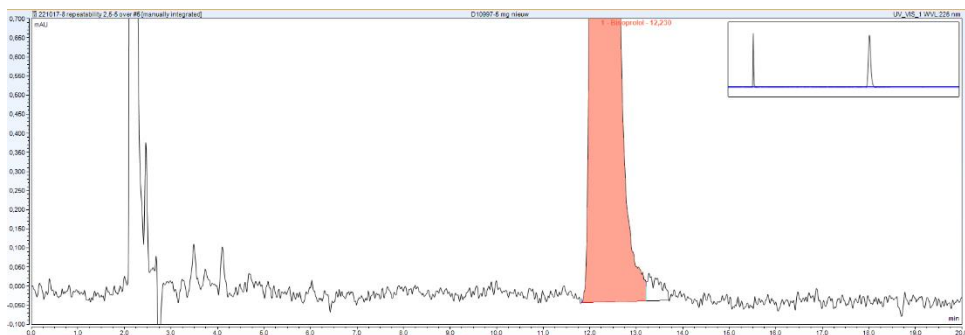
Figuur 99: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF 5e opwerking herhaald



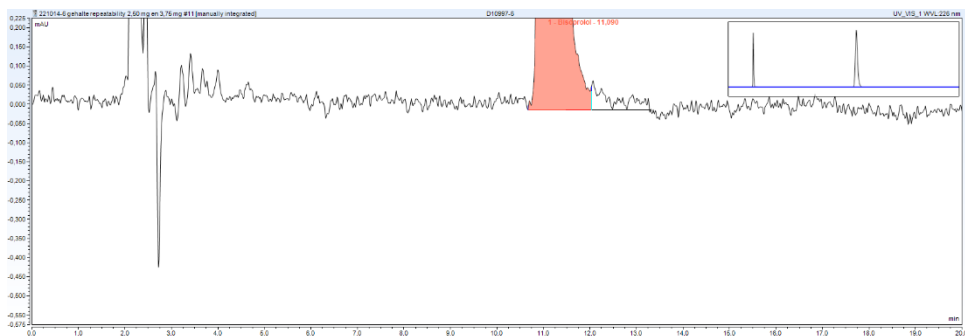
Figuur 15: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF 5e opwerking herhaald



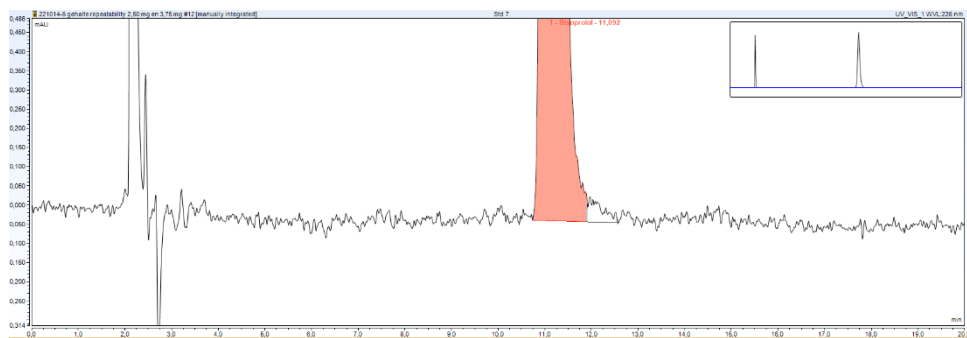
Figuur 16: Chromatogram 5e opwerking opnieuw gemeten voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten



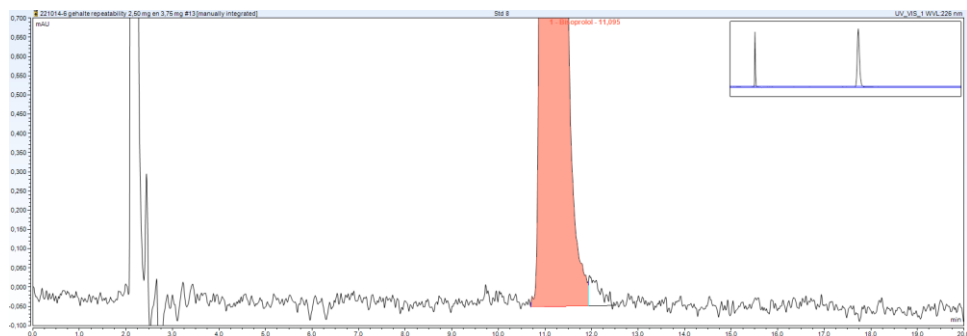
Figuur 17: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF 2e poging verdunning



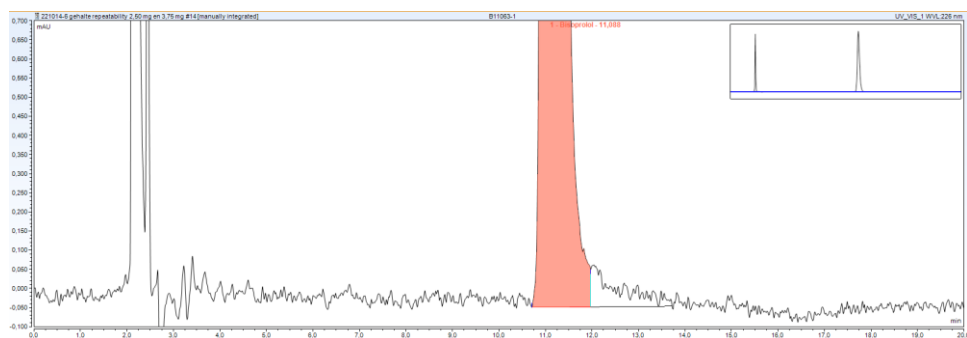
Figuur 18: Chromatogram 6e opwerking voor de herhaalbaarheid van 2,5 mg tabletten BF



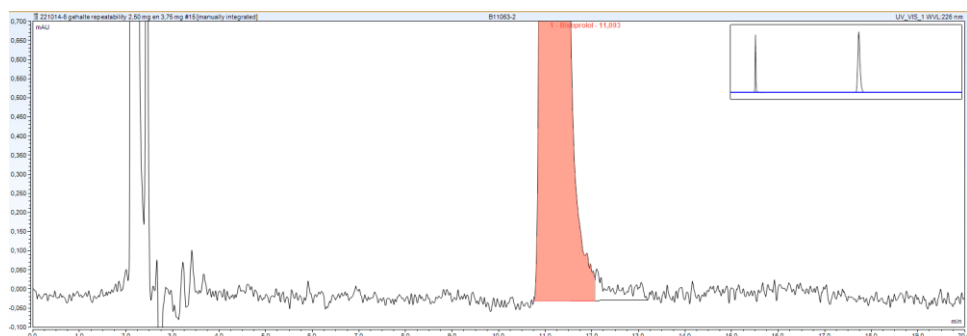
Figuur 19: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



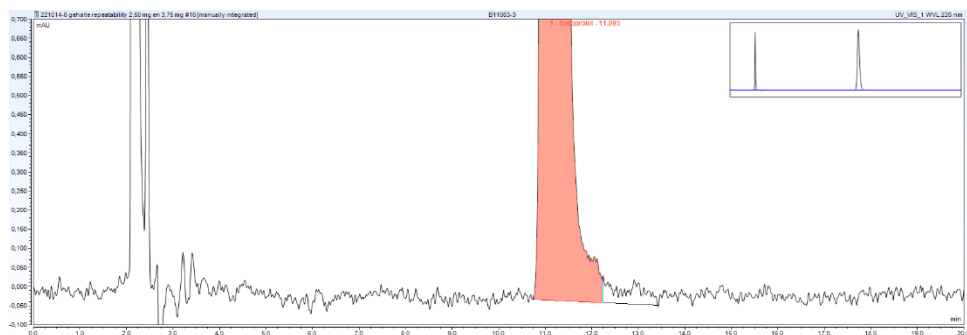
Figuur 105: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



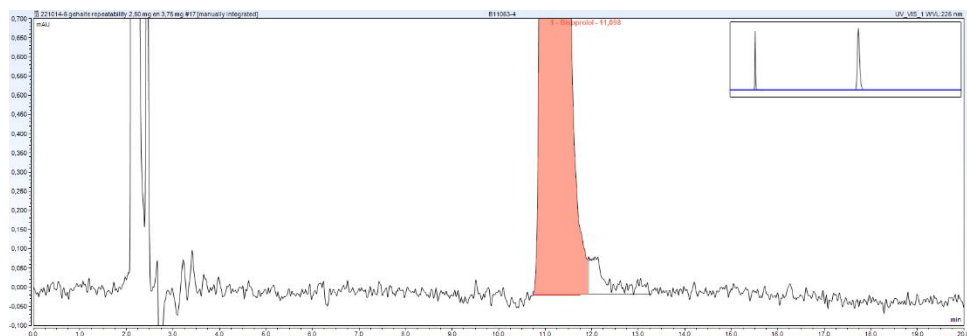
Figuur 20: Chromatogram 1e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



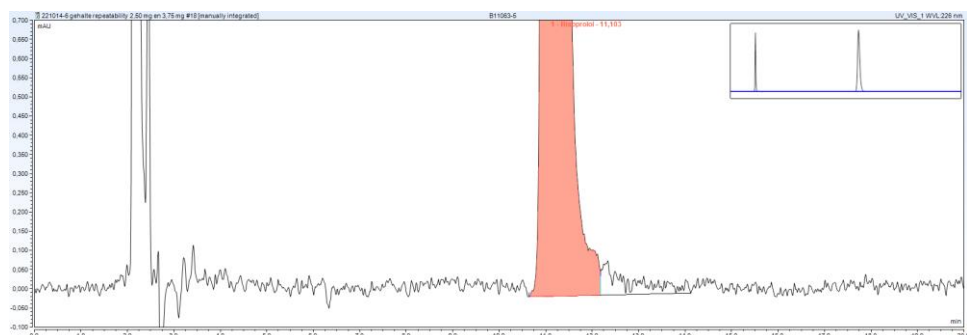
Figuur 21: Chromatogram 2e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



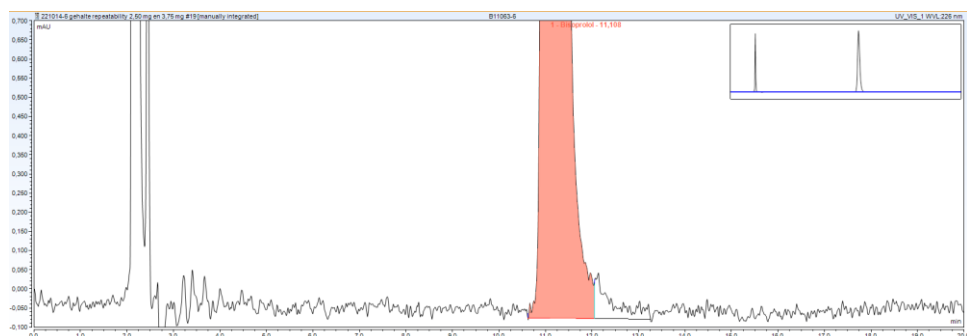
Figuur 22: Chromatogram 3e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



Figuur 23: Chromatogram 4e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



Figuur 24: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF



Figuur 25: Chromatogram 6e opwerking voor de herhaalbaarheid van 3,75 mg tabletten BF

G RUWE DATA HERHAALBAARHEID 5,00 EN 7,50 MG

Path:2022\ Validatie RD\BISOPD\221010-02 Gehalte TR
221024-2 gehalte repeatability 5 mg en 7,50 mg

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:08 PM

Summary gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

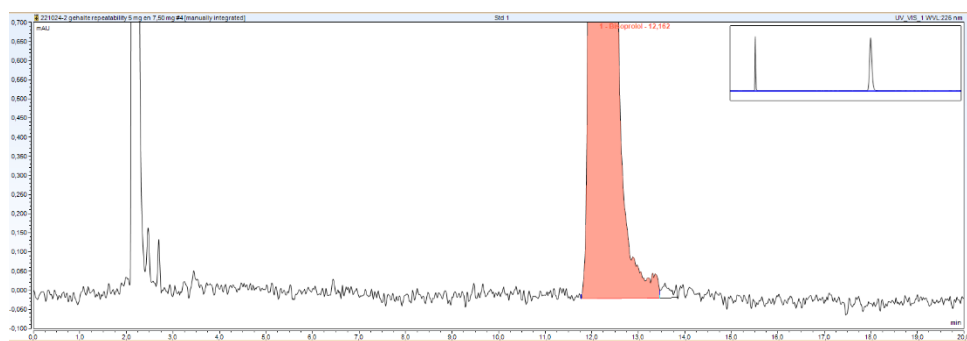
Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml/min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijjs
Uitgewerkt: Thor Reijjs
Labjournaal: labj027 blz 131 t/m blz132
Data bij charge/samplenr.: validatie
Calibration mode: Group

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Weight mg/100ml	Amount % UV_VIS_1 Bisoprolol	Average %	Manipulated? UV_VIS_1	Var. Coeff. % UV_VIS_1 Bisoprolol
1	RB1	01	24,10,22 17:25	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	n.a.
2	RB1	01	24,10,22 17:46	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	n.a.
3	RB1	01	24,10,22 18:07	Blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	n.a.
4	RB6	02	24,10,22 18:29	Std 1	4,9441	1,00		TRUE	0,165
5	RB7	02	24,10,22 18:50	Std 2	4,9481	1,00	1,0	TRUE	0,165
6	RB8	03	24,10,22 19:11	D01064-1	4,9871	99,47		TRUE	0,165
7	RC1	03	24,10,22 19:33	D01064-2	4,9868	98,78		TRUE	0,165
8	RC2	03	24,10,22 19:54	D01064-3	4,9928	98,70		TRUE	0,165
9	RC3	03	24,10,22 20:16	D01064-4	5,0275	98,93		TRUE	0,165
10	RC4	03	24,10,22 20:37	D01064-5	4,9978	98,31		TRUE	0,165
11	RC5	03	24,10,22 20:58	D01064-6	5,0081	98,96	98,9	TRUE	0,165
12	RB6	04	24,10,22 21:20	Std 1	4,9441	1,00		TRUE	0,163
13	RB7	04	24,10,22 21:41	Std 2	4,9481	1,00	1,0	TRUE	0,163
14	RC6	05	24,10,22 22:02	B10565-1	5,9756	99,97		TRUE	0,163
15	RC7	05	24,10,22 22:24	B10565-2	5,9881	99,58		TRUE	0,163
16	RC8	05	24,10,22 22:45	B10565-3	6,0139	100,24		TRUE	0,163
17	RD1	05	24,10,22 23:07	B10565-4	6,0075	100,11		TRUE	0,163
18	RD2	05	24,10,22 23:28	B10565-5	6,0141	100,31		TRUE	0,163
19	RD3	05	24,10,22 23:49	B10565-6	6,0007	100,06	100,0	TRUE	0,163
20	RB6	06	25,10,22 00:11	std 1	4,9441	1,00		TRUE	0,185
21	RB7	06	25,10,22 00:32	std 2	4,9481	1,00	1,0	TRUE	0,185
22	RB1	07	25,10,22 00:54	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,185
23	RB1	07	25,10,22 01:15	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,185
24	RB1	07	25,10,22 01:36	low flow	1,0000	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

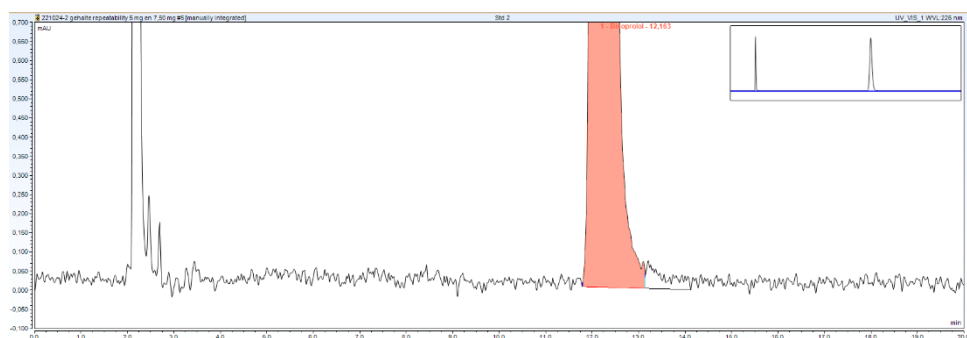
Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 26: Ruwe data voor de bepaling van de herhaalbaarheid van 5,00 mg en 7,50 mg tabletten BF

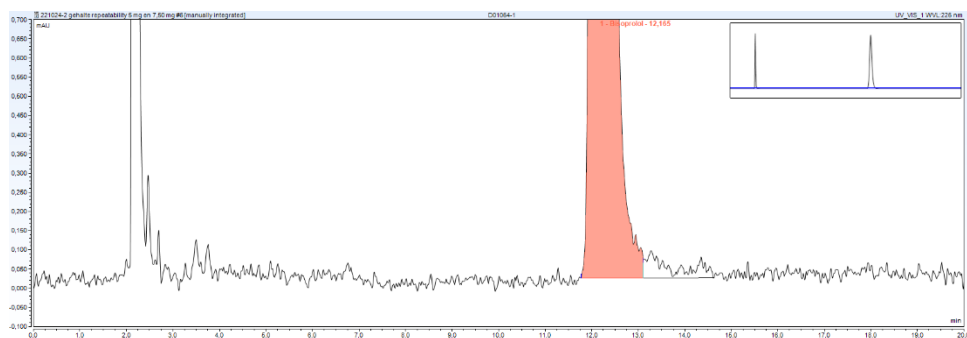
G1 CHROMATOGRAMMEN



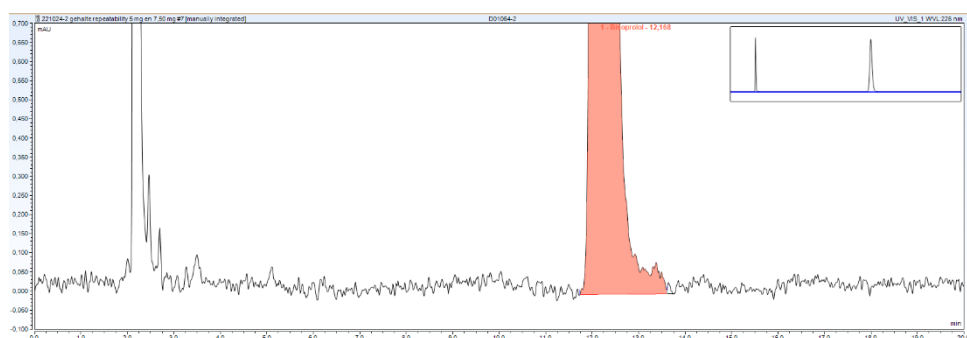
Figuur 27: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



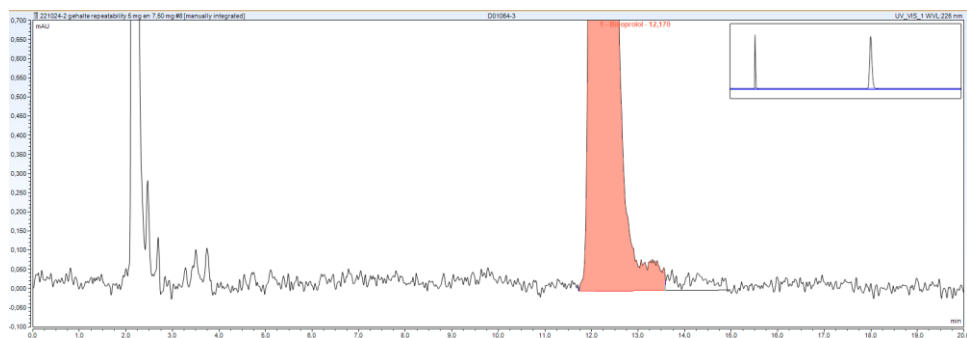
Figuur 28: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



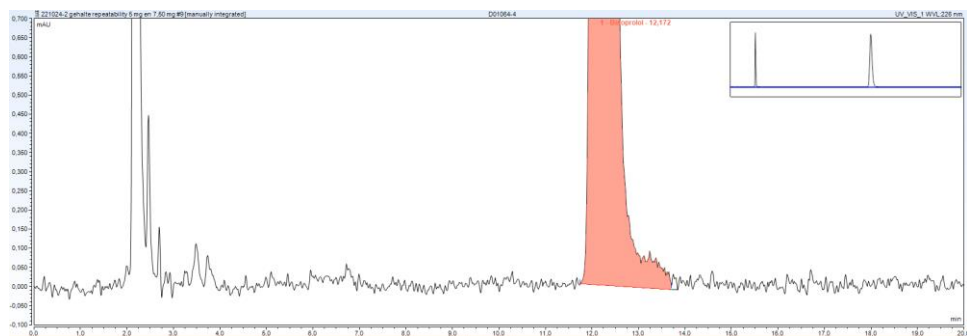
Figuur 29: Chromatogram 1e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



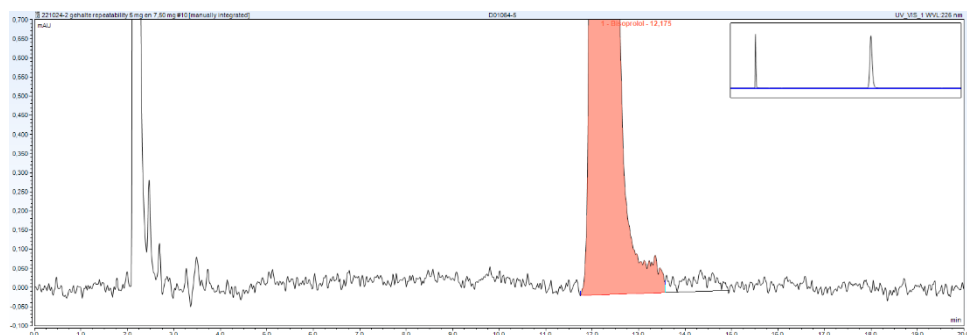
Figuur 30: Chromatogram 2e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



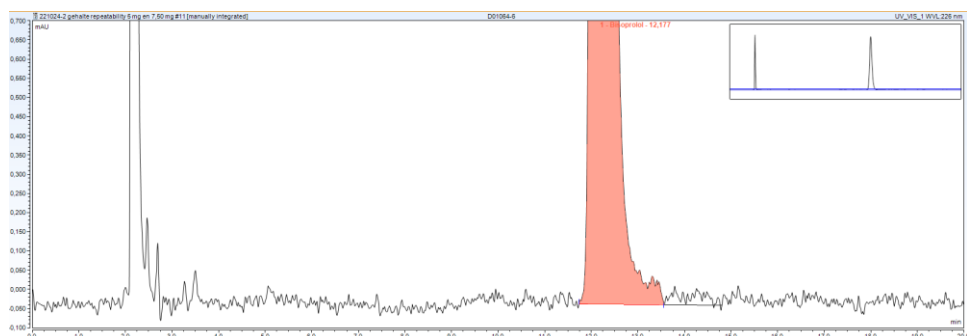
Figuur 31: Chromatogram 3e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



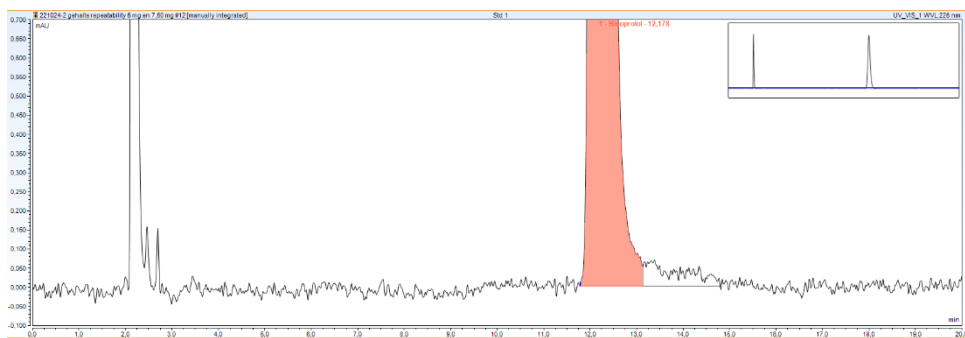
Figuur 32: Chromatogram 4e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



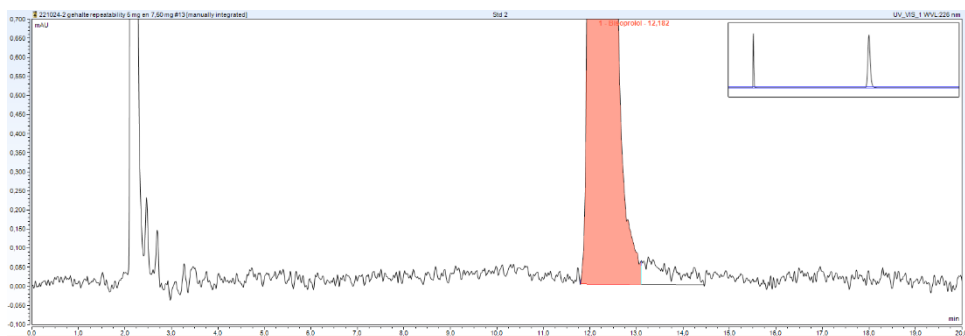
Figuur 33: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



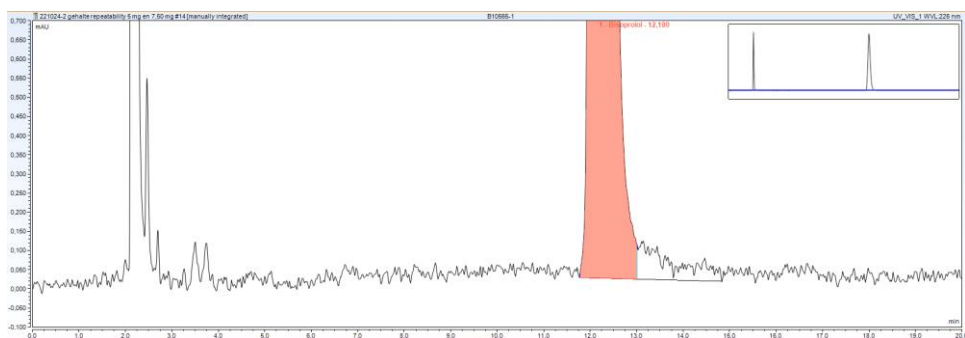
Figuur 120: Chromatogram 6e opwerking voor de herhaalbaarheid van 5,00 mg tabletten BF



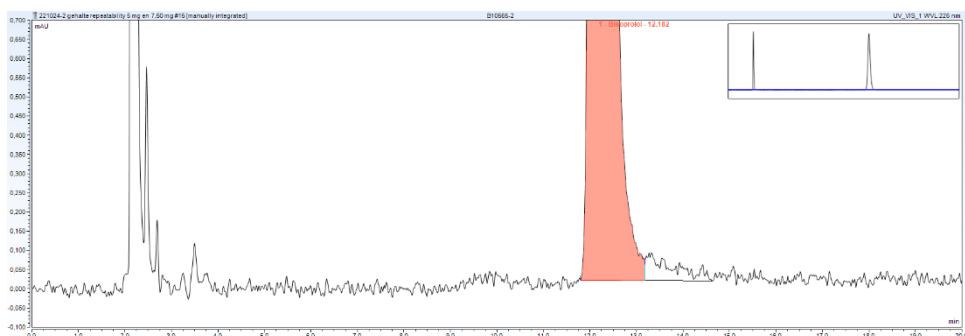
Figuur 121: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



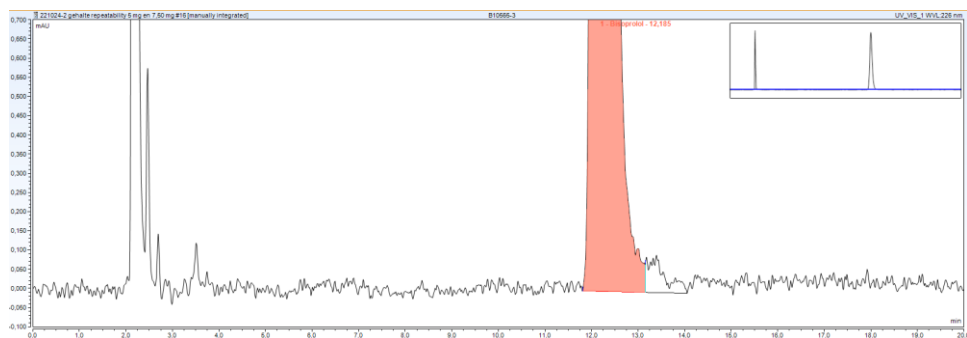
Figuur 34: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



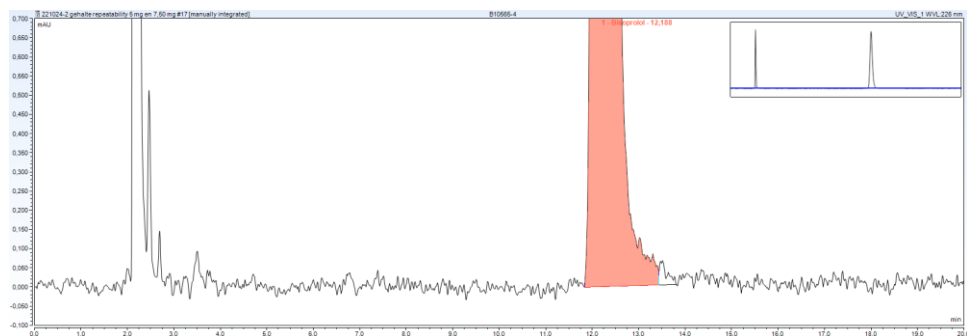
Figuur 123: Chromatogram 1e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



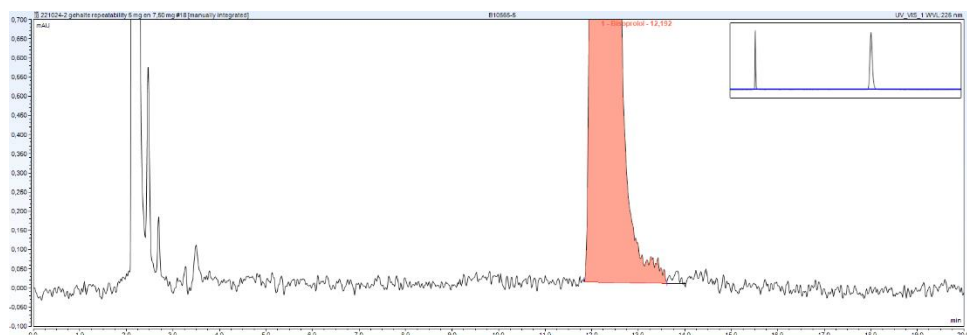
Figuur 124: Chromatogram 2e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



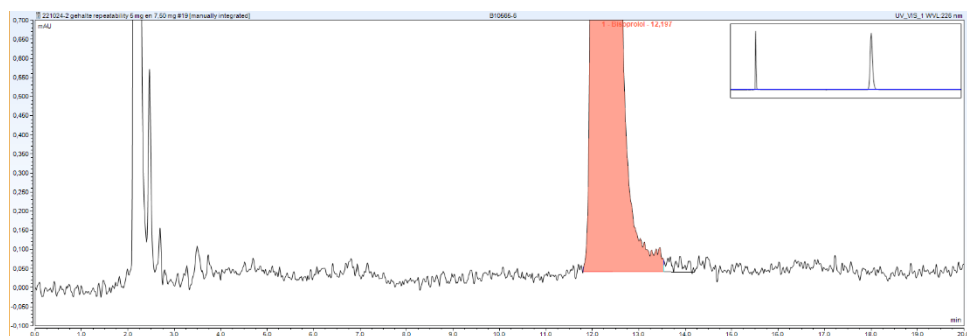
Figuur 125: Chromatogram 3e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



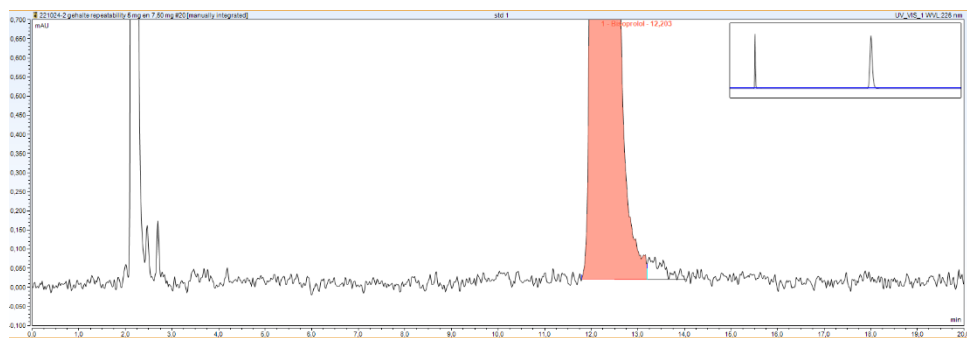
Figuur 126: Chromatogram 4e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



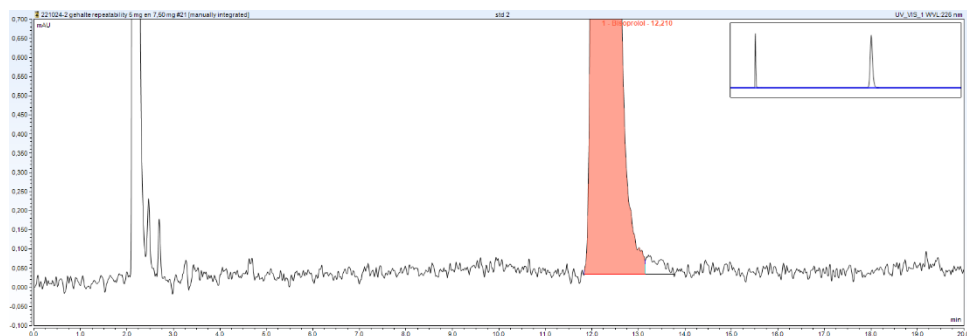
Figuur 127: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



Figuur 128: Chromatogram 6e opwerking voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF



Figuur 129: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF (sequence afsluiten)



Figuur 130: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 7,50 mg tabletten BF (sequence afsluiten)

H RUWE DATA HERHAALBAARHEID 10 MG

Path: 2022_Validatie RD\BISOPD\221010-02 Gehalte TR
221012-5 gehalte repeatability 10 mg

InnoGenerics B.V.

9-11-2022 2:51 PM

RSD gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

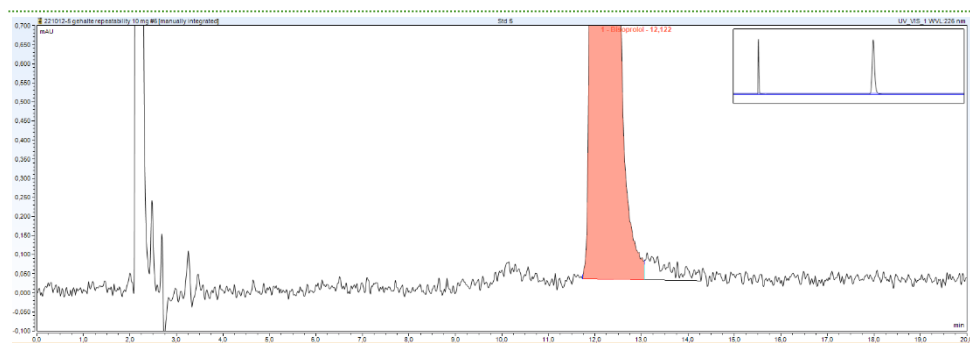
Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijs
Uitgewerkt: Thor Reijs
Labjournaal: labj027 blz 117 t/m blz122
Data bij charge/samplenr.: validatie

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Area mAU*min UV_VIS_1 Bisoprolol	RSD %	Manipulated? UV_VIS_1
1	BD6	01	12,10,22 17:48	blanco	n.a.	n.a.	FALSE
2	BE7	02	12,10,22 18:10	Std 5	14,242271		TRUE
3	BE8	02	12,10,22 18:31	Std 6	14,070346	0,86	TRUE
4	BD7	03	12,10,22 18:52	Std 3	13,716455	n.a.	FALSE
5	BD7	04	12,10,22 19:14	Std 4	13,729317	n.a.	TRUE
6	BE7	05	12,10,22 19:35	Std 5	14,234267		TRUE
7	BE8	05	12,10,22 19:57	Std 6	14,038133	0,98	TRUE
8	BE1	06	12,10,22 20:18	B01335A-1	11,135792		TRUE
9	BE2	06	12,10,22 20:39	B01335A-2	11,031037		TRUE
10	BE3	06	12,10,22 21:01	B01335A-3	11,049363		TRUE
11	BE4	06	12,10,22 21:22	B01335A-4	11,066701		TRUE
12	BE5	06	12,10,22 21:43	B01335A-5	11,086532		TRUE
13	BE6	06	12,10,22 22:05	B01335A-6	11,063512	0,33	TRUE
14	BE7	07	12,10,22 22:26	std 5	14,264646		TRUE
15	BE8	07	12,10,22 22:48	std 6	14,051688	1,06	TRUE
16	BD6	08	12,10,22 23:09	blanco	n.a.	n.a.	FALSE
17	BD7	14	12,10,22 23:30	blanco	13,710598	n.a.	FALSE

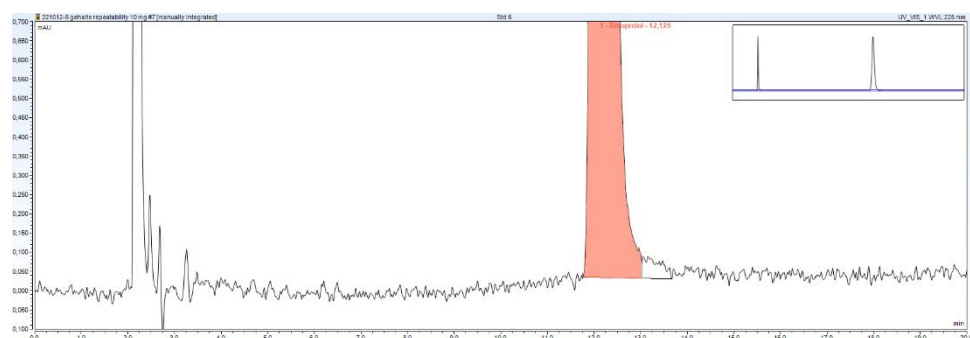
Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 131: Ruwe data voor de bepaling van de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF

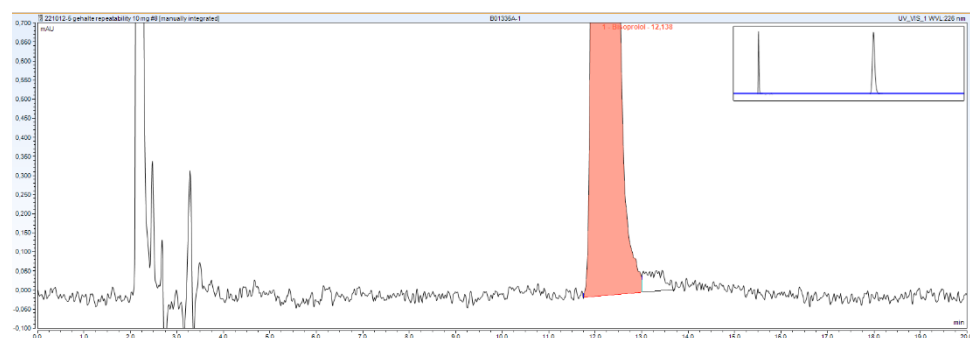
H1 CHROMATOGRAMMEN



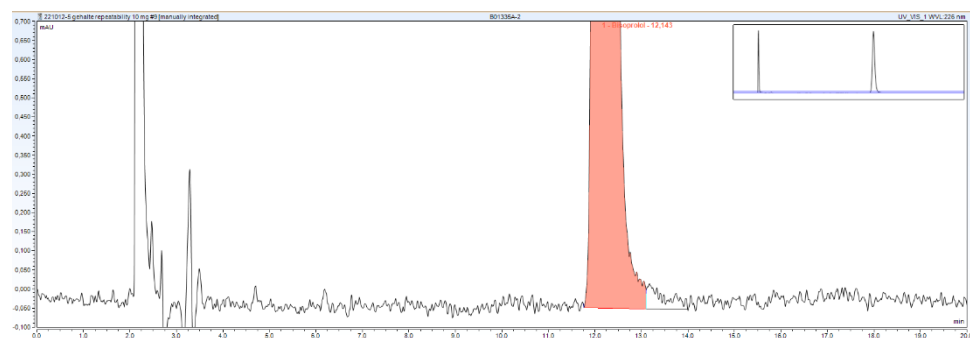
Figuur 132: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



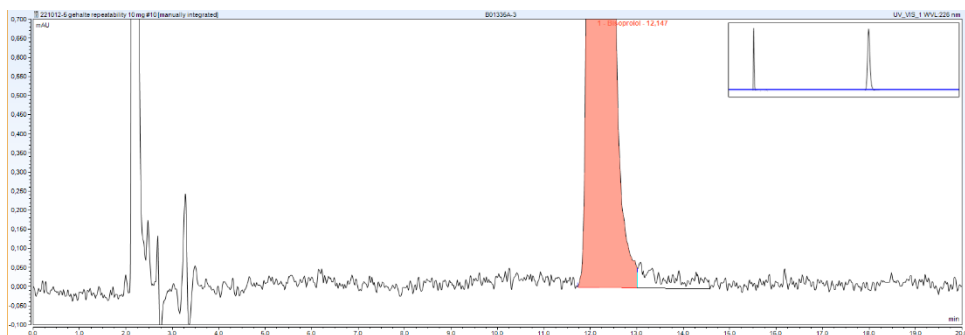
Figuur 133: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



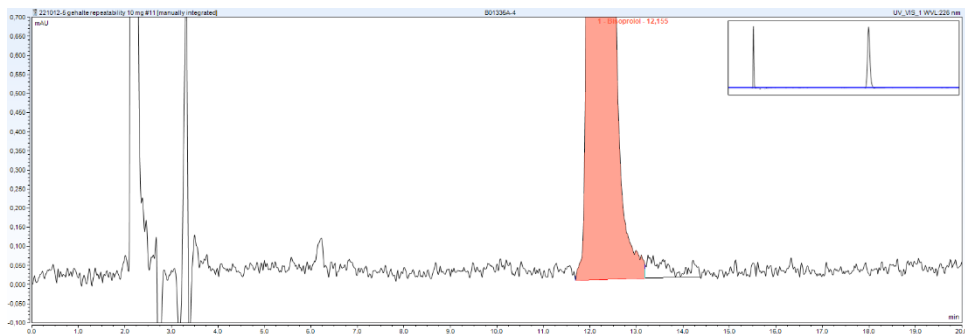
Figuur 134: Chromatogram 1e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



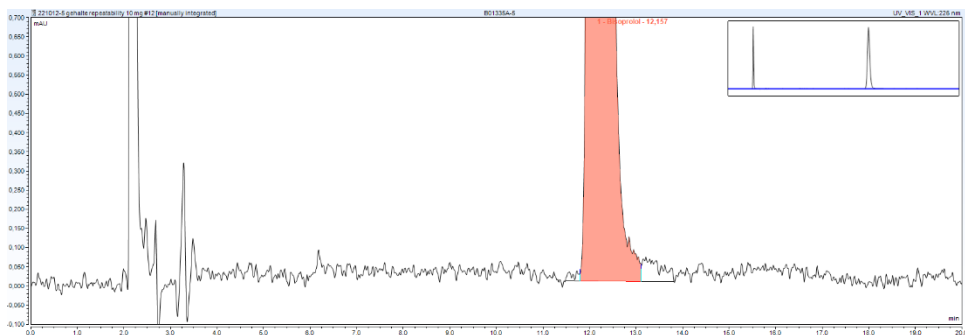
Figuur 135: Chromatogram 2e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



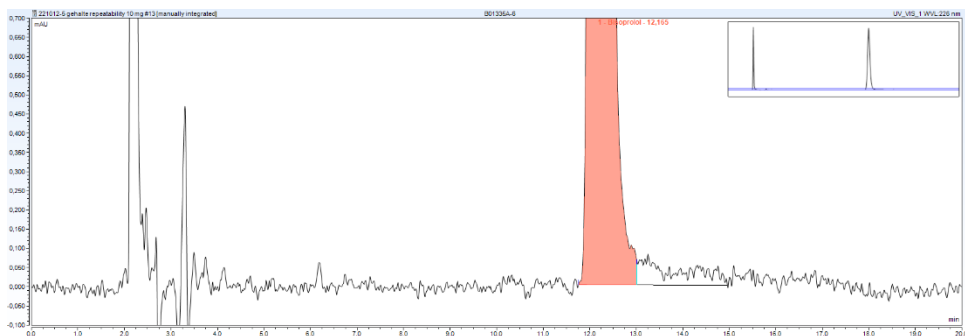
Figuur 136: Chromatogram 3e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



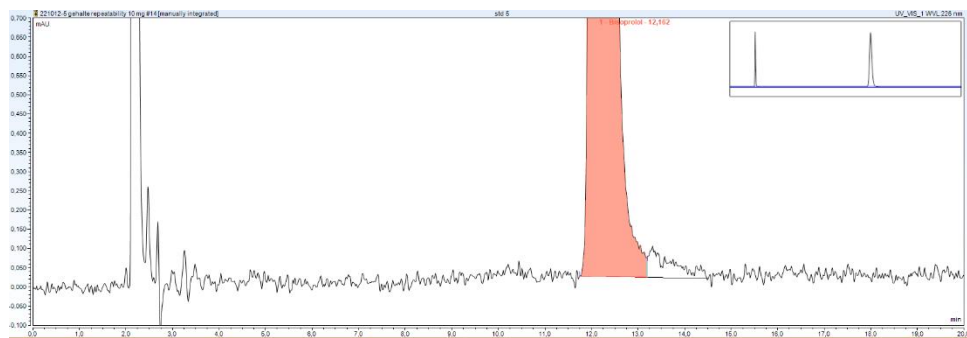
Figuur 35: Chromatogram 4e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



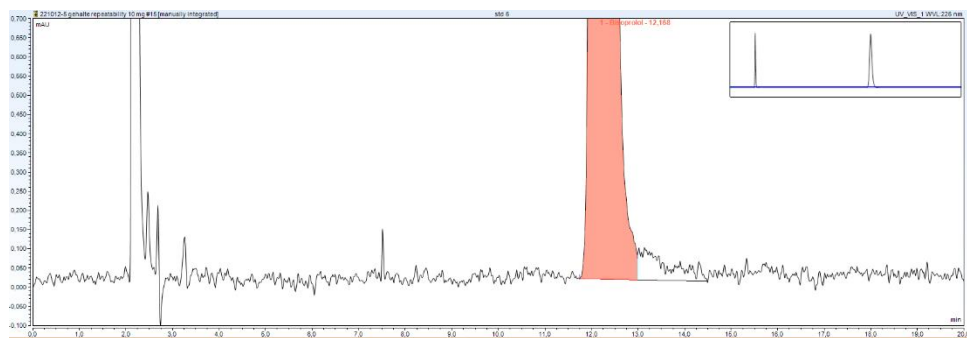
Figuur 138: Chromatogram 5e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



Figuur 36: Chromatogram 6e opwerking voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF



Figuur 140: Chromatogram 1e standaard voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF (sequence afsluiten)



Figuur 141: Chromatogram 2e standaard voor de herhaalbaarheid van 10 mg tabletten BF (sequence afsluiten)

I FILTERTESTEN

Path: 2022\Validatie RD\BISOPD\221010-02 Gehalte TR
221010-02 gehalte filtertest standaarden

InnoGenerics B.V.

14-12-2022 12:05 PM

Summary gehaltebepaling Bisoprolol fumarate 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluents: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijs
Uitgewerkt: Thor Reijs
Labjournaal: labj 027 blz 117 tm blz 118
Data bij charge/samplenr.: validatie
Calibration mode: Total

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Weight mg/100ml	Amount % UV_VIS_1 Bisoprolol	Average %	Manipulated? UV_VIS_1	Var.Coeff. % UV_VIS_1 Bisoprolol
1	BB3	01	11,10,22 13:33	blanco	1,0000	n.a.		n.a.	n.a.
2	BB3	01	11,10,22 13:43	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,087
3	BB4	01	11,10,22 14:04	blanco	1,0000	4,89	4,9	FALSE	0,087
4	BA8	02	11,10,22 14:25	Standaard 1 centrifuge	4,9111	1,00		TRUE	0,087
12	BA8	02	11,10,22 17:17	Standaard 1 centrifuge	4,9111	1,00	1,0	TRUE	0,087
5	BB1	03	11,10,22 14:47	Standaard 2 centrifuge	4,9550	1,00		TRUE	0,087
13	BB1	03	11,10,22 17:38	Standaard 2 centrifuge	4,9550	1,00	1,0	TRUE	0,087
6	BB4	04	11,10,22 15:08	standaard 1 3 ml filter	4,9111	99,86	99,9	TRUE	0,087
7	BB5	05	11,10,22 15:30	standaard 1 4 ml filter	4,9111	99,80	99,8	TRUE	0,087
8	BB6	06	11,10,22 15:51	standaard 1 5 ml filter	4,9111	99,74	99,7	TRUE	0,087
9	BB7	07	11,10,22 16:12	standaard 2 3 ml filter	4,9550	99,83	99,8	TRUE	0,087
10	BB8	08	11,10,22 16:34	standaard 2 4 ml filter	4,9550	99,87	99,9	TRUE	0,087
11	BC1	09	11,10,22 16:55	standaard 2 5 ml filter	4,9550	100,09	100,1	TRUE	0,087
14	BB2	10	11,10,22 17:59	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	0,087
15	BB3	11	11,10,22 18:21	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	0,087

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 141: Resultaten filtertesten standaarden

Summary gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijs
Uitgewerkt: Thor Reijs
Labjournaal: labj027 blz 117 t/m blz120
Data bij charge/sampelnr.: validatie
Calibration mode: Group

Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Weight mg/100ml	Amount % UV_VIS_1 Bisoprolol	Average %	Manipulated? UV_VIS_1	Var.Coeff. % UV_VIS_1 Bisoprolol
1	BC2	01	12,10,22 09:57	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	n.a.
2	BC3	01	12,10,22 10:19	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	n.a.
3	BC3	01	12,10,22 10:40	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	n.a.
4	BC4	02	12,10,22 11:02	std 3	4,9371	1,00		TRUE	0,115
5	BC5	02	12,10,22 11:23	std 4	4,9680	1,00	1,0	TRUE	0,115
6	BC6	03	12,10,22 11:44	B20531-1 3 ml	5,0216	0,97	1,0	TRUE	0,115
7	BC7	04	12,10,22 12:06	B20531-1 4 ml	5,0216	0,97	1,0	TRUE	0,115
8	BC2	05	12,10,22 12:27	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	0,115
9	BD7	06	12,10,22 12:49	B20531-1 centrifuge	5,0216	1,00	1,0	TRUE	0,000
10	BC4	07	12,10,22 13:10	B20531-1 3 ml gefiltreerd	5,0216	101,03	101,0	TRUE	0,000
11	BC5	08	12,10,22 13:31	B20531-1 4 ml gefiltreerd	5,0216	101,56	101,6	TRUE	0,000
12	BC4	09	12,10,22 13:53	std 3	4,9371	1,00		TRUE	0,023
13	BC5	09	12,10,22 14:14	std 4	4,9680	1,00	1,0	TRUE	0,023
14	BC8	10	12,10,22 14:36	B20531-1 5 ml	5,0216	97,50	97,5	TRUE	0,023
15	BD8	11	12,10,22 14:57	B20531-2 centrifuge	5,0216	1,00	1,0	TRUE	0,000
16	BD1	12	12,10,22 15:18	B20531-2 3 ml	4,9784	100,91	100,9	FALSE	0,000
17	BD2	13	12,10,22 15:40	B20531-2 4 ml	4,9784	100,97	101,0	TRUE	0,000
18	BD3	14	12,10,22 16:01	B20531-2 5 ml	4,9784	100,86	100,9	TRUE	0,000
19	BC4	15	12,10,22 16:23	Std 3	4,9371	1,00		TRUE	0,018
20	BC5	15	12,10,22 16:44	Std 4	4,9680	1,00	1,0	TRUE	0,018
21	BD6	16	12,10,22 17:05	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,018
22	BD6	16	12,10,22 17:27	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	0,018

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoother Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

Figuur 142: resultaten filtertesten standaarden 1 mg tabletten

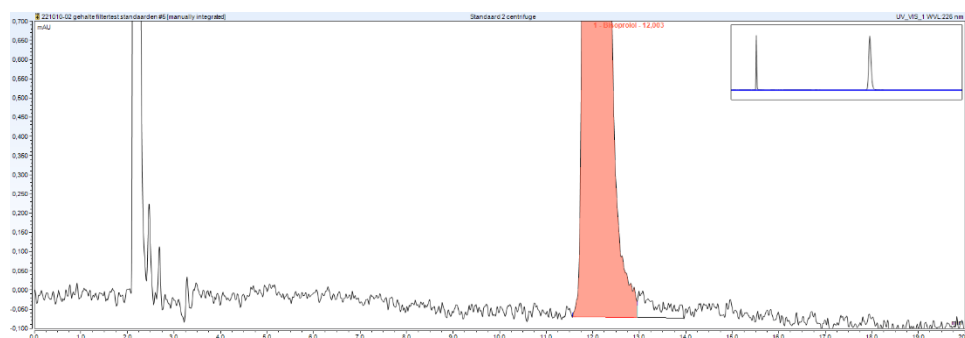
Summary gehaltebepaling Bisoprolol fumaraat 1,25 - 10 mg filmcoat tabletten Pharmdos

Column: Chrombudget C18, 250 x 4,6 mm, 5µm [kolom P 351]
Eluens: Fosfaatbuffer : acetonitril R [OPL 122] = 75 : 25
Flow: 1,0 ml /min
Oven: 35 °C
Detector UV: 226 nm
HPLC: HPLC_2
AV & Ed: BISOPD R1 2022
Operator: Thor Reijs
Uitgeverkt: Thor Reijs
Labjournaal: labj027 blz 117 t/m blz122
Data bij charge/sampler.: validatie
Calibration mode: Total

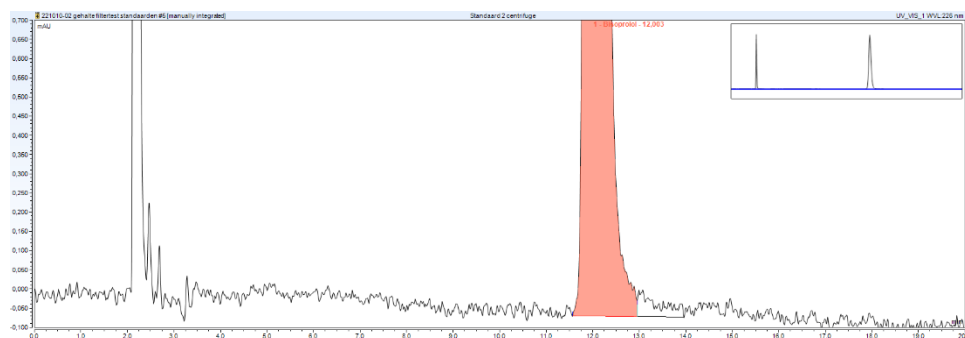
Sample No.	Pos	Rep	Time	Name	Weight mg/100ml	Amount % UV_VIS_1 Bisoprolol	Average % UV_VIS_1	Manipulated?	Var.Coeff. % UV_VIS_1 Bisoprolol
1	BD6	01	12,10,22 23:52	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,321
2	BD6	01	13,10,22 00:13	blanco	1,0000	n.a.		FALSE	0,321
3	BD6	01	13,10,22 00:35	blanco	1,0000	n.a.	n.a.	FALSE	0,321
4	BE1	02	13,10,22 00:56	B01335A-1 centrifuge	4,0011	1,00	1,0	TRUE	0,321
5	RA1	03	13,10,22 01:17	B01335A-1 3 ml filter	4,0011	100,67	100,7	TRUE	0,321
6	RA2	04	13,10,22 01:39	B01335A-1 4 ml filter	4,0011	101,50	101,5	TRUE	0,321
7	RA3	05	13,10,22 02:00	B01335A-1 5 ml filter	4,0011	102,27	102,3	TRUE	0,321
8	BE2	06	13,10,22 02:22	B01335A-2 centrifuge	3,9912	1,00	1,0	TRUE	0,321
9	RA4	07	13,10,22 02:43	B01335A-2 3 ml filter	3,9912	102,07	102,1	TRUE	0,321
10	RA5	08	13,10,22 03:04	B01335A-2 4 ml filter	3,9912	102,03	102,0	TRUE	0,321
11	RA6	09	13,10,22 03:26	B01335A-2 5 ml filter	3,9912	102,08	102,1	TRUE	0,321
12	BD6	10	13,10,22 03:47	blanco	5,0310	n.a.		FALSE	0,321
13	BD6	10	13,10,22 04:08	blanco	5,0310	n.a.		FALSE	0,321
14	BD6	10	13,10,22 04:30	low flow	5,0310	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Ret. Time min	Param. Name	Param. Value	Inj. Type	Channel
<Initial>	Consider Void Peak	Off	Any	All Channels
<Initial>	Smoothing Width	0,400 [min]	Any	All Channels
<Initial>	Baseline Noise Range	4,000 [min]...6,000 [min]	Any	All Channels
0,000	Minimum Area	1,0000 [Signal*min]	Any	All Channels
0,000	Inhibit Integration	On	Any	All Channels
6,000	Inhibit Integration	Off	Any	All Channels

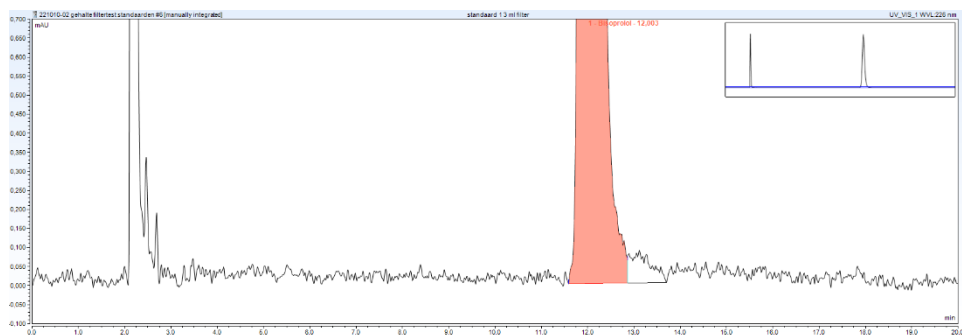
Figuur 141: Resultaten filtertesten monsters



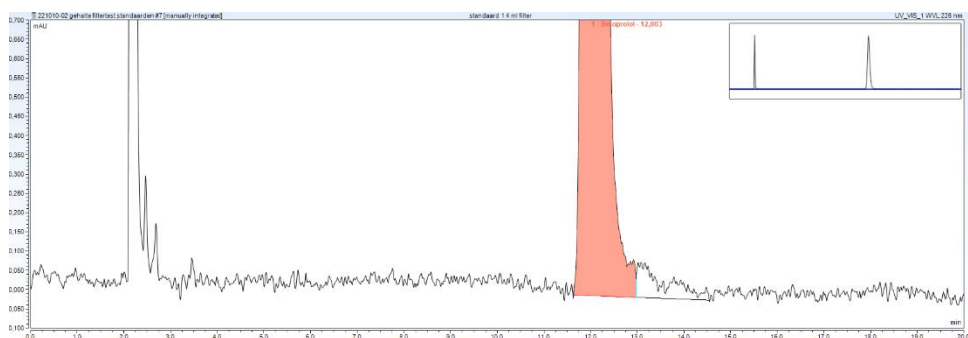
Figuur 142: Standaard 1 gecentrifugeerd



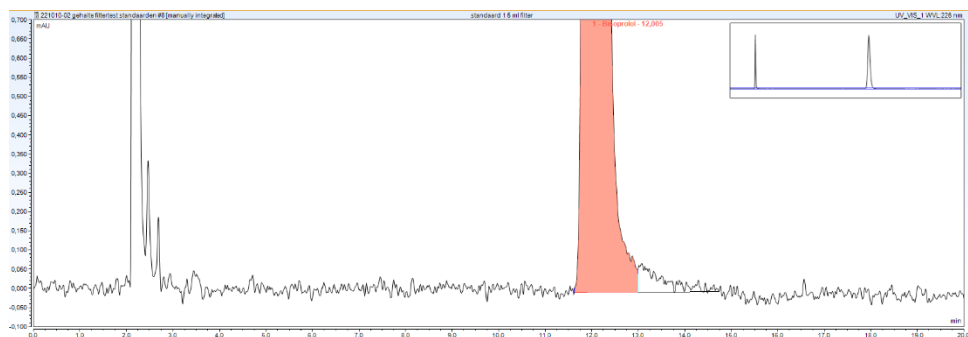
Figuur 143: Standaard 2 gecentrifugeerd



Figuur 144: Standaard 1 3 ml gecentrifugeerd



Figuur 374: Standaard 1 4 ml gecentrifugeerd



Figuur 38: Standaard 1 5 ml gecentrifugeerd

J VOORBEELDBEREKENINGEN

J1 GEHALTE

Afleiding vergelijking gehalte bepaling Bisoprolol fumaraat. Toegepast bij herhaalbaarheid.

Volledige vergelijking staat hieronder weergegeven

$$C \text{ BF theoretisch (mg/100 ml)} = \frac{I * 100 * TS}{250 \text{ ml} * \frac{V_{pip}}{V_{mk}} * \overline{mx}}$$

Verschillende variabelen gescheiden. Verschillende waardes geordend om de formule te vereenvoudigen.

$$C \text{ BF theoretisch} = I * \frac{100}{250} * \frac{\frac{TS}{V_{mk}}}{\frac{V_{pip}}{V_{mk}}} * \frac{1}{\overline{mx}}$$

Vaste waardes omgezet tot constanten: (100 = correctie factor mg/ml omzetten naar mg/100 ml), 250 = volume van testoplossing in ml $\rightarrow 0,4$

$$C \text{ BF theoretisch} = \frac{I * 0,4 * \frac{TS}{V_{mk}}}{\overline{mx}}$$

Tabletsterkte is constant in combinatie met de tweede verdunning (V_{mk}/V_{pip}). Dit geldt voor elke tabletsterkte. Vermenigvuldig deze factoren met 0,4 is gelijk aan de testverdunningscoëfficiënt (TVC) voor elke tabletsterkte.

$$C \text{ BF theoretisch} = \frac{I * TVC}{\overline{mx}}$$

Voorbeeldberekening aan de hand van inweeg van 1 herhaalbaarheidsopwerking van een tabletsterkte van 1,25 mg Bisoprolol fumaraat.

$$C \text{ BF theoretisch} = \frac{876,3 \text{ mg} * 100 * 1,25 \text{ mg}}{250 \text{ ml} * \frac{1}{1} * 87,34 \text{ (mg)}} = 5,0168 \text{ mg/100 ml Bisoprolol fumaraat}$$

Deze waarde (C BF theoretisch) is nodig om het theoretische piekoppervlak van BF (A BF theoretisch) te bepalen. Hier is de slope (S) voor nodig. Dit wordt als volgt berekend

$$S = \frac{A_{st} \text{ gem}}{c_{st} \text{ gemiddeld}}$$

De slope (2,8124) wordt berekend door de gevonden piekoppervlaktes (bisoprolol) van de standaarden te middelen. Hetzelfde wordt gedaan met de concentraties van de standaarden.

Door S te berekenen kan A_{BF} theoretisch worden berekend met de onderstaande formule. Hierbij wordt uitgegaan dat bij TVC elke tablet 100% homogeen is verdeeld om een theoretische waarde te benaderen. Dit kan worden gedaan, omdat de labelclaim beweert dat de tabletten een bepaald gehalte BF bevatten.

$$A_{BF} \text{ theoretisch} = \frac{I * TVC}{\overline{m\bar{x}}} * S$$

Vanuit dat uitgangspunt moet er getest worden of de werkelijke waarde klopt t.o.v. de labelclaim → Gehalte.

$$G = \frac{A_{\text{gevonden}}}{A_{BF} \text{ theoretisch}} * 100\%$$

Het deel van A_{BF} theoretisch wordt gesubstitueerd door de inweeg, TVC en de slope.

$$G = \frac{A_{\text{gevonden}}}{\frac{I * TVC}{\overline{m\bar{x}}} * S} * 100\%$$

Termen worden wiskundig omgevormd om deze te vereenvoudigen.

$$G = \frac{A_{\text{gevonden}}}{S} * \frac{\overline{m\bar{x}}}{I * TVC} * 100\%$$

Voorbeeldberekening toegepast

$$\frac{4,8642}{5,0168} * 100 = 96,9591 \%$$

J2 BEREKENING O-FOSFORZUUR

$\rho = 1,690 \text{ kg/l}$ oplossing

stel 1 L

dus 1 L oplossing is 1,960 kg

85% van de oplossing is OFZ

Dus $1,960/100 \cdot 85 = 1,666 \text{ kg OFZ} = 1666 \text{ g OFZ}$

$1666 \text{ g}/97,994 = 17,001 \text{ g/mol} \rightarrow 17,001 \text{ mol/l}$

$$C \cdot V = C \cdot V$$

$$17,001 V = 0,015 \cdot 1$$

$$V = 0.0008 \text{ l} = 0,8 \text{ ml} = 1 \text{ ml } 85\% \text{ OFZ}$$

