

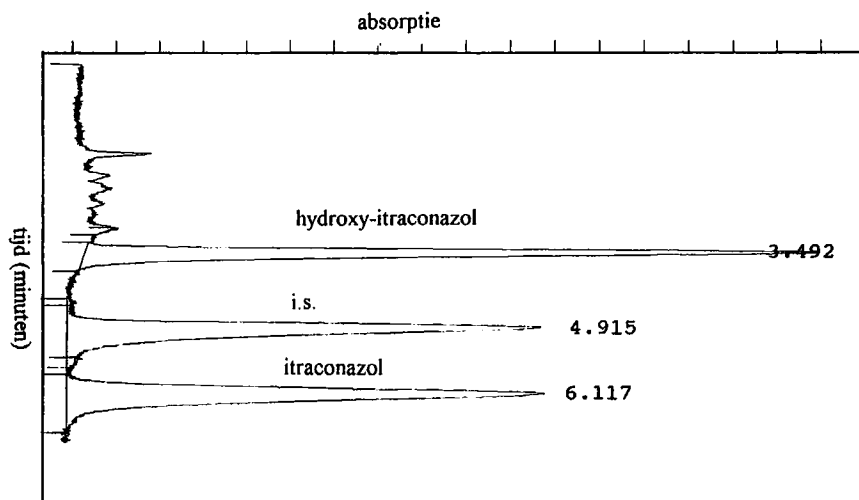


## Hoe zuiver is uw piek?

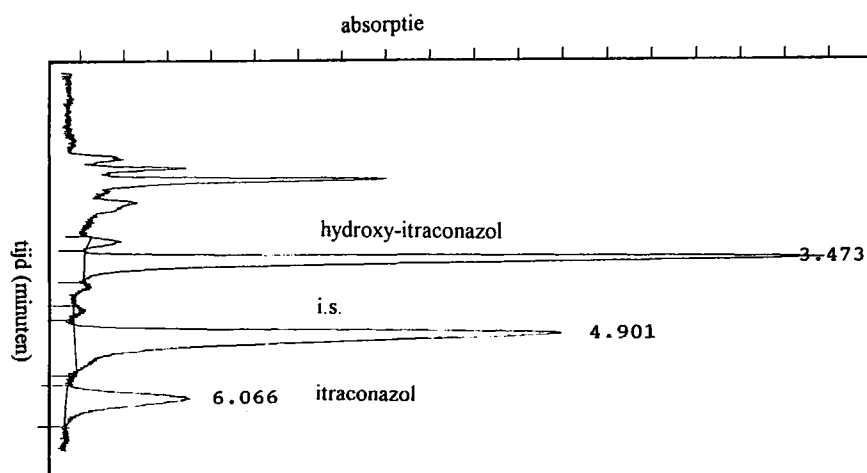
D.Compas en P.N.F.C. de Goede  
Laboratorium apotheek  
Academisch Ziekenhuis Vrije  
Universiteit  
Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam

In dit artikel willen wij middels twee praktijk voorbeelden de lezer er op wijzen dat in een HPLC-opstelling, waarbij met UV bij één golflengte wordt gedetecteerd, men de plank flink kan misslaan.

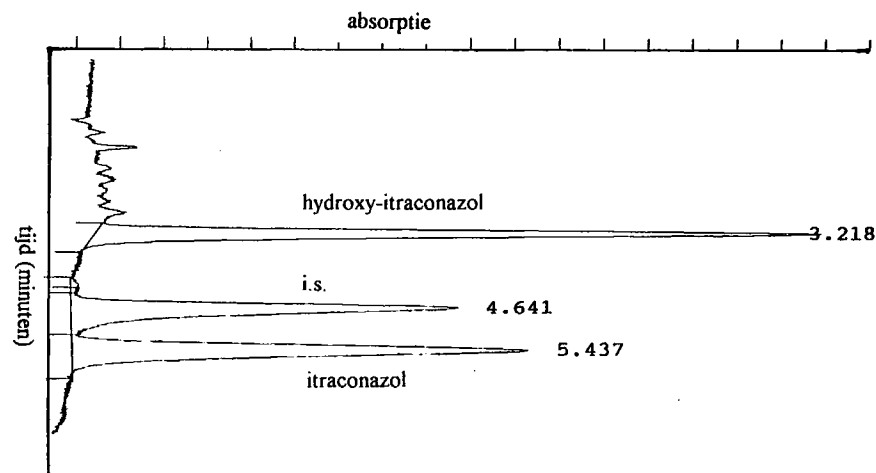
Het eerste voorbeeld betreft de analyse van itraconazol en z'n metaboliet hydroxy-itraconazol<sup>1)</sup> De chromatogrammen van een standaard en het monster staan in figuur 1. Op het eerste gezicht lijkt dit een normale uitslag die ook als zodanig aan de aanvrager gepresenteerd zou worden. Piekvorm en tijden van het patiëntmonster verschillen niet noemenswaardig van die van de standaarden. Wij zouden hierbij in principe één van onze variabele golflengte detectoren gebruikt kunnen hebben, maar gelukkig hadden we in dit geval een diode array detector (DAD) in de opstelling staan welke aangaf dat het spectrum van de piek op de plaats van de hydroxy-itraconazol geen hydroxy-itraconazol was. Ook werd niet aangegeven wat het wel was (het was namelijk een mengspektrum van twee stoffen zoals later zal blijken). Op het aanvraagformulier stond overigens geen comedicaatie vermeld. Tijdens het valideren van deze methode hadden we al opgemerkt dat trimetoprim in het chromatogram dicht in de buurt van hydroxy-itraconazol zit. Deze stof wordt wel eens in combinatie met itraconazol voorgeschreven. Toen we deze twee componenten samen op ons systeem injecteerden, bleken ze inderdaad op elkaar te liggen. Om ze te scheiden hadden we destijds bij de validatie bepaald dat de verhouding acetonitril : water in de mobiele fase voor ons systeem 62:38 moest zijn.



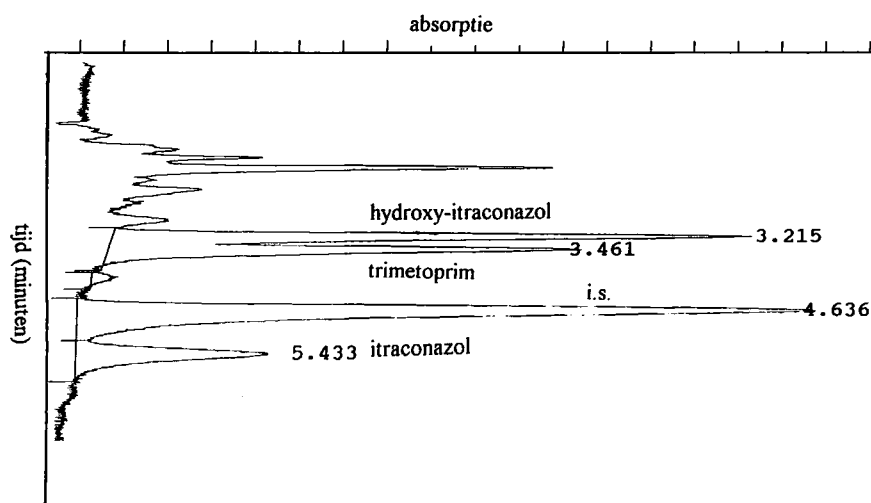
Figuur 1a: standaard itraconazol en hydroxy-itraconazol van beide 0,8 mg/l.



Figuur 1b: patiënt monster.



Figuur 2a: standaard itraconazol en hydroxy-itraconazol van beide 0,8 mg/l.



Figuur 2b: patiënt monster.

Ondanks het feit dat de in deze analyse gebruikte mobiele fase pas gemaakt was, hebben we toch nieuwe gemaakt en de monsters nogmaals geïnjecteerd (figuur 2). Met behulp van deze nieuwe mobiele fase zien we twee pieken gescheiden van elkaar in het chromatogram. De echte concentratie hydroxy-itraconazol is bijna gehalveerd vergeleken met de aanvankelijk uitgerekende hoeveelheid. De storing was inderdaad trimetoprim (volgens de bibliotheek van de DAD). Blijkbaar was de mobiele fase of niet

goed meer of was dat nooit geweest.

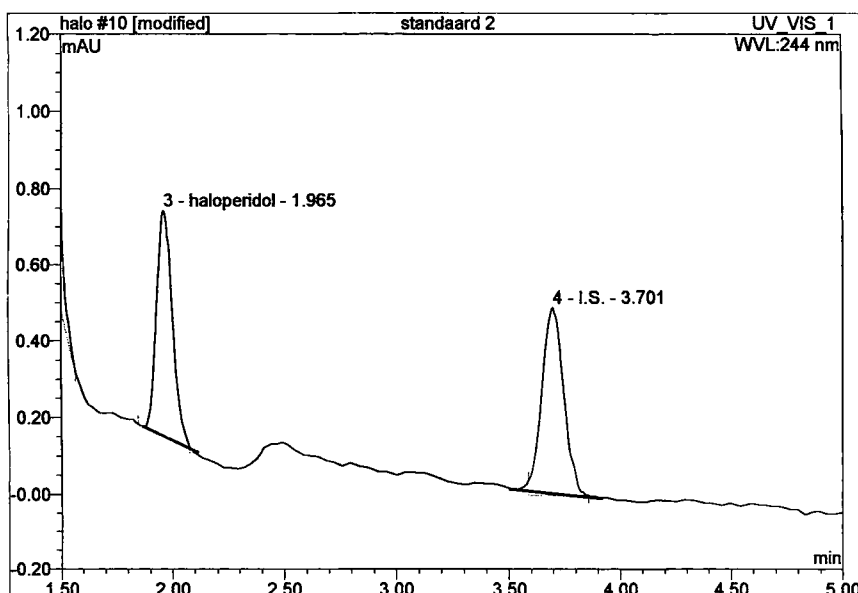
Nu kan geconcludeerd worden dat er altijd een standaard van deze twee componenten geïnjecteerd moet worden bij deze analyse, maar dan zou er wellicht weer een andere, niet eerder onderzochte component, kunnen storen.

Een tweede geval betrof een aanvraag van haloperidol. Deze wordt bij ons geanalyseerd via een straight phase systeem (modificatie Uges

AZG). Het patiëntmonster gaf een keurige piek te zien op een tijd die overeenkwam met die van de standaard haloperidol (figuur 3). De berekende concentratie was  $\pm 35 \mu\text{g/l}$ . Voor haloperidol is dit een aanzienlijke concentratie en gezien de gerichte aanvraag waren er geen bedenkingen ten aanzien van deze concentratie. Aangezien wij sinds een aantal maanden een diode-array in deze opstelling hebben staan en de pieken van belang daarmee identificeren via hun spectrum bleek nu dat de zogenaamde haloperidol piek niet teruggevonden kon worden via de bibliotheek. De bibliotheek herkende de piek als zuclopentixol. Dit riep uiteraard de nodige vraagtekens op. Het aanvraagformulier bood geen uitkomst, hierop stond slechts de haloperidol aanvraag vermeld zonder vermelding van de comedicatie. Navraag bij de betreffende arts leverde de informatie op dat de patiënt o.a. cisordinol (zuclopentixol) kreeg. Deze mededeling bevestigde in ieder geval de uitslag van de diode array, maar loste ons probleem niet op (behalve dan dat geconcludeerd kon worden dat de uitslag van  $35 \mu\text{g/l}$ , die bij enkelvoudige UV meting doorgegeven zou zijn, met achteraf een dialoog arts-apotheker, niet klopte). De aanvraag zou nu beëindigd kunnen worden met de mededeling dat er geen haloperidol uitslag te geven is. Veelal proberen wij echter via een aanpassing van het loopmiddel of een andere methode een scheiding te bewerkstelligen om alsnog een uitslag te kunnen geven, zij het met een grotere afwijking. Uiteraard gebeurt dit dan niet onder "gevalideerde condities" maar een globale uitslag is op zo'n moment wellicht beter dan geen uitslag. In ons geval hebben wij het loopmiddel zodanig veranderd dat de twee componenten redelijk gescheiden werden (figuur 4). De haloperidol concentratie blijkt nu  $\pm 5 \mu\text{g/l}$  te zijn.

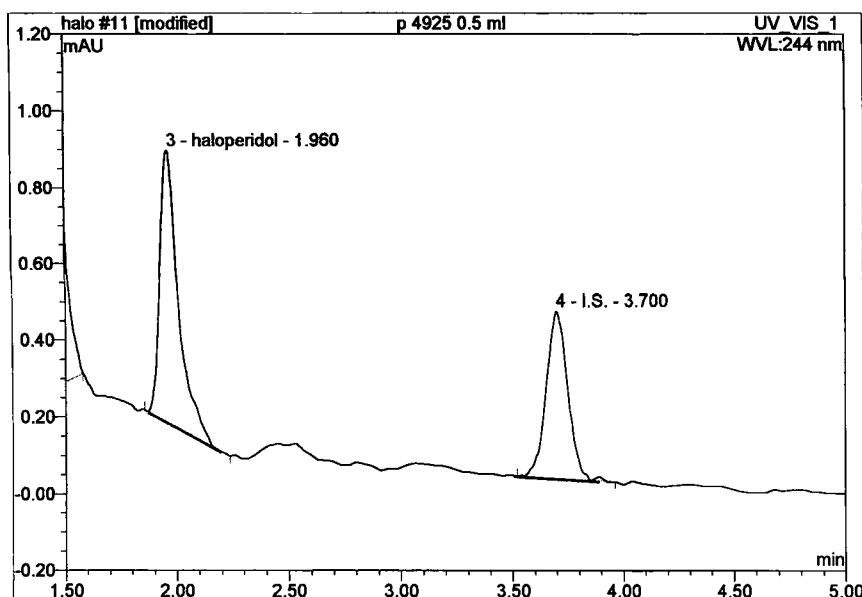
## Conclusie

Metingen uitvoeren bij één golflengte zelfs m.b.v. een gevalideerde



Figuur 3a: standaard haloperidol.





## Literatuur

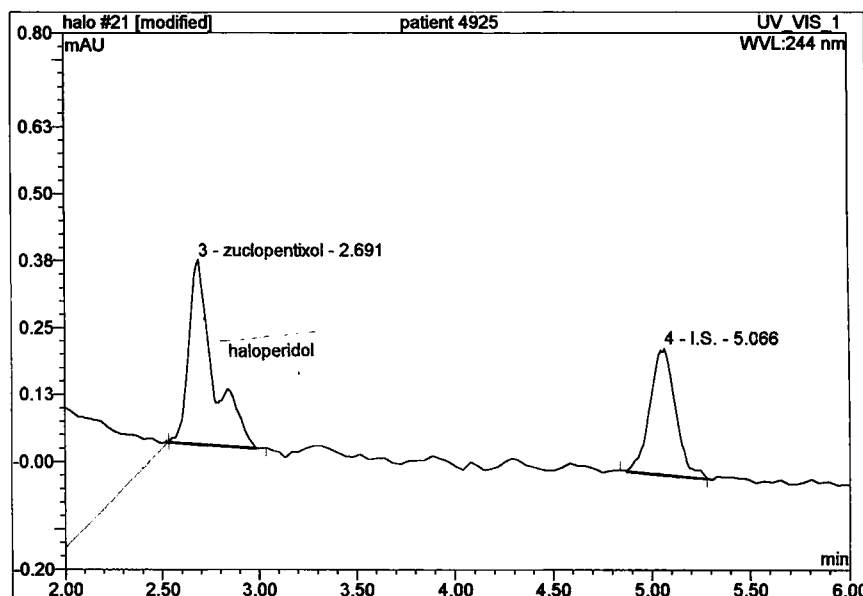
- 1 D.Compas, D.J.Touw, P.N.F.C. de Goede  
Rapid method for the analysis of itraconazole and hydroxyitraconazole in serum by high-performance liquid chromatography. J.of Chromatography B, 687 (1996) 453-456

Figuur 3b: patiënt monster.

methode brengen risico's met zich mee omdat onvolledig of niet ingevulde formulieren m.b.t. de comedicaatie vaak voorkomen.

Een binnenkomende aanvraag moet altijd gecontroleerd worden op comedicaatie als er bij één golflengte gemeten wordt. De voorbeelden laten zien dat er gemakkelijk onbewust fouten gemaakt kunnen worden.

Men zou eigenlijk altijd bij UV-detectie een diode array detector moeten gebruiken zodat de pieken spectraal geïdentificeerd kunnen worden. Na identificatie kan men er redelijkerwijs van uitgaan dat de gevonden piek ook het beoogde geneesmiddel is. Men is hierdoor wat minder kwetsbaar voor wat betreft de comedicaatie, mits de spectrum gevoeligheid voldoende laag is.



Figuur 4: patiënt monster na verandering mobiele fase.

## Tot slot:

Op ons laboratorium hebben wij ongeveer 6 HPLC opstellingen met UV-detectie waarvan 3 met diode array detector. Deze drie detectoren staan wel in de belangrijkste HPLC-opstellingen, zodat het grootste gedeelte van de analyses spectraal bekeken kan worden. Hoe zit dat bij u op het laboratorium?