



Laboratorium van de Apotheek van het Academisch Ziekenhuis, Groningen.

P. Bouma, B. Greijdanus, H. Bloemhof en D.R.A. Uges.

TRICYCLISCHE ANTIDEPRESSIVA DISCUSSIE.

Naar aanleiding van het artikel van Rob Kaletzky en R. Langen in Extract (1)

INLEIDING.

Met interesse hebben we kennis genomen van de discussie over de antidepressiva bepaling. In het AZG staat sinds 1976 de bepaling van antidepressiva in serum m.b.v. de HPLC in de belangstelling. In 1979 werd de bepaling gepubliceerd in het Pharmaceutische Weekblad (2). Sinds die tijd is de ontwikkeling verder gegaan en zijn we gekomen tot een beter voorschrift. (Zie methode C). De diverse methoden worden hier besproken.

METHODE A.

Maria Ziekenhuis Tilburg. Reversed Phase, Methanol-Hexaan extractie met indampen van de organische fase. Zie vorige uitgave EXTRACT (1).

METHODE B.

AZG Groningen. Straight phase, extractie m.b.v. dichloormethaan en indampen van de organische fase (2). Eén ml serum wordt gemengd met 0,1 ml 4 M NaOH en 100 ul interne standaard (promazine). Extractie met 5 ml dichloormethaan. Daarna indampen en extract opnemen in 50 ul eluens en 30 ul injecteren in de HPLC. Verder identiek aan methode C.

METHODE C.

AZG Groningen. Straight phase, Heptaan-amyalkohol drievoudige vloeistofvloeistof extractie zonder indampen van de organische fase. Eén ml serum wordt gemengd met buffer pH 9,6 en interne standaard (promazine). Extractie met heptaan-isoamyalkohol. De organische fase reëxtraheren met 0,1 M zoutzuur. De waterfase extraheren met 200 ul heptaan-amyalkohol. 60 ul organische fase injecteren in de HPLC. De chromatografie is gelijk aan methode B. Het eluens is dichloormethaan-methanol-buffer pH 3,2 (90-10-0,3). De absorptie bij 254 nm.

Medio '93 wordt deze methode gepubliceerd door B. Greijdanus en medewerkers.

METHODE D.

Stichting Centrale Ziekenhuisapotheek te Den Bosch. STIP (3), Reversed phase, extractie m.b.v. dichloormethaan of dichloormethaan/acetonitril en indampen van de organische fase.

Om de discussie op gang te brengen zouden we deze vier methoden, hoewel beperkt, willen bespreken aan de hand van een aantal items.

1. KEUZE STRAIGHT PHASE OF REVERSED PHASE.

De straight phase (Methode B,C) keuze heeft als voordeel dat de resolutie en asymmetriefactor van de antidepressiva beter is ondanks het feit dat het schotelgetal niet veel beter is dan bij reversed phase chromatografie. Goede resolutie (zie figuur 1 en 2) is een klinische vereiste, daar psychiatrische patiënten meestal een groot aantal geneesmiddelen, met elk zijn eigen metabolieten, toegediend krijgen. (zie figuur 2). Tailende pieken geven vaak problemen omdat hogere concentraties naast lagere voorkomen. De reversed phase chromatografie (Methode A en D) heeft als voordeel de lage UV cut off van het eluens waardoor meten met de diodearray in het lage UV gebied mogelijk is.

2. KOLOMMEN:

Diverse silicagel kolommen (Methode B,C) in het AZG zijn gebruikt: Eigen gemaakte kolommen gepakt met Partisil 5 u van Chrompack, gekochte glazen kolommen gepakt met Lichrosorb 5 u van Merck, Nucleosil 3 u van Chrompack en heden Microspher 3 u, 100 mm lengte en 4,6 mm ID. van Chrompack. Problemen met kolommen hebben zich weinig voorgedaan. Een vereiste is dat het schotelgetal ruim boven de 10.000 moet zijn. De kwaliteit van de kolom moet goed bewaakt worden. In het AZG wordt de kolom eens in de drie maanden vervangen (2000 injecties).

2. ALKALISCHE EXTRACTIE:

Alkalische extractie met een extreme hoge pH (Methode B en D) is niet wenselijk. Endotherme componenten extraheren dan sneller mee. De emulsievorming wordt bevorderd en doet de extractieopbrengst dalen. Volgens de formule van Henderson-

Hasselbach $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$ is de ideale pH die welke 2 á 3 eenheden boven de pKa waarde van de drug ligt. De pKa's van de antidepressiva liggen om trent 9 á 10.. Dit betekent dat een pH van 11-12 á 12-13 voor extractie het beste zal voldoen. Methode A benadert deze pH het beste (pH van 1 molair natriumcarbonaat is 11.7).

3. EXTRACTIEMIDDEL.

Dichloormethaan (Methode B) heeft als voordeel het lage kookpunt. Methanol-Hexaan (Methode A) evenals dichloormethaan-acetonitril (Methode D) vereisen een langere indampingstijd en hogere temperatuur. Gebleken is dat de te bepalen geneesmiddelen ontlede. Hoewel de Antidepressiva op zich redelijk stabiel blijken te zijn, hebben we ook te maken met de comediatie van de labielere neuroleptica (zwavelverbindingen worden sneller geoxideerd of verbroken). Het chromatogram oogt dan smerig alsof de extractie smerig is maar de oorzaak is het indampen. Dichloormethaan (Methode B) en dichloormethaan-acetonitril geven aanzienlijk minder schone extracten dan de drievoudige vloeistof-vloeistofextractie (Methode C). Het verschil is opvallend, zo zelfs dat iedere piek in het chromatogram van methode C, op de oplosmiddelpiek na, een stof voorstelt. We denken dat de extractie van Methode A door de aanwezige methanol niet schoon genoeg is. Dichloormethaan is een gechlorideerde verbinding en als zodanig milieu onvriendelijk. Door gebruik te maken van een Koude Val (4), temperatuur van -90 C., kan aan dit bezwaar gedeeltelijk tegemoet gekomen worden.

4. DETECTIEGRENZEN VAN DE BEPALING:

Detectiegrenzen gedefinieerd als 2 of 3 maal de ruis kunnen theoretisch laag zijn echter door interactie met verontreinigingen, ontlede- of geoxideerde stoffen of comediaties kan de ondergrens van de bepaling behoorlijk te hoog komen te liggen. Daarom is het belang van een zuiver extract onmiskenbaar groot. Methode C geeft door zijn drie maal vloeistof-vloeistof extractie zonder indampen een zeer schoon extract. Methode B en D zullen dan klinisch niet meer relevant zijn en mogelijk methode A ook.

5. MONSTERHOEVEELHEID.

De monsterhoeveelheid van 2 ml serum (methode A) is groot. Vaak is er niet meer dan 1 a 2 ml serum beschikbaar. Methode C kan goed uitgevoerd worden met minder serum dan 1 ml. Vooral de ontwikkeling van nieuwe gevoelige detectoren hebben de detectiegrenzen sterk verlaagd (ca. 1 ug/l). Bovenstaande kan alleen opgaan indien de extractiemethode zuiver genoeg is.

6. EXTRACTIEOPBRENGSTEN EN VARIATIECOEFFICIENTEN:

De extractieopbrengsten variëren niet veel per methode. De nieuwe STIP extractie (methode D) is beter geworden dan de oude extractie. Opmerkelijk is dat ondanks de te lage pH voor de extractie van methode C de opbrengsten nog redelijk bruikbaar blijken te zijn. Bij methode A en C liggen de variatiecoëfficiënten in dezelfde orde.

CONCLUSIES:

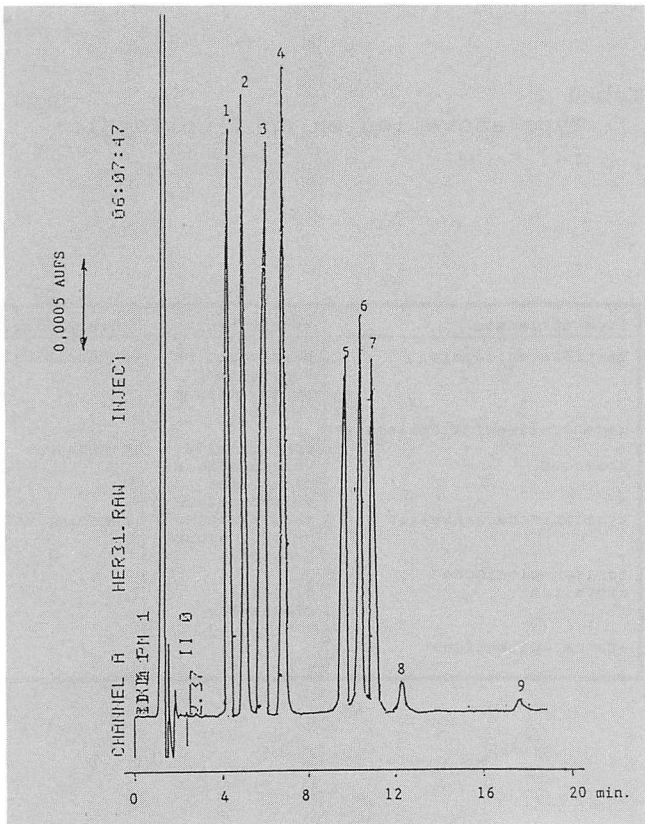
Het lab apotheek AZG geeft de voorkeur aan methode C. Hierbij beseffend dat de monstervoorbewerking meer tijd kost dan de andere methoden. Het invriezen van de fasen in een koelbad van -90 C heeft de procedure vergemakkelijkt. Bovendien is dit extract (laatste extractiestap is gewijzigd) goed bruikbaar voor de GLC (CP-Sil 5CB en CP-Sil 19 CB) uitgevoerd met een dubbele capillaire kolom. Als de HPLC methode niet bruikbaar blijkt te zijn door interactie met andere geneesmiddelen of metabolieten kunnen we overstappen naar GLC capillair met een groter scheidend vermogen door de hoge schotelgetallen van ruim boven 100.000 ipv. ca 10.000. Detectiegrenzen liggen in dezelfde orde van grootte. (NP FID detector). Opsporing van onbekende stoffen kan mbv een massa selectieve detector. Het Stip systeem (methode D) wordt in eerste instantie gebruikt voor de kwalitatieve en evt. semi-kwantitatieve bepaling.

De ondergrens van de bepaling (ca. 100 ug/l) is te hoog voor therapeutische spiegels mede doordat de diodearray detector niet gevoelig genoeg is. De niet reproduceerbaarheid van de AD bepalingen zijn bij methode C geminimaliseerd wat zich uit in de dag tot dag variatie. De Antidepressiva bepaling in het AZG is een bepaling waar de analisten niet depressief van worden.

LITERATUUR:

1. Rob Kaletzky en R. Langen
Tricyclische antidepressiva voor een depressieve analist.
Bepaling van tricyclische antidepressiva zoals deze voorkomen in de KKGt testsera.
Extract., 1992; 3: bld. 15-19.

Figuur 1.
HPLC. chromatogram van serumextract van KKGt testsera van antidepressiva I en II (gemengd) van 1992. Per liter serum:
1 = 100,9 ug Clomipramine
2 = 99,38 ug amitriptyline
3 = 97,78 ug imipramine
4 = interne standaard
5 = 105,4 ug Desm. Clomipramine
6 = 99.60 ug nortriptyline
7 = 99.38 ug desipramine
8 = 100,2 ug maprotilline
9 = 99.76 ug desm. mapro.



2. Uges D.R.A. en P. Bouma.
Determination of tricyclisch antidepressants and some of their metabolites in serum by straight phase HPLC.
Pharm. Weekblad Sci., Ed., 1979 1: 45-52.

3. Roger Snoeren.
Afstudeerverslag: Systematische Toxicologische Analyse m.b.v. HPLC. en Diode Array Detectie. Uitgevoerd in de Centrale Ziekenhuisapotheek te Den Bosch.

4. P. Bouma.
Milieu vriendelijk indampen van oplosmiddelen.
Extract., 1990; 2: bld. 12-13.

Figuur 2.
HPLC chromatogram van een serumextract van een patiënt. De aanvraag was clomipramine. Promethazine en metabolieten werden ook gevonden. Per liter serum:

- 1 = promethazine
- 2 = 90 ug clomipramine
- 3 = onbekend.
- 4 = desmethylpromethazine
- 5 = interne standaard
- 6 = 56 ug desm. clomi.
- 7 = desm. prom.-S-oxide
- 8 = promethazine-S-oxide

