



## Methodieken

Laboratorium Ziekenhuis Apotheek Midden  
Brabant Maria Ziekenhuis Tilburg.  
Rob Kaletsky.

### **Tricyclische Antidepressiva voor een depressieve analist ?**

Als je met collega's praat over het bepalen van antidepressiva dan hoor je veel gezocht en is men de bepaling liever kwijt dan rijk; er zijn vaak veel problemen en er worden nogal eens wat truukjes uitgehaald om een getal te produceren zodat de KKG score goed uitkomt. De analist wordt ook door de KKG geconfronteerd met een mengsel, waarvan je de componenten zo optimaal mogelijk moet zien te scheiden, een bijna onmogelijke opdracht. Je kunt een bepaling opzetten, die voor de praktijk een optimale gevoeligheid heeft en een mooie smalle piek voor in het chromatogram, mooi gescheiden van serum pieken en slechts 1 ml serum nodig, maar dan krijg je het KKG mengsel en moet je de bepaling aanpassen omdat het mengsel van stoffen niet voorkomt bij een patient en je toch een onafhankelijke controle wilt hebben. Helaas gaat deze aanpassing ten koste van de kwaliteit en dat is eigenlijk niet de opzet van de KKG. Misschien dat een verdere opdeling van de componenten een oplossing is. Een ander probleem van de analist is de wisselende kwaliteit van batch tot batch

van de kolommen voor HPLC en GC. Ieder-  
een is het wel eens tegengekomen, dat  
een bepaling op een nieuwe kolom ineens  
niet meer "loopt"; de fabrikant gebruikt  
een ander fabricageproces (goedkoper ?)  
en controleert zijn kolom met een meng-  
sel van stoffen die een mooi plaatje  
geven.

Maar jouw "plaatjes" zijn niet te re-  
produceren. Ook wij zijn daar vorig jaar  
weer eens mee geconfronteerd en ook  
andere collega's die dezelfde kolom ge-  
bruikten en helaas ja, het betrof de  
kolom voor de antidepressiva bepaling.  
Het toeval wilde dat er een vertegen-  
woordiger van LC Service langs kwam en  
hij beloofde dat hij de juiste kolom  
voor onze applicatie had. Nou die verha-  
len kent ook iedereen wel; eerst zien,  
dan geloven. Je begint weer op nul en  
gaat een loopvloeistof samenstellen  
, waarbij het KKGt mengsel zo goed moge-  
lijk is gescheiden. Het aantal schotels  
van de kolom was een stuk groter, de  
pieken waren allen groter geworden en  
gescheiden, ook een andere batch zag er  
goed uit. Wij waren er inderdaad op  
vooruit gegaan met deze Shandon Hypersil  
BDS kolom.

Helaas moet je ook hier concessies doen  
, wij vinden het jammer dat de fabrikant  
nog de valco kolomaansluitingen gebruikt  
maar er wordt aan gewerkt om toch mis-  
schien een cartridge systeem toe te  
passen; dit is wel belangrijk, want  
verwisselen van de voorkolom in een  
cartridge systeem zoals de fa Merck  
gebruikt, heeft toch voorkeur.

Hierbij drukken wij onze bepaling in  
Extract af en hopen hier mede een leven-  
dige discussie en of uitwisseling van  
diverse bepalingsmethodes op gang te  
krijgen voor deze zo belangrijke en in  
aantal toenemende geneesmiddelen.

**Bepaling van tricyclische antidepressiva  
zoals deze voorkomen in de KKGt testsera**

ing R. Langen.  
Laboratorium Ziekenhuis Apotheek Midden-  
Brabant  
Maria Ziekenhuis  
Dr. Deelenlaan 5  
Postbus 90107  
5000 LA Tilburg.

**Synoniemen:**

Tryptizol : amitriptyline  
                  nortriptyline (metaboliët)  
Ludiomil : maprotiline  
                  desmethylnmaprotiline  
                  (metaboliët)  
Tofranil : imipramine  
                  desipramine (metaboliët)  
Anafranil : clomipramine  
                  desmethylnclomipramine  
                  (metaboliët)

**Therapeutische concentratie:**

Amitriptyline + Nortriptyline :  
samen 100 - 200 µg ami-nor/l

Maprotiline + Desmethylnmaprotiline :  
samen 100 - 400 µg map-dmap/l

Imipramine + Desipramine :  
samen 100 - 300 µg imi-desi/l

Clomipramine + Desmethylnclomipramine :  
samen 100 - 300 µg clo-dclo/l

**Grondstoffen:**

**Grondstof, Kwaliteit, Leverancier, Art.nr.**

Acetonitril, Lichrosolv, Merck 30  
Amitriptyline HCl, Bufa Chemie  
Aqua dest, Apotheek  
Clomipramine HCl, Ciba Geigy  
Desipramine HCl, Bufa Chemie  
Des.clomipramine HCl, Ciba Geigy  
Des.maprotiline mesylaate, Ciba Geigy  
Doxepine, Capsule, Apotheek  
Fosforzuur (85 %), PA, Merck 573  
Hexaan, Uvasol, Merck 4372  
Imipramine HCl, Bufa Chemie  
Isoamylalcohol, PA, Merck 979  
Kaliumhydroxide, PA, Merck 5033  
Maprotiline HCl, Ciba Geigy  
Methanol, Lichrosolv, Merck 6007  
Natriumcarbonaat, PA, Merck 6392  
Nortriptyline HCl, Bufa Chemie

**Reagentia:**

- Loopvloeistof:  
380 ml CH<sub>3</sub>CN : 620 ml Buffer  
Buffer voor loopvloeistof:  
620 ml H<sub>2</sub>O + 3000 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, breng op  
pH 3.35 met 10 M KOH.
- KOH 10 M.

- Interne standaard:  
Doxepine 2 mg/l in H<sub>2</sub>O.
- Extraktiebuffer:  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.0 M in H<sub>2</sub>O.
- Extraktievloeistof:  
n-Hexaan 99 : isoamylalcohol 1 (v/v).

#### HPLC systeem:

Photo diode array detector L-3000 Merck-Hitachi.  
 Autosampler AS-2000 Merck/Hitachi.  
 Pomp L-6200 Merck/Hitachi.  
 Interface D-6000 Merck/Hitachi.  
 Computer Tulip AT compact 2.  
 Software HPLC manager versie 2 Merck-Hitachi.  
 Detektie 205 nm, 0.04 aufs.  
 Injektie 30 µl.  
 Flow 1 ml/min.  
 Kolom Shandon Hypersil BDS C8 5 µm 150 x 4.6 mm, LC service cat no 59874582.  
 Voorkolom Shandon Hypersil BDS C8 5 µm,

LC service cat no 66940055.

#### Werkwijze:

Pipetteer in een centrifugebuis:

Hoeveelheid serum: 2000 µl  
 Interne standaard: 100 µl  
 Methanol: 2000 µl

Op vortex onteiwitten.

Extraktiebuffer: 100 µl  
 Extraktievloeistof: 6 ml

Zwenk de buis 15 x krachtig om.  
 Centrifugeer 5 minuten bij 4000 rpm.  
 Pipetteer de hexaanlaag af en breng deze over in een schone buis.  
 Damp de hexaanlaag in onder stikstof bij 40 °C.  
 Los het residu mbv vortexen en ultrasoonbad op in 100 µl loopvloeistof en laat het opgeloste monster 1 uur staan.  
 Centrifugeer het monster nog een keer en injecteer 30 µl van de heldere oplossing.

### Retentietijden:

Ami: 8.2 min.      Imi: 7.7 min.  
Istd: 5.5 min.  
Nor: 7.3 min.      Desi: 6.9 min.  
Map: 7.7 min.      Clo: 12.0 min.  
Dmap: 6.6 min.      Dclo: 10.6 min.

### Berekeningen:

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

### Detektiegrenzen:

Ami: 10 µg/l.      Imi: 10 µg/l.  
Nor: 10 µg/l.      Desi: 10 µg/l.  
Map: 10 µg/l.      Clo: 15 µg/l.  
Dmap: 10 µg/l.      Dclo: 15 µg/l.

De detektie grens is gedefinieerd als 3 x het ruis niveau.

### Variatiecoëfficiënt:

Ami: 6.4 %.      Imi: 3.2 %.  
Nor: 3.9 %.      Desi: 3.6 %.  
Map: 4.6 %.      Clo: 6.8 %.  
Dmap: 6.1 %.      Dclo: 2.8 %.

( n=4, conc. 50 µg/l in serum, muv aminor: conc. 40 µg/l )

### Extraktie-opbrengst:

Ami: 86 %.      Imi: 98 %.  
Nor: 92 %.      Desi: 90 %.  
Map: 95 %.      Clo: 74 %.  
Dmap: 79 %.      Dclo: 76 %.

( n=4, conc. 150 µg/l in serum, muv aminor: conc. 100 µg/l )

### Lineairiteit van de ijklijnen:

De lineairiteit van de ijklijnen is getest tot:

Ami: 400 µg/l.      Imi: 500 µg/l.  
Nor: 400 µg/l.      Desi: 500 µg/l.  
Map: 500 µg/l.      Clo: 500 µg/l.  
Dmap: 500 µg/l.      Dclo: 500 µg/l.

### Alternatieve bepalingmethode:

TDx / ADx semikwantitatief.

### Veiligheid:

-Voor deze bepaling gelden de algemene maatregelen t.a.v. bloed overdraagbare aandoeningen.

-UV-beschermingsbril dragen bij technische werkzaamheden aan DAD, indien deze aan staat (UV licht!).

-loopvloeistof bereiding in zuurkast en handschoenen aan (acetonitril!).

### Milieu:

-bloed afval gaat in de container "specifiek ziekenhuisafval"

-loopvloeistof en het overige organische afval gaat in de container "categorie III" = halogeen-arme organische stoffen.

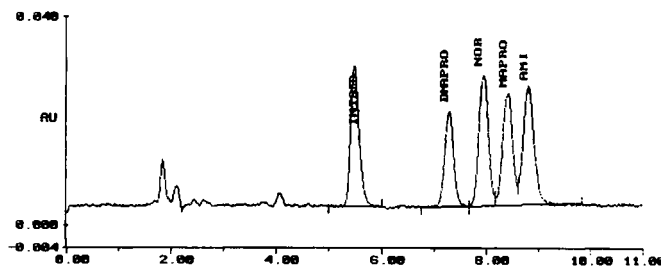
#### D-6000 HPLC Manager Report

Analyzed: Aug 11, 1992 13:28

Reported: Aug 11, 1992 13:55

Method Title : TCAI  
Method : TCAI  
Sample : KKGT I (A)  
Data File : TCAI007.RD  
UNK - Inj 1  
Vial No. : 1  
Channel : 1  
Vol : 30 ul

Channel 1



#### D-6000 HPLC Manager Report

Analyzed: Aug 11, 1992 14:53

Reported: Aug 11, 1992 15:25

Method Title : TCAI  
Method : TCAI  
Sample : KKGT II (A)  
Data File : TCAI1002.RD  
UNK - Inj 1  
Vial No. : 3  
Channel : 1  
Vol : 30 ul

Channel 1

