

Afdeling Diergeneesmiddelen 1986-01-16

RAPPORT 86.23 Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Onderzoek naar de toepassings-
mogelijkheden van HPLC-kolom-
schakelingstechnieken bij de
analyse van diergeneesmiddelen
aan de hand van de literatuur.

Verzendlijst: directeur, directeur VKA, sektorhoofd, afdeling OCON,
bibliotheek (1x), projectleider, projektbeheer,
circulatie.

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Onderwerp: Onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van HPLC-kolomschakelingstechnieken bij de analyse van diergeneesmiddelen aan de hand van de literatuur.

Doel:

Nagaan wat de toepassingen zijn van HPLC kolomschakelingen in relatie tot bruikbaarheid voor het onderzoek naar diergeneesmiddelen.

Samenvatting:

Kolomschakeling met veelal 2 kranen en 2 pompen wordt het meest toegepast als techniek om de monstervoorbewerking van analyses te vereenvoudigen. Het grote voordeel is dat dit systeem te automatiseren is. Andere toepassingen waarbij van meer kolommen en kranen wordt uitgegaan worden tot nu toe spaarzaam beschreven.

Conclusie:

Kolomschakelingstechnieken kunnen voor het onderzoek op diergeneesmiddelen worden toegepast bij:

1. Automatisering analyses van lichaamsvloeistoffen t.b.v. farmacokinetisch onderzoek.
2. Pré-concentratie en "heart-cutting" ten behoeve van on-line bevestiging met UV-Vis Diode Array detectie en FAST-LC.
3. Groepscheidingen van componenten op basis van polariteit door koppeling kolommen en/of HPLC-systemen.

Verantwoordelijk : drs M.M.L. Aerts

Medewerker/Samensteller: H.J. Keukens

Projectleider : drs M.M.L. Aerts

Inleiding

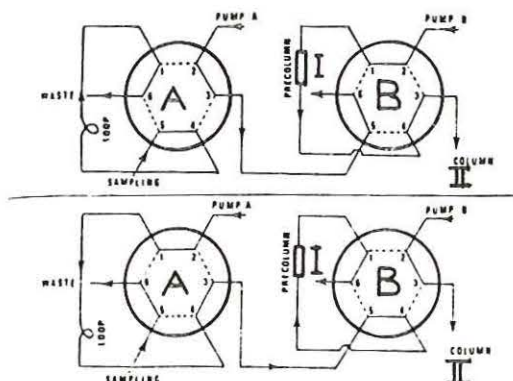
Eén van de meer recente ontwikkelingen op HPLC-gebied is de toepassing van kolomschakelingstechnieken bij de analyse van lichaamsvloeistoffen en water. De meeste toepassingen liggen op het terrein van de analyse van geneesmiddelen en metabolieten. Hieronder wordt een samenvatting gegeven van een aantal literatuur-artikelen met betrekking tot kolomschakeling. Bijzonderheden met betrekking tot HPLC-condities zijn gegeven in bijlage 1.

Samenvattingen

1. Lankelma et al (1979).

De bepaling van methotrexaat in serum.

Door gebruikmaking van 2 kranen (injectiekraan en een schakelkraan) en 2 kolommen (pré-concentreringskolom en een analytische kolom), konden de monsters eerst geconcentreerd en gezuiverd worden en vervolgens geanalyseerd. Deze opstelling is hieronder schematisch weergegeven.



Het monsterextract (1 ml) werd geïnjecteerd op voorkolom I. Na spoelen met water wordt kraan B omgeschakeld en vond analyse plaats op kolom II.

Vóór de analyse met kolomschakeling werden de serummonsters behandeld met trichloorazijnzuur om eiwitten neer te slaan.

Dit veroorzaakte een recoveryverlies van ca. 30%.

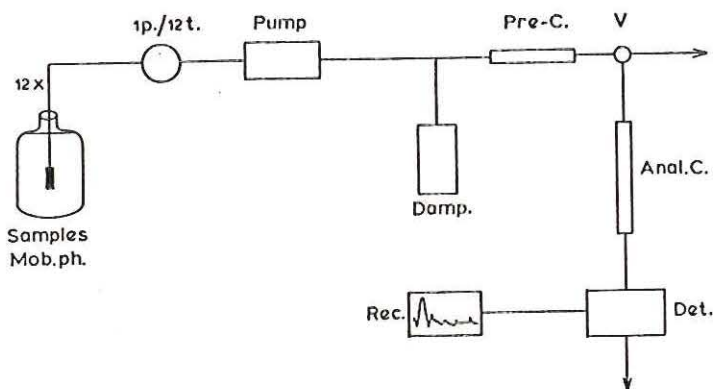
De piekverbreding door de concentratiestap was verwaarloosbaar, met name door elutie in de back-flush richting. Na 350 plasma-analyses vertoonden de kolommen nog geen achteruitgang.

2. V. Vliet et al (1979).

De bepaling van phtaalesters in water.

Grote monstervolumina, 500 tot 1000 ml, werden geconcentreerd op een zeer korte, $l=2$ mm, voorkolom. De voorkolom was voorzien van een $20 \mu\text{m}$ inlaatfrit en een $2 \mu\text{m}$ uitlaatfrit. Tussen voorkolom en analytische kolom is een kraan geplaatst waardoor gedurende de pré-concentratie de vloeistofstroom afgevoerd wordt naar waste.

Dit is hieronder schematisch weergegeven.



De geabsorbeerde componenten werden geëluëerd door gradient-elutie in de normale flow-richting. Dit maakte het gebruik van pakkingsmateriaal met deeltjesgrootte van 5 tot $10 \mu\text{m}$ noodzakelijk omdat $50 \mu\text{m}$ deeltjes te veel piek-verbreding veroorzaken. Dezelfde methode bleek ook toepasbaar voor de bepaling van polychloorbifenylen in water.

Watermonsters van natuurlijke oorsprong waren met deze methode niet te analyseren vanwege de aanwezigheid van grote hoeveelheden UV-absorberende bestanddelen welke ook op de concentreringskolom blijven en zorgen voor een te brede oplosmiddelpiek.

3. Koch et al (1980).

De bepaling van serotonine in serum en plasma met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

Voorafgaand aan de analyse werden de monsters behandeld met perchloorzuur om eiwitten neer te slaan en gezuiverd over een Amberlite kolom. Injectievolumina van $100 \mu\text{l}$ tot 1 ml waren mogelijk.

De functie van de voorkolom was in deze studie in hoofdzaak pré-concentratie.

4. Gfeller et al (1980).

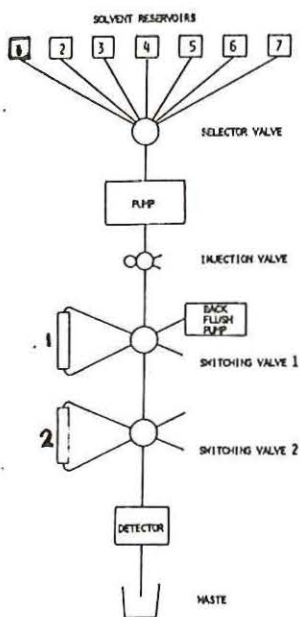
De bepaling van fluorproquazon in voeders met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1). De voeders werden geëxtraheerd met methanol. Werd van dit extract een deel, 20 µl, direct geïnjecteerd dan trad overbelading van de voorkolom op. Daarom moesten de extracten eerst met water verdund worden. Ondanks de back-flush elutie veroorzaakte de zuiveringsstap ca. 25% piekverbreding. De detectiegrens van de methode bedroeg ca. 5 ppm.

5. Erni et al (1981).

De bepaling van fluorproquazon in voeders en van endralazine in urine en plasma.

Het schakelsysteem was opgebouwd uit een eluenskeuzeschakelkraan, 2 zeswegkranen, 2 HPLC-pompen en een detector. In tegenstelling tot de opzet van Lankelma et al (1) werden de componenten geëluëerd in de normale flowrichting. De voorkolom werd niet alleen voor pré-concentratie en voorzuivering gebruikt, maar ook als voorscheidingsstelsel. Alleen de fractie welke de te bepalen componenten bevat wordt op de tweede kolom gebracht (Heart-cutting).

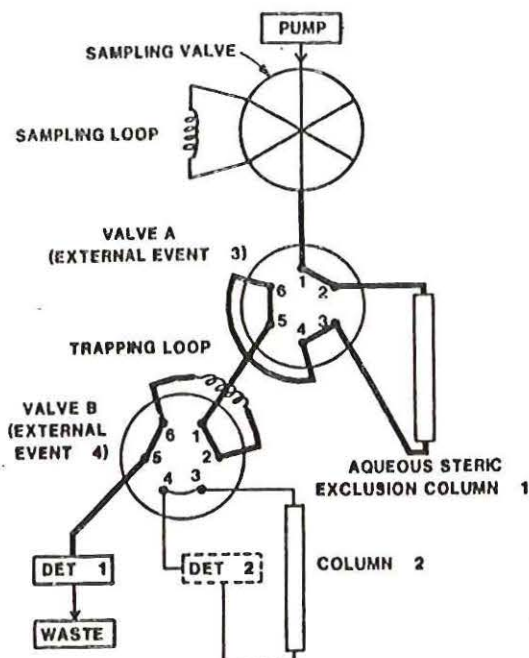
De tweede vloeistofpomp werd aangesloten op de eerste schakelkraan waardoor gedurende de elutie van de analytische kolom de eerste kolom gespoeld kan worden, in back-flush, met puur methanol. Het geheel is schematisch weergegeven in onderstaande figuur.



Voorafgaand aan de analyses werden voeders geëxtraheerd met methanol, plasmamonsters met chloroform/propanol-2 terwijl urinemonsters gebufferd werden en gestabiliseerd met Na₂ EDTA om oxydatie te voorkomen.

6. Apffel et al (1981).

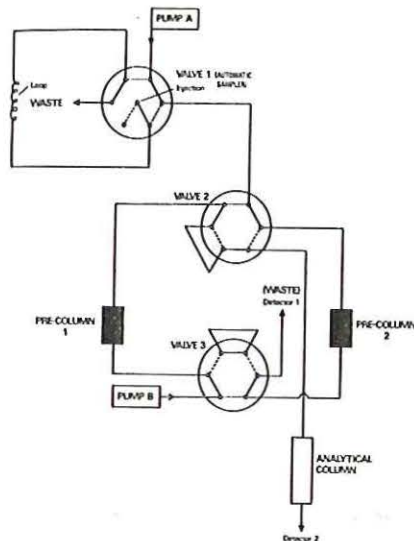
De bepaling van theophylline en cafeïne in lichaamsvloeistoffen, catecholamines in urine, vitamines in voedsel supplementen en suikers in melasse en candybars. Het kolomschakelingssysteem bestond uit drie zeswegkranen: een injectiekraan, een keuzekraan voor flow via voorkolom of analytische kolom en een kraan voor directe afvoer naar waste of analyse op de analytische kolom. Het geheel is hieronder schematisch weergegeven.



Voor alle componenten werd een GPC-kolom als voorkolom toegepast. De fracties van de voorkolom welke de te bepalen componenten bevatten varieerden daardoor in grootte van 20 µl tot enkele milliliters. Deze werden opgevangen in een monsterloop op de derde kraan. Door omschakeling van kraan A en B op hetzelfde tijdstip werd de fractie in de loop op de analytische kolom gebracht en was de voorkolom kortgesloten. Gezien de volumina van de uitgevangen fracties was on-column concentratie noodzakelijk wat bereikt werd door elutie van de GPC-voorkolom met water en/of sterk verdund zuur in combinatie met een RP of ion-exchange kolom voor de analyse. De plasma en urinemonsters werden na filtratie direct geïnjecteerd terwijl melasse en candy-bars eerst gesuspenderd werden in water.

7. Roth et al (1981).

De bepaling van Rapenton en dipyridamole in serum, urine en speeksel. Het schakelsysteem was vergelijkbaar met dat van Lankelma et al (1) met toevoeging van een derde kraan tussen kraan 1 en 2 waardoor twee voor-kolommen konden worden toegepast waarop afwisselend geïnjecteerd wordt terwijl de andere voorkolom geëluëerd wordt. Het systeem is hieronder schematisch weergegeven.



De monsters werden direct geïnjecteerd. Het injectievolume varieerde van 10 tot 150 μ l. De binding van de te bepalen componenten aan plasma-eiwitten werd op de voorkolom geheel verbroken.

Door back-flush elutie van de voorkolom was het effect van de pré-concentratie op piekverbreding en symmetrie verwaarloosbaar. De variatiecoëfficiënt van de analyse was gering (1 à 2%). Na 1000 injecties waren voorkolom en analytische kolom niet minder van kwaliteit geworden.

8. Voelter et al (1982).

De bepaling van aminopyrine en metabolieten in biologische vloeistoffen. Voor dit onderzoek werd de meest simpele opstelling gebruikt. De monsterlus van een normale injectiekraan werd daartoe vervangen door een concentreringskolom. De voorkolom werd na injectie van de monsters door handinjectie gespoeld met 1 ml water. Door omdraaien van de kraan wordt de kolom in back-flush geëluëerd naar de analytische kolom. Voor de volgende analyse moet de voorkolom eerst weer gespoeld worden met water. De binding van de te bepalen component aan plasma-eiwitten werd met deze methode verbroken. Er trad minder verlies aan polairdere metabolieten op dan bij klassieke methoden.

9. De Jong et al (1982).

De bepaling van fluvoxamine, clovoxamine en secoverine in plasma en van gelabelde pesticiden in grondextracten. Beschreven wordt een systeem waarbij tussen voorkolom en analytische kolom een kraan geplaatst werd. Door de modifierconcentratie stapsgewijs op te voeren werd een voorzuivering bereikt. De fractie met de te analyseren componenten werd op de analytische kolom gebracht, de rest gaat naar waste. RP-8 materiaal gaf te veel piekverbreding (100%) veroorzaakt door front-flush, maar RP-2 gaf slechts 10% piekverbreding. Derivativering met fluorescamine was nodig om de componenten minder polair te maken zodat deze beter te concentreren zijn op het RP-2 materiaal. Daarnaast werd het toegepast voor de fluorescensiedetectie.

Voor secoverine werd een zeer korte, 1 à 2 mm, concentreringskolom toegepast gepakt met CN-materiaal. De rest van de voorkolom werd opgevuld met PTFE-tubing doorboord met stainless-steel tube.

Overigens trad na een aantal analyses van 1 : 1 verdunde plasmamonsters (injectie 200 µl) wel drukverhoging op.

10. Nussbaumer et al (1982).

De bepaling van cyclosporin A in menselijk bloed of serum met een schakelsysteem volgens Erni et al (5). Met de tweede HPLC-pomp werd echter de analytische kolom na elke analyse gespoeld en niet de voorkolom.

Voor de analyse werden bloed en plasmamonsters onteiwit met verdunde methanol. Desondanks was de recovery groter dan 90%, mogelijk door toepassing van een interne standaard. Ondanks deze monstervoorbewerking vertoonde de voorkolom na 300 monsters een versnelde doorslag. Om het systeem optimaal te houden waren een filter en een guard kolom vóór de concentreringskolom noodzakelijk.

11. Huber et al (1982).

De bepaling van lonazolac en p-hydroxylonazolac in serum met kolom-schakeling volgens Lankelma et al (1). De resultaten van de directe analyse van serum met kolomschakelingen waren goed vergelijkbaar met die van de klassieke extractie-methode. De recovery was groter dan 95% en de variatiecoëfficiënt ca. 1,5%.

12. Jürgens (1983).

De bepaling van hydroxyphenytoïne in urine met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

Voorafgaand aan de analyse werden de monsters gehydrolyseerd met perchloorzuur en verdund met water. Storingvrije analyse was alleen mogelijk met een analytische kolom van goede kwaliteit en gradientanalyse. Drukverhoging in het systeem trad op na ca. 800 injecties van 30 µl. De variatiecoëfficiënt bedroeg 2 à 3%.

13. Werkhoven - Goewie et al (1983).

De bepaling van etoposide, teniposide en aglycone in plasma, serum en urine met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

De concentreringskolom was gevuld met PRP-1 materiaal (divenylbenzeen-polymeer) omdat dat met name voor aromatische verbindingen een betere retentie geeft dan RP-18.

Bloed, serum en plasmamonsters werden behandeld met subtilizine A om eiwitbindingen te verbreken en om verstopping van het systeem te voorkomen. Nadeel is een sterke UV-achtergrond waardoor een post-column extractie nodig was om de componenten te bepalen. Alleen urine werd na filtratie direct geïnjecteerd. Het injectievolume bedroeg 1 à 2 ml voor alle monsters. Met name pré-concentratie van plasmamonsters had enige piekverbreding tot gevolg. Urine gaf ook na post-column extractie met UV-detectie een hoog achtergrondsignaal.

De concentreringskolom werd dagelijks vervangen.

14. Roth (1983).

De bepaling van sulmazole en de sulfide- en sulfonmetaboliet in plasma, urine en gal.

Het schakelsysteem was hetzelfde als eerder door Roth (7) beschreven. Het injectievolume was bijzonder klein, voor plasma 50 µl en voor urine en gal maximaal 10 µl.

Voor directe injectie van genoemde matrices moet de apparatuur volgens Roth aan enkele voorwaarden voldoen zoals:

- a. Frits met flinke poriegrootte, in zijn geval 18 µm.
- b. De leiding welke aangesloten zit op de voorkolom moet kruislings ingevijld zijn om verspreiding van het monstervolume over de hele frit mogelijk te maken.

- c. De capillairen moeten een grotere interne diameter hebben.
- d. Een guard kolom tussen voorkolom en analytische kolom is noodzakelijk.

De chromatogrammen voor met name gal en urine vertonen enkele extra pieken.

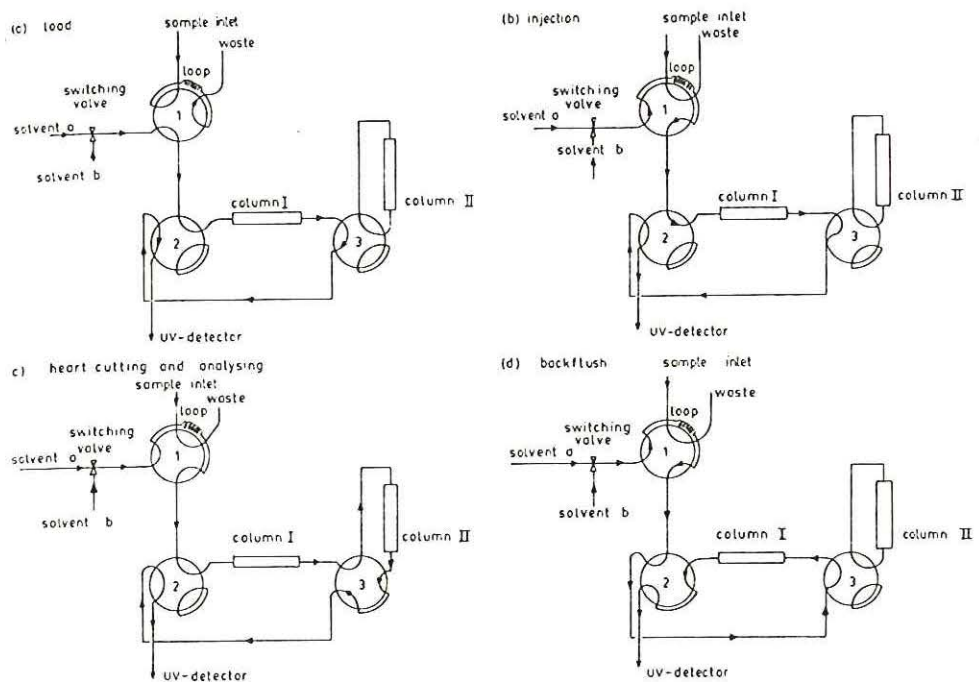
Uit proeven met plasma is gebleken dat er op de voorkolom verbreking van eiwitbinding plaatsvindt, waarschijnlijk omdat de interactie tussen C-18 en de te bepalen componenten sterker is dan de binding aan plasmaproteïnen.

15. Tuinstra et al (1983).

De bepaling van enkele exogene groeibevorderende componenten in urine met GC/MS. Na voorzuivering van de urinemonsters over Extrelut of na vloeistof-vloeistofextractie in combinatie met off-line GPC- clean-up werden de extracten onderworpen aan voorzuivering middels HPLC-kolomschakeling.

Door toepassing van vier kranen konden alle mogelijk varianten van kolomschakeling worden toegepast nl. pré-concentratie, heart-cutting en back-flush.

De opstelling is hieronder schematisch weergegeven.



De frontelutie van de voorkolom veroorzaakte enige piekverbreding. Deze was beperkt door toepassing van pakkingsmateriaal met deeltjesgrootte van 10 μm . Tevens is dit niet essentieel omdat off-line de HPLC-fractie met de te bepalen componenten werd drooggedampt en vervolgens gederivatiseerd t.b.v. GC-MS analyse. De kolomschakeling in combinatie met de Extrelut of GPC clean-up gaf schone extracten en goede recoveries. De concentreringskolom moest, ondanks back-flush gedurende elke analyse, na ongeveer 250 monsters vervangen worden.

16. Goewie.

De bepaling van secoverine in plasma en serum met kolomschakeling volgens Roth et al (7). Aan het schakelsysteem is een kraan toegevoegd om elutie van de voorkolom in front-flush en spoelen met water in back-flush mogelijk te maken.

De voorkolom, gepakt met CN-materiaal, werd kort gehouden. Bij een langere voorkolom nam de druk sneller toe. Pakkingsmateriaal met kleine deeltjesgrootte (5-10 μm) werd gebruikt om piekverbreding tegen te gaan.

Bij directe plasma of serumanalyses trad na enkele injecties (0,5 ml) verstopping van het systeem op veroorzaakt door de frit (0,5 μm) op de analytische kolom. Tevens werd secoverine niet meer vastgehouden op de voorkolom. Vóór de analyse werden de monsters daarom behandeld met subtilizine A, een eiwitbreker die labiele geneesmiddelen niet aantast. Subtilizine A heeft als nadeel dat het sterke UV-absorptiebanden geeft van 200 tot 240 nm en van 260-290 nm. De voorkolom moest daarom lang gespoeld worden. Desondanks zijn componenten met $k' < 4$ met UV niet te bepalen.

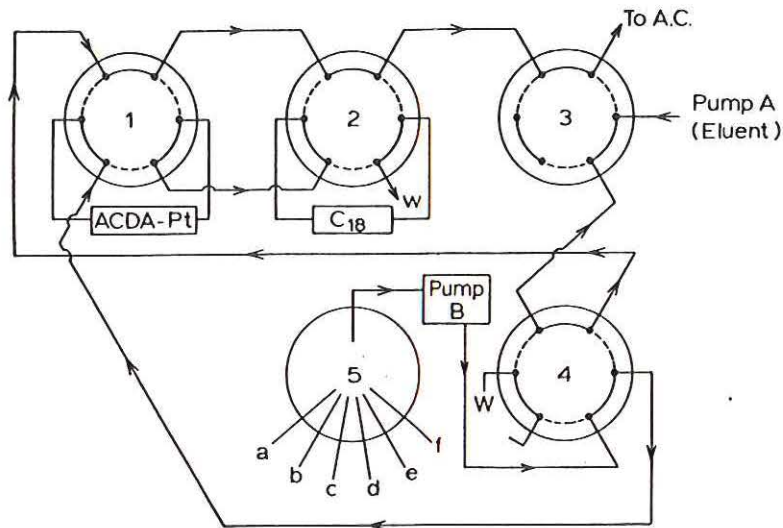
Behandeling van plasmamonsters met subtilizine A gaf geen verliezen voor de te bepalen component. Dit in tegenstelling tot onteiwitten door neerslaan en/of affiltreren.

Uit het onderzoek is gebleken dat verse serummonsters eerder verstopping van het HPLC-systeem veroorzaken dan monsters welke eerst een maand zijn ingevroren.

17. Goewie et al (1984).

De bepaling van phenylureumherbiciden in water met kolomschakeling volgens Erni et al (5). Het systeem werd uitgebreid met 1 kraan, om pré-column een selectieve voorzuivering mogelijk te maken. De opstelling is hieronder schematisch weergegeven.

HPLC OF PHENYLUREA HERBICIDES



De zuiveringskolom, gepakt met ACDA-silica beladen met Pt(IV), werd toegepast voor selectieve zuivering. De metaalbeladen fase complexeert aanwezige primaire anilines, de belangrijkste afbraakproducten van ureum-herbiciden. De ureumherbiciden worden geconcentreerd op een tweede (RP-18) voorkolom. De PT (IV)-voorkolom was snel verzadigd en moest elke 5 à 10 injecties geregenereerd worden met acetonitril en vervolgens geactiveerd met water.

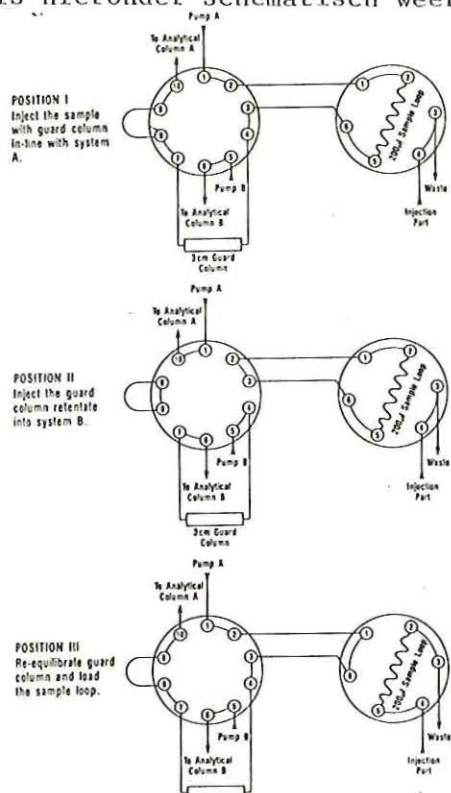
Niet alle componenten gaven 100% recovery, fenuron slechts 45% en buturon werd geheel geabsorbeerd op de PT (IV) kolom. Met deze methode kunnen 14 herbiciden bepaald worden in rivierwater op het ppb-niveau.

18. Cox et al (1984).

De bepaling van ciglitazone en monohydroxylmetaboliet in serum.

De auteurs beschrijven een kolomschakelingssysteem opgebouwd uit een zeswegkraan en een tienwegkraan. Daardoor konden 2 aparte HPLC-systemen gekoppeld worden middels de concentreringskolom.

Het systeem is hieronder schematisch weergegeven.



Voorafgaand aan de HPLC-analyse werden de serummonsters gezuiverd over C-18 en silica Bond-Elute kolommetjes. Voordeel van het systeem is dat hoofdcomponent en metaboliet welke sterk in polariteit verschillen toch in één analyse te bepalen zijn.

19. Nazareth et al (1984).

De bepaling van antiepileptica in serum met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

De voorkolom werd gepakt met 30 µm C-18 materiaal van eigen fabrikaat omdat ander materiaal niet voldeed. Het gebruik van zeefjes (voorkolom Waters) voor de concentreringskolom is te prefereren boven poreuze frits. Poreus pakkingsmateriaal gaf een betere retentie dan pellicular materiaal. Corasil C-18, een pellicular materiaal, gaf b.v. slechts een recovery van 5%. Dit laatste bleek overigens afhankelijk van de te bepalen component. Met name de kwaliteit van de analytische kolom nam sterk af bij gebruik van poreuze frits en/of pakkingsmateriaal met een deeltjesgrootte van 5 of 10 µm. Voor dit laatste fenomeen kon geen verklaring gegeven worden. Wassen van de voorkolom met fosfaatbuffer, pH = 3.5, gaf voor enkele antiepileptica een veel betere recovery, mogelijk door onderdrukking ionisatie van de te bepalen componenten door de zure wasvloeistof.

Bij injectie van 20 μ l serum konden op één voorkolom 2 à 300 injecties gedaan worden. Het schotelgetal van de analytische kolom was na 2000 injecties met ca. 25% afgenomen.

20. Juergens (1984).

De bepaling van 8 antiepileptica in serum met kolomschakeling volgens Roth et al (7).

De zeer korte voorkolom, 5 mm, werd gespoeld met verdund fosforzuur. De korte voorkolom maakte het mogelijk de te bepalen componenten in front-flush te elueren, omdat er weinig piekverbreding optrad. Voordeel t.o.v. back-flush is dat de analytische kolom minder snel verstopt raakt. Desondanks was een filter tussen concentreringskolom en analytische kolom noodzakelijk. Het maximale injectievolume bij front-flushelutie was 50 μ l. De analytische kolom moest na 1400 injecties vervangen worden.

21. Lecaillon et al (1984).

De bepaling van geneesmiddelen in plasma.

De auteurs beschrijven een kolomschakelingssysteem dat aangepast wordt aan de polariteit van de te bepalen componenten. Afhankelijk van het aantal voorkolommen werden twee kranen toegepast (1) of drie.

Voor laag- en mediumpolaire verbindingen werd als concentreringskolom een RP-2 kolom toegepast. Voor laag polaire verbindingen werd nog een tweede voorkolom, gepakt met CN-materiaal toegevoegd.

Een aparte benadering vroegen hoog polaire verbindingen. Deze componenten worden niet vertraagd op C-18 materiaal met water als eluens. In dit geval is normal-phase chromatografie nodig. Een voorkolom gepakt met NH_2 -materiaal in combinatie met eluens dat in hoofdzaak bestaat uit acetonitril (> 95%) met toevoeging van water, zwavelzuur en dichloormethaan gaf de gewenste retentie. Plasmamonsters moesten ook vermengd worden met acetonitril, zwavelzuur en dichloormethaan.

Als algemene stelregel werd door de auteurs aangegeven dat opvolgende kolommen in een schakelsysteem in combinatie met het eluens een betere retentie moeten geven om piekverbreding te voorkomen.

22. Decristoforo (1984).

De bepaling van carbapenem antibiotica in biologische monsters.

De auteurs maakten een vergelijking tussen isocratische-, gradient-analyse en analyse met kolomschakeling.

Het schakelsysteem was vergelijkbaar met dat van De Jong et al (9), met dien verstande dat de analytische kolom met een afzonderlijk eluens geëluëerd werd en niet met dat van de voorkolom. Alleen de fractie met de te bepalen componenten gaat naar de analytische kolom.

Voordelen van de kolomschakeling t.o.v. de andere mogelijkheden waren:

a. Geen problemen met gradiënteffecten op het UV-signaal.

b. Doordat slechts een fractie van het monster op de analytische kolom komt wordt er geen hinder ondervonden van tailende matrixcomponenten.

Dit is met name van belang bij het opnemen van spectra met de Diode Array-detector. Tevens is er sprake van bescherming van de analytische kolom.

23. Roth et al (1984).

Bepaling van medicijnen o.a. Pimobendaan^R en metabolieten in lichaamsvloeistoffen.

Het schakelsysteem was hetzelfde zoals eerder door dezelfde auteur is beschreven (7). Het systeem wordt nog flexibeler door toevoeging van 2 kranen, 1 pomp en een analytische kolom waardoor ook gradientanalyses mogelijk zijn.

Spoelvloeistoffen en pakkingsmaterialen werden onderzocht. Een 1% ammoniumacetaatoplossing bleek het retentievermogen van RP-materiaal voor genoemde componenten sterk te verbeteren. Echter, ook alle snel eluerende componenten bleken vastgehouden te worden, zodat water als spoelvloeistof toch beter toepasbaar was.

Het pakkingsmateriaal met de beste retentie was Amberlite XAD-2. Dit minder goed gedefinieerde pakkingsmateriaal veroorzaakte echter een flinke piekverbreding. Goede resultaten gaf ook Seppak C-18 materiaal. Een dergelijke concentreringskolom was goed voor 1000-2000 injecties van 10-50 µl plasma.

Erg visceuse monsters werden eerst verdund met water en aansluitend gecentrifugeerd.

24. Dow et al (1985).

De bepaling van spiramycine in plasma met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

Plasma werd vóór de analyse verdund met een oplossing van spiramycine-2 in verdund acetonitril. Spiramycine-2 werd toegepast als interne standaard.

Bij spoelen met water van de voorkolom werd bij de meetgolflengte, 230 nm, een sterke stoorpiek waargenomen. Bij spoelen met 4% acetonitril traden er geen interferenties op maar met name in het lage concentratiebereik traden er wel verliezen op voor spiramycine.

Voorkolom en analytische kolom werden na de analyses 1 nacht gespoeld met 50% methanol om de levensduur te vergroten. De variatiecoëfficiënt van de analyse lag tamelijk hoog (> 5%).

25. Räder et al (1985).

Bepaling van josamycine in plasma en gehomogeniseerde bloedcellen met kolomschakeling volgens Roth et al (7).

Optredende problemen waren doorslag door de voorkolom, overbelading voorkolom bij grote injectievolumina en UV-interferenties.

Door optimalisering van de HPLC- en detectiecondities werd echter een methode bereikt met 100% recovery. Maximaal konden 100 plasma-injecties van 200 µl op één concentreringskolom gedaan worden of 20 suspensies van bloedcellen.

26. Tamai et al (1985).

De bepaling van quinidine en metabolieten in lichaamsvloeistoffen met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

De voorkolom was gepakt met TSK gel 120A gecoat met eiwitten.

Metabolieten van quinidine werden verkregen door urine van met quinidine behandelde patiënten te onderwerpen aan pré-concentratie op een concentreringskolom gepakt met RP-materiaal en vervolgens te elueren met buffer/methanol. Verdere scheiding werd verkregen met een silica-gelkolom en opzuivering middels HPLC-analyse. De urine en plasmamonsters werden direct geïnjecteerd. Het injectievolume was maximaal 50 µl. Bij de analyse werd gebruik gemaakt van zowel fluorescentie als UV-detectie. De UV-detectie van 1 van de metabolieten in urine werd gestoord. Plasma leverde geen problemen op. De recoveries lagen tussen 98 en 102%.

27. Terada et al (1985).

De bepaling van penicilline G in dierlijk materiaal met kolomschakeling volgens Lankelma et al (1).

De monsters werden geëxtraheerd met water, onder toevoeging van natriumwolframaat en verdund zwavelzuur om de eiwitten neer te slaan. De extracten werden gezuiverd over een aluminiumoxide kolom en over een Seppak C-18 cartridge.

De component bleek niet te concentreren op C-18 materiaal met water als spoelvoeistof. Dit lukte wel na toevoeging van zouten aan de spoelvoeistof. Hetzelfde gold voor de zuivering over Seppak C-18. Om penicilline G op de cartridge te houden moest er 0,5% natriumchloride in het extract aanwezig zijn. Het schakelsysteem werd alleen toegepast voor pré-concentratie van 2 ml monsterextract. De spoelvoeistof voor de concentreringskolom bevatte 2% natriumchloride.

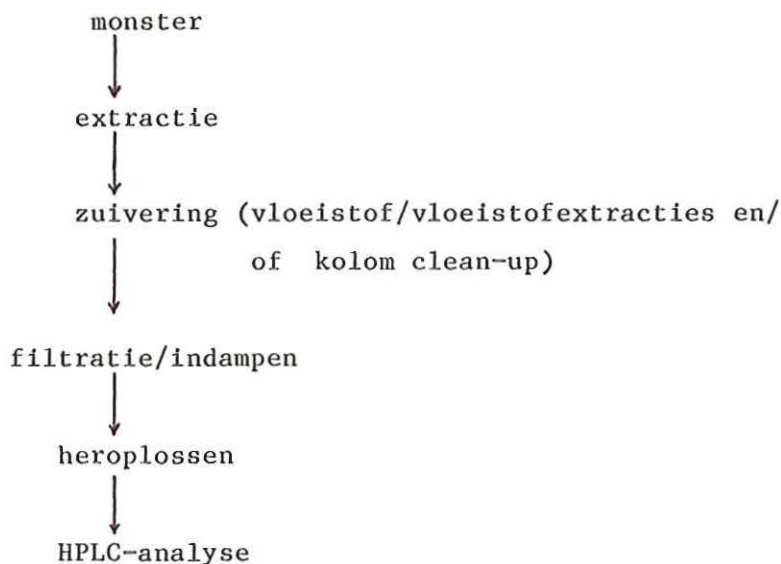
Ondanks dat elutie van de voorkolom in front-flush werd uitgevoerd was door de korte voorkolom, $l = 10$ mm, en door de pakking met $5 \mu\text{m}$ materiaal de piekverbreding gering.

De recovery voor lever was 75% en voor nier en vlees ca. 90%. De detectiegrens bedroeg 0,05 mg/kg.

Discussie

De meeste toepassingen van HPLC-kolomschakeling hebben betrekking op geneesmiddelenanalyses in lichaamsvloeistoffen zoals plasma, serum, bloed, urine en een enkele keer gal en speeksel.

Een "normale" HPLC-analyse voor een geneesmiddel in één van deze matrices ziet er schematisch weergegeven als volgt uit:



Voor het onderzoek van grote series monsters b.v. in het kader van farmacokinetisch onderzoek is een dergelijke methode minder geschikt. In de literatuur wordt met name de laatste jaren de directe analyse van plasma en serum en in mindere mate urine met kolomschakeling veelvuldig beschreven. Het monster wordt daartoe gebracht op een korte concentreringskolom welke pakkingsmateriaal bevat dat in staat is de te bepalen componenten vast te houden.

Door de kolom te spoelen met een waterige oplossing worden aanwezige eiwitten, zouten en andere hoog polaire componenten verwijderd. Door schakeling van een zeswegkraan waaraan de voorkolom gekoppeld is, worden de vastgehouden componenten met geschikt eluens in tegengestelde richting geëluëerd naar de analytische kolom en geanalyseerd. In grote lijnen is dit het principe van alle schakelsystemen welke beschreven zijn. De methoden vinden vooral toepassing bij farmacokinetisch en klinisch onderzoek. Roth et al (7) en Voelter et al (8) geven aan dat voor de componenten welke op deze manier in plasma bepaald zijn tevens de binding aan eiwitten verbroken werd.

Met een dergelijk systeem zijn tenminste enkele honderden monsters zonder problemen te analyseren.

Dit in tegenstelling tot directe HPLC-analyse van plasmamonsters zonder pré-concentratie en/of voorzuivering door kolomschakeling.

Arvidsson et al (28) kwamen maar tot 10 à 15 analyses bij directe plasma-analyses zonder kolomschakeling ondanks verlaging van de modifierconcentratie in het eluens tot een niveau waarbij geen zichtbaar eiwitneerslag ontstond. Volgens Wahlund et al (29) veroorzaakt de eiwitbinding van de componenten ook een slechte tailende piekvorm bij directe analyse. Dit effect treedt niet op bij kolomschakeling. Om verstoppingen te voorkomen worden plasmamonsters in enkele gevallen eerst ontdaan van eiwitten met trichloorazijnzuur (1), perchloorzuur (2), methanol (10) of subtilizine A (13,16). Een nadeel hiervan is dat ook een deel van de te bepalen componenten verloren gaat behalve bij gebruik van subtilizine A. Deze verbinding maakt echter UV-detectie van snel eluerende componenten onmogelijk (16).

Directe injectie van plasma geeft echter met kolomschakeling ook goede resultaten. Dit stelt wel eisen aan de toegepaste concentreringskolom. Deze moet voorzien zijn van frits met grote poriën (7) of zeefjes (19) en het liefst zo kort mogelijk zijn (13).

Dit laatste geldt vooral als de componenten in front-flush van de concentreringskolom geëluëerd worden (16,20). Is de kolom in dat geval langer dan treedt piekverbreding op met name als pakkingsmateriaal met grotere deeltjes (30-50 μm) gebruikt wordt (9,16). Pakkingsmateriaal met kleinere deeltjes (5-10 μm) kan wel toegepast worden maar maakt het gebruik van frits met kleinere poriën noodzakelijk. Dit zorgt te samen voor snelle verstopping van het systeem bij directe plasma-analyse (16). Veel meer problemen worden ondervonden bij directe analyse van urinemonsters. Deze matrix veroorzaakt een sterke UV-achtergrond (13) of geeft stoorpieken welke hoge eisen stellen aan de HPLC-omstandigheden om de analyse mogelijk te maken (12,26). Een variant op dit schakelsysteem is het heart-cutting systeem (5,6,15). In tegenstelling tot de hiervoor beschreven opstelling waarmee de componenten meestal in back-flush van de voorkolom geëluëerd worden gebeurt het in deze opstelling in de normale flow-richting met behulp van een gradientelutie en of eluenswisseling. Alleen de fractie met de te analyseren componenten wordt door kolomschakeling op de analytische kolom gebracht en geanalyseerd. De voorkolom wordt niet alleen toegepast voor de concentrering en zuivering maar ook als scheidingsysteem. Voordelen van dit systeem zijn:

- a. Minder hinder van tailende "oplosmiddel" pieken.
- b. Geen verstoring van het UV-sigitaal door verandering van het eluens bij gradientelutie.
- c. Bescherming van de analytische kolom.

Een dergelijk systeem stelt nog hogere eisen aan de pré-concentreringskolom dan het eerder beschreven systeem. De te analyseren componenten moeten als smalle band van de voorkolom elueren om piekverbreding en dientengevolge gevoeligheidsverlies te voorkomen. De uit te vangen fractie moet dus klein zijn, maximaal enkele tientallen microliters, tenzij on-column concentratie mogelijk is zoals beschreven door Apffel et al (6).

De punten a. en b. zijn van belang bij Diode-Array detectie (22). Een aanwezig achtergrondsignaal kan met name bij lagere golflengten, kleiner dan 250 nm, een sterke verstoring van het spectrum geven.

De toepassingen met de koppeling van meerdere kolommen (21) of HPLC-systemen (18) kunnen goede mogelijkheden bieden bij de analyse van geneesmiddelen, omdat de polariteit van hoofdcomponent en metabolieten

sterk van elkaar kunnen verschillen en omdat de geneesmiddelen zelf een grote variëteit in polariteit vertonen.

Het concentreringsprincipe op een voorkolom en aansluitend de analyse met HPLC door kolomschakeling is ook beschreven voor de bepaling van residuen van organische componenten in water (2,17). In de praktijk blijken monsters van natuurlijke oorsprong echter veel UV-absorberende bestanddelen te bevatten welke de bepaling kunnen storen bij pré-concentratie van zeer grote volumina (2). Goewie et al (17) bepalen echter phenylureumherbiciden in rivierwater op het ppb-niveau.

Gebruik van HPLC-kolomschakeling voor voederanalyses (4,5) wordt gecompliceerd door de complexe samenstelling van voeders. Dit leidt mogelijk tot een hoge UV-achtergrond en dito detectiegrens zoals 5 mg/kg voor fluorproquazon (4).

De analyse van vlees, lever en nier met HPLC-kolomschakeling is weliswaar beschreven (27) maar pas na een uitgebreide monstervoorbewerking (onteiwitten, aluminiumboxide- en Seppak C-18 clean-up) wordt de HPLC-analyse uitgevoerd. In dit geval wordt kolomschakeling alleen gebruikt voor pré-concentratie en niet als zuiveringsstap.

Conclusies

Hoewel dit literatuuroverzicht niet pretendeert volledig te zijn kan er toch geconcludeerd worden dat de belangstelling voor HPLC-kolomschakeling de laatste jaren sterk toeneemt. Het blijkt dat geneesmiddelen zich uitstekend lenen voor deze techniek met name omdat de meeste water en/of zuuroplosbaar zijn.

Toepassingen van HPLC-kolomschakelingen welke interessant lijken voor de analyse van diergeneesmiddelen zijn:

1. Geautomatiseerde analyses van lichaamsvloeistoffen t.b.v. farmacokinetisch onderzoek.
2. Pré-concentratie grotere volumina van waterige extracten b.v. van monsters van dierlijke oorsprong of van urine. Dit laatste in het kader van het isoleren van metabolieten.
3. Koppeling HPLC-kolommen en/of systemen t.b.v. groepsscheiding op basis van polariteit.

Literatuur

1. Lankelma J., Poppe H.; J. Chromatogr. 149 (1978) 587.
2. v. Vliet H.P.M., Bootsman Th.C., Frei R.W., Brinkman U.A.Th.; J. Chromatogr. (1979) 483.
3. Koch D.D., Kissinger P.T.; Anal. Chem. 52 (1980) 27.
4. Gfeller J.C., Stockmeyer M.; J. Chromatogr. 198 (1980) 162.
5. Erni F., Keller H.P., Morin C., Schmitt M.; J. Chromatogr. 204 (1981) 65.
6. Apffel J.A., Alfredson T.V., Majors R.E.; J. Chromatogr. 206 (1981) 43.
7. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss F.W.; J. Chromatogr. 222 (1981) 13.
8. Voelter W., Kronbach T., Zech K., Huber R.; J. Chromatogr. 239 (1982) 475.
9. de Jong G.J., Zeeman J.; Chromatographia 15 (7) (1982) 453.
10. Nussbaumer K., Niederberger W., Keller H.P.; JHRC en CC 5 (1982) 424.
11. Huber R., Zech K., Wörz M., Kronbach Th., Voelter W.; Chromatographia 16 (1982) 233.
12. Jürgens U.; J. Chromatogr. 275 (1983) 335.
13. Werkhoven - Goewie C.E., Brinkman U.A.Th., Frei R.W.; J. Chromatogr. 276 (1983) 349.
14. Roth W.; J. Chromatogr. 278 (1983) 347.
15. Tuinstra L.G.M.Th., Traag W.A., Keukens H.J., v. Mazijk R.J.; J. Chromatogr. 279 (1983) 533.
16. Goewie proefschrift.
17. Goewie C.E., Kwakman P., Frei R.W., Brinkman U.A.Th., Maasfeld W., Seshadri T., Kettrup A.; J. Chromatogr. 284 (1984) 73.
18. Cox J.W., Pullen R.H.; J. Chromatogr. 307 (1984) 155.
19. Nazareth A., Jaramillo L., Karger B.L., Giese R.W., Snyder L.R.; J. Chromatogr. 309 (1984) 357.
20. Juergens U.; J. Chromatogr. 310 (1984) 97.
21. Lecaillon J.B., Febvre N., Souppart C.; J. Chromatogr. 317 (1984) 493.
22. Decristoforo G.; Anal. Chim. Acta 163 (1984) 25.

23. Roth W., Beschke K.; J. Pharm. Biomed. Analysis 2 (2) (1984) 289.
24. Dow J., Lemar M., Frydman A., Gailliot J.; J. Chromatogr. 344 (1985) 275.
25. Räder K., Wildfeuer A., Schwedass A., Laufen H.; J. Chromatogr. 344 (1985) 416.
26. Tamia G., Yoshida H., Imai H., Takashina T., Kotoo K., Fuwa T., Tsuchioka Y., Matsuura H., Kajiyama G.; Chromatographia 20 (11) (1985) 671.
27. Terada H., Asanoma M., Sakabe Y.; J. Chromatogr. 318 (1985) 299.
28. Arvidsson T., Wahlund K.G., Daoud N.; J. Chromatogr. 317 (1984) 213.
29. Wahlund K.G., Arvidsson T.; J. Chromatogr. 282 (1983) 527.

Ref. nr.	Matrix	Bepaalde component	Voorkolom		Analytische kolom		Detectie	Detectie-grens
			Pakking	L x ID (mm)	Pakking	L x ID(mm)		
1	plasma	methotrexaat	Merck 10-RP-8	46 x 3	Partisil SAX-10	250 x 4,6	UV	0,009 µg/ml
2	water	phtaaalsters	Lichrosorb 5RP-18	2 x 4,6	RP-18	125 x 4,6	UV	-
3	plasma/serum	serotonine	Brownlee RP-18	30 x 4,6	RP-18	300 x 4	electrochemisch	0,001 ng/ml
4	voeder	fluorproquazon	Lichrosorb 10 RP-18	50 x 4,6	5-RP-8	250 x 4,6	UV	5 mg/kg
5	voeder	fluorproquazon	Knauer 5-RP-2	30 x 4,7	5-RP-18	120 x 4,7	UV	-
6	plasma/urine	endralazine	Brownlee 10-RP-8	30 x 4,6	5-RP-8	250 x 4,6	UV	20 ng/ml
	urine/plasma	caffeine, theophylline	Micro Pak TSK 2000 SW	500 x 7,5	Micro Pak MCH-10	300 x 4	UV	0,5 µg/ml
	voedingssupplement	vitamine B	Micro Pak TSK 2000 SW	300 x 7,5	Micro Pak MCH-10	400 x 4	UV	-
	urine	DOPA	Micro Pak TSK 2000 SW	300 x 7,5	Micro Pak MCH-10	300 x 4	electrochemisch	-
7	melasse, candy bars	suikers	Micro Pak TSK 2000 PW	300 x 7,5	Micro Pak NH ₂ -10	300 x 4	UV	-
	plasma, urine, speeksel	Rapenton	Corasil RP 18,37-50 µm	25 x 4,6	5-RP-18	120 x 4,6	fluorimetrisch	0,05-1 µg/ml
8	lichaamsvloeistoffen	aminopyrine	Lichroprep RP 8,25-40 µm	50 x 4,6	5-RP-18	250 x 4	UV	-
9	plasma	fluvoxamine, clovaxamine	Lichrosorb RP 2,32 µm	50 x 4,6	7-RP-8	150 x 4,6	fluorimetrisch	0,003 µg/ml
10	plasma	secoverine	March. Nagel, CN, 5 µm	1 à 2 x 4,6	CN, 5 µm	200 x 4,6	fluorimetrisch	0,04 ng/ml
	bloed, plasma	cyclosporin A	Perisorb RP-8, 30 µm	40 x 4,6	5-RP-18	150 x 4,6	UV	0,02 µg/ml
11	serum	lonazolac	Lichroprep RP-8,25-40 µm	30 x 4	5-RP-8	125 x 4	fluorimetrisch, UV	0,015 µg/ml
12	urine	hydroxyphenytoine	Lichrosorb RP-18, 10 µm	40 x 4,6	5-RP-18	250 x 4,6	UV	-
13	serum, urine	etoposide, teniposide	PRP ₁ , - 10µm	2 x 4,6	10-RP-18	125 x 4	fluorimetrisch	8 µg/ml
14	plasma, urine, gal	sulmazole	Corasil RP-18, 37-50 µm	40 x 4,6	5-RP-18	125 x 4,6	fluorimetrisch	0,008 µg/ml
15	urine	exogenen	Lichrosorb 10-RP-18	100 x 4,6	5-RP-18	150 x 4,6	GC/MS	-
16	plasma, serum	secoverine	CN 5-10 µm	(1,5-4)x4,6	10-CN	250 x 4,6	fluorimetrisch	-
			Brownlee Lichros.CN 10 µm	30 x 4,6				
17	water	phenyllureaherbiciden	ACDA-silica	11 x 2	RP-18	125 x 4	UV	0,01 µg/ml
			Pt (IV) beladen					
18	serum	ciglitazone	RP-18	11 x 2				
			Brownlee 5 RP-18	30 x 4,6	5 RP-18	250 x 4,6	UV	0,05 µg/ml

Ref. nr.	Matrix	Bepaalde component	Voorkolom		Analytische kolom		Detectie	Detectie-grens
			Pakking	L x ID(mm)	Pakking	L x ID(mm)		
19	serum	primidone phenobarbital phenytoïne	RP-18, 30 µm eigen fabrikant	50 x 4,6	5-RP-8	150 x 4,6	UV	-
20	serum	carbamazepine phenobarbital phenytoïne ethosuximide carbamazepine carbamazepine-10-11 epoxide primidone 2-ethyl 2 phenylal- diamide N-desmethylnethsuximide	Nucleosil 30 RP-18	5 x 4,6	5-RP-18	250 x 4,6	UV	-
21	plasma	metropolol 4-nitrodiphenylamine oxiracetam	Lichrosorb RP-2,25-40 µm Nucleosil CN 5µm Lichrosorb RP2,25-40 µm Lichrosorb NH2,10 µm	250 x 4,7 100 x 4,7 250 x 4,7 100 x 4,7	5 RP-8 5 RP-8 NH2 5 µm	250 x 4,7 150 x 4,7 2x250x4,7	fluorimetr. UV UV	- 0,2 µg/ml
22	gistingsprodukten	carbapenem	Nucleosil 10-RP-18	100 x 4,7	10-RP-18	210 x 4,7	Diode Array	-
23	plasma, urine	pimobendaan	Diversen	20 x 4,6	5-RP-18	125 x 4,6	fluorimetr.	-
24	plasma	spiramycine	Perisorb RP-18,30-40 µm	50 x 7	5-RP-8	150 x 4,6	UV	0,05 µg/ml
25	plasma	josamycine	Nucleosil 30 C18	5 x 4,6	Hypersil CPS;5 µm	250 x 4,6	UV	0,025 µg/ml
26	plasma, urine	quinidine	ODS TSK gel 120A	60 x 4	TSK gel 120A;5 µm	60 x 4	UV,fluorim.	0,5x10 ⁻⁵ M
27	vlees,lever,nier	penicilline G	Lichrosorb 5-RP-18	10 x 4	5-RP-18	150 x 4	UV	0,05 µg/g