



STIP II

Christ Pijnenburg,
Ziekenhuisapotheek Noordoost
Brabant, Den Bosch.
Tel: 073-6405920

Inleiding

Enige jaren wordt al geroepen: "wanneer komt STIP met verbeteringen en aanpassingen, het is een oud systeem kan het niet wat moderner?"

Graag wil ik daarom in dit artikel het een en andere aan jullie voorleggen. Natuurlijk is op het laboratorium in Den Bosch nagedacht en gewerkt aan verbeteringen want al snel wisten wij ook zeker dankzij jullie collegiale medewerking wat er verkeerd was aan het systeem.

Veel stoffen vooraan in het chromatogram, slechte extractieopbrengst, onvolledige informatie, geen updates en ga zo maar door.

Even een wedervraag: Hoe is het bij andere systemen? Zijn er eigenlijk wel andere systemen?

Wetende hoe moeilijk het is om aanpassingen en veranderingen verantwoord en begrijpelijk door te voeren zijn we daar dan ook altijd heel zuinig mee geweest. Het systeem is vaak beoordeeld en bekritiseerd, wat in onze ogen niet altijd even terecht is geweest. Als gebruikers zelf aanpassingen doorvoeren of de gestandaardiseerde werkwijze niet toepassen en er gaat iets mis, dan kan en mag dat niet bij het systeem worden neergelegd.

Terug in de tijd met voorbeelden:

- Bepaalde zure stoffen worden met STIP niet gevonden waarbij later blijkt dat er geen zure extractie is uitgevoerd;
- Spectra uit de bibliotheek kloppen niet omdat een verkeerde kwaliteit (goedkopere) acetonitril is gebruikt;
- Vermoed werd dat het testmengsel sterk ontleedt en niet alle pieken zichtbaar zijn, waarna later blijkt dat een verkeerde monitor golflengte van 254 nm is gebruikt;
- De chromatografie klopt niet wat

eigenlijk ook niet kan want er is een Waters C18 kolom gebruikt, deze is niet gelijk aan een Merck C18;

- Spectrum klopt niet. Oplossing: kan de wet van Lambert Beer soms de verklaring zijn?

Over enkele jaren, als ik met de vut ga, dan schrijf ik nog eens een artikel in Extract met naam en toenaam als afsluiting van mijn loopbaan.

Toch moest er iets gebeuren. Het was alleen wachten op het moment dat er tijd, zin en de noodzaak was. Overwegingen om STIP II te ontwikkelen zijn de volgende. Steeds vaker komt het voor dat geneesmiddelen lager worden gedetecteerd en voor de bepalingen lagere detectie grenzen vereist zijn. Om aan deze eisen te voldoen is het noodzakelijk modificaties aan te brengen door bv. betere extracties en/of kolommen met een kleinere diameter. Ook de beschikbaarheid van MS in de HPLC maakt het mogelijk lagere detectie grenzen te bereiken. Al deze mogelijke modificaties op het bestaande STIP systeem brengt de overweging met zich mee het vaak besproken en gevraagde STIP II te gaan ontwikkelen.

Aangezien het opbouwen en ontwikkelen van STIP II veel tijd en energie kost moeten alle mogelijke aanpassingen en verbeteringen goed overwogen en besproken worden en het systeem een duidelijke meerwaarde geven. Als basis wordt ook in STIP II nog steeds uitgegaan van DAD als primaire detector. Wel wordt rekening gehouden met eventueel MS en fluorescentie als extra (wel wat dure) optie.

Kolom

Diverse kolommen zijn de afgelopen jaren bekeken en in het STIP systeem geplaatst, vaak met de te verwachten teleurstellende resultaten. Is het streven van diverse fabrikanten naar

een silanolvrije kolom datgene waar de STIP gebruiker op zit te wachten? Het verlies van de silanol groepen zou de basische componenten nog verder naar voren schuiven in de chromatografie en dat is het laatste wat gewenst is.

De platinum, zorbax en tal van andere kolommen zijn in het systeem getest en goed bevonden want slechte kolommen bestaan niet meer.

Alleen, hoe gebruik je ze? Menig fabrikant heeft het sprookje van de silanolvrije kolom in Den Bosch verteld maar menig keer is aangetoond dat deze kolom dan toch meer of minder silanol bevat en dus de chromatografie beïnvloed.

Een STIP systeem opbouwen is op iedere kolom mogelijk maar gezien de jarenlange ervaring met de Lichrospher RP18-e kolom (350 geteste kolommen) gaat de voorkeur uit naar deze kolom.

Wel is gekeken en getest met een mogelijke aanpassing van de interne diameter van 4 mm naar 3 mm. Daarmee wordt al een gevoeligheid gewonnen van ruim 50%. Ook het verlaten van de cartridge en terug naar de conventionele kolom is een overweging waard. Terug naar de conventionele kolom die goed afgesloten bewaard kan worden zodat de STIP factor niet verandert. Ondertussen weten we dat het op voorraad houden van een STIP kolom problemen met zich meebrengt. Verdamping van het in de kolom aanwezige eluens door het maanden laten liggen van de kolom verandert de STIP factor. Mogelijke verklaring hiervoor is dat de aanwezige silanol groepen zich hergroeperen tot andere vormen al dan niet zonder afsplitsing van water. De silanol activiteit van een kolom wordt begrijpelijkerwijs minder. Het volledige uitschakelen van het silanol effect door middel van een overmaat fosforzuur is mogelijk, maar het gevolg hiervan is dat de basische stoffen naar voren in het chromatogram schuiven.

De ervaring met het Lichrospher materiaal van afgelopen jaren leert ons dat het mogelijk is om de variatie van de STIP factor te minimaliseren of er zelfs een constante van te maken. Hiervoor zou wel de medewerking van de leverancier nodig zijn omdat "verse" kolommen geleverd moeten worden en er een strengere selectie zou moeten plaatsvinden. Indien een kolom zonder silanol activiteit ontwikkeld zou worden dan is deze perfect te gebruiken in een gradiënt systeem. Voor STIP is een gradiënt echter geen optie. Een fabrikant die in staat is een kolom te vervaardigen waarin de silanol activiteit/hoeveelheid constant is (charge tot charge) zou daarentegen van harte welkom zijn.

Voorstel voor STIP II: Lichrospher RP18-e 125 mm x 3 mm, aangepaste flow 0,35 mL/min. Om chromatogrammen te behouden die te vergelijken zijn met de huidige STIP is aanpassing van de stroomsnelheid

noodzakelijk. De respons van de pieken wordt hoger doordat de diffusie van de component in de kolom door de smallere diameter en lagere flow minder is.

Eluens

Met betrekking tot het eluens is ook het een en andere getest. In eerste instantie werd gedacht dat het weglaten van triethylamine (TEA) gecompenseerd kon worden door aanpassing van de hoeveelheid fosforzuur. Bij testen bleek dat de pieksymmetrie slechter werd bij het weglaten van TEA.

Het aanpassen van de acetonitril : buffer verhouding zou het systeem sneller of langzamer maken maar dat was niet direct noodzakelijk.

Wel gewenst was dat de spreiding van de stoffen over de 20 minuten durende run beter zou worden. Dit is mogelijk gebleken door de hoeveelheid fosforzuur te verlagen, de gebruikte STIP factor kan worden gehalveerd. De zure en neutrale stof-

fen blijven op hun plaats gelijk aan de huidige bibliotheek. De basische stoffen daarentegen krijgen een langere retentie wat een grotere spreiding oplevert over de 20 minuten. Dit gaat echter wel ten kosten van de pieksymmetrie. Bij het voorstel zie je dat difenhydramine na ketoprofen in het chromatogram schuift. Chloorpromazine en clomipramine schuiven ca. 4 minuten naar achteren. Met betrekking tot de rest van de bibliotheek geeft een runtijd verlenging tot 25 minuten geen probleem.

Voorstel voor STIP II:

530 mL water + 250 µL fosforzuur (vergelijk met 500 µL voor een STIP I kolom) pH: 3,3 met KOH 10% + 470 mL acetonitril.

STIP-factor

Op dit moment zijn er in Den Bosch ruim 350 STIP I kolommen getest en gearchiveerd.

Uit deze gegevens en de ervaringen met het testen van de kolommen is

gebleken dat het misschien wel mogelijk is de STIP factor te verlaten. Dit is alleen mogelijk indien de firma Merck daaraan meewerkt. Hiervoor is het misschien nodig het cartridge systeem te verlaten en vaste stalen kolommen te gaan gebruiken aangezien deze beter af te sluiten zijn. Naar onze mening is het uitdrogen van de kolommen verantwoordelijk voor de niet constante STIP-factor.

Voorstel voor STIP II: Verlaten cartridge systeem en STIP-factor.

Extractie

Bij een eerdere aanpassing van de extractie is al duidelijk geworden dat het onteiwitten van het monster een invloedrijke stap is voor de extractie opbrengst. Het verder doorvoeren van dit gegeven d.m.v van een extra toevoeging van meer acetonitril en het verwijderen van de neergeslagen eiwitlaag voor de verdere opwerking levert een hogere en beter reproduceerbare opbrengst op. Dit moet nog wel verder worden uitgezocht, misschien kan zelfs een algehele extractieopbrengst van ca. 90% bereikt worden. Het standaard extraheren van een kleinere hoeveelheid monster voor de zure extractie kan overwogen worden. Het restant hiervan kan voor het basische extract gebruikt worden (meer opbrengst). Een solid phase extractie (SPE) op een RP 18 cartridge is sinds 2002 in beeld. Het gebruik van het STIP chromatografie gedrag van stoffen op een STIP kolom kan hiervoor gebruikt worden. De eerste testen maakten ons razend enthousiast.

Voorstel voor STIP II: 2 mL serum + 5 mL acetonitril, mengen, centrifugeren van bovenstaande vloeistof (acetonitril+water) 6 mL voor basisch extract en 1 mL voor zuur extract enz.

Detectie

Voor de detectie wordt een DAD gebruikt met de mogelijkheid om UV spectra in asci formaat op te slaan. Hierdoor is het mogelijk dat MDD kan blijven bestaan al dan niet in een nieuw jasje. Elders in dit blad worden de functionaliteiten van "STIP Search Int." besproken. Uitwisselbaarheid van UV-spectra moet blijven bestaan. Er komt een bibliotheek voor UV spectra en MS spectra waarvan waarschijnlijk de MS spectra bij de desbetreffende firma zullen blijven (discussie). De MS bibliotheek wordt dan een mogelijke optie.

Voorstel voor STIP II: Het al dan niet opzetten van een nieuw STIP II hangt af van het al dan niet kunnen toepassen van het huidige STIP in een LC-MS systeem.

Uitwisselbaarheid van UV spectra middels MDD moet gegarandeerd blijven ook met STIP II.

Uitwisselbaarheid van MS bibliotheken

Het overschakelen naar STIP II moet voor iedere STIP I gebruiker normaal gesproken mogelijk zijn. Dat hiervoor een nieuwe STIP II bibliotheek moet worden aangekocht is niet te voorkomen. Dit is een keuze die ieder voor zich kan maken. De MS

spectra blijven misschien bij de firma. Wat de uitwisselbaarheid van een MS bibliotheek is weet nog niemand precies.

Voorstel voor STIP II: Er moet gestreefd worden naar een STIP II dat voor iedereen bereikbaar en bruikbaar is. STIP I blijft beschikbaar maar zal niet meer geactualiseerd worden.

Tenslotte

In de afgelopen jaren is er met bovenstaande al uitgebreid geëxperimenteerd bij de ZANOB.

De 3 mm kolom en STIP II chromatografie wordt al toegepast voor de scheiding van psychofarmaca-3 van de KKGt.

De MS toepassing wordt al uitgetest samen met het MS zoekprogramma dat in de "STIP Search Int" versie 2004 ingebouwd is.

U heeft kunnen lezen dat de analisten van de ZANOB niet stil zitten, maar toch ook blijven genieten van STIP classic. Er wordt over de opvolging goed nagedacht en natuurlijk het een en ander uitgetest.

Zoals jullie uit eigen ervaring weten moet dit allemaal naast het gewone werk, FWG, fusies en verbouwingen van de afgelopen jaren.

Bij de ZANOB zijn de analisten slim en enthousiast maar het blijven ook maar gewone mensen met een huis houden en hobby's.

Zij vinden het werk net als u wel leuk maar het kost zoveel vrije tijd ...