



Bepaling van perfenazine en flufenazine m.b.v. UPLC-MS/MS

Erik Olyslager

Apotheek Gelre ziekenhuizen
Klin. Farm. & Tox. Laboratorium
Postbus 9014
7300 DS Apeldoorn
e.olyslager@gelre.nl

1. Inleiding

Perfenazine en flufenazine zijn piperazinefenothiazines die behoren tot de groep antipsychotica. Ze verminderen in de hersenen onder andere het effect van dopamine. Hierdoor nemen psychosen, hevige onrust, misselijkheid en bepaalde spiertrekkingen af. Ze worden voorgeschreven bij psychose, manie, onrust, schizofrenie, dementie, misselijkheid en braken.

De serumconcentraties perfenazine en flufenazine zijn laag. Het therapeutisch gebied van perfenazine ligt tussen 0,3 en 25 µg/l en die van flufenazine tussen 0,2 en 4 µg/l.

Tot voor kort voerden we de bepaling van perfenazine en flufenazine niet zelf uit. De bepaling van perfenazine gaf bij ons problemen door korte houdbaarheid van de standaarden en vooral flufenazine heeft een dusdanig laag therapeutisch gebied, dat deze met UV niet in voldoende lage concentraties te bepalen is. Sinds er een triple quadropole LCMS bij ons op het lab staat is de gevoeligheid geen probleem meer. Het probleem van de korte houdbaarheid van de perfenazine standaarden moest nog wel worden opgelost.

2. Experimenten

2.1 Chemicaliën en apparatuur

Ammoniumformiaat, mierenzuur en acetonitril worden geleverd door Fluka. Natriumcarbonaat door Merck. Monsters van de grondstoffen perfenazine, flufenazine.dihCl en de interne standaard promazine zijn opgevraagd bij de leverancier.

HPLC : Waters ACQUITY UPLC

Detector : Waters Quattro Premier

kolom : Waters BEH C18, lengte : 50 mm, diameter : 2,1 mm, deeltjes grootte : 1,8 µm

2.2 UPLC instellingen

Eluens A : 5 mM ammoniumformiaatbuffer
pH=3,0

Eluens B : acetonitril

Gradient (curve linear) : t=0 : 27% B
t=5,0 : 60% B
t=5,1 : 27% B
t=6,0 : 27% B

Flow : 0,25 ml/min

Injectievolume : 10 µl

Kolomtemperatuur : 50°C

2.3 MS instellingen

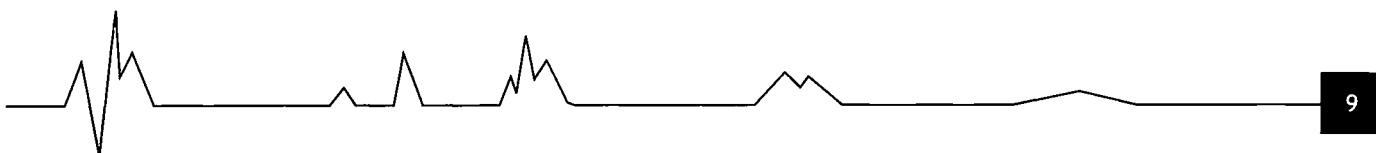
Stof	Moeder ion	Dochter ion	Cone (V)	Collision energie (V)
Perfenazine	404,01	171,1	41,00	24,00
	404,01	143,1	41,00	30,00
Flufenazine	438,00	171,1	43,00	26,00
	438,00	97,8	43,00	40,00
Promazine	285,07	86,1	29,00	18,00
	285,07	180,1	29,00	44,00

2.4 Standaarden

Interne standaard :

50 µg/l promazine in methanol.

Stockoplossingen van perfenazine en flufenazine worden bereid door 20,0 mg perfenazine en 11,67 mg flufenazine.2HCl op te lossen in methanol in een maatkolf van 100 ml. Dit geeft concentraties van 200 mg/l perfenazine en 100 mg/l flufenazine



Er wordt een tussenoplossing gemaakt door uit beide stockoplossingen 125 µl te pipetteren in een maatkolf van 25 ml en aan te vullen met methanol. Dit geeft concentraties van 1000 µg/l perfenazine en 500 µg/l flufenazine

Standaarden worden bereid door uit de tussenoplossing 50, 200 en 500 µl te pipetteren in maatkolven van 25 ml en aan te vullen met blanco plasma. De concentraties perfenazine zijn 2, 8 en 20 µg/l. Die van flufenazine zijn 1, 4 en 10 µg/l

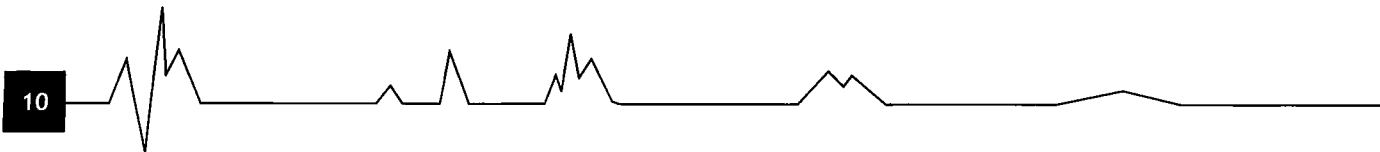
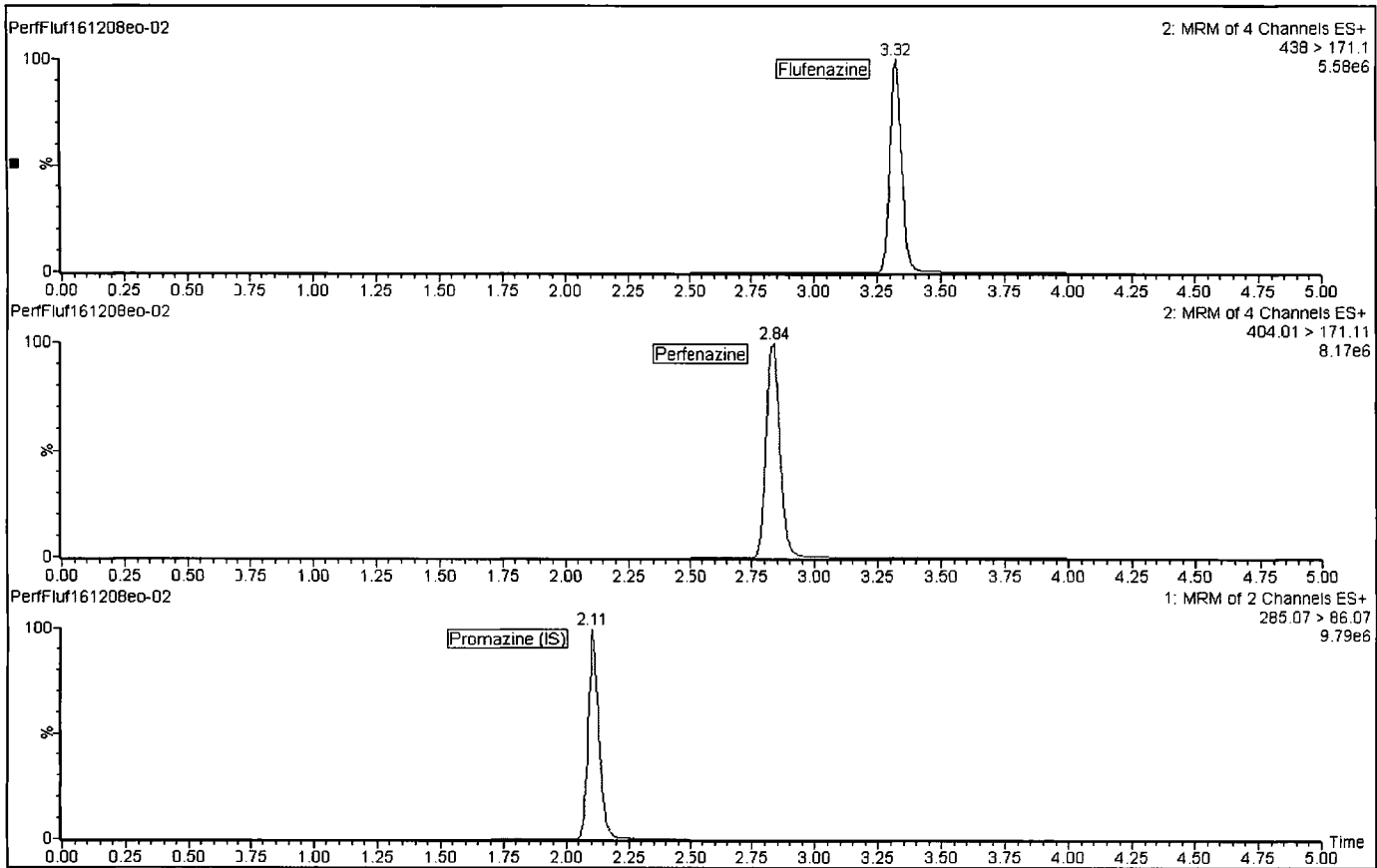
2.5 Monstervoorbewerking

Pipetteer 500 µl monster of standaard in een reageerbuis. Voeg 50 µl interne standaard en 50 µl 1 M natriumcarbonaat toe. Extraheer met 3 ml tert-butylmethylether en schud 5 minuten op de rotor. Na 3 minuten centrifugeren wordt de onderlaag bevroren en de bovenste laag overgeschonken in een tweede buis en ingedampt tot droog. Aan de drooggedampte buis wordt 200 µl van een mengsel van acetonitril en 4% mierenzuur in water in de verhouding 1:2 (pH=2,0) toegevoegd. Hiervan wordt 10 µl geïnjecteerd.

2.6 Validatie

Tijdens de validatie zijn ook de matrixeffecten onderzocht. Daarbij is de methode zoals beschreven door Matuszewski¹⁾ uitgevoerd. Daarbij worden piekoppervlakken van de componenten gespiket in eluens, gespiket na extractie van blanco serum en na extractie van serumstandaarden, met elkaar vergeleken. De extractieopbrengst is nu de verhouding van de piekoppervlakken van geëxtraheerde standaarden en de spike na extractie van blanco serum. Het matrixeffect is de verhouding van de spike na extractie van blanco serum en standaard in eluens. De proces-efficiëntie is vergelijkbaar met de vroegere extractieopbrengst, maar bij LCMS is hier het matrixeffect inbegrepen.

Figuur 1 : chromatogram van een extract van 8 µg/l perfenazine en 4 µg/l flufenazine in serum.



N=5 tenzij anders vermeld

Concentratie (µg/l)	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC % (n=15)
Perfenazine 0,8	103	1,8	3,5
Perfenazine 5,0	107	2,3	2,9
Perfenazine 19,8	102	2,1	2,2
Flufenazine 0,4	103	2,8	5,6
Flufenazine 2,5	104	2,3	3,5
Flufenazine 9,9	100	1,8	2,2

Concentratie (µg/l)	Extractieopbrengst % (VC %)	Matrix effect % (VC %)	Proces efficiëntie % (VC %)
Perfenazine 2,0	90 (5,2)	101 (1,4)	91 (4,6)
Perfenazine 8,0	91 (3,9)	97 (2,2)	88 (4,5)
Perfenazine 20,0	92 (3,4)	97 (3,1)	90 (4,8)
Flufenazine 1,0	98 (1,6)	99 (1,5)	97 (3,0)
Flufenazine 4,0	95 (1,1)	98 (1,4)	93 (1,1)
Flufenazine 10,0	94 (3,0)	99 (1,2)	93 (2,9)
I.S. (promazine)	85 (4,7)	99 (1,9)	84 (4,1)

	Onderste bepalingsgrens µg/l	Bovenste bepalingsgrens µg/l
Perfenazine	0,02	50
Flufenazine	0,01	15

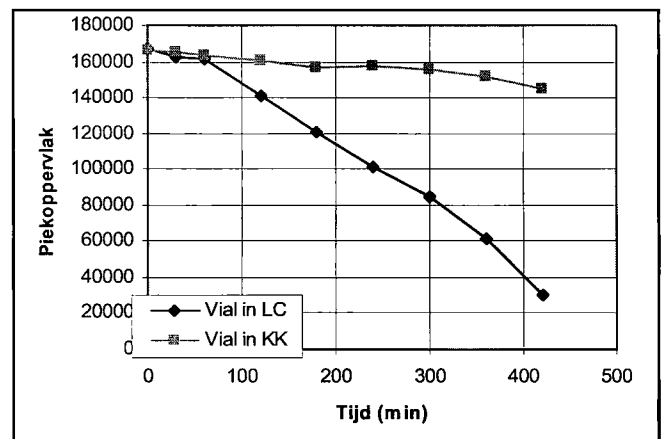
3. Houdbaarheid van de standaarden

Tijdens het opzetten van de methode viel op, dat de response van de componenten afnam tijdens een reeks injecties. Met name perfenazine had hier veel last van. Het meest waarschijnlijk leek mij, dat dit kwam door omzetting onder invloed van licht. Een andere mogelijkheid was hechting aan glaswerk. Dit laatste werd snel uitgesloten door oplossingen in glas en plastic weg te zetten in de (donkere) koelkast.

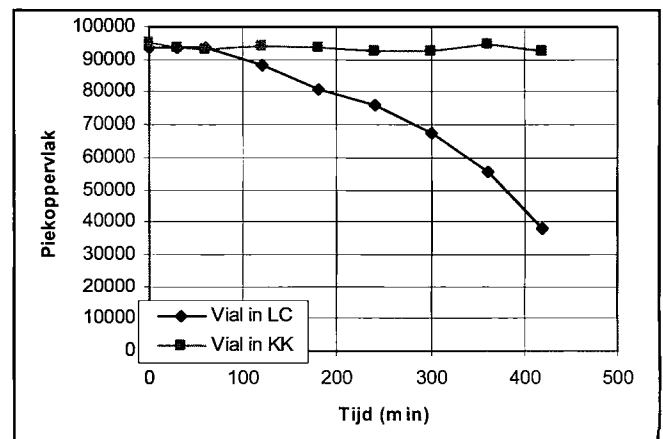
De invloed van licht op de componenten is onderzocht door een standaardoplossing van de componenten te maken in eluens en deze in HPLC vials uit te vullen. Eén vial wordt telkens na injectie in het donker in de koelkast gezet en een tweede vial blijft in de autosampler van de HPLC staan. Uit beide vials wordt na vaste tijden een injectie gedaan. Het bij ons systeem aanwezige lampje in de autosampler staat aan. De resultaten zijn te zien in onderstaande grafieken. Met de autosampler lamp uit daalden de concentraties iets minder sterk, maar de invloed van de autosampler lamp is niet groot.

In de bovenste grafiek is te zien dat ook de perfenazinelijn van de vial in de koelkast enigszins daalt. Dit wordt veroorzaakt door het korte verblijf in het licht tijdens de injecties.

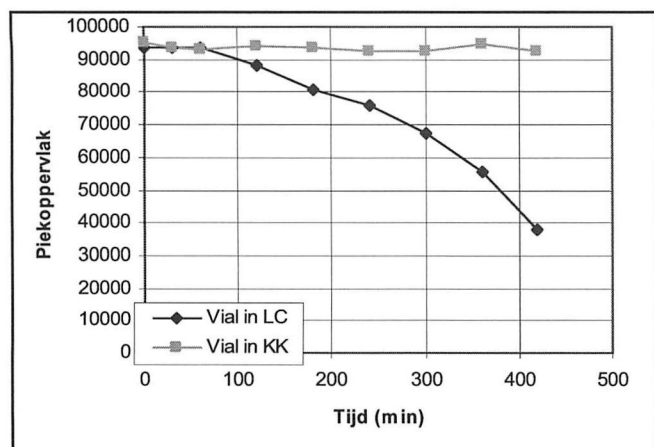
Invloed van licht op de perfenazine concentratie



Invloed van licht op de flufenazine concentratie



Invloed van licht op de promazine concentratie



Naast de lichtgevoeligheid is ook de houdbaarheid van de standaarden onderzocht bij kamertemperatuur in het donker. Daarvoor zijn standaarden uit de diepvries een week bij kamertemperatuur in het donker bewaard. De concentraties perfenazine en flufenazine blijken na een week niet gedaald te zijn.

4. Discussie

Bij de bepaling van perfenazine en flufenazine met UV liepen we tegen de grenzen van de gevoeligheid aan. Met een triple quadropole MS/MS is gevoeligheid geen probleem meer. De kans op matrixeffecten is sterk verkleind door te kiezen voor een vloeistof-vloeistofextractie in combinatie met een goede scheiding van de componenten op een UPLC-kolom. De validatie laat zien dat er geen matrix-effecten zijn geconstateerd. Wel moet men er altijd op

bedacht zijn dat co-eluerende componenten die in veel hogere concentratie kunnen voorkomen dan de te bepalen componenten voor suppressie of enhancement kunnen zorgen.

De componenten blijken erg lichtgevoelig te zijn. Er is gekeken of het uitzetten van de lamp in de autosampler voldoende was om omzetting te minimaliseren. Dit blijkt niet het geval. Vandaar dat alle lichtinval moet worden voorkomen door de hele autosampler te verduisteren of bruine vials te gebruiken.

5. Conclusie

Voor de bepaling van perfenazine en flufenazine is de LC-MS bij uitstek geschikt. De gevoeligheid voor licht blijkt verantwoordelijk te zijn voor de slechte houdbaarheid van de standaarden en niet de temperatuur. De monsters zijn buiten de invloed van licht bij kamertemperatuur minimaal een week houdbaar.

Referenties

1) B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer and C.M. Chavez-Eng; *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS; Analytical Chemistry*, Vol. 75, No 13, July 1, 2003; 3019-3030.

