



## STIP chromatografie verklaard en op weg naar de STIP-2 chromatografie...

Christ Pijnenburg  
Laboratorium Ziekenhuisapotheek  
Noordoost-Brabant,  
's-Hertogenbosch  
C.Pijnenburg@zanob.nl

### Inleiding

Op ons laboratorium hebben we inmiddels ervaring opgedaan met het testen van ruim 375 Lichrospher RP-18e STIP kolommen. Ook losten we vele malen problemen van gebruikers op. Door deze ervaring weten wij hoe stoffen zich gedragen op dit materiaal en waarom. Vaak is door ons getracht het gedrag van 'onze stoffen' op het STIP-kolom-materiaal aan collegae uit te leggen. Tijd om dit verhaal eens goed op papier te zetten.

### STIP factor

Lichrospher bestaat uit een  $C_{18}$ -groep op een silicabasis. Van dit kolom materiaal is bekend dat naast de actieve  $C_{18}$ -groep er ook actieve silanolgroepen aanwezig zijn. Deze silanolgroepen zijn de oorzaak van het bestaan van de STIP-factor. De STIP factor is in het leven geroepen omdat de silanolactiviteit per kolom, en vooral per charge kolommen, kan verschillen. Wel weten we inmiddels dat deze factor per kolom nagenoeg constant blijft.

Intussen weten we ook dat als een kolom droog (niet goed afgesloten) als reserve in de kast wordt gelegd deze factor wel verandert door de uitdroging van het kolom materiaal. De verschillende silanolgroepen gaan dan samen, er splitst water af; er verdwijnen silanolgroepen of er ontstaan andere vormen en de STIP-factor daalt.

### Retentie mechanisme

Vaak doet men de suggestie: waarom pakken we geen silanolvrije kolommen. Maar het zou juist zonde zijn

geen gebruik te maken van de retentiemechanismen van silanolen! Door deze  $C_{18}$ -kolom met actieve silanol groepen zijn we in staat op één kolom twee chromatografische mechanismen toe te passen.

Bij de ongeladen stoffen wordt de  $C_{18}$  (polaire) interactie gebruikt (scheiding op polariteit). De geprotoneerde stikstoffen (onze basische stoffen, waaronder veel psychofarmaca) worden op de actieve silanol groepen vertraagd door ionexchange.

In het zure STIP eluens (pH=4) worden de alifatische stikstoffen geprotoneerd, gaan uitwisseling aan met de zwak zure silanol-groepen en krijgen op die manier retentie. Door nu meer fosforzuur (= zoals het moet bij een hogere STIP-factor) toe te voegen wordt de retentietijd van deze alifatische stikstoffen korter. Let op: aanvankelijk dachten wij dat deze hoeveelheid fosforzuur de retentietijd beïnvloedt maar dat is vermoedelijk niet zo. Doordat meer fosforzuur wordt gebruikt is er meer KOH 10% nodig om de juiste pH (ca 3,3) te bereiken, waardoor ook meer kalium ( $K^+$ ) in het eluens aanwezig is.  $K^+$  gaat de competitie aan met de geprotoneerde stikstoffen ten opzichte van de actieve silanol-groepen. In het kort: hoe meer  $K^+$  hoe sneller 'onze stoffen' van de kolom afkomen.

Bij de ongeladen stoffen wordt de retentie uitsluitend bepaald door de  $C_{18}$ -groepen op de kolom. Deze retentie is vooral te beïnvloeden door de verhouding acetonitril/water.

### Silanol vrij?

The smart one's onder ons zullen vragen: 'Waarom gaan we dan niet in een basisch milieu werken of een kolom zonder silanol gebruiken?'. Dat kan, echter: de ongeladen stik-

stoffen krijgen een relatief lange retentietijd in een basisch eluens – er van uitgaande dat alles enigszins gescheiden van de kolom af moet komen. Als we een silanolvrije kolom gebruiken met een zuur eluens dan vliegen omgekeerd de geprotoneerde stikstoffen van de kolom af.

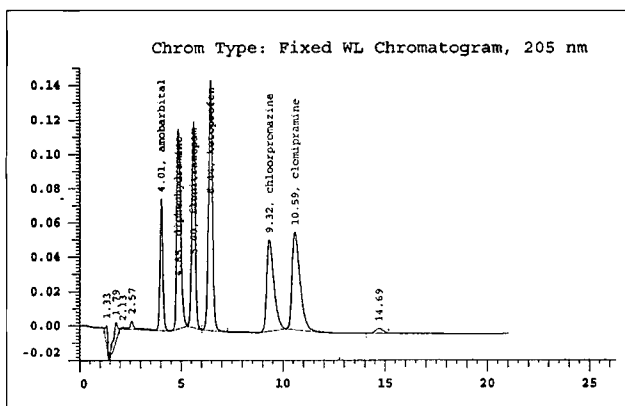
Voor diegene die het bovenstaande begrijpt, zal duidelijk zijn dat voor STIP-2 vooral gebruik wordt gemaakt van de eigenschappen van de silanol-groepen. De zure en neutrale stoffen behouden exact dezelfde retentietijden als bij STIP. De basische componenten krijgen een retentietijd die circa 1,5x zo lang is als in het traditionele STIP bestand. Als u bovenstaand verhaal goed begrepen heeft kunt u zelf bedenken welke aanpassing er plaats vindt om van STIP naar STIP-2 te gaan. Het STIP bibliotheekbestand wordt met de toepassing van STIP-2 chromatografie uitgesmeerd over de 20 minuten die een run duurt.

### Van de traditionele ouderwetse STIP naar 'hypermoderne' STIP-2

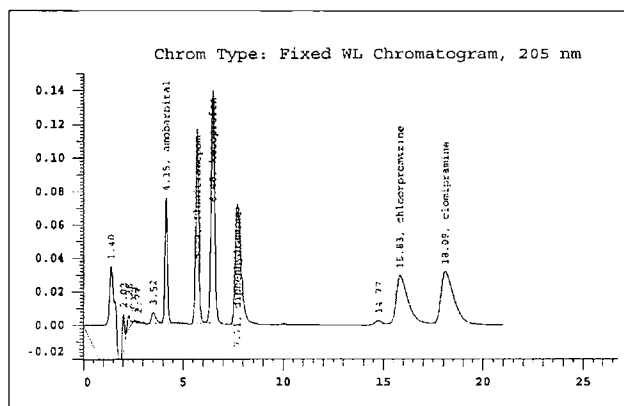
In het voorafgaande verhaal is de STIP chromatografie uitgelegd en de STIP-2 kort aangestipt. Allereerst moet wel vermeld worden dat er nog geen officiële praktisch toepasbare STIP-2 bestaat. De theoretische, experimentele STIP-2 is inmiddels wel in gebruik bij het Laboratorium van Ziekenhuisapotheek Noordoost-Brabant te 's-Hertogenbosch.

### Waaruit bestaat STIP-2?

Om te beginnen wordt gebruik gemaakt van een 3 mm Lichrospher RP-18 kolom met een flow van 0,34 mL/min. Daarnaast wordt er in plaats van een 20  $\mu$ L loop een



Figuur 1: STIP testmengsel, chromatografie volgens STIP



Figuur 2: STIP testmengsel, chromatografie volgens STIP-2

50 µL loop gebruikt. Deze twee aanpassingen geven al een gevoeligheidswinst van bijna een factor 3. Deze aanpassingen zijn zo vanzelfsprekend dat ze niet worden toegelicht. Deze aanpassingen geven alleen gevoeligheidswinst; maar waar zit nu de echte winst van de STIP-2 chromatografie vernieuwing? Een ruim 10 jaar gehoorde klacht is dat het grootste deel van het STIP-bestand in de eerste 10 minuten zit van het chromatogram. Op basis van onze kennis en ervaring is de volgende aanpassing gemaakt. De STIP factor is dusdanig verlaagd dat de basische (alifatische stikstoffen) stoffen met een factor 1,5x naar achteren gaan. Deze aanpassing heeft geen invloed op de zure en neutrale stoffen. Het bibliotheekbestand wordt nu uitgesmeerd over de volle 20 minuten van een run, waarbij alleen de basische stoffen naar achteren schuiven. Opgemerkt moet worden dat de basische pieken er begrijpelijkerwijs niet mooier op worden. Het verschil is goed te zien in de chromatogrammen van resp. STIP (figuur 1) en STIP-2 (figuur 2).

Als er een STIP kolom wordt geleverd met de STIP-factor van 1,0 dan geldt voor STIP-2 de factor 0,3.

Verder blijft alles gelijk aan de traditionele STIP-eluens bereiding.

### Conclusie

Met de verandering van kolom, de verandering van loop en de

wijziging van het eluens is er een STIP-2 chromatografie ontstaan die een factor 3 gevoeliger is en een beter scheidend vermogen heeft. Dat wil nog niet zeggen dat er een echt STIP-2 systeem is want het bibliotheekbestand moet opnieuw gemaakt worden.

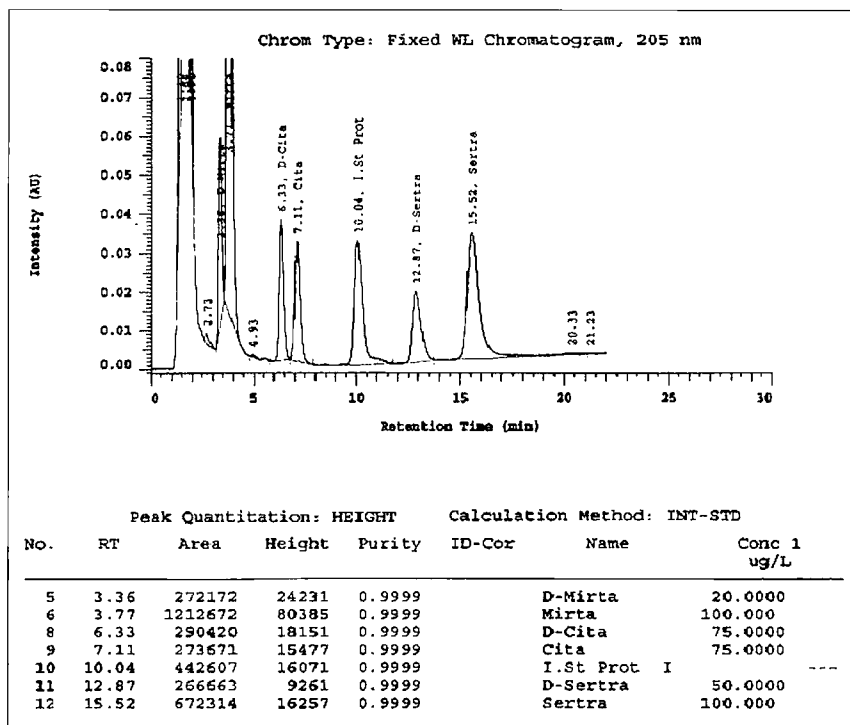
Of dat gebeurt is o.a. afhankelijk van de noodzaak tot het aanbrengen van verbeteringen en van behoefte bij collegae aan een STIP-2-systeem.

Van vermeldenswaardig belang zijn de verdere ontwikkelingen in de monstervoorbewerking. Wij werken

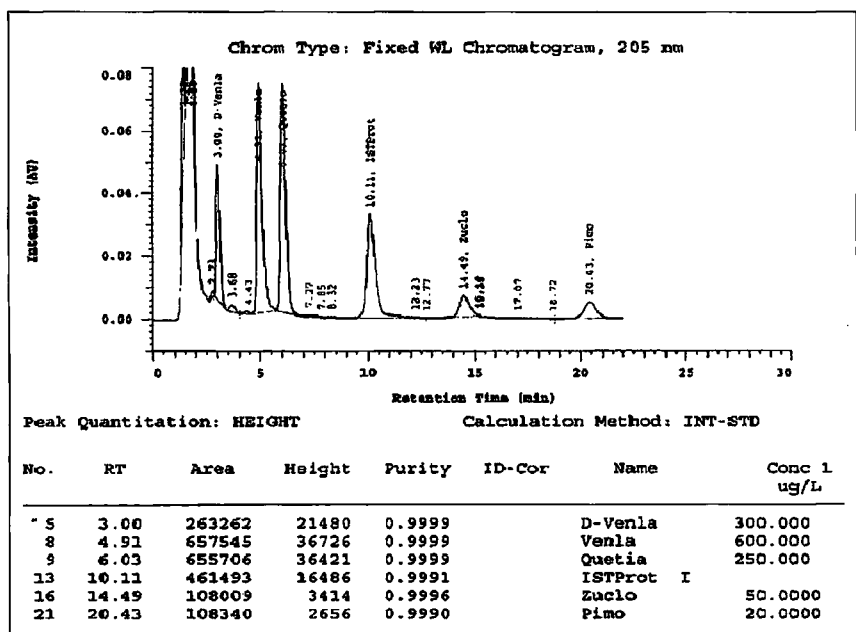
aan een gestandaardiseerde extractie met SPE in STIP-stijl, waarover we in een volgend Extract met resultaten zullen komen, zie de figuren 3 tot en met 5 voor wat standaard serum extracties met recoveries tussen de 90-100%. Ook dat komt de gevoeligheid ten goede.

In een vorig nummer van Extract werd een methodiek geschetst waarmee storende invloeden van benzodiazepines ongedaan gemaakt kunnen worden.

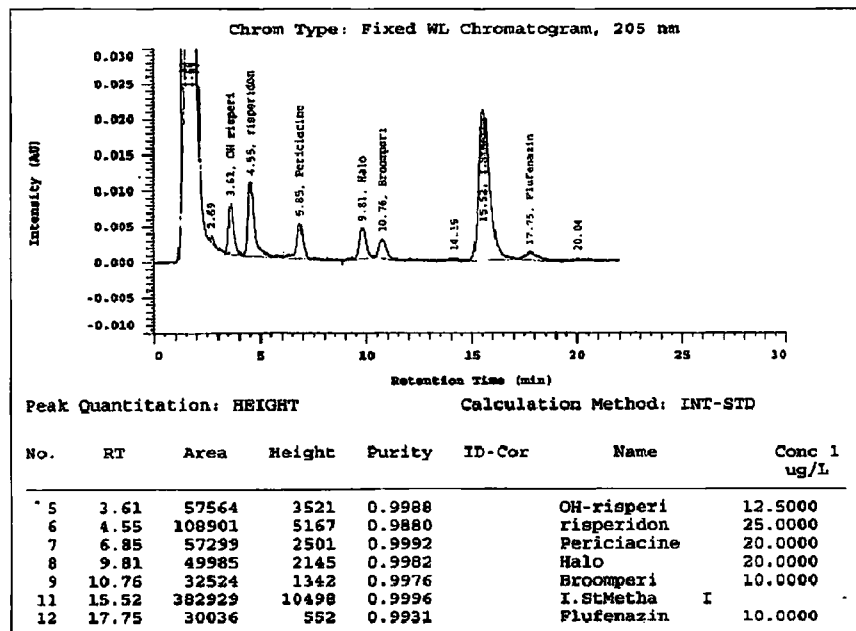
Al met al ontstaat zo langzaam een methodiek die een betere scheiding geeft, een grotere gevoeligheid en



Figuur 3: Voorbeeld chromatogram.



Figuur 4: Voorbeeld chromatogram.



Figuur 5: Voorbeeld chromatogram.

minder interferenties heeft dan het traditionele STIP-systeem. Suggesties, aanvullingen etc. etc. met betrekking tot een nieuw STIP-systeem blijven intussen van harte welkom.

### Epiloog

STIP-2 leeft en werkt al enige jaren in Den Bosch maar ook op het lab van de ZANOB verandert veel, dus wat de toekomst brengt?

STIP-2 past precies in de toekomstige toepassing van LC/MS vanwege de voor een MS belangrijke lage ionenconcentratie en lage flow van 0,34 ml/min. Dit is ook al uitgetest maar daar heel veel later iets meer over misschien.

De STIP-2 chromatografie is niet alleen bedoeld voor Toxicologie maar ook geschikt voor TDM, zie de figuren 3 tot en met 5.

Bijkomend voordeel is dat veel van de vaak storende benzodiazepines in de STIP-2 chromatografie voor de laag gedoseerde basische geneesmiddelen komen.

Voor vragen en/of opmerkingen  
C.Pijnenburg@zanob.nl