



## Temperatuur als extra scheidingsparameter bij HPLC-RP

Richard van Rossen  
Henk Trumpie  
Apotheek Haagse Ziekenhuizen  
E-mail : r.vanrossen@ahz.nl

### Inleiding

In *Extract*;2000;11(2);20-21 hebben wij de invloed van de kolomtemperatuur bij straight phase chromatografie beschreven. Bij bepaalde analyses bleek de temperatuur een uitstekende extra scheidingsparameter te zijn. In hetzelfde artikel concludeerden wij dat bij reversed phase vloeistof chromatografie (HPLC-RP) de temperatuur ook een rol speelt, alleen niet zo extreem als bij straight phase. Dit laatste moeten we echter corrigeren, want de afgelopen 2 jaar is gebleken dat diverse stoffen bij HPLC-RP behoorlijk extreem reageren op

temperatuursveranderingen. We willen dit laten zien aan de hand van 2 voorbeelden.

### Midazolam

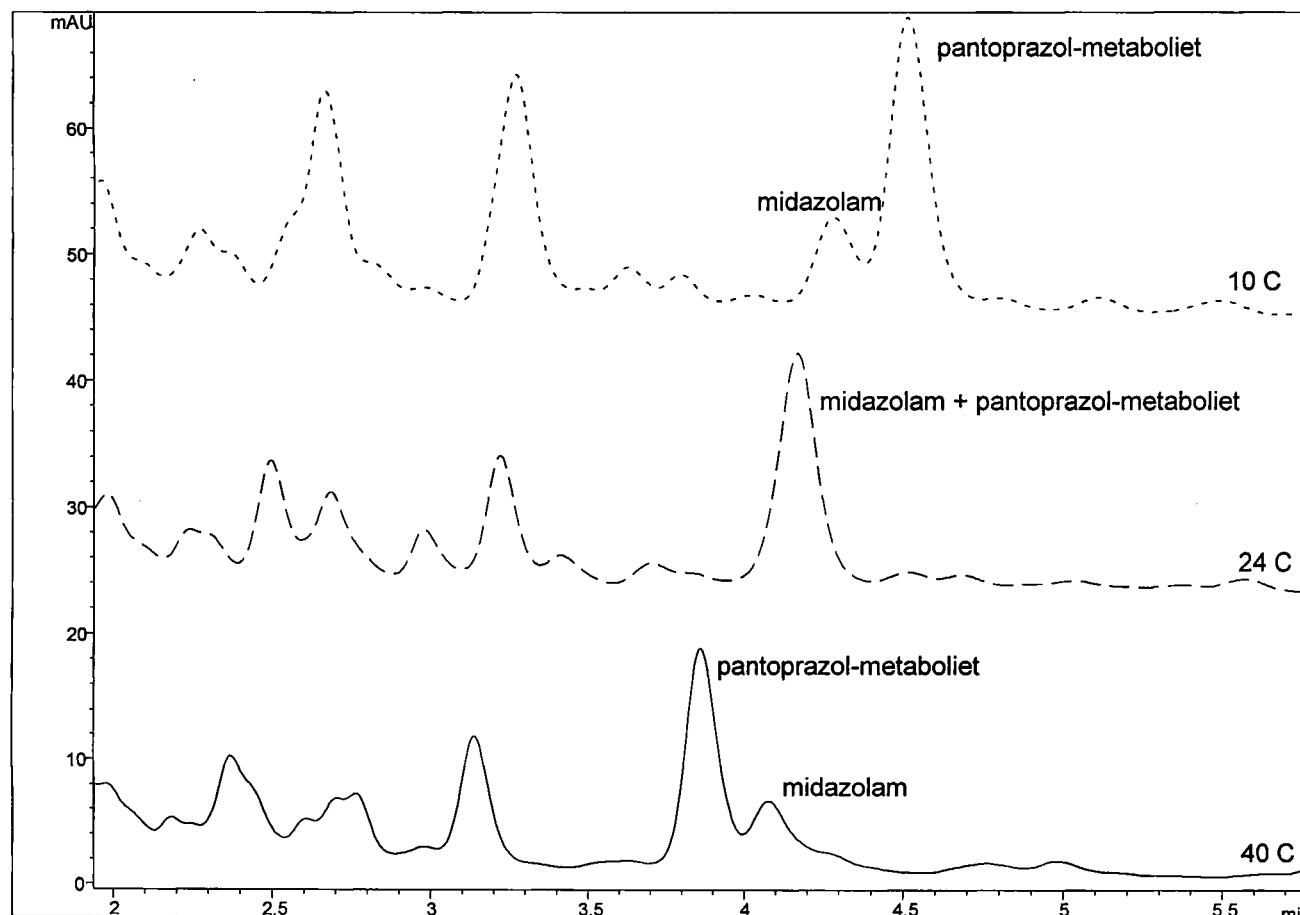
Het eerste voorbeeld behelst de bepaling van midazolam in serum m.b.v. de STIP-chromatografie. Deze bepaling wordt vooral uitgevoerd bij IC-patiënten die gesedeerd worden met midazolam. Jarenlang ging dit zonder problemen, totdat de betrokken IC's ineens overgingen van omeprazol (Losec®) op pantoprazol (pantozol®) als protonpompremmer. Van omeprazol en zijn metabolieten hadden wij nooit last, maar een metaboliet van pantoprazol bleek bij kamertemperatuur precies samen te vallen met midazolam. Door de kolomtemperatuur te variëren

bleek al snel dat midazolam zich niet zo veel aantrekt van de temperatuur, maar op de retentie van de metaboliet van pantoprazol had de temperatuur zeer veel invloed (zie figuur 1).

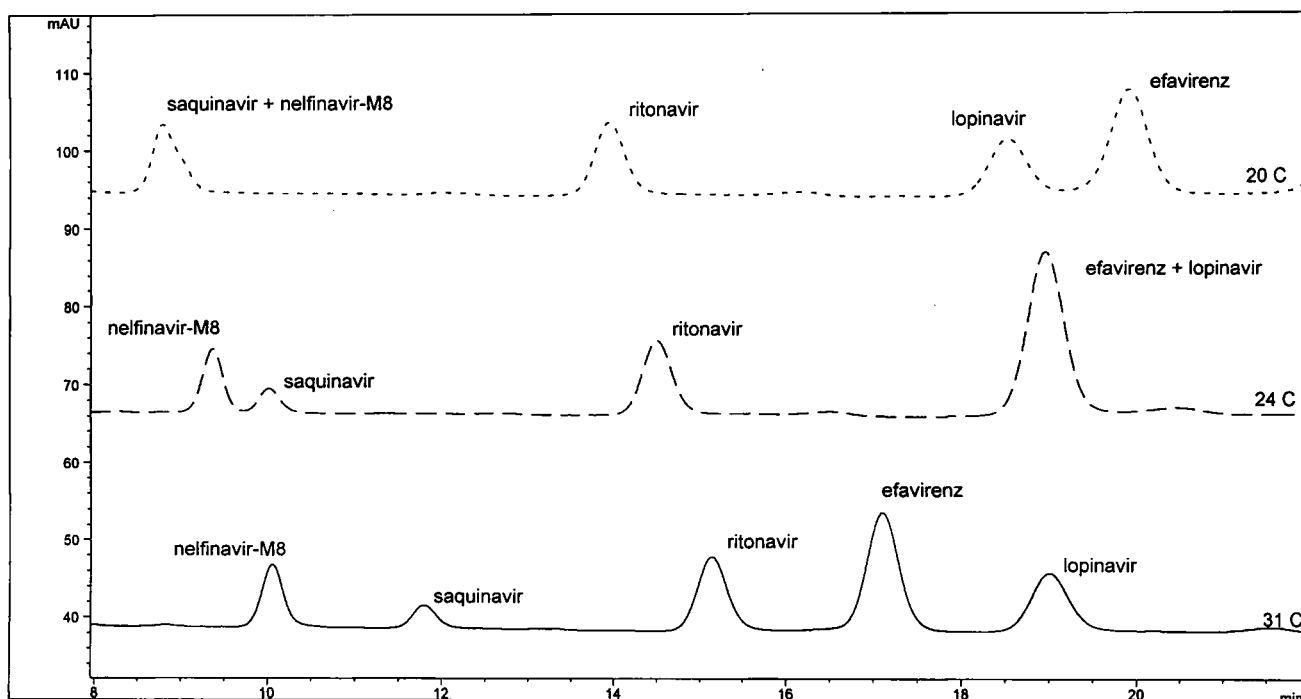
### De anti-HIV middelen.

Begin 2001 zijn wij gestart met het opzetten van een analyse voor anti-HIV middelen in plasma. Het uitgangspunt was om 8 middelen (amprenavir, efavirenz, indinavir, lopinavir, nelfinavir, nevirapine, ritonavir en saquinavir) in één run te kunnen bepalen met een isocratisch HPLC-RP systeem. Na enig experimenteren bleek dit inderdaad mogelijk te zijn. Tijdens de ontwikkeling van deze methode was al gebleken hoe gevoelig sommige anti-HIV middelen zijn voor de kolomtemperatuur, maar in de

Figuur 1: Invloed van de kolomtemperatuur op de scheiding van midazolam en een metaboliet van pantoprazol.



Figuur 2: Invloed van de kolomtemperatuur op de scheiding van diverse anti-HIV middelen.



praktijk konden we gewoon bij 20°C werken. Totdat de KKG de anti-HIV middelen in haar pakket opnam en tevens een metabooliet van nelfinavir in haar testen stopte. Deze metabooliet valt op ons HPLC-systeem bij 20°C exact samen met saquinavir. Omdat in de praktijk nelfinavir nooit in combinatie met saquinavir wordt gegeven, was dit voor ons nooit een probleem. Door de temperatuur te verhogen naar 24°C lukte het om deze 2 componenten weer basislijn gescheiden te krijgen. Echter bij 24°C

vallen lopinavir en efavirenz weer samen. Door de temperatuur verder te verhogen naar 31°C wisselen efavirenz en lopinavir van plek en zijn weer basislijngescheiden (zie figuur 2).

**Conclusie**

Uit beide voorbeelden blijkt dat ook bij HPLC-RP de kolomtemperatuur een uitstekende extra scheidingsparameter kan zijn. Een groot voordeel hiervan is het feit dat de temperatuur reversibel is.

Bij onverwachte co-medicatie en/of storing hoeft er niet aan het eluens gesleuteld te worden, maar kan worden volstaan met een aanpassing van de kolomtemperatuur. De volgende keer kan er weer gewoon onder de oorspronkelijke omstandigheden gewerkt worden. Daarom zijn alle HPLC-opstellingen op ons lab inmiddels uitgerust met een kolomthermostaat en is de kolomtemperatuur een vast onderdeel van de optimalisering/validatie van een methode geworden.