



Temperatuur als extra scheidingsparameter bij HPLC-SP

Straight Phase HPLC en Diode Array Detectie

Richard van Rossen
Henk Trumpie
Apotheek Haagse Ziekenhuizen

Op het laboratorium van de Apotheek Haagse Ziekenhuizen (AHZ) wordt al sinds jaar en dag gebruik gemaakt van een Straight Phase HPLC systeem voor de bepaling van psychofarmaca. Het betreft hier een gemodificeerde methode "Uges" uit 1979. Vervanging van de 5 μ Silica kolom door een 3 μ Silica kolom, enige jaren geleden, leverde een systeem op dat chromatografisch gezien superieur is aan de meeste RP-systemen.

Na ingebruikname van een diode array detector bleek dit systeem nog veel meer mogelijkheden te hebben dan tot dan toe was aangenomen. Door de STIP-bibliotheek los te laten op allerlei extra pieken, die bij patiënten in het chromatogram aanwezig waren, bleek dat met dit systeem b.v. ook de cardiaca (flecainide!), de betablokkers en stoffen als sulpiride uitstekend te bepalen waren. Hetzelfde geldt voor drugs als morfine, codeïne, cocaïne, benzoylcegonine en de XTC-achtigen (MDMA, MDEA en MDA), zodat met deze chromatografie op relatief eenvoudige wijze positieve AxSYM uitslagen bevestigd kunnen worden.

Omdat dit systeem op ons laboratorium altijd gebruiksgereed staat is het ook uitermate geschikt om te gebruiken in de toxicologie, met name bij toxenen waarbij we er met STIP niet uitkomen. Over het algemeen kan gesteld worden dat veel stoffen die op het STIP-systeem teweinig retentie hebben, met dit SP-systeem wel voldoende retentie hebben (zie figuur 1).

Op dit moment bevat de bibliotheek

zo'n 125 stoffen, waaronder uiteraard de meeste psychofarmaca, cardiaca en drugs of abuse. Naast de klassieke psychofarmaca zijn ook meer recente psychofarmaca als mirtazepine, olanzapine en venlafaxine goed te bepalen. Het merendeel van de stoffen in de bibliotheek zijn stoffen die we toevallig aantreffen als co-medicatie bij patiëntmonsters. De bibliotheek is nog nooit gericht uitgebreid. De verwachting is dat er nog wel meer stoffen goed te bepalen zijn met dit systeem.

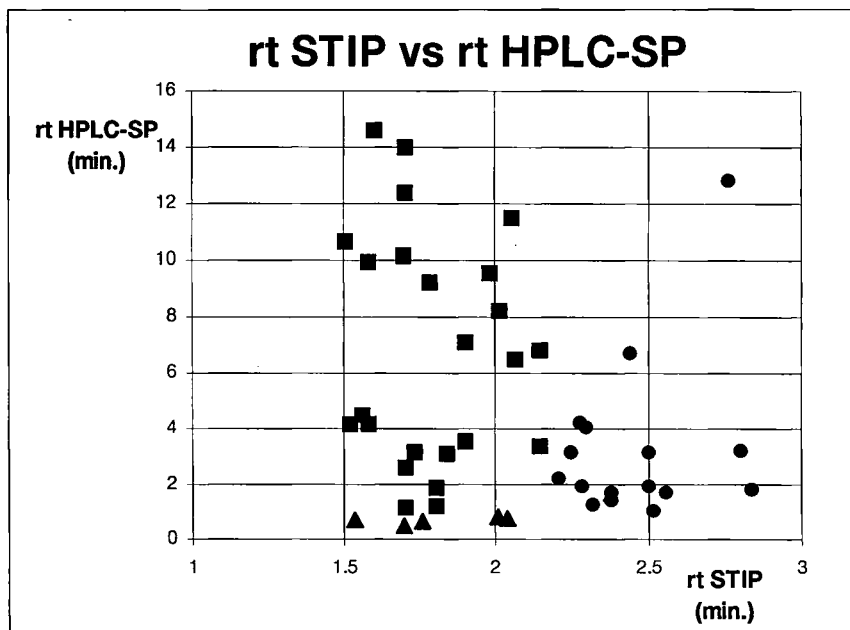
Nadeel van een SP-methode in combinatie met diode array detectie is natuurlijk dat de spectra pas vanaf 230 nm opgenomen kunnen worden in verband met de UV cut-off van dichloormethaan. Bij sommige stoffen (b.v. amfetamine) treedt er daardoor een behoorlijk gevoeligheidsverlies op. In de praktijk blijkt echter dat voor de meeste componenten het gebied van 230 tot 400 nm vol-

doende gevoeligheid en spectrale informatie bevat.

Ten tijde van de verbouwing van ons laboratorium ontdekten wij een kwetsbaar punt van dit SP-systeem. Op onze tijdelijke locatie bleken de temperatuurschommelingen nogal extreem te zijn. De laagste temperatuur die werd gemeten was 10°C en de hoogste 34°C. Op één dag werden soms temperatuurverschillen gemeten van 10°C. Het bleek dat ons SP-systeem nogal gevoelig was voor deze temperatuurschommelingen. Bepaalde scheidingen die bij 20°C nooit een probleem waren, bleken bij 15°C of 30°C ineens onmogelijk te realiseren. Ook kwam het voor dat stoffen gewoon van plaats wisselden.

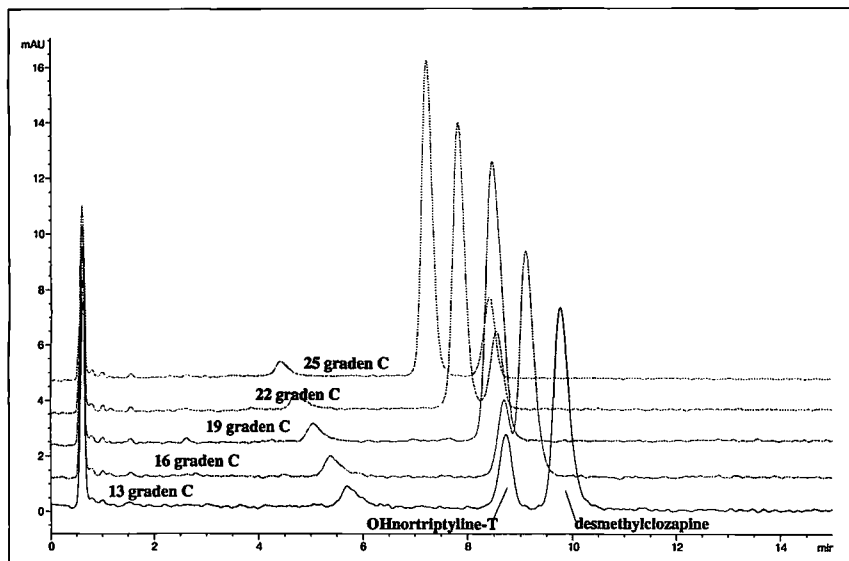
Een goed voorbeeld is de scheiding tussen desmethylclozapine en transhydroxy-nortriptyline (zie figuur 2 op de volgende pagina). Bij 25°C zit hydroxy-nortriptyline achter desmethylclozapine, bij 19°C vallen

Figuur 1



Vierkanten: Bij STIP in het front, met HPLC-SP voldoende retentie
Driehoeken: Bij beide systemen in het front
Cirkels: Bij beide systemen voldoende retentie

Figuur 2



Desmethylclozapine en hydroxynortriptyline wisselen van plaats o.i.v. de temperatuur.

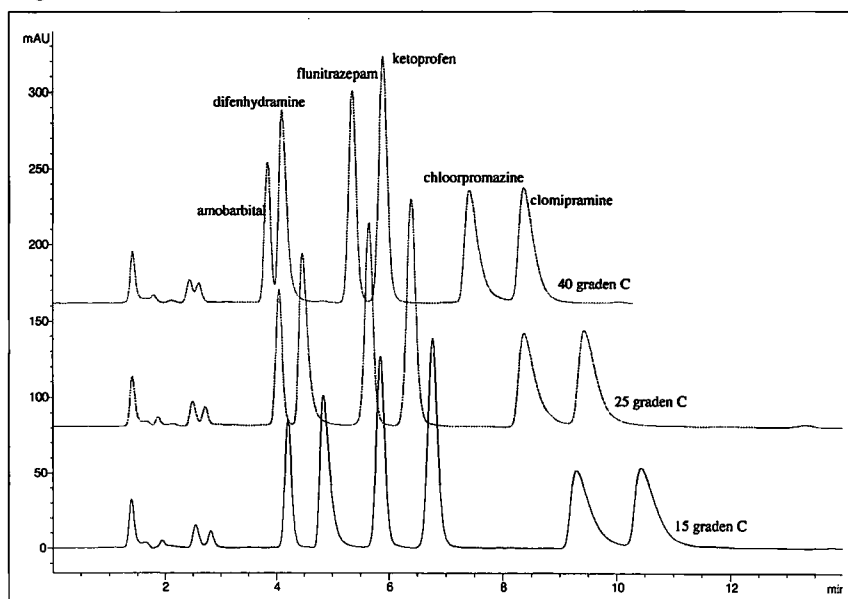
ze exact samen en bij 13°C zit hydroxy-nortriptyline voor desmethylclozapine. Opvallend is dat hydroxynortriptyline bijna niet reageert op temperatuurverschillen en dat desmethylclozapine bij hogere temperaturen steeds minder retentie heeft. Hetzelfde beeld zien we bij de scheiding tussen propranolol (temperatuurongevoelig) en promazine (Temperatuur omhoog, Rt omlaag) en zo zijn er nog diverse andere voorbeelden te noemen.

Tot aan onze noodgedwongen verhuizing hadden wij het nut van een kolomthermostaat nooit ingezien, maar nu bleken we eigenlijk niet zonder te kunnen. Door gebruik te maken van een kolomthermostaat is het kwetsbare punt van dit sys-

teem geen nadeel, maar juist een voordeel gebleken. De temperatuur is een extra scheidingsparameter die vaak uitstekend van pas komt. Bij onverwachte extra pieken (storingen of co-medicatie) kan door de temperatuur te variëren op eenvoudige wijze toch nog voldoende scheiding bewerkstelligd worden.

Ook bij Reversed Phase chromatografie speelt de temperatuur een rol, alleen niet zo extreem als bij Straight Phase. Toch is b.v. bij het STIP-systeem de invloed van de temperatuur duidelijk waarneembaar (zie figuur 3). Daarom is onze STIP-opstelling sinds kort ook uitgerust met een kolomthermostaat.

Figuur 3



Invloed van de temperatuur op de STIP testmix.