



Opgemerkt

HPLC : van C18 naar C8, wordt dat sleutelen?

W. Huisman, J.M. Sterrenburg
Laboratorium Apotheek, Ziekenhuis de Heel
Kon. Julianaplein 58, 1502 DV Zaandam.

Naar aanleiding van het in Extract gepubliceerde artikel over de bepaling van tricyclische antidepressiva in KKGt testsera [1], besloten wij om deze kolom eens uit te proberen. Uit praktische overwegingen was het voor ons van belang dat de huidige routinematige HPLC-bepalingen, zonder al te veel wijzigingen aan het HPLC-systeem, ook op de in dit artikel genoemde C8-kolom [2] uitgevoerd konden worden. In de routine bepalen wij met behulp van 2 HPLC-systemen de volgende stoffen:

1) Anti-epileptica.

- Primidon
- Fenobarbital
- Fenytoïne
- Carbamazepine + metaboliet

Interne-standaard: cyclobarbitaal

Eluens : 1,80 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [3] in 500 ml gedestilleerd water op pH 6,50 brengen met fosforzuur 10%. Voeg toe 500 ml methanol [3]. Filtreer over 0,45 μ filter [3] onder vacuüm.
Flow : 0,50 ml/min

2) Coffeïne.

Interne-standaard: 8-chloor-theofylline

Eluens : 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [3] in 800 ml gedestilleerd water. Voeg toe 70 ml methanol [2] + 20 ml tetrahydrofuraan [3]. Breng dit geheel op pH 5,0 met NaOH 4n. Vul aan tot 1000 ml met gedestilleerd water. Filtreer over 0,45 μ filter [3] onder vacuüm.
Flow : 0,75 ml/min

Onze vorige kolom betrof 2 gekoppelde C18 kolommen van elk 10 cm lengte + voorkolom in een cartridge-systeem [4]. Voor de goede orde: deze kolom voldeed voor dit doel overigens uitstekend.

Na installatie van de nieuwe kolom werden de diverse standaard-mengsels geïnjecteerd in de ongewijzigde eluentia + flowsnelheid. Hieronder volgen de retentietijden in de 2 loopvloeistoffen.

1) Anti-epileptica (0,50 ml/min)

STOF	RTC18	RTC8	RTC8(0,75ml/min)
primidon	3,5	6,5	4,3
fenobarb.	4,0	7,1	4,8
CBZ-epox.	4,6	8,0	5,3
cyclobarb.	5,8	10,1	6,7
fenytoïne	7,8	14,0	9,3
carbamazep.	9,4	15,1	10,0

2) Coffeïne (0,75 ml/min)

STOF	RTC18	RTC8	RTC8(1,00ml/min)
theofylline	3,3	6,3	4,8
coffeïne	4,5	8,3	6,3
8-Cl-theof.	6,8	12,6	9,7

Hieruit blijkt dus dat de a-polariteit van deze C8 kolom, ondanks de kortere lengte en de kortere koolstof-ketens, hoger ligt dan de C18.

Uit de resultaten blijkt dan ook dat alleen een flow-snelheid verhoging noodzakelijk is om bijna weer hetzelfde chromatogram te verkrijgen.

Ons doel was hiermee bereikt: 1 kolom voor zowel de anti-depressiva als voor de routinebepalingen zonder "gesleutel".

[1] "Bepaling van tricyclische antidepressiva zoals deze voorkomen in de KKGt testsera". ing. R. Langen. Laboratorium Ziekenhuis Apotheek Midden-Brabant, Maria Ziekenhuis, Tilburg. Extract Jaargang 3 Nr. 3.

[2] Kolom Shandon Hypersil BDS C8 5 μ m 150 x 4.6 mm, cat no 59874582 + voorkolom Shandon Hypersil BDS C8 5 μ m, cat no 66940055. LC-Service, Emmen.

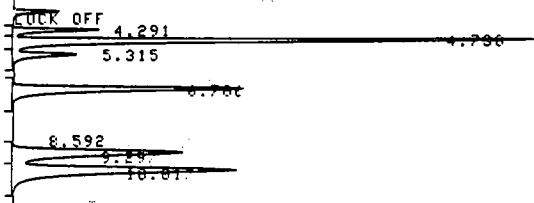
[3] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a. Merck 6579
Methanol HPLC Labscan C2517
Membranfilter RC55 0,45 μ m, 50 mm Schleicher&Schuell Ref.no. 410214
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. Merck 6345
Tetrahydrofuraan p.a. Merck 9731
Alles via Boom, Meppel.

[4] 2 x Chromspher C18, 5 μ m, 100 x 3 mm, cat no 28267 + voorkolom. Chrompack, Middelburg.

Voor chromatogrammen, zie blz 10

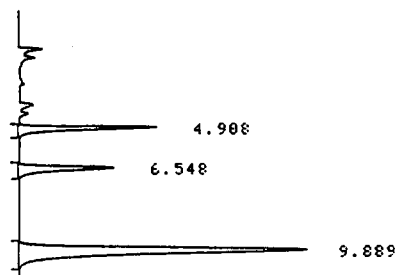
1) Chromatogram KKGTT referentieserum anti-epileptica.

11:08:42 ANTI-EPILEPTICA



CHROMATOGRAM	2	MEMORIZED				
PKNO	TIME	HIGHT	MF	IDNO	CONC	NAME
1	4.291	34665		2		PRIMIDON
2	4.738	202192	V	3		FENOBARBITAL
3	5.315	25846	V	4		CBZ-EPOXIDE
4	6.706	90522	R	1		CYCLOBARBITAL
5	9.297	66184	V	5		FENYTOINE
6	10.017	87064	V	6		CARBAMAZEPIN

2) Chromatogram KKGTT referentieserum cardiaca.



C-R5A CHROMATOPAC
CHANNEL NO 1
SAMPLE NO 0
REPORT NO 8
IS WT 1

FILE 0
METHOD 1023
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	HIGHT	MF	IDNO	CONC	NAME
1	4.908	13256	R	1		THEOPHYLLINE
2	6.548	9291		2		COFFEINE
3	9.889	27791		3		INT. ST.
TOTAL		50337				