

RIVM rapport 670400 002

**Toepassing van nabij-infraroodspectroscopie  
bij de analyse van farmaceutische producten**

M. J. Vredenburg, T. Visser<sup>1</sup>, D. de Kaste,  
D. Mooibroek

Februari 2001

<sup>1</sup> Dr. Tom Visser  
Utrecht University  
Department of Vibrational Spectroscopy  
Sorbonnelaan 16 (Z311)  
3584 CA Utrecht  
The Netherlands

Dit onderzoek is verricht in opdracht van de directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu in het kader van het project Geavanceerde Analysetechnieken (projectnummer 670400).

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven  
tel. 030-2749111, fax 030-2742971



## Abstract

Near infrared (NIR) spectroscopy combined with chemometric data analysis has become commonly accepted as a mature qualitative and quantitative analytical technique. In industrial quality control for instance, NIR is a favourable method due to the versatile and non-destructive character, the high discriminating properties and the speed of analysis. Contrary, in pharmaceutical analysis the number of applications is still small since conventional procedures prescribed in Pharmacopoeia's have to be followed. However, NIR might be a valuable and less elaborate alternative for these methods too. To get insight into this, four potential pharmaceutical applications of NIR have been studied.

- The usefulness of NIR for identity control has been studied from 327 independent samples of 36 different compounds that are used for preparation of vaccine-media. After evaluating the spectral data, a library containing representable spectra for each of the 36 substances was compiled. Presenting the remaining spectra to the library resulted in correlation coefficients of  $>0.99$  for each compound with a corresponding distance to other identities of  $>0.15$ .
- The potentials for quality control were investigated by the spectra of reference standards of glycerol and samples of contaminated glycerol originating from the so-called Haitian affair in 1996-1997. Using Principal Components Analysis (PCA), samples and glycerol 98 % could be distinguished with a multivariate confidence interval  $>95$  %.
- The utility of NIR to discriminate between different production plants of pharmaceutical products has been investigated by means of intact tablets of Metandienon obtained from 13 different locations. PCA of second derivative spectra revealed that at least 4 different classes can be distinguished with  $>95$  % confidence intervals.
- Quantitative aspects were studied by determination of the active ingredients of intact and powdered tablets of Tamoxifen. Beer's Law quantification based on selected absorption bands, proved to be useful but only at concentrations  $>5$  %.

The results prove that NIR combined with chemometric data analysis can be a reliable technique for quality and identity control of raw materials and pharmaceutical dosage forms. The method can be timesaving due to easy sample preparation and fast measurements and so it is especially suitable for large series of samples.



# Inhoud

**Summary 7**

**Samenvatting 9**

**1. Introductie 11**

**2. Principe van NIR 15**

**3. Chemometrische technieken 17**

**4. Methoden en materialen 19**

4.1. Identiteitscontrole 19

4.2. Kwaliteitscontrole 20

4.3. Brontracering 22

4.4. Kwantitatieve analyse 24

4.5. NIR metingen 24

4.6. MIR metingen 25

4.7. Chemometrie 25

**5. Resultaten en Discussie 27**

5.1. Identiteitscontrole 27

5.2. Kwaliteitscontrole 29

5.3. Brontracering 33

5.4. Kwantitatieve analyse 39

**6. Conclusies 41**

**Dankwoord 42**

**Literatuur 43**

**Bijlage 1 De Glycerine Affaire 45**

**Bijlage 2 Overzicht Metandienon tabletten 50**

**Bijlage 3 Verzendlijst 51**



## Summary

A pilot study has been carried out to the potentials and limitations of near infrared (NIR) spectroscopy for the analysis of pharmaceutical products. For this purpose four possible applications have been studied.

The usefulness for identity control was studied first. The NIR spectra of 327 pharmaceutical ingredients, commonly used for the preparation of vaccine-media, have been measured. A selection of spectra was used to compose a calibration set. The remaining set was used for validation. The correlation coefficient was found to be a useful parameter to confirm the identity with high confidence.

The second application was quality control. The NIR spectra of 72 samples of glycerol that originated from the so-called Haitian affair have been compared to 45 reference standards of glycerol 85 % and 98 %. Standards and samples could be clearly distinguished after principal component analysis (PCA) of the spectra.

The possibility to determine the source of production of a pharmaceutical product was studied on 18 samples of Metandienon tablets and 7 samples of Tamoxifen tablets, obtained from different sources. PCA of the corresponding NIR spectra appeared to be a useful combination to classify the tablets in accordance with their physical and chemical properties.

Finally, the quantitative potentials of NIR were studied by the analysis of Tamoxifen tablets. From measurements on both intact and powdered tablets it was concluded that NIR can be used for quantification of the amount of active ingredients. However, small differences in dosage appear to be difficult to determine.

The results demonstrate that NIR can be a fast and non-destructive alternative to conventional, more elaborate, methods that are currently in use for qualitative and quantitative purposes.





## Samenvatting

De mogelijkheden en de beperkingen van nabij-infrarood spectroscopie (NIR) voor de analyse van farmaceutische producten zijn onderzocht. Vier mogelijke toepassingen zijn bestudeerd.

Eerst werd de bruikbaarheid voor identiteitscontrole onderzocht. Van 327 farmaceutische producten, die worden gebruikt voor de bereiding van vaccimedia werden NIR spectra opgenomen. Een deel van de spectra werd gebruikt om een calibratie set samen te stellen. De overige spectra werden gebruikt voor validatie. De correlatiecoëfficiënt bleek een nuttige parameter om de identiteit met hoge betrouwbaarheid te bevestigen.

De tweede toepassing was kwaliteitscontrole. De NIR spectra van 72 glycerol monsters afkomstig van de zogenaamde Haïtiaanse affaire zijn vergeleken met 45 referentiestandaarden van glycerol 85 % en 98 %. Standaarden en monsters konden duidelijk worden onderscheiden na principale componenten analyse (PCA) van de spectra.

De mogelijkheid om productiebronnen van farmaceutische producten vast te stellen werd bestudeerd aan de hand van 18 monsters Metandienon tabletten en 7 monsters Tamoxifen tabletten van verschillende oorsprong. PCA van de opgenomen NIR spectra bleek een bruikbare methode om de tabletten in overeenstemming met de fysische en chemische eigenschappen te classificeren.

Als laatste werden de kwantitatieve mogelijkheden van NIR onderzocht door analyse van Tamoxifen tabletten. Uit metingen van intacte en verpoederde tabletten kan worden geconcludeerd dat NIR bruikbaar is voor de kwantificering van de hoeveelheid actieve stof. Kleine verschillen in de dosering zijn echter moeilijk aan te tonen.

De resultaten laten zien dat NIR een snelle en niet-destructief alternatief kan zijn voor conventionele en meer bewerkelijke methoden, die momenteel in gebruik zijn voor kwalitatieve en kwantitatieve doeleinden.



# 1. Introductie

Nabij-infraroodspectrometrie (NIR) is een analysetechniek die de laatste jaren sterk aan populariteit heeft gewonnen met name in farmaceutische toepassingen. De belangrijkste redenen voor het gebruik van NIR zijn vooral economische, de techniek is uiterst eenvoudig en robuust terwijl de gemiddelde tijd die nodig is voor de analyse van één monster veelal minder is dan een minuut. De techniek is bovendien non-destructief en kan vrijwel volledig worden geautomatiseerd.

Tot voor enkele jaren werd NIR vooral gebruikt in de voedingsindustrie voor kwantitatieve doeleinden zoals het bepalen van vocht-, eiwit- en vetgehalten van bulkmaterialen. NIR werd echter nauwelijks gebruikt voor analytisch chemische analyses zoals bijvoorbeeld structuuropheldering. De belangrijkste reden daarvoor was de complexiteit van de NIR spectra. NIR absorptiepatronen zijn, anders dan mid infrarood (MIR) spectra, erg moeilijk te interpreteren. De NIR absorptiebanden zijn breed en grillig van vorm en daardoor moeilijk te correleren met moleculaire structureigenschappen of functionele groepen. De signaal/ruisverhouding van de spectra is echter zeer hoog waardoor ogenschijnlijk kleine verschillen toch significant kunnen zijn. Om deze informatie inzichtelijk en daardoor bruikbaar te maken zijn complexe statistische, zogenaamde multivariate calibratie technieken onontbeerlijk. De ontwikkeling van dergelijke geavanceerde chemometrische technieken voor data-interpretatie en dataverwerking in de jaren negentig hebben dan ook een enorme impuls gegeven aan de toepassingsmogelijkheden van NIR, al zijn relatief grote aantallen monsters nodig om een hoge betrouwbaarheid te kunnen garanderen.

De interesse in toepassing van NIR voor de analyse van farmaceutische producten stamt uit het eind van de jaren tachtig<sup>1</sup>. Sindsdien zijn diverse studies gepubliceerd en is het aantal toepassingen aanzienlijk gestegen. Voorbeelden daarvan zijn onder meer beschreven in diverse overzichtsartikelen<sup>2,3</sup>.

Met name vanwege de snelle analysetijd is NIR een economisch aantrekkelijk alternatief voor de veel arbeidsintensievere natchemische bepalingen die in de diverse Farmacopees worden voorgeschreven<sup>4</sup>. Bovendien kunnen monsters zonder enige voorbereiding zelfs door de verpakking heen worden gemeten<sup>5</sup>. Daarnaast is de methode volledig non-destructief en blijft fysische informatie over bijvoorbeeld de deeltjesgrootte, de dichtheid en brekingsindex in het spectrum van een monster behouden. Tevens bevatten de spectra informatie over eventuele polymorfie en zelfs optische activiteit. Voor de controle van de chemische samenstelling van een monster kan dat een complicerende factor zijn, maar in farmaceutische toepassingen is het een voordeel dat fysische eigenschappen met NIR kunnen worden vastgesteld omdat ze mede van invloed kunnen zijn op de werking van het geneesmiddel. De meeste onderzoeken naar farmaceutische toepassingen van NIR richten zich dan ook op dit aspect en op de kwaliteitscontrole in het kader van Good Laboratory Practice (GLP) en Good Manufacturing Practice (GMP). Voorbeelden van die kwaliteitsaspecten zijn onder andere

beschreven in artikelen van onderzoeken van Plugge en van der Vlies<sup>6</sup>, Wilson en Byron<sup>7</sup> en Forina et al<sup>8</sup>.

De identiteits- en kwaliteitscontrole van zowel grondstoffen als intacte producten is momenteel de belangrijkste toepassing van NIR in de farmaceutische en cosmetische industrie<sup>9,10</sup>. Het gebruik voor kwantificering neemt echter snel toe en naar verwachting zal NIR ook daarin een belangrijke rol gaan spelen<sup>11</sup>.

In het RIVM wordt NIR spectrometrie sinds 1998 toegepast onder andere voor de bepaling van het vetgehalte van gevriesdroogde melk- en voedselproducten<sup>12</sup>. Daarnaast wordt onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om de identiteitscontrole van grondstoffen voor de bereiding van vaccinmedia uit te voeren met NIR als alternatief voor de relatief trage analyse met MIR.

In het kader van het RIVM project Geavanceerde Analysetechnieken MAP SOR (Meerjaren Activiteiten Plan Strategisch Onderzoek Directie) is begin 1999 besloten oriënterend onderzoek uit te voeren naar de mogelijkheden en beperkingen van NIR in farmaceutische toepassingen. Doel van dit onderzoek is het verkrijgen van inzicht in de techniek om zodoende beter te kunnen oordelen in hoeverre NIR geschikt en toelaatbaar is als routinematige methode voor de kwaliteitscontrole (identiteit, zuiverheid en gehalte) van grondstoffen en farmaceutische producten. Tevens kan daarbij 'hands on' ervaring worden opgedaan en kan worden nagegaan in hoeverre NIR bruikbaar is bij het opsporen en karakteriseren van vervalste geneesmiddelen, wetende dat bij dit type onderzoek de hoeveelheid informatie over de te analyseren producten gering is.

Op basis van deze onderzoeksdoelen zijn een viertal potentiële toepassingen van NIR bestudeerd.

De eerste toepassing betreft de bruikbaarheid van NIR als methode voor de identiteitscontrole van grondstoffen die worden gebruikt voor de bereiding van vaccinmedia<sup>13</sup>. Deze controle wordt momenteel nog met MIR uitgevoerd maar NIR zou een, veel sneller, alternatief kunnen zijn mits de betrouwbaarheid voldoende kan worden aangetoond.

De tweede toepassing is het gebruik van NIR voor kwaliteitscontrole. De controle is uitgevoerd aan monsters glycerol met als doel het traceren van afwijkingen in de samenstelling van deze vloeistof<sup>14</sup>. De problematiek die daaraan ten grondslag ligt is de zogenaamde Haïtiaanse glycerine affaire uit 1996-1997. Als gevolg van de verwerking van een partij verontreinigde glycerol in een siroop zijn destijds 87 jonge kinderen om het leven gekomen. Onduidelijk is of er destijds een kwaliteitscontrole is uitgevoerd en door wie. Uit het onderzoek dat is ingesteld is wel gebleken dat de Amerikaanse Farmacopee (USP) en de Europese Farmacopee (Ph. Eur) verschillende voorschriften hanteren voor de controle van glycerol. Tevens bleek dat de methoden niet al te discriminatief zijn voor glycerol. Een tweede partij (72 vaten, elk 250 kg) van dezelfde herkomst is in de haven van Rotterdam in beslag genomen en geanalyseerd. Mede om die reden is besloten te onderzoeken of de onzuiverheden in deze glycerol monsters eenvoudig en snel met NIR te traceren zouden zijn geweest. Uitgebreide informatie over deze affaire is beschreven in bijlage 1.

Een derde mogelijke toepassing is het traceren van productiebronnen van tabletten<sup>15, 16</sup>. Doel is na te gaan of NIR bruikbaar is om onderscheid te maken tussen tabletten van verschillende samenstelling en oorsprong met als afgeleid doel het opsporen van vervalsingen. Dit onderzoek is uitgevoerd aan tabletten van de middelen Metandienon en Tamoxifen.

Metandienon is in Nederland als actief bestanddeel van geneesmiddelen voor humaan of veterinair gebruik niet toegelaten. Toch is er een levendige handel in Metandienon tabletten, met name in het circuit van sportscholen. Er worden regelmatig partijen van deze tabletten in beslag genomen maar de herkomst is vaak onduidelijk. Uit chemische analyses blijkt dat de samenstelling en het gehalte aan het werkzame bestanddeel nogal varieert.

Tamoxifen tabletten (werkzaam bestanddeel Tamoxifencitraat) zijn een belangrijk hulpmiddel bij de bestrijding van borstkanker. Tamoxifen tabletten zijn onder verschillende merknamen in de handel.

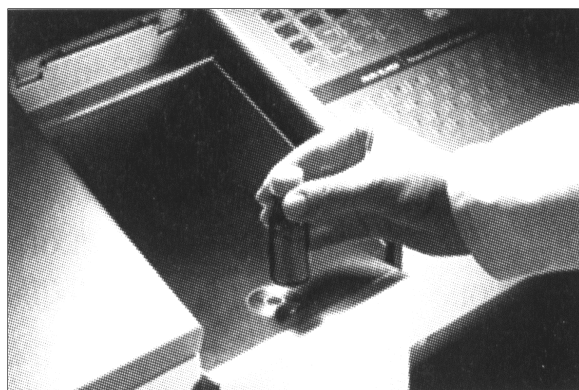
Een vierde mogelijke toepassing van NIR is kwantitatieve analyse<sup>17</sup>. Vanwege het non-destructieve karakter kunnen NIR analyses zonder voorbereidingen worden uitgevoerd aan intacte tabletten. Doel van het onderzoek is de hoeveelheid werkzame bestanddeel in intacte tabletten te bepalen. Dit onderzoek is eveneens uitgevoerd aan Tamoxifen tabletten. Deze tabletten verschillen zowel in samenstelling qua hulpstoffen als qua hoeveelheid Tamoxifencitraat per tablet.



## 2. Principe van NIR

Het deel van het elektromagnetisch spectrum dat algemeen wordt betiteld als ‘nabij-infrarood’ is het golflengtegebied tussen 800 en 2500 nanometer ofwel 12500 tot 4000  $\text{cm}^{-1}$  in golfgetal. In dit gebied absorberen de zogenaamde boventonen van moleculaire vibraties. Vrijwel alle organische en anorganische moleculen vibreren en daarom kan in principe van bijna elk materiaal een NIR spectrum worden opgenomen. De intensiteit van de NIR absorpties is echter zeer beperkt maar door gebruik te maken van een specifieke NIR lichtbron en een NIR gevoelige detector kunnen spectra worden geproduceerd met een zeer hoge signaal/ruisverhouding.

De belangrijkste kenmerken van NIR zijn de robuustheid, snelheid en eenvoud van analyse. Een monstervoorbewerking is meestal niet nodig en er zijn geen speciale materialen of accessoires vereist. Monsters kunnen daardoor zelfs in hun verpakking worden geanalyseerd. De NIR spectra van tabletten kunnen bijvoorbeeld in de stripverpakking of in een glazen flesje worden gemeten. Een voorbeeld daarvan is weergegeven in Figuur 1. De foto illustreert hoe een monster op het ‘meetoog’ van het NIR instrument wordt geplaatst. Deze methode is ook toegepast in het hier beschreven onderzoek.



*Figuur 1. NIR-meting van een vaste stof in de verpakking*

De bruikbaarheid van NIR voor het verkrijgen van kwalitatieve en kwantitatieve informatie wordt ontleend aan de zeer hoge signaal/ruisverhouding van NIR spectra. Daardoor kunnen hele kleine, met het oog soms nauwelijks waarneembare, verschillen tussen spectra toch significant zijn en aldus bruikbare informatie bevatten. Om die informatie uit (een set van) spectra te verkrijgen zijn geavanceerde mathematische technieken onontbeerlijk. Om die reden zijn multivariate calibratie technieken zoals principale componenten analyse (PCA) noodzakelijk voor een succesvolle toepassing van NIR spectrometrie. Dergelijke chemometrische methoden maken dan ook standaard deel uit van de instrument software.





### 3. Chemometrische technieken

NIR absorptiepatronen zijn, anders dan MIR spectra, erg moeilijk te interpreteren. De NIR absorptiebanden zijn breed en grillig van vorm en daardoor nauwelijks te correleren met moleculaire structureigenschappen of functionele groepen. De signaal/ruisverhouding van de spectra is echter zeer hoog waardoor ogenschijnlijk kleine verschillen toch significant kunnen zijn. Statistische en chemometrische technieken zijn onontbeerlijk om die verschillen zichtbaar en inzichtelijk te maken. Tevens zijn relatief grote aantallen monsters nodig om een zekere betrouwbaarheid te kunnen garanderen.

Een manier om overeenkomsten (en verschillen) tussen NIR spectra uit te drukken in een getal is de correlatiecoëfficiënt. Spectra van monsters van dezelfde verbinding zullen een hoge mate van overeenkomst hebben en dus een hoge correlatie. Daarentegen zal de correlatie met spectra van andere verbindingen kleiner zijn. Het verschil in correlatiecoëfficiënt wordt ook wel de ‘distance’ genoemd. De correlatie en de ‘distance’ zijn dus twee parameters om de overeenkomsten en verschillen van de NIR spectra van bijvoorbeeld een monster en een referentiestandaard te beschrijven.

Om de correlatiecoëfficiënt van het spectrum van een te controleren monster te kunnen berekenen zijn referentiespectra nodig. Daartoe wordt een bibliotheek van referentiespectra gebruikt<sup>18</sup>. Vanzelfsprekend moet voor de identiteitscontrole van een te controleren verbinding een referentiespectrum van die stof in de bibliotheek aanwezig zijn. Daarnaast moeten voldoende spectra van andere stoffen aanwezig zijn om de ‘distance’ ten opzichte van die andere stoffen met een zekere betrouwbaarheid te kunnen berekenen.

Een andere manier om overeenkomsten en verschillen tussen spectra in een getal uit te drukken is door middel van een zogenaamde principale componenten analyse (PCA). Hierbij worden de NIR spectra geordend in een datamatrix van golfgetallen met bijbehorende intensiteiten. De extractie van relevante informatie uit een dergelijke datamatrix wordt eenvoudiger wanneer de dimensies van deze datamatrix worden gereduceerd, met andere woorden als het aantal variabelen kan worden gereduceerd. Door deze dimensiereductie kunnen meer inzichtelijke grafische voorstellingen van de dataset worden gemaakt. PCA is een veel toegepaste techniek om de dimensies van de datamatrix te verkleinen. Door het toepassen van wiskundige methodes worden abstracte variabelen (de principale componenten) verkregen die een combinatie zijn van de werkelijk gemeten variabelen. De eerste principale component (PC) beschrijft de grootst mogelijke variantie in de datamatrix. De tweede PC beschrijft de op één na grootste variantie in de dataset en staat loodrecht op de eerste PC. Hierdoor zijn de PC's onafhankelijk van elkaar. Door gebruik te maken van deze abstracte variabelen is het vaak mogelijk om de oorspronkelijke matrix grotendeels te beschrijven.

Met behulp van de principale componenten (PC's) kunnen zowel overeenkomsten als verschillen in een set van spectra zichtbaar worden gemaakt in een tweedimensionale plot.

Daartoe worden  $PC_x/PC_y$  plots gebruikt. In dergelijke plots worden de spectra gewoonlijk als punten worden weergegeven. Enerzijds kan een  $PC_x/PC_y$  plot worden gebruikt om inzicht te krijgen in de variatie binnen een set van spectra/monsters. Anderzijds kunnen de plots gebruikt worden voor classificatie doeleinden omdat groepen van spectra die veel overeenkomst vertonen herkenbaar zijn als clusters.

## 4. Methoden en Materialen

### 4.1 Identiteitscontrole

Het onderzoek naar de bruikbaarheid van NIR voor de identiteits- en kwaliteitscontrole van farmaceutische grondstoffen is uitgevoerd aan de hand van zesendertig verschillende verbindingen. Per verbinding zijn tussen de één en de vijfenveertig monsters geanalyseerd, in totaal driehonderdzeventwintig monsters. De namen van de verbindingen en het aantal geanalyseerde monsters per verbinding zijn weergegeven in Tabel 1. De verbindingen zijn vaste stoffen in poedervorm of vloeistoffen.

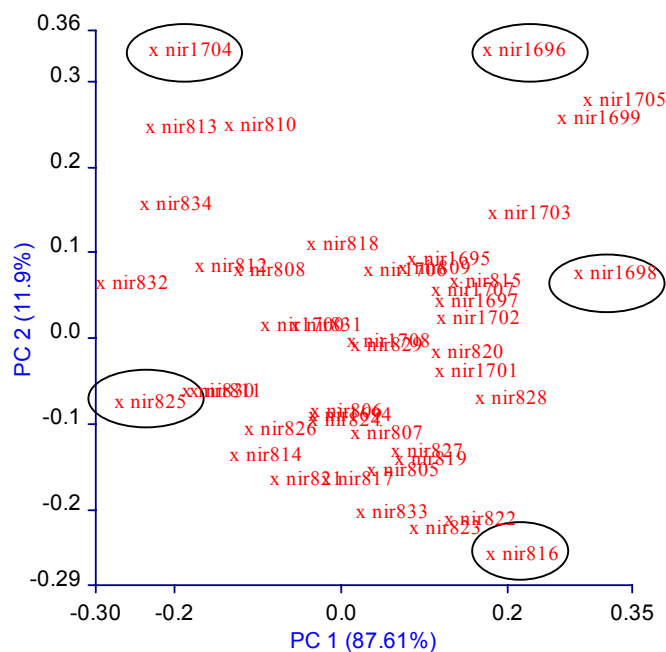
Tabel 1. Geanalyseerde verbindingen inclusief het aantal monsters per verbinding.

Verbinding	aantal monsters	Verbinding	aantal monsters	Verbinding	aantal monsters
2-deoxyribose	1	glutaminezuur-l	6	saccharose	12
adonitol	15	gluthation	5	streptomycinesulfaat	30
alanine-l	1	glycerol	41	thiomersal	6
arabinose-l	3	guanine.HCl	3	threonine-dl	1
arginine-l (free base)	2	hydroxy-l-proline	1	threonine-l	1
arginine-l.HCl	4	isoleucine-dl	12	trinatriumcitraat	12
asparagine-l	24	natriumglutamaat	45	tryptophan-dl	6
asparaginezuur-l	1	nicotinezuur	1	tyrosine-l	6
cellobiose	1	phenolrood	1	uracil	2
chloortetracycline.HCl	1	phenolrood (zout)	8	ureum	12
EDTA	9	proline-l	1	valine-dl	1
glutamine-l	38	pyridoxal.HCl	1	vitamine D2	7

Uit de verzameling van driehonderdzeventwintig opgenomen spectra zijn eerst een aantal spectra geselecteerd om te dienen als calibratieset ofwel ‘referentiebibliotheek’. De overige spectra zijn gebruikt als validatiespectra.

Bij het samenstellen van de referentiebibliotheek is ernaar gestreefd per verbinding vijf spectra van onafhankelijke monsters op te nemen. De keuze van deze vijf spectra is uitgevoerd met behulp van PCA. Criterium voor selectie is vijf spectra die in de PC1/PC2 plot globaal de grenzen van het cluster aangeven. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 2. In de PC1/PC2 plot van de veertig NIR spectra van natriumglutamaat zijn de spectra van de omcirkelde nummers opgenomen in de referentiebibliotheek. Deze methode is in principe weliswaar arbitrair, maar wordt verondersteld representatief te zijn voor de variatie in de totale set van spectra.

Voor een aantal verbindingen waren echter minder dan vijf monsters beschikbaar. Voor deze verbindingen zijn alle beschikbare spectra in de bibliotheek opgenomen.



Figuur 2. PC1/PC2 plot van veertig NIR spectra van natriumglutamaat.  
De vijf omcirkelde spectra zijn gekozen voor opname in de referentiebibliotheek.

Van alle zogenaamde validatiespectra is vervolgens de correlatiecoëfficiënt en de ‘distance’ ten opzichte van de spectra in de bibliotheek bepaald. Indien meer dan één validatiespectrum per verbinding beschikbaar was, is tevens de spreiding en het gemiddelde van de correlatie berekend. Indien drie of meer validatiespectra aanwezig waren is tevens de standaarddeviatie van de correlatie bepaald.

Verbindingen waarvan geen validatiespectra beschikbaar waren zijn niet apart onderzocht. Voor deze stoffen is wel gekeken naar de ‘distance’ ten opzichte van andere verbindingen. Tenslotte is de bruikbaarheid van de correlatiecoëfficiënt en de ‘distance’ voor de identificatie van onbekende verbindingen getest aan de hand van twee ‘blinde’ monsters.

## 4.2 Kwaliteitscontrole

Het onderzoek naar de bruikbaarheid van NIR voor kwaliteitscontrole is uitgevoerd aan de hand van honderdvijftien monsters glycerol. Daarvan zijn tweeënzeventig monsters glycerol in beslag genomen in de haven van Rotterdam, tweeënveertig referentiemonsters glycerol 85 % en één referentiemonster glycerol 98 % dat in duplo is geanalyseerd.

Om inzicht te krijgen in de eventuele invloed van het vochtgehalte op het NIR-spectrum van glycerol is een deelmonster van een referentiestandaard glycerol 85 % gedurende 24 uur bewaard in een exsiccator boven silicagel. Eenzelfde deelmonster is 24 uur in een afgesloten vat boven water geplaatst.

Uit eerder uitgevoerde chemische analyse van de glycerol monsters is gebleken dat deze slechts ten dele bestaan uit glycerol. Daarnaast bevatten deze monsters nog zeven andere componenten. Op basis van die kwantitatieve samenstelling zijn de tweeënzeventig monsters

onderverdeeld in twee groepen. De samenstelling per groep is weergegeven in Tabel 2. Zeven monsters zijn ingedeeld bij groep 1 en vijftien bij groep 2.

Tabel 2. Samenstelling in gewichtspercentages van de 72 monsters

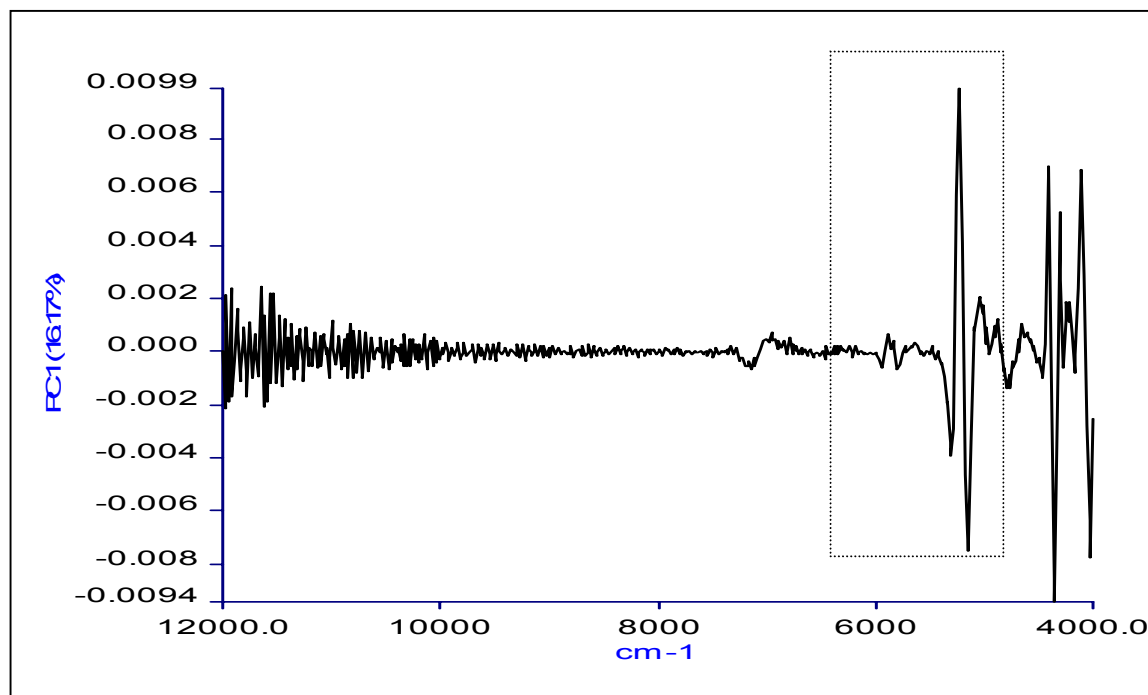
COMPONENT	Samenstelling (%)	
	Groep 1	Groep 2
glycerine	7,9	7,7
diethyleenglycol	19	13,9
triethyleenglycol	6,3	2,7
tetraethyleenglycol	0,4	0,09
monoethyleenglycol	0,6	5
water	22,4	24,3
saccharose	29,5	26,5
sorbitol	20	20

Uit het totaal van vijfenveertig spectra van glycerol referentiestandaarden zijn zes spectra geselecteerd als calibratiespectra. De spectra van de resterende referentiestandaarden en van de glycerol monsters zijn gebruikt als validatiespectra. Voor al deze spectra is de correlatiecoëfficiënt ten opzichte van de zes referentiespectra bepaald. Tevens zijn het gemiddelde en de standaarddeviatie van de correlatiecoëfficiënt berekend voor de referentiestandaarden en voor de glycerol monsters.

Vervolgens is PCA uitgevoerd van de totale set van NIR spectra. Doel hiervan was te onderzoeken of bepaalde clusters konden worden gevonden die correleren met de glycerol monsters enerzijds en de referentiestandaarden anderzijds. Deze analyse is gedaan aan de oorspronkelijke spectra (gebied 12000-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) en aan twee golfgetalgebieden, te weten het gedeelte van 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$  en het interval 6500-5500  $\text{cm}^{-1}$ .

De selectie van het eerste deelgebied is gebaseerd op de afwezigheid van enige absorptie in het gebied 12000-10000  $\text{cm}^{-1}$ . Berekeningen zijn uitgevoerd aan de transmissie spectra en aan de tweede afgeleide van de spectra. Reden voor het gebruik van de tweede afgeleide spectra is dat eventuele basislijn effecten op deze wijze worden geëlimineerd. Bovendien worden verschillen en overeenkomsten in de spectra daardoor vaak beter zichtbaar.

De selectie van het deelgebied 6500-5500  $\text{cm}^{-1}$  is gebaseerd op informatie uit de tweede afgeleide spectra en het zogenaamde 'loading spectrum' van de eerst principale component. Dit 'loading spectrum' weerspiegelt de spectrale variatie in de set van spectra als functie van de golflengte. Zoals blijkt uit het loading spectrum in Figuur 3 ligt de grootste variatie (en dus informatie) in het gebied tussen 6500-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Tussen 5500 en 4000  $\text{cm}^{-1}$  kan een deel van de variatie echter ook afkomstig zijn van variaties in absorpties afkomstig van de glazen petrischaaltjes en waterdamp uit de atmosfeer. Om die reden is uiteindelijk het gebied beperkt tot 6500-5500  $\text{cm}^{-1}$ .



Figuur 3. Loading spectrum van de eerste principale component van glycerol. De inzet is het geselecteerde deelgebied  $6500\text{-}5500\text{ cm}^{-1}$ .

Om inzicht te krijgen in algemene experimentele effecten is ook gekeken naar de absorptiegebieden van water. Voor zover mogelijk is voor deze gebieden met behulp van de software gecorrigeerd, of deze gebieden zijn niet meegenomen in de berekeningen.

Tenslotte is nog onderzocht in hoeverre de zeven monsters van groep 1, die qua samenstelling afwijken van de vijftien monsters van groep 2, aan de hand van hun NIR-spectrum kunnen worden onderscheiden. Op basis van gedetailleerde visuele inspectie van de tweede afgeleide spectra van de tweeënzeventig monsters zijn twee gebieden geselecteerd te weten  $6500\text{-}5500\text{ cm}^{-1}$  en  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$ . Op deze gebieden is vervolgens PCA uitgevoerd.

### 4.3 Brontracering

Het onderzoek naar de mogelijkheden om met NIR vervalsingen en productiebronnen van farmaceutische producten te traceren is uitgevoerd aan achttien verschillende monsters Metandienon tabletten en zeven monsters Tamoxifen tabletten. Het aantal beschikbare tabletten per monster verschilde voor Metandienon van één tot tien. Gegevens over oorsprong van deze tabletten, codes en fysische gegevens zijn vermeld in Bijlage 2.

Onderzoeksgegevens zijn vermeld in Tabel 5 (sectie Resultaten, paragraaf 5.3).

Van Tamoxifen waren meer dan tien tabletten per monster aanwezig. Vier monsters waren van het merk Dumex en drie van het merk TEVA. De Dumex tabletten bevatten respectievelijk 10, 20, 30 en 40 mg van de werkzame stof Tamoxifencitraat per tablet en de

TEVA tabletten respectievelijk 10, 20 en 40 mg per tablet. Gegevens van de monsters zijn vermeld in Tabel 3.

Tabel 3. Overzicht van Tamoxifen tabletten.

No	Monster	LGO-code	Gewicht tablet (mg)	Gewicht Tamoxifencitr.(mg)	Gewicht Tamoxifencitr. (%)
1	Dumex	4568	180	10	5.5
2	Dumex	4569	200	20	10
3	Dumex	4570	300	30	10
4	Dumex	4571	400	40	10
5	TEVA	4572	125	10	8
6	TEVA	4573	250	20	8
7	TEVA	4574	500	40	8

Voor zover mogelijk zijn per monster NIR metingen uitgevoerd aan tien intacte tabletten (één spectrum per tablet) en aan tabletten na verpoederen in een agaat mortier.

Om inzicht te krijgen in eventuele effecten van bewaarcondities zoals temperatuur en (lucht)vochtigheid op de NIR spectra van de tabletten zijn aanvullende analyses uitgevoerd. Hiertoe zijn van drie monsters Metandienon (orderno. 3531, 4606 en 4607) na opname van het NIR spectrum, drie tabletten gedurende een week bewaard bij 100 °C. Tevens zijn drie tabletten gedurende zes dagen bewaard bij een relatieve vochtigheid van 82.4 % en een temperatuur van gemiddeld 19,5 °C. Daarna is nogmaals het NIR-spectrum van deze tabletten opgenomen.

Voor de NIR meting van de intacte tabletten is een tablet in een 5 mm tablethouder geplaatst waarna het NIR spectrum is opgenomen in het gebied 12000 cm<sup>-1</sup> tot 3000 cm<sup>-1</sup> conform SOP LOC288. Voor de analyse van de verpoederde tabletten zijn vier tabletten per monster handmatig vermalen in een agaat mortier. Het poeder is vervolgens overgebracht in een glazen vial. Daarna is het spectrum opgenomen conform SOP LOC288. Voor vergelijkingsdoeleinden is op dezelfde wijze het NIR spectrum van de werkzame stoffen Metandienon en Tamoxifencitraat opgenomen.

De opgenomen NIR spectra zijn visueel beoordeeld door interpretatie en door vergelijking met referentiespectra uit een spectrum bibliotheek. Vervolgens is onderzocht in hoeverre de monsters konden worden geclassificeerd op basis van de correlatiecoëfficiënt, dan wel op basis van clustering met behulp van PCA. De berekeningen zijn uitgevoerd in het gebied 10000 cm<sup>-1</sup> - 4000 cm<sup>-1</sup>, rekening houdend met eventuele achtergrond absorpties van water. Voor deze gebieden is met behulp van de instrument software gecorrigeerd.

## 4.4 Kwantitatieve analyse

Kwantitatieve analyse is uitgevoerd aan zeven verschillende typen Tamoxifen tabletten welke worden verkocht onder de merknamen Dumex en TEVA (zie Tabel 3).

Voor de analyse van de monsters in poedervorm zijn per monster één tot vier tabletten vermalen in een agaat mortier zodanig dat per monster gelijke gewichtshoeveelheden werden geanalyseerd (400 mg voor Dumex tabletten en 500 mg voor TEVA-tabletten). Na vermaling is het poeder overgebracht in een glasvial waarna het NIR-spectrum is opgenomen.

Om inzicht te krijgen in de mogelijkheden van kwantificering van de hoeveelheid werkzame stof per tablet is een beperkte ijkreeks gemaakt. Van de tabletten met verschillende hoeveelheden werkzame stof zijn er in principe slechts twee uit de serie van Dumex bruikbaar voor het maken van een ijklijn omdat het percentage aan werkzame stof daarin verschillend is (zie Tabel 3). Daarom is een ijkreeks gemaakt bestaande uit toevoegingen van 85, 161 en 260 mg Tamoxifencitraat aan verpoederde 40 mg Dumex tabletten. Na homogenisering zijn deze mengmonsters als poeder geanalyseerd. Op basis van het NIR-spectrum van zuiver Tamoxifencitraat en van de spectra van de mengmonsters is de absorptieband bij  $8757\text{ cm}^{-1}$  geselecteerd voor het maken van een ijklijn. Kwantificering is onderzocht aan de hand van het geïntegreerde oppervlak van deze piek. De punten bij  $8920$  en  $8650\text{ cm}^{-1}$  zijn daarbij gehanteerd voor het trekken van een basislijn. Deze punten zijn gekozen omdat dit de buigpunten in de flanken van de absorptieband in de spectra van de tabletten zijn.

## 4.5 NIR metingen

NIR spectra zijn opgenomen in het gebied  $12000\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  met een Spectrum Identicheck FT-NIR spectrometer (Perkin-Elmer) conform standaard procedure SOP LOC288.

Alle metingen zijn verricht met een integrerende bol (ICRA) in de zogenaamde 'upper mode'. Detectie is uitgevoerd met een PbS-detector. De optische resolutie was  $16\text{ cm}^{-1}$  ( $8\text{ cm}^{-1}$  data punt resolutie). Per spectrum zijn 64 scans genomen.

Als achtergrondmeting (referentieblanko) voor de analyse van vaste stoffen is Teflon gebruikt (instrument standaard). Voor vloeistoffen is een lege petrischaal met een zogenaamde reflector toegepast.

De analyse van poedervormige vaste stoffen is uitgevoerd door circa 1 g monster over te brengen in een 3 ml glazen vial met schroefdop (Alltech). Na vullen en afsluiten is de vial op het meetoog van de spectrometer geplaatst. Vervolgens is het NIR spectrum opgenomen in de diffuse reflectie mode.

De analyse van vloeistoffen is uitgevoerd door circa 2 ml monster over te brengen in een petrischaal met metalen reflector (Perkin-Elmer). De schaal met monster en reflector is



vervolgens op het meetoog van de spectrometer geplaatst waarna het spectrum is opgenomen in de transflectie mode.

De analyse van intacte tabletten is uitgevoerd met behulp van een tablethouder met een diameter van 5 mm. De tablethouder was gecentreerd geplaatst op het meetoog van de spectrometer. De NIR spectra zijn opgenomen in de diffuse reflectie mode. Hierbij moet worden opgemerkt dat de grootte en de vorm van de tabletten van invloed is op de kwaliteit van het spectrum in termen van signaal/ruis verhouding. De 10 mg Tamoxifen tabletten van TEVA zijn bijvoorbeeld te klein en te ‘bol’ om goede metingen te kunnen doen met een 7 mm tablethouder. Om reden van uniformiteit zijn daarom alle tabletten geanalyseerd met de 5 mm tablethouder.

## 4.6 MIR metingen

Voor vergelijkingsdoeleinden zijn een aantal verbindingen tevens met mid infrarood (MIR) geanalyseerd in het gebied  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . De spectra zijn opgenomen met een Bruker IFS-55 FT-IR instrument. De optische resolutie was  $2\text{ cm}^{-1}$  bij 32 scans (foreground/background). Vloeistoffen zijn opgenomen als vloeistoffilm tussen twee KBr-vensters met stikstof als referentieachtergrond conform LOC SOP 214. Vaste stoffen zijn geanalyseerd als KBr-tablet volgens dezelfde SOP. Referentie blanco was KBr.

## 4.7 Chemometrie

Berekeningen van de correlatiecoëfficiënt en de ‘distance’ zijn uitgevoerd met het programma ‘COMPARE’. Dit programma maakt deel uit van de standaard software van het gebruikte NIR instrument. De berekeningen zijn uitgevoerd aan het golfgetalgebied  $10000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  in plaats van aan het oorspronkelijke spectrum van  $12000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ . Redenen hiervoor waren enerzijds het feit dat er in geen enkel spectrum absorpties zijn waargenomen tussen  $12000$  en  $10000\text{ cm}^{-1}$  en anderzijds dat het gebied  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  niet goed bruikbaar is vanwege interfererende absorpties van de gebruikte glazen meetflesjes en petri-schaaltjes.

Principale componenten analyses (PCA) zijn uitgevoerd met het programma Quant+ op zowel de oorspronkelijke NIR spectra (golfgetalgebied  $12000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) als op geselecteerde deelgebieden van de spectra. In een aantal gevallen is tevens PCA uitgevoerd op de tweede afgeleide van NIR spectra om het effect van basislijnverschillen in de spectra te minimaliseren. De scores van de berekende principale componenten zijn geëxporteerd naar het programma MATLAB. Met behulp van MATLAB zijn de PCA resultaten uitgezet in  $PC_x/PC_y$  plots en zijn 95% betrouwbaarheidsellipsen berekend rondom de scores van verbindingen die tot eenzelfde categorie of klasse behoren<sup>19</sup>. Op deze wijze wordt een duidelijk beeld verkregen van de diverse categorieën en de ligging ten opzichte van elkaar.

Een belangrijke aanname hierbij is wel dat de data normaal verdeeld zijn en dat de gemeten data representatief zijn voor de gehele populatie.

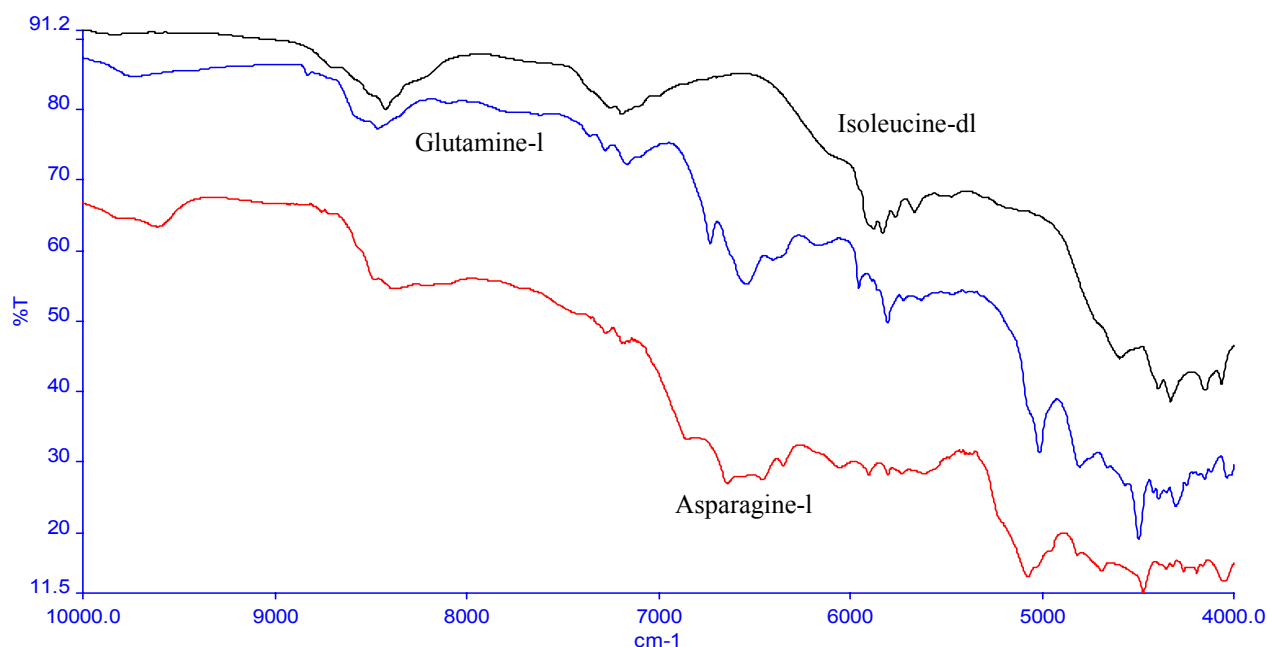
## 5. Resultaten en Discussie

De resultaten van de diverse onderzoeken zijn per deelonderzoek gerangschikt.

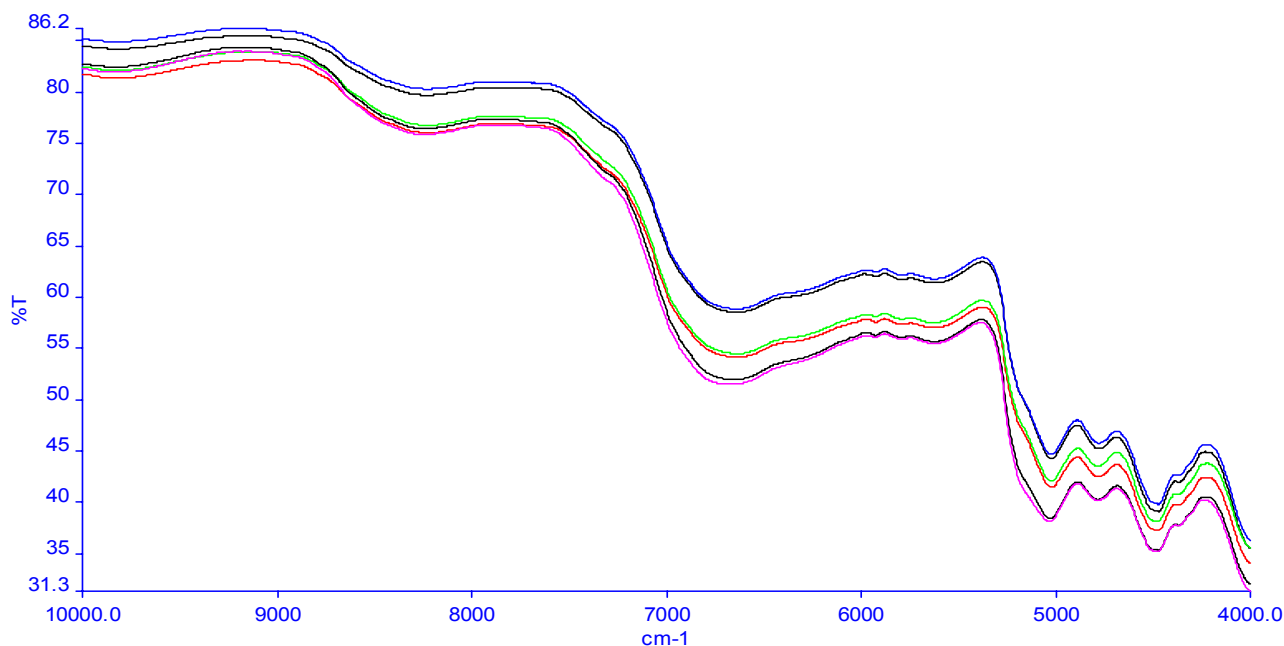
### 5.1 Identiteitscontrole

De NIR spectra van de 36 verschillende grondstoffen zijn op het oog allemaal verschillend. Figuur 4 laat een voorbeeld zien van die verschillen in de spectra van de aminozuren isoleucine-dl, glutamine-l en asparagine-l. De verschillen tussen verwante verbindingen zijn kleiner dan van verbindingen die qua moleculaire structuur duidelijk anders zijn.

De spectra van verschillende monsters van dezelfde verbinding zijn, afgezien van verschillen in de hoogte van de basislijn, vrijwel gelijk. Dit wordt geïllustreerd door de zes spectra van streptomycinesulfaat in Figuur 5. Het verschil in hoogte van de basislijn wordt vooral waargenomen in de spectra van poedervormige stoffen. De oorzaak hiervan is een verschil in korrelgrootte van het monster. Het meetprincipe van vaste stoffen is gebaseerd op reflectie en verstrooiing. Het gevolg daarvan is dat verschillen in korrelgrootte resulteren in verschillen in de hoeveelheid gereflecteerd en verstrooid licht en dus in een verschil in de spectrale basislijn. De invloed van dit effect is gereduceerd door het nemen van de tweede afgeleide van de spectra. Hetzelfde effect kan optreden wanneer de korrelgrootte in een monster varieert en de verdeling in het monstervaatje niet homogeen is.



Figuur 4. NIR-spectra van isoleucine-dl (zwart), glutamine-l (blauw) en asparagine-l (rood).



Figuur 5. NIR spectra van 6 verschillende monsters streptomycinesulfaat.

De resultaten van de berekening van de correlatiecoëfficiënt zijn vermeld in Tabel 4. Naast de gemiddelde correlatie  $C_m$ , de spreiding  $S$  en de 'distance'  $D$  is voor verbindingen waarvoor minstens drie validatiespectra beschikbaar waren tevens de standaarddeviatie van de correlatie  $S_d$  berekend.

Tabel 4. Resultaten van COMPARE voor verbindingen met minimaal zes monsters.  $N_t$ : totaal aantal monsters,  $N_b$ : aantal validatie monsters,  $C_m$ : gemiddelde correlatie,  $S$ : spreiding,  $S_d$ : standaarddeviatie en  $D$ : 'distance'.

Verbinding	$N_t$	$N_b$	$C_m$	$S$	$S_d$	$D$
adonitol	15	10	0,9999	0,0003	0,0001	0,24
asparagine-l	24	19	0,9978	0,0086	0,0020	0,32
glutamine-l	38	33	0,9990	0,0003	0,0001	0,53
glycerol	41	36	0,9996	0,0008	0,0003	0,39
isoleucine-dl	12	7	0,9998	0,0004	0,0002	0,24
natriumglutamaat	45	40	0,9993	0,0016	0,0005	0,43
saccharose	12	7	0,9999	0,0001	0,0000	0,37
streptomycinesulfaat	30	25	0,9994	0,0036	0,0008	0,32
trinatriumcitraat	12	7	0,9999	0,0002	0,0001	0,44
ureum	12	7	0,9999	0,0002	0,0001	0,39

Zoals blijkt is voor alle verbindingen de  $S_d$  kleiner dan 0.002. De distance  $D$  tot de hoogste correlatie met een andere verbinding is groter dan 0.24. Dit is meer dan 100 maal de standaarddeviatie hetgeen betekent dat de betrouwbaarheid van de voorspelling praktisch 100 % is. Uiteraard gelden deze resultaten alleen voor de gehanteerde, relatief beperkte, set van verbindingen en monsters.

Met name voor de verbindingen waarvan slechts enkele monsters beschikbaar waren voor validatie kan daardoor een te optimistisch beeld ontstaan. Gezien de waarden voor  $S_d$  en  $D$  is het is echter aannemelijk dat de genoemde betrouwbaarheid ook voor een bibliotheek met aanzienlijk meer verbindingen en monsters zal worden behaald.

Dit wordt bevestigd door de analyseresultaten van twee onbekende monsters (LOC99M2864 en LOC99M2865). Berekening van de correlatiecoëfficiënt op basis van de referentiebibliotheek geeft voor monster LOC99M2865 een correlatiecoëfficiënt van 0.9999 met saccharose terwijl de 'distance' tot de andere verbindingen minimaal 0.37 bedraagt. Hieruit kan worden geconcludeerd dat dit monster saccharose is.

Voor monster LOC99M2864 wordt geen hoge correlatie met een spectrum uit de bibliotheek gevonden. Hieruit wordt de conclusie getrokken dat dit monster niet in de bibliotheek vertegenwoordigd is. De meeste overeenkomst wordt gevonden met de stof isoleucine-dl (correlatie 0.9187). Op grond van de eerder berekende  $C_m$ - en  $S_d$  waarden voor deze verbinding van respectievelijk 0.9998 en 0.0002 (zie Tabel 4) moet echter worden geconcludeerd dat dit monster niet isoleucine-dl is. Gezien de hoge correlatie i.c. de lage  $D$  waarde betreft het waarschijnlijk wel een sterk verwante verbinding zoals bijvoorbeeld een (optische) isomeer van isoleucine. Door MIR analyse en door de leverancier van de monsters is dit bevestigd, het monster is l-isoleucine.

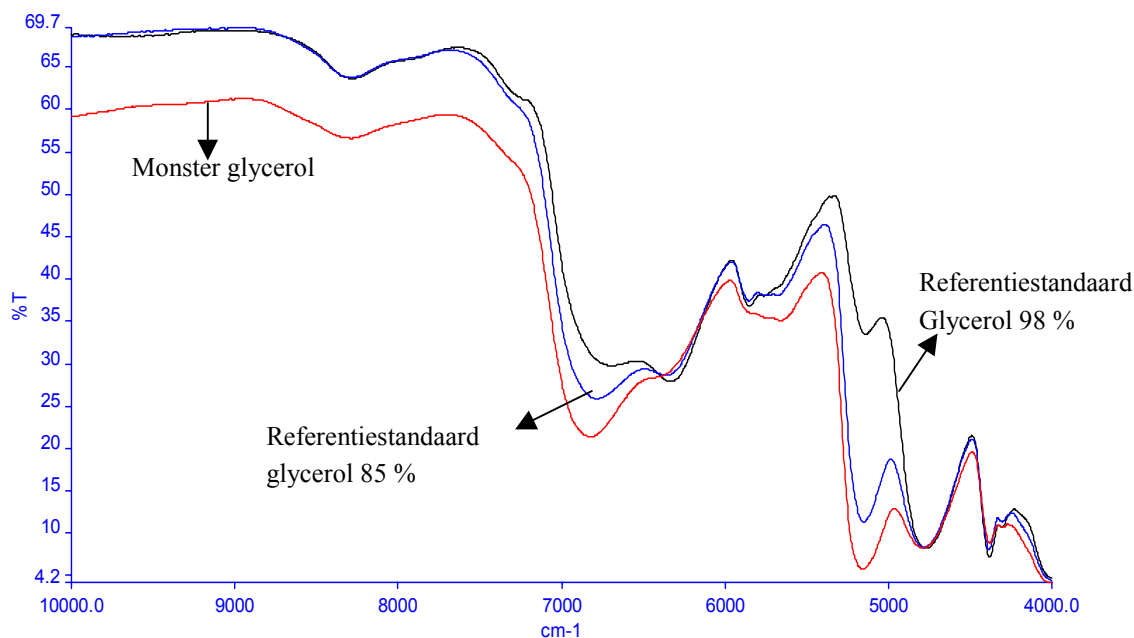
## 5.2 Kwaliteitscontrole

De duplo NIR spectra van de referentiestandaard glycerol 98 % (LGO-code 3925) blijken onderling vrijwel identiek en duidelijk verschillend van de referentiestandaarden glycerol 85 %. Het MIR spectrum van deze referentiestandaard bevestigt het verschil in het waterpercentage door de lagere intensiteit van de absorptiebanden die kunnen worden toegeschreven aan de aanwezigheid van water (OH-rekvibratie en OH-buigvibratie bij respectievelijk 3300 en 1640  $\text{cm}^{-1}$ ). De resultaten van het bewaren van één van de referentiestandaarden onder droge en vochtige condities komen eveneens tot uiting in de intensiteit van deze MIR banden. Dit is ook zichtbaar in de NIR spectra. De absorpties van water in de NIR spectra van de glyceroloplossingen liggen rond de 6800 en 5150  $\text{cm}^{-1}$ , boventonen van OH-normaal vibraties bij o.a. 3400  $\text{cm}^{-1}$ .

Absorpties van waterdamp uit de atmosfeer in het optische systeem van het NIR instrument blijken van invloed te kunnen zijn op de NIR spectra. Bij een hoog vochtgehalte in de atmosfeer kan dit in de spectra aanleiding geven tot een verhoogd ruisniveau in de gebieden 7400-6900  $\text{cm}^{-1}$  en 5500-5100  $\text{cm}^{-1}$ . Om deze effecten te beperken zijn deze absorptiegebieden in een deel van de experimenten buiten beschouwing gelaten.

De NIR spectra van de referentiestandaarden en de monsters verschillen op het oog niet al te veel. Ter illustratie daarvan zijn in Figuur 6 de spectra weergegeven van de referentiestandaarden glycerol 85 % en 98 % en van een monster glycerol.

De verschillen liggen vooral in de hoogte van de basislijn, met name in het gebied 12000-9000  $\text{cm}^{-1}$  en in de intensiteit van de piek bij circa 5200  $\text{cm}^{-1}$ . De oorzaak hiervan wordt respectievelijk toegeschreven aan de wat gelere kleur van de monsters en aan het waterpercentage. In de tweede afgeleide spectra is het verschil in basislijn afwezig, de verschillen in het gebied 7000-5000  $\text{cm}^{-1}$  zijn daarentegen veel duidelijker.



*Figuur 6. NIR spectra van referentiestandaarden glycerol 85 % (blauw) en glycerol 98 % (zwart) en een monster glycerol (rood).*

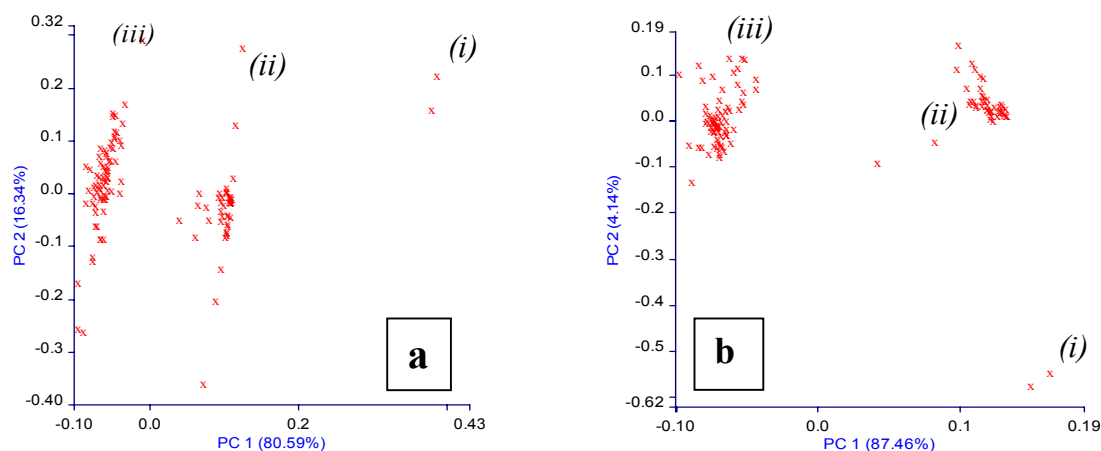
De correlatiecoëfficiënt van de referentiestandaarden (glycerol 85 %) varieert tussen 1.000 en 0.9951. Het gemiddelde is 0.9992 en de standaarddeviatie is 0.0008. De correlatiecoëfficiënt van de monsters glycerol ten opzichte van de referentiestandaard ligt tussen 0.9737 en 0.9453. Het gemiddelde is 0.9646 en de standaarddeviatie is 0.0043. Uitgaande van een betrouwbaarheidsinterval van drie maal de standaarddeviatie vanaf het gemiddelde betekent dit dat de betrouwbaarheid van de classificatie met deze methode groter is dan 99 %. Op basis van dit criterium zouden alle monsters glycerol t.o.v. de referentiestandaard glycerol 85 % zijn afgekeurd.

Principale componenten analyse van de volledige NIR spectra resulteert in drie verschillende clusters (i) de referentiestandaarden glycerol 98 % (2 spectra), (ii) de referentiestandaarden van glycerol 85 % (43 spectra) en (iii) de glycerol monsters (72 spectra). Deze clusters zijn weergegeven in Figuur 7a.

De invloed van variaties in basislijn en ruis bij gebruik van het totale spectrale gebied is echter niet verwaarloosbaar met name in het gebied 12000-10000  $\text{cm}^{-1}$ . In dit gebied treedt vrijwel geen absorptie op maar de basislijn fluctueert en de ruis is relatief groot. Deze variaties kunnen dusdanig groot zijn dat kleine maar relevante verschillen in andere gebieden hierin als het ware 'verdrinken'.

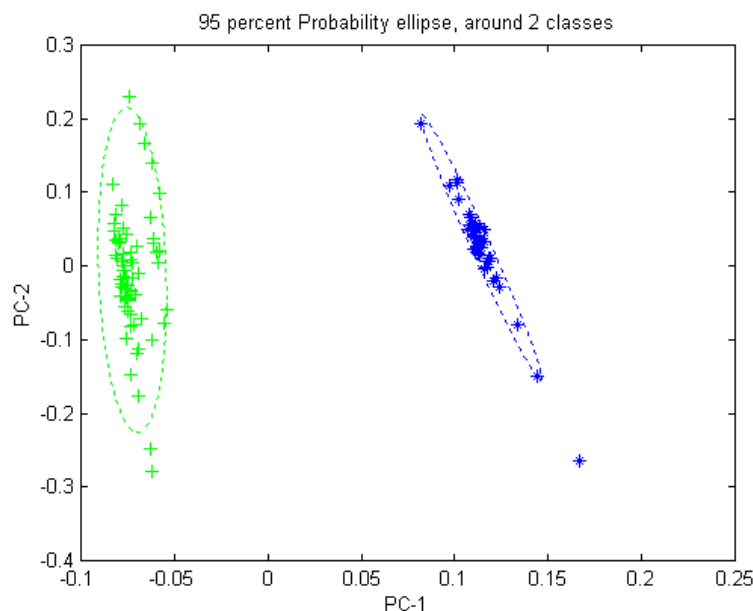
Om die reden is een tweede PCA gedaan waarbij het stuk 12000-10000  $\text{cm}^{-1}$  buiten beschouwing is gelaten en het verschil in basislijn is gereduceerd door de tweede afgeleide

van de spectra te nemen. Zoals blijkt uit Figuur 7b zijn de spectra behorende tot de groepen (i), (ii) en (iii) nu nog duidelijker herkenbaar als aparte clusters.



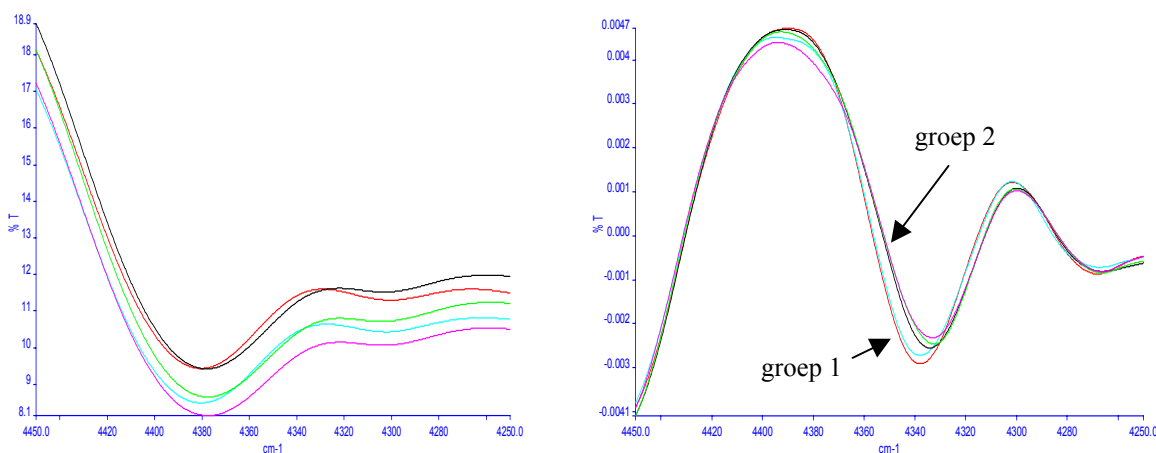
Figuur 7. PC1/PC2 plots van de onbewerkte NIR spectra (7a) en de tweede afgeleide spectra in het gebied  $10000-4000\text{ cm}^{-1}$  (7b). (i) glycerol 98 %, (ii) glycerol 85 % en (iii) glycerol monsters.

PCA van het spectrale gebied  $6500-5500\text{ cm}^{-1}$  geeft nog betere resultaten dan van het gebied  $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ . Voor de berekening is een nieuwe PCA uitgevoerd aan de tweede afgeleide spectra, waarbij de twee referentiestandaarden glycerol 98 % zijn weggelaten, vanwege het veel lagere waterpercentage t.o.v. de monsters. De resultaten na berekening van de 95 % betrouwbaarheidsellipsen van zijn weergegeven in de PC1/PC2 plot in Figuur 8.



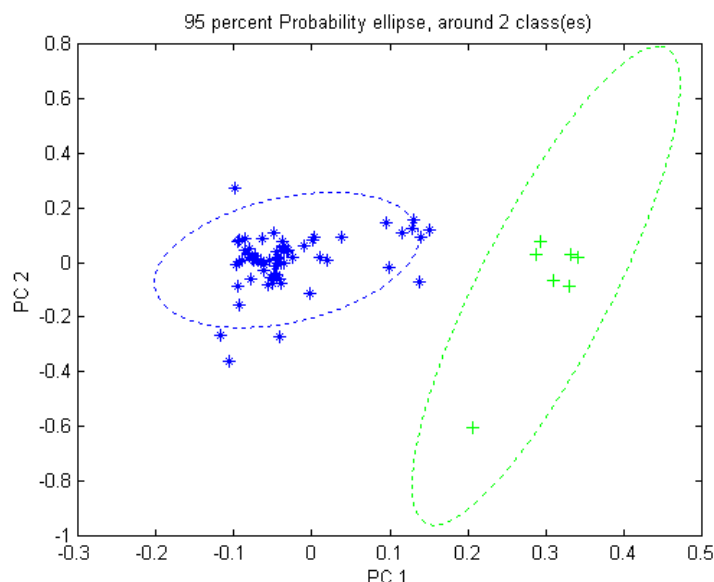
Figuur 8. PC1/PC2 plot van de tweede afgeleide spectra in het gebied  $6500-5500\text{ cm}^{-1}$  van de referentiestandaarden glycerol 85 % (paarse cluster) en de glycerol monsters (groene cluster). De ellipsen geven het 95 % betrouwbaarheidsgebied per cluster weer.

Nadere beschouwing van de tweede afgeleide spectra leert dat in twee golfgetalgebieden kleine, doch significante, verschillen te zien zijn tussen de twee groepen 1 en 2 van de glycerol monsters. Het betreft de gebieden  $6500\text{-}5500\text{ cm}^{-1}$  en  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$ . Ter illustratie zijn de oorspronkelijke en de tweede afgeleide spectra in het gebied  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$  van twee representanten van monster groep 1 en drie van groep 2, weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9. Onbewerkte (links) en tweede afgeleide (rechts) NIR spectra in het gebied  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$  van twee glycerol monsters van groep 1 en drie van groep 2.

PCA van de tweede afgeleide spectra van de tweeënzestig glycerolmonsters van het gebied  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$  resulteert in een indeling in twee clusters. Dit is weergegeven in Figuur 10. De 95 % betrouwbaarheids-intervallen geven een duidelijke onderscheid voor de monsters van groep 1 en groep 2.



Figuur 10. Resultaten van PCA clustering van de glycerolmonsters. PC1 plot voor het gebied  $4400\text{-}4300\text{ cm}^{-1}$ . De ellipsen beschrijven het 95 % betrouwbaarheidsgebied van de monsters van groep 1 (groene cluster) en groep 2 (paarse cluster).

De resultaten tonen aan dat NIR in combinatie met PCA analyse ook bruikbaar is om kleine verschillen in de chemische samenstelling van een grote groep monsters te traceren. Daarvoor

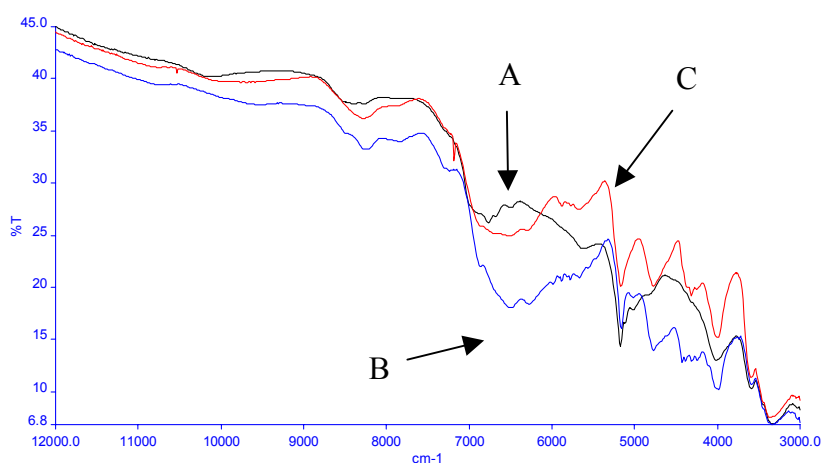


is echter wel meer ‘voorbewerking’ van de spectra vereist. Anderzijds kan, gezien de verschillen in gewichtspercentages glycerol van circa 5 % tussen de monsters van groep 1 en groep 2, worden geconcludeerd dat NIR niet erg gevoelig is voor kleine verschillen in de samenstelling van een vloeistof. Daarbij moet wel worden opgemerkt dat het grootste deel van de samenstellende componenten (glycerol, mono-, di- en tri-ethyleenglycol e.d.) grote overeenkomst vertoont in de moleculaire structuur. Bij sterk verschillende samenstellende componenten zal het discriminerende vermogen van NIR groter zijn.

### 5.3 Brontracering

De NIR spectra van zowel Metandienon als Tamoxifen tabletten afkomstig van eenzelfde batch blijken vrijwel gelijk. Ook de spectra van de intacte tabletten en van de tabletten in poedervorm van eenzelfde partij vertonen onderling hetzelfde absorptiepatroon. Wel is de signaal/ruis verhouding van de spectra van tabletten minder goed dan die van de poeders. De oorzaak hiervan is het geringe formaat van de tabletten. Hierdoor moet een tablethouder met een beperkte opening van 5 mm worden gebruikt en dit gaat gepaard met een afname van de lichtopbrengst van circa 50 %.

Op basis van visuele beoordeling van de NIR spectra van de Metandienon tabletten kan voor de achttien verschillende monsters globaal een indeling in 3 typen, A, B, en C worden gemaakt. Ter illustratie van de verschillen per type is van elk type een spectrum weergegeven in Figuur 11. De verschillen in de spectra impliceren dat de samenstelling van de tabletten anders is, in kwantitatieve dan wel in kwalitatieve zin.



*Figuur 11. NIR spectra van drie typen Metandienon-tablet, type A (zwarte lijn; LGO-code 4027), type B (blauwe lijn; LGO-code 3531) en type C (rode lijn; LGO-code 3536).*

Vergelijking van de NIR spectra met bibliotheekspectra van referentiestoffen duidt voor de spectra van de typen A en met name B op de aanwezigheid van lactose. In de NIR spectra van het type B is de overeenkomst met het spectrale patroon van lactose nog veel duidelijker.

Op basis van de intensiteit van de lactose banden lijken de tabletten van het type A en B een grote hoeveelheid van deze vulstof te bevatten. Dit wordt bevestigd door de MIR spectra. De chemisch vastgestelde aanwezigheid van cafeïne in de tabletten van het monster met orderno 3531 (uitvoering LGO) wordt bevestigd door de NIR en MIR spectra. Op basis van de intensiteit van de karakteristieke MIR absorptiebanden bij 1700 en 1660  $\text{cm}^{-1}$  kan worden geschat dat, naast lactose, ca. 10 tot 15 % cafeïne aanwezig is. De NIR spectra van de monsters van het type C vertonen allemaal kleine maar zeer karakteristieke absorptiebandjes bij 10537 en 7185  $\text{cm}^{-1}$ . De oorsprong van deze piekjes kon echter niet worden vastgesteld.

Uit de berekeningen van de correlatiecoëfficiënten blijkt dat de NIR-spectra van tabletten die tot dezelfde batch behoren een onderlinge correlatie hebben van groter dan 0.99. De spectra van de verschillende monsters kunnen op basis van deze correlatie eveneens worden geïdentificeerd in de drie typen A, B en C (zie Tabel 5).

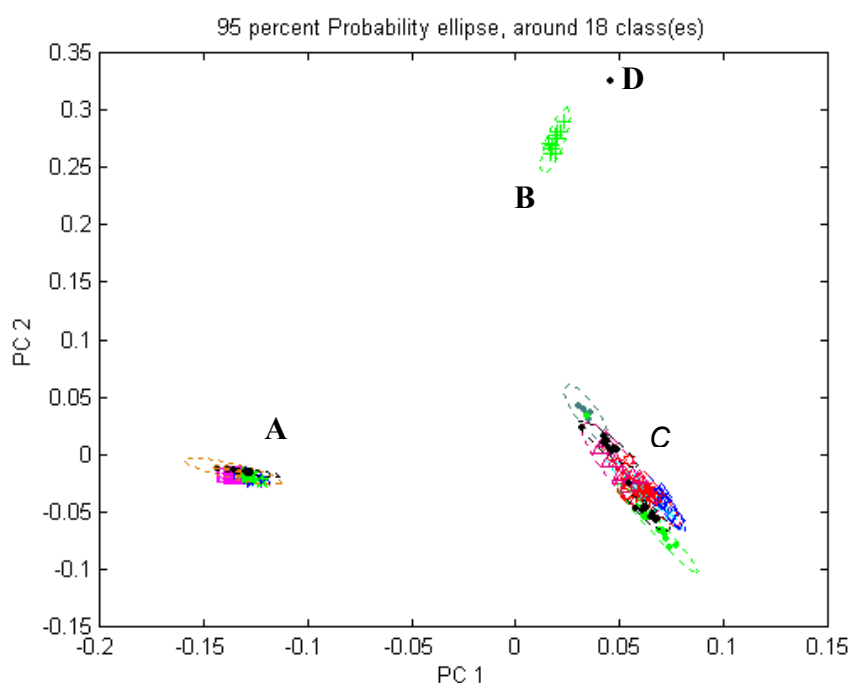
Tabel 5: Overzicht van monsters Metandienon.

LGO-code	aantal tabletten	analyse als poeder	NIR-specs	type
4027	10	+	NIR772 t/m NIR781	A
3531	10	+	NIR782 t/m NIR791	B
3536	10	+	NIR792 t/m NIR801	C
4603	10	+	NIR993 t/m NIR1002	C
4604	10	+	NIR1003 t/m NIR1012	A
4605	10	+	NIR1013 t/m NIR1022	C
4606	10	+	NIR1023 t/m NIR1032	A
4607	10		NIR1033 t/m NIR1042	C
4608	10		NIR1043 t/m NIR1052	C
4790	10		NIR1333 t/m NIR1342	C
4886	5		NIR1534 t/m NIR1538	A
4887	5		NIR1539 t/m NIR1543	C
4888	5		NIR1544 t/m NIR1548	A
4889	1		NIR1549	C
4890	1		NIR1550	C
4891	1		NIR1551	B (D)
4892	10		NIR1552 t/m NIR1561	C
4893	10		NIR1562 t/m NIR1571	C

De spectra van de monsters met orderno. 4027, 4604, 4606, 4886 en 4888 vertonen onderling een correlatie van  $>0.99$  en kunnen op basis daarvan worden geïdentificeerd als één groep (type A). De correlatie met de overige spectra is kleiner is dan 0.75 (distance  $>0.24$ ). De monsters met orderno. 3531 en 4891 (type B) hebben een onderlinge correlatie van 0.95. De correlatie met alle overige monsters is kleiner dan 0.86. De overeenkomst van het spectrum van monster met orderno. 4891, en in iets mindere mate van orderno.3531, met het spectrum van lactose blijkt ook uit de correlatiecoëfficiënten. De correlatie van monster 4891 (type B) met lactose is zelfs  $>0.99$ . De lagere correlatie van orderno. 3531 kan worden toegeschreven aan de eerder geconstateerde aanwezigheid van cafeïne in deze tabletten. De spectra van de monsters met orderno. 3536, 4603, 4605, 4607, 4608, 4790, 4887, 4889, 4890, 4892 en 4893 hebben een onderlinge correlatiecoëfficiënt van  $>0.99$ . Dit zijn dezelfde

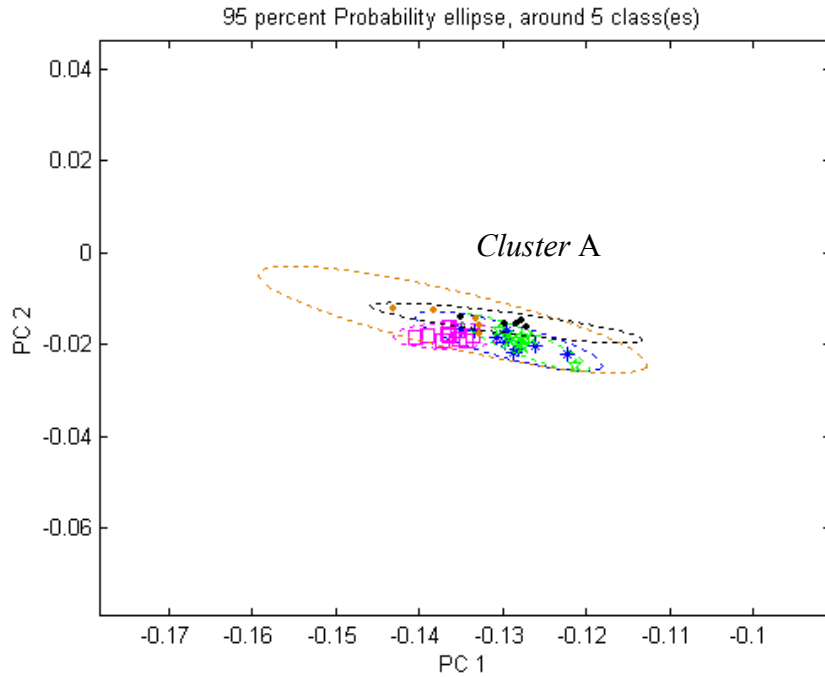
monsters als die eerder zijn geassocieerd als type C. De correlatie met de spectra van typen A en B bedraagt minder dan 0.84. De PCA plot van de tweede afgeleide spectra van alle (138) gemeten tabletten zijn weergegeven in Figuur 12. In de PC1/PC2 plot zijn drie duidelijke clusters van monsters te onderscheiden. Deze clusters stemmen overeen met de indeling in de typen A, B en C zoals die ook op basis van interpretatie en de correlatiecoëfficiënten is gemaakt. Het spectrum van het monster met ordeno. 4891 blijkt iets af te wijken van de spectra van de tabletten van ordeno. 3531. Dit is in overeenstemming met de resultaten van de correlatiecoëfficiënten.

Op basis van de PCA plot kan het monster met ordeno. 4891 als een apart type D worden geassocieerd. De betrouwbaarheid van deze classificatie blijkt uit de 95 % betrouwbaarheidsellipsen. Zoals blijkt uit Figuur 12 ligt monster 4891 (zwarte bullet D) ver af van het cluster B en kan daarom als een aparte klasse worden gekenmerkt.



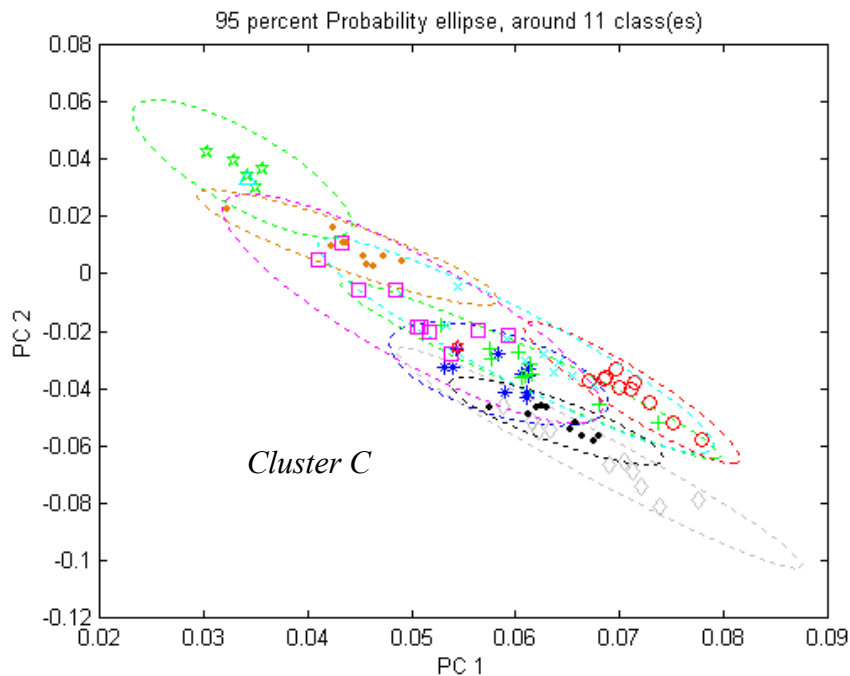
*Figuur 12. PC1/PC2 plot met 95 % betrouwbaarheidsellipsen van de NIR spectra van alle geanalyseerde tabletten (138 spectra van 18 monsters), 2e afgeleide spectra, gebied 10000 – 4000 cm<sup>-1</sup>.*

Voor de monsters die zijn ingedeeld bij het cluster A is geen nader onderscheid te maken. In Figuur 13 is dit cluster met de 95 % betrouwbaarheidsellipsen geëxpandeerd weergegeven. Zoals blijkt overlappen alle ellipsen elkaar in hoge mate.



Figuur 13. Geëxpandeerde deelplot van Figuur 12. Betreft 95 % betrouwbaarheidsellipsen van de NIR spectra van tabletten toegekend aan cluster A .

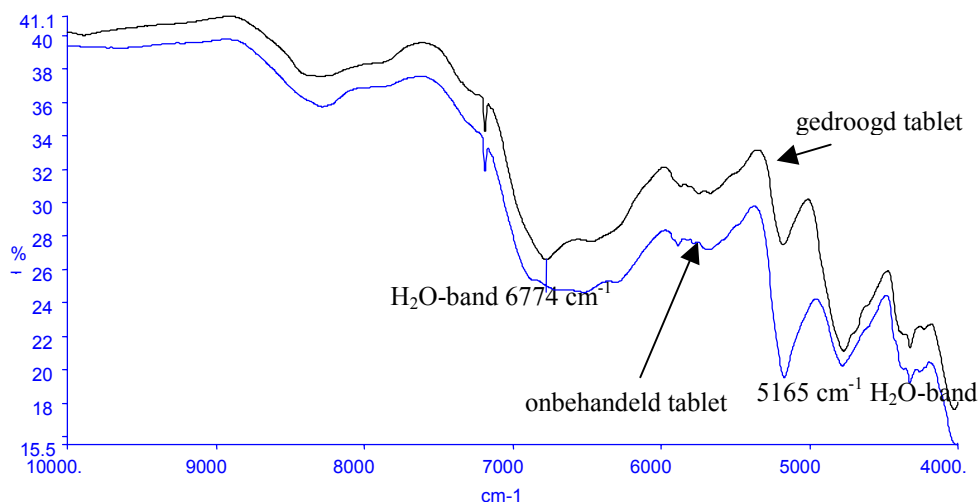
Een geëxpandeerde plot van de 95 % betrouwbaarheidsellipsen van het cluster C in Figuur 14 toont wel een gedeeltelijk onderscheid voor een aantal monsters.



Figuur 14. Geëxpandeerde deelplot van Figuur 12. Betreft 95 % betrouwbaarheidsellipsen van de NIR spectra van tabletten toegekend aan cluster C.

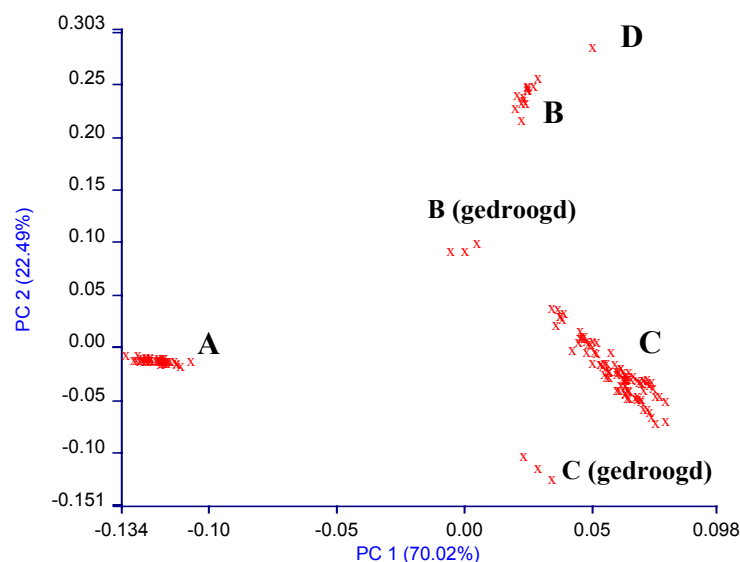
Het effect van het bewaren van de tabletten bij een hoge luchtvochtigheid is nauwelijks zichtbaar in de NIR spectra en komt ook niet tot uiting in de resultaten van de classificatie.

Het effect van sterke droging is wel zichtbaar. Zoals blijkt uit Figuur 15 is de intensiteit van de absorptiebanden van water bij  $6774$  en  $5165$   $\text{cm}^{-1}$  afgenomen in vergelijking met de spectra van de onbehandelde tabletten. De toename is verschillend voor de onderzochte monsters en hangt waarschijnlijk samen met andere eigenschappen van de tabletten zoals samenstelling, pakking, etc. De verschillen zijn duidelijk waarneembaar voor de monsters met orderno. 4607 en 3531 maar voor de tabletten van orderno. 4606 is er geen verschil.



Figuur 15. Effect van drogen boven silicagel bij  $100^\circ\text{C}$  van tabletten op de NIR spectra: afname van de intensiteit van de absorptiebanden van water rond  $6800$  en  $5150$   $\text{cm}^{-1}$ . Onbehandeld tablet (blauwe lijn) en gedroogd tablet (zwarte lijn).

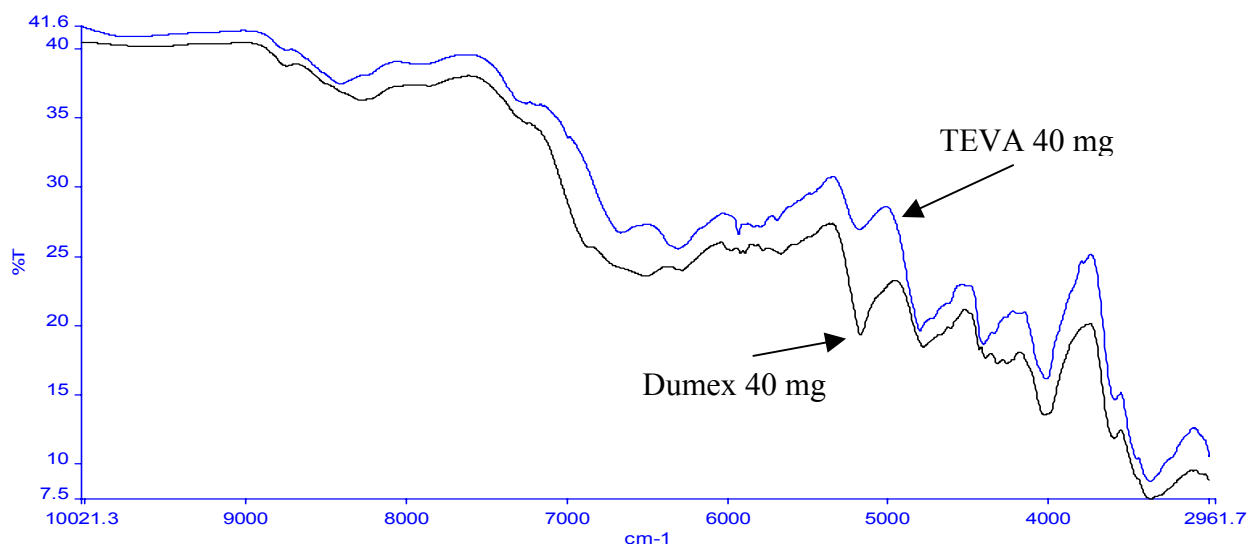
In Figuur 16 is de PCA plot weergegeven van spectra van onbehandelde tabletten, van spectra van tabletten na bewaren bij hoge luchtvochtigheid en van spectra na drogen.



Figuur 16. Resultaten van PCA clustering op de classificatie van droog en vochtig opgeslagen tabletten. Plot van PC1 tegen PC2 van de spectra van alle tabletten (2e afgeleide spectra, gebied  $10000 - 4000$   $\text{cm}^{-1}$ ).

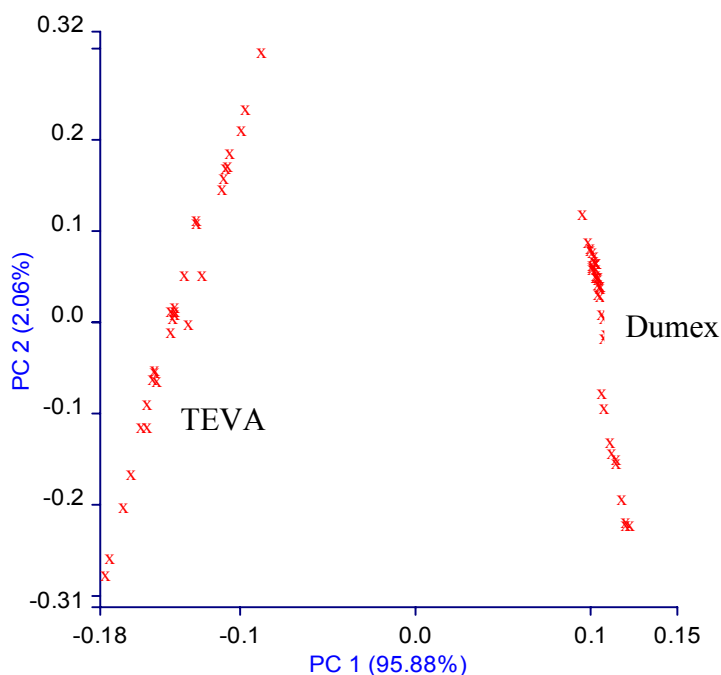
Voor de monsters van het type A (orderno. 4606) is geen effect op de classificatie zichtbaar terwijl voor de typen B (orderno. 3531) en C (orderno. 4607) de spectra na drogen buiten de clusters van de onbehandelde tabletten vallen. Hierbij moet echter worden opgemerkt dat deze effecten in de praktijk hoogst waarschijnlijk veel kleiner zullen zijn gezien de geforceerde wijze van droging.

De spectra van de intacte en verpoederde Tamoxifen tabletten van hetzelfde merk zijn, behoudens de absorpties van de glasvial, aan elkaar gelijk. Als gevolg van het grotere meetoppervlak van de glasvials is de signaal/ruisverhouding van de spectra van de poeders echter veel hoger dan die van de gehele tabletten. De spectra van de Dumex- en TEVA-tabletten zijn echter wel duidelijk verschillend. Een voorbeeld daarvan is gegeven in Figuur 17. Deze verschillen kunnen worden toegeschreven aan het gebruik van verschillende hulpstoffen door de twee fabrikanten. De verschillen komen eveneens tot uiting in de correlatiecoëfficiënten. Voor beide merken afzonderlijk is deze groter dan 0.995 met een standaarddeviatie van 0.003 ongeacht de hoeveelheid werkzame stof. De correlatiecoëfficiënt ten opzichte van het andere merk is kleiner dan 0.74.



Figuur 17. NIR-spectra van 40 mg tabletten van het merk Dumex (zwarte lijn) en TEVA (blauwe lijn).

De resultaten van PCA zijn weergegeven in Figuur 18. Zoals blijkt liggen de monsters van Dumex en TEVA in twee duidelijk verschillende clusters.

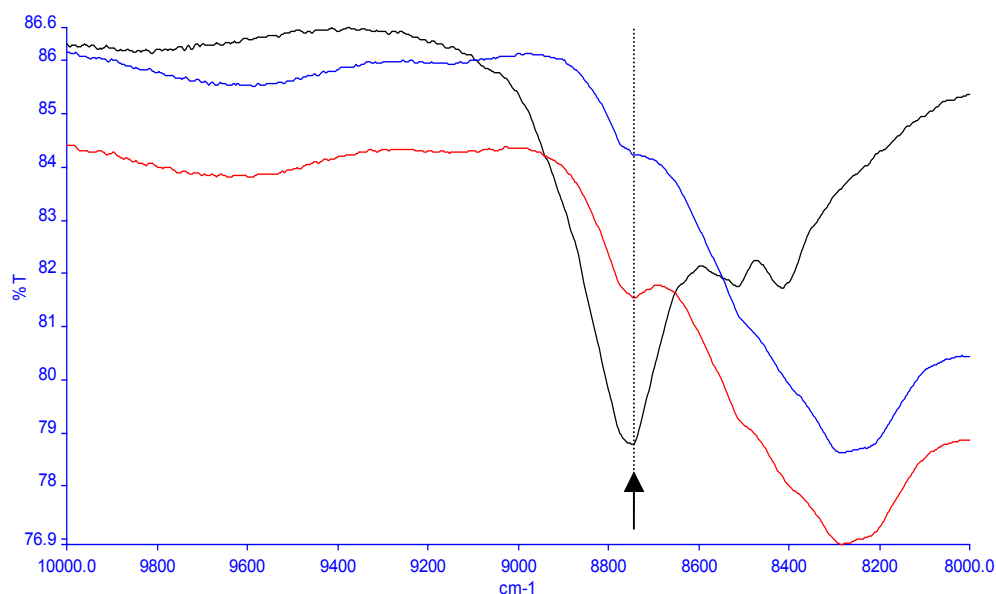


Figuur 18. Resultaten van PCA van de NIR spectra van alle Tamoxifen tabletten (PC1/PC2 plot).  
Golfgetalgebied 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$ , 2e afgeleide spectra.

## 5.4 Kwantitatieve analyse

Op basis van vergelijking van het spectrum van zuiver Tamoxifencitraat met de spectra van verpoederde tabletten is de absorptieband bij  $8757 \text{ cm}^{-1}$  geselecteerd als best bruikbaar voor kwantificering van de hoeveelheid Tamoxifencitraat. Deze absorptieband is weergegeven in Figuur 19.

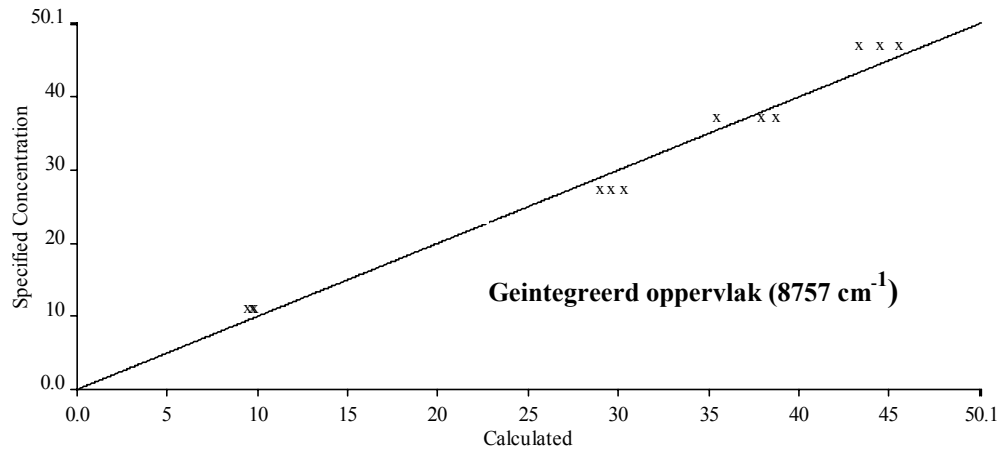
Zoals eerder opgemerkt verschilt de procentuele samenstelling van de tabletten nauwelijks vanwege de evenredige toename van het tabletgewicht met de doseringsgrootte. Het maken van een ijklijn, i.c. kwantificering op basis van intacte tabletten is daarom niet mogelijk.



Figuur 19. Absorptieband van Tamoxifencitraat bij  $8757 \text{ cm}^{-1}$  welke is gebruikt voor kwantificering.

De ijklijn aan de hand van verpoederde 40 mg tabletten met toevoeging van een bekende hoeveelheid Tamoxifencitraat is weergegeven in Figuur 20. Uit het verloop van de ijklijn en de berekende correlatie van 0.9879 kan worden geconcludeerd dat NIR bruikbaar is voor indicatieve kwantificering van het gehalte aan werkzame stof.

Als gevolg van het geringe aantal metingen is geen nauwkeurigheid van de bepaling vastgesteld. Qua gevoeligheid lijkt een minimum gehalte van enkele gewichtsprocenten vereist.



Figuur 20. Ijklijn van Tamoxifencitraat. Geïntegreerd oppervlak van de absorptieband bij 8757 cm<sup>-1</sup> uitgezet tegen de relatieve concentratie aan Tamoxifencitraat in gewichtsprocenten.



## 6. Conclusies

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat NIR-spectrometrie, in combinatie met het gebruik van de correlatiecoëfficiënt of van principale componenten analyse (PCA) een bruikbare techniek lijkt voor diverse farmaceutische toepassingen. De eenvoudige voorbereiding, het non-destructieve karakter en de snelle analyse (<1 min. per monster) maken de methode met name aantrekkelijk voor grote series.

NIR is vooral geschikt voor de identiteitscontrole van grondstoffen en is mogelijk ook bruikbaar voor de identificatie van onbekenden. Bij gebruik van de correlatiecoëfficiënt in combinatie met de 'distance' is de betrouwbaarheid van de controle op basis van de gehanteerde set van spectra praktisch 100 %. Daarbij moet echter worden opgemerkt dat deze conclusie is gebaseerd op statistische waarnemingen. De betrouwbaarheid is afhankelijk van de samenstelling van de referentiebibliotheek zowel wat betreft het aantal verbindingen als het aantal onafhankelijke monsters per verbinding. Vanuit dat oogpunt bezien is de gehanteerde set van data relatief klein. Uitbreiding van deze set met meer verbindingen en meer spectra is dan ook aan te raden om de betrouwbaarheid en robuustheid van de methode verder te testen en te vergroten.

Uit de resultaten van het onderzoek aan glycerol monsters kan worden geconcludeerd dat NIR spectrometrie tevens een bruikbare techniek is om snel en eenvoudig afwijkingen in de kwaliteit van stoffen te detecteren. Met behulp van NIR zouden alle glycerol monsters die in Rotterdam in beslag zijn genomen als afwijkend van de referentiestandaard glycerol 85 % zijn geclassificeerd.

Op basis van de analyseresultaten van de Metandienon en Tamoxifen tabletten kan worden geconcludeerd dat NIR in combinatie met PCA mogelijkheden schept voor het traceren van de herkomst van dergelijke producten. De resultaten van classificatie kunnen enigszins worden beïnvloed door de luchtvochtigheid waarbij een tablet is opgeslagen. De mate waarin hangt echter af van de eigenschappen van het monster. Bij Metandienon tabletten treedt dit effect bijvoorbeeld alleen op bij sterk gedroogde monsters.

Tenslotte kan, uit de analyseresultaten van verpoederde Tamoxifen tabletten waaraan bekende hoeveelheden Tamoxifencitraat werd toegevoegd, worden geconcludeerd dat NIR eveneens bruikbaar is voor kwantificeringsdoeleinden. De gevoeligheid van NIR voor kleine verschillen in de kwantitatieve samenstelling is echter beperkt. Nader onderzoek is nodig om de mogelijkheden en beperkingen van deze toepassing in kaart te brengen.

## **Dankwoord**

De auteurs bedanken hierbij Marjon van Vliet en Chris Slijkhuis van het Laboratorium voor Geneesmiddelen Onderzoek (LGO) voor het uitvoeren van de chemische analyses, de levering van de monsters en voor hun waardevolle bijdragen en suggesties bij dit onderzoek.

## Literatuur

1. R.A. Lodder, G.M. Hieftje, Analysis of intact tablets by near-infrared reflectance spectrometry; *Appl. Spectrosc.* 42 (1988), 556-558.
2. F. McClure, Near-infrared spectroscopy; the giant is running strong; *Anal. Chem.* 66 (1994) 43A-53A.
3. G. Radtke, K. Knop, B.C. Lippold, Nahinfrarot (NIR)-Spektroskopie: Grundlagen und Anwendung aus pharmazeutischer Sicht; *Pharm. Ind.* 61 (1999) 848-857.
4. T.G. Axon, R. Brown, S.V. Hammond, S.J. Maris, Focusing near infrared spectroscopy on the business objectives of modern pharmaceutical production; *J. Near Infrared Spectrosc.* 6 (1998) A13-A19.
5. M.A. Dempster, B.F. MacDonald, P.J. Gemperline, N.R. Boyer, A near infrared reflectance analysis method for the noninvasive identification of film-coated and non-film coated, blister packed tablets; *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 43-51.
6. W. Plugge, C. van der Vlies, Near-infrared spectroscopy as a tool to improve quality; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1996) 435-453.
7. H. Wilson, T. Byron, J. Sellors, NIR spectroscopy for quality control in the pharmaceutical industry; *Int. Laboratory*, jan. 1998, 7A-7D.
8. M. Forina, G. Drava, R. Boggia, S. Lanteri, P. Conti, Validation procedures in near-infrared spectrometry; *Anal. Chim. Acta*, 295 (1994) 109-118.
9. P.R. Khan, R.D. Jee, R.A. Watt, A.C. Moffat, The identification of active drugs in tablets using near infrared spectroscopy; *Pharmaceutical Sciences* 3 (1997), 447-453.
10. H. Grunewald, C. Kurowski, D. Timm, U. Grummisch, U. Meyhack, Rapid non-destructive raw material identification in the cosmetic industry with near infrared spectroscopy; *J. Near Infrared Spectrosc.* 6 (1998) A215-A222.
11. I. Jedvert, M. Josefson, F. Langkilde, Quantification of an active substance in a tablet by NIR and Raman spectroscopy; *J. Near Infrared Spectrosc.* 6 (1998) 279-289.
11. T. Visser, M.J. Vredendregt, J.A. Marsman, A.K.D. Liem, Fast determination of the fat contents of milk and food products by near infrared spectroscopy; *Organohalogen Compounds*, 1998; 35: 205-208.
13. P.R. Khan, R.D. Jee, R.A. Watt, A.C. Moffat; *Pharmac. Sciences* 3 (1997) 447-453.
14. W. L. Yoon, R.D. Jee, A.C. Moffat, P.D. Blackler, K. Yeung, D.C. Lee, Construction and transferability of spectral library for the identification of common solvents by near infrared transreflectance spectroscopy; *Analyst* 124 (1999) 1197-1203.
15. Y.A. Woo, H.J. Kim, H. Chung, Classification of cultivation area of ginseng radix with NIR and Raman spectroscopy; *Analyst* 124 (1999) 1223-1226.
16. E. Bertran, M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, I. Montoliu, Near Infrared Spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin oils of very close geographical origin; *J. Near Infrared Spectrosc.* 8, 45-52 (2000).
17. A.D. Trafford, R.D. Jee, A.C. Moffat, P. Graham, A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy; *Analyst* 124, 163-167 (1999).
18. C. I. Gerhausser, K. A. Kovar, Strategies for constructing near-infrared spectral libraries for the identification of drug substances; *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 1504-1510.
19. J. Edward Jackson *A User's Guide To Principal Components*; 1991, John Wiley & Sons, Inc, p342 – 344.



## Bijlage 1 De Glycerine Affaire

### Inleiding

In de periode september 1996 t/m maart 1997 is het Laboratorium voor Geneesmiddelenonderzoek (LGO) betrokken geweest bij de analyse van een partij glycerine die was aangetroffen in de haven van Rotterdam en zou worden verscheept naar Haïti. Het betrof een onderzoek dat in opdracht van de Inspectie Gezondheidszorg (IGZ) werd uitgevoerd n.a.v. de alarmerende berichten van de Food and Drug Administration (FDA), USA, dat het om vergiftigde glycerine zou gaan. De partij glycerine (72 vaten van elk 250 kg) was afkomstig uit China en zou diethyleenglycol bevatten. In Haïti had een eerder verscheepte partij het leven gekost aan 87 kinderen. Vrij snel kon een verband worden gelegd tussen de irreversibele nierbeschadiging die deze kinderen na het drinken van een paracetamol drank hadden gekregen en de glycerine die in deze drank was verwerkt. De tweede partij kon tijdig door de Inspectie worden onderschept en heeft Haïti nooit bereikt. De betreffende partijen glycerine waren afkomstig uit China en via een Nederlandse en Duitse handelaar verkocht aan een farmaceutische firma in Haïti die deze partij zonder enige vorm van kwaliteitscontrole in een paracetamol drank voor kinderen had verwerkt. Glycerine is een viskeuze vloeistof met een zoete smaak (ca. 60% van de zoetheid van rietsuiker) en kent naast het gebruik als oplosmiddel in farmaceutische producten (o.a. in zachte gelatine capsules, oordruppels, zepillen, dranken) tal van toepassingen in voedingsmiddelen (o.a. in ijs, jam, likeur), cosmetica (o.a. in tandpasta, crèmes, lotions) en tabak (ter bevochtiging). Glycerine wordt veelal door afsplitsing (verzeping) uit plantaardige en dierlijke vetten gemaakt. In het recente verleden zijn polyolen als ethyleen- en diethyleenglycol vaker gebruikt voor het illegaal bijzoeten van witte wijn.

### Onderzoek

Het onderzoek, dat werd uitgevoerd in samenwerking met het Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in Berlijn en het Bundesministerium für Gesundheit in Bonn, en richtte zich op het beantwoorden van de volgende vragen:

1. wat is de samenstelling van de partij glycerine, en is de partij homogeen?
2. kan de slechte kwaliteit aan een productiefout worden toegeschreven, of is er sprake van fraude?
3. wanneer de partij volgens de eisen van de Europese Farmacopee zou zijn onderzocht was de slechte kwaliteit van deze partij dan aan het licht gekomen?

### Farmacopee eisen

Omdat de vaten waarin de glycerine werd vervoerd de aanduiding: 'Glycerine USP' (eerste partij) en 'Glycerine-1.26-UP' (tweede partij) waren voorzien is een vergelijking gemaakt met de eisen die de United States Pharmacopoeia (USP) en de European Pharmacopoeia (EP) aan de kwaliteit van deze farmaceutische grondstof stellen. Op basis van een aerometrische dichtheidsbepaling, die ergens in het traject China -> Nederland -> Duitsland moet zijn uitgevoerd is de conclusie getrokken dat de vaten glycerine met een gehalte van 98% zouden bevatten (zie foto). Waarschijnlijk is hierbij gebruik gemaakt van zgn. glycerine/water tabellen waarbij aan de hand van de waarde voor de brekingsindex of relatieve dichtheid het gehalte aan glycerine kan worden afgelezen. Het gebruik van deze tabellen is natuurlijk alleen geoorloofd wanneer zeker is dat het mengsel uitsluitend uit zuivere glycerine en water bestaat.

De eisen die de USP en de EP aan de zuiverheid van glycerine voor medicinaal gebruik stellen zijn nagenoeg gelijk, **behalve** t.a.v. van de volgende parameters:

Farmacopee, versie	USP XXIII, 1995	EP, 3 <sup>e</sup> editie, 1997
Titel monografie	Glycerin	Glycerol
<b>Identiteit</b>	IR: conform referentie	A) brekingsindex: 1,470–1,4750 nD B) IR: conform referentie C) kleurreactie (CrIII) D) acroleine vorming + Nessler reactie Identificatie: A + B, of A + C + D
<b>Zuiverheid</b>	Dichtheid: => 1,249 g/cm <sup>3</sup> Water: geen eis	geen eis =< 2,0%
<b>Gehalte</b>	95,0-101,0%	98,0-101,0%

Opvallend is dat de USP voor de identificatie genoegen neemt met alleen een Infrarood (IR)-spectrum en dat de EP dat uitsluitend toestaat in combinatie met het bepalen van de brekingsindex. Verder valt op dat de USP de relatieve dichtheid laat bepalen, terwijl de EP daar geheel van afziet. Voor de bepaling van het gehalte wordt zowel in de USP als in de EP gebruik gemaakt van een niet-selectieve bepaling (een titratie berustend op de Malaprade reactie). Een voor een farmacopee niet ongebruikelijke gang van zaken die acceptabel is wanneer de monografie van adequate en specifieke zuiverheidstesten is voorzien.

#### Resultaten analytisch onderzoek

M.b.v. een aantal conventionele, natchemische analysetechnieken (DLC, GC, IR, optische rotatie en titraties) werd de globale samenstelling van de 72 monsters vastgesteld (het globale gehalte van de verschillende componenten is op hele tientallen afgerond en weergegeven in % m/m):

	<u>Globaal</u> (n=72)	<u>Serie 1</u> (n=65)	<u>Serie 2</u> (n=7)
- glycerol	10	7,7	7,7
- sacharose	30	29,5	26,4
- sorbitol	20	20,0	20,0
- diethyleenglycol	20	19,0	13,9
- water	20	22,4	24,3

relatieve dichtheid 1,2660 g/cm<sup>3</sup>, bij 23 °C.  
brekingsindex 1,4584 nD, bij 25 °C.

De relatieve dichtheid bleek een niet-discriminerende parameter te zijn (zie figuur 1a); de referentie substantie (glycerine 98%) en alle 72 monsters bleken te voldoen aan de eis die de USP stelt (=> 1,249 g/cm<sup>3</sup>). De brekingsindex bleek daarentegen wel discriminerend te zijn. De referentie substantie (glycerine 98%) ligt fraai tussen de limieten die de EP stelt (1,470-1,4750 nD), terwijl alle 72 monsters daar overduidelijk niet aan voldeden (zie figuur 1b). Tevens bleek dat 7 van de 72 monsters, zowel tav. de brekingsindex als tav. de relatieve dichtheid buiten het 2S(standaarddeviatie)-interval rond het gemiddelde (n=72) vielen. De samenstelling van deze 7 monsters (serie 2) bleek op een aantal punten af te wijken van die van de overige 65 monsters (serie 1), zie ook het bovenstaand overzicht.

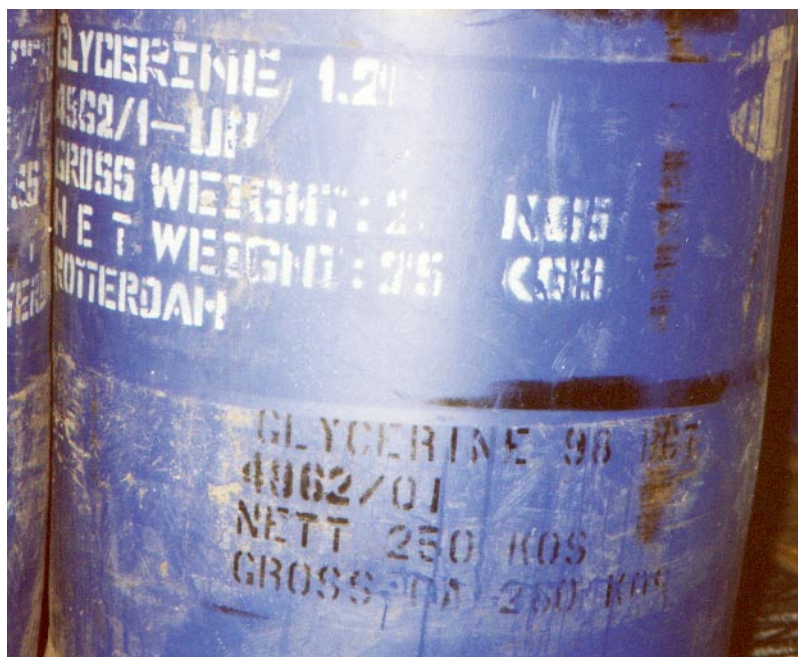
### Conclusie

Uit de resultaten van het onderzoek werd geconcludeerd dat een productiefout niet erg waarschijnlijk was, aangezien in het mengsel componenten zijn aangetroffen die niet bij de normale productie van glycerine zijn betrokken of kunnen ontstaan (bijv. diethyleenglycol). Hoewel een technisch gebruik van deze partij glycerine niet kan worden uitgesloten (het zou een basismengsel voor de verfindustrie kunnen zijn) is het wel opmerkelijk dat, behalve het diethyleenglycol, alle overige componenten gebruikelijke bestanddelen zijn van een oraal aan mensen toe te dienen oplossing. De aanduiding 'technische glycerine' is echter misleidend omdat ook aan deze kwaliteit strenge kwaliteitseisen t.a.v. gehalte en zuiverheid worden gesteld (zie eisen Britsch Standard BS 5711 = ISO 1614 en aanhangende documenten waarin eisen worden gehanteerd die niet minder streng zijn dan die aan glycerine voor medicinaal gebruik worden gesteld). Het lijkt er dus op dat het bij deze partij glycerine om een mengsel gaat dat bewust is samengesteld, zodanig dat de dichtheid op een bepaalde waarde is gebracht, die toevalligerwijze(?) overeenkomt met de eis ( $> 1,26$ ) van de USP.

De monografie van de EP bleek geschikt om de inferieure kwaliteit van deze glycerine te ontmaskeren. Wanneer de partij conform deze monografie zou zijn getest dan was deze partij nooit vrijgegeven voor het gebruik in geneesmiddelen. Ten einde de monografie ook voor de toekomst te wapenen voor onzuivere glycerine partijen met mogelijk een lager, doch eveneens giftige concentratie aan diethyleenglycol is de monografie uitgebreid met een specifieke limiet test op deze verbinding.

### Literatuur

1. De Volkskrant, 30/8/96: 'In Haïti stierven 87 kinderen aan koortsmiddel'.
2. NRC-Handelsblad, 8/2/97: 'Onderzoek FDA na dood kinderen: Bedrijf betrokken bij giftig medicijn'.
3. European Pharmacopoeia, 3<sup>d</sup> ed., Glycerol (1997, 0496).
4. United States Pharmacopoeia, ed. XXIII, 1995, Glycerin, page 713-714.
5. Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, NT 1998, 11 Lfg 1999, G23, G24.
6. Diethyleenglycol, H. van Milligen, Chemische Feitelikheden 179, november 2000.



Bijschrift foto:

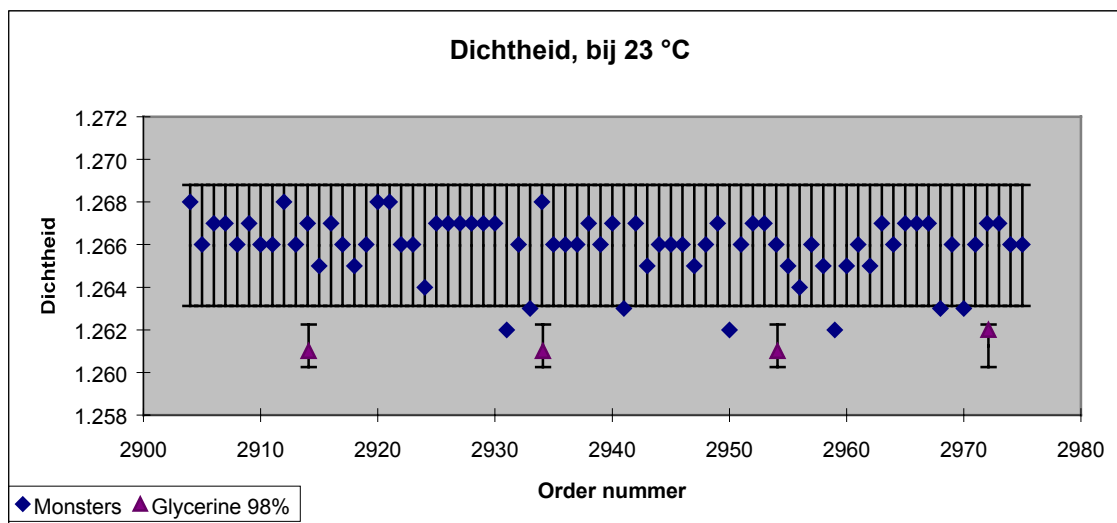
Foto van een van de vaten die in de haven van Rotterdam werden aangetroffen en t.b.v. dit onderzoek zijn bemonsterd.

In witte letters: 'Glycerine 1.26  
4962/1-UP  
Gross weight: 250 kgs  
Net weight: 250 kgs  
Rotterdam'

In zwarte letters: 'Glycerine 98 pct  
4962/1  
Nett 250 kos  
Gross ca 260 kos'

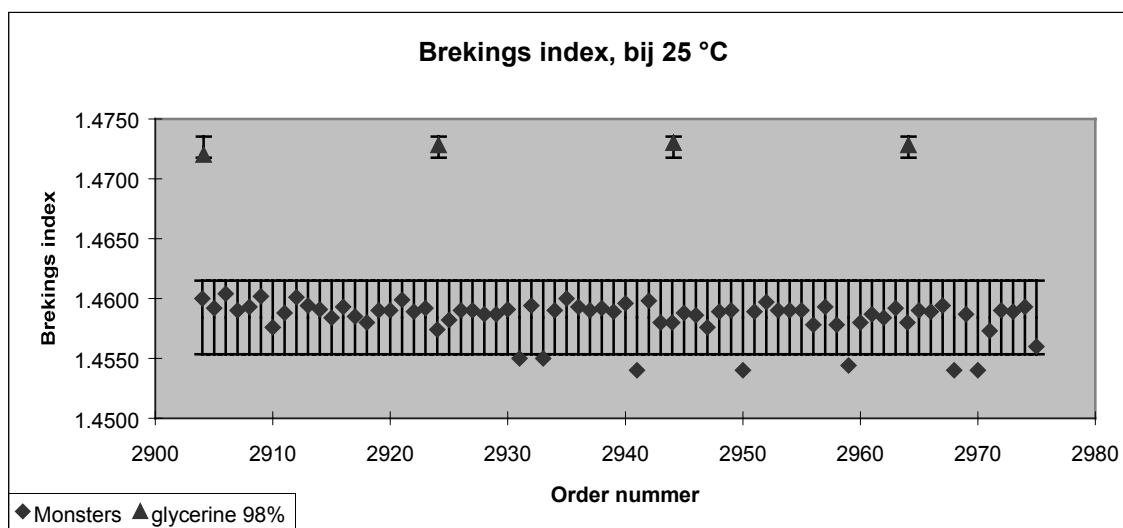


Figuur 1a.

Bijschrift figuur 1a:

Individuele uitslagen voor de **relatieve dichtheid** met het 2S(standaarddeviatie)-interval rond de gemiddelde waarde (n=72). De waarde voor de referentiestandaard (glycerine 98%) is viermaal bepaald en eveneens met het 2S-interval aangegeven.

Figuur 1b.

Bijschrift figuur 1b:

Individuele uitslagen voor de **brekingsindex** met het 2S(standaarddeviatie)-interval rond de gemiddelde waarde (n=72). De waarde voor de referentiestandaard (glycerine 98%) is viermaal bepaald en eveneens met het 2S-interval aangegeven.

## Bijlage 2 Overzicht Metandienon tabletten

Order nr	NIR cluster	Aantal	Charge nr	Mfg. date	Tablet gewicht (mg)	Afmetingen (mm)	Resultaten (metandienon /tablet)	Code
3531	B	100	20865	12/99	122.58 (n=20)	d: 3.1 Ø: 6.2 (n=5)	15 mg Caffeine	
3536	C	1000	50595	4/95	121.61 (n=20)	d: 3.5 Ø: 6.2 (n=5)	5 mg	
4027	A	1000	87221	09/97	116.07 (n=20)	d: 2.4 Ø: 6.1 (n=5)	2 mg	
4603	C	1000	50056	1/95	123.76 (n=20)	d: 3.4 Ø: 6.1 (n=5)	5.1 mg	
4604	A	1000	97537	02/99	116.06 (n=20)	d: 2.2 Ø: 6.2 (n=5)	1 mg	
4605	C	1000	41651	10/94	121.90 (n=20)	d: 3.2 Ø: 6.1 (n=5)	5.1 mg	
4606	A	1000	87580	09/97	118.45 (n=20)	d: 2.5 Ø: 6.1 (n=5)	3.0 mg	
4607	C	1000	810004	1/98	119.65 (n=20)	d: 3.3 Ø: 6.2 (n=5)	4.7 mg	
4608	C	150	-	-	120.15 (n=20)	d: 3.2 Ø: 6.2 (n=5)	4.7 mg	
4790	C	1000	810348	121098	118.57 (n=20)	d: 3.2 Ø: 6.1 (n=5)	4.7 mg	
4886	A	5	-	-	-	-	0.6 – 3.34 mg	789/98
4887	C	5	-	-	-	-	5.2 mg	1790/98
4888	A	5	-	-	-	-	0.66 – 1.55 mg	17453/98
4889	C	1(2*25) <sup>1</sup>	-	-	118.6 (n=10)	d: 3.3 Ø: 6.1 (n=10)	4.92 mg	98/481.1
4890	C	1(5) <sup>1</sup>	-	-	-	d: 3.5 Ø: 6.1 (n=1)	5.0 mg	97/530.1
4891	D	1 (946) <sup>1</sup>	-	-	111.88 (n=10)	d: 2.7 Ø: 6.1 (n=10)	0.035 mg	97/565.1
4892	C	15	60401	3-96	116.36 (n=20)	d: 3.3 Ø: 6.2 (n=5)	4.8 mg	
4893	C	1000	910215	-	118.91 (n=20)	d: 3.3 Ø: 6.2 (n=5)	4.7 mg	

<sup>1</sup> aantal onderzochte tabletten, tussen haakjes de originele verpakkingsgrootte

- niet bepaald / niet bekend

## **Bijlage 3      Verzendlijst**

1. Directeur-generaal RIVM
2. Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
3. Dr. Ir. G. de Mik
4. Dr. P. van Zoonen
5. Dr. Ir. H. J. G. M. Derks
6. Dr. Ir. A. P. J. M. de Jong
7. Dr. R. Hoogerbrugge
8. Dr. R. W. Stephany
9. Dr. D. M. Barends
10. Drs. P. W. J. Caspers
11. Drs. D. A. van Riet-Nales
12. G. M. Overvliet
13. Dr. G. Zomer
14. Dr. A. K. D. Liem
15. Dr. R. A. Baumann
16. Dr. E. A. Hogendoorn
17. Drs. P. M. J. M. Jongen
18. Ir. J. J. G. Kliet
19. Dr. L. A. van Ginkel
20. Dr. Ir. E. H. J. M. Jansen
21. W. F. de Vries
22. P. Berendse
23. M. van Vliet
24. C. Slijkhuis
25. t/m 28. Auteur(s)
29. SBD/Voorlichting & Public Relations
30. Bibliotheek RIVM
31. Bureau Rapportenregistratie
32. t/m 41. Bureau Rapportenbeheer
42. t/m 78. Reserve exemplaren