



# Chromatografie

## SNELLE, ROUTINEMATIGE ANALYSE VAN COFFEINE EN ETHOSUXIMIDE MET REVERSED PHASE HPLC.

R. Langen.  
Laboratorium Ziekenhuis Apotheek Midden-  
Brabant,  
Maria Ziekenhuis, Dr. Deelenlaan 5  
5042 AD Tilburg, Tel: 013-655882.

Leveranciers van HPLC kolommen prijzen  
steeds vaker kolommen aan welke geschikt  
zijn voor geneesmiddelanalyse door mid-  
del van directe serum injectie. Voor-  
beelden zijn de Pinkerton ISRP kolom of  
de ChromSpher BioMatrix kolom.

De voordelen van deze kolommen zijn  
duidelijk. Naast een geringe monster  
hoeveelheid zijn geen tijdrovende en  
milieu onvriendelijke vloeistof/vloei-  
stof of solid phase extracties meer  
nodig.[1] [2]

Nadelen, in vergelijking met 'traditio-  
nele' HPLC kolommen, zijn er echter ook.  
Kolommen, geschikt voor directe serum  
injectie, zijn erg duur en de kolom is  
sneller aan vervanging toe. Een ander  
nadeel dat voor ons speelt is dat weer  
een andere kolom aan onze collectie HPLC  
kolommen zou worden toegevoegd.

Dit heeft ons doen besluiten een snelle  
analyse voor coffeine en ethosuximide te  
ontwikkelen op een 'traditionele' C18  
kolom.

Hieronder volgt het voorschrift en de  
HPLC chromatogrammen.

Chromatogram I: standaard coffeine 6,0  
mg/l in zout 0,9 %.

Chromatogram II: patient serum, concen-  
tratie 9,5 mg/l.

Chromatogram III: standaard ethosuximide  
40,0 mg/l in humaan plasma.

Chromatogram IV: patient serum, concen-  
tratie 39,2 mg/l.

In de ethosuximide chromatogrammen is  
ook de coffeine piek zichtbaar.

### Coffeine en ethosuximide.

	Concentratie in serum (mg/l)	
	Therapeutisch	Toxisch
Coffeine	8 - 15	> 20
Ethosuximide	40 - 80	> 120

### Grondstoffen:

Grondstof, kwaliteit, leverancier, arti-  
kel nummer:

Acetonitril, lichrosolv, Merck, 30.  
Aqua dest, apotheek.  
 $\beta$ -hydroxy-ethyl-theophylline, Pierce.  
Coffeine anhydricum, OPG.  
Ethyl-methyl-succinimide, Technisch  
Pharm. Ondern. B.V.  
Fosforzuur (85 %), PA, Merck, 573.  
Kaliumhydroxide, PA, Merck, 5033.  
Methanol, lichrosolv, Merck, 6007.  
Natriumchloride opl. 0,9 %, Braun.

### Reagentia:

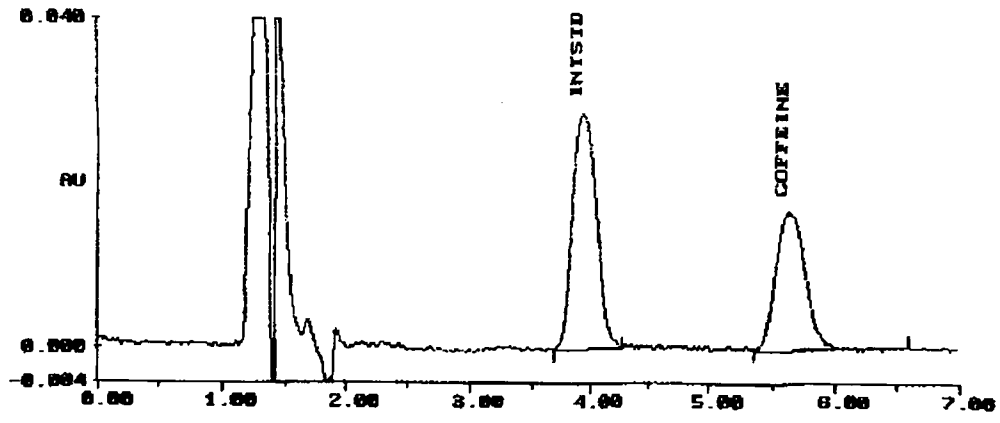
- Loopvloeistof:  
100 ml acetonitril + 900 ml fosfaat  
buffer.  
Fosfaatbuffer:  
900 ml aqua dest + 400  $\mu$ l fosforzuur  
(85 %),  
breng op pH 4,0 met 10 M KOH.
- KOH 10 M.
- Interne standaard:  
 $\beta$ -hydroxy-ethyl-theophylline 5 mg/l  
in methanol.

### HPLC systeem:

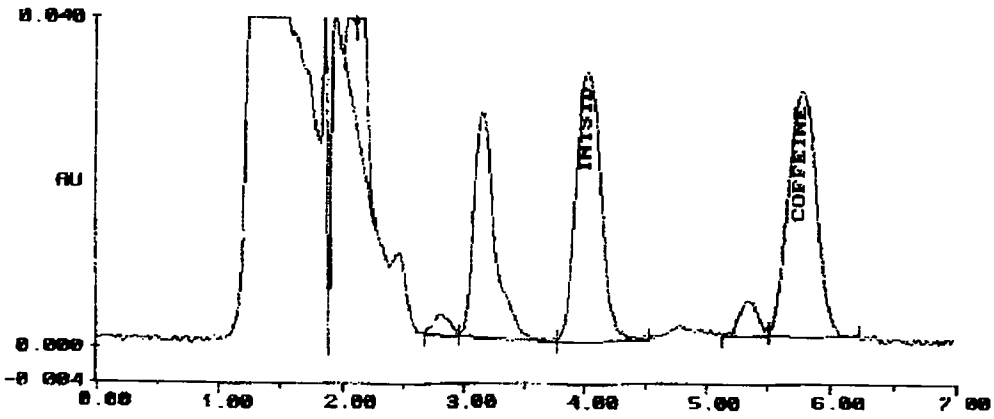
Detektor: Photo Diode Array L-3000  
Merck/Hitachi.  
Detektie: 205 nm, 0,040 aufs.  
Autosampler: AS-2000 Merck/Hitachi.  
Injectie: 20  $\mu$ l.  
Pomp: L-6200 Merck/Hitachi.  
Flow: 1 ml/min.  
Kolom: LiChroCART 125-4  
LiChrospher 100 RP-18 5  
 $\mu$ m  
Merck artikel nummer  
50828 met voorkolom.  
Interface: D-6000 Merck/Hitachi.  
Computer: Tulip AT compact 2.  
Software: HPLC-manager versie 2  
Merck/Hitachi.

### Werkwijze:

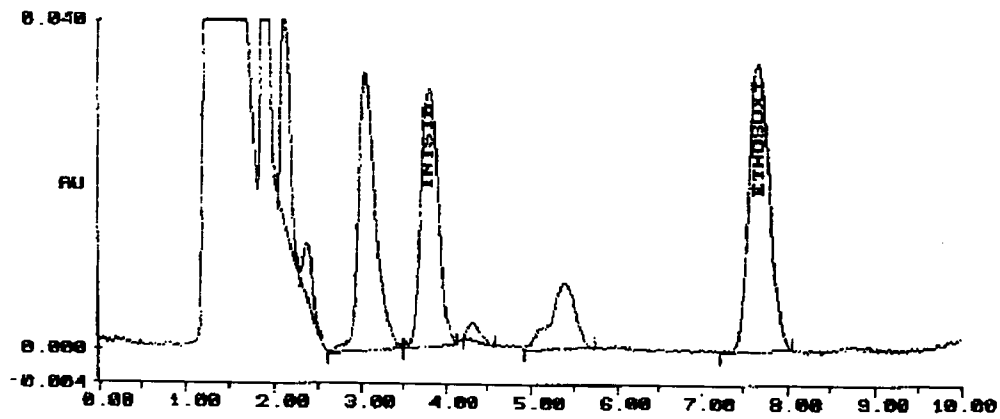
Pipetteer in een centrifuge cupje:  
- 100  $\mu$ l serum of standaard,  
- 200  $\mu$ l interne standaard.  
Onteiwit op de vortex.  
Centrifugeer 4 minuten bij 10000 rpm.  
Injecteer 20  $\mu$ l van de bovenstaande  
heldere vloeistof.



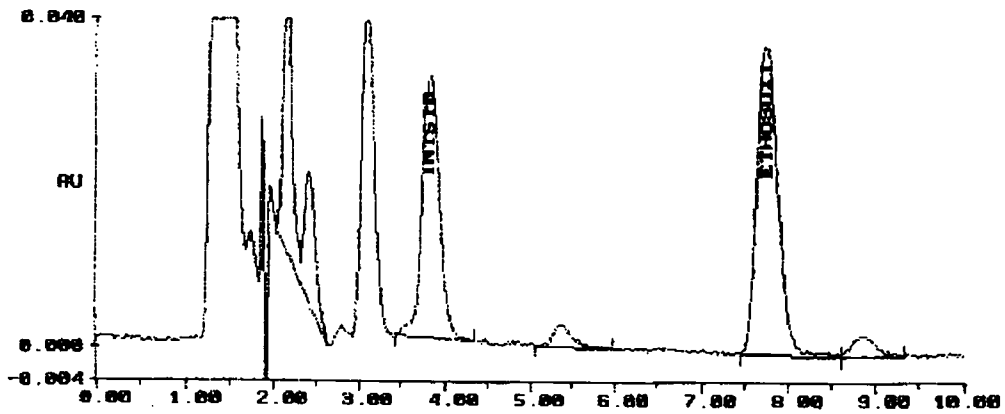
Chromatogram I



Chromatogram II



Chromatogram III



Chromatogram IV

### Retentie tijden:

Interne standaard: 3,8 min.  
Coffeine: 5,7 min.  
Ethosuximide: 7,7 min.

### Berekeningen:

Met behulp van de ratio's van de piekhoogten van de monster/interne standaard pieken.

### Bepalingsgrenzen in serum:

Coffeine: 1 mg/l.  
Ethosuximide: 5 mg/l.

### Intra-assay variantie:

Coffeine:  
3 mg/l in zout 0.9 % : 3.9 % (n=5).  
12 mg/l in zout 0.9 % : 1.2 % (n=5).

Ethosuximide:  
40 mg/l in plasma : 3.3 % (n=6).

### Lineairiteit van de ijklijn:

De lineairiteit van de ijklijn is getest tot 15 mg coffeine/l en 80 mg ethosuximide/l.

### Veiligheid:

- Voor deze analyse gelden de algemene maatregelen ten aanzien van bloed overdraagbare aandoeningen.
- Draag een UV-beschermingsbril bij technische werkzaamheden aan de detector, indien deze aan staat.
- Bereid loopvloeistof in de zuurkast en draag handschoenen.

### Milieu:

- Verzamel bloed afval in de container 'specifiek ziekenhuis afval'.
- Verzamel loopvloeistof en overig organisch afval in de container 'categorie III': halogeen-arme organische stoffen.

### Literatuur:

- [1] LC-service, product informatie Pinkerton ISRP kolom.
- [2] Documentatiemap symposium Chrom-pack, 'Trends in chromatografie en farmaceutische analyse'. 20 april 1993.