

Van STIP chromatografie naar SPE extractie is een kleine stap.....

Als het verhaal in het vorige extract begrepen is dan klinkt de titel van dit hoofdstuk niet zo vreemd.

Uitgelegd is dat de zure/neutrale stoffen resp. de basische stoffen zich op verschillend manieren binden in een C18 kolom.

Wordt er nu een SPEd kolom met lichrospher C18 materiaal genomen waar zich dus naast de C18 ook actieve silanol groepen bevinden dan kan deze met de STIP chromatografie worden benaderd.

Het serum met diverse stoffen wordt door het toevoegen van de buffer pH:3 in zuur milieu gebracht.

Dit zure milieu heeft geen invloed op de zure en neutrale stoffen maar protoneren wel de alifatische stikstoffen van de basische stoffen.

Brengen we dit mengsel op de SPEd-C18 dan worden de zure/ neutrale stoffen aan de C18 en de geprotoneerde stikstoffen aan de actieve zwak zure silanolgroepen(kation exchange) gebonden.

Door met water te spoelen worden de zouten en verdere in water oplosbare verontreinigingen verwijderd.

De belangrijkste factor voor het hele SPEd verhaal is dat de doorloop snelheid van het aangezuurde serum niet te hoog is. ca. 1-2 ml/min.Deze snelheid is vooral van essentieel belang voor het kation exchange effect.

Er is nu een kolom waar de stoffen "schoon" aan de C18 of silanol zijn gebonden.

Door te spoelen met acetonitril worden de zure/neutrale stoffen die aan de C18 gebonden zijn van de kolom gespoeld(A1 fractie).

Omdat er totaal geen tegen-ionen in de acetonitril aanwezig zijn zullen de nog steeds geprotoneerde basische stoffen op de kolom aan de silanol blijven hangen, ook als er heel veel acetonitril wordt gebruikt.

Er zijn 2 manieren om de geprotoneerde basische stoffen van de kolom te spoelen.

Spoelen met een oplossing waarin een hoge tegenion bv kalium concentratie aanwezig is of de protonering opheffen.

Dit opheffen is mogelijk door de acetonitril basisch(ca. pH:11) te maken met bv ammonia 25%. Spoelen met 3 ml 2% ammonia in acetonitril levert dan de basische A2 fractie op.

Omdat alles op de SPEd kolom gebracht wordt en alles van de SPE kolom wordt afgespoeld in de resp A1 of A2 fractie zijn recoveries nagenoeg 100%. Afwijkingen hierop kunnen de stoffen zijn die in het STIP bestand een Rt hebben gelijk Ro, meer hierover in het DOA verhaal.

Kolommen kunnen in theorie dan ook meerder malen gebruikt worden, echter slibben ze wel dicht door vaste serum bestanddelen.

Voor de SPEd wordt lichrospher C18 materiaal gebruikt wat niet geendcapped is.

Niet geendcapped omdat de silanol juist belangrijk is voor bovenbeschreven SPEd methode, en actief aanwezig moet zijn.

Door de ervaring met het testen van STIP kolommen is bekend dat silanol groepen geactiveerd moeten worden, deze moeten als waren open gaan staan.

Het is dan ook raadzaam de SPEd kolom vooraf te spoelen met 1 ml A2 voor het verwijderen van storende fabricage bestanddelen en vervolgens de silanol te activeren met 1 ml buffer pH:3.

Als dit spoelen voor het opwerken van de monsters plaatsvindt is dat voldoende voor de silanol groepen om actief te worden.

Bij het opwerken van urine monsters is het verhaal enigzins anders omdat urine dusdanig veel stoffen bevat die zich ook aan de silanol binden. De "tegenion" concentratie kan in urine heel erg hoog en onderling verschillen.

Totale optimale activering is heel belangrijk, meer hierover in het DOA verhaal in een latere uitgave van Extract..

Concluderend kan gesteld worden dat STIP chromatografie toegepast kan worden op een SPEd kolom zoals de titel van dit hoofdstuk al aangaf.

Voordelen tov de oude STIP extractie is dat er met 1 ml gextraheerd kan worden en dat de vaak storende benzodiazepines en coffeine zich nu in de A1 fractie bevinden. (Als je weet waarom dan heb je het verhaal begrepen!)

Bij extreem hoge benzodiazepine concentraties kan 1-2 % toch in de A2 fractie aanwezig zijn, hoe dat kan mogen jullie zelf bedenken.

Dat wat minder als 100% recovery wordt gevonden is te wijten aan de hoeveelheid monster wat in de buizen of pipetten achterblijft, slordigheid van de analist.

Dit is op te lossen door direct op de kolommen te pipetteren met de kraan afgesloten. Eerst de buffer dan het serum zodat goede protonering plaats kan vinden.

Bij de ZanoB worden de Psy 1-2-3 testen van de KKGt op deze manier opgewerkt met goede resultaten.

Verder zijn er een drietal mengsels gemaakt waar bij SPEd wordt toegepast.

Komende extracten zullen wat concept voorschriften beschreven worden het eerste wordt hieronder beschreven.

De andere mengsel zijn Spe-2 : *D-Venlafaxine*, **Pipamperon**, *Venlafaxine*, *Quetiapine*, *Zuclopentixol*, *Pimozide* en Spe-3 *OH-Risperidon*, *Risperidon*, *Pericacine*, *Haloperidol*, *Broomperidol*, *Flufenazine*

Voor de toepassing voor de toxicologie ziet het er veelbelovend uit, diversen toxenen zijn bij de ZANO B naast de oude traditionele manier ook met SPEd opgewerkt, meer later hierover.

Het klinkt allemaal eenvoudig maar het grootste probleem is de omschakeling van de analist van de ouderwetse Liquid Liquid extractie naar hypermoderne SPEd.

Er zijn nog een aantal kleine praktische tips nodig om een goed resultaat te krijgen.

Wat we ons wel moeten realiseren is dat SPEd de mogelijkheid biedt tot zeer laag meten waarbij alle kleine verontreinigingen grote storingen geven in het chromatogram.

ps: aangezien er nogal wat tijd voorbij gaat tussen het inleveren van artikel en het plaatsen van het artikel is het raadzaam indien u geïnteresseerd bent contact op te nemen.

Bepaling: D-Mirtazepine, Mirtazepine, D-Citalopram, Citalopram, D-Sertraline, Sertraline.

Monster: Minimaal 1 ml serum

Interpretatie:

Therapeutische concentratie: Zie STIPsearch

Eluens bereiding:

Zie bereidingsprotocol loopvloeistof STIP-2

Recoveries:

Zie bijlage

Validatie/Controle:

Zie controle programma

Berekening:

Interne standaard methode integreren op hoogte

Apparatuur/instelling:

Systeem: Systeem 5, STIP-2 systeem (**LET OP 3 mm kolom!!!**)

Flow: 0,34 ml/min

Golfengte: 205 nm

Methode: 5.Solidphase

Werkwijze:

1,00 ml standaard/monster+ 1 ml interne standaard .

Zie bijlage SPEd extractie.

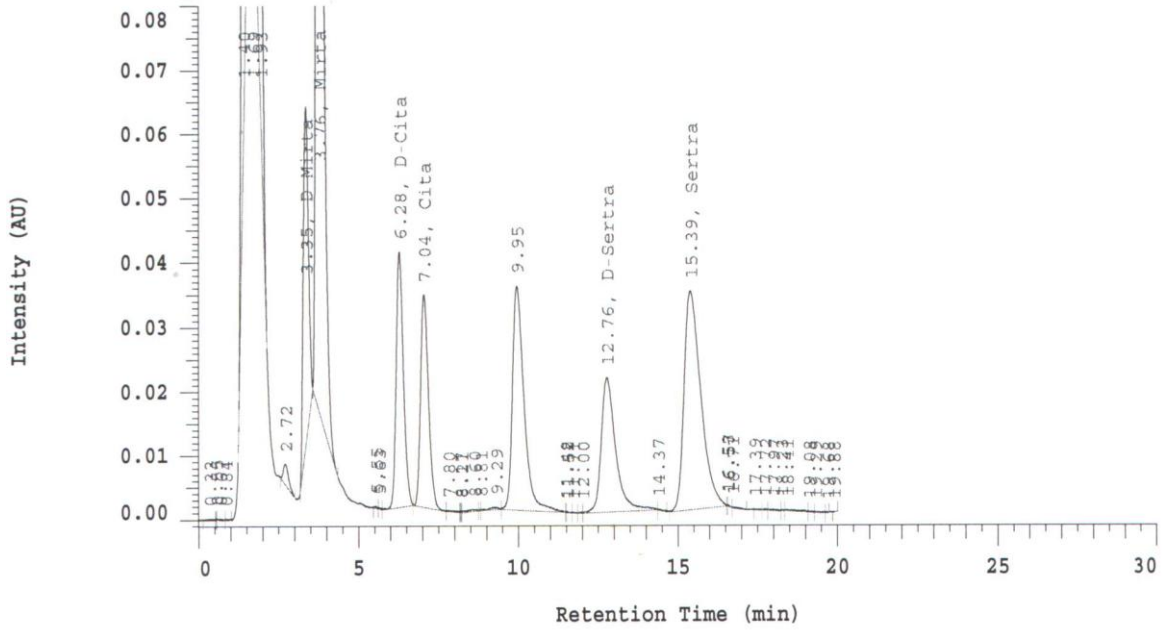
Droogdampen

Residu oplossen in 100 µl eluens(let op dat in eluens geen storing zit, controleren)

Injecteer 2x25 µl

Opmerkingen:

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 205 nm



Peak Quantitation: HEIGHT Calculation Method: EXT-STD

| No. | RT | Area | Height | Purity | ID-Cor | Name | Conc 1 ug/L |
|-----|-------|---------|--------|--------|--------|----------|-------------|
| 9 | 3.35 | 290833 | 26510 | 1.0000 | | D-Mirta | 91.5378 |
| 10 | 3.76 | 1267272 | 85178 | 0.9999 | | Mirta | 100.910 |
| 13 | 6.28 | 313581 | 19902 | 0.9999 | | D-Cita | 94.7648 |
| 14 | 7.04 | 286881 | 16570 | 0.9999 | | Cita | 93.6714 |
| 26 | 12.76 | 331254 | 10540 | 1.0000 | | D-Sertra | 97.1654 |
| 28 | 15.39 | 625975 | 17059 | 1.0000 | | Sertra | 98.8684 |

figuur1 : Revoveries

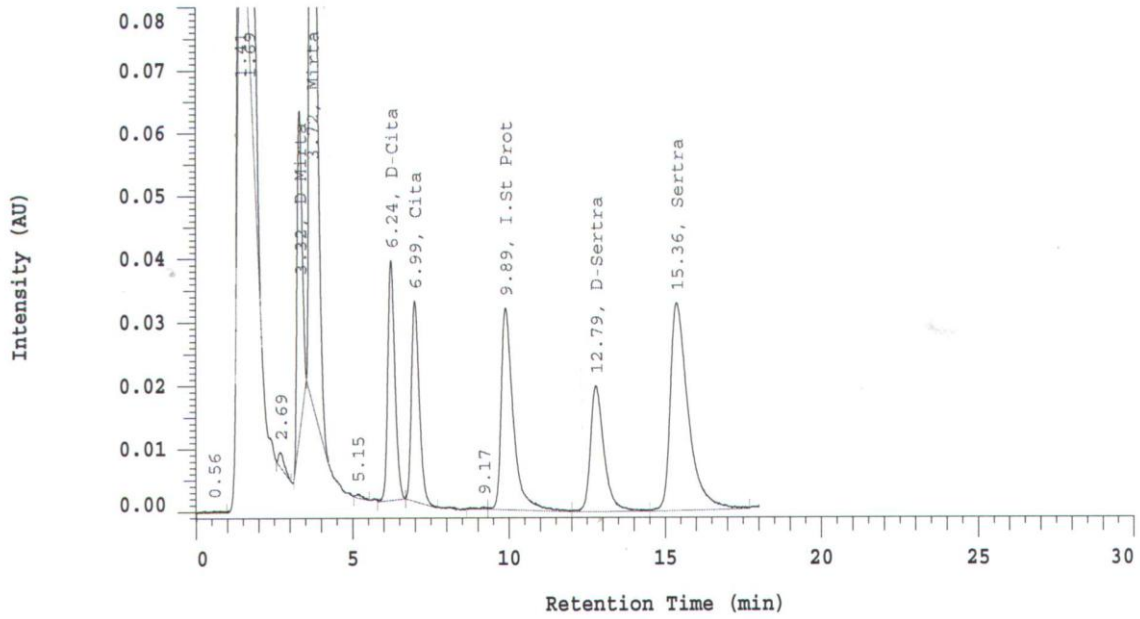
**ziekenhuisapotheek
Noordoost-Brabant**

08-10-2004

| BEPALING | EIS | GEM | % | UC% | Ntot | Nuit | <10% | 10-15% | 15-20% | >20% |
|--|-------|-------|--------|---------|------|------|------|--------|--------|------|
| SPE.CZA startdatum: 29-09-2004 einddatum: 08-10-2004 | | | | | | | | | | |
| D-Mirta | 10.00 | 9.61 | 96.11 | 4.89 | 9 | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 |
| Mirta | 50.00 | 50.89 | 101.78 | 2.07 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| D-Cita | 50.00 | 50.22 | 100.44 | 3.70 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Cita | 50.00 | 50.56 | 101.11 | 3.14 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| I.St | 15000 | 16478 | 109.86 | 4.65 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| F4 = gegevens afdrukken | | | 104.89 | 4.58 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Esc = opheffen | | | 0.0000 | 51.0000 | 3.92 | 9 | 0 | 9 | 0 | 0 |

figuur 2: Spe-1 controle 9x opgewerkt, van I.St. zijn de height counts ingevoerd.

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 205 nm

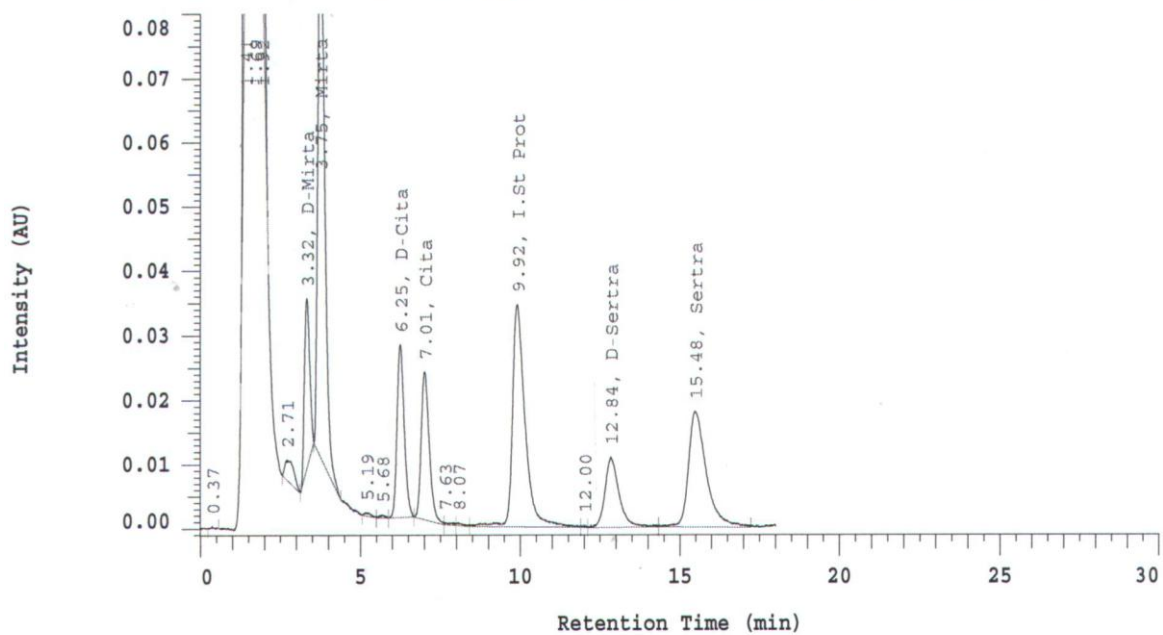


Peak Quantitation: HEIGHT Calculation Method: INT-STD

| No. | RT | Area | Height | Purity | ID-Cor | Name | Conc 1 ug/L |
|-----|-------|---------|--------|--------|--------|-----------|-------------|
| 5 | 3.32 | 284116 | 25528 | 0.9999 | | D-Mirta | 20.0000 |
| 6 | 3.72 | 1204870 | 81372 | 0.9999 | | Mirta | 100.000 |
| 8 | 6.24 | 301153 | 18974 | 0.9999 | | D-Cita | 75.0000 |
| 9 | 6.99 | 277350 | 15873 | 0.9999 | | Cita | 75.0000 |
| 11 | 9.89 | 432040 | 15938 | 0.9999 | | I.St Prot | I - |
| 12 | 12.79 | 306405 | 10005 | 1.0000 | | D-Sertra | 50.0000 |
| 13 | 15.36 | 662941 | 16429 | 1.0000 | | Sertra | 100.000 |

figuur 3: Spe-1 Standaard serum

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 205 nm



| Peak Quantitation: HEIGHT | | | | | Calculation Method: INT-STD | | |
|---------------------------|-------|--------|--------|--------|-----------------------------|-------------|----------------|
| No. | RT | Area | Height | Purity | ID-Cor | Name | Conc 1 ug/L |
| 6 | 3.32 | 149567 | 13315 | 0.9999 | 0.9996 | D-Mirta | 9.64538 |
| 7 | 3.75 | 644021 | 44108 | 0.9999 | 1.0000 | Mirta | 50.1169 |
| 10 | 6.25 | 211327 | 13457 | 0.9999 | 0.9999 | D-Cita | 49.1790 |
| 11 | 7.01 | 202227 | 11508 | 0.9999 | 1.0000 | Cita | 50.2723 |
| 14 | 9.92 | 476866 | 17238 | 0.9997 | 1.0000 | I.St Prot I | |
| 16 | 12.84 | 169391 | 5518 | 0.9998 | 0.9997 | D-Sertra | 25.4984 |
| 17 | 15.48 | 355821 | 9038 | 0.9998 | 0.9999 | Sertra | 50.8607 |

figuur 4: Spe-1 Controle opgewerkt.

SPEd extractie:

SPEd chromatografie: STIP-2, 3 mm kolom , 0,34 flow, systeem 5
STIP-1 is ook toepasbaar.

A1: pure acetonitril

A2: 2 ml NH3 25% ad 100 ml acetonitril

Buffer pH:3 Ijk-buffer pH:3 die gebruikt wordt voor pH meter.

Deze citraat buffer bevat heel weinig kalium en natrium en is toch in staat de ph van serum naar ca 4 te brengen. PH van 2 of lager kan niet gebruikt worden omdat bij deze lage pH de kolom aangetast wordt en sommige benzo's geprotoneerd worden en zich op dezelfde manier gedraagt als de basische stoffen.

Neem nieuwe kolommen en spoel deze voordat de monsters worden opgewerkt met: Vacuum gebruiken van ca 10 mm hg!!!!

- 1 ml A2 en 1 ml buffer ph:3. (de ph=3, activeert de kolom, draai de kraan dicht als hoeveelheid er bijna door is en laat met randje vloeistof min. 5 minuten staan).

-Werk monster volgens voorschrift op, spoel door kolom,

-Spoel met 3 ml water

Zet kolom op schone opvang buis!

-Spoel met 3 ml A1.(hier komen zure en neutrale stoffen in)

Zet kolom op schone opvang buis!

-Spoel met 3 ml A2.(hier komen de basische stoffen in)

Damp droog en los op in 100 ul eluens en injecteer 2x25 ul

Voor meer info: C.Pijnenburg@zanob.nl