

B.ASc. Scriptie

De ontwikkeling van een multicomponent-analysemethode voor het bepalen van
antidepressiva in bloedserum met LC-MS²



DOOR MARTIJN BÖHM
JANUARI 2015 – JULI 2016
HOGESCHOOL LEIDEN

OLVG, LOCATIE OOST
APOTHEEK LABORATORIUM
OOSTERPARK 9, AMSTERDAM

B.ASc. scriptie

De ontwikkeling van een multicomponent-analysemethode voor het bepalen van
antidepressiva in bloedserum met LC-MS²

26 januari 2016

Methode ontwikkeling bij:	OLVG oost Apotheek laboratorium Oosterpark 9 1091 AC, Amsterdam
Scriptie geschreven door:	Martijn Böhm +316-52661269 Burgemeester van Nienesstraat 7 1911 CR, Uitgeest
Geschreven taal:	Nederlands
Studeerinstelling:	Hogeschool Leiden Hoger Laboratorium Onderwijs Zernikedreef 11 2333 CK, Leiden
Studeer richting & specialisatie:	Chemie: Chemische Analyse
Student nummer:	S1082295
Begeleider:	Martijn Brancart
Stage docent:	Linda Aarts
Paraaf begeleider (Martijn Brancart):	

Datum paraaf:

1 Samenvatting

Depressie is een veel voorkomende psychische afwijking welke meer dan één miljoen mensen in Nederland treft. Depressie kan worden behandeld met antidepressiva. Het gebruik van antidepressiva kan gemonitord worden, waardoor de veiligheid en effectiviteit van de behandeling tegen depressie toeneemt. Het OLVG Oost wilt één uniforme analyse methode met LC-MS² voor het bepalen van alle commercieel relevante antidepressiva.

Een selectie van commercieel relevante antidepressiva werd opgesteld door de aanvraag historie van OLVG Oost en landelijke historie van antidepressiva te bestuderen. Van alle antidepressiva werden oplossingen gemaakt, welke vervolgens geïnfuseerd werden in de MS voor het opnemen van transities.

De kolom en eluens keuzen werd bepaald door verschillende methode te testen. Het best verkregen chromatografie systeem was een isocratisch 55:45 acetonitril – formiaat mierenzuur buffer eluens op een 150 mm C8 kolom, waarbij alle antidepressiva binnen vijf minuten elueerden, en de suppressie de elutie ontweek.

Twee voorbereidingsmethoden; SPE en PPT werden tegen elkaar getest. De SPE voorbereidingsmethode was aanzienlijk beter in het verwijderen van de matrix van plasma. De SPE was echter tijdrovend en duur in verhouding tot de PPT, waardoor de PPT gekozen werd als voorbereidingsmethode.

De prestatiekenmerken van de analyse methode werden vastgelegd, waarbij eerst gekeken werd naar de matrix effecten op de analyse methode. De methode voldeed niet aan de eisen van de EMEA op het gebied van matrix effecten, waardoor een nieuwe chromatografische methode opgezet moest worden.

Een nieuwe chromatografische methode werd opgezet. De nieuwe chromatografische methode had slechte individuele piek vorm, waardoor een nieuwe chromatografische methode opgezet moest worden.

Een nieuwe chromatografische methode werd opgezet. De prestatiekenmerken van de analyse methode werden vastgelegd, waarbij gekeken werd naar de matrix effecten, de precisie en accuraatheid, de lineariteit, de carry-over, de specificiteit en de stabiliteit volgens de EMEA richtlijnen. De accuraatheid voldeed niet aan de eisen van de EMEA. De accuraatheid moet opnieuw bepaald worden. Wanneer de accuraatheid twee maal succesvol herhaald wordt, is de multicomponent-analysemethode voor het bepalen van antidepressiva in bloedserum met LC-MS² succesvol voor 17 antidepressiva.

1 Summary

Depression is a common psychiatric disorder for which more than one million Dutch citizens are treated. Depression can be treated with antidepressants. The use of antidepressants can be monitored, which enhances the safety and effectiveness of the treatment against depression. OLVG Oost desires one uniform method to determine the amount of all commercial relevant antidepressants with LC-MS².

A selection of commercial relevant antidepressants was created by studying the request history of antidepressants, and the history of use of antidepressants in The Netherlands. For all antidepressants that were included in the method development, solutions were prepared. The antidepressants were infused in the mass spectrometer from which transitions were derived.

The column and mobile phase was determined by testing different methods. The best performing chromatographic system was an isocratic 55:45 acetonitril – formate formic acid buffer eluent on a 150 mm C8 based column. With this chromatographic system all antidepressants eluted within five minutes, and the suppression avoided the elution of antidepressants.

Two types of sample preparation methods; SPE and PPT were tested against each other. The SPE sample preparation method outperformed the PPT sample preparation method for the removal of matrix from plasma. However the SPE method was more time consuming and more expensive than the PPT method, which is why the PPT was chosen as the sample preparation method for the determination of antidepressants.

The performance characteristics of the analysis method were evaluated. The method failed according to the EMEA guidelines for the matrix effects. A new chromatography system had to be developed.

A new chromatographic method was developed. The new chromatographic method suffered from bad peak shape. A new chromatographic method had to be developed.

A new chromatographic method was developed. The performance characteristics were evaluated by analyzing the matrix effects, the precision and accuracy, the linearity, the carry-over, the specificity and the stability according to the EMEA guidelines. The accuracy did not meet the expectations of the EMEA guidelines. When the accuracy is successfully determined, the multicomponent-analysis method for the determination of antidepressants with LC-MS² is successful for 17 antidepressants.

2 Inhoud

Inhoud

B.ASc. Scriptie	0
1 Samenvatting.....	2
2 Inhoud.....	4
3 Afkortingen	7
4 Inleiding	9
4.1 Doelstelling.....	10
4.2 Reden voor de methode ontwikkeling	10
4.3 Oorzaak van depressie	10
4.4 Medicatie soorten	11
4.4.1 Geschiedenis.....	11
4.5 Patiënt monitoring	13
4.5.1 Medicatie effectiviteit	13
4.5.2 Medicatie ineffectiviteit	13
4.5.3 Misbruik van medicatie en controle van inname	13
4.6 Instrumentele monitoring en theoretische achtergrond	14
4.6.1 Gebruikte monitoring methode.....	14
4.6.2 Huidig monitoring methode	14
4.6.3 MS scan methode	18
4.6.4 MS opereer methode	19
4.7 Kwantificatie	20
4.7.1 Regressie	20
4.7.2 Interne standaarden	20
4.7.3 Quality Control (QC)	20
4.8 Experimentele methode.....	21
4.8.1 Kwalifier / Quantifier methode.....	21
4.8.2 Solid Phase Extraction (SPE)	21
5 Experimenteel	22
5.1 Chemicaliën.....	22
5.1.1 Antidepressiva	22
5.1.2 Eluens en overige vloeistoffen.....	22
5.1.3 Vaste stoffen	22
5.2 Instrumentatie	23
5.2.1 Analyse systeem	23
5.2.2 Kolommen	23
5.2.3 SPE	23
5.2.4 Pipetten	23
5.2.5 Analytische balans	23
5.3 Werkwijze.....	24
5.3.1 Werkwijze samenvatting	24
5.3.2 Voorbereiding.....	26
5.3.3 Massaspectrometrie	28
5.3.4 Chromatografie (methode 1).....	30
5.3.5 Kwantificatie.....	34
5.3.6 Prestatie kenmerken analyse methode 3	51
6 Resultaten.....	54
6.1 Literatuurstudie.....	54
6.1.1 Chromatografie	54
6.1.2 Massaspectrometrie.....	54
6.1.3 Opwerking en kwantificatie.....	54
6.2 Voorbereiding	55
6.2.1 Antidepressiva oplossingen	55
6.3 Massaspectrometrie	56
6.3.1 Transitie & massaspectrometrie component optimalisatie	56
6.4 Chromatografie	58
6.4.1 Individuele chromatografie	58

6.4.2	Kolom keuze experiment	59
6.4.3	Eluens keuze experiment (ammoniumacetaat buffer vs. ammoniumformiaat buffer)	61
6.4.4	Kwalitatieve suppressie bepaling	63
6.4.5	Kolom D met isocratisch systeem 1	65
6.4.6	isocratisch systeem 2 op Kolom D	65
6.5	Optimalisatie van gevoeligheid	66
6.5.1	Transitie selectie	67
6.5.2	Verschil in gevoeligheid antidepressiva tussen acetaat buffer (standaard) en formiaat-buffer	68
6.5.3	Handmatige MS optimalisatie	69
6.5.4	Gevoeligheid optimalisatie eluens additieven	73
6.6	Kwantificatie	75
6.6.1	Toevoegen van interne standaarden	75
6.6.2	Interne standaard toewijzing	75
6.6.3	Lineariteit	76
6.7	Houdbaarheidsonderzoek	90
6.7.1	Vorbereiding	90
6.7.2	Korte termijn houdbaarheid (stabiliteit)	90
6.7.3	Lange termijn houdbaarheid (stabiliteit) in methanol bij 8°C	91
6.8	Prestatie kenmerken vastleggen analyse methode 1	92
6.8.1	Kwantitatieve suppressie bepaling methode 1 met 1:2 plasma : neerslagvloeistof verhouding	92
6.9	Analyse methode 2: chromatografie op kolom B	95
6.9.1	Chromatografie & Suppressie methode 2	95
6.10	Analyse methode 3	99
6.10.1	Chromatografie en kwalitatieve suppressie op kolom D met gradiënt methode	99
6.10.2	Recovery van analyse methode 3	100
6.10.3	Prestatie kenmerken analyse methode 3	101
7	Discussie	113
7.1	Vorbereiding	113
7.1.1	Opnemen van antidepressiva in methode ontwikkeling	113
7.1.2	Controleren en bestellen van antidepressiva en chemicaliën	113
7.1.3	Uitgesloten antidepressiva	114
7.1.4	Bereiden van individuele 100 mg/l antidepressiva oplossingen	114
7.2	Massaspectrometrie	115
7.2.1	Opnemen van transitie	115
7.2.2	Desmethyl Fluoxetine	115
7.3	Chromatografie	116
7.3.1	Individuele chromatografie	116
7.3.2	Kolom Keuze	116
7.3.3	Eluens keuze	117
7.3.4	Eluens verhouding	118
7.3.5	Kwalitatieve suppressie bepaling	119
7.4	Optimalisatie van systeem gevoeligheid	120
7.4.1	Onderscheid van signaal sterkte	120
7.4.2	Transitie selectie	121
7.4.3	Handmatige MS optimalisatie	121
7.4.4	Eluens optimalisatie	123
7.5	Kwantificatie	124
7.5.1	Toevoegen van interne standaard	124
7.5.2	Interne standaard toewijzing	124
7.5.3	Lineariteit	124
7.5.4	Recovery	127
7.5.5	Vorbewerkingsmethoden	128
7.6	Houdbaarheidsonderzoek	130
7.6.1	Korte termijn stabiliteit van antidepressiva oplossingen in serum bij 20 °C	130
7.6.2	Lange termijn stabiliteit van antidepressiva oplossingen in methanol bij 8 °C	131
7.7	Prestatiekenmerken van analyse methode 1	131
7.7.1	Kwantitatieve & kwalitatieve suppressie op analyse methode 1	131
7.8	Chromatografie methode 2	133
7.8.1	Gradiënt systeem op kolom B	133
7.8.2	Suppressie en elutie profiel van chromatografie methode 2	133

7.8.3	Piek vorm van chromatografie methode 2	133
7.9	Chromatografie methode 3.....	135
7.9.1	Gradiënt systeem op kolom D	135
7.9.2	Suppressie en elutie profiel van chromatografie methode 3	135
7.9.3	Druk verloop & analyse tijd	135
7.9.4	Recovery van analyse methode 3	136
7.10	Prestatie kenmerken analyse methode 3.....	136
7.10.1	Kwantitatieve suppressie bepaling	136
7.10.2	Lineariteit	138
7.10.3	Carry-over	138
7.10.4	Specificiteit	139
7.10.5	Recovery	139
7.10.6	Precisie en accuraatheid	140
8	Conclusie	142
9	Aanbeveling	143
10	Na woord	143
11	Referenties	144
12	Bijlage	146
12.1	Instrumenteel verslag 'Thermo Scientific, Quantum Acces Max' massaspectrometer	146
12.1.1	Ionisatiebron; Heated Electro Spray Ionisation	146
12.1.2	Interface regio	147
12.1.3	Triple quad (analyzer regio)	148
12.1.4	Detector	150
12.1.5	Vacuüm systeem	151
12.2	'Thermo Scientific Quantum Access Max' top weergaven	152
12.3	'Q00 ion optics' doorsnede	153
12.4	Bijlage 3: 'Q0 ion optics' doorsnede	154
12.5	Bijlage 4: Schematische weergaven van MS detector	155
12.6	Chemicaliën	156
12.6.1	Antidepressiva	157
12.6.2	Vloeistoffen	172
12.6.3	Vaste stoffen	172
12.7	Werking quadrupole massa filter	173
12.8	Therapeutische grens gebieden antidepressiva	174
12.9	"Amitriptyline & Nortriptyline" methode	175
12.10	Chromatogrammen individuele chromatografie	176
12.10.1	Antidepressiva	176
12.10.2	Metaboliëten	177
12.10.3	Gedeuteerde referentie stoffen	178
12.11	Resultaten samenvatting literatuurstudie	179
12.12	Massaspectrometrie	180
12.12.1	Transities	180
12.12.2	Tube lens optimalisatie	181
12.13	Kwantificatie	181
12.13.1	Regressie lijnen	181
12.14	Bijlage prestatie kenmerken	181
12.14.1	Specificiteit	181

3 Afkortingen

Afkorting Betekenis

(u)HPLC	(ultra) High Pressure Liquid Chromatography (hoge druk vloeistof chromatografie)
1/x	Gewogen regressie model
a	Richtingscoëfficiënt
AC	Alternating Current (wissel spanning)
AC.	Academische Standaard
ACN	Acetonitril
AD.	Antidepressiva
Arb	Arbitrary units (grootheid loze eenheid)
b	As-afsnede
B.ASc.	Bachelor of Applied Sciences and Chemistry
B.I.	Betrouwbaarheidsinterval
C18	Octadecyl
C8	Octaan
CID	Collision Induced Fragmentation (botsing geïnduceerde fragmentatie)
CITO	Spoed aanvraag van bio analytische bepaling
CV	Coëfficiënt of Variation (relatieve standaard deviatie)
DC	Direct Current (gelijk spanning)
DM.	Desmethyl (biologisch afbraakproduct)
Dx	Gedeuteerde antidepressiva
EMA	Europeaan Medicine Agency
Gem.	Gemiddeld
H ₂ O	Water
H ₃ PO ₄	Fosforzuur
HCOOH	Mierenzuur
H-ESI	Heated-Electro Spray Ionisation
HLB	Hydrophobic Lipophilic Balans
I.D.	Interne Diameter
I.S.	Interne standaard
ID.	Identificatie
ISTD	Interne Standaard
LC-MS	Vloeistofchromatografie-Massaspectrometrie
LLE	Liquid Liquid Extraction (vloeistof vloeistof extractie)
LLOQ	Lower Limit of Quantification (onder limiet van de kwantificatie)
LOD	Limit of Detection
M.E	Matrix Effect
m/z	Mass to Charge Ratio (massa lading verhouding)
MCX	Mixed Cation Exchange
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
Mnd.	Maand
MRM	Multi Reaction Monitoring
MS	Massaspectrometrie / massaspectrometer
n	Aantal
n.v.	Neerslag vloeistof
NDRI	Norepinephrine Dopamine Reuptake Inhibitor
NH ₄ CO ₂	Ammoniumformiaat
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxide
OLVG	Onze Lieve Vrouwe Gasthuis
P.E.	Post Extraction

Vervolg van afkortingen lijst op volgende pagina

Vervolg afkortingen lijst

Afkorting Betekenis

PPT	Proteïne Precipitation (proteïne precipitatie)
Prak.	Praktische (concentratie)
Q(1, 2 of 3)	Quadrupole 1/3
QA	Quality Assurance
QC	Quality Control
QQQ	Triple Quadrupole
r^2	Correlatiecoëfficiënt
rec.	Recovery
RP	Reversed Phase (Chromatography)
RPM	Rates Per Minut (toeren per minuut)
S(X)	Standaard
SARI	Serotonin Antagonist and Reuptake Inhibitor
SEH	Spoed Eisende Hulp (afdeling)
Si	Theoretische concentratie regressiepunt
SIM	Selected Ion Monitoring
SNRI	Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Single Reaction Monitoring
SSRI	Serotonin Selective Reuptake Inhibitor
std.	Standaard
std. Dev.	Standaard Deviatie
sy/x	Standaard fout
T	Tijd
TCA	Tricyclische antidepressiva
TDM	Therapeutic Drug Monitoring (therapeutische drug monitoring)
TEA	Triethylamine
Theo.	Theoretische (concentratie)
ULOQ	Upper Limit of Quantification (boven limiet van de kwantificatie)
UP	Ultra Pure
V	Volt
Wi	Weegfactor
Xi	Concentratie (bekende)
Yi	Signaal (area/area IS)

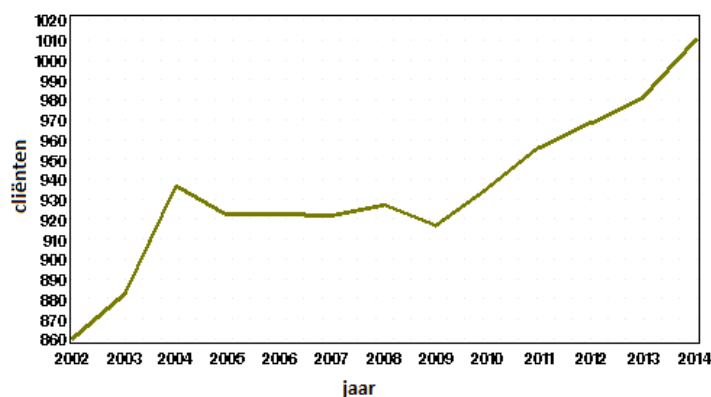
4 Inleiding

Depressie is een van de meest voorkomende psychische afwijkingen welke miljoenen mensen wereldwijd treft. Depressie is een benaming voor een stemmingsstoornis die zich kenmerkt door een verlies aan levenslust of zware neerslachtigheid. Wanneer een depressie niet behandeld wordt, kan dit leiden tot ernstige chronische en levensbedreigende situaties. Dergelijke situaties kunnen het economische en sociale leven van een individu drastisch beïnvloeden. In de meest extreme situaties lijdt depressie tot zelfmoord. Zelfmoord is een groot gezondheidsprobleem en gezondheidsgevaar, welke in Europa verantwoordelijk is voor 60.000 doden per jaar (EU-27(2010)) ^[1]. Zelfmoord wordt sterk geassocieerd met slechte mentale gezondheid en in het bijzonder met stemmingsstoornissen ^[3].

Antidepressiva medicijnen worden het meest gebruikt bij de behandeling van stemmingsstoornissen. In Nederland worden er jaarlijks één miljoen mensen behandeld aan stemmingsstoornissen, ^[2] (zie Figuur 1) met een totale uitgifte van ongeveer 9,5 miljoen recepten in 2014 ^[2]. Therapeutische drug monitoring van antidepressiva is essentieel voor optimale supervisie van de patiënt. Onder deze supervisie vallen de controle op intoxicatie, werkzaamheid en inname van medicatie door de patiënt (therapie trouwheid). Deze informatie is van essentieel belang voor de behandelaar om de patiënt zo efficiënt en veilig mogelijk te behandelen.

Het aantal gebruikers van antidepressiva, 2002 - 2014

1 = 1000 cliënten



Figuur 1: Aantal gebruikers van antidepressiva in Nederland tussen 2002 en 2014 ^[2]

4.1 Doelstelling

Het laboratorium van de ziekenhuisapotheek van het OLVG bepaald de concentratie van 13 antidepressiva in serum met behulp van de techniek LC-MS². Alle antidepressiva worden nu met verschillende analysemethode geanalyseerd. Het laboratorium wilt graag één uniforme multicomponent analysemethode voor het bepalen van deze antidepressiva in serum. Dit verslag beschrijft de kwalitatieve en kwantitatieve methodeontwikkeling plus de optimalisatie van de analyse methode voor het bepalen van deze 13 antidepressiva en 10 metabolieten van deze antidepressiva in serum met behulp van LC-MSMS, alsmede de validatie van deze methode. Daarnaast wordt een methode vergelijking uitgevoerd van twee opwerkingsmethoden; 'Solid Phase Extraction' (SPE) en proteïne precipitatie.

De analyse methode wordt ontwikkeld voor de volgende antidepressiva en bijbehorende metabolieten: Amitriptyline en Nortriptyline, Citalopram en Desmethylcitalopram, Clomipramine en Desmethylclomipramine, Dosulepine en Desmethyldosulepine, Duloxetine, Fluoxetine en Norfluoxetine, Fluvoxamine, Imipramine en Desipramine, Maprotiline en Desmethylmaprotiline, Mirtazapine en Desmethyilmirtazapine, Paroxetine, Sertraline en Norsertraline en Venlafaxine en Norvenlafaxine.

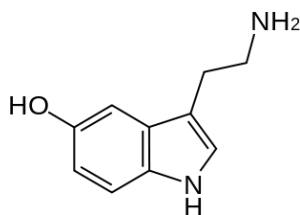
4.2 Reden voor de methode ontwikkeling

Binnen Nederland zijn er een aantal ziekenhuizen die antidepressiva in serum kunnen bepalen. Door een groeiend aantal patiënten welke behandeld worden voor depressieve stemmingsstoornissen, is het financieel aantrekkelijk om de patiënt monsters zelf te analyseren. Bij de beschikking over één multicomponent analysemethode kunnen verschillende antidepressiva in serum bepaald worden in één opwerking en analyse reeks, waardoor tijd en chemicaliën bespaart kunnen worden.

Daarnaast moet het laboratorium van de apotheek over een eigen analysemethode beschikken, om cito (spoed) analyses uit te kunnen voeren in opdracht van de SEH.

4.3 Oorzaak van depressie

De exacte oorzaak van een depressie is niet bekend en verschilt per persoon, waardoor het gericht behandelen van dergelijke symptomen lastig is. Er zijn verschillende fysieke en chemische factoren welke een depressie kunnen veroorzaken. Lang werd gedacht dat depressie veroorzaakt werd door schommelingen van het gehalte serotonine in het lichaam. Het chemisch mechanisme van depressie is echter complexer en hangt af van een groot aantal hormonen en eiwitten, tevens variëren deze chemische factoren per persoon. Serotonine, dopamine, endorfine en noradrenaline zijn hormonen welke een significante rol kunnen spelen bij depressie.



Figuur 2: 5-hydroxytryptamine ((5-HT) serotonine)

4.4 Medicatie soorten

In Nederland zijn er 25 verschillende antidepressiva op de markt welke voorgeschreven kunnen worden ter bestrijding van depressieve stemmingsstoornissen [4]. De antidepressiva zijn opgedeeld in groepen op hun structuur en werking.

4.4.1 Geschiedenis

4.4.1.1 Voor 1950

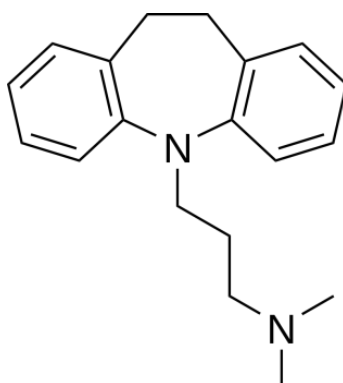
Voor 1950 waren er nog geen gerichte antidepressiva op de markt, patiënten met depressieve symptomen werden vaak behandeld met morfinomimeticum (opiaten en opioïden) en amfetamines. Het gebruik van morfinomimeticum en amfetamines als middel ter bestrijding van depressieve symptomen werd echter verboden wegens de geringe effectiviteit, de vele bijwerkingen en de verslavende karakteristieken van deze middelen.

4.4.1.2 Eerste generatie antidepressiva: Tricyclische antidepressiva

Na de geboorte explosie rondom 1950 ontstond er een vraag naar een medicijn tegen postnatale depressie. Halverwege de jaren '50 werd er voor het eerst geëxperimenteerd met het gebruik van tricyclische antidepressiva (TCA) bij de bestrijding van depressieve klachten.

Tricyclische antidepressiva dankt zijn naam aan zijn chemische structuur, welke opgebouwd zijn uit drie cyclische koolstof ringen. Imipramine was de eerste TCA welke getest werd op de antidepressieve werking en bleek zeer succesvol in het bestrijden van depressieve symptomen. Zelfs bij de meest zware depressies bleek het medicijn succesvol. Eind jaren 50 verschenen er naast imipramine nog enkele andere succesvolle TCA op de markt, waaronder amitriptyline. TCA worden naast de behandeling van stemmingsstoornissen tegenwoordig ook gebruikt voor de behandeling van onder andere migraine, chronische pijn, mentale stoornissen, etc.

Het mechanisme van TCA is complex en niet volledig begrepen. De meeste TCA blokkeren de heropname van het hormoon noradrenaline. De heropnamen van noradrenaline kan geremd worden door de noradrenalinetransporters te blokkeren (met TCA). Hierdoor verblijft het noradrenaline in de synaptische spleet, welke bij depressie in te lage concentratie aanwezig kan zijn.



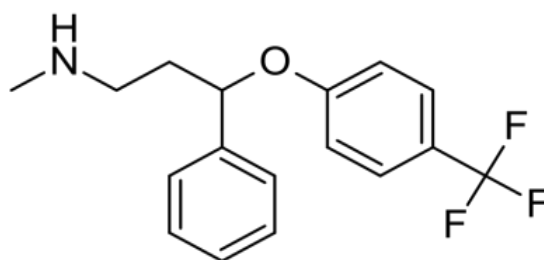
Figuur 3: Structuurformule van imipramine (TCA)

4.4.1.3 Tweede generatie antidepressiva: Serotonin selective reuptake inhibitor

Eind jaren '60 werden psychische afwijkingen waaronder stemmingsstoornissen meer erkend als medische aandoening. Dit leidde tot een grotere vraag naar antidepressiva, met als gevolg dat commerciële bedrijven betere, meer selectieve medicijnen op de markt brachten. Eind jaren '80 verschenen de eerste 'serotonin selective reuptake inhibitor' antidepressiva (SSRI) op de markt.

De SSRI antidepressiva zijn selectiever tegen de bestrijding van depressieve symptomen en hebben daardoor minder bijeffecten ten opzichten van de krachtigere TCA. Verder zijn de SSRI antidepressiva bij een overdosis aanzienlijk minder toxisch dan de TCA, waardoor een overdosis van dit medicijn tot minder ernstige complicaties zal leiden. Daarom worden SSRI in de meeste landen vaker voorgeschreven dan de vaak effectievere TCA [8].

Het mechanisme van SSRI's is complex en niet volledig begrepen. De hypothese is dat SSRI's de heropname van het hormoon serotonine blokkeren in de presynaptische cel. De heropname van serotonine kan geremd worden door de serotoninetransporters te blokkeren (met SSRI's). Hierdoor verblijft het serotonine in de presynaptische cel, welke bij depressie in te lage concentratie aanwezig kan zijn.



Figuur 4: Structuurformule van fluoxetine (SSRI)

4.4.1.4 Overige generaties

Na de jaren '80 zijn er enkele antidepressiva op de markt gekomen met een specifieke werking. De meest voorgeschreven moderne antidepressiva zijn de: 'serotonin antagonist and reuptake inhibitor' (SARI), de 'serotonin norepinephrine reuptake inhibitor' (SNRI) en de 'norepinephrine dopamine reuptake inhibitor' (NDRI). De SSRI en TCA antidepressiva zijn in Nederland de meest voorgeschreven soorten antidepressiva [4].

4.5 Patiënt monitoring

Patiënt monitoring is essentieel voor het effectief behandelen van een patiënt. Monitoring wordt op meerdere manieren uitgevoerd. Een veel toegepaste techniek is de ‘dose titration’ techniek, waarbij de response van een patiënt op een medicijn waargenomen wordt door een behandelaar. Aan de hand van de waargenomen symptomen stelt de behandelaar de dosis van het medicijn bij.

‘Therapeutic Drug Monitoring’ (TDM) is het monitoren van een patiënt. Met TDM is er chemische inzage in de inname van medicatie door een patiënt. Door verbeterende analyse technieken en dalende kosten wordt TDM toegankelijker en meer toegepast. Een combinatie van ‘dose titration’ en TDM wordt tegenwoordig toegepast voor het behandelen van depressie in Nederland.

4.5.1 Medicatie effectiviteit

‘Therapeutic Drug Monitoring’ is het systematische controleren van een patiënt. Bij TDM wordt er routinematig bloed afgenomen. Het afgenomen bloed wordt gecontroleerd op de hoeveelheid medicijn. Aan de hand van deze resultaten wordt samen met ‘dose titration’ de hoeveelheid medicijn aangepast zodat de patiënt voorzien is van de optimale hoeveelheid medicijn. Op deze wijze ondervindt de patiënt een optimale behandeling met de minst mogelijke bijwerkingen. TDM is daarom een essentieel onderdeel in de behandeling tegen stemmingsstoornissen van een patiënt. ‘Therapeutic Drug Monitoring’ voor TCA blijkt bovendien effectiever in de behandeling tegen depressie dan alleen klinische opinies (dose titration) van professionals/behandelars ^[5].

4.5.2 Medicatie ineffectiviteit

Naast de effectiviteit van een medicijn, kan ook de ineffectiviteit van een medicijn gemeten worden met behulp van TDM. Doordat de mechanismen van depressies nog niet volledig bekend zijn en de oorzaak van depressies verschilt per patiënt, verschilt ook de effectiviteit van de antidepressiva. Met behulp van TDM kan sneller verondersteld worden of een antidepressiva de juiste werking op een patiënt heeft en of er eventueel overgegaan moet worden op een ander type antidepressiva. De patiënt kan hierdoor sneller effectief behandeld worden tegen stemmingsstoornissen.

4.5.3 Misbruik van medicatie en controle van inname

Door de sterke associatie van stemmingsstoornissen en depressie met suïcidale neigingen, is het van essentieel belang dat medicatie ingenomen wordt zoals een arts of professional dat voorschrijft. Met behulp van TDM is er direct inzicht in de inname van medicatie en kunnen er acties ondernomen worden wanneer medicatie misbruikt wordt, hierdoor neemt de veiligheid van de patiënt door TDM toe.

4.6 Instrumentele monitoring en theoretische achtergrond

4.6.1 Gebruikte monitoring methode

De monitoring van antidepressiva kan met behulp van verschillende analyse technieken. Gaschromatografie en vloeistofchromatografie zijn de meest gebruikte technieken [6]. Tevens kan het gehalte antidepressiva in verschillende matrices bepaald worden. Enkele voorkomende matrices zijn bloed, urine, plasma en serum, waarvan serum de meest gebruikte matrix is [6]. Wat betreft de voorbereiding van het bepalen van antidepressiva in plasma of serum is geen voorkeursmethode, Solid Phase Extraction (SPE), Liquid Liquid Extraction (LLE), Online SPE en protein precipitation (PPT) worden alle frequent toegepast.

4.6.2 Huidig monitoring methode

Op het laboratorium van de ziekenhuisapotheek van het OLVG oost worden alle niet metallische antidepressiva bepaald met een PPT voorbereidingsmethode, de analyt scheiding vindt plaats met '(Ultra) High Pressure (performance) liquid chromatograph' (UHPLC). De detectie vindt plaats met een 'mass spectrometer' (MS).

4.6.2.1 Systeem & werkmethode

De 'UHPLC' is uitgevoerd met een quaternaire pomp waardoor gradiënt methoden mogelijk zijn. De MS is een triple quadrupole massa spectrometer, met mogelijkheid tot 'Single' en 'Multi Reaction Monitoring' (SRM en MRM respectievelijk). De ionisatie wordt uitgevoerd met een 'Heated Electro Spray Ionisation' (HESI) zachte ionisatie bron. De kwantificatie vindt gewoonlijk plaats aan de hand van een vijf-punts kalibratie lijn. De regressie wordt gecontroleerd aan de hand van één of twee quality control (QC) monsters.



Figuur 5: Thermo Scientific (Dionex) Ultimate 3000 UHPLC & Thermo Scientific Quantum Access Max MS

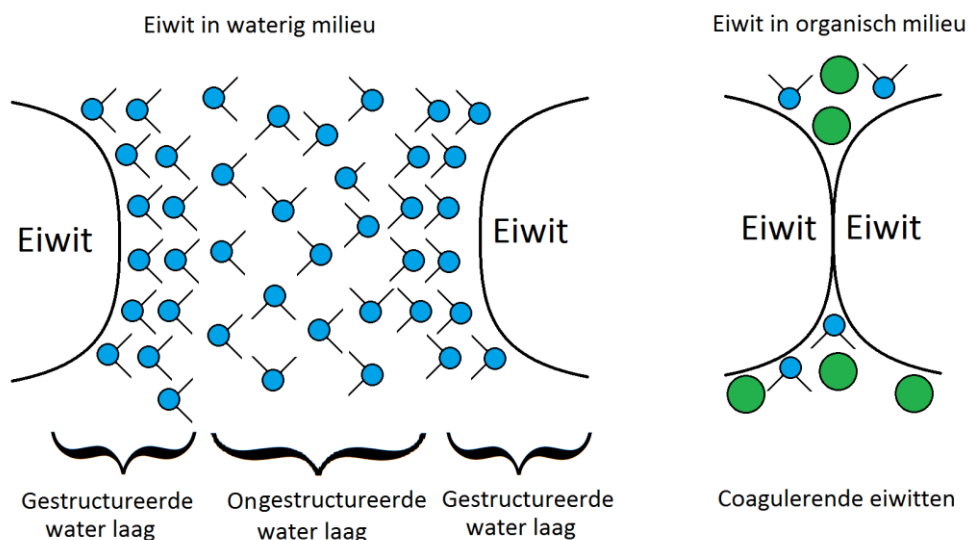
4.6.2.2 'Protein Precipitation' methode (PPT)

De voorbereiding van het monster voor de analyse van antidepressiva in patiënten materiaal met UPLC wordt met een PPT methode opgewerkt. Met deze PPT methode wordt volbloed verwerkt tot bloedserum.

De monsters worden aangeleverd als buizen met volbloed welke voorzien zijn van een antistollingsmiddel, waarna deze gecentrifugeerd worden. Door het centrifugeren ontstaat er een fase scheiding van rode-bloedcellen en bloedplasma. Bloedplasma is het bloedvloeistof zonder bloedcellen. Het bloedplasma wordt gescheiden van de overig vloeistof.

Aan het bloedplasma wordt vervolgens stollingsvloeistof toegevoegd waardoor coagulatiefactoren neerslaan. De coagulatiefactoren zijn grote eiwitten welke relatief makkelijk neerslaan. In een waterig milieu slaan deze grotere eiwitten niet neer doordat alle eiwitten omringt worden door een laag water, waardoor deze in oplossing blijven. De water laag om deze eiwitten, ontstaat doordat de eiwitten polaire en ionische gebieden bevatten. De water moleculen vormen waterstofbruggen en ionische verbindingen met deze gebieden. Wanneer bijvoorbeeld organische vloeistoffen zoals bijvoorbeeld acetonitril, toegevoegd worden, verdwijnen de waterlagen om de eiwitten. De eiwitten gaan onderling hechten doormiddel van waterstofbruggen en ionische verbindingen, waardoor grote, niet oplosbare eiwitten ontstaan (zie figuur 6). De niet oplosbare eiwitten slaan vervolgens neer (coagulatie).

De verkregen oplossing wordt vervolgens opnieuw gecentrifugeerd, waarna de bovenstaande vloeistof gescheiden kan worden van de coagulatie. Serum is bloedplasma zonder coagulatiefactoren. Gedurende het analyse proces heeft serum de voorkeur boven plasma, omdat deze minder snel verstoppingen veroorzaakt in de UHPLC. Figuur 6 geeft het PPT mechanisme weer:



Figuur 6: PPT mechanisme: Blauw = water molecuul, groen = organisch oplosmiddel

4.6.2.3 UHPLC en scheidingsmechanisme

De UHPLC zorgt voor de onderlinge scheiding van antidepressiva. De matrix (serum) en onderlinge antidepressiva worden doormiddel van reverse-phased (RP) chromatografie van elkaar gescheiden. Het analyt wordt door een autosampler opgenomen en geïnjecteerd in het UHPLC systeem. In de UHPLC wordt het analyt mee genomen door een mobiele fase onder hoge druk. Het analyt wordt vervolgens door een kolom geleid voorzien van een pakkingsmateriaal (stationaire fase). Het pakkingsmateriaal bestaat uit een silica basis welke voorzien is van een apolaire hars. Door de stationaire fase en de mobiele fase wordt het antidepressiva van zijn matrix gescheiden door middel van verschil in polariteit.

Polariteit is een fysisch fenomeen wat moleculen ondervinden wanneer het centrum van een positieve lading binnen een molecuul, niet samenvalt met een centrum van de negatieve lading van het molecuul, ofwel; een molecuul beschikt over een verschil in dipoolmoment. Hoe sterker het verschil in dipool moment in een molecuul voorkomt, hoe polairder het molecuul is. Componenten met een hoge polariteit stoten componenten met een lage polariteit af en trekken componenten met een hoge polariteit aan.

In de kolom stelt het analyt een evenwicht in tussen mobiele fase en de stationaire fase. Polaire componenten uit het analyt, zoals het matrix, hebben weinig tot geen affiniteit met de apolaire stationaire fase en zullen zich meer verdelen in de polaire mobiele fase. De mobiele fase stroomt door de kolom heen en neemt zo de polaire componenten uit het analyt mee. De apolaire componenten uit het analyt, zoals het antidepressiva, hebben wel affiniteit met de stationaire fase en ondervinden retentie. Hierdoor verblijft het antidepressiva langer in de kolom dan het polaire matrix, waardoor matrix en antidepressiva van elkaar gescheiden kunnen worden. De verschillende antidepressiva onderling beschikken ook over een verschil in dipoolmoment en kunnen zo onderling van elkaar gescheiden worden. Doordat de UHPLC gekoppeld is aan een MS² is volledige onderlinge scheiding van de antidepressiva niet van essentieel belang, doordat de MS² ook in staat is onderscheid te maken tussen het analyt. Enige onderlinge retentie is echter wel gewenst.

De UHPLC is van het merk 'Thermo Scientific', model: 'Ultimate 3000'. De UHPLC beschikt over een quaternaire pomp, waardoor gradiënt systemen mogelijk zijn.

4.6.2.4 Massa spectrometer; massa detectie

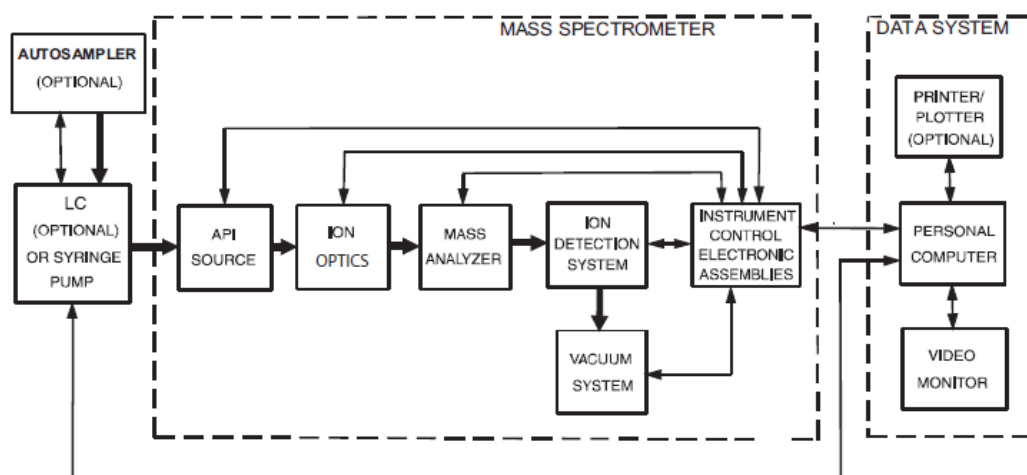
Na de scheiding van de analyten onderling en het matrix, door de UHPLC, komt de mobiele fase stroom aan bij de detector. De detectie van het analyt vindt plaats met een massaspectrometer.

Massaspectrometrie is een analyse techniek die componenten kan kwalificeren en kwantificeren aan de hand van de massa en lading van een component. Een massa spectrometer meet de massa lading verhouding van een geladen fragment of parent ion (ionen). Een massa spectrometer voorziet analyt van een lading met een ionisatie bron. Wanneer het analyt geladen is beschikt deze over een magnetisch veld, welk beïnvloedbaar is.

De massaspectrometer creëert een magnetisch veld welk inkomende ionen in een positie forceert. Deze positie forcering is dermate specifiek dat enkel de ionen met een specifieke massa lading verhouding de detector kunnen bereiken. De massaspectrometer is zo in staat alle ongewenste materie te verwijderen van het gewenste analyt. Het gewenste analyt bereikt vervolgens de detector welke gedetecteerd wordt aan de hand van een elektrisch signaal, afkomstig van de ionen.

De massaspectrometer is van het merk 'Thermo Scientific' model 'Quantum Access Max' en beschikt over een 'Triple Quadrupole' (QQQ) massafilter. De ionisatie van het analyt vindt plaats met 'Heated Electro Spray Ionisation' (HESI) zachte ionisatie techniek. De detectie vindt plaats met een 'electron multiplier' [7]. Voor uitgebreide informatie over de 'Quantum Access Max', de theoretische achtergrond en de gebruikswijzen van de massa spectrometer zie bijlage 12.1: Instrumenteel verslag Thermo Scientific "Quantum Access Max".

Figuur 7 geeft een blokschema van de Quantum Access Max weer.



Figuur 7: Blokschema Thermo Scientific Quantum Access Max MS

4.6.3 MS scan methode

De massaspectrometer kan op verschillende methode opereren. Bij methode ontwikkeling worden twee methoden toegepast; Product Scan methode en de Selected Ion Monitoring (SIM) methode.

4.6.3.1 Product scan

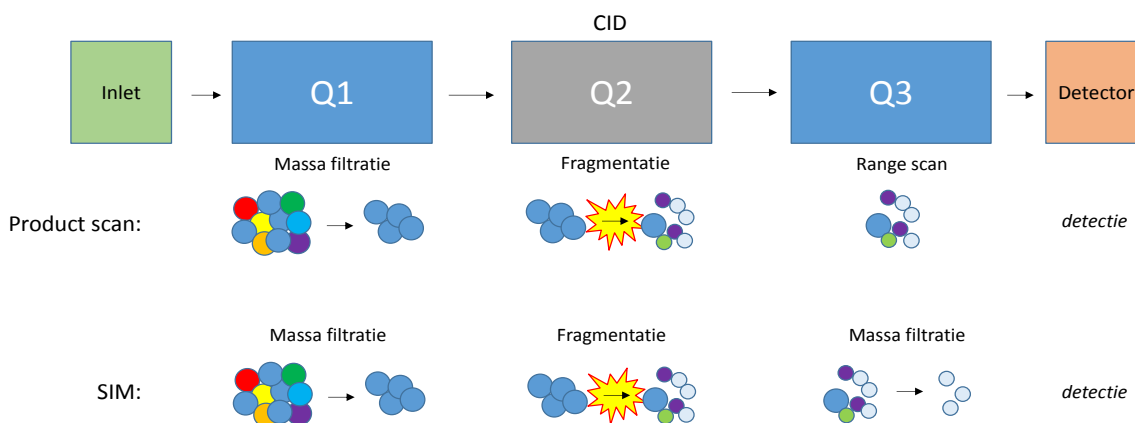
Bij een 'product scan' wordt er gebruik gemaakt van twee stadia massa filtratie. In stadium één wordt Q1 ingesteld om op één specifieke massa lading verhouding te filtreren. De specifieke massa lading verhouding ionen bereiken vervolgens Q2, waar de ionen gefragmenteerd worden. Alle fragment ionen worden doorgeleid naar Q3. Quadrupole Q3 wordt vervolgens ingesteld om het volledige massa bereik te scannen (zie Figuur 7).

De product scan is in staat om van één antidepressiva een volledig fragmentatie patroon op te nemen, ook wel transitie genoemd. Bij een transitie wordt het DC voltage op quadrupole Q3 uitgezet tegen de intensiteit van de detector over een massa gebied (bijvoorbeeld m/z 50 tot en met 500). De transitie geeft inzicht bij welk voltage een massa lading verhouding een signaal produceert. Aan de hand van deze kennis kan een voltage met bijbehorende massa gekozen worden voor het monitoren van fragment ionen van antidepressiva. De product scan wordt alleen gebruikt tijdens de analyse methode ontwikkeling om transities van componenten in kaart te brengen.

4.6.3.2 Selected Ion Monitoring (SIM)

Bij SIM wordt er gebruikt gemaakt van twee stadia massa filtratie. In stadium één wordt Q1 ingesteld om één specifieke massa lading verhouding ionen te filteren. De specifieke massa lading verhouding ionen bereiken vervolgens Q2, waar de ionen gefragmenteerd worden. Alle fragmenten worden doorgeleid naar Q3. In stadium twee wordt Q3 ingesteld om één specifieke massa lading verhouding te filteren en door te laten naar de detector.

Met de SIM methode is het mogelijk om zeer lage concentraties analyt in zeer vervuilde matrices te meten. Doordat er twee stadia aan specifieke massa filtratie zijn bereikt weinig ongewenste materie de detector, waardoor de LOD daalt. Ook wordt niet het gehele massa bereik gemonitord, waardoor de MS kan focussen op één of enkele massa's, waardoor de LOD nog verder daalt. Figuur 8 geeft weergaven van de MS scan methodes weer.



Figuur 8: Schematische weergaven van MS scan methode

4.6.4 MS opereer methode

De MS staat gewoonlijk gekoppeld met een UHPLC, welke voor de scheiding van het analyt zorgt. Het analyt kan echter op meerdere manieren geïntroduceerd worden in het MS systeem.

4.6.4.1 uHPLC-MS (reguliere analyse)

Tijdens reguliere analyses wordt de MS gekoppeld aan een UHPLC. Het UHPLC systeem is voorzien van een auto-sampler, welke het analyt introduceert. De UHPLC pompt het analyt door het systeem, richting de massaspectrometer. Doordat het analyt gescheiden wordt van zijn matrix, verlaagd de achtergrond ruis en matrix effecten.

4.6.4.2 Directe infusie massaspectrometrie (ontwikkeling & optimalisatie)

De MS kan met behulp van 'directe infusie' voorzien worden van analyt zonder dat deze de UHPLC passeert. Hierdoor kunnen externe storingsfactoren, afkomstig van de UHPLC vermeden worden gedurende optimalisatie (of analyse). Bovendien kan met behulp van directe infusie MS een constante stroom analyt in de MS geïntroduceerd worden.

Met directe infusie wordt een injectienaald voorzien van analyt. De injectienaald wordt aangesloten op het MS systeem en in een houder geplaatst. Een arm drukt met een constante kracht (constant debiet) op de plunjer, waardoor analyt de MS in geïntroduceerd wordt. Doordat er een constante stroom aan analyt geïntroduceerd wordt, geeft dit een stabiel signaal. Door het stabiele signaal kunnen MS parameters goed geoptimaliseerd worden.

4.6.4.3 Ion suppressie bepaling (ontwikkeling & optimalisatie)

De formatie van ionen is essentieel voor massa spectrometrie. Serum bevat een aantal componenten welke de ionisatie van het antidepressiva kunnen onderdrukken, doordat deze makkelijker geïoniseerd worden dan het antidepressiva zelf. Fosfaten nemen bijvoorbeeld lading gemakkelijk over van het antidepressiva en onderdrukt hierdoor de ionisatie. Om componenten goed te kunnen kwantificeren is het van belang dat alle componenten ten alle tijden constant geïoniseerd worden. De elutie van de ion onderdrukkende componenten moet daarom in kaart gebracht worden.

Bij een ion suppressie bepaling wordt gebruik gemaakt van zowel UHPLC-MS als directe infusie MS. Met behulp van een 'threeway connector' worden de UHPLC-MS stroom en de directe infusie stroom aan elkaar gekoppeld, waarna deze gezamenlijk de MS bereiken.

Door de directe infusie stroom te voorzien van antidepressiva, vertoont het chromatogram een hoge basislijn (het antidepressiva bereikt continu de detector). Wanneer de UHPLC matrix injecteert zullen de componenten uit de matrix een retentie ondervinden, waarna deze vervolgens de MS bereiken. In de MS onderdrukt de matrix de ionisatie van het antidepressiva waardoor een dip in de basislijn waarneembaar is. De elutie van de componenten die ion suppressie veroorzaken zijn op deze wijze in kaart te brengen.

De chromatografie moet zo worden afgesteld (kolom, eluens verhouding en additieven) dat de elutie van antidepressiva gescheiden wordt van de elutie van de componenten die suppressie veroorzaken.

4.7 Kwantificatie

Het gehalte antidepressiva in een patiënt moet kwalitatief en kwantitatief bepaald kunnen worden. Om de kwaliteit te kunnen borgen van de kwantitatieve analyseresultaten worden in de analyse methode een aantal technieken toegepast.

4.7.1 Regressie

Alle antidepressiva worden bepaald aan de hand van een vijfpunts kalibratielij. De concentraties van de kalibratiepunten worden gebaseerd op de therapeutische index van de antidepressiva (zie bijlage 12.8). De concentraties van de laagste kalibratiepunten bedragen maximaal een half keer de 'laag therapeutische waarden' van het desbetreffende antidepressiva. De concentratie van de hoogste kalibratiepunten bedragen minimaal twee keer de hoog therapeutische waarden van het desbetreffende antidepressiva.

Voor het opwerken van de kalibratielij wordt gespiked plasma gebruikt. De opwerking van de kalibratiepunten is identiek aan de opwerking van de reguliere monsters.

4.7.2 Interne standaarden

Alle analyse resultaten worden gecorrigeerd door gebruik te maken van interne standaarden, om onnauwkeurigheden tijdens het opwerkingsproces, fluctuaties in gevoeligheid en injectie volume te corrigeren. Bij de analyse methode wordt gebruik gemaakt van gedeuteerde interne standaarden. Gedeuteerde interne standaarden zijn chemicaliën welke gedeuteerde methylgroepen bevatten. De waterstof atomen welke verbonden zijn aan het koolstof atoom binnen een methylgroep zijn voorzien van een neutron. Hierdoor neemt de massa per gedeuteerde methylgroep met 3 gram per mol toe. De massaspectrometer is in staat onderscheid te maken tussen componenten en hun gedeuteerde variant. De gedeuteerde variant beschikt over vrijwel identieke fysische eigenschappen, daarom zijn ze zeer representatief en geschikt als interne standaard.

Voor de analyse methode wordt een vijftal gedeuteerde interne standaarden gekozen. Amitriptyline-D₃, Citalopram-D₆ en Venlafaxine-D₆ werden vooraf gekozen wegens hun uiteenlopende fysische eigenschappen en hun frequente aanvraag binnen het OLVG. Nadat het elutie profiel van de analyse methode bevestigd is, worden nog extra interne standaarden gekozen, zodat het chromatogram zo volledig en homogeen mogelijk gedekt is.

4.7.3 Quality Control (QC)

De regressielijnen worden gedurende reguliere analyses bij OLVG Oost gecontroleerd aan de hand van twee QC monsters, welke onafhankelijk zijn opgewerkt ten opzichte van de regressielijn. Voor de opwerking van de QC monsters wordt gespiked plasma gebruikt. De opwerking van de QC monsters is identiek aan de opwerking van de reguliere monsters. Één QC bevindt zich in het lage gebied van de kalibratielij, en één QC bevindt zich in het hoge gebied van de kalibratielij. Gedurende de validatie worden eisen vast gesteld omtrent het afwijken van QC's ten opzichte van de kalibratielij.

4.8 Experimentele methode

4.8.1 Kwalifier / Quantifier methode.

De 'kwalifier quantifier' methode is een MS scan techniek. Met de kwalifier quantifier methode worden er door de massa spectrometer systematisch twee fragmenten gemonitord na de fragmentatie van een specifieke massa lading verhouding. De geladen fragmenten die gevormd worden zijn specifiek voor het molecuul waarin je geïnteresseerd bent. Het monitoren van twee fragmenten biedt daarom extra kwalitatieve informatie.

Bij de kwalifier quantifier methode wordt één van de twee gemonitorde fragmenten gebruikt voor de kwantificatie alsmede voor de kwalificatie van het molecuul waarin je geïnteresseerd bent. Het andere gemonitorde fragment wordt enkel gebruikt voor kwalitatieve informatie.

4.8.2 Solid Phase Extraction (SPE)

SPE is een voorbereiding en extractie methode van de analyt oplossing. Met SPE kunnen de antidepressiva worden vast gehecht aan een stationaire fase, terwijl matrices met behulp van een mobiele fase doorgespoeld worden. De antidepressiva kunnen vervolgens van de stationaire fase verwijderd worden door de stationaire fase met een geschikt eluens te elueren. Het mechanisme van SPE is vergelijkbaar met die van een LC systeem. Met SPE is het mogelijk om analyt te zuiveren en te concentreren, waardoor lage aantoonbaarheidsgrenzen behaald kunnen worden.

4.8.2.1 Hydrophilic lipophilic balans PRIME (HLB PRIME) SPE

De HLB SPE is een sterke reversed phase kolom. De antidepressiva ondervinden retentie door de sterke hydrofiele interactie van het kolommateriaal. Water, fosfaten en overige polaire componenten ondervinden geen retentie door het kolommateriaal van de HLB SPE kolom. De HLB is een universele SPE kolom welke gebruikt kan worden voor alle vrije basen. De HLB PRIME is een driestaps SPE. De conditioneer en equilibreer stap zijn bij de HLB PRIME niet nodig, waardoor sw throughput verhoogt.

4.8.2.2 Mixed Cation Exchange (MCX) SPE

De MCX SPE is een sterk kationische, reversed phase spe kolom. De antidepressiva nemen makkelijk een positieve lading aan, doordat alle antidepressiva stikstof atomen bevatten. De positief geladen stikstof atomen kunnen een ionische binding aan gaan met de sterk kationische stationaire fase van de MCX SPE kolom. Daarnaast ondervinden de antidepressiva retentie door de reversed phase interactie van de kolom. De MCX SPE wordt gebruikt voor basische componenten met een pK_a tussen de 2 en de 10.

4.8.2.3 Hydrophilic lipophilic balans (HLB) SPE

De HLB SPE is een sterke reversed phase kolom. De antidepressiva ondervinden retentie door de sterke hydrofiele interactie van het kolommateriaal. Water, fosfaten en overige polaire componenten ondervinden geen retentie door het kolommateriaal van de HLB SPE kolom. De HLB is een universele SPE kolom welke gebruikt kan worden voor alle vrije basen.

5 Experimenteel

5.1 Chemicaliën

5.1.1 Antidepressiva

Amitriptyline hydrochloride & desmethyl amitriptyline hydrochloride (nortriptyline), imipramine hydrochloride & desmethyl imipramine (desipramine) hydrochloride, clomipramine hydrochloride & desmethyl clomipramine hydrochloride, citalopram hydrobromide, fluoxetine hydrochloride, fluvoxamine maleaat, paroxetine hydrochloride, sertraline hydrochloride & desmethyl sertraline hydrochloride, maprotiline hydrochloride, mirtazapine & desmethyl mirtazapine hydrochloride en venlafaxine hydrochloride waren van Sigma Aldrich, Darmstad, Duitsland.

Desmethyl fluoxetine, desmethyl venlafaxine, desmethyl sertraline, desmethyl citalopram, amitriptyline D3, citalopram D6, venlafaxine D3, clomipramine D3 en imipramine D6 waren van Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, Verenigde Staten.

Dosulepine hydrochloride, desmethyl maprotiline hydrochloride, desmethyl dosulepine hydrochloride waren van LGC, Teddington, Middlesex, Verenigd Koninkrijk.

Duloxetine hydrochloride was van Eli Lilly & Company, Indianapolis, Indiana, Verenigde Staten en desmethyl citalopram hydrochloride was van Lundbeck, Kopenhagen, Denemarken.

Voor uitgebreide informatie van de gebruikte antidepressiva, zie bijlage 12.6.1.

5.1.2 Eluens en overige vloeistoffen

Acetonitril en methanol waren HPLC kwaliteit (>99%), Ultrapure-acetonitril was UPLC kwaliteit (100%), mierenzuur (98-99%), azijnzuur (>99%), fosforzuur (85%) en ammoniak (25%) waren analytische kwaliteit van Merck, Darmstadt, Duitsland. Triethylamine was analytische kwaliteit (>99%) van Sigma Aldrich, Darmstadt, Duitsland. 2-propanol was UPLC-MS kwaliteit van Fluka, Darmstadt, Duitsland.

Voor uitgebreide informatie van de vloeistoffen zie bijlage 12.6.2.

5.1.3 Vaste stoffen

Ammoniumacetaat en ammoniumfluoride waren 'trace metal' kwaliteit (>99,9%), ammoniumformaat en zinksulfaat heptahydraat en uracil waren analytische kwaliteit (>99,0%) van Sigma Aldrich, Darmstadt, Duitsland.

Voor uitgebreide informatie van de vaste stoffen zie bijlage 12.6.3.

5.2 Instrumentatie

5.2.1 Analyse systeem

De UPLC is van het merk Thermo Scientific, model Ultimate 3000. De massaspectrometer is van het merk Thermo Scientific, model Quantum Access Max. De Quantum Access Max is uitgevoerd met een H-ESI bron. De massa selectie vindt plaats aan de hand van een triple quadrupole massaspectrometer welke voorzien is van 'collision cell' technologie. De detectie vindt plaats aan de hand van een 'Electron Multiplier'. De UHPLC en de MS staan gekoppeld, waardoor analyt onderling kan scheiden, alvorens deze de MS bereikt. Tevens kan de MS geopereerd worden met directe infusie, waardoor het UHPLC traject overgeslagen kan worden.

Voor uitgebreide informatie over de Thermo Scientific Quantum Access Max massaspectrometer, zie bijlage 12.1 voor een instrumenteel verslag.

5.2.2 Kolommen

De 'ZORBAX Eclipse C18 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron', de 'ZORBAX Eclipse C8 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron' en de 'ZORBAX Eclipse C8 Analytical 4.6 x 150mm 5-micron' waren van Agilent, Santa Clara, California, Verenigde Staten. De 'Acquity UPLC® HSS T3 1.8µm 2,1 x 100 mm' (C18) was van Waters Chromatography, Dublin, Ierland.

5.2.3 SPE

De 'MCX 1CC 30 mg sorbent', de 'HLB 1CC 30 mg sorbent' en de 'HLB PRIME SPE 1 CC 10 mg sorbent' kolommen waren van Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Verenigde Staten.

5.2.4 Pipetten

De 'M25E', de 'M100E', de 'M250E' en de 'M1000E' 'Microman E Positive-Displacement' pipetten waren van Gilson, Middleton, Wisconsin, Verenigde Staten. De pipetten hebben een gezamenlijk bereik van 3 tot 1000 µl. De pipetten zijn geschikt voor het kwantitatief pipetteren van vluchtige en viskeuze vloeistoffen.

5.2.5 Analytische balans

De ME 5-OCE analytische balans was van Sartorius. De analytische balans had een (vermeld) effectief bereik van 1 mg tot en met 5100 mg en rapporteerde op 4 getallen na de komma nauwkeurig.

5.3 Werkwijze

5.3.1 Werkwijze samenvatting

Een literatuurstudie naar de ontwikkeling voor een multi-component analysemethode van antidepressiva met LC-MS werd uitgevoerd. Alle chemicaliën werden gecontroleerd op aanwezigheid en kwantiteit. Vervolgens werden individuele 100 mg/l antidepressiva test oplossingen bereid, welke werden door verdund tot 1mg/l, 100 µg/l, 5 µg/l en 1 µg/l oplossingen. Er werden transities van de antidepressiva opgenomen door de 1 mg/l antidepressiva oplossing te infuseren in de MS. De resultaten van de transities werden in de opgenomen analyse methode.

Er werden chromatogrammen opgenomen met verschillende kolommen en verschillende eluens verhoudingen, om zo een kolom keuze te kunnen maken en de eluens verhouding vast te stellen. Er werden een kwalitatieve suppressies uitgevoerd voor het bepalen van het suppressieprofielen van de analyse methoden. Er werden verschillende buffers getest, waarbij de piek vorm en de piek intensiteit van de eluerende antidepressiva met elkaar vergeleken werden. De ionisatiebron van de MS werd geoptimaliseerd door de gevoeligheid te monitoren van de 5 µg/l antidepressiva test oplossing, met wisselende ionisatiebron parameters.

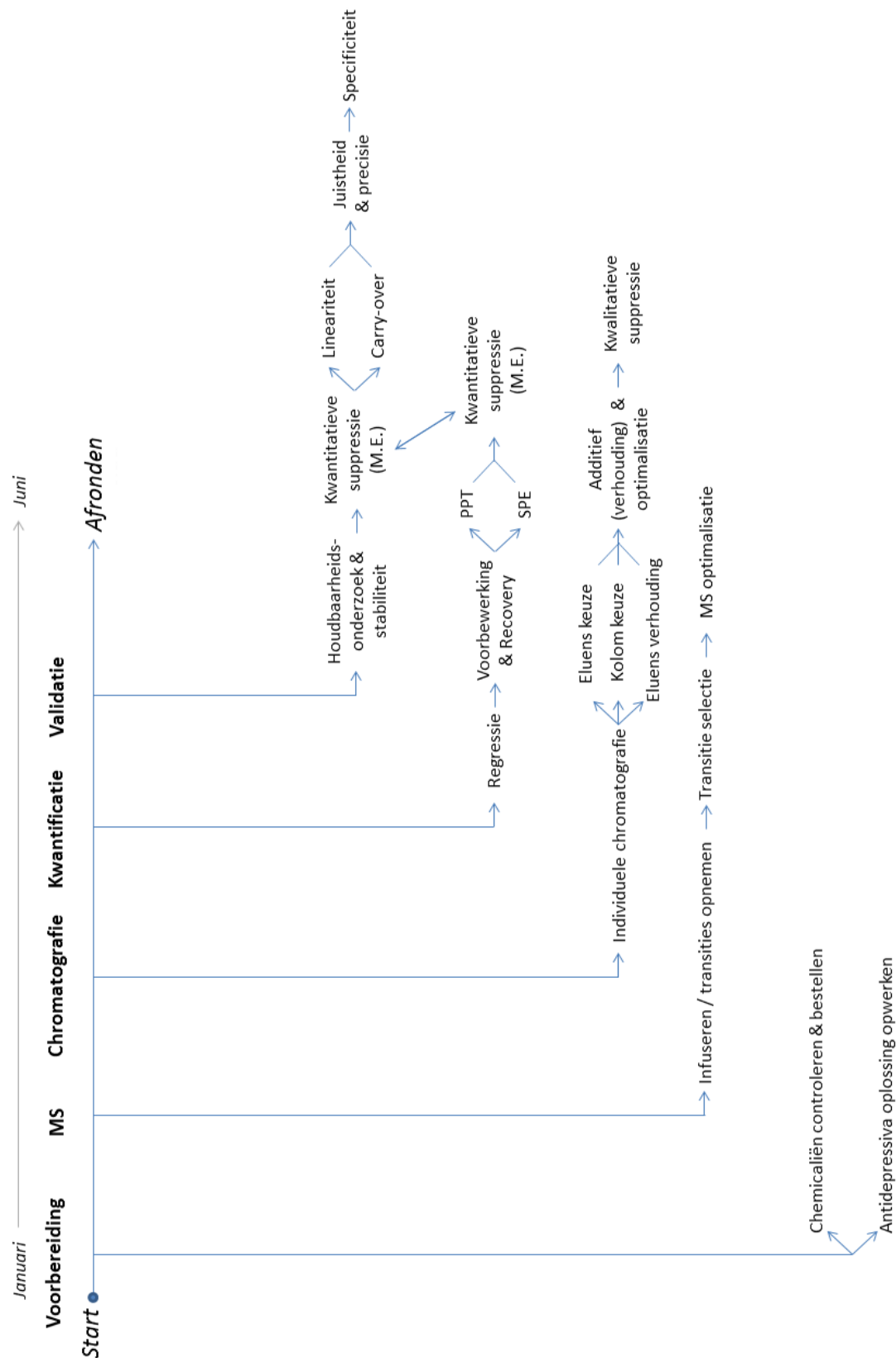
De lineariteit van de analyse methode werd bepaald door regressie oplossingen te analyseren. Aan de hand van de regressie oplossingen werd tevens de recovery van de analyse methode, en de recovery van de PPT opwerkingsmethode bepaald. De monster voorbewerkingsmethode werd getest door verschillende precipitatie methoden, en SPE methoden met elkaar te vergelijken.

De lange termijn stabiliteit van antidepressiva in methanol bij 8°C en korte termijn stabiliteit van antidepressiva in serum bij 20°C werd bepaald. Vervolgens werden de prestatiekenmerken van analysemethode (methode 1) vastgelegd door het bepalen van het matrix effect, de juistheid en precisie, de lineariteit, de carry-over en de specificiteit. De analyse methode voldeed niet aan een van de prestatiekenmerken, waardoor een nieuwe chromatografische analyse methode moest worden opgezet.

Er werd een gradiënt methode opgesteld (analyse methode 2). Er werd een kwalitatieve suppressie uitgevoerd voor het bepalen van het suppressieprofiel van analyse methode 2. Vervolgens werd er getest met verschillende eluens addities om de piek vorm van analyse methode 2 te verbeteren. De piek vorm was niet naar wens, waardoor een nieuwe chromatografische analyse methode moest worden opgezet

Er werd een nieuwe gradiënt methode opgesteld (analyse methode 3), met een zwakke neerwaartse en opwaartse gradiënt helling. Er werd een kwalitatieve en kwantitatieve suppressie bepaling uitgevoerd voor het bepalen van het de matrix effecten en het suppressieprofiel van analyse methode 3. Vervolgens werden overige prestatiekenmerken van de analyse methode vastgelegd door het bepalen van de juistheid en precisie, lineariteit, carry-over en specificiteit.

Werkschema voor: “De ontwikkeling van een multicomponent-analysemethode voor het bepalen van antidepressiva in bloedserum met LC-MS²”



5.3.2 Voorbereiding

Voor een overzicht van alle bereide oplossingen, zie bijlage 12.6.1.5

5.3.2.1 Bereiden van 100 mg/l antidepressiva oplossingen in methanol

Er werd met behulp van een microbalans 1 mg antidepressiva afgewogen, welke gecorrigeerd was voor zijn zout. De antidepressiva werden kwantitatief overgebracht in maatkolven van 10 ml met methanol, waarna deze werden aangevuld en gehomogeniseerd. De oplossingen werden gecodeerd als A1 tot en A26 (zie Tabel 1).

Tabel 1: 100 mg/l antidepressiva test oplossingen (A)

A	Nr.	Stof	A	Nr.	Stof
<i>Antidepressiva</i>			<i>Desmethyl</i>		
A	1	Amitriptyline	A	15	Citalopram
A	2	Citalopram	A	16	Clomipramine
A	3	Clomipramine	A	17	Dosulepine
A	4	Dosulepine	A	19	(nor)Fluoxetine
A	5	Duloxetine	A	20	(desi)Imipramine
A	6	Fluoxetine	A	21	Maprotiline
A	7	Fluvoxamine	A	22	Mirtazapine
A	8	Imipramine	A	24	(nor)Amitriptyline
A	9	Maprotiline	A	25	(Nor)venlafaxine
A	10	Mirtazapine	A	26	Sertraline
A	11	Paroxetine			
A	12	Sertraline			
A	14	Venlafaxine			

5.3.2.2 Bereiden van 1 mg/l antidepressiva oplossingen

Oplossingen A1 tot en met A26 werden 100 keer verdund. Er werd 50 µl van de 100 mg/l antidepressiva oplossingen (A1 tot en met A26) gepipetteerd in reageerbuizen van 10 ml. De reageerbuizen werden aangevuld tot 5000 µl met methanol.

5.3.2.3 Bereiden van 100 µg/l antidepressiva oplossing

De 100 mg/l antidepressiva oplossingen (5.3.2.1) werden 1000 keer verdund. Er werd 0,01 ml 100 mg/l antidepressiva oplossing (5.3.2.1) van elke antidepressiva (A1 tot en met A26) in één maatkolf van 10 ml gepipetteerd, waarna de maatkolf werd aangevuld tot 10 ml met methanol.

5.3.2.4 Bereiden 5 µg/l antidepressiva oplossingen

De 100 µg/l antidepressiva oplossing (0) werd 20 keer verdund. Er werd 0,5 ml 100 µg/l antidepressiva oplossing gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml, waarna de maatkolf werd aangevuld tot 10 ml met methanol.

5.3.2.5 Bereiden 1 µg/l antidepressiva oplossingen

De 100 µg/l antidepressiva oplossing (0) werd vijf keer door verdund. Er werd 0,1 ml 5 µg/l antidepressiva oplossing gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml waarna de maatkolf werd aangevuld tot 10 ml met methanol

5.3.2.6 **Eluens**

5.3.2.6.1 acetaat buffer

Er werd 2,3 gram ammoniumacetaat afgewogen op een analytische balans. Het afgewogen ammoniumacetaat werd kwantitatief overgebracht in 3000 ml 'ultra pure' (UP) water. Er werd 50 ml 100% azijnzuur aan de acetaatoplossing toegevoegd. De verkregen oplossing werd gehomogeniseerd met behulp van een roerflow en een roerplaat. De oplossing werd ontluicht met behulp van een ultrasoon bad. De oplossing werd overgeschonken in een fles, waarna de oplossing op de UPLC geplaatst werd.

5.3.2.6.2 formiaat buffer

Er werd 0,630 gram ammoniumformiaat afgewogen op een analytische balans en kwantitatief overbracht in een maatkolf van 1000 ml met UP water. Er werd 1,0 ml 99% mierenzuur gepipetteerd bij de ammoniumformiaat oplossing. De oplossing werd aangevuld tot 1000 ml, waarna de oplossing werd gehomogeniseerd, ontluicht en overgeschonken in een eluens fles.

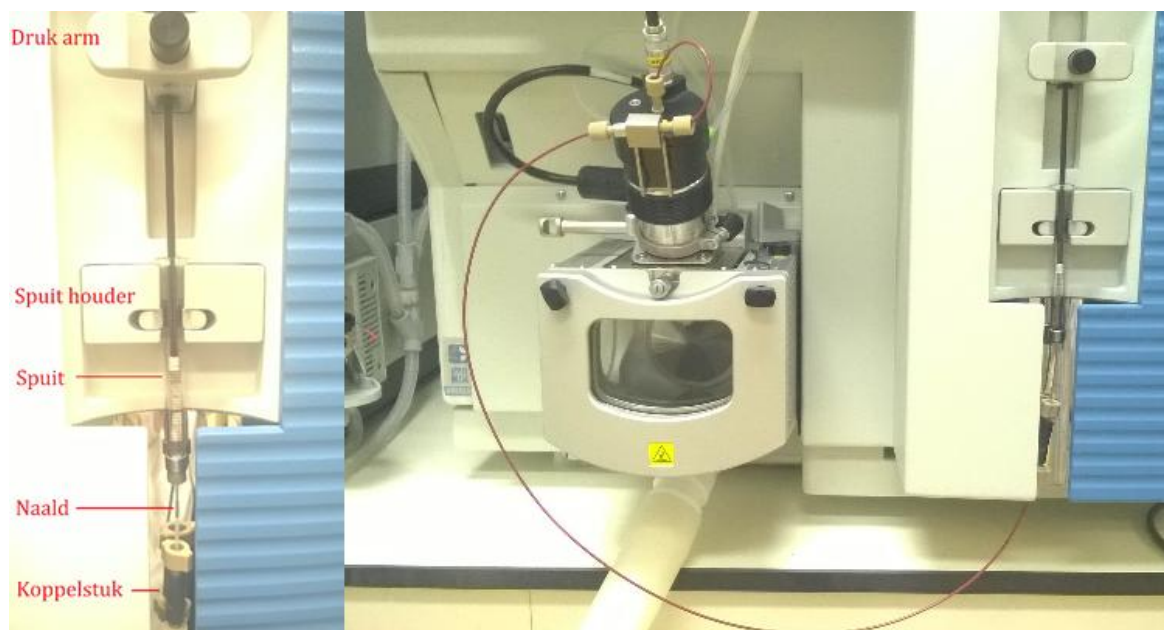
5.3.2.6.3 Acetonitril + 0,1% mierenzuur

Er werd 1,0 ml 100% mierenzuur gepipetteerd bij 1000 ml acetonitril. De oplossing werd gehomogeniseerd, ontluicht en overgeschonken in een eluens fles, waarna de oplossing op de UPLC aangesloten werd.

5.3.3 Massaspectrometrie

5.3.3.1 Directe infusie massaspectrometrie

De massaspectrometer werd ontkoppeld van de UPLC en gekoppeld aan een aansluitstuk voor directe infusie (zie Figuur 9). Het aansluitstuk en de bron werden twee keer gespoeld met 50 μ l methanol, en twee keer met 1 mg/l antidepressiva oplossing. De vloeistofspuit werd opnieuw voorzien van 50 μ l 1 mg/l antidepressiva oplossing, waarna de vloeistofspuit aangesloten werd op het koppelstuk. De vloeistofspuit werd in de spuithouder geplaatst, waarna de druk arm tegen de plunjer gepositioneerd werd. De druk arm werd geactiveerd, waardoor de druk arm een continue vloeistof flow van 10 μ l/min. creëerde, welke direct de HESI bron ingeleid werd.



Figuur 9: Directe infusie opstelling

De massaspectrometer werd digitaal ingesteld om een gebied rondom de massa van het antidepressiva te scannen (antidepressiva massa $\pm$ 20 m/z). Wanneer een piek (signaal) gedetecteerd werd, werd de massa waar de piek zich bevond genoteerd. De genoteerde waarden werden vervolgens ingesteld voor het opnemen van een transitie van deze massa.

5.3.3.2 Transitie selectie

De twee meest intense transitie's (Relatieve intensiteit tegenover Collisie energie (V)) werden geselecteerd en opgenomen in de analyse methode voor het monitoren van de antidepressiva. Hierbij werden gelijke massa's met gelijke transitie's van de antidepressiva onderling vermeden.

5.3.3.3 **Systeem gevoeligheid optimaliseren (MS).**

5.3.3.3.1 Voltage

De 1 µg/l antidepressiva test oplossing werd in triplo geanalyseerd met 3000, 3500, 4000 en 4500 volt op het capillaire van de ionisatie bron.

5.3.3.3.2 Sheath gas

De 1 µg/l antidepressiva test oplossing werd in triplo geanalyseerd bij 5, 10, 20 en 30 ml/min. 'sheath gas' in de ionisatie bron.

5.3.3.3.3 Auxilairy gas

De 1 µg/l antidepressiva test oplossing werd in triplo geanalyseerd bij 5, 15, 30 en 45 ml/min. 'sheath gas' in de ionisatie bron.

5.3.3.3.4 Vaporizer temperature

De 1 µg/l antidepressiva test oplossing werd in triplo geanalyseerd bij 250, 300, 350 en 400 °C 'vaporizer temperature' in de ionisatie bron.

5.3.4 Chromatografie (methode 1)

De systeeminstellingen van de “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost (zie bijlage 12.9) werd als uitgangspunt genomen voor de chromatografie, om een basispunt te hebben om vanuit door te werken.

5.3.4.1 Individuele chromatografie

De massaspectrometer werd gekoppeld aan de UPLC. De 1 mg/l antidepressiva test oplossingen (5.3.2.2) werden overgeschonken in vials, waarna deze in de autosampler van de UPLC werden geplaatst. Van alle componenten werden afzonderlijke chromatogrammen opgenomen met behulp van de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. De run tijd van de Amitriptyline & Nortriptyline methode werd verlengt tot 15 minuten, zodat zeker was dat alle componenten konden elueren.

5.3.4.2 Kolom keuze

De kolommen uit Tabel 2 waren aanwezig op het laboratorium en werden getest voor de chromatografie (voor het bepalen) van de antidepressiva. Er werd 1 ml 100 µg/l antidepressiva test oplossing (0) over gepipetteerd in een vial, waarna de vials in de autosampler van de UPLC werden geplaatst. De 100 µg/l antidepressiva test oplossing werd geanalyseerd met elke kolom, met de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost.

Tabel 2: Geteste kolommen

kolom	merk	type	stationaire fase	lengte (mm)	interne diameter (mm)	pakkingsgrootte (µm)
A	Agilent	Zorbax Eclipse	C18	150	4,6	5
B	Agilent	Zorbax Eclipse	C18	100	2,1	3,5
C	Waters	Acquity UPLC	C18	100	2,1	1,8
D	Agilent	Zorbax Eclipse	C8	150	4,6	5
E	Agilent	Zorbax Eclipse	C8	100	2,1	3,5

5.3.4.3 Eluens keuze

De 1 µg/l antidepressiva test oplossing werd in triplo geanalyseerd met de C8 150 mm kolom en de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost, met zowel de acetaat als de formiaat buffer op 55:45 acetonitrile:buffer verhouding.

5.3.4.4 Eluens verhouding

Er werd initieel getest met een isocratisch 55:45 acetonitril:formiaat buffer (5.3.2.6.2) systeem met kolom C en kolom D, met de 5 µg/l antidepressiva test oplossing. De eluens verhouding werd met stappen van 5% aangepast tot dat de antidepressiva retentie ondervonden, en alle componenten binnen 10 minuten elueerde. Er werd een gradiënt systeem ontwikkeld voor kolom C, om meer retentie te creëren bij de eerste eluerende componenten, maar de totale analyse tijd binnen 10 minuten te houden.

5.3.4.5 Eluens additieven

5.3.4.5.1 0,25% mierenzuur concentratie

Er werd 0,126 gram ammoniumformiaat afgewogen en kwantitatief overgebracht in 200 ml UP water (10 mmol/l ammoniumformiaat). Vervolgens werd er 0,5 ml 99% mierenzuur bij de ammoniumformiaat oplossing gepipetteerd. De oplossing werd gehomogeniseerd, ontlucht en overgeschonken in een eluens fles, waarna de oplossing op de UPLC werd aangesloten.

Er werd 0,5 ml 99% mierenzuur bij 200 ml acetonitril gepipetteerd. De oplossing werd gehomogeniseerd, ontlucht en overgeschonken in een eluens fles, waarna de oplossing op de UPLC aangesloten werd. Kolom D werd aangesloten op het UPLC-MSMS systeem. Het UPLC-MS systeem werd een half uur gestabiliseerd alvorens te analyseren.

De 1 µg/l antidepressiva oplossing werd geanalyseerd met de UPLC-MSMS met een 55:45 acetonitril : formiaat buffer met 0,25% mierenzuur, met analyse methode 1. De intensiteit (oppervlakte) van alle pieken en de vorm van de pieken werden vergeleken met de resultaten van het standaard eluens (0,1% mierenzuur).

5.3.4.5.2 25 mmol ammoniumformiaat

Er werd 0,315 gram ammoniumformiaat afgewogen en kwantitatief overgebracht in 200 ml UP water (25 mmol/l ammoniumformiaat). Vervolgens werd er 0,2 ml 99% mierenzuur bij de ammoniumformiaat oplossing gepipetteerd. De oplossing werd gehomogeniseerd, ontlucht en overgeschonken in een eluens fles, waarna de oplossing op de UPLC werd aangesloten.

De 1 µg/l antidepressiva oplossing werd geanalyseerd met de UPLC-MSMS met een 55:45 acetonitril : formiaat-buffer met 0,1% mierenzuur en 25 mmol ammoniumformiaat. De intensiteit (oppervlakte) van alle pieken en de vorm van de pieken werden vergeleken met de resultaten van het standaard eluens (10 mmol ammoniumformiaat).

5.3.4.6 Kwalitatieve Suppressie bepaling

De Agilent Zorbax Eclipse C8 150 mm 4,6 mm I.D. 5 μm (kolom D) en de Waters Acquity UPLC C18 100 mm 2,1 mm I.D. 1,8 μm (kolom C) werden getest op kwalitatieve suppressie.

5.3.4.6.1 Bereiden van 20:80 water:methanol neerslag vloeistof met 0,035 mol ZnSO_4

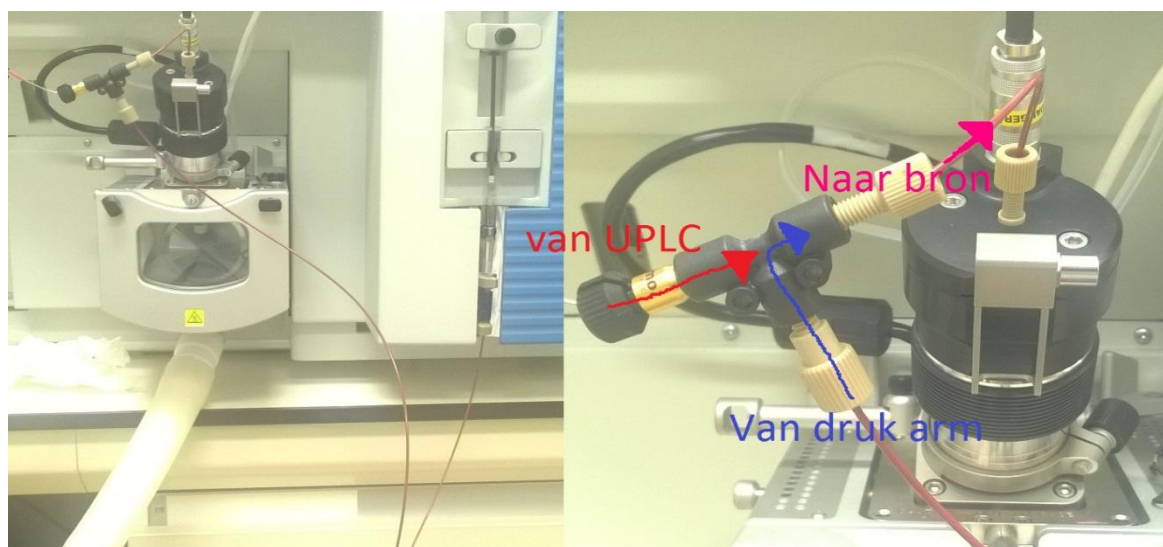
Er werd 10 gram zinksulfaat heptahydraat afgewogen op een analytische balans en kwantitatief overgebracht in een 1 liter maatcilinder die 200 ml UP water bevat. De oplossing werd aangevuld tot 1000 ml met methanol, waarna de oplossing werd gehomogeniseerd, ontluicht en overgeschonken in een eluens fles.

5.3.4.6.2 Suppressie monster

Blanco plasma werd opgewerkt door 500 μl lipemisch plasma te pipetteren in een reageerbuis. Aan de reageerbuis werd 500 μl neerslag vloeistof (5.3.4.6.1) toegevoegd. De oplossing werd gehomogeniseerd, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 5 minuten afgedraaid. De bovenstaande laag werd over geschonken in een vial, welke gecodeerd was als 'suppressie 1'.

5.3.4.6.3 Suppressie bepaling

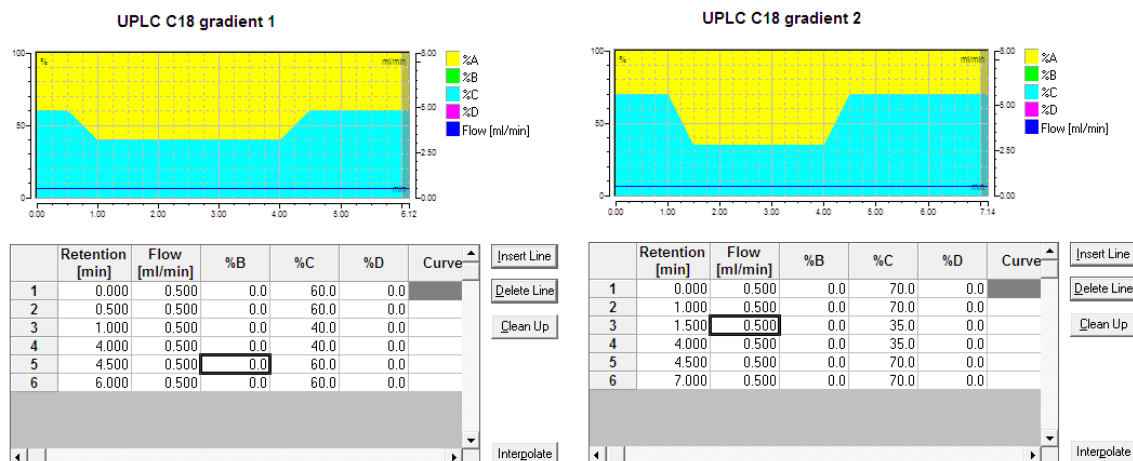
Kolom D werd in de UPLC geplaatst. De MS en de UPLC werden gekoppeld aan een 'three way connector' aansluitstuk voor suppressie bepaling (zie Figuur 10). Het aansluitstuk werd twee keer gespoeld met 50 μl methanol door een vloeistofspuit van 50 μl te vullen met methanol en deze aan te sluiten op het aansluit stuk. Vervolgens werd de spuit leeg gedrukt, waardoor de spuit, het aansluitstuk en de leidingen gespoeld werden met methanol. Het aansluit stuk werd vervolgens op dezelfde wijze gespoeld met 50 μl 100 $\mu\text{g/l}$ antidepressiva oplossing (0). De vloeistofspuit werd opnieuw voorzien van 50 μl 100 $\mu\text{g/l}$ antidepressiva oplossing, waarna de spuit aangesloten werd op het koppelstuk. De spuit werd in de spuithouder geplaatst, waarna de druk arm tegen de plunjer gepositioneerd werd. De druk arm werd geactiveerd, waardoor de druk arm een continue vloeistof flow van 10 $\mu\text{l/min}$. creëerde, welke direct de HESI bron ingeleid werd.



Figuur 10: Aansluiting suppressie bepaling (threeway connector) met schematische vloeistof stromen

De UPLC werd ingesteld op de start condities van de te bepalen methode. Het systeem werd twee minuten op deze wijze gestabiliseerd. Vervolgens werd de kwalitatieve suppressie bepaald door de UPLC 5 µl 'suppressie 1' monster te laten injecteren en analyseren.

Het proces werd herhaald met een isocratisch 50:50 acetonitril : formiaat-buffer verhouding op kolom D, en op twee gradiënt systemen (gradiënt 1 en 2), weergegeven in Figuur 11 op kolom C.



Figuur 11 Gradiënt systemen UPLC C18 kolom: C = percentage formiaat buffer

5.3.4.7 Toevoegen van interne standaarden

Er werden interne standaarden aan de analyse methode toegevoegd aan de hand van de verkregen chromatogrammen.

Er werd 0,1 ml oplossing uit de interne standaard ampullen (Venlafaxine D6, Citalopram D6 en Amitriptyline D3, Imipramine D6 en Clomipramine D3) gepipetteerd in individuele reageerbuizen. De reageerbuizen werden aangevuld tot 1 ml methanol, waarna deze vervolgens gehomogeniseerd werden. De concentratie van de interne standaard oplossingen bedroeg 1000 µg/l. De oplossingen werden vervolgens geïnfuseerd in de massaspectrometer (zie 5.3.3.1 voor werkwijze), waarna transitie opgenomen werden. De meest intense transitie werden toegevoegd bij de analyse methode voor het monitoren van antidepressiva.

5.3.5 Kwantificatie

5.3.5.1 Lineariteit

5.3.5.1.1 Bepalen van bereik

Het bereik van de componenten voor hun lineaire regressie werd bepaald aan de hand van de therapeutische index waarde van de component. Het bereik werd bepaald door een half keer de laag therapeutische index waarden, en twee keer de hoog therapeutische index waarden te nemen van iedere component, als richtlijn voor het kalibratiegebied.

5.3.5.1.2 Bereiden van 100 mg/l antidepressiva oplossingen voor regressie en recovery

Er werden nieuwe 100 mg/l antidepressiva oplossingen bereid, volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.2.1. De oplossingen werden gecodeerd B1 tot en met B26.

Tabel 3: 100 mg/l antidepressiva test oplossingen (B)

B	Nr.	Stof	B	Nr.	Stof
<i>Antidepressiva</i>			<i>Desmethyl</i>		
B	1	Amitriptyline	B	15	Citalopram
B	2	Citalopram	B	16	Clomipramine
B	3	Clomipramine	B	17	Dosulepine
B	4	Dosulepine	B	19	(nor)Fluoxetine
B	5	Duloxetine	B	20	(desi)Imipramine
B	6	Fluoxetine	B	21	Maprotiline
B	7	Fluvoxamine	B	22	Mitrazepine
B	8	Imipramine	B	24	(nor)Amitriptyline
B	9	Maprotiline	B	25	(Nor)venlafaxine
B	10	Mitrazepine	B	26	Sertraline
B	11	Paroxetine			
B	12	Sertraline			
B	14	Venlafaxine			

5.3.5.1.3 Bereiden van 'regressie oplossing B'

Er werd een hoeveelheid van elk component (zie Tabel 4) in één maatkolf van 10 ml gepipetteerd. De maatkolf werd aangevuld tot 10 ml met methanol, waarna de oplossing gehomogeniseerd werd. De oplossing werd overgebracht in een medicijnflesje van 10 ml, welke gecodeerd werd; 'regressie oplossing B'. Een tweede oplossing werd op dezelfde wijze opgewerkt voor monster A1 tot en met A26, welke gecodeerd werd; 'regressie oplossing A'.

Tabel 4: Hoeveelheid gepipetteerd voor regressie oplossing B'

B	Nr.	Stof	pipet (µl)	B	Nr.	Stof	pipet (µl)
<i>Antidepressiva</i>				<i>Desmethyl</i>			
B	1	Amitriptyline	250	B	15	Citalopram	50
B	2	Citalopram	250	B	16	Clomipramine	500
B	3	Clomipramine	250	B	17	Dosulepine	250
B	4	Dosulepine	250	B	19	(nor)Fluoxetine	500
B	5	Duloxetine	250	B	20	(desi)Imipramine	500
B	6	Fluoxetine	500	B	21	Maprotiline	500
B	7	Fluvoxamine	250	B	22	Mitrazepine	500
B	8	Imipramine	250	B	24	(nor)Amitriptyline	250
B	9	Maprotiline	500	B	25	(Nor)venlafaxine	250
B	10	Mitrazepine	100	B	26	Sertraline	100
B	11	Paroxetine	250				
B	12	Sertraline	500				
B	14	Venlafaxine	500				

5.3.5.1.4 Bereiden van interne standaard (ISTD) oplossing

Er werd 100 µl citalopram D6, venlafaxine D6, amitriptyline D3, clomipramine D3 en Imipramine D6 uit ampullen gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml. De maatkolf werd aangevuld tot 10 ml met methanol, waarna de oplossing gehomogeniseerd werd. De oplossing werd overgebracht in een medicijnflesje van 10 ml.

5.3.5.1.5 Bereiden lineariteit oplossingen

Er werd een vijfpunts-kalibratielijns opgewerkt door de hoeveelheden uit Tabel 5 in reageerbuizen te pipetteren. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd, waarna de oplossingen werden overgebracht in vials. De vials werden gecodeerd en vervolgens in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 5: Volumes gepipetteerd voor lineaire regressie

	Volume pipet (µl)				
ID.	S1	S2	S3	S4	S5
Meng oplossing (B)	10	20	50	100	200
ISTD	20	20	20	20	20
Water	970	960	930	880	780
Totaal (µl)	1000	1000	1000	1000	1000

5.3.5.2 Interne standaard toewijzing

Aan de hand van het elutie profiel van analyse methode 1 werden componenten interne standaarden toegewezen. Elk component kreeg de interne standaard toegewezen welke het dichtst bij het betreffende component elueerde.

5.3.5.2.1 Lineariteit bepaling (analyse methode 1)

De lineariteit van de componenten werd bepaald met de oplossingen bereid bij 5.3.5.1.5.

'kolom D werd in de UPLC geplaatst, met een eluens flow van 0,5 ml/min. en een eluens verhouding van 55:45 acetonitril : formiaat-buffer. De MS werd ingesteld op 3500 volt capillaire voltage, 20 ml/min. sheath gas, 30 ml/min. auxiliary gas en 350 °C vaporizer temperature (methode 1)'. Het systeem werd een half uur gestabiliseerd waarna de oplossingen in enkelvoud geanalyseerd werden. Het injectie volume bedroeg 10 µl.

5.3.5.3 Recovery

5.3.5.3.1 Regressie

Er werd een regressielijn opgesteld volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.1.5 (zie Tabel 5)

5.3.5.3.2 recovery in waterige matrix

Er werden recovery monsters opgewerkt door de hoeveelheden Tabel 6 bij elkaar te pipeteren in reageerbuizen. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd, waarna deze werden overgebracht in vials. De vials werden gecodeerd en in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 6: Volumes gepipetteerd voor recovery monsters

ID.	Volume pipet (µl)		
	rec. 1	rec. 2	rec. 3
<i>Regressie oplossing (A)</i>	20	50	100
<i>ISTD</i>	20	20	20
<i>Water</i>	960	930	880
<i>totaal</i>	1000	1000	1000

5.3.5.3.3 Recovery PPT t.o.v. schone regressie reeks

Er werd een tweede reeks recovery monsters opgewerkt met een proteïne precipitatie methode door de hoeveelheden uit Tabel 7 in reageerbuizen te pipetteren. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd, waarna 100 µl uit de reageerbuizen werd gepipetteerd in nieuwe reageerbuizen. Aan de 100 µl gespikete plasma werd er 400 µl neerslag vloeistof (5.3.4.6.1) toegevoegd. De oplossing werd geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende vijf minuten afgedraaid. De bovenstaande laag werd uit de reageerbuizen over geschonken in gecodeerde vials. De vials werden in de autosampler van de UPLC geplaatst. De regressielijn, de recovery monsters en de PPT recovery monsters werden vervolgens in enkelvoud geanalyseerd met analyse methode 1.

Tabel 7: Volumes gepipetteerd voor recovery monsters met PPT opwerkingsmethode

	Volume pipet (µl)		
ID.	rec. ppt 1	rec. ppt 2	rec. ppt 3
<i>meng oplossing (A)</i>	20	50	100
<i>ISTD</i>	20	20	20
<i>Plasma (blanco)</i>	960	930	880
<i>Totaal (µl)</i>	1000	1000	1000

5.3.5.3.4 PPT Recovery t.o.v. PPT regressie reeks

Er werd een vijf-punts kalibratielijn opgewerkt door de hoeveelheden Tabel 8 in reageerbuizen te pipetteren, waarna de reageerbuizen gehomogeniseerd werden. Er werd 100 µl uit de reageerbuizen gepipetteerd in nieuwe reageerbuizen. Aan de nieuwe reageerbuizen werd 400 µl neerslag vloeistof (5.3.4.6.1) toegevoegd. De oplossing werd geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 5 minuten afgedraaid. De bovenstaande laag werd uit de reageerbuizen over geschonken in gecodeerde vials. De vials werden in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 8: Volumes gepipetteerd voor lineaire regressie met PPT

	Volume pipet (µl)				
ID.	S1	S2	S3	S4	S5
<i>regressie oplossing (B)</i>	10	20	50	100	200
<i>ISTD</i>	20	20	20	20	20
<i>Plasma</i>	970	960	930	880	780
<i>Totaal (µl)</i>	1000	1000	1000	1000	1000

De regressielijn, de recovery monsters en de PPT recovery monsters werden vervolgens geanalyseerd met analyse methode 1.

5.3.5.4 Proteïne precipitatie

5.3.5.4.1 0,1 mol zinksulfaat oplossing

Er werd 1,4381 gram zinksulfaat heptahydraat afgewogen en kwantitatief over te brengen in een maatcilinder met UP water. De maatcilinder werd aangevuld tot 50 ml met UP water, waarna de oplossing werd gehomogeniseerd met een roerflow en roerplaat. De oplossing werd overgebracht in een 50 ml medicijnfles.

5.3.5.4.2 Plasma : neerslagvloeistof verhouding

5.3.5.4.2.1 Regressie

Er werd een regressielijn opgesteld volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.1.3 (zie Tabel 5.)

5.3.5.4.2.2 Plasma : neerslagvloeistof verhouding monsters

Er werd een reeks gespiked plasma monsters opgewerkt door de hoeveelheden uit Tabel 9 bij elkaar te pipeteren in reageerbuizen. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd.

Tabel 9: Volumes gepipetteerd voor recovery monsters met PPT opwerkingsmethode

	Volume pipet (µl)				
I.D.	S1	S2	S3	S4	S5
meng oplossing (a)	10	20	50	100	200
ISTD	20	20	20	20	20
Plasma	970	960	930	880	780
Totaal (µl)	1000	1000	1000	1000	1000

De gespikete plasma monsters en de neerslag vloeistof (5.3.5.4.1) werden bij elkaar gepipetteerd volgens de verhoudingen uit Tabel 10. De oplossingen werden geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 5 minuten afgedraaid. De bovenstaande laag werd uit de reageerbuizen over geschonken in gecodeerde vials. De vials werden in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 10: Plasma : Neerslag vloeistof verhoudingen

Plasma (µl)	100	100	250	250
Zinksulfaat 0,1 m (µl)	200	100	100	50
methanol (µl)	800	400	400	200
Totaal N.V. (µl)	1000	500	500	250
Verhouding plasma : NV	1:10	1:5	1:2	1:1

5.3.5.4.2.3 Plasma : NV analyse

De regressielijn en de recovery monsters werden in enkelvoud geanalyseerd met analyse methode 1.

5.3.5.5 Solid Phase Extraction (SPE) voorbereiding

5.3.5.5.1 Voorbereiding

Er werd een SPE bak gereinigd en onderhouden, door alle rubberen connecties te vervangen en in te smeren met vaseline. Vervolgens werd de SPE bak terug in elkaar gezet. De SPE bak werd aangesloten op een kraanwater vacuümsysteem.

5.3.5.5.2 Oplossingen

Tabel 11 geeft een overzicht van de oplossingen gebruikt gedurende de SPE voorbereiding.

Tabel 11: Oplossingen gebruikt gedurende SPE voorbereiding

Oplossing	nummer
4% fosforzuur	5.3.5.5.2.1
2% mierenzuur	5.3.5.5.2.2
5% ammoniumhydroxide in methanol	5.3.5.5.2.3
5% methanol	5.3.5.5.2.4
20% methanol	5.3.5.5.2.5
10% methanol in acetonitril	5.3.5.5.2.6

5.3.5.5.2.1 4% fosforzuur oplossing

Er werd 0,4 ml fosforzuur (85%) gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml, welke werd aangevuld met UP water, waarna deze werd gehomogeniseerd.

5.3.5.5.2.2 2% mierenzuur oplossing

Er werd 0,2 ml mierenzuur (100%) gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml werd aangevuld met methanol, waarna deze werd gehomogeniseerd.

5.3.5.5.2.3 5% Ammoniumhydroxide in methanol oplossing

Er werd 0,5 ml ammoniumhydroxide oplossing in een maatkolf van 10 ml gepipetteerd. De maatkolf werd aangevuld met methanol, waarna deze gehomogeniseerd werd.

5.3.5.5.2.4 5% methanol oplossing

Er werd 0,5 ml methanol in een maatkolf van 10 ml gepipetteerd. De maatkolf werd aangevuld met UP water, waarna deze gehomogeniseerd werd.

5.3.5.5.2.5 20% methanol oplossing

Er werd 2,0 ml methanol in een maatkolf van 10 ml gepipetteerd. De maatkolf werd aangevuld met UP water, waarna deze gehomogeniseerd werd.

5.3.5.5.2.6 10% methanol in acetonitril

Er werd 1,0 ml methanol in een maatkolf van 10 ml gepipetteerd. De maatkolf werd aangevuld met acetonitril, waarna deze gehomogeniseerd werd.

5.3.5.5.3 Mixed Cation Exchange (MCX)

De MCX SPE is in duplo uitgevoerd. Tevens is een blanco monster geanalyseerd op kwalitatieve suppressie volgens de werkwijze beschreven bij 3.3.3.6. Gecodeerde reageerbuisen werden in de SPE bak geplaatst, waarna de deksel terug werd gezet op het SPE systeem. Vervolgens werden de MCX kolommen in de SPE deksel gezet. Tabel 12 geeft een versimpelde weergave van de werkwijze van het MCX SPE protocol.

Tabel 12: Basis protocol MCX SPE

Actie	Frequentie	MCX SPE			Fractie
		Kwantiteit (µl)	oplosmiddel		
Conditioneren	2	250	methanol		-
Equilibreren	2	250	water		-
Laden	1	200	Vorbewerkt monster		-
Was 1	1	250	2% mierenzuur		1
Was 2	1	250	methanol		2
Elutie	2	500	5% ammoniumhydroxide		3
Na elutie	1	250	5% ammoniumhydroxide		4
Reconstitutie	-	-	-		-

5.3.5.5.3.1 Conditioneren

Er werd 250 µl methanol op de kolommen gebracht. De methanol werd van de kolommen geëluëerd, tot het methanol niveau vlak boven het kolom materiaal zat, waardoor het kolom materiaal niet droog kwam te staan. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.3.2 Equilibreren

Er werd 250 µl UP water op de kolommen gebracht. De methanol werd van de kolommen geëluëerd, tot het methanol niveau vlak boven het kolom materiaal zat. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.3.3 Laden

Er werd plasma gespiked door 100 µl regressie oplossing B (5.3.5.1.3), 50 µl ISTD oplossing (5.3.5.1.5) en 850 µl plasma in een reageerbuis te pipetteren. De reageerbuis werd gehomogeniseerd. Er werd 200 µl gespiked plasma uit de reageerbuis gepipetteerd in een nieuwe reageerbuis, waaraan 200 µl 4% fosforzuuroplossing (5.3.5.5.2.1) toegevoegd was. De reageerbuis werd gehomogeniseerd. Vervolgens werd er 200 µl voorbewerkt plasma gepipetteerd op de WCX SPE kolom. Het voorbewerkte plasma werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal.

5.3.5.5.3.4 Was 1

Er werd 250 µl 2% mierenzuur (5.3.5.5.2.2) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuisen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuisen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.3.5 *Was 2*

Er werd 250 µl methanol op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.3.6 *Elutie*

Er werd 500 µl 5% NH₄OH oplossing (5.3.5.5.2.3) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal, deze stap werd één keer herhaald. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.3.7 *Na elutie*

Er werd 500 µl 5% NH₄OH oplossing (3.3.4.5.1.3) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden verzameld, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.3.8 *Reconstitutie*

De reageerbuizen werden ingedampt met behulp van een stikstofstroom in een indampblok. De buizen werden aangevuld met 1000 µl UP water. De buizen werden 15 minuten geschud in een schudmachine, waarna de inhoud van de reageerbuizen werd overgebracht in gecodeerde vials. De vials werden in de UPLC geplaatst en geanalyseerd met methode 1.

5.3.5.5.4 Hydrophilic lipophilic balans (HLB) SPE

De HLB SPE is in duplo uitgevoerd. Tevens is een blanco monster geanalyseerd op kwalitatieve suppressie volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6.

Gecodeerde reageerbuizen werden in de SPE bak geplaatst, waarna de deksel terug werd gezet op het SPE systeem. Vervolgens werden de HLB kolommen in de SPE deksel gezet. Tabel 13 geeft een versimpelde weergave van de werkwijze van het HLB SPE protocol.

Tabel 13: Basis protocol HLB SPE

Actie	Frequentie	HLB SPE		Fractie
		kwantiteit (µl)	oplosmiddel	
Conditioneren	2	200	methanol	-
Equilibreren	2	200	water	-
Laden	1	200	Vorbewerkt monster	-
Was 1	1	250	5% methanol	1
Was 2	1	250	5% methanol	2
Elutie	2	500	methanol	3
Na elutie	1	250	methanol	4
Reconstitutie	-	-	-	-

5.3.5.5.4.1 Conditioneren

Er werd 200 µl methanol op de kolommen gebracht. De methanol werd van de kolommen geëluëerd, tot het methanol niveau vlak boven het kolom materiaal zat, waardoor het kolom materiaal niet droog kwam te staan. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.4.2 Equilibreren

Er werd 200 µl UP water op de kolommen gebracht. De methanol werd van de kolommen geëluëerd, tot het methanol niveau vlak boven het kolom materiaal zat, waardoor het kolom materiaal niet droog kwam te staan. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.4.3 Laden

Er werd plasma gespiked door 100 µl regressie oplossing B (5.3.5.1.3), 50 µl ISTD oplossing (5.3.5.1.4) en 850 µl plasma in een reageerbuis te pipetteren. De reageerbuis werd gehomogeniseerd. Er werd 200 µl gespiked plasma uit de reageerbuis gepipetteerd in een nieuwe reageerbuis, waaraan 200 µl 4% fosforzuur oplossing (3.3.4.5.1.1) toegevoegd was. De reageerbuis werd gehomogeniseerd. Vervolgens werd er 200 µl vorbewerkt plasma gepipetteerd op de HLB SPE kolom. Het vorbewerkte plasma werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal.

5.3.5.5.4.4 *Was*

Er werd 250 µl 5% methanol oplossing op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.4.5 *Elutie*

Er werd 500 µl methanol op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal, deze stap werd één keer herhaald. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.4.6 *Na elutie*

Er werd 500 µl methanol op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden verzameld, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.4.7 *Reconstitutie*

De reageerbuizen werden ingedampt met behulp van een stikstofstroom in een indampblok. De buizen werden aangevuld met 1000 µl UP water. De buizen werden 15 minuten geschud in een schudmachine, waarna de inhoud van de reageerbuizen werd overgebracht in gecodeerde vials. De vials werden in de UPLC geplaatst en geanalyseerd met methode 1.

5.3.5.5.5 Hydrophilic lipophilic balans PRIME (HLB PRIME) SPE

De HLB SPE is in duplo uitgevoerd. Tevens is een blanco monster geanalyseerd op kwalitatieve suppressie volgens de werkwijze beschreven bij 3.3.3.6.

Gecodeerde reageerbuizen werden in de SPE bak geplaatst, waarna de deksel terug werd gezet op het SPE systeem. Vervolgens werden de HLB kolommen in de SPE deksel gezet. Tabel 14 geeft een versimpelde weergave van de werkwijze van het HLB SPE protocol.

Tabel 14: Basis protocol HLB PRIME SPE

Actie	HLB PRIME SPE			Fractie
	Frequentie	kwantiteit (µl)	oplosmiddel	
Conditioneren	-	-	-	-
Equilibreren	-	-	-	-
Vorbewerking en laden	1	500	Vorbewerkt monster	-
Was 1	1	200	20% methanol	1
Was 2	1	200	20% methanol	2
Elutie	2	500	10% methanol in acetonitril	3
Na elutie	1	250	10% methanol in acetonitril	4
Reconstitutie	-	-	-	-

5.3.5.5.5.1 Vorbewerking en laden

Er werd 250 µl regressie oplossing B (5.3.5.1.3) gepipetteerd in een reageerbuis. De reageerbuis werd aangevuld tot 1000 µl met plasma. De reageerbuis werd gehomogeniseerd, waarna 200 µl uit de reageerbuis werd gepipetteerd in een nieuwe reageerbuis. Aan de reageerbuis werd 200 µl zinksulfaat neerslagvloeistof (5.3.5.4.1) toegevoegd, waarna deze intens werd geschud. Er werd 600 µl acetonitril aan de reageerbuis toegevoegd. De oplossing werd geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 5 minuten afgedraaid. Van het supernatant werd 500 µl in een reageerbuis gepipetteerd, waaraan 500 µl 4% fosforzuur oplossing (3.3.4.5.1.1) was toegevoegd. De buis werd geschud, waarna 500 µl van de verkregen oplossing op de HLB PRIME kolom werd gepipetteerd. Het vorberekende plasma werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal.

5.3.5.5.5.2 Was

Er werd 200 µl 20% methanol oplossing (5.3.5.5.2.5) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst. Dit proces werd één keer herhaald.

5.3.5.5.3 *Elutie*

Er werd 500 µl 10% methanol in acetonitril oplossing (5.3.5.5.2.6) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal, deze stap werd één keer herhaald. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden uit de SPE bak vervangen voor nieuwe gecodeerde reageerbuizen, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.4 *Na elutie*

Er werd 500 µl 10% methanol in acetonitril (3.3.4.5.1.6) op de kolommen gebracht, welke werd geëluëerd tot vlak boven het kolom materiaal. De SPE klep werd verwijderd en de reageerbuizen werden verzameld, waarna De SPE klep terug werd geplaatst.

5.3.5.5.5 *Reconstitutie*

De reageerbuizen werden ingedampt met behulp van een stikstofstroom in een indampblok. De buizen werden aangevuld met 1000 µl UP water. De buizen werden 15 minuten geschud in een schudmachine, waarna de inhoud van de reageerbuizen werd overgebracht in gecodeerde vials. De vials werden in de UPLC geplaatst en geanalyseerd met methode 1.

5.3.5.5.6 SPE analyse: MCX, HLB & HLB PRIME

De SPE monsters werden geanalyseerd op recovery. Er werd een regressielijn opgesteld en geanalyseerd volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3.1 (zie **Error! Reference source not found.**). Er werden QC monsters opgewerkt en geanalyseerd volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3, om te controleren of de regressielijn voldeed. De regressie monsters, QC monsters en SPE monsters werden geanalyseerd met analyse methode 1. Tevens werd een blanco van elke SPE geanalyseerd op kwalitatieve suppressie volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6.

5.3.5.6 Houdbaarheid (stabiliteit) onderzoek

5.3.5.6.1 Bereiden van 100 mg/l antidepressiva oplossingen voor houdbaarheid onderzoek

Er werden nieuwe 100 mg/l antidepressiva oplossingen opgewerkt volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.2.1. De oplossingen werden gecodeerd C1 tot en met C26.

Tabel 15: mg/l antidepressiva test oplossingen (C)

C	Nr.	Stof	C	Nr.	Stof
<i>Antidepressiva</i>			<i>Desmethyl</i>		
C 1		Amitriptyline	C 15		Citalopram
C 2		Citalopram	C 16		Clomipramine
C 3		Clomipramine	C 17		Dosulepine
C 4		Dosulepine	C 19		(nor)Fluoxetine
C 5		Duloxetine	C 20		(desi)Imipramine
C 6		Fluoxetine	C 21		Maprotiline
C 7		Fluvoxamine	C 22		Mirtazapine
C 8		Imipramine	C 24		(nor)Amitriptyline
C 9		Maprotiline	C 25		(Nor)venlafaxine
C 10		Mirtazapine	C 26		Sertraline
C 11		Paroxetine			
C 12		Sertraline			
C 14		Venlafaxine			

5.3.5.6.2 Bereiden van 'meng oplossing C' voor houdbaarheid onderzoek

Er werd een nieuwe meng oplossing gemaakt volgens de werkwijze 5.3.5.1.3. De oplossing werd gecodeerd als 'meng oplossing C'.

Tabel 16: Hoeveelheid gepipetteerd voor 'meng oplossing C'

C	Nr.	Stof	pipet (µl)	C	Nr.	Stof	pipet (µl)
<i>Antidepressiva</i>				<i>Desmethyl</i>			
C 1		Amitriptyline	250	C 15		Citalopram	50
C 2		Citalopram	250	C 16		Clomipramine	500
C 3		Clomipramine	250	C 17		Dosulepine	250
C 4		Dosulepine	250	C 19		(nor)Fluoxetine	500
C 5		Duloxetine	250	C 20		(desi)Imipramine	500
C 6		Fluoxetine	500	C 21		Maprotiline	500
C 7		Fluvoxamine	250	C 22		Mirtazapine	500
C 8		Imipramine	250	C 24		(nor)Amitriptyline	250
C 9		Maprotiline	500	C 25		(Nor)venlafaxine	250
C 10		Mirtazapine	100	C 26		Sertraline	100
C 11		Paroxetine	250				
C 12		Sertraline	500				
C 14		Venlafaxine	500				

5.3.5.6.3 Lange termijn houdbaarheid van antidepressiva in methanol bij 8°C

De oplossingen uit Tabel 17 werden opgewerkt op de getoonde data en (eventueel) bewaard bij 8°C.

Tabel 17: Datum van opwerken mengoplossingen

Oplossing:	Opwerk datum:	Houdbaarheid na:
Meng oplossing A	23-12-2015	3 maanden
Meng oplossing B	25-1-2016	1 maand
Meng oplossing C	23-3-2016	0 maand

5.3.5.6.3.1 Regressie

Er werd een vijfpunts-kalibratielijns opgewerkt door de hoeveelheden uit Tabel 18 in reageerbuizen te pipetteren. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd, waarna de oplossingen werden overgebracht in vials. De vials werden gecodeerd en vervolgens in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 18: Hoeveelheden gepipetteerd voor regressie voor lange termijn houdbaarheidsonderzoek

	Volume pipet (µl)				
ID.	S1	S2	S3	S4	S5
oplossing (C)	10	20	50	100	200
ISTD	20	20	20	20	20
Water	970	960	930	880	780
Totaal (µl)	1000	1000	1000	1000	1000

5.3.5.6.3.2 Houdbaarheidsoplossingen

Er werd van meng oplossing A, B en C de hoeveelheden uit Tabel 19 gepipetteerd in reageerbuizen. De oplossingen werden gehomogeniseerd en overgebracht in vials. De vials werden in de autosampler van de UPLC geplaatst.

Tabel 19: recovery monsters voor lange termijn houdbaarheidsonderzoek

	Volume pipet (µl)		
ID.	1	2	3
Meng oplossing (A, B en C)	20	50	100
ISTD	20	20	20
water	960	930	880
Totaal (µl)	1000	1000	1000

5.3.5.6.3.3 Lange termijn houdbaarheid van antidepressiva in methanol bij 8°C bepaling

De recovery van de houdbaarheidsoplossingen werd bepaald aan de hand van de regressie oplossingen van 5.3.5.6.3.1.

5.3.5.6.4 Korte termijn systeem stabiliteit na opwerking bij 20 °C

Er werd een vijfpunts-kalibratielijns opgewerkt volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.6.3.1 De regressie werd opgenomen met analyse methode 1 op de tijdsintervallen: 0 uur (direct), 0,5 uur, 1 uur, 2 uur, 4 uur, 8 uur, 12 uur, 24 uur, 36 uur en 48 uur.

5.3.5.7 Kwantitatieve suppressie bepaling: Matrix Effect (M.E.) bij methode 1 met monster : neerslagvloeistof in 250:500 verhouding

Er werd 2000 µl normaal, icterisch, biliverdin ophoop, lipemisch, hemolitisch en donker plasma gepipetteerd in individuele reageerbuizen. Bij de reageerbuizen werd 800 µl 0,1 mol zinksulfaat oplossing en 3200 µl methanol gepipetteerd. De oplossingen werden geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 10 minuten afgedraaid.

Er werd 50 µl meng oplossing C (5.3.5.6.2) en 10 µl ISTD oplossing (5.3.5.1.4) in 48 reageerbuizen gepipetteerd. De 48 reageerbuizen werden in een indampblok geplaatst, waarna de inhoud van de buizen werd verdampt. Direct na het indampen van de vloeistof, werden de reageerbuizen uit het indampblok verwijderd, om eventuele verdamping van analyt te voorkomen.

Er werd 750 µl supernatant van elk type plasma bij de ingedampte reageerbuizen in zesvoud gepipetteerd.. Tevens werd een academisch monster meegenomen, waarvoor 750 µl water bij een ingedampte reageerbuizen in zesvoud werd gepipetteerd. De reageerbuizen werden voorzien van stoppen, waarna deze in een schudmachine werden geplaatst, waar deze 15 minuten werden geschud. De inhoud van de reageerbuizen werd overgeschonken in gecodeerde vials, waarna deze in de UPLC werden geplaatst. De monsters werden geanalyseerd met behulp van analyse methode 1.

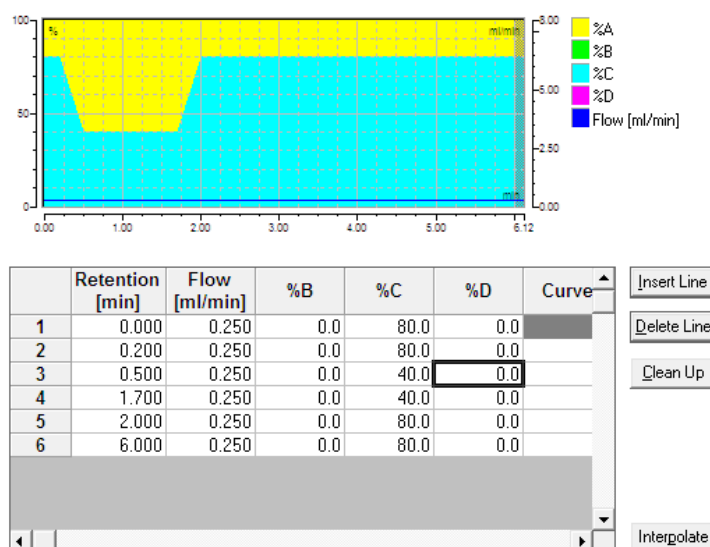
5.3.5.8 Kwalitatieve suppressie bepaling analyse methode 1 na +/- 300 injecties op kolom D

De kwalitatieve suppressie voor analyse methode 1 werd herhaald volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6.3 na ~300 injecties op kolom D.

5.3.5.9 Chromatografie op C18 100 mm kolom (kolom B) (methode 2)

5.3.5.9.1 Chromatografie

Er werd een gradiënt systeem ontwikkeld welke initieel een laag organisch eluens gehalte had (<40%) en vervolgens in organisch gehalte verhoogde om de retentie van eluerende componenten te vergroten. De 100 µg/l antidepressiva test oplossing werd hiervoor geanalyseerd met analyse methode 1, met uitzondering van de chromatografie. Figuur 12 geeft de verkregen UPLC instellingen weer ('%C' = percentage formiaat-buffer).



Figuur 12: Gradiënt analyse methode 2: %C = percentage formiaat-buffer

5.3.5.9.2 Suppressie

Er werd een kwalitatieve suppressie opgenomen van analyse methode 2 volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6. Kolom B werd in de UPLC geplaatst met een flow van 0,25 ml/min. met een 20:80 acetonitril : formiaat-buffer verhouding. De MS werd ingesteld op 3500 volt capillaire voltage, 20 Arb. sheath gas, 30 Arb. auxiliary gas en 350 °C vaporizer temperature, de analyse werd uitgevoerd met de gradiënt uit 5.3.5.9.1(methode 2).

5.3.5.9.3 Chromatografie met 20 mmol Triethylamine (TEA) eluens

Er werd 0,126 gram ammoniumformiaat afgewogen en kwantitatief overgebracht met UP water (10 mmol/l ammoniumformiaat). Er werd 0,2 ml 100% mierenzuur bij de ammoniumformiaat oplossing gepipetteerd. Er werd 0,4120 gram TEA afgewogen en kwantitatief overgebracht met UP water. De oplossing werd aangevuld tot 200 ml, waarna de oplossing werd gehomogeniseerd en ontluicht. De oplossing werd overgeschonken in een eluens fles en op de UPLC aangesloten,

Er werd chromatografie opgenomen de het 100 µg/l antidepressiva test oplossing met analyse methode 2, waarbij 20 mmol TEA aan het eluens was toegevoegd.

5.3.5.9.4 Chromatografie met 0,25 mmol ammoniumformiaat en 0,25% mierenzuur eluens

Het 25 mmol ammoniumformiaat eluens (5.3.4.5.1) (zowel acetonitril als buffer oplossing) werd op het UPLC systeem aangesloten. Het analyse systeem werd ingespoeld met kolom B op een 20:80 acetonitril : formiaat-buffer verhouding. Er werd chromatografie opgenomen van de 100 µg/l antidepressiva test oplossing met analyse methode 2, met het 25 mmol ammoniumformiaat en 0,25% mierenzuur acetonitril : formiaat-buffer eluens (5.3.4.5.1).

5.3.5.9.5 Chromatografie met nieuwe kolom B

Een nieuwe Agilent ZORBAX Eclipse C18 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron kolom werd in de UPLC geplaatst en ingespoeld met 50:50 methanol : formiaat-buffer verhouding voor twee uur bij 0,1 ml/min. Vervolgens werd het systeem ingespoeld met een 20:80 acetonitril : formiaat-buffer verhouding met een flow van 0,25 ml/min.

Er werd chromatografie opgenomen van de 100 µg/l antidepressiva test oplossing met de nieuwe Agilent ZORBAX Eclipse C18 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron kolom, met analyse methode 2.

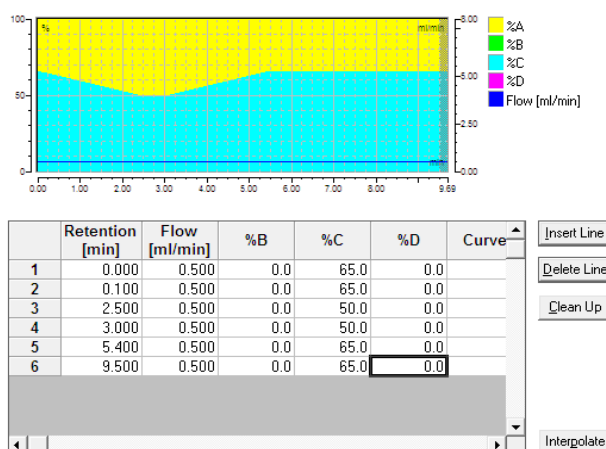
5.3.5.10 Chromatografie op C8 150 mm kolom (kolom D) (methode 3)

5.3.5.10.1 Chromatografie

Er werd een gradiënt systeem ontwikkeld welke initieel een laag organisch eluens gehalte had (<40-35%) en vervolgens in organisch gehalte verhoogde om de retentie van eluerende componenten te vergroten. Het 100 µg/l antidepressiva monster werd hiervoor geanalyseerd met analyse methode 1, met uitzondering van de chromatografie.

5.3.5.10.2 Kwalitatieve suppressie

Er werd een kwalitatieve suppressie opgenomen van analyse methode 3 volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6. Kolom D werd in de UPLC geplaatst met een flow van 0,5 ml/min. met een 35:65 acetonitril : formiaat-buffer verhouding. De MS werd ingesteld op 3500 volt capillaire voltage, 20 Arb. sheath gas, 30 Arb. auxiliary gas en 350 °C vaporizer temperature, de analyse werd uitgevoerd met de gradiënt uit Figuur 13(methode 3).



Figuur 13: Gradiënt analyse methode 3: C = percentage formiaat buffer

5.3.5.11 **Regressie bepaling (methode 3)**

Er werd een vijfpunts-kalibratielijns opgewerkt volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3.1. De kalibratie monsters werden geanalyseerd met analyse methode 3. Een gewogen regressiemodel werd toegepast voor het plotten van een regressielijn.

5.3.5.12 **Recovery bepaling (methode 3)**

Er werden recovery monsters opgewerkt volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3.4. De recovery monsters werden geanalyseerd met analyse methode 3, berekend op de kalibratielijns opgewerkt bij 5.3.5.11.

5.3.6 **Prestatie kenmerken analyse methode 3**

De prestatie kenmerken zijn bepaald aan de hand van de EMEA ^[17] richtlijnen. Om de prestatie kenmerken vast te leggen worden de lineariteit, de carry-over, de juistheid en precisie en de specificiteit bepaald. De lange termijn stabiliteit in methanol bij 8°C (5.3.5.6.3.3), de korte termijn systeemstabiliteit na opwerking (5.3.5.6.4) en de kwantitatieve suppressie bepaling (5.3.6.1) zijn reeds uitgevoerd.

5.3.6.1 **Kwantitatieve suppressie bepaling: Matrix Effect (M.E.) bij methode 3 met 250:500 monster : neerslagvloeistof**

Voor de hoge concentratie kwantitatieve suppressie bepaling werd er 50 µl regressie oplossing C (5.3.5.6.2) en 10 µl ISTD oplossing (5.3.5.1.4) in 48 reageerbuizen gepipetteerd, en voor de lage concentratie kwantitatieve suppressie bepaling werd er 5 µl regressie oplossing C en 10 µl ISTD oplossing in 48 reageerbuizen gepipetteerd. De 96 reageerbuizen werden in een indampblok geplaatst, waarna de inhoud van de buizen werd verdampt. Direct na het indampen van de vloeistof, werden de reageerbuizen verwijderd uit het indampblok, om eventuele verdamping van analyt te voorkomen.

Er werd 2000 µl normaal, icterisch, biliverdin ophoop, lipemisch, hemolitisch en donker plasma gepipetteerd in individuele reageerbuizen. Bij de reageerbuizen werd 800 µl 0,1 M zinksulfaat oplossing en 3200 µl methanol gepipetteerd. De oplossing werd geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 10 minuten afgedraaid.

Er werd 750 µl van elk type serum (normaal, icterisch, biliverdin ophoop, lipemisch, hemolitisch en donker plasma) bij de ingedampde reageerbuizen in zesvoud gepipetteerd, op hoog en laag niveau. Tevens werd een academisch monster meegenomen, waarbij 500 µl neerslagvloeistof en 250 µl water werd gepipetteerd in ingedampde reageerbuizen in zesvoud op hoge en lage concentratie. De reageerbuizen werden voorzien van stoppen, waarna deze in een schudmachine werden geplaatst, waar deze 15 minuten werden geschud. De inhoud van de reageerbuizen werd overgeschonken in gecodeerde vials, waarna deze in de UPLC werden geplaatst. De monsters werden geanalyseerd met behulp van analyse methode 3.

5.3.6.2 Lineariteit

Er werd een zeven-punts kalibratielijन opgenomen door de hoeveelheden uit Tabel 20 in reageerbuizen te pipetteren, volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3.4. De kalibratie monsters werden geanalyseerd met analyse methode 3. Er werd een gewogen regressiemodel toegepast het op de regressielijn. De lineariteit werd op drie verschillende dagen bepaald, door twee verschillende analisten

Tabel 20: Gepipetteerde volumes voor zeven-punts lineariteit bepaling

ID.	Volume pipet (μl)						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
oplossing (C)	10	20	30	50	100	150	200
ISTD	20	20	20	20	20	20	20
Plasma	970	960	950	930	880	830	780
Totaal (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5.3.6.3 Carry-over

Er werd een blanco sample opgewerkt door blanco plasma op te werken volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.4.6.2. Het blanco sample werd direct na het hoogste kalibratiepunt (S7) van de lineariteit bepaling gemeten met analyse methode 3.

5.3.6.4 Specificiteit

Er werden 1000 mg/l paracetamol, acetylsalicylzuur, ibuprofen, morfine, clozapine, cafeïne en metoprolol oplossingen gemaakt door ~10 mg stof af te wegen, welke waren gecorrigeerd met hun zout. De afgewogen stof werd kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 10 ml met UP water. De maatkolf werd aangevuld met UP water, waarna de oplossing gehomogeniseerd werd. De oplossing werd overgebracht in een gecodeerde vial, waarna deze in de autosampler van de UPLC werd geplaatst. Alle oplossingen werden geanalyseerd met analyse methode 3.

5.3.6.5 Juistheid & Precisie

5.3.6.5.1 Regressie

Er werd een vijf punts-kalibratielijns opgewerkt volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.3.4

5.3.6.5.2 Opwerking Juistheid & precisie monsters

Er werden recovery monsters opgewerkt door de hoeveelheden uit Tabel 21 in zesvoud bij elkaar te pipeteren in reageerbuizen. De reageerbuizen werden gehomogeniseerd, waarna 250 µl in nieuwe reageerbuizen gepipetteerd werd. Aan de buizen werd 100 µl 0,1 mol/l zinksulfaat oplossing (5.3.5.4.1) en 400 µl methanol toegevoegd. De oplossingen werden geschud, en vervolgens bij 5000 toeren per minuut gedurende 5 minuten afgedraaid. De supernatanten werden overgebracht in gecodeerde vials. Waarna de vials in de autosampler van de UPLC werden geplaatst.

Tabel 21: Gepipetteerde volumes voor juistheid en precisie bepaling

% t.o.v. ULOQ	Volume pipet (µl)			
	LLOQ (10%)	20%	50%	100%
ID.	A	B	C	D
oplossing (B)	10	20	50	50
ISTD	20	20	20	20
Plasma	970	960	930	930
Totaal (µl)	1000	1000	1000	1000

5.3.6.5.3 Analyse van juistheid en precisie

De zeven punts-kalibratielijns werd in enkelvoud geanalyseerd. Er werd een gewogen regressie model toegepast voor het correleren van de area tegen de antidepressiva concentratie. De juistheid en precisie monsters werden in duplo geanalyseerd. Alle monsters werden geanalyseerd met analyse methode 3. De juistheid en precisie werd drie keer uitgevoerd, door twee verschillende analisten, op drie verschillende dagen.

6 Resultaten

6.1 Literatuurstudie

Voorafgaand aan de methode ontwikkeling werd een literatuurstudie uitgevoerd naar het ontwikkelen van een multicomponent-analysemethode voor het bepalen van antidepressiva in bloedserum met LC-MS². Tijdens de literatuurstudie werd aandacht besteed aan de massaspectrometrie parameters, de chromatografie parameters en de monsters voorbereidingsmethode. Een overzichtstabel van de resultaten van de literatuurstudie staat in bijlage 12.11.

6.1.1 Chromatografie

Octadecyl (C18) gebaseerde kolommen worden voornamelijk toegepast voor de analyse van antidepressiva met LC-MSMS^{[10][11][12][13][14]}, daarnaast worden ook sporadisch octaan (C8) gebaseerde kolommen toegepast^[15]. Er wordt gebruikt gemaakt van zowel HPLC kolommen (5 µm)^{[10][11][13][14]} als UPLC kolommen (2,1 µm)^[12].

Gebruikte eluens soorten voor de analyse van antidepressiva met LC-MSMS zijn voornamelijk combinaties van waterige buffers met acetonitril^{[10][11][12][14][15]}. De meeste analyse methoden maken gebruik van gradiënt systemen, waarbij er begonnen wordt met een hoog waterig buffer gehalte, kort na de start van de analyse wordt het acetonitril gehalte verhoogt en dus het buffer gehalte verlaagt^{[10][11][12][14]}.

De buffers gebruikt voor de analyse van antidepressiva met LC-MSMS bestaan veelal uit formiaat^{[10][11]}, acetaat^{[12][15]}, mierenzuur^[14] en azijnzuur^{[13][15]} buffers, waarbij de pH van de buffers vaak rond de drie zit^{[10][11][13][15]}.

6.1.2 Massaspectrometrie

De massaspectrometrie systemen gebruikt voor de analyse van antidepressiva zijn voornamelijk ESI systemen^{[6][10][11][12][13][14][15]}, daarnaast wordt er gebruik gemaakt van UV en Diode Array Detectoren (DAD)^[6]. De ESI massaspectrometrie systemen worden in positieve ionisatie modus bediend, met een voltage op de ionisatie bron wisselend tussen de 3200^[10] en 5500^[15] volt.

6.1.3 Opwerking en kwantificatie

De opwerking van antidepressiva voor bepaling met LC-MS systemen vind voornamelijk plaats met behulp van SPE en LLE methoden^{[6][11][12][14]}. Daarnaast worden ook sporadisch PPT methoden toegepast^[13]. De opgewerkte matrices betreffen voornamelijk plasma^[6].

De interne standaarden gebruikt voor de kwantificatie van antidepressiva met LC-MS zijn vaak gedeuteerde interne standaarden^{[11][14][15]}, daarnaast worden ook geregeld antipsychotica toegepast als interne standaard wegens de soortgelijke molecuul structuur^{[10][12][13]}.

6.2 Voorbereiding

6.2.1 Antidepressiva oplossingen

Tabel 22 geeft een overzicht van alle antidepressiva oplossingen weer, met bijbehorende streef en theoretische concentraties. Voor een gedetailleerd overzicht van elke bereide oplossing, zie hiervoor bijlage 12.6.1.5 tot en met bijlage 12.6.1.14.

Tabel 22: Overzicht van antidepressiva oplossingen

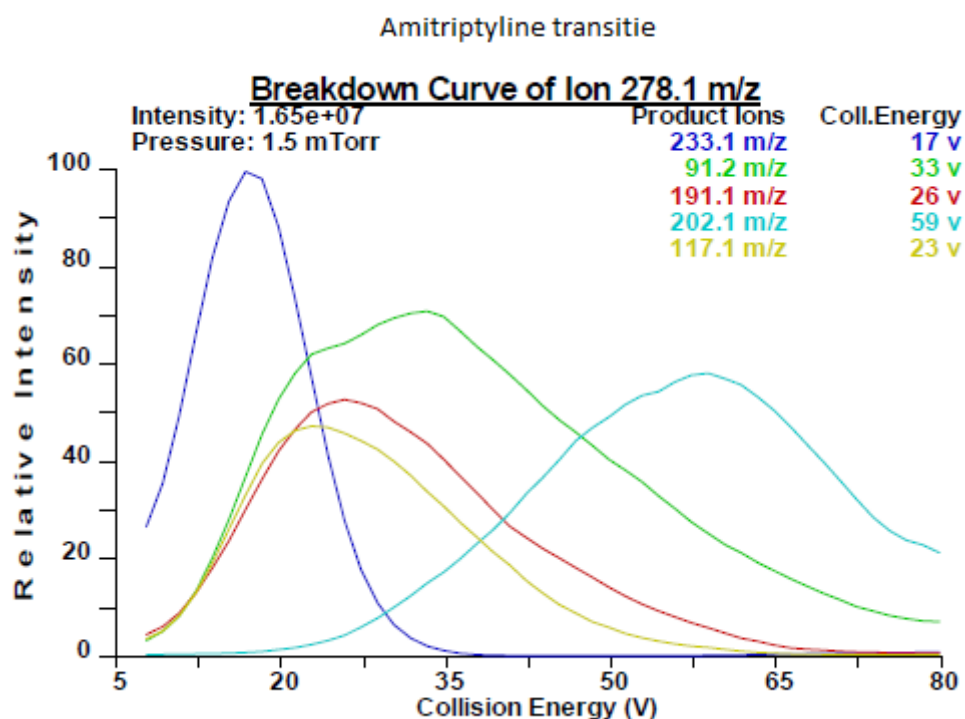
ID. Nr.	Stof	Antidepressiva								mg/l AD regressie opl.		
		mg/l AD			µg/l AD (A)				1000			
		100 (A)	100 (B)	100 (C)	100	5	1			A	B	C
1	Amitriptyline	103,29	114,17	97,46	1033	103,29	5,17	1,03		2,58	2,85	2,44
2	Citalopram	86,28	107,73	95,97	863	86,28	4,32	0,86		2,16	2,69	2,40
3	Clomipramine	107,92	109,36	96,00	1079	107,92	5,40	1,08		2,70	2,73	2,40
4	Dosulepine	103,17	106,47	96,05	1032	103,17	5,16	1,03		2,58	2,66	2,40
5	Duloxetine	109,84	110,55	107,34	1098	109,84	5,49	1,10		2,75	2,76	2,68
6	Fluoxetine	108,69	115,22	107,35	1087	108,69	5,44	1,09		5,43	5,76	5,37
7	Fluvoxamine	103,47	98,93	104,64	1035	103,47	5,18	1,04		2,59	2,47	2,62
8	Imipramine	103,98	116,99	102,39	1040	103,98	5,20	1,04		2,60	2,93	2,56
9	Maprotiline	106,77	102,97	105,27	1068	106,77	5,34	1,07		5,34	5,15	5,26
10	Mirtazapine	108,20	113,40	101,70	1082	108,20	5,41	1,08		1,08	1,13	1,02
11	Paroxetine	104,65	94,20	95,25	1047	104,65	5,24	1,05		2,62	2,36	2,38
12	Sertraline	108,22	96,33	110,27	1082	108,22	5,41	1,08		5,41	4,82	5,51
14	Venlafaxine	103,06	96,52	100,49	1031	103,06	5,16	1,03		5,15	4,83	5,03
15	DM.citalopram	99,62	102,03	97,03	996	99,62	4,98	1,00		0,50	0,51	0,49
16	DM.clomipramine	95,88	100,16	1000,0	959	95,88	4,80	0,96		4,79	5,00	5,00
17	DM.dosulepine	98,18	94,99	99,51	982	98,18	4,91	0,98		2,46	2,38	2,49
19	DM.fluoxetine	1000,0	1000,0	1000,0	1000	100,00	5,00	1,00		5,00	5,00	5,00
20	DM.imipramine	96,85	103,53	100,10	968	96,85	4,85	0,97		4,84	5,18	5,01
21	DM.maprotiline	113,41	103,83	102,43	1134	113,41	5,67	1,13		5,67	5,19	5,12
22	DM.mirtazapine	98,03	99,46	1000,0	980	98,03	4,90	0,98		4,90	5,00	5,00
24	DM.amitriptyline	98,03	94,69	97,59	980	98,03	4,90	0,98		2,45	2,37	2,44
25	DM.venlafaxine	100,00	100,00	100,00	1000	100,00	5,00	1,00		2,50	2,50	2,50
26	DM.sertraline	100,00	100,00	100,00	1000	100,00	5,00	1,00		1,00	1,00	1,00

6.3 Massaspectrometrie

6.3.1 Transitie & massaspectrometrie component optimalisatie

6.3.1.1 Breakdown curve (transitie)

Figuur 14 geeft de breakdown curve (transitie) van amitriptyline weer. Op de y-as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, op de X-as staat het voltage op de quadrupole weergegeven. Door het opnemen van een transitie wordt inzichtelijk gemaakt welke fragmenten ontstaan wanneer een antidepressiva gefragmenteerd wordt en welke fragmenten een intens signaal geven (bij een bepaald voltage). De resultaten van de transitie staan in Tabel 23. Alle transitie van de overige antidepressiva staan in bijlage 12.12.1.



Figuur 14: Transitie van amitriptyline; Op de y-as staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-as staat het voltage op de collision cell (volt) uitgesteld.

Tabel 23 geeft de resultaten van de transitie van de antidepressiva en antidepressiva metabolieten weer. Van alle antidepressiva en metabolieten worden de vijf meest intense transitie weergegeven, op volgorde van intensiteit, waarbij 1 de relatieve 100% intensiteit vormt. De 'collision energie' (C.E.) wordt weergegeven in volt met bijbehorende 'product ion (P.I.)' in 'mass to charge ratio'. Product fragment één en product fragment twee (de twee meest intense producten) werden opgenomen in de analyse methode.

Tabel 23: resultaten transitie

Antidepressiva						Desmethyl					
parent ion (u)	1 (100%)	2	3	4	5	parent ion (u)	1 (100%)	2	3	4	5
278,1		Amirtriptiline				264,0		(nor)amirtriptiline			
C.E. (v)	17	33	59	26	23	C.E. (v)	15	32	21	25	21
P.I. (m/z)	233,1	91,2	202,1	191,1	117,1	P.I. (m/z)	233,1	91,2	117,1	191,1	105,1
325,2		Citalopram				311,1		Citalopram			
C.E. (v)	29	18	27	29	-	C.E. (v)	25	16	27	25	57
P.I. (m/z)	109,1	262	234	116,1	-	P.I. (m/z)	109,1	262,1	234	116,1	83,2
315,1		Clomipramine				301,0		Clomipramine			
C.E. (v)	18	36	39	24	52	C.E. (v)	17	25	16	59	39
P.I. (m/z)	86,2	58,3	227	242	192	P.I. (m/z)	72,3	242	270	44,4	57,2
296,0		Dosulepine				282,0		Dosulepine			
C.E. (v)	23	19	24	23	22	C.E. (v)	16	21	21	15	21
P.I. (m/z)	222,9	225	218	147	109	P.I. (m/z)	225	223	218	251,1	209
310,0		Fluoxetine				296,0		(Nor)Fluoxetine**			
C.E. (v)	13	67	44	9	79	C.E. (v)	40				
P.I. (m/z)	44,4	42,4	117	277,9	91,2	P.I. (m/z)	30,5				
319,0		Fluvoxamine						Fluvoxamine*			
C.E. (v)	11	21	12	16	-	C.E. (v)	-				
P.I. (m/z)	258,2	200,1	259,2	228,1	-	P.I. (m/z)	-				
281,0		Imipramine				267,0		(Imi)Desipramine			
C.E. (v)	17	36	40	26	16	C.E. (v)	16	23	15	41	38
P.I. (m/z)	86,3	58,3	193,2	208,1	236,1	P.I. (m/z)	72,3	208,1	236,1	44,4	57,3
278,0		Maprotiline				264,0		Maprotiline			
C.E. (v)	19	25	34	21	32	C.E. (v)	20	19	37	45	31
P.I. (m/z)	250,2	117,2	91,2	169,1	141,1	P.I. (m/z)	117,2	169,1	91,2	115,1	141,1
266,1		Mirtazapine				252,0		Mirtazapine			
C.E. (v)	26	40	19	21	49	C.E. (v)	23	23	38	36	42
P.I. (m/z)	195,1	194	72,3	209,1	167,1	P.I. (m/z)	209,1	195,1	115,1	92,2	91,2
330,0		Paroxetine						Paroxetine *			
C.E. (v)	20	30	23	35	38	C.E. (v)	-				
P.I. (m/z)	192,1	70,3	151	135,1	109,1	P.I. (m/z)	-				
308,0		Sertraline				292,0		Sertraline			
C.E. (v)	29	13	22	48	50	C.E. (v)	25	10	47	24	47
P.I. (m/z)	160,9	277	129,1	123,1	127,9	P.I. (m/z)	159	275,1	123,1	129,1	128,1
278,2		Venlafaxine				264,2		(nor)Venlafaxine			
C.E. (v)	19	12	32	17	42	C.E. (v)	18	12	35	53	25
P.I. (m/z)	58,3	260,2	121,1	215,1	91,2	P.I. (m/z)	58,3	246,2	107,2	77,2	133,1

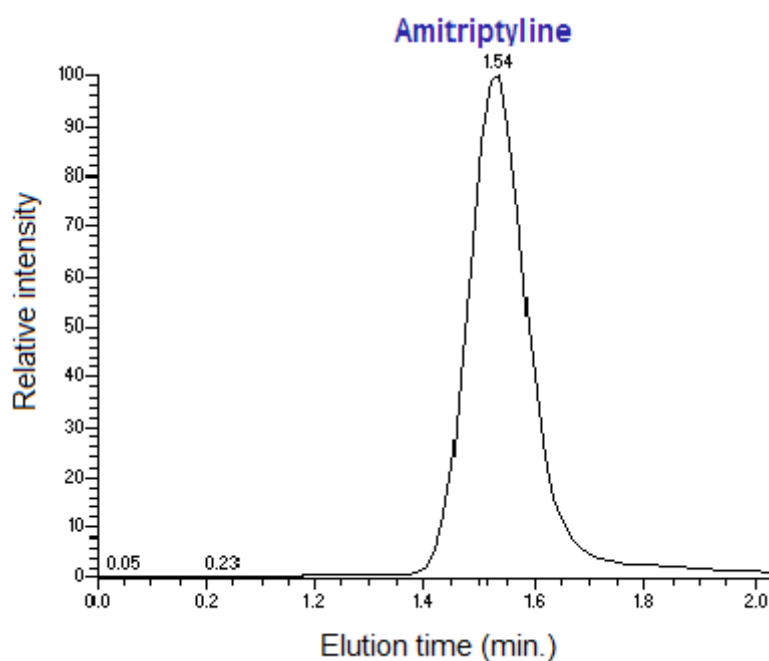
*= geen actief metaboliet

**= Geen afbraak patroon, één massa bij één voltage waargenomen.

6.4 Chromatografie

6.4.1 Individuele chromatografie

Figuur 15 geeft het individuele chromatogram van de 1 mg/l antidepressiva oplossing voor amitriptyline weer, welke is opgenomen met de reguliere 'Amitriptyline & Nortriptyline' analysemethode van OLVG Oost. Alle overige individuele chromatogrammen staan in bijlage 12.10.



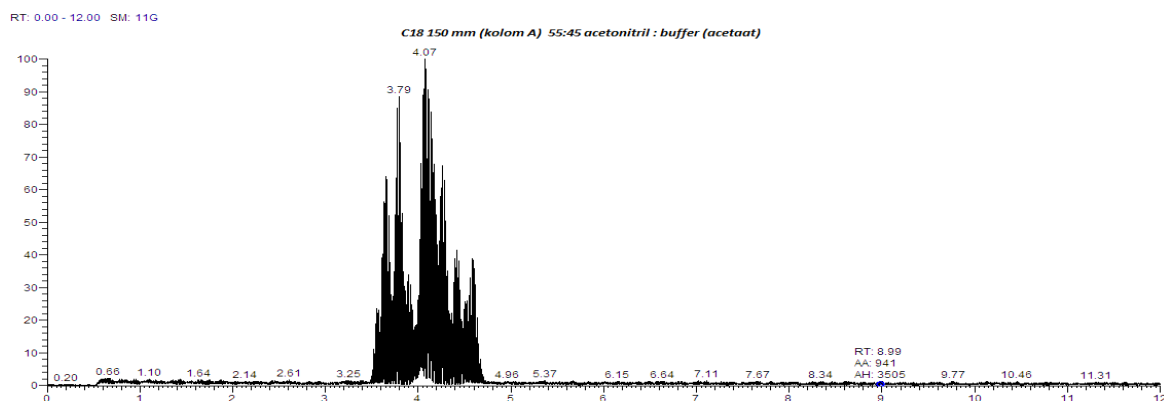
Figuur 15: Individueel chromatogram amitriptyline; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.2 Kolom keuze experiment

Er werden chromatogrammen opgenomen van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, met de reguliere 'Amitriptyline & Nortriptyline' analysemethode van OLVG Oost, om een impressie te krijgen van mogelijke kolommen en chromatografie. De geteste kolommen staan weergegeven in Tabel 2.

6.4.2.1 Kolom A

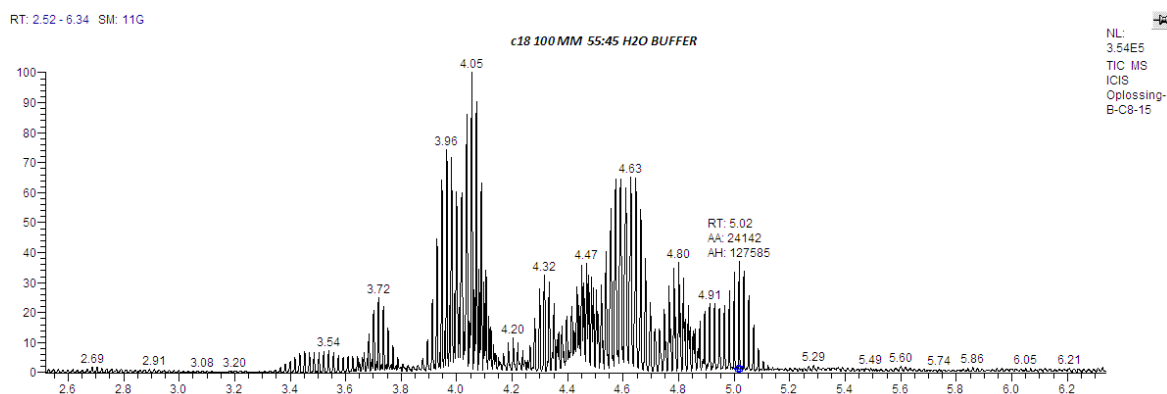
Figuur 16 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met een 55:45 acetonitril:buffer (acetaat) eluens verhouding, op kolom A weer.



Figuur 16: chromatogram van het 100 µg/l antidepressiva oplossing op kolom A: op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.2.2 Kolom B

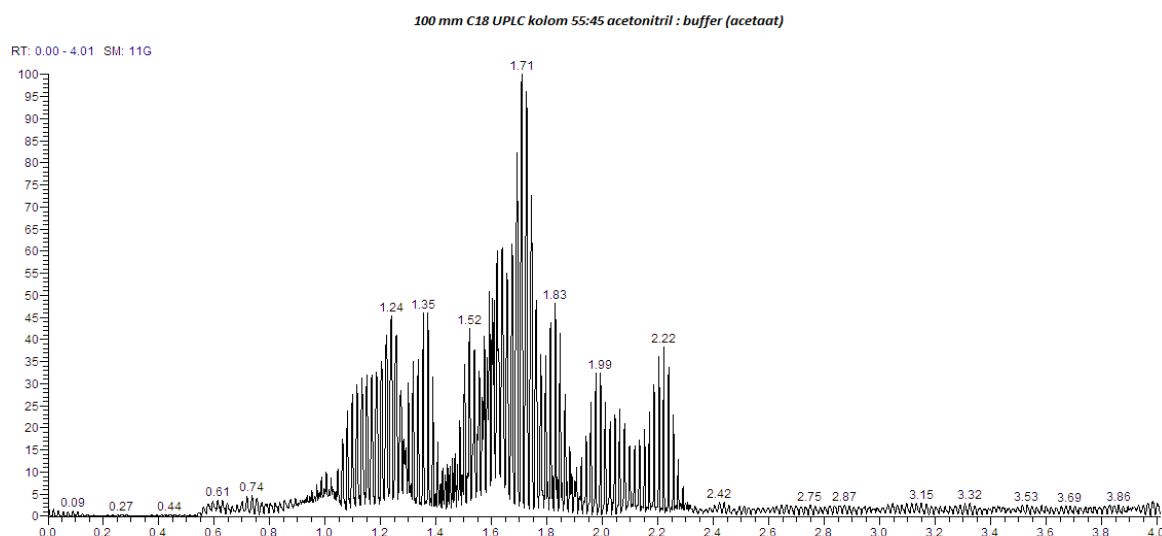
Figuur 17 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met een 55:45 acetonitril:buffer (acetaat) eluens verhouding, op kolom B weer.



Figuur 17: chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing op kolom B: op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.2.3 Kolom C

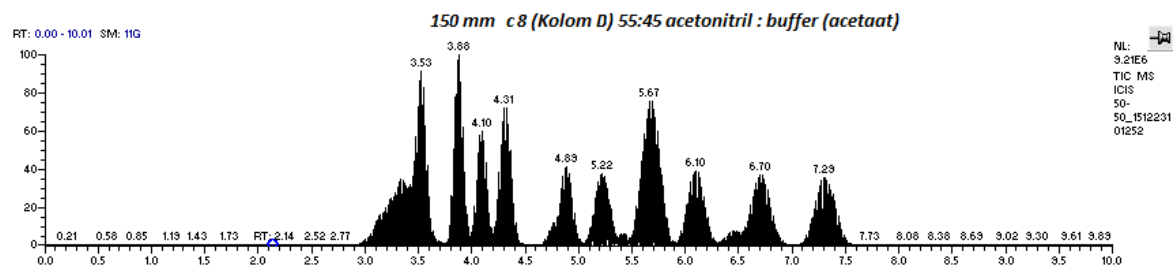
Figuur 18 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met een 55:45 acetonitril:buffer (acetaat) eluens verhouding, op kolom C weer.



Figuur 18: chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing op kolom C: op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.2.4 Kolom D

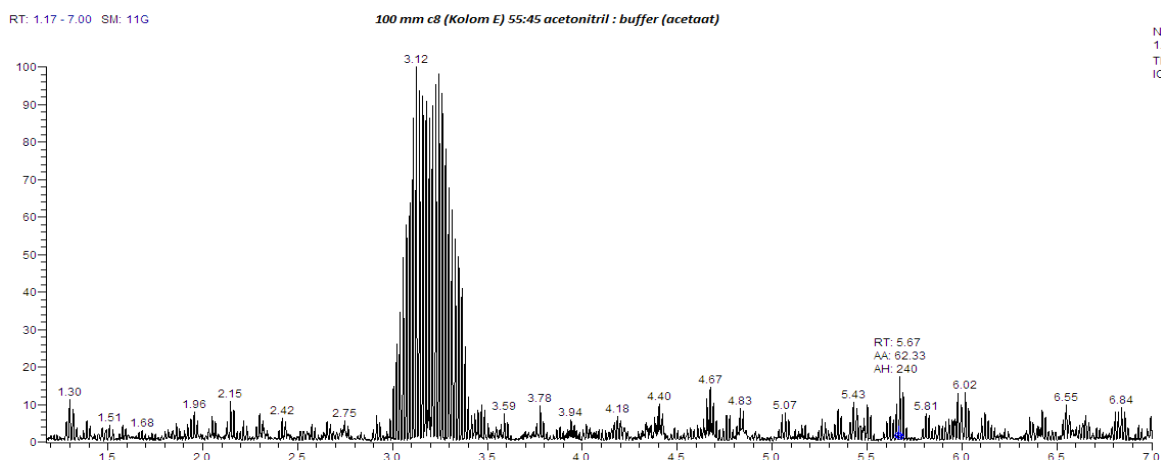
Figuur 19 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met een 55:45 acetonitril:buffer (acetaat) eluens verhouding, op kolom D weer.



Figuur 19: chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing op kolom D: op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.2.5 Kolom E

Figuur 20 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met een 55:45 acetonitril:buffer (acetaat) eluens verhouding, op kolom E weer.

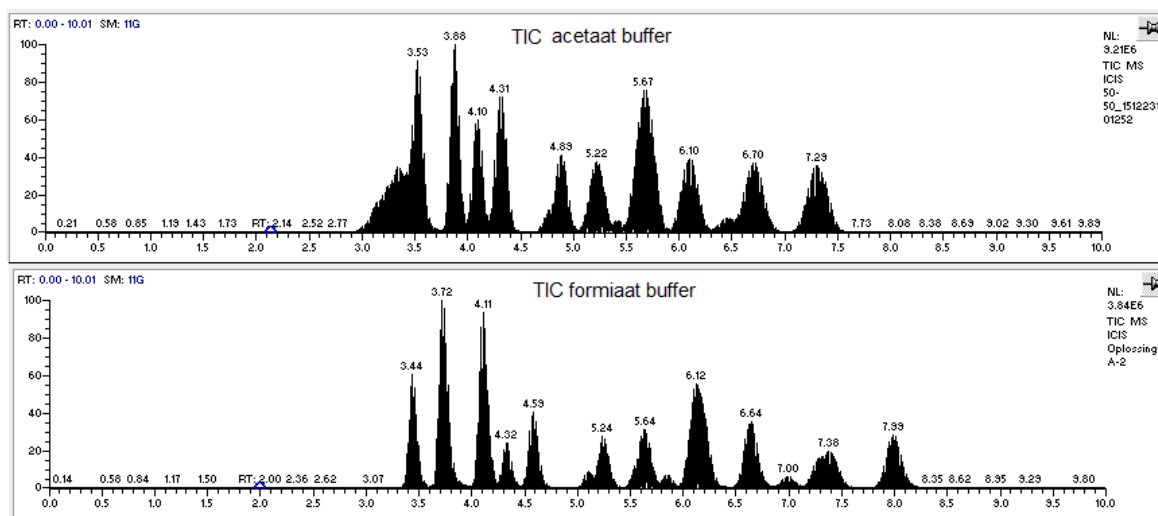


Figuur 20: chromatogram van e 100 µg/l antidepressiva oplossing op kolom E: op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.3 Eluens keuze experiment (ammoniumacetaat buffer vs. ammoniumformiaat buffer)

6.4.3.1 TIC van 100 µg/l antidepressiva oplossing; acetaat buffer versus formiaat buffer

Figuur 21 geeft de TIC chromatogrammen van de 100 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met de reguliere 'Amitriptyline & Nortriptyline' analysemethode van OLVG Oost met kolom D voor zowel de acetaat als de formiaat buffer weer.



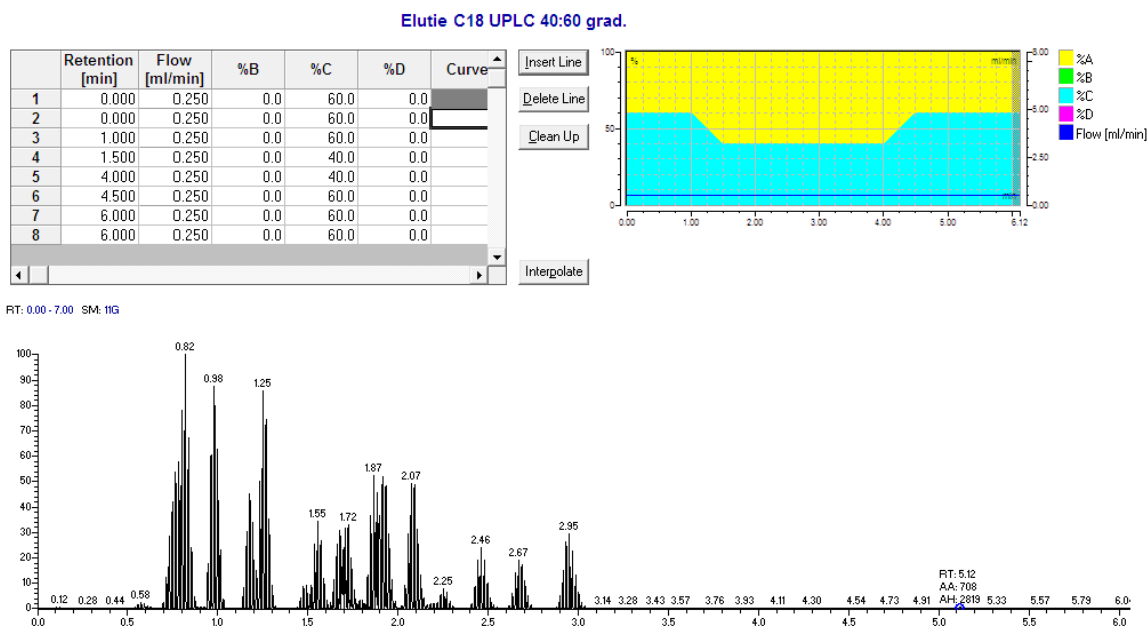
Figuur 21: TIC van 100 µg/l antidepressiva oplossing bepaald met zowel acetaat als de formiaat buffer; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.3.2 Eluens verhouding

Kolom C en Kolom D werden getest met verschillende eluens verhoudingen met de 5 µg/l antidepressiva oplossing.

6.4.3.3 TIC Kolom C

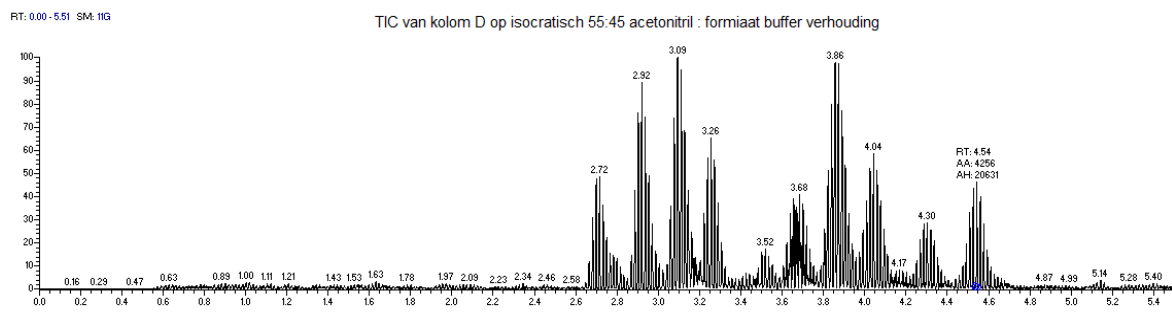
Figuur 22 geeft gradiënt systeem 1, op kolom C, met bijbehorend TIC signaal van de 5 µg/l antidepressiva oplossing weer.



Figuur 22: TIC van gradiënt systeem 1 op kolom C; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.3.4 TIC kolom D

Figuur 23 geeft het TIC signaal van het isocratisch 55:45 acetonitril : formiaat buffer eluens verhouding op kolom D weer.



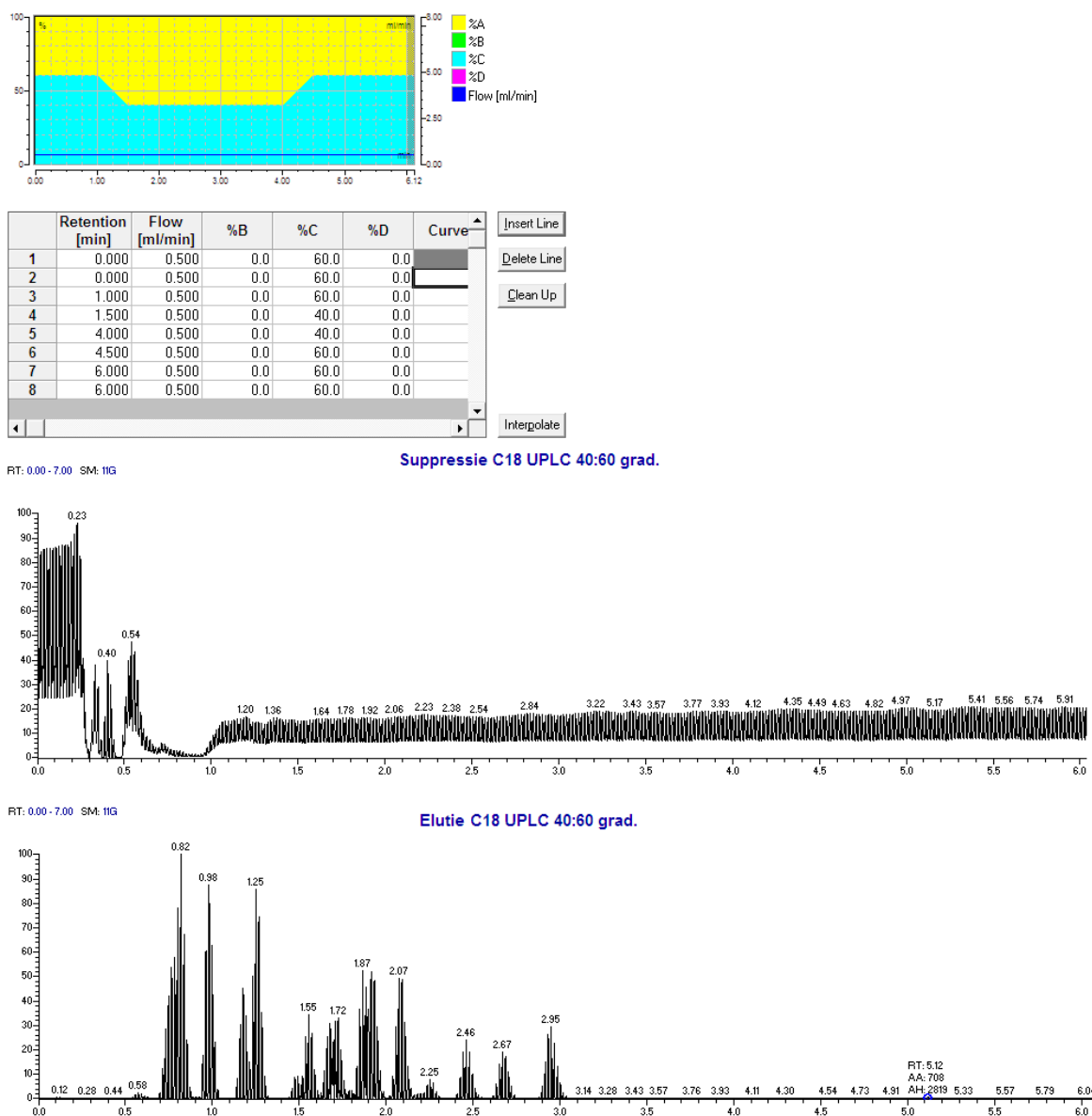
Figuur 23: TIC van isocratisch 55:45 acetonitril : formiaatbuffer verhouding; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.4 Kwalitatieve suppressie bepaling

De kwalitatieve suppressie werd bepaald op de analysemethode verkregen bij 6.4.3.3 en 6.4.3.4. Daarnaast werd de kwalitatieve suppressie opgenomen met een hoger buffer eluens gehalte, om te controleren of de suppressie met de elutie mee bewoog.

6.4.4.1 Kolom C met gradiënt 1

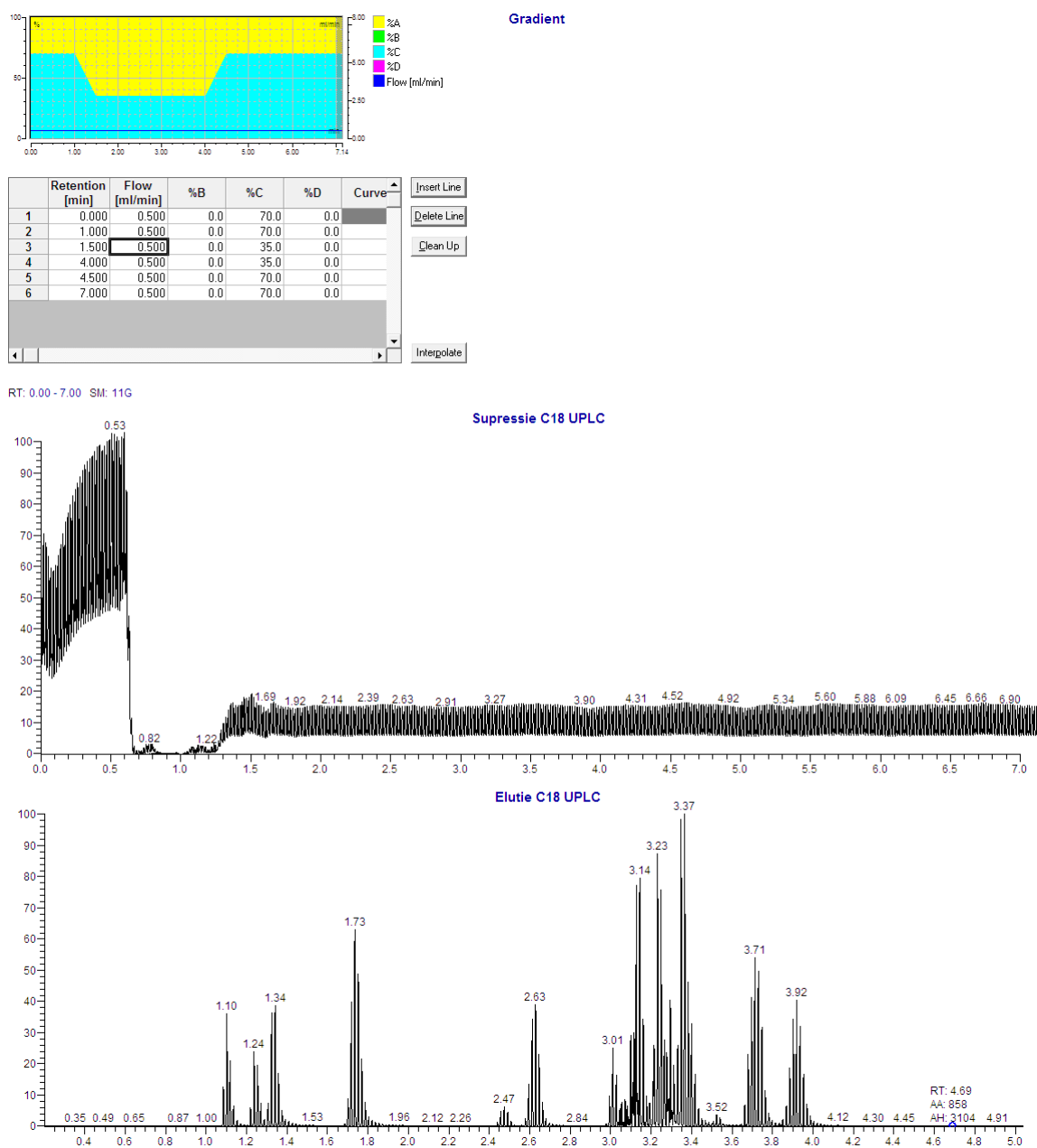
Figuur 24 geeft gradiënt systeem 1, het kwalitatieve suppressie profiel en bijbehorende elutie profiel weer.



Figuur 24: Suppressie bepaling kolom C met gradiënt 1; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.4.2 Gradiënt 2 op Kolom C

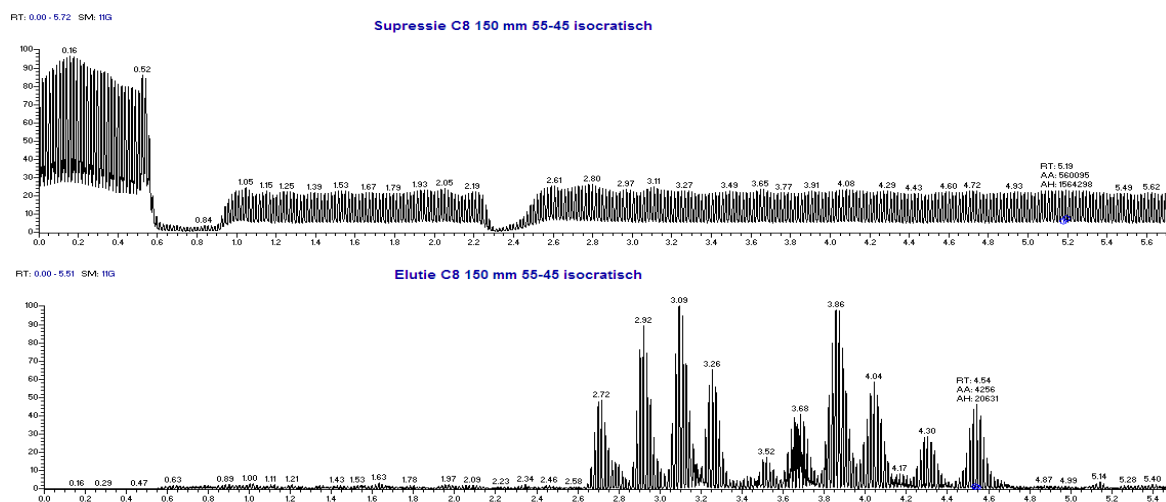
Figuur 25 geeft gradiënt systeem 2 op kolom C, het kwalitatieve suppressie profiel en bijbehorende elutie profiel weer van gradiënt systeem 2 op kolom C.



Figuur 25: Suppressie bepaling kolom C met gradiënt 2; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven. (assen van figuur komen niet volledig overeen)

6.4.5 Kolom D met isocratisch systeem 1

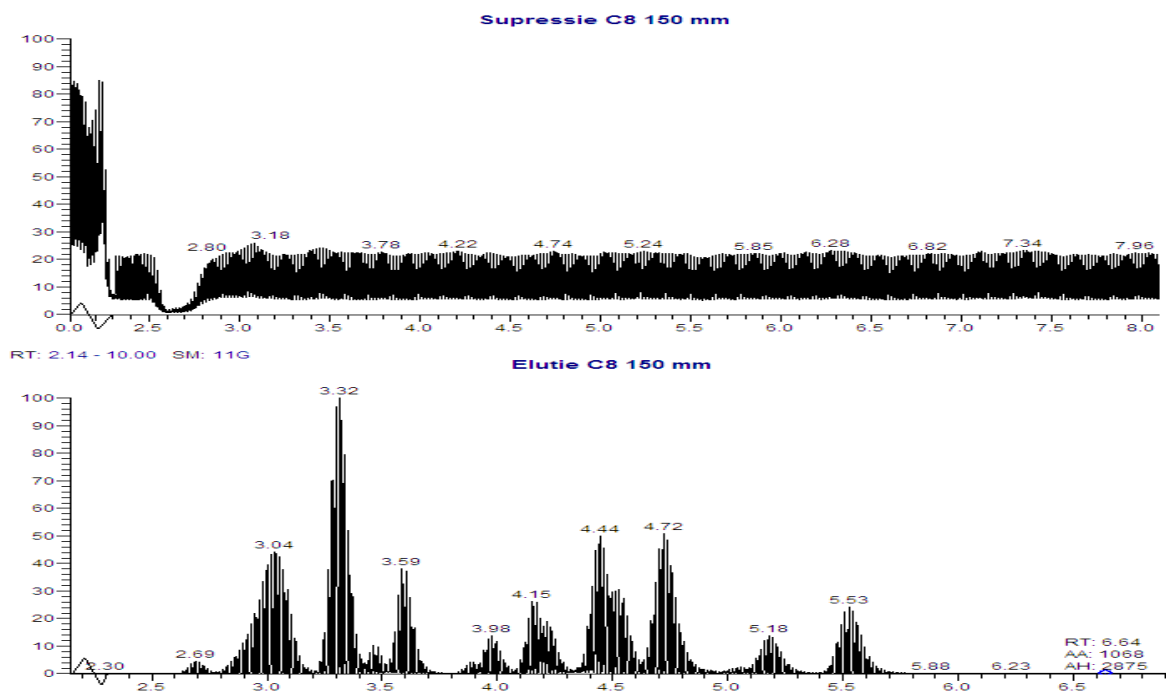
Figuur 26 geeft de kwalitatieve suppressie en het elutie profiel, van het 55:45 acetonitril : formiaat buffer isocratisch systeem op kolom D weer.



Figuur 26: Suppressie bepaling kolom D van het 55:45 acetonitril : buffer isocratisch systeem; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.4.6 isocratisch systeem 2 op Kolom D

Figuur 27 geeft de kwalitatieve suppressie profiel en het elutie profiel, van het 50:50 acetonitril : formiaat buffer isocratisch systeem op kolom D weer.



Figuur 27: Suppressie bepaling kolom D van het 50:50 acetonitril : buffer isocratisch systeem; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (min.) weergegeven.

6.5 Optimalisatie van gevoeligheid

Er werd onderscheid gemaakt tussen componenten welke matige, gemiddelde en intense (grote) area's hadden bij de chromatografie met de formiaat buffer, waarbij de LLOQ in acht werd genomen. De antidepressiva met matige signaal intensiteit wegen zwaarder gedurende de optimalisatie van de analysemethode dan antidepressiva met gemiddeld of intens signaal intensiteit.

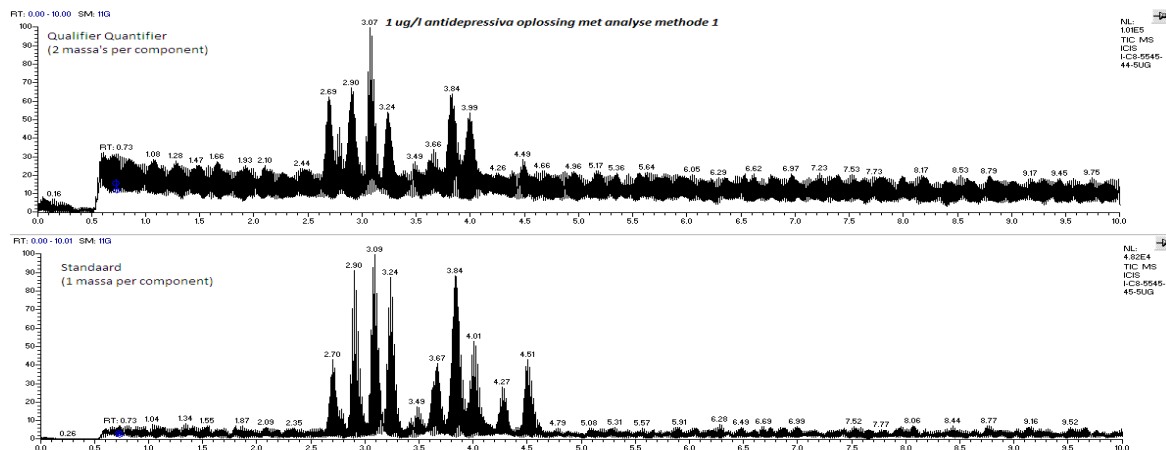
Tabel 24 geeft de signaal sterkte van de antidepressiva in drie categorieën weer. Gedurende de optimalisatie worden de componenten die een matig signaal sterkte hebben **blauw** gekleurd.

Tabel 24: Onderscheid signaal sterkte

matig signaal	LLOQ (µg/l)	gemiddeld signaal	LLOQ (µg/l)	intens signaal	LLOQ (µg/l)
DM.mirtazapine	25	Mirtazapine	10	DM.venlafaxine	25
Paroxetine	10	Citalopram	25	Venlafaxine D6 (ISTD)	-
DM.maprotiline	50	DM.dosulepine	50	Citalopram D6 (ISTD)	-
DM.fluoxetine	25	Dosulepine	25	Imipramine	25
DM.sertraline	25	Sertraline	25	Amitriptyline D6 (ISTD)	-
Fluvoxamine	25	Fluoxetine	50	Amitriptyline	25
DM.citalopram	5	DM.clomipramine	75	DM.amitriptyline	25
Dosulepine	25	Clomipramine	50		
		Maprotiline	38		
		DM.imipramine	75		

6.5.1 Transitie selectie

Figuur 28 geeft het TIC chromatogram van de 1 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met de "Amitriptyline & Nortriptyline" analysemethode, met kolom D, met twee massa's per parent ion (Qualifier/Quantifier), en één massa per parent ion (standaard) weer.



Figuur 28: TIC chromatogrammen 1 µg/l antidepressiva oplossing voor 'qualifier – quantifier' methode ; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

Figuur 29 geeft de massa van de 'parent ions' met gepaarde 'product ions' met bijbehorende voltages, welke werden opgenomen in de analyse methode weer.

SRM Settings							
Q1 Peak Width (FWHM):		0.70	Cycle Time(s):		☒ 1.000	Skimmer Offset (V):	
#	Parent	Product	SRM Collision Energy	Polarity	Trigger	Reference	Name
1	264.200	58.300	18	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)venlafaxine
2	252.000	209.100	23	+	1.000e+05	No	D.M. mirtazepine
3	266.100	195.100	26	+	1.000e+05	No	mirtazepine
4	278.200	58.300	19	+	1.000e+05	No	venlafaxine
5	284.000	64.300	19	+	1.000e+05	No	venlafaxine D6
6	311.100	109.100	25	+	1.000e+05	No	D.M. citalopram
7	325.200	109.100	29	+	1.000e+05	No	citalopram
8	331.000	109.100	32	+	1.000e+05	No	citalopram D6
9	330.000	192.100	20	+	1.000e+05	No	paroxetine
10	282.000	225.000	16	+	1.000e+05	No	D.M. dosulepine
11	296.000	222.900	23	+	1.000e+05	No	dosulepine
12	267.000	72.300	16	+	1.000e+05	No	D.M. (desi)imipramine
13	264.000	169.100	19	+	1.000e+05	No	D.M. maprotiline
14	281.000	86.300	17	+	1.000e+05	No	imipramine
16	298.000	44.400	12	+	1.000e+05	No	Duloxetine
17	319.000	200.100	21	+	1.000e+05	No	fluvoxamine
18	264.000	233.100	15	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)amitriptyline
19	278.000	250.200	19	+	1.000e+05	No	maprotiline
20	278.100	233.100	23	+	1.000e+05	No	amitriptyline
21	281.000	233.100	17	+	1.000e+05	No	amitriptyline D3
22	296.000	134.100	11	+	1.000e+05	No	D.M. fluoxetine
23	292.000	159.000	25	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)sertraline
24	308.000	277.000	13	+	1.000e+05	No	sertraline
25	301.000	72.300	17	+	1.000e+05	No	D.M. clomipramine
26	310.000	44.400	13	+	1.000e+05	No	fluoxetine
27	315.100	86.200	18	+	1.000e+05	No	clomipramine
*							

Figuur 29: Parent ion massa's met bijbehorende transitie's

6.5.2 Verschil in gevoeligheid antidepressiva tussen acetaat buffer (standaard) en formiaat-buffer

De acetaat buffer (standaard buffer bij OLVG Oost) werd getest tegenover een formiaat buffer op chromatografie en intensiteit van componenten.

Tabel 25 geeft de area van de 1 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met de reguliere "Amitriptyline & Nortriptyline" analysemethode van OLVG Oost, voor de componenten die matig signaal geven, bepaald met de acetaatbuffer en formiaat buffer weer.

Tabel 25: Verschil in gevoeligheid tussen acetaat buffer en formiaat buffer

ID.	Acetaat buffer	formiaat buffer	Δ Area (Formiaat - Acetaat)	Δ Area formiaat t.o.v. acetaat %
-	Area	Area	Area	%
DM.venlafaxine	113938	188382	74444	65,34
DM.mirtazapine	78319	84770	6451	8,24
Mirtazapine	365459	390664	25205	6,90
Venlafaxine	199997	204681	4684	2,34
DM.citalopram	154177	176755	22578	14,64
Citalopram	163006	189823	26817	16,45
Paroxetine	19875	46046	26171	131,68
DM.dosulepine	104252	114946	10694	10,26
DM.maprotiline	19057	21292	2235	11,73
Dosulepine	67894	110574	42680	62,86
Duloxetine	37667	49542	11875	31,53
DM.imipramine	141259	216494	75235	53,26
Fluvoxamine	4568	11177	6609	144,68
Imipramine	211213	323717	112504	53,27
DM.amitriptyline	191645	190687	-958	-0,50
Maprotiline	317638	385744	68106	21,44
DM.fluoxetine	4563	6972	2409	52,79
Amitriptyline	91956	90157	-1799	-1,96
DM.sertraline	6104	8269	2165	35,47
Fluoxetine	40805	49542	8737	21,41
DM.clomipramine	1252896	1449892	196996	15,72
Sertraline	77540	97800	20260	26,13
Clomipramine	230001	232225	2224	0,97
Gemiddeld	-	-	32449	34,12

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.5.3 Handmatige MS optimalisatie

Nadat de chromatografie bepaald was, werden de volgende MS parameters: het voltage op de ionisatiebron, de sheath gas, de auxiliary gas en de vaporizer temperature verder geoptimaliseerd.

6.5.3.1 Voltage op ionisatie bron

Het voltage op de ionisatie bron werd geoptimaliseerd door met de reguliere analysemethode (3500 volt), en met 4000, 4500 en 3000 volt op de ionisatie bron de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. De Area intensiteit van de analysemethodes werden vergeleken ten opzichte van de reguliere analysemethode. Mits een verbetering gevonden werd (intenser signaal), werd het voltage op de bron in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 26 geeft de resultaten van de optimalisatie van het voltage op de bron weer. De resultaten worden vergeleken tegenover de waarden van de standaard methode (3500 volt).

Tabel 26: Resultaten van bron voltage optimalisatie

ID.	Voltage (area)				Voltage t.o.v. 3500 V (%)		
	3500	4000	4500	3000	4000	4500	3000
DM.venlafaxine	257742	243843	197020	230341	-5,39	-23,56	-10,63
DM.mirtazapine	97875	74112	54884	82629	-24,28	-43,92	-15,58
Mirtazapine	360121	362072	205616	302018	0,54	-42,9	-16,13
Venlafaxine	312998	261919	190783	268903	-16,32	-39,05	-14,09
DM.citalopram	171794	130415	109172	126715	-24,09	-36,45	-26,24
Citalopram	288467	227746	179434	238362	-21,05	-37,8	-17,37
Paroxetine	50568	45922	31678	39326	-9,19	-37,36	-22,23
DM.dosulepine	141185	108166	103199	108822	-23,39	-26,91	-22,92
DM.maprotiline	21932	20551	13552	18387	-6,3	-38,21	-16,16
Dosulepine	217105	157612	154046	178307	-27,4	-29,05	-17,87
Duloxetine	50683	33987	28895	38753	-32,94	-42,99	-23,54
DM.imipramine	248001	221431	164408	204357	-10,71	-33,71	-17,6
Fluvoxamine	14415	10336	10229	12636	-28,3	-29,04	-12,34
Imipramine	479288	405554	293838	342523	-15,38	-38,69	-28,54
DM.amitriptyline	204870	172913	162135	152367	-15,6	-20,86	-25,63
Maprotiline	373541	342875	261912	317836	-8,21	-29,88	-14,91
DM.fluoxetine	3982	2645	3375	4023	-33,57	-15,25	1,04
Amitriptyline	74582	94621	57327	76174	26,87	-23,14	2,13
DM.sertraline	12900	7549	9316	10496	-41,48	-27,78	-18,64
Fluoxetine	51183	33987	35886	37108	-33,6	-29,89	-27,5
DM.clomipramine	1643111	1325365	1032144	1233363	-19,34	-37,18	-24,94
Sertraline	84514	69941	57115	71203	-17,24	-32,42	-15,75
Clomipramine	330569	274280	183870	293614	-17,03	-44,38	-11,18
Gemiddeld	-	-	-	-	-17,54	-33,06	-17,24

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.5.3.2 Sheath gas

Het sheath gas werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (30 Arb), en op 15, 5 en 45 Arb de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. De Area intensiteit van de analysemethoden werden vergeleken ten opzichte van de reguliere analysemethode. Mits een verbetering gevonden werd (intensier signaal), werd het sheath gas in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 27 geeft de resultaten van de sheath gas optimalisatie weer. De resultaten worden vergeleken tegenover de waarden van de standaard methode (30 Arb).

Tabel 27: Resultaten van sheath gas optimalisatie

ID.	Arb (area)				Arb t.o.v. 30 arb (%)		
	30	15	5	45	15	5	45
DM.venlafaxine	232780	154618	48918	201225	-33,58	-78,99	-13,56
DM.mirtazapine	96063	62094	17953	87924	-35,36	-81,31	-8,47
Mirtazapine	400273	253704	92394	364774	-36,62	-76,92	-8,87
Venlafaxine	277041	231900	44139	219035	-16,29	-84,07	-20,94
DM.citalopram	157292	80947	12252	157405	-48,54	-92,21	0,07
Citalopram	237175	141231	43891	195099	-40,45	-81,49	-17,74
Paroxetine	43863	14568	4236	57749	-66,79	-90,34	31,66
DM.dosulepine	109076	77837	17131	87810	-28,64	-84,29	-19,5
DM.maprotiline	17175	18581	3404	16341	8,19	-80,18	-4,86
Dosulepine	169876	94459	33241	119326	-44,39	-80,43	-29,76
Duloxetine	33603	14164	3159	39799	-57,85	-90,6	18,44
DM.imipramine	255657	167753	57908	224320	-34,38	-77,35	-12,26
Fluvoxamine	20014	3966	2951	13736	-80,18	-85,25	-31,37
Imipramine	392143	347774	81686	325933	-11,31	-79,17	-16,88
DM.amitriptyline	182522	132958	23657	151502	-27,16	-87,04	-17,00
Maprotiline	348640	271227	63921	317190	-22,2	-81,67	-9,02
DM.fluoxetine	2740	*	*	333	-	-	-87,83
Amitriptyline	108299	75445	13366	99894	-30,34	-87,66	-7,76
DM.sertraline	5443	6423	1158	4718	18,00	-78,72	-13,33
Fluoxetine	33603	14164	3159	39799	-57,85	-90,6	18,44
DM.clomipramine	1424400	876985	233306	1290332	-38,43	-83,62	-9,41
Sertraline	80327	33395	9949	80643	-58,43	-87,61	0,39
Clomipramine	270388	203819	52754	203018	-24,62	-80,49	-24,92
Gemiddeld	-	-	-	-	-34,87	-83,64	-12,37

* Geen (significant) signaal waargenomen

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.5.3.3 Auxiliary gas

Het auxiliary gas werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (20 Arb), en op 10, 5 en 30 Arb de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. De Area intensiteit van de analysemethoden werden vergeleken ten opzichte van de reguliere analysemethode. Mits een verbetering gevonden werd (intensier signaal), werd de sheath gas in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 28 geeft de resultaten van de auxiliary gas optimalisatie weer. De resultaten worden vergeleken tegenover de waarden van de standaard methode (20 Arb).

Tabel 28: Resultaten van auxiliary gas optimalisatie

ID.	Aux Arb (area)				Aux arb % t.o.v. 20 arb (%)		
	20	10	5	30	10	5	30
DM.venlafaxine	181448	238537	280384	159402	31,46	54,53	-12,15
DM.mirtazapine	85962	72073	71390	84864	-16,16	-16,95	-1,28
Mirtazapine	326664	410885	415262	305655	25,78	27,12	-6,43
Venlafaxine	198566	374120	284430	169238	88,41	43,24	-14,77
DM.citalopram	101159	79685	101180	130823	-21,23	0,02	29,32
Citalopram	178905	237593	247993	177626	32,80	38,62	-0,71
Paroxetine	37064	20918	28171	43997	-43,56	-23,99	18,70
DM.dosulepine	92823	100947	119650	88093	8,75	28,90	-5,10
DM.maprotiline	15554	13027	22657	16118	-16,25	45,67	3,63
Dosulepine	108672	166846	171392	100868	53,53	57,71	-7,18
Duloxetine	22413	23518	24936	32100	4,93	11,25	43,22
DM.imipramine	198249	267329	253109	181625	34,85	27,67	-8,39
Fluvoxamine	12156	10465	7443	16712	-13,91	-38,77	37,48
Imipramine	302159	510725	515590	243795	69,03	70,64	-19,32
DM.amitriptyline	160606	187089	170907	165801	16,49	6,41	3,23
Maprotiline	325682	364829	367065	302873	12,02	12,71	-7,00
DM.fluoxetine	5507	1444	430	2413	-73,79	-92,19	-56,19
Amitriptyline	89608	181521	135975	67985	102,57	51,74	-24,13
DM.sertraline	4538	1616	3562	7215	-64,39	-21,51	59,00
Fluoxetine	22413	23518	24936	32100	4,93	11,25	43,22
DM.clomipramine	1192617	1114811	951269	1223416	-6,52	-20,24	2,58
Sertraline	85251	67650	62468	74427	-20,65	-26,72	-12,7
Clomipramine	201332	317422	288885	188107	57,66	43,49	-6,57
gemiddeld	-	-	-	-	11,60	12,63	2,54

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.5.3.4 Vaporizer temperature

De vaporizer temperature werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (300 °C), en op 250, 350 en 400 °C de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. De Area intensiteit van de analysemethodes werden vergeleken ten opzichte van de reguliere analysemethode. Mits een verbetering gevonden werd (intenser signaal), werd de vaporizer temperature in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 29 geeft de resultaten van de vaporizer temperature optimalisatie weer. De resultaten worden vergeleken tegenover de waarden van de standaard methode (300 °C).

Tabel 29: Resultaten van vaporizer temperature optimalisatie

ID.	VT (area)				VT t.o.v. 300 °C VT (%)		
	300 °C	250 °C	350 °C	400 °C	250 °C	350 °C	400 °C
DM.venlafaxine	233611	230914	249983	253025	-1,15	7,01	8,31
DM.mirtazapine	92713	79737	79244	85810	-14,01	-14,53	-7,44
Mirtazapine	424758	404146	420534	360443	-4,85	-0,99	-15,14
Venlafaxine	262654	210145	263673	235311	-19,99	0,39	-10,41
DM.citalopram	184209	106373	120656	151148	-42,25	-34,5	-17,95
Citalopram	219704	160891	191128	223468	-26,77	-13,01	1,71
Paroxetine	58558	26011	40345	47524	-55,58	-31,1	-18,84
DM.dosulepine	124979	141843	99488	121275	13,49	-20,4	-2,96
DM.maprotiline	20305	20649	29738	26807	1,70	46,46	32,02
Dosulepine	137571	140254	104838	165277	1,95	-23,79	20,14
Duloxetine	42393	24814	33703	30899	-41,47	-20,5	-27,11
DM.imipramine	237873	252636	217883	250208	6,21	-8,40	5,19
Fluvoxamine	13569	16812	14757	19468	23,91	8,76	43,48
Imipramine	383299	387412	390967	400474	1,07	2,00	4,48
DM.amitriptyline	170193	180732	193149	203165	6,19	13,49	19,37
Maprotiline	338657	305670	379948	411433	-9,74	12,19	21,49
DM.fluoxetine	*436	*515	*1027	*2456	18,06	135,53	463,07
Amitriptyline	135834	102973	113595	124532	-24,19	-16,37	-8,32
DM.sertraline	9653	4794	4007	4937	-50,34	-58,49	-48,86
Fluoxetine	42393	24814	33703	30899	-41,47	-20,5	-27,11
DM.clomipramine	1471556	1129945	1439619	1293208	-23,21	-2,17	-12,12
Sertraline	65647	59639	78821	88200	-9,15	20,07	34,36
Clomipramine	255178	203900	283171	279365	-20,09	10,97	9,48
Gemiddeld	-	-	-	-	-13,55	-0,34	20,30

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

* Slechte meting

6.5.4 Gevoeligheid optimalisatie eluens additieven

6.5.4.1 0,25% mierenzuur eluens ten opzichte van 0,10% mierenzuur eluens

De mierenzuur concentratie werd geoptimaliseerd door de 5 µg/l test oplossing te analyseren met eluens met 0,1% en 0,25% mierenzuur. De area intensiteit van de 0,25% mierenzuur concentratie werd vergeleken ten opzichte van de standaard 0,1% mierenzuur concentratie. Mits een verbetering gevonden werd (intenser signaal), werd de mierenzuur concentratie in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 30 geeft de area's van de 5 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met analyse methode 1, met eluens met 0,10% en 0,25% mierenzuur (HCOOH) weer.

Tabel 30: Area van 5 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met analyse methode met 0,10% en 0,25% mierenzuur eluens

ID.	0,10% HCOOH	0,25% HCOOH	Area verschil	Area verschil
-	Area	Area	0,10% - 0,25% (area)	0,25 % t.o.v. 0,10% (%)
DM.venlafaxine	188382	158467	29915	-15,88
DM.mirtazapine	84770	58908	25862	-30,51
Mirtazapine	390664	395424	-4760	1,22
Venlafaxine	204681	208211	-3530	1,72
DM.citalopram	176755	143086	33668	-19,05
Citalopram	189823	171314	18509	-9,75
Paroxetine	46046	51546	-5500	11,94
DM.dosulepine	114946	95452	19494	-16,96
DM.maprotiline	21292	26999	-5707	26,80
Dosulepine	110574	114604	-4029	3,64
Duloxetine	49542	40376	9166	-18,50
DM.imipramine	216494	224053	-7560	3,49
Fluvoxamine	11177	8186	2991	-26,76
Imipramine	323717	317139	6577	-2,03
DM.amitriptyline	190687	197900	-7213	3,78
Maprotiline	385744	326041	59703	-15,48
DM.fluoxetine	6972	1685	5288	-75,84
Amitriptyline	90157	97619	-7462	8,28
DM.sertraline	8269	6007	2262	-27,36
Fluoxetine	49542	40376	9166	-18,50
DM.clomipramine	1449892	1313000	136892	-9,44
Sertraline	97800	93742	4059	-4,15
Clomipramine	232225	202702	29523	-12,71
Gemiddeld	-	-	15101	-10,52

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.5.4.2 0,25 mmol ammoniumformiaat buffer eluens ten opzichte van 0,10 mmol ammoniumformiaat buffer eluens

De formiaat concentratie werd geoptimaliseerd door de 5 µg/l test oplossing te analyseren met eluens met 10 mmol en 25 mmol formiaat. De area intensiteit van de 25 mmol formiaat concentratie werd vergeleken ten opzichte van de standaard 10 formiaat concentratie. Mits een verbetering gevonden werd (intensier signaal), werd de formiaat concentratie in kleinere stappen geoptimaliseerd.

Tabel 31 geeft de area's van de 5 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met analyse methode 1, met eluens met 10 mmol en 25 mmol ammoniumformiaat (NH₄CO₂) weer.

Tabel 31: Area van 5 µg/l antidepressiva oplossing, bepaald met analyse methode met 10 mmol en 25 mmol ammoniumformiaat eluens

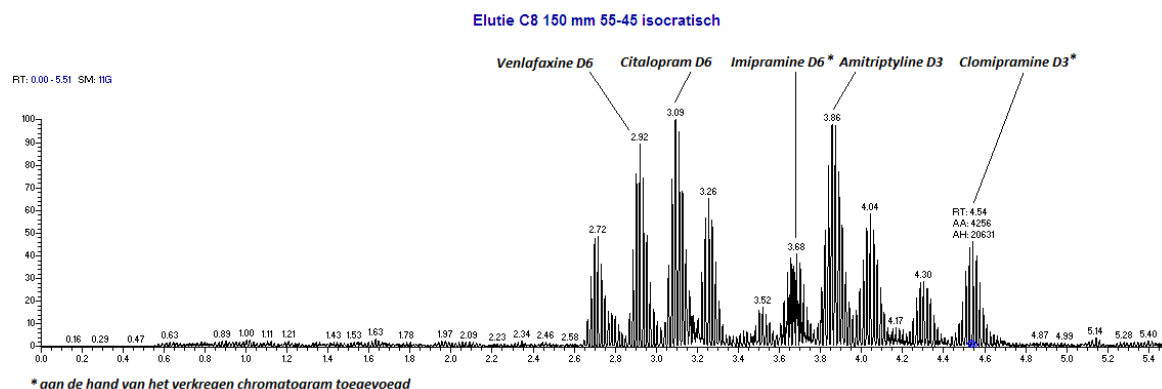
ID.	10 mmol NH ₄ HCO ₂	25 mmol NH ₄ HCO ₂	Area verschil	Area verschil
-	Area	Area	10 mmol - 25 mmol (area)	10 mmol t.o.v. 25 mmol (%)
DM.venlafaxine	188382	164756	23626	-12,54
DM.mirtazapine	84770	72380	12390	-14,62
Mirtazapine	390664	368709	21954	-5,62
Venlafaxine	204681	185276	19404	-9,48
DM.citalopram	176755	150709	26046	-14,74
Citalopram	189823	175379	14444	-7,61
Paroxetine	46046	43447	2599	-5,64
DM.dosulepine	114946	97263	17683	-15,38
DM.maprotiline	21292	26831	-5539	26,02
Dosulepine	110574	111283	-708	0,64
Duloxetine	49542	46032	3510	-7,09
DM.imipramine	216494	231623	-15130	6,99
Fluvoxamine	11177	12094	-917	8,20
Imipramine	323717	310310	13407	-4,14
DM.amitriptyline	190687	187441	3247	-1,70
Maprotiline	385744	380837	4907	-1,27
DM.fluoxetine	6972	3955	3018	-43,28
Amitriptyline	90157	89061	1096	-1,22
DM.sertraline	8269	9070	-801	9,68
Fluoxetine	49542	46032	3510	-7,09
DM.clomipramine	1449892	1246877	203015	-14,00
Sertraline	97800	94892	2908	-2,97
Clomipramine	232225	213314	18911	-8,14
Gemiddeld	-	-	16199	-5,43

Blauw gekleurde componenten zijn antidepressiva welke over een matige intensiteit beschikken op de MS

6.6 Kwantificatie

6.6.1 Toevoegen van interne standaarden

Figuur 30 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing met analyse methode 1, met de locaties van de interne standaarden weer. Venlafaxine D6, Citalopram D6 en Amitriptyline D3, waren voor de methode ontwikkeling gekozen als interne standaarden. Imipramine D6 en Clomipramine D3 zijn later toegevoegd.



Figuur 30: TIC chromatogram van 100 µg/l antidepressiva met interne standaard locaties; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.6.2 Interne standaard toewijzing

Alle antidepressiva kregen interne standaarden toegewezen aan de hand van het elutie profiel verkregen bij 6.4.5 (Figuur 26). De antidepressiva kregen een interne standaard toegewezen op het dichtstbijzijnde eluerende interne standaard. Tabel 32 geeft de toewijzing van de antidepressiva aan de interne standaarden aan.

Tabel 32: Toewijzing van interne standaarden

Venlafaxine D6	Citalopram D6	Imipramine D6	Amitriptyline D3	Clomipramine D3
DM.venlafaxine	DM.mirtazapine	DM.imipramine	DM.amitriptyline	DM.sertraline
Venlafaxine	Mirtazapine	Fluvoxamine	Maprotiline	Sertraline
	Paroxetine	Imipramine	DM.fluoxetine	DM.clomipramine
	DM.dosulepine	Duloxetine	Amitriptyline	Clomipramine
	DM.maprotiline		Fluoxetine	
	Dosulepine			
	Citalopram			
	DM.citalopram			

6.6.3 Lineariteit

6.6.3.1 Bereik

Tabel 33 geeft de laag en hoog therapeutische indexwaarden van alle componenten, en het theoretische bereik van de methode; de 'Lower Limit of Quantification' (LLOQ) is de laagste standaard en bedraagt een half keer de laag therapeutische waarden, de 'Upper Limit of Quantification' (ULOQ) is de hoogste standaard en bedraagt twee keer de hoog therapeutische waarden.

Tabel 33: Therapeutische indexwaarden en voor de bepaling van het bereik van de methode

Component	$\mu\text{g/l}$ [9]			
	Laag therapeutisch	Hoog therapeutisch	0,5 x laag therapeutisch	2 x hoog therapeutisch
Amitriptyline	50	200	25	400
DM.amitriptyline	50	150	25	300
Amitriptyline + DM.ami	100	300	50	600
Citalopram	50	200	25	400
DM.citalopram	10	100	5	200
Clomipramine	100	250	50	500
DM.clomipramine	150	550	75	1100
Dosulepine	50	150	25	300
DM.dosulepine	100	200	50	400
Doxepine	** *	** *	** *	** *
DM.doxepine	200	350	100	700
Duloxetine	30	120	15	240
Fluoxetine	100	450	50	900
DM.fluoxetine	50	350	25	700
Fluvoxamine	50	250	25	500
Imipramine	50	150	25	300
DM.imipramine	150	300	75	600
Maprotiline	75	300	37,5	600
DM.maprotiline	100	400	50	800
Mirtazapine	20	100	10	200
DM.Mirtazapine	50	300	25	600
Paroxetine	20	200	10	400
Sertraline	50	300	25	600
DM.sertraline	**	**	10	200
Trazodon	*300	*1500	*150	*3000
Venlafaxine	**	**	50	1000
DM.(Nor)venlafaxine	100	400	50	800

* = verwijderd uit methode

** = geen therapeutische index waarden gerapporteerd door bron [9]

Tabel 34 geeft het praktische bereik van de antidepressiva van de analyse methode weer. Alle componenten hebben een bereik van 2000% ten opzichte van de LLOQ.

Tabel 34: Praktisch bereik van de antidepressiva

Nr. Stof	$\mu\text{g/l}$ antidepressiva				
	Punt 1 (LLOQ) 5%	Punt 2 10%	Punt 3 25%	Punt 4 50%	Punt 5 (ULOQ) 100%
1 Amitriptyline	25	50	125	250	500
2 Citalopram	25	50	125	250	500
3 Clomipramine	25	50	125	250	500
4 Dosulepine	25	50	125	250	500
5 Duloxetine	25	50	125	250	500
6 Fluoxetine	25	50	125	250	500
7 Fluvoxamine	50	100	250	500	1000
8 Imipramine	25	50	125	250	500
9 Maprotiline	25	50	125	250	500
10 Mirtazepine	50	100	250	500	1000
11 Paroxetine	10	20	50	100	200
12 Sertraline	25	50	125	250	500
14 Venlafaxine	50	100	250	500	1000
15 DM.citalopram	5	10	25	50	100
16 DM.clomipramine	50	100	250	500	1000
17 DM.dosulepine	25	50	125	250	500
19 DM.fluoxetine	50	100	250	500	1000
20 DM.imipramine	50	100	250	500	1000
21 DM.maprotiline	50	100	250	500	1000
22 DM.mirtazapine	50	100	250	500	1000
24 DM.amitriptyline	25	50	125	250	500
25 DM.venlafaxine	25	50	125	250	500
26 DM.sertraline	10	20	50	100	200

6.6.3.2 Standaard lineaire regressie vs. gewogen lineaire regressie

Tabel 35 geeft de resultaten van de regressie lijn van desmethyl Mirtazapine voor het bepalen van het regressie model weer.

Tabel 35: resultaten van desmethyl Mirtazapine voor regressie model

Theo. Conc. ($\mu\text{g/l}$)	signaal. (area / area I.S.)
50	0,5737
100	1,0330
250	2,8047
500	5,5262
1000	11,7764

Tabel 36 geeft de resultaten van desmethyl Mirtazapine voor het bepalen van het regressiemodel weer. De resultaten in kolom '1/x' van Tabel 36 zijn berekend aan de hand van een lineair enkelvoudig gewogen regressie model, de 'std.' kolom is berekend aan de hand van een standaard (ongewogen) lineaire regressie model.

Tabel 36: Resultaten van gewogen regressie model en standaard regressie model

QC	Theo. Conc. (µg/l)	Prak. conc.		Afwijking t.o.v. lijn	
		1/x (µg/l)	std. (µg/l)	1/x (%)	std. (%)
LLOQ 1	50	53,23	59,84	6,46	19,69
2	100	93,88	99,67	-6,12	-0,33
3	250	246,70	249,40	-1,32	-0,24
4	500	485,88	483,73	-2,82	-3,25

Concentratie berekend met Vergelijking 1

Vergelijking 1 : Concentratie formule:

$$(Signaal\ analyt - asafsnede\ van\ model) / richtingscoëfficiënt\ van\ model \\ = (0,5618 - 0,5413) / 0,01157 = 53,23$$

Gewogen richtingscoëfficiënt berekend met Vergelijking 3

Gewogen as-afsnede berekend met formule Vergelijking 4

aantal (n)	1/Xi	Xi	Yi	Wi	Xi^2	XiYi	WiXi	WiYi	WiXiYi	WiXi^2
5	0,02	50	0,57	2,70	2500	28,69	135,14	1,55	78	6757
5	0,01	100	1,03	1,35	10000	103,30	135,14	1,40	140	13514
5	0,004	250	2,80	0,54	62500	701,18	135,14	1,52	379	33784
5	0,002	500	5,53	0,27	250000	2763,08	135,14	1,49	747	67568
5	0,001	1000	11,78	0,14	1000000	11776,44	135,14	1,59	1591	135135
Σ	0,037	1900	21,71	5,00	1325000	15373	675,68	7,55	2934	256757

Xi = theoretische concentratie (µg/l)

Yi = Area ratio (area / area I.S.)

Wi = Weegfactor (berekend met Vergelijking 2)

Vergelijking 2: Weegfactor formule [18]:

$$Wi = \frac{n * \frac{1}{Xi}}{\sum \frac{1}{Xi}} : \frac{5 * \frac{1}{50}}{\sum \frac{1}{50}} = 2,70$$

n = aantal regressie punten

Si = Theoretische concentratie regressiepunt

Vergelijking 3: Gewogen richtingscoëfficiënt formule [18]:

$$a = \frac{\sum WiXiYi - \frac{\sum WiXi * \sum WiYi}{n}}{\sum WiXi^2 - \frac{(\sum WiXi)^2}{n}} : \frac{2934 - \frac{675,68 * 7,55}{5}}{256757 - \frac{675,68^2}{5}} = 0,01157$$

n = aantal regressie punten

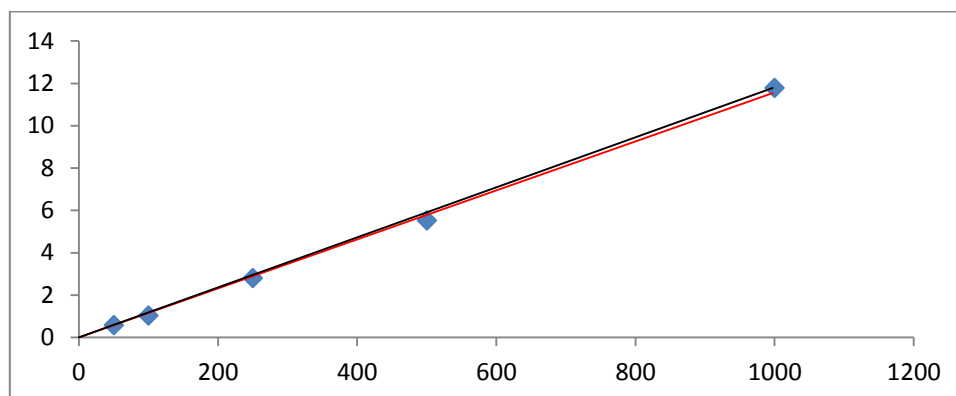
Vergelijking 4: Gewogen as-afsnede formule [18]:

$$b = \frac{\sum WiYi - a * \sum WiXi}{n} : \frac{7,55 - 0,01157 * 675,68}{5} = -0,05413$$

a = richtingscoëfficiënt

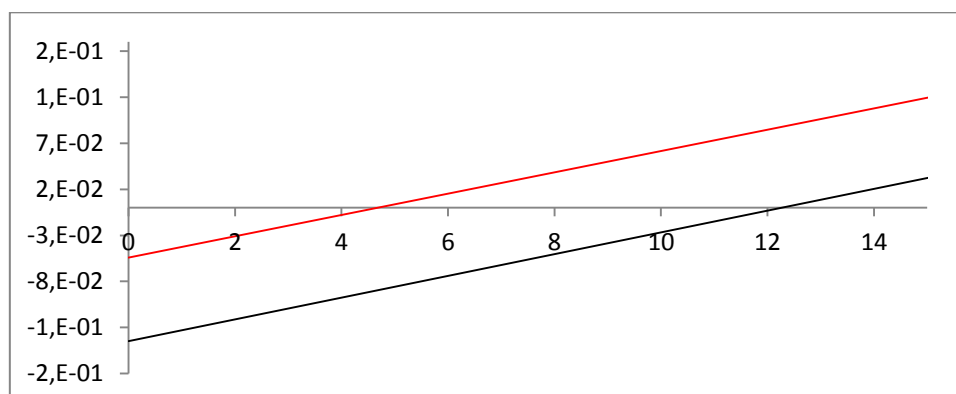
n = aantal regressie punten

Figuur 31 geeft de regressie van desmethyl Mirtazapine, met zowel lineair gewogen regressie (rood) als standaard lineaire regressie weer.



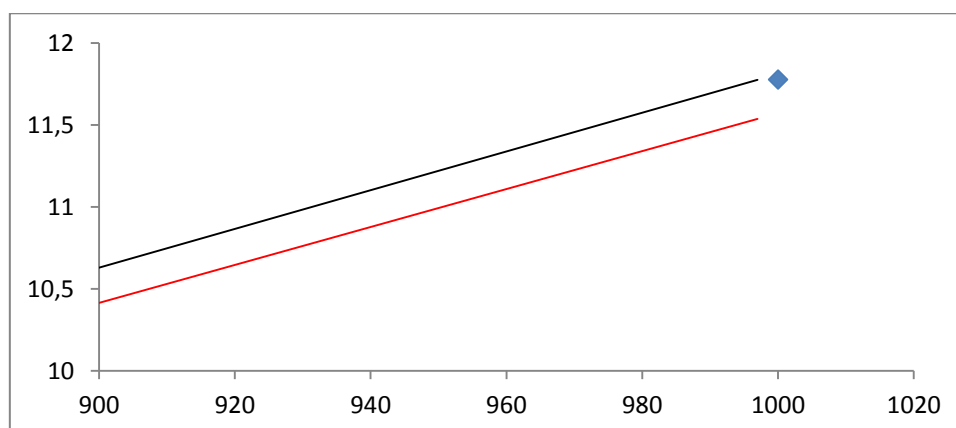
Figuur 31: Regressie desmethyl Mirtazapine voor regressie model bepaling: Op de y-as staat het signaal (area ratio) weergegeven – op de X-as staat de concentratie weergegeven in µg/l

Figuur 32 geeft de as-afsnede van Figuur 31 weer. Rood is de lineaire gewogen regressielijn en zwart is de standaard lineaire regressielijn.



Figuur 32: As afsnede van Figuur 31: Op de y-as staat het signaal (area ratio) weergegeven – op de X-as staat de concentratie weergegeven in µg/l

Figuur 33 geeft de bovenzijde van de regressielijn van Figuur 31 weer. Rood is de lineaire gewogen regressielijn en zwart is de standaard lineaire regressielijn.



Figuur 33: bovenzijde regressielijn (punt 5) van Figuur 31: Op de y-as staat het signaal (area ratio) weergegeven – op de X-as staat de concentratie weergegeven in µg/l

6.6.3.3 Lineariteit model

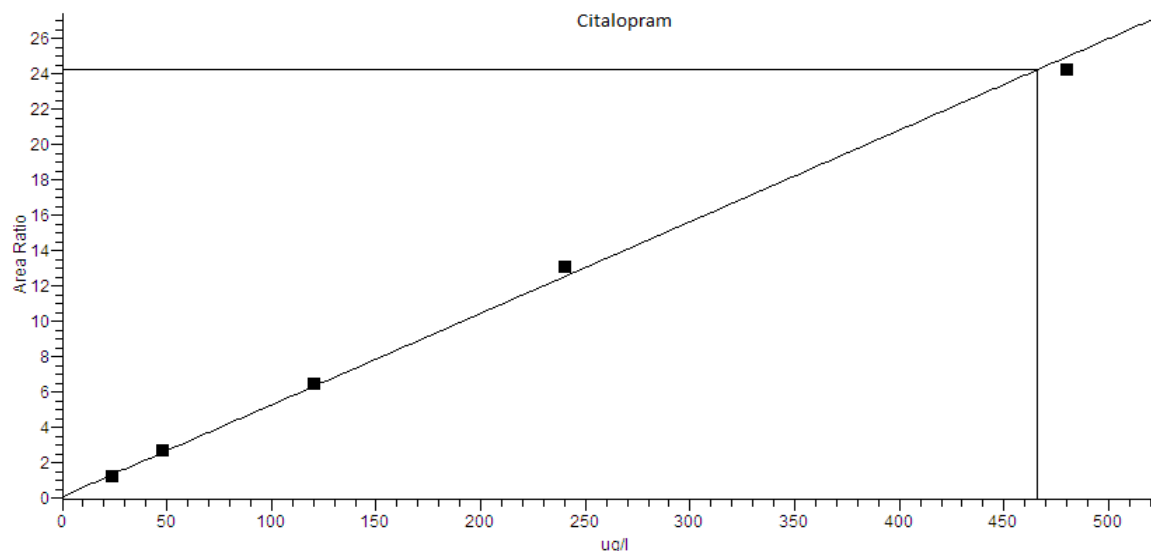
6.6.3.3.1 Lineariteit van analyse methode 1 met 10 µl injectievolume

Tabel 37 geeft de lijn rapportage van de lineariteit test met 10 µl injectie volume weer. Er is een gewogen lineaire model op alle componenten toegepast. De betrouwbaarheidsintervallen (b.i.) zijn berekend aan de hand van een 95% interval. A is het helling getal, B is de as afsneden, sy/x is de standaard fout en R² is de correlatiecoëfficiënt.

Tabel 37: resultaten van lineariteit test 10 µl injectie volume

I.D.	Lijn rapportage: $y = ax + b$									
	Y =	A	X ±	B.I. A	+	B	±	B.I. B	sy/x	R ²
DM.venlafaxine	y =	4,48E-02	x ±	6,49E-05	+	-4,90E-02	±	1,67E-02	; sy/x = 2,52E-02	; r ² = 0,9999
DM.mirtazapine	y =	3,76E-02	x ±	6,95E-05	+	1,43E-01	±	3,58E-02	; sy/x = 5,39E-02	; r ² = 0,9978
Mirtazapine	y =	4,95E-02	x ±	4,84E-04	+	1,48E-01	±	5,07E-02	; sy/x = 7,64E-02	; r ² = 0,9967
Venlafaxine	y =	4,41E-02	x ±	4,14E-05	+	3,24E-02	±	2,14E-02	; sy/x = 3,23E-02	; r ² = 0,9999
DM.citalopram	y =	4,07E-02	x ±	3,20E-04	+	2,31E-02	±	1,60E-02	; sy/x = 2,41E-02	; r ² = 0,9907
Citalopram	y =	4,55E-02	x ±	2,36E-05	+	1,33E-02	±	5,84E-03	; sy/x = 8,81E-03	; r ² = 1,0000
Paroxetine	y =	3,70E-02	x ±	3,82E-05	+	1,84E-02	±	9,36E-03	; sy/x = 1,41E-02	; r ² = 0,9989
DM.dosulepine	y =	3,98E-02	x ±	3,59E-05	+	1,59E-02	±	9,19E-03	; sy/x = 1,39E-02	; r ² = 0,9998
DM.maprotiline	y =	3,59E-02	x ±	2,55E-05	+	4,55E-02	±	1,35E-02	; sy/x = 2,03E-02	; r ² = 0,9975
Dosulepine	y =	4,07E-02	x ±	1,15E-04	+	8,51E-02	±	2,83E-02	; sy/x = 4,27E-02	; r ² = 0,9988
Duloxetine	y =	3,82E-02	x ±	4,54E-05	+	2,45E-02	±	1,26E-02	; sy/x = 1,89E-02	; r ² = 0,9994
DM.imipramine	y =	4,25E-02	x ±	2,63E-04	+	4,06E-01	±	1,35E-01	; sy/x = 2,04E-01	; r ² = 0,9963
Fluvoxamine	y =	3,54E-02	x ±	3,06E-05	+	2,51E-02	±	8,23E-03	; sy/x = 1,24E-02	; r ² = 0,9831
Imipramine	y =	5,58E-02	x ±	2,75E-04	+	1,75E-01	±	7,26E-02	; sy/x = 1,09E-01	; r ² = 0,9995
DM.amitriptyline	y =	4,27E-02	x ±	2,06E-04	+	1,06E-01	±	5,16E-02	; sy/x = 7,79E-02	; r ² = 0,9979
Maprotiline	y =	4,72E-02	x ±	4,05E-04	+	5,40E-01	±	2,14E-01	; sy/x = 3,22E-01	; r ² = 0,9967
DM.fluoxetine	y =	3,52E-02	x ±	5,34E-06	+	9,27E-03	±	2,75E-03	; sy/x = 4,15E-03	; r ² = 0,9981
Amitriptyline	y =	4,20E-02	x ±	2,90E-05	+	2,51E-03	±	7,26E-03	; sy/x = 1,10E-02	; r ² = 0,9999
DM.sertraline	y =	3,55E-02	x ±	1,05E-05	+	-2,84E-03	±	2,69E-03	; sy/x = 4,06E-03	; r ² = 0,9989
Fluoxetine	y =	3,72E-02	x ±	3,26E-05	+	1,54E-02	±	1,80E-02	; sy/x = 2,72E-02	; r ² = 0,9994
DM.clomipramine	y =	4,10E-02	x ±	1,11E-04	+	1,20E-01	±	5,72E-02	; sy/x = 8,64E-02	; r ² = 0,9990
Sertraline	y =	3,82E-02	x ±	8,60E-05	+	1,05E-01	±	4,88E-02	; sy/x = 7,36E-02	; r ² = 0,9979
Clomipramine	y =	5,34E-02	x ±	2,06E-04	+	-1,01E-01	±	5,09E-02	; sy/x = 7,68E-02	; r ² = 0,9996

Figuur 34 geeft de lineaire regressie van citalopram weer. Alle overige regressie modellen staan in bijlage 12.13.1.



Figuur 34: Lineaire regressie Citalopram: Op de Y-as staat de area ratio weergegeven, en op de X-as staat de concentratie van Citalopram weergegeven in $\mu\text{g/l}$

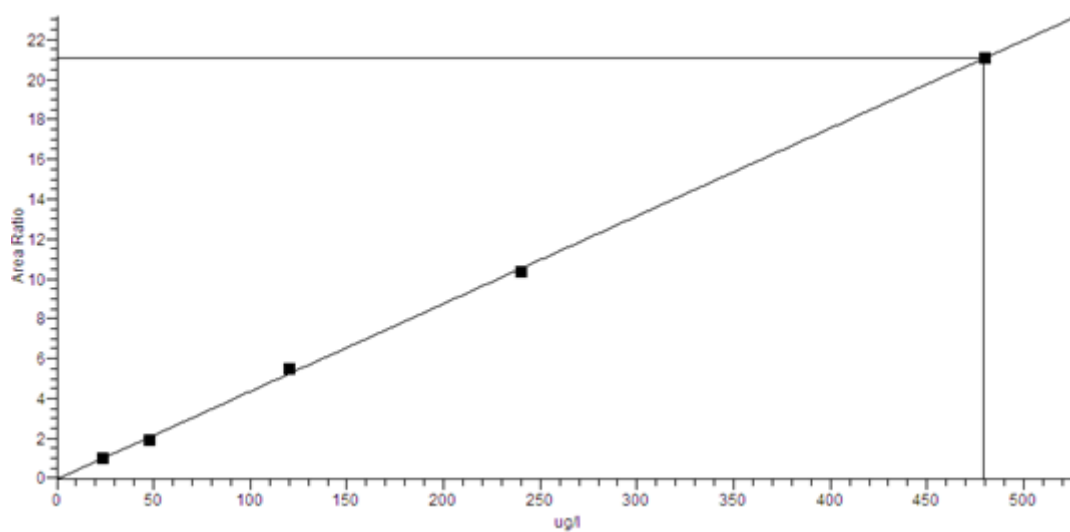
6.6.3.3.2 Lineariteit van analyse methode 1 met 2,5 μl injectievolume

Figuur 34 geeft de lijn rapportage van de lineariteit test met 2,5 μl injectie volume weer. Er is een gewogen lineaire model op alle componenten toegepast. De betrouwbaarheidsintervallen (b.i.) zijn berekend aan de hand van een 95% interval. A is het helling getal, B is de as afsneden, sy/x is de standaard fout en R^2 is de correlatiecoëfficiënt.

Tabel 38: resultaten van lineariteit test 2,5 μl injectie volume

I.D.	Lijn Rapportage: $y = ax + b$						
	A	A b.i.	B	B b.i.	sy/x	r^2	
DM.Venlafaxine	$y = 3,63\text{E-}02 \ x \pm$	$-7,32\text{E-}02 \ +$	$3,94\text{E-}04 \pm$	$1,01\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,1531$	$r^2 = 0,9996$	
DM.mirtazapine	$y = 9,16\text{E-}03 \ x \pm$	$-1,11\text{E-}01 \ +$	$1,36\text{E-}04 \pm$	$6,99\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1055$	$r^2 = 0,9993$	
Mirtazapine	$y = 9,65\text{E-}02 \ x \pm$	$-7,59\text{E-}02 \ +$	$7,71\text{E-}04 \pm$	$8,07\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1217$	$r^2 = 0,9998$	
Venlafaxine	$y = 4,46\text{E-}02 \ x \pm$	$3,46\text{E-}02 \ +$	$1,87\text{E-}04 \pm$	$9,68\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1460$	$r^2 = 0,9999$	
Dmcitalopram	$y = 2,68\text{E-}02 \ x \pm$	$-3,90\text{E-}02 \ +$	$4,41\text{E-}04 \pm$	$2,20\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0332$	$r^2 = 0,9992$	
Citalopram	$y = 4,39\text{E-}02 \ x \pm$	$-3,29\text{E-}02 \ +$	$4,59\text{E-}04 \pm$	$1,13\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,1710$	$r^2 = 0,9997$	
Paroxetine	$y = 5,05\text{E-}03 \ x \pm$	$-4,01\text{E-}02 \ +$	$1,14\text{E-}04 \pm$	$2,78\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0420$	$r^2 = 0,9985$	
DM.dosulepine	$y = 2,26\text{E-}02 \ x \pm$	$-6,05\text{E-}02 \ +$	$3,41\text{E-}04 \pm$	$8,74\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1318$	$r^2 = 0,9993$	
DM.maprotiline	$y = 3,05\text{E-}03 \ x \pm$	$-7,43\text{E-}02 \ +$	$7,35\text{E-}05 \pm$	$3,87\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0584$	$r^2 = 0,9983$	
Dosulepine	$y = 3,52\text{E-}02 \ x \pm$	$9,33\text{E-}02 \ +$	$2,87\text{E-}04 \pm$	$7,10\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1071$	$r^2 = 0,9998$	
Duloxetine	$y = 5,95\text{E-}03 \ x \pm$	$1,36\text{E-}02 \ +$	$1,37\text{E-}04 \pm$	$3,77\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0569$	$r^2 = 0,9984$	
DM.imipramine	$y = 2,15\text{E-}02 \ x \pm$	$-9,65\text{E-}02 \ +$	$2,41\text{E-}04 \pm$	$1,24\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,1872$	$r^2 = 0,9996$	
Fluvoxamine	$y = 9,16\text{E-}04 \ x \pm$	$-7,56\text{E-}03 \ +$	$4,68\text{E-}05 \pm$	$1,26\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0190$	$r^2 = 0,9922$	
Imipramine	$y = 4,48\text{E-}02 \ x \pm$	$-1,69\text{E-}01 \ +$	$7,96\text{E-}04 \pm$	$2,10\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,3163$	$r^2 = 0,9991$	
DM.amitriptyline	$y = 3,69\text{E-}02 \ x \pm$	$-6,71\text{E-}02 \ +$	$2,35\text{E-}04 \pm$	$5,90\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0890$	$r^2 = 0,9999$	
Maprotiline	$y = 5,06\text{E-}02 \ x \pm$	$-5,56\text{E-}01 \ +$	$3,30\text{E-}04 \pm$	$1,74\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,2626$	$r^2 = 0,9999$	
DM.fluoxetine	$y = 6,21\text{E-}04 \ x \pm$	$-3,12\text{E-}02 \ +$	$2,86\text{E-}05 \pm$	$1,47\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0222$	$r^2 = 0,9937$	
Amitriptyline	$y = 2,66\text{E-}02 \ x \pm$	$-1,33\text{E-}02 \ +$	$2,10\text{E-}04 \pm$	$5,27\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0796$	$r^2 = 0,9998$	
DM.sertraline	$y = 3,65\text{E-}04 \ x \pm$	$-1,36\text{E-}02 \ +$	$2,53\text{E-}05 \pm$	$6,51\text{E-}03$	$\text{sy/x} = 0,0098$	$r^2 = 0,9858$	
Fluoxetine	$y = 6,53\text{E-}03 \ x \pm$	$-1,14\text{E-}01 \ +$	$7,26\text{E-}05 \pm$	$4,01\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,0605$	$r^2 = 0,9996$	
Sertraline	$y = 1,75\text{E-}02 \ x \pm$	$-7,74\text{E-}02 \ +$	$1,51\text{E-}04 \pm$	$7,76\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1170$	$r^2 = 0,9998$	
DM.clomipramine	$y = 1,14\text{E-}02 \ x \pm$	$-3,07\text{E-}01 \ +$	$2,11\text{E-}04 \pm$	$1,20\text{E-}01$	$\text{sy/x} = 0,1808$	$r^2 = 0,9990$	
Clomipramine	$y = 5,84\text{E-}02 \ x \pm$	$-1,52\text{E-}01 \ +$	$3,23\text{E-}04 \pm$	$7,98\text{E-}02$	$\text{sy/x} = 0,1204$	$r^2 = 0,9999$	

Figuur 34 geeft de lineaire regressie weer van citalopram weer. Alle overige regressie modellen staan in bijlage 12.13.1.



Figuur 35: Lineaire regressie citalopram: Op de Y-as staat de area ratio weergegeven, en op de X-as staat de concentratie van citalopram weergegeven in $\mu\text{g/l}$

6.6.3.4 Recovery

De recovery van de methode werd geanalyseerd om te controleren of de analyse methode kon kwantificeren. Tevens werd de recovery van de componenten met de PPT methode bepaald, om inzicht te krijgen in de effectiviteit van de PPT methode, gebruikt bij de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. De recovery werd op drie punten in het regressiegebied bepaald om een eventuele fout in het regressiegebied te corrigeren.

6.6.3.4.1 Resultaten recovery in waterige matrix ten opzichte van een regressiereeks in waterige matrix

Tabel 39 geeft de resultaten van de recovery monsters in waterige matrix, ten opzichte van een regressie reeks in waterige matrix weer. De recovery word bepaald door de praktische concentratie ten opzichte van hun theoretische concentratie te vergelijken. De recovery resultaten worden per antidepressiva gemiddeld.

Tabel 39: resultaten recovery in waterige matrix

ID.	Concentratie AD						Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)			
	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.
-	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.				
DM.venlafaxine	50,00	50,22	125,00	120,98	250,00	241,67	0,45	-3,22	-3,33	-2,03
DM.mirtazapine	98,58	107,96	246,44	277,10	492,88	517,58	9,52	12,44	5,01	8,99
Mirtazapine	20,34	22,75	50,85	57,25	101,70	103,76	11,86	12,60	2,02	8,83
Venlafaxine	100,49	99,67	251,23	251,84	502,46	500,11	-0,82	0,24	-0,47	-0,35
DM.citalopram	9,70	9,63	24,26	24,94	48,51	49,07	-0,79	2,80	1,16	1,06
Citalopram	47,98	47,60	119,96	119,39	239,91	242,02	-0,79	-0,47	0,88	-0,13
Paroxetine	47,63	51,21	119,06	124,86	238,13	249,38	7,53	4,87	4,73	5,71
DM.dosulepine	49,75	51,72	124,39	128,85	248,77	258,08	3,96	3,59	3,74	3,76
DM.maprotiline	102,43	108,49	256,06	291,79	512,13	530,26	5,92	13,95	3,54	7,81
Dosulepine	48,02	48,77	120,06	125,83	240,13	241,71	1,55	4,80	0,66	2,34
Duloxetine	53,67	56,91	134,18	146,14	268,35	279,34	6,04	8,92	4,09	6,35
DM.imipramine	100,10	107,16	250,25	282,56	500,50	523,91	7,05	12,91	4,68	8,21
Fluvoxamine	52,32	53,44	130,81	146,13	261,61	255,83	2,14	11,71	-2,21	3,88
Imipramine	51,19	51,13	127,98	131,87	255,97	268,45	-0,13	3,03	4,88	2,59
DM.amitriptyline	48,80	50,67	121,99	134,28	243,97	263,40	3,84	10,08	7,96	7,29
Maprotiline	102,43	103,93	256,06	287,10	512,13	543,41	1,47	12,12	6,11	6,57
DM.fluoxetine	100,00	109,34	250,00	264,76	500,00	531,65	9,34	5,91	6,33	7,19
Amitriptyline	48,73	49,18	121,82	126,29	243,64	245,67	0,93	3,67	0,83	1,81
DM.sertraline	50,00	52,07	125,00	126,53	250,00	253,49	4,15	1,23	1,40	2,26
Fluoxetine	107,35	110,97	268,37	286,61	536,74	565,59	3,38	6,80	5,38	5,18
DM.clomipramine	100,43	102,76	251,07	272,75	502,14	530,07	2,32	8,63	5,56	5,51
Sertraline	110,27	114,19	275,68	308,86	551,35	592,32	3,56	12,04	7,43	7,67
Clomipramine	48,00	46,48	120,00	117,02	240,00	243,34	-3,16	-2,48	1,39	-1,42
Gemiddeld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,30

6.6.3.4.2 Resultaten recovery in serum met PPT methode ten opzichte van een regressiereeks in waterige matrix

De recovery van de PPT methode werd getest door recovery monsters op te werken met de reguliere PPT van de 'Amitriptyline & Nortriptyline' methode van OLVG Oost. De resultaten werden gekwantificeerd aan de hand van een regressie reeks opgenomen in water, waardoor de effectiviteit van de PPT methode inzichtelijk worden.

Tabel 40 geeft de resultaten van de recovery monsters in serum, voorberekt met PPT, ten opzichte van een regressie reeks in waterige matrix weer. De recovery wordt bepaald door de praktische concentratie ten opzichte van hun theoretische concentratie te vergelijken. De recovery resultaten worden per antidepressiva gemiddeld.

Tabel 40: resultaten recovery in serum met PPT t.o.v. waterige matrix regressie reeks

ID.	Concentratie AD						Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)				
	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.	Std. Dev.
DM.venlafaxine	50,00	36,70	125,00	87,86	250,00	171,47	-26,60	-29,71	-31,41	-29,24	2,44
DM.mirtazapine	98,58	87,79	246,44	259,57	492,88	547,58	-10,94	5,33	11,10	1,83	11,43
Mirtazapine	20,34	19,27	50,85	59,61	101,70	121,01	-5,28	17,23	18,99	10,31	13,53
Venlafaxine	100,49	96,95	251,23	248,91	502,46	493,34	-3,53	-0,93	-1,82	-2,09	1,32
DM.citalopram	9,70	8,67	24,26	22,39	48,51	45,05	-10,65	-7,71	-7,14	-8,50	1,88
Citalopram	47,98	47,61	119,96	122,51	239,91	238,18	-0,78	2,13	-0,72	0,21	1,66
Paroxetine	47,63	35,69	119,06	114,16	238,13	249,26	-25,07	-4,12	4,68	-8,17	15,28
DM.dosulepine	49,75	52,32	124,39	137,66	248,77	269,41	5,17	10,67	8,29	8,04	2,76
DM.maprotiline	102,43	91,59	256,06	281,40	512,13	616,56	-10,58	9,90	20,39	6,57	15,75
Dosulepine	48,02	53,01	120,06	151,90	240,13	279,05	10,38	26,52	16,21	17,70	8,17
Duloxetine	53,67	56,95	134,18	158,07	268,35	307,89	6,11	17,81	14,73	12,89	6,06
DM.imipramine	100,10	114,26	250,25	332,31	500,50	625,50	14,15	32,79	24,98	23,97	9,36
Fluvoxamine	52,32	79,81	130,81	231,97	261,61	385,59	52,53	77,34	47,39	59,09	16,02
Imipramine	51,19	50,77	127,98	138,62	255,97	274,50	-0,82	8,31	7,24	4,91	4,99
DM.amitriptyline	48,80	45,78	121,99	128,47	243,97	266,56	-6,18	5,31	9,26	2,80	8,02
Maprotiline	102,43	94,44	256,06	280,42	512,13	587,68	-7,80	9,51	14,75	5,49	11,80
DM.fluoxetine	100,00	99,68	250,00	250,29	500,00	561,64	-0,32	0,11	12,33	4,04	7,18
Amitriptyline	48,73	47,75	121,82	121,01	243,64	239,13	-2,01	-0,66	-1,85	-1,51	0,74
DM.sertraline	50,00	35,19	125,00	102,28	250,00	202,43	-29,62	-18,17	-19,03	-22,27	6,38
Fluoxetine	107,35	102,09	268,37	269,87	536,74	560,85	-4,90	0,56	4,49	0,05	4,72
DM.clomipramine	100,43	81,05	251,07	233,81	502,14	524,75	-19,29	-6,88	4,50	-7,22	11,90
Sertraline	110,27	84,72	275,68	256,22	551,35	598,89	-23,17	-7,06	8,62	-7,20	15,90
Clomipramine	48,00	42,30	120,00	108,43	240,00	239,18	-11,87	-9,64	-0,34	-7,29	6,12

6.6.3.4.3 Resultaten recovery in serum met PPT methode ten opzichte van een regressiereeks in serum met een PPT methode

Tabel 41 geeft de resultaten van de recovery monsters in serum, voorberekt met PPT, ten opzichte van een regressie reeks in serum voorberekt met PPT weer. De recovery wordt bepaald door de praktische concentratie ten opzichte van hun theoretische concentratie te vergelijken. De recovery resultaten worden per antidepressiva gemiddeld.

Tabel 41: resultaten recovery in serum met PPT t.o.v. een regressie reeks in serum met PPT

ID.	Concentratie AD						Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)				
	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.	Std. Dev.
	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.					
DM.venlafaxine	50,00	49,70	125,00	131,94	250,00	245,08	-0,59	5,55	-1,97	1,00	4,00
DM.mirtazapine	99,46	100,92	248,66	261,83	497,32	550,82	1,47	5,30	10,76	5,84	4,67
Mirtazapine	22,68	20,38	56,70	53,52	113,40	112,17	-10,13	-5,60	-1,08	-5,60	4,53
Venlafaxine	96,52	101,18	241,29	268,78	482,58	513,24	4,83	11,39	6,35	7,53	3,43
DM.citalopram	10,20	9,38	25,51	23,79	51,02	54,11	-8,04	-6,73	6,06	-2,91	7,79
Citalopram	53,87	47,81	134,66	122,49	269,33	262,12	-11,25	-9,04	-2,68	-7,66	4,45
Paroxetine	47,10	44,01	117,74	121,96	235,49	270,42	-6,56	3,59	14,83	3,95	10,70
DM.dosulepine	47,50	50,97	118,74	131,83	237,48	258,89	7,30	11,02	9,02	9,11	1,86
DM.maprotiline	103,83	102,52	259,58	269,25	519,16	560,84	-1,26	3,73	8,03	3,50	4,65
Dosulepine	53,23	50,32	133,08	123,82	266,16	270,56	-5,47	-6,96	1,65	-3,59	4,60
Duloxetine	55,27	57,51	138,18	139,16	276,37	289,69	4,06	0,71	4,82	3,20	2,19
DM.imipramine	103,53	111,74	258,83	274,17	517,65	566,72	7,93	5,93	9,48	7,78	1,78
Fluvoxamine	49,46	50,92	123,66	122,26	247,32	268,17	2,96	-1,13	8,43	3,42	4,80
Imipramine	58,49	50,56	146,23	138,32	292,47	287,42	-13,56	-5,41	-1,73	-6,90	6,05
DM.amitriptyline	47,35	51,78	118,36	133,13	236,73	229,11	9,35	12,48	-3,22	6,21	8,31
Maprotiline	102,97	108,79	257,42	288,81	514,84	481,57	5,66	12,19	-6,46	3,80	9,46
DM.fluoxetine	100,00	100,33	250,00	262,54	500,00	453,93	0,33	5,02	-9,21	-1,29	7,25
Amitriptyline	57,08	48,66	142,71	126,55	285,42	221,77	-14,76	-11,32	-22,30	-16,13	5,62
DM.sertraline	50,00	64,52	125,00	120,35	250,00	220,18	29,04	-3,72	-11,93	4,46	21,68
Fluoxetine	115,22	116,59	288,05	290,48	576,10	491,34	1,19	0,84	-14,71	-4,23	9,08
DM.clomipramine	100,16	102,74	250,40	249,72	500,80	536,90	2,57	-0,27	7,21	3,17	3,78
Sertraline	96,33	105,46	240,83	300,33	481,65	512,62	9,48	24,70	6,43	13,54	9,79
Clomipramine	54,68	47,43	136,69	117,22	273,39	256,84	-13,26	-14,24	-6,06	-11,19	4,47

6.6.3.5 Proteïne precipitatie voorbereiding

6.6.3.5.1 Resultaten plasma : neerslagvloeistof verhouding

De verhouding plasma : neerslagvloeistof werd geoptimaliseerd. Tabel 42 geeft de resultaten van de plasma : neerslagvloeistof verhouding test weer, waarbij de resultaten vergeleken werden met de theoretische concentratie van de componenten.

Tabel 42: plasma : neerslagvloeistof verhouding

ID.	Concentratie AD (µg/l)					Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)			
	Theo.	1:10	1:5	1:2	1:1	1:10	1:5	1:2	1:1
DM.venlafaxine	125,00	134,86	124,94	136,83	120,09	7,89	-0,05	9,46	-3,93
DM.mirtazapine	246,44	256,71	246,28	263,31	231,16	4,17	-0,06	6,85	-6,20
Mirtazapine	50,85	52,24	52,47	53,52	51,90	2,73	3,18	5,25	2,07
Venlafaxine	251,23	262,09	268,76	269,55	248,45	4,32	6,98	7,29	-1,11
DM.citalopram	24,26	24,10	23,12	24,81	22,79	-0,64	-4,70	2,30	-6,05
Citalopram	119,96	125,12	115,56	115,35	114,42	4,31	-3,66	-3,84	-4,61
Paroxetine	119,06	123,62	121,92	117,15	107,35	3,83	2,40	-1,61	-9,84
DM.dosulepine	124,39	128,89	125,82	124,02	117,06	3,62	1,15	-0,30	-5,89
DM.maprotiline	256,06	270,18	274,16	252,51	246,69	5,51	7,07	-1,39	-3,66
Dosulepine	120,06	124,43	126,14	122,42	117,87	3,64	5,06	1,96	-1,83
Duloxetine	134,18	135,00	138,29	132,80	133,79	0,61	3,06	-1,03	-0,28
DM.imipramine	250,25	279,19	255,31	283,04	258,51	11,56	2,02	13,10	3,30
Fluvoxamine	130,81	124,09	119,70	127,45	109,16	-5,13	-8,49	-2,57	-16,55
Imipramine	127,98	135,19	137,31	130,80	135,71	5,63	7,29	2,20	6,04
DM.amitriptyline	121,99	133,61	129,11	139,73	124,56	9,53	5,84	14,55	2,11
Maprotiline	256,06	295,80	277,13	286,57	285,66	15,52	8,23	11,91	11,56
DM.fluoxetine	250,00	270,61	251,01	245,82	236,11	8,24	0,40	-1,67	-5,55
Amitriptyline	121,82	126,17	123,15	121,03	111,41	3,57	1,09	-0,65	-8,54
DM.sertraline	125,00	123,04	121,64	115,29	118,98	-1,57	-2,69	-7,77	-4,82
Fluoxetine	268,37	303,53	272,31	297,15	259,74	13,10	1,47	10,73	-3,22
DM.clomipramine	251,07	245,62	245,74	232,99	234,30	-2,17	-2,12	-7,20	-6,68
Sertraline	275,68	292,68	289,92	286,39	265,77	6,17	5,17	3,89	-3,59
Clomipramine	120,00	116,18	114,48	116,17	103,90	-3,19	-4,60	-3,19	-13,42
Gemiddeld	-	-	-	-	-	4,40	1,48	2,53	-3,51

6.6.3.6 Solid Phase Extraction (SPE)

6.6.3.6.1 Resultaten 'Mixed Cation Exchange' (MCX) SPE

6.6.3.6.1.1 MCX Recovery

Tabel 43 geeft de resultaten van de MCX SPE recovery weer. Er werd een regressie reeks in water opgenomen, waarmee de recovery van de MCX SPE berekend werd. Recovery monsters werden op drie verschillende concentraties met de MCX SPE voorbewerkt.

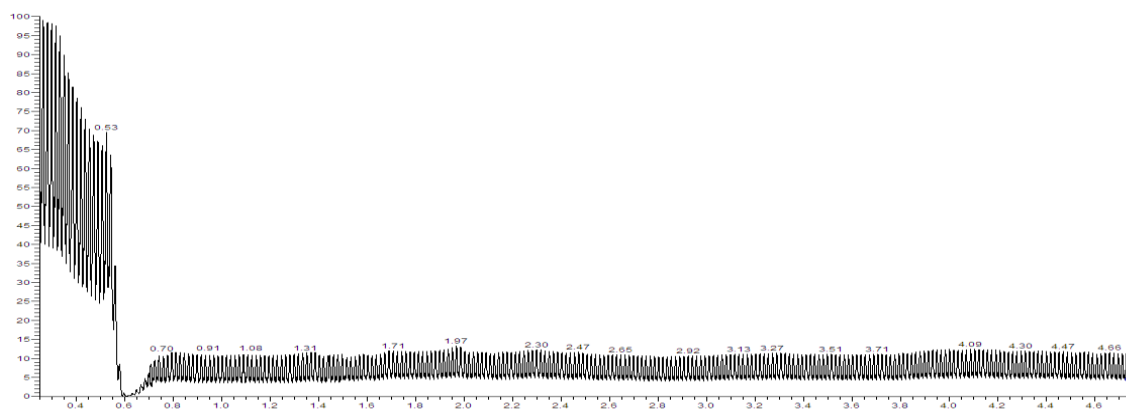
Tabel 43: resultaten recovery MCX SPE

ID.	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)				
	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.	Std. Dev.
DM.venlafaxine	50,00	54,17	125,00	122,17	250,00	236,27	8,33	-2,27	-5,49	0,19	7,23
DM.mirtazapine	99,46	116,60	248,66	274,67	497,32	527,01	17,23	10,46	5,97	11,22	5,67
Mirtazapine	22,68	22,94	56,70	55,65	113,40	108,29	1,13	-1,84	-4,51	-1,74	2,82
Venlafaxine	96,52	98,72	241,29	243,03	482,58	476,22	2,28	0,72	-1,32	0,56	1,81
DM.citalopram	10,20	10,26	25,51	26,23	51,02	54,05	0,58	2,83	5,94	3,12	2,69
Citalopram	53,87	52,34	134,66	135,51	269,33	266,53	-2,85	0,63	-1,04	-1,08	1,74
Paroxetine	47,10	49,55	117,74	126,60	235,49	250,60	5,21	7,53	6,42	6,38	1,16
DM.dosulepine	47,50	49,53	118,74	130,84	237,48	259,24	4,28	10,19	9,16	7,88	3,16
DM.maprotiline	103,83	106,36	259,58	272,78	519,16	560,16	2,44	5,09	7,90	5,14	2,73
Dosulepine	53,23	49,31	133,08	139,79	266,16	296,22	-7,36	5,04	11,29	2,99	9,49
Duloxetine	55,27	56,10	138,18	149,82	276,37	298,79	1,51	8,42	8,11	6,02	3,90
DM.imipramine	103,53	101,44	258,83	278,49	517,65	569,54	-2,02	7,60	10,02	5,20	6,37
Fluvoxamine	49,46	57,12	123,66	130,70	247,32	261,59	15,48	5,69	5,77	8,98	5,63
Imipramine	58,49	56,62	146,23	151,84	292,47	312,53	-3,19	3,84	6,86	2,50	5,16
DM.amitriptyline	47,35	46,54	118,36	123,55	236,73	245,97	-1,72	4,38	3,90	2,19	3,39
Maprotiline	102,97	105,15	257,42	262,98	514,84	515,38	2,12	2,16	0,10	1,46	1,18
DM.fluoxetine	100,00	95,39	250,00	287,15	500,00	547,63	-4,61	14,86	9,53	6,59	10,06
Amitriptyline	57,08	52,22	142,71	136,10	285,42	290,01	-8,51	-4,63	1,61	-3,84	5,11
DM.sertraline	50,00	41,96	125,00	114,95	250,00	267,22	*-16,07	-8,04	6,89	-5,74	11,65
Fluoxetine	115,22	115,23	288,05	303,73	576,10	634,50	0,01	5,45	10,14	5,20	5,07
DM.clomipramine	100,16	100,92	250,40	273,67	500,80	532,82	0,76	9,29	6,39	5,48	4,34
Sertraline	96,33	98,40	240,83	257,22	481,65	497,29	2,15	6,81	3,25	4,07	2,44
Clomipramine	54,68	55,10	136,69	137,07	273,39	270,65	0,77	0,28	-1,00	0,01	0,91

* = slechte meting

6.6.3.6.1.2 kwalitatieve suppressie bepaling MCX

Figuur 36 geeft de kwalitatieve suppressie bepaling van de MCX SPE blanco weer.



Figuur 36: Kwalitatieve suppressie MCX; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.6.3.6.2 Resultaten 'Hydrophilic Lipophilic Balance' (HLB) SPE

6.6.3.6.2.1 Resultaten HLB recovery SPE

Tabel 44 geeft de resultaten van de HLB SPE recovery weer. Er werd een regressie reeks in water opgenomen, waarmee de recovery van de HLB SPE berekend werd. Recovery monsters werden op drie verschillende concentraties met de HLB SPE voorbereid.

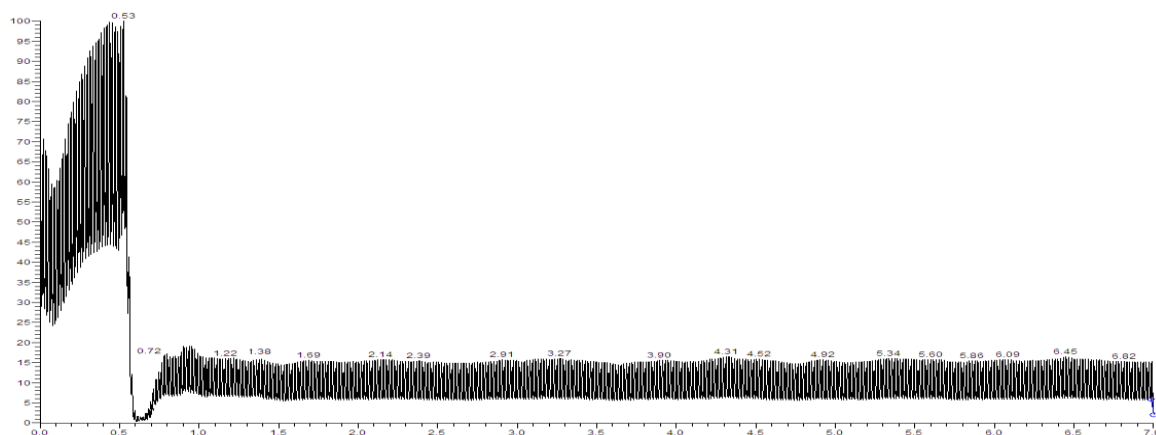
Tabel 44: resultaten recovery HLB SPE

ID.	Concentratie AD						Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)				
	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.	Std. Dev.
-	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.					
DM.venlafaxine	50,00	52,39	125,00	120,07	250,00	236,50	4,77	-3,95	-5,40	-1,52	5,50
DM.mirtazapine	99,46	82,97	248,66	259,09	497,32	504,75	-16,58	4,19	1,49	-3,63	11,29
Mirtazapine	22,68	21,61	56,70	57,08	113,40	112,46	-4,72	0,68	-0,82	-1,62	2,79
Venlafaxine	96,52	97,60	241,29	245,96	482,58	485,09	1,12	1,94	0,52	1,19	0,71
DM.citalopram	10,20	9,35	25,51	25,06	51,02	51,03	-8,29	-1,75	0,03	-3,34	4,38
Citalopram	53,87	52,44	134,66	135,58	269,33	276,95	-2,66	0,69	2,83	0,29	2,77
Paroxetine	47,10	40,71	117,74	112,87	235,49	237,40	-13,58	-4,14	0,81	-5,63	7,31
DM.dosulepine	47,50	46,02	118,74	115,95	237,48	237,24	-3,12	-2,35	-0,10	-1,86	1,57
DM.maprotiline	103,83	95,18	259,58	261,80	519,16	502,13	-8,33	0,86	-3,28	-3,58	4,60
Dosulepine	53,23	51,76	133,08	134,27	266,16	274,00	-2,76	0,89	2,94	0,36	2,89
Duloxetine	55,27	58,67	138,18	129,97	276,37	275,04	6,14	-5,94	-0,48	-0,09	6,05
DM.imipramine	103,53	97,63	258,83	266,72	517,65	531,20	-5,70	3,05	2,62	-0,01	4,93
Fluvoxamine	49,46	41,99	123,66	127,75	247,32	264,72	-15,11	3,30	7,04	-1,59	11,86
Imipramine	58,49	55,96	146,23	145,62	292,47	300,39	-4,32	-0,42	2,71	-0,68	3,52
DM.amitriptyline	47,35	46,43	118,36	119,06	236,73	236,46	-1,93	0,59	-0,12	-0,49	1,30
Maprotiline	102,97	96,84	257,42	269,78	514,84	517,39	-5,95	4,80	0,50	-0,22	5,41
DM.fluoxetine	100,00	89,63	250,00	246,29	500,00	495,69	-10,37	-1,48	-0,86	-4,24	5,32
Amitriptyline	57,08	59,10	142,71	139,98	285,42	275,30	3,53	-1,91	-3,55	-0,64	3,71
DM.sertraline	50,00	38,57	125,00	124,44	250,00	225,25	*-22,87	-0,45	-9,90	-11,07	11,26
Fluoxetine	115,22	106,01	288,05	276,59	576,10	566,58	-7,99	-3,98	-1,65	-4,54	3,21
DM.clomipramine	100,16	95,04	250,40	270,01	500,80	516,36	-5,11	7,83	3,11	1,94	6,55
Sertraline	96,33	91,68	240,83	262,75	481,65	512,90	-4,83	9,10	6,49	3,59	7,40
Clomipramine	54,68	56,92	136,69	135,89	273,39	273,74	4,10	-0,59	0,13	1,22	2,53

* = slechte meting

6.6.3.6.2.2 Resultaten kwalitatieve suppressie bepaling HLB

Figuur 37 geeft de kwalitatieve suppressie bepaling van de HLB SPE blanco weer.



Figuur 37: Kwalitatieve suppressie bepaling HLB; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.6.3.6.3 Resultaten 'Hydrophilic Lipophilic Balance PRIME' (HLB) SPE

6.6.3.6.3.1 Resultaten HLB PRIME recovery

Tabel 45 geeft de resultaten van de HLB SPE PRIME recovery weer. Er werd een regressie reeks in water opgenomen, waarmee de recovery van de HLB SPE PRIME berekend werd. Recovery monsters werden op drie verschillende concentraties met de HLB SPE PRIME voorbereid.

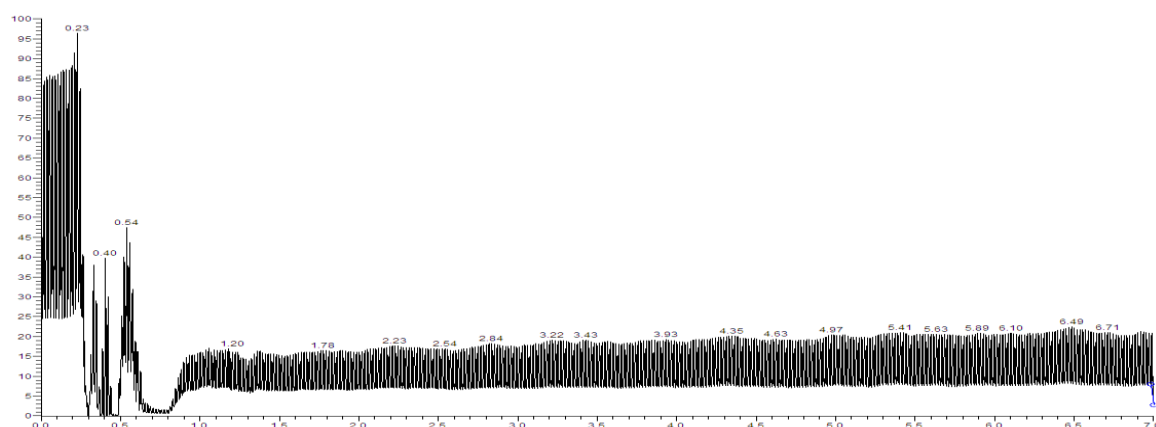
Tabel 45: Resultaten recovery HLB PRIME SPE

ID.	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)		Afwijking t.o.v. theo. conc. (%)		
	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Pt. 1	Pt. 3	Gem.
DM.venlafaxine	50	49,86	250	241,09	-0,28	-3,57	-1,92
DM.mirtazapine	99,46	96,14	497,32	516,44	-3,34	3,84	0,25
Mirtazapine	22,68	23,31	113,4	114,09	2,76	0,61	1,69
Venlafaxine	96,52	92,12	482,58	484,65	-4,56	0,43	-2,07
DM.citalopram	10,2	10,3	51,02	51,69	1	1,32	1,16
Citalopram	53,87	53,06	269,33	266,45	-1,51	-1,07	-1,29
Paroxetine	47,1	48,26	235,49	233,11	2,45	-1,01	0,72
DM.dosulepine	47,5	48	237,48	234,38	1,06	-1,31	-0,12
DM.maprotiline	103,83	100,12	519,16	501,27	-3,57	-3,45	-3,51
Dosulepine	53,23	50,06	266,16	274,07	-5,95	2,97	-1,49
Duloxetine	55,27	56,02	276,37	267,46	1,36	-3,22	-0,93
DM.imipramine	103,53	100,16	517,65	520,99	-3,26	0,64	-1,31
Fluvoxamine	49,46	46,21	247,32	236,04	-6,57	-4,56	-5,56
Imipramine	58,49	56,51	292,47	294,17	-3,38	0,58	-1,4
DM.amitriptyline	47,35	44,56	236,73	247,19	-5,89	4,42	-0,73
Maprotiline	102,97	96,62	514,84	521,81	-6,16	1,35	-2,4
DM.fluoxetine	100	91,61	500	476,31	-8,39	-4,74	-6,57
Amitriptyline	57,08	54,41	285,42	284,53	-4,68	-0,31	-2,5
DM.sertraline	50	56,13	250	243,43	12,26	-2,63	4,82
Fluoxetine	115,22	113,43	576,1	585,32	-1,56	1,6	0,02
DM.clomipramine	100,16	102,09	500,8	518,28	1,93	3,49	2,71
Sertraline	96,33	95,16	481,65	502,07	-1,21	4,24	1,52
Clomipramine	54,68	58,45	273,39	277,02	6,9	1,33	4,11

Pt. 2 is door praktische redenen uitgevallen

6.6.3.6.3.2 Kwalitatieve suppressie bepaling HLB PRIME

Figuur 38 geeft de kwalitatieve suppressie bepaling van de HLB PRIME SPE blanco weer.



Figuur 38: Kwalitatieve suppressie bepaling HLB PRIME; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.7 Houdbaarheidsonderzoek

6.7.1 Voorbereiding

Zie Tabel 17 voor de gebruikte oplossingen.

6.7.2 Korte termijn houdbaarheid (stabiliteit)

De korte termijn stabiliteit van antidepressiva in serum bij 20°C werd bepaald door op t = 0, 1, 4, 8, 12, 24 en 48 uur vijfpunts-regressie lijnen op te nemen. Tabel 46 geeft de (af/toe-name in) slope ten opzichte van T = 0 in procenten voor de korte termijn stabiliteit in serum bij 20°C weer.

Tabel 46: resultaten slope t.o.v. T = 0 van korte termijn stabiliteit

Antidepressiva	slope t.o.v. T0						
	T0 (uur)	T1	T4	T8	T12	T24	T48
	<i>Eis = 100 ± 15(%)⁽¹⁷⁾</i>						
Amitriptyline	100,00	104,99	101,92	108,83	102,12	104,94	94,74
Citalopram	100,00	103,99	103,05	104,83	103,86	106,15	108,09
Clomipramine	100,00	97,04	100,10	101,24	102,97	104,16	95,58
Dosulepine	100,00	105,84	102,29	101,78	108,87	102,23	95,65
Duloxetine	100,00	104,31	104,41	108,10	105,96	107,95	104,79
Fluoxetine	100,00	109,60	101,00	99,65	110,60	101,15	94,76
Fluvoxamine	100,00	107,24	109,08	98,05	105,69	106,38	93,98
Imipramine	100,00	103,57	99,57	99,86	107,61	102,67	99,72
Maprotiline	100,00	105,76	100,42	107,93	98,28	97,79	104,76
Mirtazapine	100,00	99,69	97,52	99,12	95,21	96,29	97,03
Paroxetine	100,00	101,86	99,80	100,43	103,45	97,10	96,49
Sertraline	100,00	99,98	101,23	103,44	100,82	106,17	105,90
Venlafaxine	100,00	99,29	100,95	101,93	98,16	98,16	101,74
DM.Citalopram	100,00	104,12	103,25	106,37	99,96	99,71	98,26
DM.Clomipramine	100,00	101,20	99,46	100,47	102,49	102,35	101,01
DM.Dosulepine	100,00	107,03	101,55	98,95	102,31	96,61	94,30
DM.(nor)Fluoxetine	100,00	101,86	109,55	107,29	110,62	109,73	102,95
DM.(desi)Imipramine	100,00	107,29	98,72	99,51	105,32	98,02	94,07
DM.Maprotiline	100,00	109,39	99,63	97,91	101,39	100,28	92,38
DM.Mirtazapine	100,00	101,16	96,62	99,06	88,10	92,18	89,39
DM.(nor)Amitriptyline	100,00	101,58	94,77	99,93	95,39	92,58	102,58
DM.(Nor)venlafaxine	100,00	97,78	96,29	96,65	92,54	96,67	100,90
DM.Sertraline *	100,00	92,74	97,70	90,32	122,62	88,99	91,58

* = slechte metingen, matige regressiemodellen.

Rood = afname in slope waargenomen

6.7.3 Lange termijn houdbaarheid (stabiliteit) in methanol bij 8°C

De lange termijn stabiliteit van antidepressiva in methanol bij 8°C werd bepaald door monsters op te werken op t = 0, 1 en 3 maanden volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.6.3. Tabel 47 geeft de (afname in) recovery ten opzichten van T = 0 in procenten van de lange termijn stabiliteit in methanol bij 8°C weer.

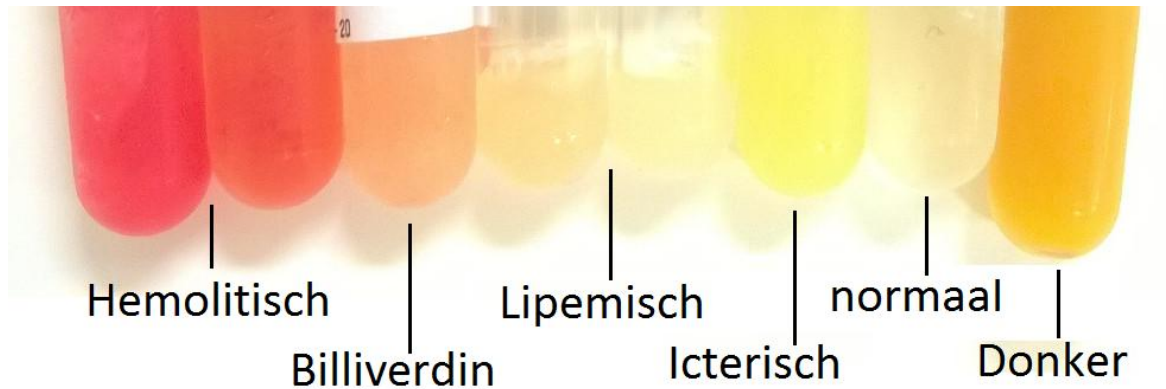
Tabel 47: resultaten recovery t.o.v. T = 0 (mnd.) voor de lange termijn stabiliteit

Antidepressiva	slope t.o.v. T0		
	T0 (mnd.)	T1	T3
	Eis = 100 ± 15(%) ⁽¹⁷⁾		
DM.venlafaxine	100,00	102,52	103,00
DM.mirtazapine	100,00	100,27	100,74
Mirtazapine	100,00	97,71	105,21
Venlafaxine	100,00	109,62	97,95
DM.citalopram	100,00	100,32	106,72
Citalopram	100,00	90,37	129,12
Paroxetine	100,00	118,29	93,05
DM.dosulepine	100,00	102,81	100,61
DM.maprotiline	100,00	111,80	95,22
Dosulepine	100,00	98,42	106,38
Duloxetine	100,00	104,91	99,88
DM.imipramine	100,00	94,47	111,89
Fluvoxamine	100,00	102,18	99,71
Imipramine	100,00	89,83	115,88
DM.amitriptyline	100,00	109,57	108,06
Maprotiline	100,00	100,68	94,78
DM.fluoxetine	100,00	98,50	103,86
Amitriptyline	100,00	90,48	118,83
DM.sertraline	100,00	97,62	114,39
Fluoxetine	100,00	95,07	108,94
DM.clomipramine	100,00	102,37	110,30
Sertraline	100,00	117,00	94,08
Clomipramine	100,00	91,19	105,88

6.8 Prestatie kenmerken vastleggen analyse methode 1

6.8.1 Kwantitatieve suppressie bepaling methode 1 met 1:2 plasma : neerslagvloeistof verhouding

Figuur 39 geeft de plasma soorten welke gebruikt zijn voor de kwantitatieve suppressie (matrix effect) bepaling weer.



Figuur 39: Plasma soorten voor kwantitatieve suppressie bepaling

Tabel 48 geeft de resultaten van de kwantitatieve suppressie bepaling weer. De resultaten worden uitgedrukt in procenten recovery ten opzichte van de academische standaard (AC.) waarden.

Tabel 48: resultaten matrix effect

Recovery (M.E.) Type ID.	M.E. t.o.v. 100% AC. (%)						Resultaten		
	Normaal 3	Icterisch 5	Billiverdin 7	Lipemisch 9	Hemolitisch 11	Donker 13	Gem. -	STD.dev. -	CV (%) (eis = <15% [17])
DM.Venlafaxine	98,67	96,03	72,35	63,06	85,41	90,76	84,38	14,01	16,60
DM.Mirtazapine	88,41	81,95	88,42	70,74	92,07	92,57	85,69	8,25	9,63
Mirtazapine	129,12	146,77	128,09	133,80	133,46	148,46	136,62	8,83	6,47
Venlafaxine	97,33	96,40	96,86	96,72	96,83	97,52	96,94	0,41	0,42
Dmcitalopram	110,61	102,05	97,73	97,18	96,49	109,66	102,29	6,39	6,25
Citalopram	111,83	98,27	97,12	92,65	91,34	96,84	98,01	7,30	7,45
Paroxetine	96,92	98,81	97,38	90,88	89,49	110,92	97,40	7,61	7,82
DM.dosulepine	97,77	99,47	76,68	99,28	98,18	101,79	95,53	9,34	9,78
DM.maprotiline	91,39	96,03	131,89	99,36	98,07	103,46	103,37	14,53	14,05
Dosulepine	96,42	98,38	57,34	98,50	96,96	98,49	91,02	16,52	18,15
Duloxetine	94,41	96,37	94,18	92,14	91,50	104,38	95,50	4,69	4,91
DM.imipramine	93,73	98,16	85,59	97,32	97,81	103,27	95,98	5,94	6,19
Fluvoxamine	92,36	101,70	110,72	98,66	106,41	114,50	104,06	8,13	7,81
Imipramine	93,85	98,49	98,58	94,66	95,31	98,60	96,58	2,21	2,29
DM.amitriptyline	99,22	97,62	95,03	98,57	99,95	106,52	99,49	3,85	3,87
Maprotiline	101,75	100,03	99,14	98,76	99,16	107,76	101,10	3,43	3,40
DM.fluoxetine	88,50	91,89	96,20	97,48	97,97	108,04	96,68	6,65	6,88
Amitriptyline	100,52	96,84	97,37	93,24	96,37	97,03	96,89	2,33	2,40
DM.sertraline	93,66	88,00	87,68	99,84	94,36	104,60	94,69	6,63	7,00
Fluoxetine	91,98	95,10	94,83	94,44	96,15	100,27	95,46	2,73	2,86
Sertraline	98,30	92,79	93,52	97,65	97,90	106,84	97,84	5,01	5,12
DM.clomipramine	98,89	92,09	93,38	97,31	98,02	106,42	97,68	5,06	5,17
Clomipramine	95,92	92,47	94,83	95,13	94,70	102,25	95,88	3,32	3,47

Matrix effect is berekend met de volgende formule:

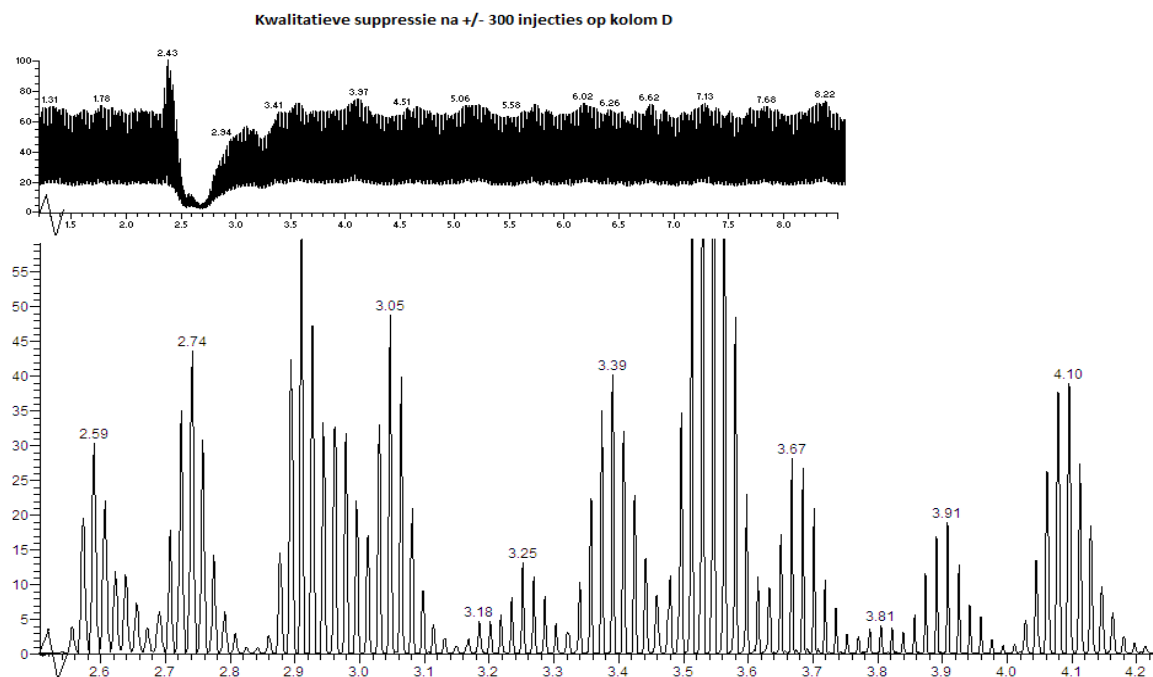
Vergelijking 5

$$\text{Matrix Effect} = \left(\frac{P.E.(area\ component)}{AC.(area\ component)} / \frac{P.E.(area\ IS)}{AC.(area\ IS)} \right) \times 100 = \% \text{ Matrix Effect t.o.v. academische standaard}$$

$$\text{Matrix Effect} = \left(\frac{17498963}{19067518} / \frac{1477320}{1588641} \right) \times 100 = 98,67 \% \text{ Matrix Effect}$$

6.8.1.1 Kwalitatieve suppressie bepaling na +/- 300 injecties op kolom D

De kwalitatieve suppressie werd opnieuw bepaald om te controleren of de suppressie verschoven was. Figuur 40 geeft de kwalitatieve suppressie en de elutie van analyse methode 1 na +/- 300 injecties op kolom D weer.



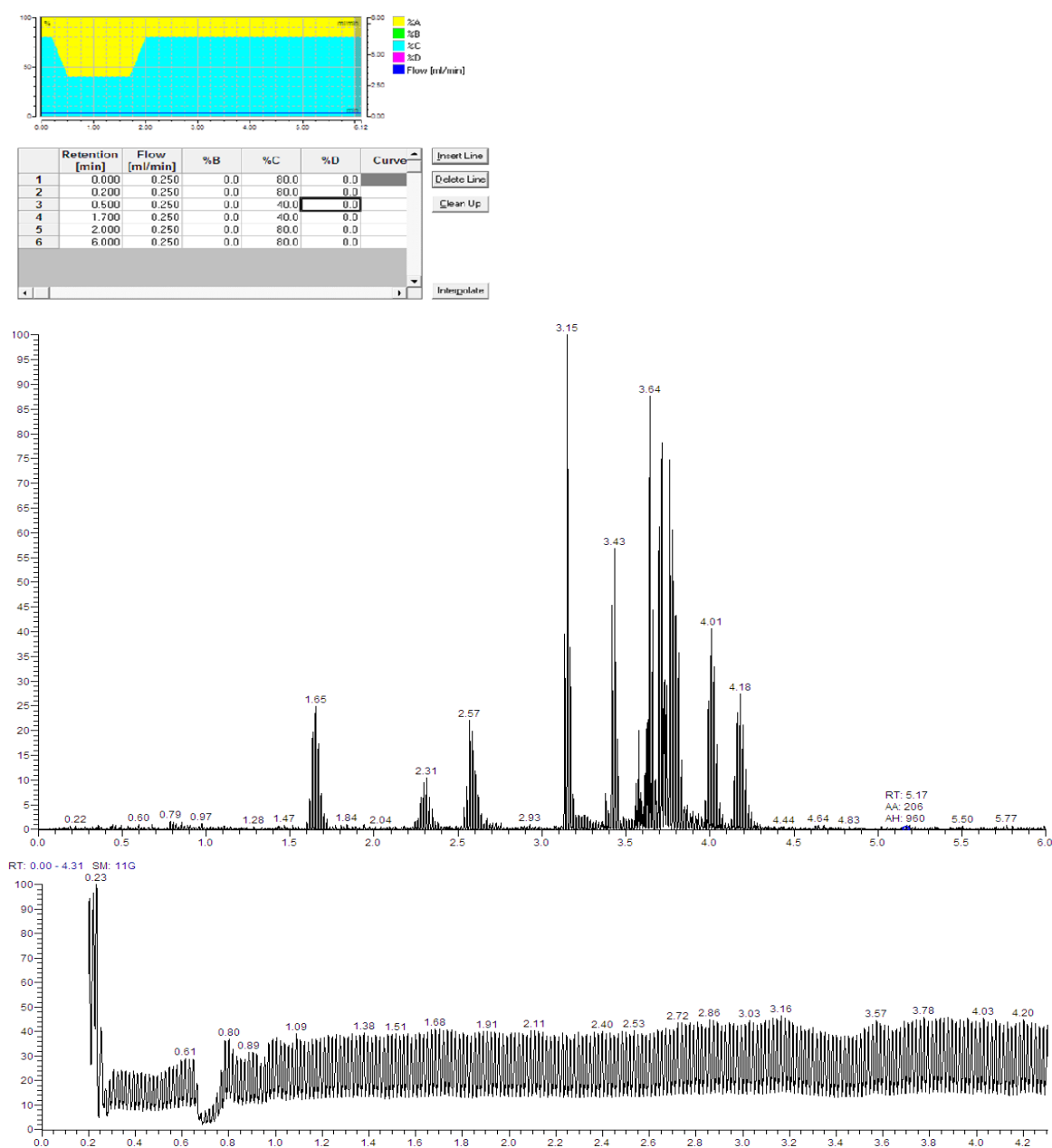
Figuur 40: Kwalitatieve suppressie van analyse methode 1 na +/- 300 injecties op kolom D; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.9 Analyse methode 2: chromatografie op kolom B

6.9.1 Chromatografie & Suppressie methode 2

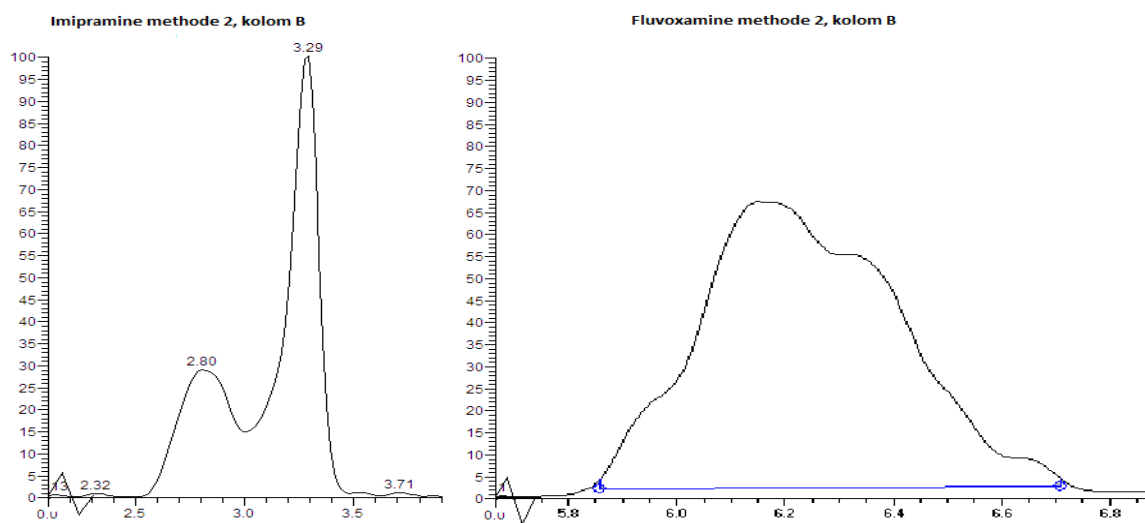
6.9.1.1 Gradiënt systeem & kwalitatieve suppressie

Er werd een nieuwe chromatografische methode opgezet voor het bepalen van antidepressiva, waarbij de suppressie beter ontweken werd, dan bij analyse methode 1. Figuur 41 geeft de systeeminstellingen van de UPLC, de elutie en het bijbehorende suppressie profiel van 'analyse methode 2' weer.



Figuur 41: Chromatografie en suppressie methode 2; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

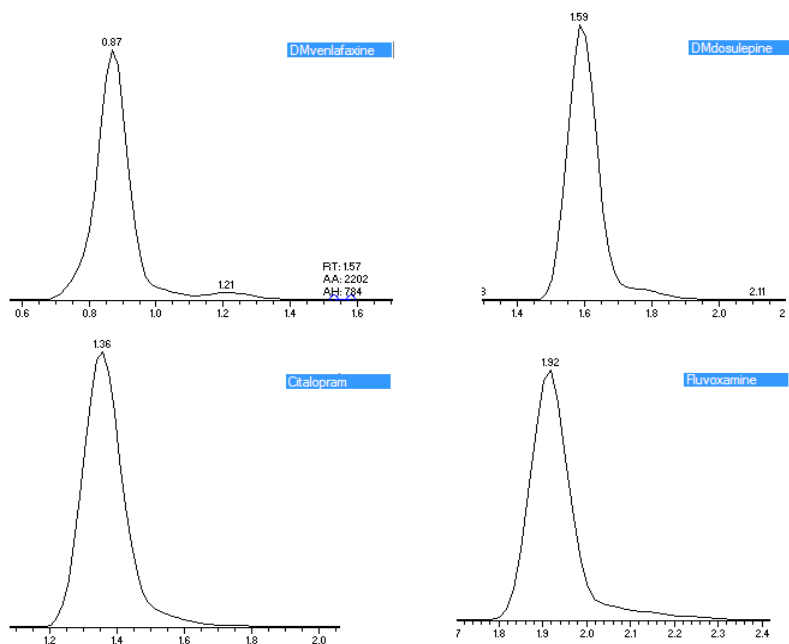
Figuur 42 geeft de piek vorm Imipramine en Fluvoxamine weer, welke opgenomen zijn met behulp van analysemethode 2. De slechte piek vorm wordt veroorzaakt door de sterke gradiënt van analysemethode 2.



Figuur 42: Piek vorm analyse methode 2 gradiënt systeem op kolom B; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector weergegeven, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) weergegeven.

6.9.1.2 Isocratisch systeem analyse methode 2 op kolom B

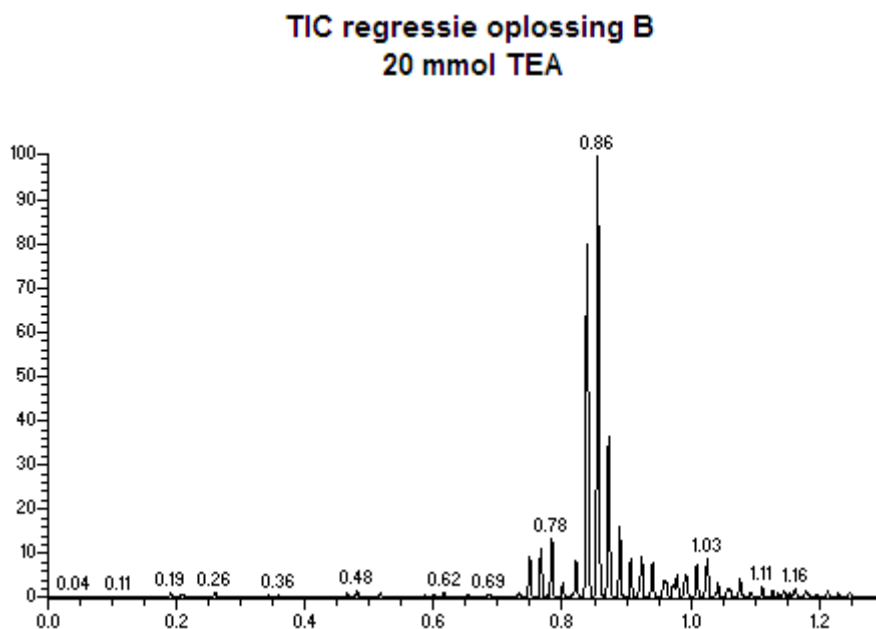
Er werd een isocratische methode getest om te controleren/bekijken of de piek vorm van de componenten verbeterde. Figuur 43 geeft de piek vorm van desmethyl venlafaxine, desmethyl Dosulepine, Citalopram en Fluvoxamine weer bij een 55:45 acetonitril : formiaat-buffer isocratisch systeem op kolom B. Alle antidepressiva hadden last van tailing op kolom B.



Figuur 43: Piek vorm 40:60 acetonitril : formiaat-buffer isocratisch systeem op kolom B; op de y as staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-as staat de elutie tijd (minuten) uitgesteld.

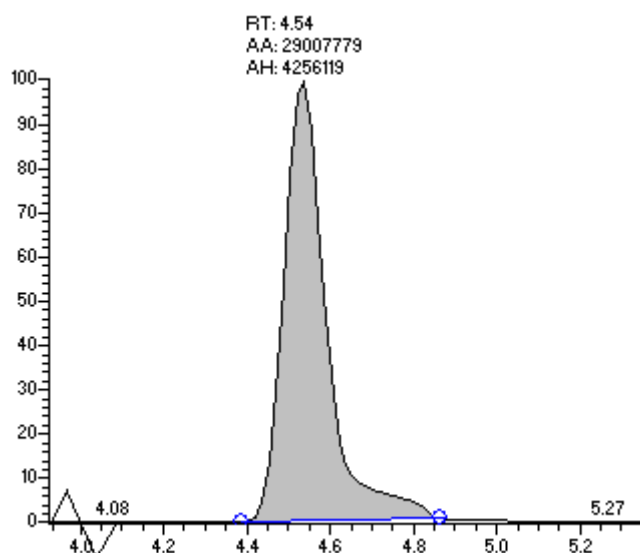
6.9.1.3 Chromatografie analyse methode 2 met 20 mmol TEA eluens

Als poging om de piek vorm te verbeteren (de tailing te verminderen) werd TEA (triethylamine) aan het eluens toegevoegd (zie 5.3.5.9.3 voor samenstelling), waarna de chromatografie opnieuw werd opgenomen. Figuur 44 geeft het TIC signaal van analyse methode 2, met '20 mmol TEA eluens' weer.



Figuur 44: TIC signaal analyse methode 2 met 20 mmol TEA eluens

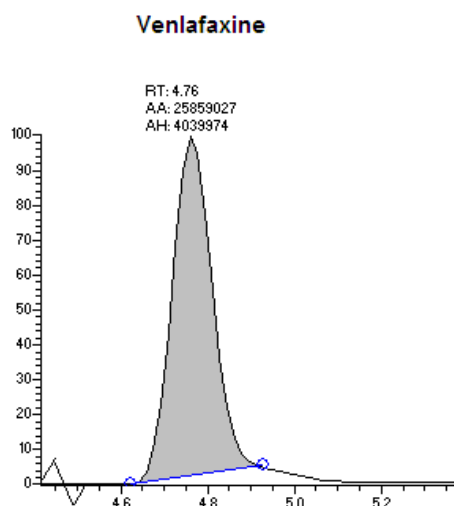
Figuur 45 geeft het individuele chromatogram van Venlafaxine opgenomen met analyse methode 2 met het '20 mmol TEA eluens' weer.



Figuur 45: Chromatogram van Venlafaxine, bepaald met analyse methode 2 met 20 mmol TEA eluens

6.9.1.4 Chromatografie analyse methode 2 met 0,25% mierenzuur en 25 mmol ammoniumformiaat eluens

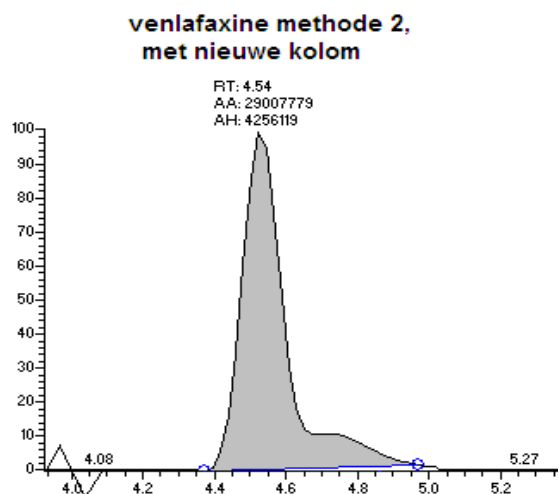
Als poging om de piek vorm te verbeteren werd de ammoniumformiaat in het eluens verhoogt van 10 mmol naar 0,25 mmol en de mierenzuur concentratie van 0,10% naar 0,25%, waarna de chromatografie met het verkregen eluens opnieuw werd opgenomen. Figuur 46 geeft het individuele chromatogram van Venlafaxine met analyse methode 2 met het '25 mmol ammoniumformiaat en 0,25% mierenzuur eluens weer.



Figuur 46: Chromatogram van Venlafaxine verkregen met analyse methode 2 met het 25 mmol ammoniumformiaat en 0,25% mierenzuur eluens

6.9.1.5 Chromatografie analyse methode 2 met nieuwe kolom B

als poging om de piek vorm te verbeteren werd de kolom waarmee de chromatografie opgenomen werd, vervangen voor een nieuwe, niet gebruikte kolom, waarna de chromatografie opnieuw werd opgenomen. Figuur 47 geeft het individuele chromatogram van Venlafaxine verkregen met analyse methode 2 en de nieuwe kolom B weer.

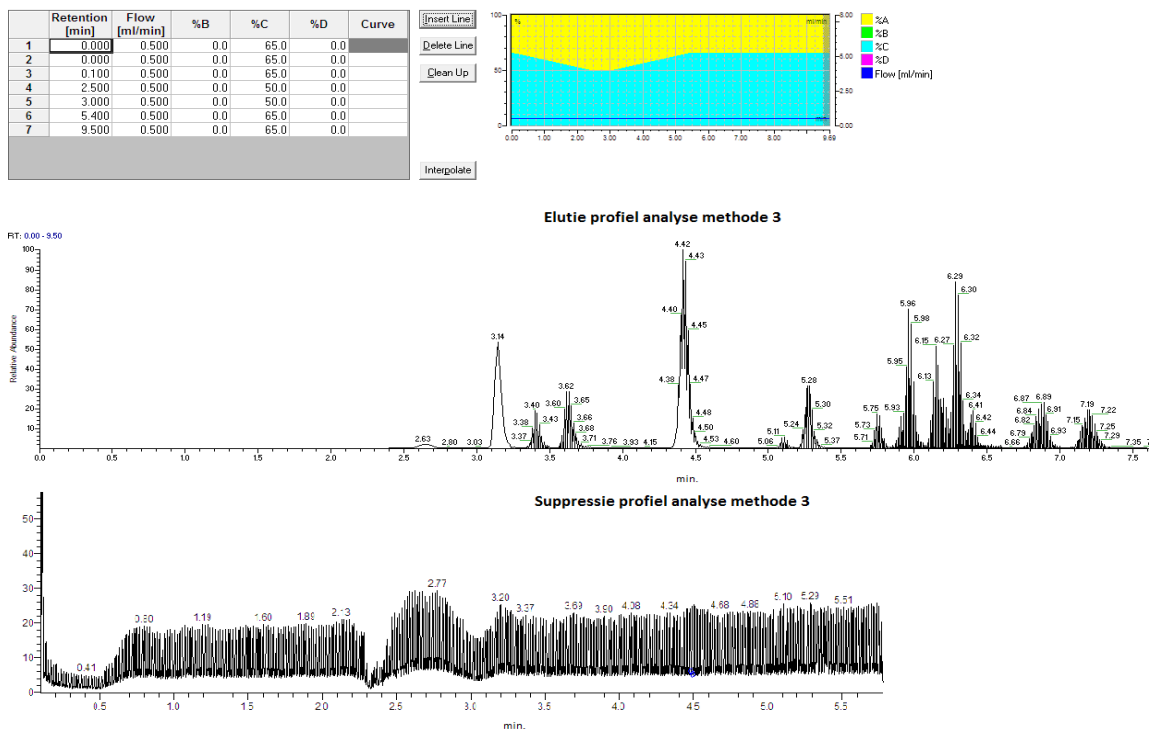


Figuur 47: chromatogram van venlafaxine met analyse methode 2 en nieuwe kolom B

6.10 Analyse methode 3

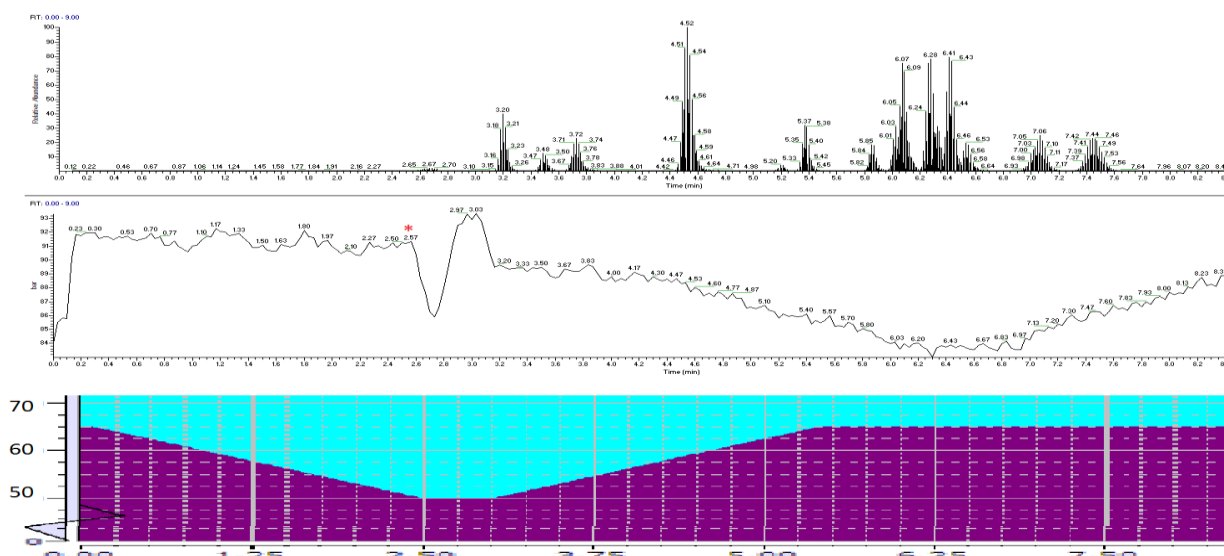
6.10.1 Chromatografie en kwalitatieve suppressie op kolom D met gradiënt methode

Figuur 48 geeft de systeem(chromatografie) instellingen van de UPLC, het bijbehorende elutie profiel en het kwalitatief suppressie profiel van analyse methode 3 weer.



Figuur 48: Chromatografie instellingen, elutie profiel en suppressie profiel van analyse methode 3

Figuur 49 geeft het elutie profiel, het druk verloop en de gradiënt van analyse methode 3 weer.
* is het weg vallen van de druk, veroorzaakt door de injectie van de UPLC.



6.10.2 Recovery van analyse methode 3

Tabel 49 geeft de resultaten van de recovery monsters in serum, voorberekt met PPT, ten opzichte van een regressie reeks in serum voorberekt met PPT, bepaald met analyse methode 3 weer.

Tabel 49: Recovery van PPT QC monsters t.o.v. PPT regressie reeks bepaald met analyse methode 3

ID.	Concentratie AD						Recovery (%)			
	Pt. 1 (µg/l)		Pt. 2 (µg/l)		Pt. 3 (µg/l)					
	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Theo.	Prak.	Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Gem.
DM.venlafaxine	50,00	51,54	125,00	128,37	250,00	250,79	103,08	102,69	100,32	102,03
DM.mirtazapine	98,58	98,27	246,44	250,06	492,88	496,05	99,69	101,47	100,64	100,60
Mirtazapine	20,34	21,42	50,85	52,08	101,70	108,89	105,31	102,42	107,07	104,93
Venlafaxine	100,49	101,08	251,23	260,71	502,46	506,06	100,58	103,77	100,72	101,69
DM.citalopram	9,70	8,70	24,26	24,43	48,51	48,58	89,68	100,71	100,14	96,84
Citalopram	47,98	47,59	119,96	117,82	239,91	237,92	99,17	98,22	99,17	98,85
Paroxetine	47,63	43,63	119,06	113,43	238,13	232,49	91,60	95,26	97,63	94,83
DM.dosulepine	49,75	45,26	124,39	126,48	248,77	243,95	90,96	101,68	98,06	96,90
DM.maprotiline	102,43	79,06	256,06	227,01	512,13	503,86	*	88,65	98,38	93,52
Dosulepine	48,02	51,73	120,06	124,10	240,13	246,49	107,71	103,37	102,65	104,58
Duloxetine	53,67	55,29	134,18	134,03	268,35	265,34	103,01	99,89	98,88	100,59
DM.imipramine	100,10	99,69	250,25	257,88	500,50	484,11	99,59	103,05	96,73	99,79
Fluvoxamine	52,32	47,15	130,81	132,54	261,61	266,90	90,11	101,33	102,02	97,82
Imipramine	51,19	50,26	127,98	136,64	255,97	247,22	98,17	106,77	96,58	100,51
DM.amitriptyline	48,80	46,21	121,99	129,15	243,97	256,37	94,70	105,87	105,08	101,88
Maprotiline	102,43	97,96	256,06	273,41	512,13	544,05	95,64	106,77	106,23	102,88
DM.fluoxetine	100,00	66,20	250,00	283,12	500,00	514,37	*	113,25	102,87	108,06
Amitriptyline	48,73	46,77	121,82	134,77	243,64	250,90	95,99	110,63	102,98	103,20
DM.sertraline	50,00	47,83	125,00	137,63	250,00	255,85	95,67	110,11	102,34	102,70
Fluoxetine	107,35	99,26	268,37	308,52	536,74	578,64	92,46	114,96	107,81	105,08
DM.clomipramine	100,43	100,69	251,07	233,27	502,14	488,53	100,26	92,91	97,29	96,82
Sertraline	110,27	102,73	275,68	316,37	551,35	598,55	93,16	114,76	108,56	105,50
Clomipramine	48,00	48,25	120,00	115,19	240,00	244,92	100,51	95,99	102,05	99,52

* = geen significant signaal waargenomen

6.10.3 Prestatie kenmerken analyse methode 3

Alle rood gekleurde componenten, zijn antidepressiva waarbij een EMEA eis ^[17] overschreven wordt.

6.10.3.1 Kwantitatieve suppressie ‘analyse methode 3’

De kwantitatieve suppressie (matrix effect) moet volgens de EMEA op laag (maximaal drie keer de LLOQ) en hoog (dicht tegen de ULOQ) niveau worden uitgevoerd. De lage concentratie kwantitatieve suppressie bepaling is uitgevoerd op twee keer de concentratie van de LLOQ. De hoge concentratie kwantitatieve suppressie bepaling is uitgevoerd op 75% ten opzichte van de ULOQ.

Tabel 50 geeft de resultaten van de kwantitatieve suppressie bepaling van analyse methode 3 op laag niveau, ten opzichte van de academische standaard (AC) in 100% weer.

Tabel 50: resultaten kwantitatieve suppressie bepaling analyse methode 3 op laag niveau t.o.v. 100% academische standaard

Recovery (M.E.) ID.	M.E. t.o.v. 100% AC. (%)						Gem. -	STD.dev. -	CV (%) (eis = <15% [17])
	Normaal 3	Icterisch 5	Billiverdin 7	Lipemisch 9	Hemolitisch 11	Donker 13			
DM.venlafaxine	63,35	72,29	98,50	37,17	79,55	54,36	67,54	21,16	31,33
DM.mirtazapine	79,29	74,13	85,72	92,86	89,85	92,64	85,75	7,64	8,90
Mirtazapine	90,60	90,89	93,52	102,91	104,48	102,13	97,42	6,43	6,60
Venlafaxine	98,39	97,22	95,34	84,24	97,89	97,97	95,17	5,46	5,74
DM.citalopram	99,95	102,54	110,69	105,71	*	106,76	105,13	4,23	4,02
Citalopram	96,00	95,35	93,41	97,21	*	100,34	96,46	2,71	2,81
Paroxetine	101,06	103,21	104,74	88,11	94,42	96,67	98,03	6,23	6,36
DM.dosulepine	99,09	96,31	91,21	89,97	89,53	92,93	93,17	3,80	4,08
DM.maprotiline	97,88	98,07	97,30	100,60	105,62	109,65	101,52	5,03	4,96
Dosulepine	100,76	98,84	91,31	92,91	91,27	93,84	94,82	4,02	4,24
Duloxetine	99,39	95,81	89,01	89,26	91,35	94,35	93,20	4,07	4,37
DM.imipramine	95,01	96,14	100,21	97,35	97,18	96,83	97,12	1,74	1,79
Fluvoxamine	81,09	89,71	108,08	100,59	101,28	105,42	97,70	10,28	10,52
Imipramine	97,29	98,91	98,72	103,60	101,45	100,00	99,99	2,25	2,25
DM.amitriptyline	99,29	97,05	96,69	99,47	103,35	103,13	99,83	2,87	2,88
Maprotiline	95,72	101,45	108,01	108,10	108,27	108,34	104,98	5,28	5,03
DM.fluoxetine	92,73	83,43	93,18	97,62	110,65	120,91	99,76	13,64	13,67
Amitriptyline	103,12	103,75	101,41	106,50	107,18	100,29	103,71	2,73	2,63
DM.sertraline	111,42	97,30	91,23	104,83	123,84	122,76	108,56	13,30	12,25
Fluoxetine	93,31	93,73	98,17	97,00	102,46	104,10	98,13	4,43	4,52
Sertraline	95,12	101,24	105,26	109,77	114,51	113,78	106,61	7,57	7,10
DM.clomipramine	94,94	100,10	102,77	101,04	104,75	105,94	101,59	3,93	3,86
Clomipramine	98,22	98,20	96,59	101,68	102,17	100,99	99,64	2,27	2,28

* = analyse mislukt (zie 7.6.2.)

M.E. berekend met Vergelijking 5

Tabel 51 geeft de resultaten van de kwantitatieve suppressie bepaling van analyse methode 3 op hoog niveau, ten opzichte van de academische standaard in 100% weer (75% t.o.v. ULOQ).

Tabel 51: Resultaten kwantitatieve suppressie bepaling analyse methode 3 op hoog niveau t.o.v. 100% academische standaard

Recovery (M.E.) ID.	M.E. t.o.v. 100% AC. (%)						Gem. -	STD.dev. -	CV (%) (eis = <15% [17])
	Normaal 3	Icteric 5	Billiverdin 7	Lipemisch 9	Hemolitisch 11	Donker 13			
DM.venlafaxine	94,85	76,13	107,42	112,77	138,73	117,29	107,86	21,17	19,63
DM.mirtazapine	106,84	71,43	86,13	93,87	108,08	101,32	94,61	14,04	14,84
Mirtazapine	103,16	84,58	89,14	96,90	108,22	100,37	97,06	8,85	9,11
Venlafaxine	99,96	101,58	101,72	102,08	102,63	102,79	101,79	1,02	1,00
DM.citalopram	99,48	95,35	106,36	104,59	105,31	106,69	102,96	4,55	4,42
Citalopram	96,38	106,56	106,25	107,11	107,29	106,88	105,08	4,28	4,07
Paroxetine	98,74	99,53	107,67	113,87	117,60	116,84	109,04	8,44	7,74
DM.dosulepine	99,60	101,18	102,40	106,48	108,89	106,42	104,16	3,63	3,48
DM.maprotiline	99,04	99,81	109,97	113,73	115,51	115,25	108,88	7,59	6,97
Dosulepine	97,87	106,67	105,28	105,31	106,78	103,76	104,28	3,33	3,19
Duloxetine	97,90	103,52	107,19	115,52	117,93	116,43	109,75	8,13	7,41
DM.imipramine	100,45	97,18	101,69	104,25	107,78	107,24	103,10	4,11	3,98
Fluvoxamine	100,67	101,15	109,76	112,75	114,22	118,52	109,51	7,24	6,61
Imipramine	98,56	103,16	102,95	103,64	103,24	103,29	102,47	1,93	1,88
DM.amitriptyline	105,04	93,21	100,60	106,66	104,31	107,09	102,82	5,24	5,10
Maprotiline	101,90	100,59	109,96	118,68	119,09	120,12	111,72	8,91	7,97
DM.fluoxetine	105,59	94,90	112,49	115,48	112,87	121,56	110,48	9,21	8,34
Amitriptyline	101,41	106,83	110,02	113,40	111,74	111,39	109,13	4,38	4,01
DM.sertraline	110,31	81,45	98,54	104,67	99,15	105,08	99,87	10,01	10,02
Fluoxetine	103,86	93,76	102,58	110,03	102,69	112,34	104,21	6,55	6,28
Sertraline	104,24	94,29	104,76	114,07	114,93	115,80	108,02	8,47	7,84
DM.clomipramine	97,86	95,20	100,49	106,55	110,88	108,86	103,31	6,36	6,15
Clomipramine	102,15	95,74	94,55	94,84	95,32	94,26	96,14	2,99	3,11

M.E. berekend met Vergelijking 5

6.10.3.2 Lineariteit

Tabel 52 geeft de praktisch bepaalde concentraties van de regressiepunten van de lineariteit analyse van analyse methode 3, op dag 1 weer.

Tabel 52: Lineariteit resultaten van analyse methode 3

I.D.	Praktische concentratie AD (µg/l)						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
DM.venlafaxine	0,88	1,92	2,98	5,23	10,58	16,42	22,12
DM.mirtazapine	0,54	1,01	1,61	2,78	5,62	8,67	11,58
Mirtazapine	1,10	2,16	3,33	5,73	11,62	17,70	23,09
Venlafaxine	2,39	4,79	7,34	12,23	24,13	36,69	49,15
Dm.citalopram	0,15	0,28	0,45	0,79	1,56	2,37	3,15
Citalopram	1,17	2,27	3,64	6,01	12,25	18,19	23,40
Paroxetine	0,17	0,31	0,47	0,85	1,66	2,51	3,19
DM.dosulepine	0,66	1,25	1,98	3,26	6,60	10,02	12,82
DM.maprotiline	0,15	0,34	0,50	0,88	1,94	2,95	4,08
Dosulepine	0,77	1,51	2,31	3,96	8,08	12,34	15,87
Duloxetine	0,20	0,38	0,59	1,08	2,08	3,24	4,18
DM.imipramine	1,40	2,89	4,38	6,64	13,13	19,93	27,70
Fluvoxamine	0,03	0,06	0,09	0,14	0,28	0,49	0,61
Imipramine	1,09	2,15	3,37	5,41	11,01	16,91	22,91
DM.amitriptyline	1,20	2,37	3,81	5,53	11,71	18,59	23,54
Maprotiline	3,88	8,24	13,13	19,11	39,45	60,17	75,88
DM.fluoxetine	0,04	0,06	0,15	0,19	0,46	0,71	1,01
Amitriptyline	0,75	1,42	2,41	3,55	7,39	12,08	15,08
DM.sertraline	0,01	0,02	0,04	0,05	0,13	0,20	0,28
Fluoxetine	0,50	0,98	1,50	2,49	5,03	8,17	10,63
Sertraline	1,03	1,97	3,17	4,90	10,02	15,91	20,45
DM.clomipramine	1,07	2,18	3,18	5,49	11,01	16,76	19,39
Clomipramine	1,25	2,48	3,59	6,30	12,78	19,77	24,00

Tabel 53 geeft de afwijking van de praktische bepaalde concentratie van de regressie punten, ten opzichte van de theoretische concentratie van de regressie punten van de lineariteit analyse in procenten, op dag 1 weer.

Tabel 53: afwijking van de punten t.o.v. de regressielijn

Eis. [17] ID.	Afwijking t.o.v. regressielijn (%)						
	<20% S1	<15% S2	<15% S3	<15% S4	<15% S5	<15% S6	<15% S7
DM.Venlafaxine	3,00	-1,50	-2,26	-0,66	-2,00	0,49	1,17
DM.mirtazapine	7,04	-5,97	-2,76	-0,92	-1,24	1,13	1,10
Mirtazapine	2,37	-3,12	-2,01	0,22	0,78	2,05	-0,25
Venlafaxine	0,75	-0,58	0,90	0,53	-1,17	0,07	0,48
Dm.citalopram	5,56	-6,86	-2,84	1,40	-0,31	0,77	0,22
Citalopram	0,47	-3,42	2,62	1,45	3,10	2,01	-1,59
Paroxetine	-0,09	-4,78	-5,32	4,41	2,16	3,21	-1,70
DM.dosulepine	2,05	-3,79	1,63	0,60	2,02	3,20	-0,88
DM.maprotiline	5,63	0,38	-6,43	-6,70	-1,33	-1,13	2,02
Dosulepine	1,87	-2,83	-2,12	0,00	1,53	3,11	-0,58
Duloxetine	3,23	-6,63	-5,17	4,25	-0,57	2,94	-0,27
DM.imipramine	-0,44	4,77	6,43	-2,84	-3,49	-2,22	2,00
Fluvoxamine	1,53	7,23	4,12	-6,76	-5,76	11,84	3,77
Imipramine	4,10	-0,90	1,98	-2,80	-1,99	0,09	1,57
DM.amitriptyline	2,76	1,27	8,63	-5,25	0,35	6,19	0,87
Maprotiline	-4,62	4,60	12,36	-1,32	2,49	4,43	-1,14
DM.fluoxetine	15,93	-14,77	11,07	*(-16,39)	-3,68	-2,83	2,52
Amitriptyline	5,56	-2,25	9,35	-3,96	-0,58	8,16	1,22
DM.sertraline	10,98	-10,37	1,20	*(-18,92)	-2,19	-2,19	1,58
Fluoxetine	5,47	-1,73	-1,20	-2,99	-2,79	4,71	2,04
Sertraline	4,18	-1,63	5,04	-2,78	-0,84	4,88	1,07
DM.clomipramine	0,00	0,00	-3,00	0,01	0,00	1,42	-12,05
Clomipramine	-2,56	-1,16	-3,83	2,03	3,91	7,36	-2,22

* = resultaat verwijderd wegens overschrijding van eis

Tabel 54 geeft de lijn rapportage van de resultaten uit Tabel 52, op dag 1 weer. Er is een gewogen lineaire model op alle componenten toegepast. De betrouwbaarheidsintervallen (b.i.) zijn berekend aan de hand van een 95% interval. A is het helling getal, B is de as afsneden, sy/x is de standaard fout en r^2 is de correlatiecoëfficiënt.

Tabel 54: lijn rapportage van lineariteit resultaten analyse methode 3.

I.D.	Lijn Rapportage						
	A	A b.i.	B	B b.i.	sy/x	r^2	
DM.venlafaxine	$y = 4,47E-02 \ x \pm 3,00E-04 + -3,55E-01 \pm 7,83E-02$				$; sy/x = 1,33E-01$	$; r^2 = 0,9998$	
DM.mirtazapine	$y = 1,19E-02 \ x \pm 7,18E-05 + -1,30E-01 \pm 3,70E-02$				$; sy/x = 6,29E-02$	$; r^2 = 0,9998$	
Mirtazapine	$y = 1,15E-01 \ x \pm 8,52E-04 + -1,15E-01 \pm 9,05E-02$				$; sy/x = 1,54E-01$	$; r^2 = 0,9997$	
Venlafaxine	$y = 4,89E-02 \ x \pm 1,84E-04 + -1,15E-01 \pm 9,64E-02$				$; sy/x = 1,64E-01$	$; r^2 = 0,9999$	
Dmcitalopram	$y = 3,27E-02 \ x \pm 1,60E-04 + -1,90E-02 \pm 8,11E-03$				$; sy/x = 1,38E-02$	$; r^2 = 0,9999$	
Citalopram	$y = 4,94E-02 \ x \pm 6,58E-04 + 8,06E-02 \pm 1,65E-01$				$; sy/x = 2,81E-01$	$; r^2 = 0,9991$	
Paroxetine	$y = 6,81E-03 \ x \pm 1,16E-04 + 1,22E-02 \pm 2,89E-02$				$; sy/x = 4,92E-02$	$; r^2 = 0,9985$	
DM.dosulepine	$y = 2,61E-02 \ x \pm 3,36E-04 + 2,57E-02 \pm 8,74E-02$				$; sy/x = 1,49E-01$	$; r^2 = 0,9992$	
DM.maprotiline	$y = 4,03E-03 \ x \pm 5,16E-05 + -1,03E-01 \pm 2,76E-02$				$; sy/x = 4,70E-02$	$; r^2 = 0,9992$	
Dosulepine	$y = 3,36E-02 \ x \pm 3,89E-04 + -5,15E-02 \pm 9,77E-02$				$; sy/x = 1,66E-01$	$; r^2 = 0,9993$	
Duloxetine	$y = 7,92E-03 \ x \pm 9,82E-05 + -2,04E-02 \pm 2,75E-02$				$; sy/x = 4,68E-02$	$; r^2 = 0,9992$	
DM.imipramine	$y = 2,71E-02 \ x \pm 4,60E-04 + 3,10E-03 \pm 2,40E-01$				$; sy/x = 4,09E-01$	$; r^2 = 0,9986$	
Fluvoxamine	$y = 1,20E-03 \ x \pm 4,45E-05 + -9,12E-03 \pm 1,22E-02$				$; sy/x = 2,07E-02$	$; r^2 = 0,9932$	
Imipramine	$y = 4,47E-02 \ x \pm 3,95E-04 + -1,77E-01 \pm 1,06E-01$				$; sy/x = 1,80E-01$	$; r^2 = 0,9996$	
DM.amitriptyline	$y = 4,90E-02 \ x \pm 9,59E-04 + -2,70E-02 \pm 2,45E-01$				$; sy/x = 4,16E-01$	$; r^2 = 0,9981$	
Maprotiline	$y = 7,48E-02 \ x \pm 1,40E-03 + 7,50E-01 \pm 7,49E-01$				$; sy/x = 1,27E+00$	$; r^2 = 0,9983$	
DM.fluoxetine	$y = 1,01E-03 \ x \pm 2,87E-05 + -3,18E-02 \pm 1,50E-02$				$; sy/x = 2,55E-02$	$; r^2 = 0,9960$	
Amitriptyline	$y = 3,17E-02 \ x \pm 7,77E-04 + -7,99E-02 \pm 1,98E-01$				$; sy/x = 3,36E-01$	$; r^2 = 0,9970$	
DM.sertraline	$y = 5,67E-04 \ x \pm 1,36E-05 + -8,25E-03 \pm 3,55E-03$				$; sy/x = 6,05E-03$	$; r^2 = 0,9971$	
Fluoxetine	$y = 1,00E-02 \ x \pm 1,56E-04 + -1,29E-01 \pm 8,78E-02$				$; sy/x = 1,49E-01$	$; r^2 = 0,9988$	
Sertraline	$y = 1,88E-02 \ x \pm 2,78E-04 + -8,01E-02 \pm 1,60E-01$				$; sy/x = 2,73E-01$	$; r^2 = 0,9989$	
DM.clomipramine	$y = 2,01E-02 \ x \pm 9,27E-04 + 3,63E-01 \pm 4,86E-01$				$; sy/x = 8,27E-01$	$; r^2 = 0,9895$	
Clomipramine	$y = 5,16E-02 \ x \pm 1,52E-03 + 1,17E-01 \pm 3,82E-01$				$; sy/x = 6,49E-01$	$; r^2 = 0,9957$	

Tabel 55 geeft de verhouding tussen de as-afsneden uit Tabel 54 ten opzichte van de LLOQ van de antidepressiva weer.

Tabel 55: As-afsnede ten opzichte van LLOQ

nr.	ID.	As-afsnede (µg/l)	LLOQ (µg/l)	As-afsnede t.o.v. LLOQ (%)
1	DM.venlafaxine	-0,36	25	-1,42
2	DM.mirtazapine	-0,13	25	-0,52
3	Mirtazapine	-0,11	25	-0,46
4	Venlafaxine	-0,12	25	-0,46
5	DM.citalopram	-0,02	25	-0,08
6	Citalopram	0,08	25	0,32
7	Paroxetine	0,01	50	0,02
8	DM.dosulepine	0,03	25	0,10
9	DM.maprotiline	-0,10	25	-0,41
10	Dosulepine	-0,05	50	-0,10
11	Duloxetine	-0,02	10	-0,20
12	DM.imipramine	0,00	25	0,01
14	Fluvoxamine	-0,01	50	-0,02
15	Imipramine	-0,18	5	-3,54
16	DM.amitriptyline	-0,03	50	-0,05
17	Maprotiline	0,75	25	3,00
19	DM.fluoxetine	-0,03	50	-0,06
20	Amitriptyline	-0,08	50	-0,16
21	DM.sertraline	-0,01	50	-0,02
22	Fluoxetine	-0,13	50	-0,26
24	DM.clomipramine	-0,08	25	-0,32
25	Sertraline	0,36	25	1,45
26	Clomipramine	0,12	10	1,17

6.10.3.3 Carry over

Tabel 56 geeft de resultaten van de Carry-over analyse weer, waarbij de area van de Carry-over analyse vergeleken wordt met de area van de LLOQ. De LLOQ Area is gebaseerd op de LLOQ (S1) van de lineariteit bepaling (6.10.3.2). De Area van de carry-over dient lager te zijn dan 20% t.o.v. de LLOQ voor reguliere componenten, en lager dan 5% voor de interne standaarden, volgens de EMEA richtlijnen [17].

Tabel 56: resultaten Carry-over

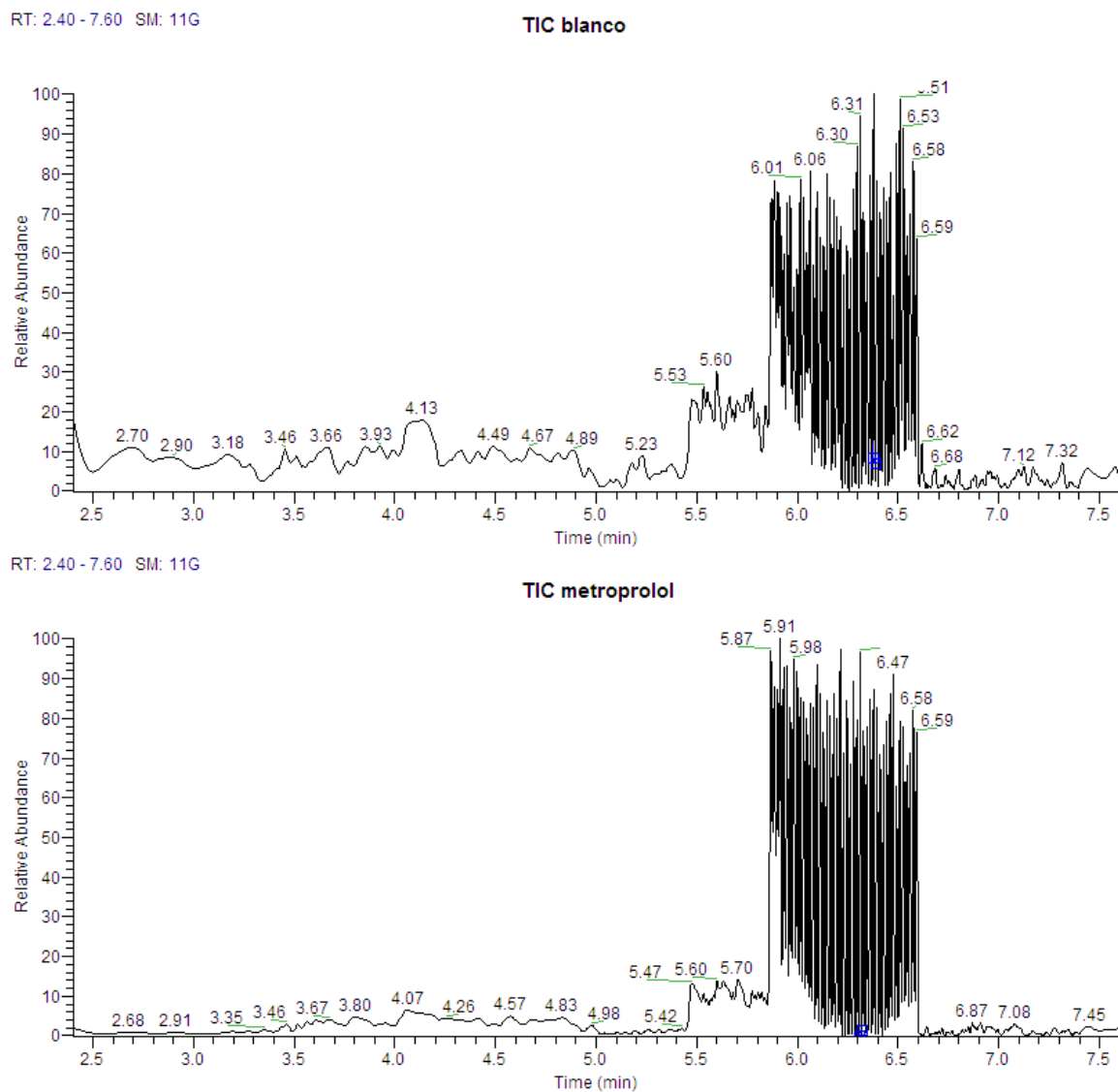
ID.	Carry-over		Carry over t.o.v LLOQ (%)
	Area Carry Over	Area LLOQ	
DM.venlafaxine	572,23	509121	0,11
DM.mirtazapine	*	147497	*
Mirtazapine	*	298325	*
Venlafaxine	95,19	1386850	0,01
DM.citalopram	*	41922	*
Citalopram	*	318355	*
Paroxetine	*	45738	*
DM.dosulepine	*	180213	*
DM.maprotiline	*	40118	*
Dosulepine	*	209935	*
Duloxetine	*	55508	*
DM.imipramine	238,01	706005	0,03
Fluvoxamine	81,78	13914	0,59
Imipramine	*	547501	*
DM.amitriptyline	*	262370	*
Maprotiline	441,25	846021	0,05
DM.fluoxetine	*	8172	*
Amitriptyline	123,15	162518	0,08
DM.sertraline	*	2449	*
Fluoxetine	29,80	109222	0,03
DM.clomipramine	234,39	310684	0,08
Sertraline	*	224152	*
Clomipramine	580,23	362821	0,16
Venlafaxine_D6**	*	580742	*
Citalopram_D6**	219,44	271665	0,08
Imipramine_D6**	*	503213	*
Amitriptyline_D3**	*	217813	*
Clomipramine_D3**	272,65	289519	0,09

* = geen signaal waargenomen ten opzichte van basislijn

** = carry-over ten opzichte van ISTD area

6.10.3.4 Specificiteit

Figuur 50 geeft de TIC chromatogrammen van de blanco en van metoprolol weer om de selectiviteit van de bepaling te kunnen vaststellen. Alle overige TIC chromatogrammen staan in 12.14.1.



Figuur 50: Tic signaal van een blanco bepaling en van metoprolol

6.10.3.5 Precisie en accuraatheid

6.10.3.5.1 Dag 1

Tabel 57 geeft de resultaten van de precisie en accuraatheid analyse op dag 1 weer. De resultaten van de precisie worden berekend met een in zesvoud uitgevoerde meting. De resultaten van de accuraatheid worden gemiddeld en vergeleken ten opzichte van de theoretische waarden, uitgedrukt in procenten afwijking.

Tabel 57: resultaten precisie en accuraatheid dag 1

19-4-2016 Eis [17]: ID.	Precisie - Spreiding (%)					Accuraatheid - Afwijking (%)				
	<20%	<15%	<15%	<15%	-	<20%	<15%	<15%	<15%	-
	a	b	c	d	Gemiddeld	a	b	c	d	Gemiddeld
DM.venlafaxine	2,63	1,33	0,62	2,25	1,71	4,09	10,19	8,82	6,32	7,35
DM.mirtazapine	5,35	1,55	2,21	2,48	2,90	-4,68	7,63	4,84	0,10	1,97
Mirtazapine	3,90	2,94	1,91	2,48	2,81	1,77	12,51	10,62	6,84	7,93
Venlafaxine	1,45	1,30	0,77	1,62	1,28	0,42	0,73	-1,89	-3,62	-1,09
Dmccitalopram	5,81	4,64	2,47	1,49	3,60	-10,07	0,91	-0,84	-3,68	-3,42
Citalopram	3,93	0,80	1,91	1,72	2,09	-0,96	3,05	2,03	-0,46	0,91
Paroxetine	6,98	1,92	2,40	1,13	3,11	3,78	7,26	4,76	5,16	5,24
DM.dosulepine	4,25	2,40	2,53	1,71	2,72	2,15	2,28	-0,96	-2,65	0,21
DM.maprotiline	9,61	3,82	3,60	3,49	5,13	11,34	14,54	3,38	-8,61	5,16
Dosulepine	7,85	3,11	3,76	2,18	4,23	1,10	-2,12	-5,06	-8,23	-3,58
Duloxetine	6,70	6,15	2,96	2,61	4,60	7,75	6,72	4,77	4,86	6,03
DM.imipramine	3,17	2,41	1,56	2,90	2,51	-11,23	1,41	9,50	14,04	3,43
Fluvoxamine	14,85	13,36	6,44	5,46	10,03	-11,87	4,55	9,01	14,61	4,08
Imipramine	3,98	0,89	2,19	2,85	2,48	-7,92	-3,31	-4,76	-3,99	-4,99
DM.amitriptyline	4,39	3,09	4,48	3,47	3,86	-11,73	2,13	7,02	6,09	0,88
Maprotiline	7,97	4,98	4,01	1,53	4,62	0,17	12,71	14,81	14,59	10,57
DM.fluoxetine	33,69	14,17	10,64	2,68	15,30	19,15	26,90	16,22	11,81	18,52
Amitriptyline	7,03	4,19	3,63	2,03	4,22	-6,03	0,98	4,21	1,42	0,14
DM.sertraline	8,07	14,78	9,37	4,28	9,13	0,13	7,03	12,24	-1,00	4,60
Fluoxetine	5,27	2,73	2,80	2,08	3,22	3,82	10,47	10,61	8,99	8,47
Sertraline	7,01	5,80	3,10	1,99	4,48	-2,81	10,64	14,65	13,71	9,05
DM.clomipramine	2,74	3,19	1,08	2,23	2,31	14,97	12,94	10,12	12,27	12,58
Clomipramine	2,39	3,49	1,52	2,61	2,50	-4,59	-4,57	-3,08	-2,43	-3,67

6.10.3.5.2 Dag 2

Tabel 58 geeft de resultaten van de precisie en accuraatheid analyse op dag 2 weer. De resultaten van de precisie worden berekend met een in zesvoud uitgevoerde meting. De resultaten van de accuraatheid worden gemiddeld en vergeleken ten opzichte van de theoretische waarden, uitgedrukt in procenten afwijking.

Tabel 58: resultaten precisie en accuraatheid dag 2

21-4-2016 Eis: ID.	Precisie - Afwijking (%)					Accuraatheid - Afwijking (%)				
	<20% a	<15% b	<15% c	<15% d	- Gemiddeld	<20% a	<15% b	<15% c	<15% d	- Gemiddeld
DM.venlafaxine	1,29	0,54	1,39	1,03	1,06	15,84	10,43	11,04	10,37	11,92
DM.mirtazapine	2,52	3,13	1,80	1,76	2,30	25,27	24,74	14,03	16,50	20,14
Mirtazapine	1,76	1,67	1,67	2,43	1,88	17,29	19,51	13,93	15,94	16,67
Venlafaxine	1,21	0,90	0,78	0,40	0,82	6,84	9,95	11,67	12,91	10,34
DM.citalopram	4,50	3,16	2,60	1,97	3,06	15,50	14,09	14,07	19,13	15,70
Citalopram	2,25	1,65	1,44	1,63	1,74	0,03	4,90	6,67	10,39	5,50
Paroxetine	3,84	2,36	1,43	2,03	2,41	28,33	21,34	7,21	7,66	16,14
DM.dosulepine	2,80	1,79	1,43	1,63	1,91	22,98	14,34	4,59	9,57	12,87
DM.maprotiline	7,43	6,24	2,41	1,26	4,34	24,77	19,92	12,81	25,61	20,78
Dosulepine	1,79	3,12	3,03	2,30	2,56	13,13	9,65	6,08	13,22	10,52
Duloxetine	1,61	5,13	3,05	2,62	3,10	20,90	18,04	5,13	7,69	12,94
DM.imipramine	3,58	1,78	1,85	1,50	2,18	24,13	23,34	9,43	6,39	15,82
Fluvoxamine	14,88	5,74	4,03	3,66	7,08	29,45	35,55	20,69	11,41	24,27
Imipramine	2,73	2,74	1,80	0,91	2,05	9,88	12,71	10,39	13,79	11,69
DM.amitriptyline	5,92	5,69	8,45	5,98	6,51	29,41	24,06	13,74	11,86	19,77
Maprotiline	5,71	5,54	8,07	4,86	6,05	7,85	7,25	-1,93	-2,64	2,63
DM.fluoxetine	29,16	6,90	11,17	6,22	13,36	41,12	25,40	-2,03	0,33	16,21
Amitriptyline	6,90	2,98	7,48	5,16	5,63	5,80	5,02	0,51	3,82	3,79
DM.sertraline	51,20	37,58	15,99	8,20	28,24	90,83	35,43	24,33	20,28	42,72
Fluoxetine	3,15	5,16	8,62	5,36	5,57	39,49	25,87	9,66	6,26	20,32
Sertraline	4,57	5,16	7,85	5,03	5,65	42,88	25,14	4,20	1,57	18,45
DM.clomipramine	2,81	3,49	4,38	1,96	3,16	30,13	25,12	10,78	6,53	18,14
Clomipramine	4,72	1,67	3,07	1,57	2,76	10,15	15,00	15,71	17,25	14,53

6.10.3.5.3 Dag 3

Tabel 59 geeft de resultaten van de precisie en accuraatheid analyse op dag 2 weer. De resultaten van de precisie worden berekend met een in zesvoud uitgevoerde meting. De resultaten van de accuraatheid worden gemiddeld en vergeleken ten opzichte van de theoretische waarden, uitgedrukt in procenten afwijking.

Tabel 59: resultaten precisie en accuraatheid dag 3

28-4-2016 Eis: ID.	Precisie - Afwijking (%)					Accuraatheid - Afwijking (%)				
	<20% a	<15% b	<15% c	<15% d	- Gemiddeld	<20% a	<15% b	<15% c	<15% d	- Gemiddeld
DM.Venlafaxine	3,93	4,78	1,62	2,35	3,17	-17,29	-14,94	-14,64	-15,72	-15,65
DM.mirtazapine	5,66	3,56	2,58	2,07	3,47	-13,59	-9,24	-12,03	-13,87	-12,18
Mirtazapine	4,94	4,86	3,58	2,23	3,90	-16,66	-11,39	-13,39	-14,13	-13,89
Venlafaxine	3,17	3,08	0,92	1,83	2,25	-8,61	-3,66	-2,44	-3,21	-4,48
Dmcitalopram	5,92	6,32	3,81	2,54	4,65	-15,31	-13,12	-12,43	-11,27	-13,03
Citalopram	4,98	3,07	1,06	1,82	2,73	-9,32	-4,86	-5,20	-3,49	-5,72
Paroxetine	7,47	6,06	4,03	1,99	4,89	-22,14	-14,49	-14,82	-17,82	-17,32
DM.dosulepine	6,43	3,37	1,73	2,42	3,49	-13,82	-9,27	-7,31	-4,01	-8,60
DM.maprotiline	13,63	7,77	4,38	2,04	6,95	-10,45	-14,24	-17,97	-14,77	-14,36
Dosulepine	4,78	4,33	2,52	2,68	3,58	-13,04	-6,73	-0,72	4,66	-3,96
Duloxetine	11,86	6,66	2,19	2,13	5,71	-10,24	-11,11	-12,15	-11,42	-11,23
DM.imipramine	5,83	4,23	5,25	3,58	4,72	-14,06	-6,70	-10,49	-14,33	-11,39
Fluvoxamine	19,83	5,39	5,99	7,14	9,59	-0,95	2,03	-12,88	-16,50	-7,07
Imipramine	6,01	4,41	4,74	4,46	4,91	-1,84	-1,96	-2,21	-3,12	-2,28
DM.amitriptyline	8,25	3,27	1,72	5,30	4,63	-14,68	-9,03	-9,82	-12,04	-11,39
Maprotiline	6,48	4,02	3,33	5,41	4,81	-19,24	-12,87	-15,83	-17,52	-16,37
DM.fluoxetine	14,82	11,76	7,20	3,57	9,34	-41,27	-31,74	-25,20	-22,72	-30,23
Amitriptyline	3,99	3,03	4,21	4,70	3,98	-7,26	-2,64	-4,28	-2,85	-4,26
DM.sertraline	19,27	31,36	7,59	6,56	16,20	-56,25	-35,97	-11,76	-3,89	-26,97
Fluoxetine	4,51	3,75	0,91	5,92	3,77	-18,47	-9,05	-13,39	-16,27	-14,30
Sertraline	4,69	4,43	1,83	5,35	4,07	-23,52	-14,64	-15,57	-18,56	-18,07
DM.clomipramine	6,63	3,48	4,91	2,75	4,44	-18,04	-11,45	-14,23	-17,50	-15,31
Clomipramine	5,15	4,47	4,82	2,42	4,22	-8,46	-2,49	-1,96	-0,56	-3,37

6.10.3.6 Slope

Tabel 60 geeft de slope van de regressie verkregen bij de precisie en accuraatheid bepaling op dag 1, 2 en 3 weer. De resultaten van de slope van dag 2 en 3 worden vergeleken met de slope van dag 1, uitgedrukt in procenten afwijking.

Tabel 60: slope van regressies voor de bepaling van precisie en accuraatheid op dag 1, 2 en 3

ID.	Slope			Slope t.o.v. slope 19-4-2016 (%)	
	19-4-2016	21-4-2016	28-4-2016	21-4-2016	28-4-2016
DM.Venlafaxine	4,05E-02	4,19E-02	4,34E-02	3,49	7,11
DM.mirtazapine	1,20E-02	1,22E-02	1,45E-02	1,92	20,73
Mirtazapine	1,18E-01	1,07E-01	1,24E-01	-9,16	5,05
Venlafaxine	4,77E-02	4,83E-02	4,98E-02	1,31	4,46
Dmcitalopram	3,34E-02	3,70E-02	4,01E-02	10,9	20,24
Citalopram	4,95E-02	4,90E-02	5,01E-02	-1,07	1,16
Paroxetine	6,66E-03	6,92E-03	8,07E-03	3,94	21,18
DM.dosulepine	2,52E-02	2,49E-02	2,50E-02	-1,28	-0,8
DM.maprotiline	3,85E-03	3,55E-03	4,62E-03	-7,91	19,83
Dosulepine	3,23E-02	3,21E-02	2,98E-02	-0,82	-7,92
Duloxetine	7,26E-03	7,38E-03	7,70E-03	1,66	6,11
DM.imipramine	2,92E-02	2,85E-02	3,06E-02	-2,43	4,93
Fluvoxamine	1,30E-03	1,35E-03	1,65E-03	4,11	26,84
Imipramine	4,93E-02	4,59E-02	4,71E-02	-6,99	-4,57
DM.amitriptyline	4,95E-02	5,19E-02	5,62E-02	4,97	13,58
Maprotiline	7,43E-02	8,14E-02	8,65E-02	9,49	16,41
DM.fluoxetine	9,88E-04	1,04E-03	1,14E-03	5,31	15,84
Amitriptyline	3,24E-02	3,14E-02	2,90E-02	-2,97	-10,31
DM.sertraline	5,82E-04	5,74E-04	8,32E-04	-1,27	42,99
Fluoxetine	9,63E-03	1,03E-02	1,09E-02	6,75	12,96
Sertraline	1,85E-02	1,92E-02	2,06E-02	4,07	11,78
DM.clomipramine	2,09E-02	2,09E-02	2,57E-02	0,36	23,1
Clomipramine	5,54E-02	5,48E-02	6,04E-02	-1,06	9,09
<i>gemiddeld</i>	-	-	-	1,01	11,3

7 Discussie

7.1 Voorbereiding

7.1.1 Opnemen van antidepressiva in methode ontwikkeling

Aan de hand van aanvragen voor de analyse van antidepressiva binnen het OLVG, van voorgaande jaren, en aan de hand van de gegevens van de GIP data bank ^[4] werd er besloten welke antidepressiva opgenomen werden in de methode ontwikkeling. Alle antidepressiva welke in de afgelopen drie jaar één of meerdere keren bij het OLVG aangevraagd werden, of antidepressiva welke meer dan 150.000 keer per jaar in Nederland voorgeschreven waren ^[4], werden opgenomen in de analyse methode.

7.1.2 Controleren en bestellen van antidepressiva en chemicaliën

Alle chemicaliën werden bij voorkeur bij Sigma Aldrich (en Cerrilant) besteld. Wanneer deze de betreffende antidepressiva niet in het assortiment hadden werd het product bij LGC besteld, met uitzondering van Desmethyl Citalopram, welke bij Lundbeck werd besteld en Duloxetine hydrochloride welke bij Eli Lilly & Company werd besteld wegens patent rechten.

7.1.2.1 interne standaarden

Er werd besloten om met gedeuteerde interne standaarden te werken wegens hun vrijwel identieke fysische en chemische eigenschappen ten opzichte van de antidepressiva (in kwestie). Daarnaast worden gedeuteerde antidepressiva niet voorgeschreven als medicijn, waardoor eventuele co medicatie bij een patiënt niet kan interfereren op de analyse van de antidepressiva.

Antipsychotica kan ook goed functioneren als interne standaard voor de analyse op antidepressiva ^{[10][12][13]} door de soortgelijke molecuul structuur ten opzichte van tri cyclische antidepressiva. Sporadisch worden antipsychotica en antidepressiva tegelijk bij een patiënt voorgeschreven wat antipsychotica minder geschikt zou maken als interne standaard voor de analyse op antidepressiva.

Venlafaxine D6, Citalopram D6 en Amitriptyline D3 werden voorafgaand aan de methode ontwikkeling opgenomen in de analyse methode als interne standaarden. Venlafaxine D6, Citalopram D6 en Amitriptyline D3 werden gekozen als interne standaarden wegens de frequente aanvraag voor analyse van Venlafaxine, Citalopram en Amitriptyline bij OLVG Oost.

7.1.3 **Uitgesloten antidepressiva**

Doxepine was een van de chemicaliën welke besteld moest worden voor de methode ontwikkeling. Bij ontvangst werd de Doxepine gecontroleerd, waarbij de container geopend werd. Enkele dagen na het openen van de Doxepine container, was de Doxepine in een bruine stroperige vloeistof veranderd. De Doxepine bleek zeer hygroscopisch, en is daardoor niet geschikt om te gebruiken bij de methodeontwikkeling. Omdat er de afgelopen jaren geen aanvragen zijn gedaan naar Doxepine bij het OLVG, werd besloten Doxepine niet mee te nemen bij de methodeontwikkeling.

Trazodon heeft een hoog therapeutische waarde van 1500 µg/l [8]. Door deze hoge therapeutische waarden zou Trazodon een bereik in de analyse methode moeten halen tot 3000 µg/l, wat ver boven het bereik van alle andere antidepressiva zou zijn (zie Tabel 33). Omdat er de afgelopen jaren geen aanvragen zijn gedaan naar Trazodon, was besloten Trazodon niet mee te nemen bij de methodeontwikkeling.

7.1.4 **Bereiden van individuele 100 mg/l antidepressiva oplossingen**

Er werden 100 mg/l antidepressiva oplossingen bereid door 1 mg antidepressiva in te wegen en op te lossen in 10 ml methanol. De inweeg werd gecorrigeerd voor zijn zout, zodat er daadwerkelijk 1 mg antidepressiva werd ingewogen. Het klinisch farmaceutisch apotheek laboratorium van OLVG Oost bezit een Sartorius ME-5 balans die nauwkeurig kan wegen vanaf één milligram (>1 mg), de balans rapporteert op vier getallen na de komma nauwkeurig.

7.2 Massaspectrometrie

7.2.1 Opnemen van transitities

Er werden individuele 1 mg/l antidepressiva oplossingen geïnfuseerd in de MS, voor het opnemen van een transitie van de betreffende antidepressiva. De transities zet de relatieve intensiteit van een fragment tegen de 'collision energy' van de quadrupole uit in volt. Van ieder component werden de twee meest intense transitities opgenomen in de analyse methode. Hiervoor werden gedurende de analyse per antidepressiva twee fragmenten gemonitord.

7.2.2 Desmethyl Fluoxetine

Desmethyl Fluoxetine beschikte niet over een mooie transitie (zie bijlage 12.12.1). In plaats van een gaussische vorm, had de transitie een chaotisch signaal over het gehele voltage gebied bij 30,4 m/z op 40 volt. In een poging de transitie van Desmethyl Fluoxetine te verbeteren werd er een transitie opgenomen met een debiet van 50 µl/min. in plaats van 10 µl/min in de MS. Onder deze omstandigheden was de transitie niet verbeterd. Er werden transities van Desmethyl Fluoxetine opgenomen met 3000 en 4000 volt op de ionisatie bron. Onder deze omstandigheden was de transitie ook niet verbeterd. Vervolgens werd een transitie van Desmethyl Fluoxetine opgenomen met 0,5 mTorr 'collision gas pressure' in de 'collision chamber' van de MS. Onder deze omstandigheden was één gaussische piek enigszins waarneembaar (12.12.1), bij 134,4 m/z op 25 volt.

Een m/z van 30,5 is echter aan de lage kant voor massaspectrometrie. In het gebied van 0 tot en met 100 m/z komen veel storende factoren voor, zoals geïoniseerde atmosferische gassen en adducten voor, wat de analyse bemoeilijkt.

Een product specialist van Thermo Scientific vermeldde dat een 0,5 mTorr 'collision gas pressure' te laag is om reproduceerbaar te kunnen analyseren en dat de minimale 'collision gas pressure' 1,5 mTorr moet bedragen. De 'collision gas pressure' van de MS werd om deze reden niet verlaagd. Tevens zouden de transities van alle overige componenten verslechteren. De transitie verkregen met de 1,5 mTorr 'collision gas pressure' werd gebruikt als transitie waarde voor Desmethyl Fluoxetine op 1,5 mTorr (30,5 m/z fragment op 40 volt). Desmethyl Fluoxetine kon daarom maar op één fragment gemonitord worden, in tegenstelling tot alle andere antidepressiva, welke op twee fragmenten gemonitord werden.

Desmethyl Fluoxetine is daarom minder geschikt voor ESI-MS en er werd rekening gehouden met de mogelijkheid dat Desmethyl Fluoxetine kwam te vervallen uit de analyse methode.

7.3 Chromatografie

7.3.1 Individuele chromatografie

Van elk component werd een individueel chromatogram opgenomen met de 1 mg/l antidepressiva oplossingen, met de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. Elke antidepressiva vertoonde een signaal op beide gemonitorde fragmenten, met uitzondering van Desmethyl Fluoxetine, welke maar op één fragment gemonitord kon worden. Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine en Mirtazapine hadden geen gaussische piek vorm (zie bijlage 12.10.1).

7.3.2 Kolom Keuze

Uit de literatuurstudie bleek dat op C18 gebaseerde kolommen het meest toegepast worden voor de analyse van antidepressiva met LC-MSMS [6]. Daarnaast worden sporadisch op C8 gebaseerde kolommen toegepast [15].

Kolom A, B, C, D en E werden getest voor de chromatografie van de 100 µg/l antidepressiva test oplossing met de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. De methode maakt gebruik van een isocratisch 55:45 acetonitril : acetaat-buffer eluens op 0,3 ml/min debiet. Het debiet werd per kolom aangepast zodat de maximale druk van de kolom in kwestie niet overschreden werd.

Kolom A en E gaven geen gewenst chromatogram. Kolom B, C en D gaven chromatogrammen waarbij de componenten onderling enige retentie ondervonden. Kolom B vertoonde op de individuele chromatogrammen van de antidepressiva veel tailing. Kolom C en D werden verder geoptimaliseerd voor wat betreft de chromatografie.

7.3.3 Eluens keuze

7.3.3.1 Reden voor gebufferd eluens

Het eluens moet pH gereguleerd worden om het antidepressiva een lading te kunnen geven. Hiervoor is een lage pH gewenst zodat stikstof atomen aanwezig in alle antidepressiva een positieve lading aannemen. Deze lading helpt bij de ionisatie van de antidepressiva in het MS stadium. Alle antidepressiva zijn zwakke basen met een pKa van rond de tien. Een vuist regel is dat alle zwakke basen (antidepressiva) voor 99% positief geïoniseerd zijn wanneer deze 2 pH eenheden onder de pKa van de zwakke basen zit.

Als een antidepressiva niet geïoniseerd is, is deze meer apolaire dan de geïoniseerde antidepressiva en ondervind dus meer retentie op een C18 of C8 gebaseerde kolom. De geïoniseerde antidepressiva is meer polair wegens het hoge ladingsverschil binnen het molecuul en ondervind dus minder retentie op een C18 of C8 kolom. Om een robuuste methode te creëren is het daarom essentieel dat het eluens gebufferd wordt, zodat de pH van de oplossing niet makkelijk kan fluctueren, waardoor de retentie kan verschuiven als gevolg van pH schommelingen.

7.3.3.2 Mogelijke buffers

Een buffer voor LC-MSMS moet vluchtig zijn zodat deze verdampt kan worden in de H-ESI bron. Wanneer de buffer verdampt wordt, wordt tevens de lading van de buffer over gegeven aan het analyt. Doordat de buffer vluchtig moet zijn, zijn er maar een select aantal buffers beschikbaar. De beschikbare buffers zijn trifluorazijnzuur (TFA), bicarbonaat, ammonium acetaat, azijnzuur, mierenzuur en formiaat buffers.

TFA is een zeer agressief zuur en kan de MS van binnen aantasten. Bovendien kan TFA suppressie veroorzaken bij het analyt, wat kwantificatie bemoeilijkt. Bicarbonaat heeft een pKa van 10,3 en is daarom niet in staat alle antidepressiva te ioniseren, waardoor bicarbonaat minder geschikt is. Een acetaat/azijnzuur buffer is de standaard LC-MS buffer bij het OLVG Oost. Azijnzuur heeft een pKa van 4,76. Ook Mierenzuur is een geschikte buffer en heeft een pKa van 3,77. Ammoniumformiaat in combinatie met mierenzuur heeft een sterk ionisatie potentiaal en buffersterkte en is daarom zeer geschikt voor de analyse van antidepressiva met LC-MSMS. Om deze redenen werd het standaard eluens; de acetaat-azijnzuur buffer, tegen een ammoniumformiaat-mierenzuur buffer getest.

7.3.3.3 Acetaat-azijnzuur buffer vs. Formiaat-mierenzuur buffer

De formiaat-mierenzuur buffer had mooiere individuele piek vormen dan met de acetaat-azijnzuur buffer. De gevoeligheid met de formiaat-mierenzuur buffer nam gemiddeld met 34% ten opzichte van de acetaat-azijnzuur buffer toe. Tevens verbeterde de antidepressiva met een matige intensiteit aanzienlijk op gevoeligheid met de formiaat-mierenzuur buffer ten opzichte van de acetaat-azijnzuur buffer. Om deze reden werd de formiaat-mierenzuur buffer als eluens gekozen.

7.3.4 Eluens verhouding

De UPLC werd geoptimaliseerd op chromatografie met kolom C en D voor de bepaling van antidepressiva met LC-MSMS. Volledige scheiding van alle antidepressiva onderling was niet essentieel doordat de MS onderscheid kan maken tussen de massa's van 'parent ions' en bijbehorende fragmenten. Enige retentie tussen de antidepressiva onderling was echter wel gewenst, zodat de MS geclusterd kan worden in tijdsfragmenten. De fragmenten worden gebaseerd op het elutie profiel van de chromatografie. Hierdoor focust de MS per tijdsdeel maar op enkele antidepressiva, in plaats van alle antidepressiva tegelijk over het gehele chromatogram. Hierdoor neemt de gevoeligheid toe.

7.3.4.1 Gradiënt systeem 1: Kolom C

De UPLC werd geoptimaliseerd op chromatografie met de 'Waters Acquity UPLC C18 100 x 2,1 mm 1,8 μ m kolom' (kolom C) voor de analyse van antidepressiva. De chromatografie werd zo afgesteld dat alle componenten binnen ongeveer 5 minuten elueerden. De laatst eluerende componenten ondervonden zeer veel retentie met een isocratisch systeem waardoor de analyse erg lang duurde. Om deze reden werd een gradiënt systeem ontwikkeld waarbij het gehalte acetonitril gedurende de analyse toenam. De verdeling coëfficiënt van het antidepressiva tussen de stationaire fase en de mobiele fase verschuift door de gradiënt, waarbij het apolaire antidepressiva zich meer in de mobiele fase gaat bevinden, wanneer het gehalte acetonitril toeneemt. Hierdoor elueert de antidepressiva sneller.

De uiteindelijk verkregen chromatografie startte met een debiet van 0,25 ml/minuut met een 40:60 acetonitril : formiaat-buffer verhouding waar de analyse één minuut op verbleef, vervolgens ging de verhouding in een halve minuut naar 60:40 acetonitril : formiaat-buffer verhouding, waar de analyse 2,5 minuten op verbleef. Vervolgens ging de analyse in een halve minuut terug naar een 40:60 verhouding, waar de analyse anderhalve minuut op verbleef, om te stabiliseren voor een volgende analyse (zie Figuur 11).

7.3.4.2 Isocratisch systeem 1: Kolom D

De UPLC werd tevens geoptimaliseerd op chromatografie met de 'Agilent Zorbax Eclipse C18 150 x 4,6 mm 5 μ m kolom' (kolom D) voor de analyse van antidepressiva met LC-MS. De chromatografie werd niet aangepast ten opzichte van het uitgangspunt van 55:45 acetonitril : formiaat-buffer verhouding met een flow van 0,50 ml/minuut. Alle componenten elueerden binnen vijf minuten, waarbij de elutie mooi verdeeld was.

Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine en Mirtazapine hadden een matige piek vorm (zie Figuur 59). Er vond een scheiding plaats van ieder component, waardoor twee slecht gescheiden pieken ontstonden. Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine en Mirtazapine zijn alle drie enantiomeren. De piek scheiding wordt mogelijk veroorzaakt door de scheiding van de R en S enantiomeren. Het verlagen van het organisch gehalte (<40%) voorkomt het scheiden van de pieken.

Of de gescheiden pieken ook daadwerkelijke enantiomeren van elkaar zijn is niet bekend. Zuivere enantiomeren zijn niet commercieel verkrijgbaar en worden enkel tegen zeer hoge kosten op aanvraag gemaakt/gezuiverd, dit is daarom niet verder onderzocht.

7.3.5 Kwalitatieve suppressie bepaling

Suppressie wordt veroorzaakt wanneer er tijdens de ionisatie van het analyt in de H-ESI bron zich componenten bevinden die de ionisatie van het analyt kunnen overnemen. De mate van ionisatie door de bron is een mate van kwantificatie. Om deze reden is het belangrijk dat de ionisatie consequent gebeurt.

Door met een chromatografie methode een monster te analyseren waarvan bekend is dat deze suppressie veroorzaakt, terwijl er continu antidepressiva in de MS geïnfuseerd wordt, wordt het inzichtelijk waar de suppressie zich in het chromatogram bevindt. De suppressie en elutie van de antidepressiva moeten elkaar ontwijken (niet co-elueren) om de antidepressiva goed te kunnen kwantificeren.

7.3.5.1 Gradiënt systeem 1: Kolom C

De suppressie van gradiënt systeem 1 op kolom C vond plaats tussen 0,5 en 1,1 minuten na injectie. De elutie van Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine, Mirtazapine en Venlafaxine vonden plaats binnen de suppressie. Gradiënt systeem 1 was daarom niet geschikt voor de analyse van antidepressiva met LC-MS.

7.3.5.2 Isocratisch systeem 1: Kolom D

De suppressie van isocratisch systeem 1 op kolom D vond plaats tussen 2,2 en 2,6 minuten na injectie. De elutie van de eerste component (Desmethyl Venlafaxine) vond plaats tussen 2,65 minuten en 2,90 minuten. De suppressie was hiermee net ontweken ten opzichte van de elutie, er was geen grote marge over voor verschuiving van de elutie van het antidepressiva, of het verschuiven van de suppressie.

7.3.5.3 Optimalisatie van chromatografie

Om te controleren of de suppressie en elutie van antidepressiva verder van elkaar gescheiden konden worden, werd het buffer gehalte verhoogt voor gradiënt systeem 1 en isocratisch systeem 1. De verkregen methoden werden gradiënt systeem 2 en isocratisch systeem 2 genoemd.

7.3.5.3.1 Gradiënt systeem 2: kolom C

De elutie van de antidepressiva van gradiënt systeem 2 vond later plaats dan de elutie van antidepressiva van gradiënt systeem 1. De suppressie van gradiënt systeem 2 vond echter ook later plaats waardoor Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine, Mirtazapine en Venlafaxine zich binnen de suppressie bevonden. De suppressie bewoog mee met de elutie van de antidepressiva, waardoor kolom C niet geschikt was voor de analyse van antidepressiva met LC-MS in serum en een PPT voorbereidingsmethode.

De elutie van de antidepressiva van isocratisch systeem 2 vond later plaats dan de elutie van antidepressiva van isocratisch systeem 1. De suppressie van isocratisch systeem 2 vond echter ook later plaats. De suppressie bewoog mee met de elutie van de antidepressiva. De elutie van het laatste antidepressiva van isocratisch systeem 2 vond één minuut later plaats dan met isocratisch systeem 1.

Om deze redenen werd isocratisch systeem 1: 55:45 acetonitril : formiaat-buffer op 0,5 ml/minuut met kolom D gebruikt als chromatografische methode voor de analyse van antidepressiva in serum.

7.4 Optimalisatie van systeem gevoeligheid

De gevoeligheid van de analyse methode werd geoptimaliseerd door het voltage op de ESI ionisatiebron, de sheath gas, de auxiliary gas, en de vaporizer temperature te optimaliseren. Alle begininstellingen waren overgenomen van de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. Voor het optimaliseren van de MS parameters werd er een stap lager en een stap hoger gemeten dan de reguliere instellingen. Voor het optimaliseren van het eluens werd de buffersterkte met 150% vergroot, om te controleren of er een verandering in gevoeligheid waargenomen kon worden. Wanneer een verhoogd signaal/verbeterd resultaat geconstateerd werd, werd er in een fijner raster geoptimaliseerd tot er een optimum gevonden werd.

Alle parameters waarbij een gas debiet geoptimaliseerd wordt, wordt uitgedrukt in ‘Arb’ wat staat voor ‘Arbitrary units’. Arb is een grootheid-loze gas debiet eenheid. De Thermo Scientific TSQ rapporteert alle gas debieten in Arb, omdat er geen debietmeters aan de gaskranen gekoppeld zijn. De flow is afhankelijk van de druk op de gas box, welke gereguleerd wordt.

7.4.1 Onderscheid van signaal sterkte

Niet iedere antidepressiva gaf een intens signaal. Aan de hand van de area van de 1 µg/l antidepressiva oplossing en aan de hand van de ‘lower limit of quantification’ (LLOQ) werd bepaald welke antidepressiva te weinig gevoeligheid hadden (matige intensiteit) en welke antidepressiva voldoende gevoeligheid hadden (normale en sterke intensiteit).

Desmethyl Mirtazapine, Paroxetine, Desmethyl Maprotiline, Desmethyl Citalopram en Dosulepine hadden last van een hoge basislijn op 1 µg/l. Desmethyl Fluoxetine, Desmethyl, Fluvoxamine en Sertraline hadden last van een laag signaal.

De antidepressiva met een lage gevoeligheid (matige intensiteit) werden primaire geoptimaliseerd. Dit houdt in dat een verhoging van signaal als gevolg van de optimalisatie bij de antidepressiva met een matig signaal ten koste mocht gaan ten opzichte van de componenten met gemiddeld of intens signaal.

7.4.2 Transitie selectie

Doordat Desmethyl Mirtazapine, Paroxetine, Desmethyl Maprotiline, Desmethyl Citalopram en Dosulepine last hadden van een hoge basis lijn, en doordat Desmethyl Fluoxetine maar op één fragment gemonitord kon worden, werden alle componenten gereduceerd tot het monitoren van één fragment, in plaats van twee fragmenten. Bij alle antidepressiva werd gekeken welk fragment het meest intense signaal gaf. Het fragment met het zwakkere signaal werd uit de methode verwijderd. Hierdoor halveerde het aantal gemonitorde fragmenten waardoor de basislijn van de antidepressiva met matige intensiteit sterk af nam (zie Figuur 28).

7.4.3 Handmatige MS optimalisatie

7.4.3.1 Optimalisatie van voltage op ionisatiebron

Het voltage op de ionisatie bron werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (3500 volt), 3000, 4000 en 4500 volt de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. Er was geen verbetering in signaal waargenomen bij 3000, 4000 en 4500 volt op de ionisatiebron (zie Tabel 26). Bijna alle resultaten vielen lager uit dan de resultaten van de standaard 3500 volt.

Het lager uitvallen van de resultaten van het optimaliseren van het voltage op de ionisatiebron is mogelijk veroorzaakt doordat de transitie van alle antidepressiva opgenomen waren met 3500 volt op de ionisatiebron. Op deze 3500 volt zijn de optima voor de fragmenten gevonden. Het veranderen van het voltage op de ionisatiebron veranderd ook mogelijk de optima van de fragmenten, wat resulteert in een daling van signaal.

Het voltage op de ionisatiebron is niet gewijzigd ten opzichte van de reguliere methode en bedraagt 3500 volt in positieve modus.

7.4.3.2 Optimalisatie van Sheath gas

De sheath gas werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (30 Arb), 5, 15 en 45 Arb de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. Er was geen verbetering in signaal waargenomen bij 5, 15 en 45 Arb ten opzichte van 30 Arb sheath gas (zie Tabel 27). Bijna alle resultaten vielen lager uit dan de resultaten van de standaard 30 Arb. Van de antidepressiva met matige intensiteit viel enkel Paroxetine (+31,66 % bij 45 Arb) en Desmethyl Sertraline (+18,00% bij 15 Arb) hoger uit. Alle overige componenten verslechterden echter onder deze omstandigheden.

De sheath gas is niet gewijzigd ten opzichte van reguliere methode en bedraagt 30 Arb.

7.4.3.3 Optimalisatie van auxiliary gas

De auxiliary gas werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (20 Arb) 5, 10 en 30 Arb de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. Er was een verbetering in signaal waargenomen bij 5 en 10 Arb ten opzichte van de 20 Arb auxiliary gas (zie Tabel 28). Bij de antidepressiva met matige intensiteit werd echter juist een daling in signaal sterkte waargenomen bij 5 en 10 Arb. Bij 30 Arb was er een verbetering in signaal waargenomen voor de Desmethyl Sertraline, Fluvoxamine en Desmethyl Citalopram.

De Arb waarden voor de auxiliary gas had aangepast moeten worden van 20 Arb (standaard) naar 30 Arb. De Arb waarde is echter niet goed overgenomen in de analyse methode, waardoor de analyse parameters zijn vastgelegd met de standaard waarde van 20 Arb. Hierdoor is de 20 Arb auxiliary gas waarde aangehouden.

7.4.3.4 Optimalisatie van vaporizer temperature

De vaporizer temperature werd geoptimaliseerd door met de reguliere methode (300 °C), 250, 350 en 400 °C de chromatografie op te nemen van de 5 µg/l antidepressiva oplossing. Desmethyl Maprotiline, Dosulepine en Fluvoxamine gaven signaal verbetering bij 250, 350 en 400°C (zie Tabel 29). Bij de overige antidepressiva met matige signaal intensiteit was juist een daling in signaalsterkte waar te nemen, waarbij de signaalsterkte van Desmethyl Sertraline gemiddeld 50% daalde. De signaal sterkte van Desmethyl Fluoxetine nam bij 400 °C met 463% toe, de meting met de reguliere waarde was echter zeer slecht, waardoor deze resultaten niet betrouwbaar zijn.

De vaporizer temperature is niet aangepast ten opzichte van de reguliere methode, doordat er geen eenduidige conclusie getrokken kon worden uit de resultaten. De vaporizer temperature bedraagt 300 °C.

7.4.4 Eluens optimalisatie

7.4.4.1 Optimalisatie van mierenzuur concentratie

De mierenzuur concentratie werd geoptimaliseerd door de 5 µg/l test oplossing te analyseren met eluens dat 0,10% en 0,25% mierenzuur bevatte. Paroxetine en Desmethyl Paroxetine gaven een signaal verbetering bij eluens met 0,25% mierenzuur ten opzichte van eluens met 0,10% mierenzuur. Bij alle overige antidepressiva met matige signaal intensiteit werd juist een daling in signaalsterkte waargenomen.

De pH van het eluens met 0,25% mierenzuur bedroeg ~2,6. Agilent raad aan de 'Zorbax Eclipse C8' kolom (kolom D) te gebruiken bij een pH range tussen de 3 en 10. De pH van het eluens met 0,10% mierenzuur bedroeg ~3,3. Wanneer een eluens gebruikt wordt onder het minimale pH advies van de fabrikant bestaat de mogelijkheid dat het kolommateriaal oplost waardoor de kolom beschadigd. Als gevolg hiervan kan de retentie verschuiven, wat ten koste gaat van de robuustheid van de analyse.

Omdat er geen eenduidige stijging in signaal sterkte is waargenomen en omdat de pH van het eluens met 0,25% mierenzuur buiten de pH range van de kolom valt, wordt het eluens met 0,10% mierenzuur aangehouden als eluens voor de analyse van antidepressiva met LC-MS.

7.4.4.2 Optimalisatie van ammoniumformiaat concentratie

Een eluens met ammoniumformiaat werd geoptimaliseerd door de 5 µg/l test oplossing te analyseren met eluens met 10 mmol en 25 mmol ammoniumformiaat. Desmethyl Maprotiline, Dosulepine en Desmethyl Sertraline hadden een signaal verbetering met het eluens met 0,25 mmol ammonium formiaat ten opzichte van het eluens met 10 mmol ammoniumformiaat. Bij alle overige antidepressiva met matige signaal intensiteit werd juist een daling in signaalsterkte waargenomen.

Omdat er geen eenduidige stijging in signaal sterkte werd waargenomen, wordt het eluens met 10 mmol mierenzuur aangehouden als eluens voor de analyse van antidepressiva met LC-MS.

7.5 Kwantificatie

7.5.1 Toevoegen van interne standaard

Figuur 30 geeft het TIC chromatogram van de 100 µg/l antidepressiva oplossing met analyse methode 1, met de locaties van de interne standaarden weer. Venlafaxine D6, Citalopram D6 en Amitriptyline D3, waren voor de methode ontwikkeling gekozen als interne standaarden. Imipramine D6 en Clomipramine D3 zijn toegevoegd aan de hand van het elutie profiel van analyse methode 1.

Imipramine D6 en Clomipramine D3 waren gekozen als interne standaarden wegens de elutie locatie van Imipramine en Clomipramine. Bovendien wordt de analyse van Imipramine en Clomipramine met regelmaat aangevraagd bij het OLVG. Een gedeuteerde interne standaard maakt de analyse van deze componenten meer stabiel.

7.5.2 Interne standaard toewijzing

Alle antidepressiva kregen interne standaarden toegewezen aan de hand van het elutie profiel verkregen bij 6.4.3.4 (Figuur 23). Tabel 32 geeft de toewijzing van de antidepressiva aan de interne standaarden aan. De antidepressiva kregen een interne standaard toegewezen op basis van de dichtstbijzijnde eluerende interne standaard.

7.5.3 Lineariteit

7.5.3.1 Bereik

Het bereik van de antidepressiva in de analyse methode werd gebaseerd op de therapeutische index waarden van de antidepressiva in kwestie. De 'lower limit of quantification' (LLOQ) bedroeg een half keer de laag therapeutische index waarden. De 'upper limit of quantification' bedroeg twee keer de hoog therapeutische index waarden (zie Tabel 33).

De therapeutische indexwaarden van Desmethyl Sertraline en Desmethyl Venlafaxine werden niet vermeld [9]. Het bereik van Desmethyl Sertraline is gesteld op 10 tot 200 µg/l, Sertraline heeft een bereik van 25 tot 600 µg/l. Het bereik van Desmethyl Sertraline is aan de lage kant. Het bereik van Desmethyl Sertraline is opzettelijk laag gehouden omdat deze geleverd wordt als een 1 ml ampul van 100 µg/ml. Door de relatief lage concentratie van de Desmethyl Sertraline oplossing in de ampul moet er veel gepipetteerd worden om het bereik van 25 tot 600 µg/l te halen wat kostbaar is. Om deze reden is het bereik van Desmethyl Sertraline tijdens dit onderzoek op 10 tot 200 µg/l gesteld om zo kosten te besparen.

7.5.3.2 Lineariteit model

De analyse van antidepressiva in serum met LC-MS moest van het OLVG Oost lineair zijn. Volgens de gespecialiseerde laboratorium analisten van het OLVG Oost was het mogelijk om de analyse van antidepressiva met LC-MS lineair te krijgen door onder andere de gevoeligheid van de antidepressiva en het injectie volume van het LC systeem te optimaliseren. Het toepassen van lineaire modellen was hierbij een harde eis.

Door het verlagen van het injectie volume wordt de detector minder (over)beladen door antidepressiva (fragmenten) waardoor de regressie lineair wordt/blijft. Het overbeladen van de detector gebeurt enkel bij antidepressiva met “hoge signaal intensiteit”. Door het verlagen van het injectievolume neemt echter ook de gevoeligheid van componenten met matige signaal intensiteit af. Een optimum moet gevonden worden tussen gevoeligheid van antidepressiva met matige signaal intensiteit en de lineariteit van antidepressiva met sterke signaal intensiteit.

Door het injectie volume van de analyse te verlagen van 10 naar 2,5 µl werd de analyse van antidepressiva meer lineair. Figuur 34 geeft de regressie van Citalopram weer bij een injectie volume van 10 µl. Figuur 35 geeft de regressie van Citalopram weer bij een injectie volume van 2,5 µl. Bij de 10 µl injectie volume is visueel te zien dat de ijklijn iets afbuigt bij de twee hoogste regressie punten. Bij de 2,5 µl injectie volume is deze afbuiging visueel niet meer waarneembaar.

Daarnaast heeft een lager injectie volume ook een positief effect op de piek vorm van de antidepressiva. Wanneer er besloten wordt om met een PPT opwerkingsmethode de antidepressiva in plasma op te werken tot serum, dan bedraagt een groot deel van de matrix van de antidepressiva methanol. Methanol is nodig om de precipitatie mogelijk te maken. Het eluens bestaat uit acetonitril en water. Wanneer analyt bestaand uit een methanol matrix geïnjecteerd wordt, gaat het antidepressiva in het analyt een balans instellen tussen het eluens en de matrix. Wanneer het injectie volume groot is, wordt er veel methanol geïnjecteerd, waardoor een grotere hoeveelheid antidepressiva een balans gaat instellen tussen het methanol en de eluens, dit effect verminderd de gaussische piek vorm van de antidepressiva. Wanneer het injectie volume klein is, wordt er weinig methanol geïnjecteerd, waardoor een kleine hoeveelheid antidepressiva een balans gaat instellen. Hierdoor behouden de antidepressiva betere gaussische piek vormen.

Het injectie volume van de analyse methode is om deze redenen bepaald op 2,5 µl.

7.5.3.3 Regressie model

7.5.3.3.1 Normale regressie vs. gewogen regressie

Meerdere kalibratie modellen kunnen toegepast worden voor de analyse van antidepressiva met LC-MS. Bio-analytische LC-MS methoden staan er om bekend een gelijke spreiding in respons te hebben over het gehele kalibratiegebied van de analyse methode. Dit betekent dat de CV over het gehele kalibratiegebied gelijk is. Dit betekent tevens dat de absolute spreiding in de analyse toeneemt met de concentratie.

Wanneer een standaard ongewogen regressiemodel toegepast wordt bij een bio-analytische LC-MS methode, hebben hogere responsen (hogere regressie punten) een grotere invloed op de richtingscoëfficiënt van de regressielijn dan de lagere responsen. Dit resulteert vaak in grote as-afsnede en grote onzekerheden in het lage regressie gebied, waardoor kwantificatie in het lage regressie gebied niet accuraat is. Om dit effect te voorkomen kunnen de dataparen gewogen worden.

Bij gewogen regressie worden dataparen gecorrigeerd door een weegfactor die bepaald wordt door de concentratie van het punt in kwestie. Bij gewogen regressie telt de afwijking van een regressiepunt ten opzichte van de regressielijn minder mee naar mate de concentratie toeneemt.

De EMEA richtlijn schrijft dat een zo simpel mogelijk model, met de adequate pasvorm toegepast moet worden als regressiemodel: "A relationship which can simply and adequately describe the response of the instrument with regard to the concentration of analyte should be applied" ^[17]. Een ongewogen regressie model is echter niet voldoende toepasbaar voor kwantificatie in het lage regressie gebied.

Het enkelvoudig gewogen regressiemodel geeft een aanzienlijk kleinere as-afsnede (zie Figuur 32) en is nauwkeuriger op lage concentratie (zie Tabel 36). Het lineaire gewogen regressiemodel gaf een afwijking 6,46% ten opzichte van de regressielijn en het standaard lineaire regressie model gaf een afwijking 19,69% ten opzichte van de regressielijn, voor het LLOQ monster.

Op hogere concentratie is te zien dat het standaard lineaire model een betere passing heeft ten opzichte van de regressiepunten (zie Figuur 33). Als een zwaarder gewogen model toegepast zou worden, bijvoorbeeld een dubbel gewogen regressie ($1/x^2$) dan zou de afwijking in het boven gebied van de regressielijn nog groter worden, waardoor de analyse minder betrouwbaar wordt op hogere concentraties. De analyse moet betrouwbaar zijn in het hoge en lage regressie gebied. Door de regressie te wegen kan de betrouwbaarheid van de regressielijn vergroot worden in het lage regressie gebied, dit gaat echter ten koste van de betrouwbaarheid in het hoge regressie gebied.

Het lineair enkelvoudig ' $1/x$ ' gewogen regressie model is daarom het meest eenvoudige model, dat adequaat toegepast kan worden op de analyse van antidepressiva met LC-MS, waarbij de juiste compromis is gevonden tussen afwijking in het onder gebied (rondom de LLOQ) en het boven gebied van de regressielijn (ULOQ).

7.5.4 Recovery

7.5.4.1 Recovery in waterige matrix ten opzichte van een regressiereeks in waterige matrix

Door de recovery van antidepressiva te bepalen in een waterige matrix ten opzichte van een regressiereeks in waterige matrix, is de recovery in een optimale situatie bepaald. Aan de hand van de analyse resultaten van de recovery in waterige matrix werd inzichtelijk of de analysemethode geschikt is voor kwantificatie.

Alle recovery resultaten zijn in een optimaal scenario 100%, waardoor de afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie 0% moet zijn. Alle antidepressiva zitten binnen een gemiddelde afwijking van 10% ten opzichte van hun theoretische concentratie (zie Tabel 39). De gemiddelde afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie van alle antidepressiva bedraagt 4,3%. De afwijking wordt gecreëerd door de spreiding in de analyse methoden en mogelijk door de afwijking in punt twee (pt. 2), welke systematisch hoog is. Aan de hand van de analyse resultaten van de recovery in waterige matrix is geconcludeerd dat de analysemethode geschikt is voor kwantificatie.

7.5.4.2 Recovery in serum met PPT methode ten opzichte van een regressiereeks in waterige matrix

Door de recovery van antidepressiva te bepalen met een PPT methode, ten opzichte van een regressiereeks in een waterige matrix, is de effectiviteit van de PPT methode bepaald. Met de resultaten van de PPT recovery werd inzichtelijk of de PPT methode geschikt was voor kwantificatie.

Alle PPT recovery resultaten zijn in een optimaal scenario 100%, waardoor de afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie 0% moet zijn. Alle antidepressiva zitten binnen een gemiddelde afwijking van 20% ten opzichte van de theoretische concentratie, met uitzondering van Desmethyl Venlafaxine (-29,44%), Desmethyl Imipramine (23,97%), Fluvoxamine 59,09%) en Desmethyl Sertraline (-22,27%) (zie Tabel 40). De PPT methode beschikt over een relatief hoge gemiddelde recovery. Bij Paroxetine, Desmethyl Maprotiline, Fluvoxamine en Sertraline is er echter wel veel spreiding (>15%) in de recovery resultaten onderling.

7.5.4.3 Recovery in serum met PPT methode ten opzichte van een regressiereeks in serum met een PPT methode

Door de recovery van antidepressiva te bepalen met een PPT methode, ten opzichte van een met regressiereeks opgewerkt met dezelfde PPT methode werd inzichtelijk of de PPT methode geschikt was voor kwantificatie met analyse methode 1.

Alle recovery resultaten zijn in een optimaal scenario 100%, waardoor de afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie 0% moet zijn. Alle antidepressiva zitten binnen een gemiddelde afwijking van 20% ten opzichte van de theoretische concentratie (zie Tabel 41). De PPT methode beschikt over een relatief hoge gemiddelde recovery. Bij Desmethyl Sertraline is er echter wel veel spreiding (>15%) in de recovery resultaten onderling. Dit wordt veroorzaakt door het laagste recovery punt welke een individuele afwijking had van 29,04%.

7.5.5 Voorbewerkingsmethoden

Twee type voorbewerkingsmethoden werden met elkaar vergeleken, PPT en SPE. Het uitgangspunt voor de PPT methode was de PPT methode gebruikt bij de reguliere “Amitriptyline & Nortriptyline” methode van OLVG Oost. Verder werden drie SPE methoden vergeleken; Mixed Cation Exchange, Hydrophilic Lipophilic Balance, en Hydrophilic Lipophilic Balance PRIME. De SPE kolommen werden gesponsord door Waters Corporation Nederland.

7.5.5.1 Proteïne precipitatie voorbereiding (PPT)

Doordat het injectie volume zo laag mogelijk gehouden moest worden is er veel aan gevoeligheid verloren, waardoor componenten met ‘lage signaal intensiteit’ niet goed konden geanalyseerd worden. Om de gevoeligheid voor deze componenten te verhogen werd de hoeveelheid plasma / neerslagvloeistof getest. Hierbij werd gezocht naar een optimale balans tussen het verwijderen van matrix en recovery antidepressiva in serum/plasma.

Bij de 1:1 plasma neerslagvloeistof verhouding is een reductie in recovery waargenomen met een gemiddelde afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie van -3,51%. Bij de 2:1 plasma neerslagvloeistof verhouding werd geen reductie in recovery waargenomen, waardoor de maximale gevoeligheid en optimale matrix verwijdering gevonden was. Daarom werd de 2:1 plasma neerslagvloeistof verhouding aangenomen als de PPT voorbewerkingsmethode van antidepressiva in serum met LC-MS.

7.5.5.2 Solid Phase Extraction

De regressielijnen zijn opgenomen met monsters in waterige matrix. Er werden recovery monsters geanalyseerd op drie verschillende concentratie niveaus, om een eventuele fout per concentratie gebied te corrigeren. Alle PPT recovery resultaten zijn in een optimaal scenario 100%, waardoor de afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie 0% moet zijn. Er is een blanco monster opgewerkt voor elke methode, om de kwalitatieve suppressie van de opwerkingsmethode te analyseren

7.5.5.2.1 Mixed Cation Exchange, Hydrophilic Lipophilic Balance, en Hydrophilic Lipophilic Balance PRIME

De MCX (Tabel 43), HLB (Tabel 44) en HLB PRIME (Tabel 45) beschikken alle drie over goede recovery resultaten. Alle antidepressiva hebben bij zowel de MCX, HLB en HLB PRIME een afwijking van minder dan 20% ten opzichte van de theoretische concentratie. De spreiding van de analyseresultaten was bij de MCX, HLB en HLB PRIME voor alle antidepressiva lager dan 15%.

De kwalitatieve suppressie van de MCX, HLB en HLB PRIME analyse vertoonde bij alle drie de voorbewerkingsmethoden geen signaal suppressie. De schommeling van het signaal aan het begin van de chromatogrammen wordt veroorzaakt door het wisselen van de kraan positie (gate valve) van de MS. Doordat de MCX, HLB en HLB PRIME SPE methoden geen last hebben van suppressie zou de chromatografische methode geoptimaliseerd kunnen worden. Hierbij hoeft geen rekening gehouden te worden met het ontwijken van de suppressie, in tegenstelling tot de PPT methode, waardoor kan de throughput van de werkelijke analyse verhoogt kan worden.

De opwerking van de MCX en HLB SPE voor antidepressiva serum bedraagt ongeveer 50 tot 60 minuten, mits alle oplossingen voorradig zijn en maximaal 12 monsters tegelijk. De opwerking van de HLB PRIME duurt ongeveer 70 minuten, mits alle oplossingen voorradig zijn en maximaal 12 monsters tegelijk.

7.5.5.2.2 SPE Vergelijking

Waters beschrijft in zijn brochure de HLB PRIME als een drie-staps SPE in plaats van een vijf-staps SPE (HLB en MCX). Hiermee zou volgens Waters tijd en moeite bespaart kunnen worden. Waters vermeld echter niet in de brochure dat het analyt dat op de HLB PRIME toegepast wordt een voorbereiding nodig heeft, voordat het analyt op de SPE kolommen opgebracht kan worden. HLB PRIME was daarom tegen verwachting in de langstdurende SPE van de drie.

Van de MCX, HLB en HLB PRIME functioneerde de HLB het beste. Het opwerken van de HLB en MCX duurden even lang, de HLB behaalde de hoogste recovery en de laagste spreiding in de analyse resultaten.

7.5.5.3 PPT vs. HLB SPE

De HLB SPE presteert aanzienlijk beter dan de PPT methode (zie Tabel 44 voor SPE en zie Tabel 41 voor PPT). De throughput van de PPT methode is echter hoger dan die van de SPE methode. Gemiddeld zal de antidepressiva analyse één keer per week als routine uitgevoerd gaan worden. In een run kunnen meer dan 50 monsters voorkomen. Voor de PPT methode zal een reeks van 50 monsters naar schatting 30 tot 45 minuten opwerktijd in beslag nemen. Voor de SPE methode zal een reeks van 50 monsters naar schatting meer dan drie uur in beslag nemen. Dit komt doordat het OLVG een SPE bak heeft welke op een water vacuüm werkt. Het water vacuüm is niet in staat onder de 0,8 bar te komen, waardoor de SPE monsters niet snel kunnen doorlopen. Daarnaast beschikt de SPE bak maar over 12 SPE aansluitingen, waardoor er maar 12 monsters per keer opgewerkt/voorbewerkt kunnen worden.

Door bezuinigingen in het budget van het OLVG Oost is het niet mogelijk om apparatuur aan te schaffen welke de throughput van de SPE kunnen verhogen. Om de throughput te verhogen zou een nieuw vacuüm systeem aangeschaft moeten worden. Daarnaast zou een multi-channel pipet aangeschaft moeten worden, zodat de activeer, equilibreer, en was stappen per meervoud uitgevoerd kunnen worden. De kosten voor deze apparatuur zouden kunnen oplopen tot 20.000 euro.

Waters heeft SPE kolommen, welke geïntegreerd zijn in een plastic container. De bakken zijn voorzien van 48 of 96 'well plates' (SPE kolommen). Met de SPE bakken kan de throughput verhoogd worden. De SPE bakken kosten +/- 300 euro per stuk, waardoor analyses opgespaard moeten worden, om zo de kosten per monsters laag te kunnen houden. Dit is echter geen goede optie omdat de antidepressiva ook als 'cito' (spoed) (toxische) bepaling aangevraagd kan worden door de SEH. In zo'n geval moet de antidepressiva direct geanalyseerd worden, waardoor de SPE bak niet volledig of amper gebruikt kan worden, waardoor de kosten verder oplopen. Daarnaast was er te weinig tijd om de methode-ontwikkeling af te ronden als er gewacht moest worden op eventueel nieuw SPE materiaal

Om de bovenstaande redenen is er door het OLVG Oost besloten antidepressiva in plasma monsters op te werken tot serum met behulp een PPT methode.

7.6 Houdbaarheidsonderzoek

Een houdbaarheidsonderzoek werd uitgevoerd om te controleren of voorgaand bereide oplossingen (en resultaten) gebruikt konden worden voor het vast leggen van validatie parameters en overige kwantitatieve toepassingen.

7.6.1 Korte termijn stabiliteit van antidepressiva oplossingen in serum bij 20 °C

De korte termijn stabiliteit van antidepressiva in serum bij 20°C werd bepaald door op $t = 0, 1, 4, 8, 12, 24$ en 48 uur vijfpunts-regressie lijnen op te nemen van één regressiereeks welke was opgewerkt vlak voor $T=0$. De slope van de regressielijnen wordt de gemonitord, waarbij de verkregen slope's vergeleken werden met de slope van $T=0$. Er werd gekozen om de slope van de antidepressiva te monitoren op tijdsintervallen in plaats van het monitoren van QC's. Op deze wijze worden eventuele fluctuaties in gevoeligheid van de MS beter gecorrigeerd. Als de antidepressiva niet stabiel zouden zijn, zou er een afname in slope waarneembaar zijn ten opzichte van $T=0$.

De korte termijnstabiliteit in serum bij 20 °C vertoont voor alle antidepressiva geen afname in slope ten opzichte van $T=0$ (zie Tabel 46). De regressiemodellen voor Desmethyl Sertraline waren slecht door lage signaal responsen in het lage regressie gebied, waardoor de resultaten van Desmethyl Sertraline niet betrouwbaar zijn, hierdoor kan er niet geconcludeerd worden of Desmethyl Sertraline stabiel is.

7.6.2 Lange termijn stabiliteit van antidepressiva oplossingen in methanol bij 8 °C

De lange termijn stabiliteit van antidepressiva in methanol bij 8°C werd bepaald door antidepressiva oplossingen op te werken op $t = 0, 1$ en 3 maanden volgens de werkwijze beschreven bij 5.3.5.6.3. De lange termijn stabiliteit werd bepaald door een regressielijn op te nemen in waterige matrix, waarna onafhankelijke recovery monsters opgewerkt werden. De recovery monsters werden op drie concentratie niveaus geanalyseerd om een eventuele fout per concentratie gebied te corrigeren.

De lange termijn stabiliteit in methanol bij 8°C vertoont geen afname in concentratie (zie Tabel 46). Er zijn grote spreidingen in de analyse resultaten tussen de maanden onderling. De analyse had achteraf beter uitgevoerd kunnen worden door de slope te monitoren en te vergelijken met de antidepressiva oplossingen. Een groot aantal van de antidepressiva is commercieel verkrijgbaar als oplossing in methanol. De houdbaarheid van dergelijke producten is vaak meer dan vijf jaar. Gedurende de methode ontwikkeling werd dan ook aangenomen dat de antidepressiva oplossingen stabiel waren in methanol bij 8°C.

7.7 Prestatiekenmerken van analyse methode 1

Om te controleren of de ontwikkelde analyse methode voldoet aan de EMEA richtlijnen ^[17] worden prestatiekenmerken van de analyse methode vast gelegd. Hierbij wordt gekeken naar de kwantitatieve suppressie (matrix effect), de juistheid en precisie, de lineariteit, de carry-over, de recovery, de stabiliteit (reeds uitgevoerd) en de specificiteit.

7.7.1 Kwantitatieve & kwalitatieve suppressie op analyse methode 1

7.7.1.1 Matrix effecten

De kwantitatieve suppressie bepaling wordt uitgevoerd om te controleren of er geen componenten zijn welke 'suppressie' of 'enhancement' ondervinden als gevolg van de matrix wat tegelijkertijd met het analyt geïoniseerd wordt door de ionisatiebron.

De kwantitatieve suppressie wordt uitgevoerd door antidepressiva te pipetteren in reageerbuizen welke vervolgens ingedampt worden. Bij de reageerbuizen met ingedampt antidepressiva wordt neergeslagen plasma (serum) gepipetteerd. Tevens wordt een academische standaard opgewerkt, waarvoor een reageerbuis met ingedampt antidepressiva voorzien wordt van neerslagvloeistof en water. De monsters met serum worden gemeten tegen de academische standaard, waardoor het effect van de matrix op de antidepressiva inzichtelijk wordt. Door het serum toe te voegen aan de buizen met ingedampt antidepressiva wordt het effect van het neerslag proces van het plasma buiten beschouwing gelaten, waardoor enkel de matrix van het serum nog effect heeft op de suppressie of enhancement.

De kwantitatieve suppressie bepaling van analyse methode 1 vertoonde een aanzienlijke suppressie voor Desmethyl Venlafaxine en Desmethyl Mirtazapine. Desmethyl Venlafaxine en Desmethyl Mirtazapine ondervinden in het bijzonder veel suppressie bij lipemische plasma. Lipemische plasma is plasma wat veel vetten bevat. Vetten bestaan onder andere uit triglyceriden en ortho-phosphaten, welke de ionisatie van het antidepressiva kunnen overnemen en daarbij suppressie veroorzaken. Tevens ondervond Desmethyl Mirtazapine enhancement (zie Tabel 50). Dosulepine had last van suppressie bij het billiverdin ophoop plasma, waardoor de CV voor de Dosulepine populatie groter was dan 15%.

7.7.1.2 **Verschuiving van matrix effecten**

De kolom (D) was tijdens de eerste kwalitatieve suppressie bepaling nog relatief nieuw, met minder dan 50 injecties uitgevoerd op de kolom. Gedurende de methode ontwikkeling zijn er meer dan 300 injecties uitgevoerd op de kolom, waardoor de kolom mogelijk slijtage heeft ondervonden. Door de slijtage kan de elutie iets verschuiven, als gevolg van kanaalvorming, waardoor convectieve dispersie (eddy-difusie) toeneemt. Door de kanaalvorming kan het eluens de stationaire fase passeren zonder retentie te ondervinden, hierdoor kan de elutie verschuiven.

De kwalitatieve suppressie bepaling toonde aan dat de suppressie vlak buiten de elutie van antidepressiva van analyse methode 1 viel (Figuur 25). De suppressie van Desmethyl Venlafaxine en Desmethyl Mirtazapine en de enhancement van Mirtazapine was daarom opmerkelijk. De kwalitatieve suppressie viel wel dicht op de elutie van Desmethyl Venlafaxine, om deze reden werd de kwalitatieve suppressie bepaling opnieuw uitgevoerd.

De kwalitatieve suppressie na 300 injecties op kolom D toonde aan dat de suppressie en Desmethyl Venlafaxine en Desmethyl Mirtazapine co-elueerden. De suppressie en elutie van Desmethyl Venlafaxine en Desmethyl Mirtazapine zijn door slijtage van de kolom op elkaar in gaan lopen. De slijtage kan mogelijk versneld zijn door het gebruik van eluens met 0,25% mierenzuur, welke onder de minimale pH waarden van kolom D zat.

Een gemiddelde kolom gaat zo'n 500 tot 1000 injecties mee voor bio-analytische LC-MS methoden. Doordat niet exact bekend is na hoeveel injecties de suppressie en elutie van antidepressiva zijn gaan overlappen en de kolom maar zo'n 300 injecties gebruikt was, moest een nieuwe chromatografische methode ontwikkeld worden voor het bepalen van antidepressiva met LC-MS, welke robuuster was op het gebied van chromatografie.

De methode werd afgekeurd wegens het matrix effect op Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine, Mirtazapine en Dosulepine. De chromatografie moet opnieuw ontwikkeld worden, waarbij de suppressie beter ontweken moet worden. Overige prestatie kenmerken worden verder onderzocht wanneer een nieuwe en goed functionerende chromatografische methode is opgezet.

7.8 Chromagrafie methode 2

7.8.1 Gradiënt systeem op kolom B

Er werd een chromatografische methode opgezet op de 'ZORBAX Eclipse C18 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron' (kolom B). Een gradiënt systeem werd opgezet (zie Figuur 41) welke startte met een flow van 0,25 ml/min en een eluens verhouding van 20:80 acetonitril : formiaat-buffer, waar de methode 0,2 minuten op verbleef. Vervolgens ging de eluens verhouding in 0,3 minuten naar een eluens verhouding van 60:40 acetonitril : formiaat-buffer, waar de methode 1,2 minuten op verbleef. Vervolgens keerde de eluens verhouding in 0,3 minuten terug naar de 20:80 acetonitril : formiaat-buffer verhouding, waar de analyse 4 minuten op verbleef.

7.8.2 Suppressie en elutie profiel van chromatografie methode 2

De elutie van het eerste antidepressiva (Desmethyl Venlafaxine) vond plaats tussen de 1,55 en 1,70 minuten na injectie. De suppressie van chromatografie methode 2 vond plaats tussen de 0,5 en 1,0 minuten na injectie. Tevens was er een milde dip waarneembaar tussen de 3,2 en 3,6 minuten na injectie. De elutie ontweek hierbij volledig de initiële suppressie (0,5 tot 1,0 minuut), waarbij genoeg ruimte is voor fluctuaties in elutie tijd.

7.8.3 Piek vorm van chromatografie methode 2

7.8.3.1 Slechte piek vorm door gradiënt systeem

De piek vorm van chromatografie methode 2 was slecht (zie Figuur 42). De matige piek vorm is te wijten aan het gradiënt systeem. Een isocratische 55:45 acetonitril : formiaat-buffer methode werd opgezet voor kolom B, waarbij de slechte piek vorm (grotendeels) mee was verholpen.

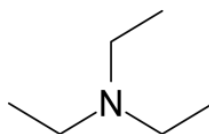
De slechte piek vorm wordt mogelijk veroorzaakt door de mix kamer van het UPLC systeem. De gebruikte kolom (kolom B) heeft een deeltjes grootte van 3,5 μm welke op het grensgebied zit van HPLC en UPLC. De kolom heeft volgens de fabrikant een optimale elutie snelheid van 0,25 ml/min. en een maximale snelheid van 0,3 ml/min. De mix kamer van het chromatografie systeem is gericht op UPLC doeleinden. Bij UPLC worden lagere debieten toegepast, waardoor mix kamers kleiner zijn om zo het dode volume zo klein mogelijk te houden. Mogelijk is de mix kamer van de UPLC niet in staat een debiet van 0,25 ml/min. met steile gradiënt volledig homogeen te mixen. Hierdoor fluctueert de eluens verhouding. De injectie van de UPLC vindt direct in de eluens stroom plaats, welke zich na de mix kamer bevindt. Het geïnjecteerde antidepressiva gaat zich na de injectie verdelen in de niet homogene eluens stroom welke vervolgens als een brede band op de kolom gebracht wordt. Het ongelijk opbrengen van analyt op een kolom kan voor piekverbreding, afname van piek symmetrie, scheiden van pieken en piek tailing zorgen.

7.8.3.2 Tailing

7.8.3.2.1 Triethylamine

Op de isocratische 55:45 acetonitril : formiaat-buffer methode vertoonde de antidepressiva veel tailing (zie Figuur 43). De tailing kan veroorzaakt worden door het basismateriaal van de kolom. De basis bestaat uit silanol groepen waar octadecyl groepen aan gebonden zijn. Wanneer er vrije (ongedekte) silanol groepen zijn binnen de kolom, kunnen er polaire en ionische interacties ontstaan, welke tailing veroorzaken. Doordat de antidepressiva positief geladen zijn bij het stikstof atoom, bevatten zij een ionische en relatief polair gebied, welke met de vrije silanol groepen interactie kunnen hebben. Triethylamine beschikt over dezelfde eigenschappen als de antidepressiva wat betreft de ionische en polaire interactie met de silanol groepen. Wanneer triethylamine toegevoegd wordt aan het eluens neemt deze een positieve lading aan door de buffer. Het positief geladen triethylamine kan vervolgens de vrije silanol groepen afdekken, waardoor de tailing van antidepressiva voorkomen kan worden.

Het toevoegen van 20 mmol TEA verhoogt de pH van het eluens, waardoor de antidepressiva niet meer goed geïoniseerd werden door de buffers. Het toevoegen van TEA aan het eluens resulteerde in een drastische signaal verlaging, zelfs bij hogere buffer concentraties. Bijna geen van de antidepressiva was meer waarneembaar (zie Figuur 44). De tailing op kolom B was hiermee niet verholpen.



Figuur 51: structuurformule triethylamine

7.8.3.2.2 0,25 % Mierenzuur en 25 mmol Ammoniumformiaat buffer

Door het gehalte van ammoniumformiaat en mierenzuur te verhogen, verhoogd de buffersterkte. Dit resulteert in een meer polaire buffer. Doordat de buffer oplossing polairder is, is er een groter verschil in elektronegativiteit tussen het acetonitril en de buffer in de mobiele fase. Hierdoor is de balans van het antidepressiva tussen de stationaire fase en mobiele fase verkleint, waardoor de antidepressiva zich sterker verdeeld in het acetonitril. Dit resulteert in scherper piek vorm.

Het verhogen van de buffersterkte had geen effect op de piek vorm. De tailing op kolom B was hiermee niet verholpen.

7.8.3.2.3 Vervangen van kolom

De tailing op kolom B kan veroorzaakt worden door slijtage van de kolom, waardoor vrije silanol groepen bloot komen te liggen en de eddy-difusie van de kolom toeneemt, als gevolg van kanaal vorming.

Het vervangen van de kolom door een nieuwe 'ZORBAX Eclipse C18 Narrow Bore RR 2.1 x 100mm 3,5-micron' had geen effect op de tailing van de antidepressiva. De nieuwe kolom vertoonde dezelfde tailing. De oorzaak van de tailing is niet verder onderzocht, en er diende een nieuwe chromatografische methode opgezet te worden op een andere kolom.

7.9 Chromatografie methode 3

7.9.1 Gradiënt systeem op kolom D

Er werd een chromatografische methode opgezet op de 'ZORBAX Eclipse C8 Analytical 4.6 x 150mm 5-micron' (kolom D). Een gradiënt systeem werd opgezet (zie Figuur 49) welke startte met een flow van 0,5 ml/min. en een eluens verhouding van 35:65 acetonitril : formiaat-buffer, waar de methode 0,1 minuten op verbleef. Vervolgens ging de eluens verhouding in 2,4 minuten naar een eluens verhouding van 50:50 acetonitril : formiaat-buffer, waar de methode 0,5 minuten op verbleef. Vervolgens keerde de eluens verhouding in 2,4 minuten terug naar de 35:65 acetonitril : formiaat-buffer verhouding, waar de analyse tot 10 minuten op verbleef om de eluens verhouding te kunnen laten stabiliseren voor de volgende analyse.

Door met een lager organisch gehalte te beginnen (35% acetonitril) vindt de piek scheiding van Desmethyl Venlafaxine, Desmethyl Mirtazapine en Mirtazapine niet plaats en wordt de suppressie beter ontweken. Vervolgens wordt de analyse verhoogt in organisch gehalte (50%) om te elutie van de overige antidepressiva te versnellen. De gradiënt keert weer terug naar de start verhouding van het eluens, om het systeem te laten stabiliseren. (zie 12.15 voor samenvatting instellingen analyse methode 3)

7.9.2 Suppressie en elutie profiel van chromatografie methode 3

De elutie van het eerste antidepressiva (Desmethyl Venlafaxine) vond plaats tussen de 3,10 en 3,25 minuten na injectie. De suppressie van chromatografie methode 3 vond plaats tussen de 2,2 en 2,6 minuten na injectie. Tevens was er een milde dip waarneembaar tussen de 2,8 en 3,2 minuten na injectie. De elutie ontweek hierbij volledig de initiële suppressie, waarbij genoeg ruimte is voor fluctuaties in elutie tijd. De tweede suppressie dip vond echter tegelijk plaats met de elutie van Desmethyl Venlafaxine, waardoor mogelijk de suppressie niet volledig ontweken is.

7.9.3 Druk verloop & analyse tijd

Aan het druk verloop is te zien dat de druk afneemt naarmate de verhouding acetonitril in het eluens toeneemt. Water zorgt voor een hogere tegendruk dan acetonitril door de waterstofbrug vorming van water. De tegendruk wordt veroorzaakt door het pakkingsmateriaal van de kolom. Aan het druk profiel van het gradiënt systeem is te zien dat de druk achter loopt op de gradiënt (zie Figuur 49). De vertraging bedraagt ongeveer 3 minuten. De vertraging wordt veroorzaakt door het grote dode volume van de kolom. De UPLC kolom (kolom C) vertoonde deze vertraging in het druk verloop niet, doordat de UPLC kolom een klein dode volume heeft. Bovendien is een plotse daling in druk te zien (zie Figuur 49). Deze daling in druk wordt veroorzaakt door de injectie en vindt plaats op ongeveer 3 minuten na injectie.

Na 10 minuten is de druk weer stabiel op nominaal niveau. Om deze reden is de analysetijd per run ingesteld op 10 minuten, zodat de druk (en daarbij de eluens verhouding in de kolom) kan herstellen, alvorens een nieuw monster te injecteren, ondanks dat de laatste component (Clomipramine) na 7,7 minuten elueert.

7.9.4 **Recovery van analyse methode 3**

Om te controleren of analyse methode 3 geschikt was om te kwantificeren werd de recovery bepaald met een PPT methode, ten opzichte van een regressiereeks opgewerkt met dezelfde PPT methode

Alle recovery resultaten zijn in een optimaal scenario 100%, waardoor de afwijking ten opzichte van de theoretische concentratie 0% moet zijn. Alle antidepressiva zitten binnen een gemiddelde afwijking van 20% ten opzichte van de theoretische concentratie (zie Tabel 49). De methode vertoont geen afwijkingen en is geschikt om te kwantificeren

7.10 **Prestatie kenmerken analyse methode 3**

Om te controleren of de ontwikkelde analyse methode (methode 3) voldoet aan de EMEA richtlijnen ^[17] werden de prestatiekenmerken van de analyse methode vast gelegd. Hierbij werd gekeken naar de kwantitatieve suppressie (matrix effect), de accuraatheid en precisie, de lineariteit, de carry-over, de recovery, en de specificiteit. De stabiliteit is met analyse methode 1 bepaald. Gezien de stabiliteit (lange stabiliteit in methanol bij 8 °C en korte termijn stabiliteit in serum bij 20 °C) niet systeemafhankelijk zijn, werden deze parameters niet opnieuw bepaald.

7.10.1 **Kwantitatieve suppressie bepaling**

Het matrix effect wordt op hoog en laag concentratie niveau, met zes verschillende soorten plasma in zes-voud bepaald (voor gedetailleerde uitleg van matrix effect zie 4.6.4.3). De bepaling van de “laag niveau” matrix effect dient te worden uitgevoerd op maximaal drie keer de concentratie van de LLOQ analyt oplossing (werkelijke concentratie van het analyt gedurende de analyse) ^[17]. De bepaling van de “hoog niveau” matrix effect dient te worden uitgevoerd dicht tegen de concentratie van de ULOQ analyt oplossing ^[17].

De LLOQ bedraagt 5% ten opzichte van de ULOQ. Drie keer de LLOQ bedraagt 15%. De laag niveau matrix effect bepaling is uitgevoerd op 10% ten opzichte van de ULOQ. De hoog niveau matrix effect bepaling is uitgevoerd op 75% ten opzichte van de ULOQ. Het matrix effect werd bepaald op 6 uiteenlopende type plasma's: normaal, icterisch, billiverdin ophoop, lipemisch, hemolitisch en donker plasma (zie Figuur 39).

7.10.1.1 **Laag & laag niveau matrix effect bepaling**

Alle antidepressiva hadden een matrixeffect van minder dan 20% ten opzichte van de academische standaard op zowel laag als hoog niveau, met uitzondering van Desmethyl Venlafaxine. Bijna alle antidepressiva hadden een CV (correlation variance (relatieve standaard afwijking)) minder dan de 15% eis ^[17], met uitzondering van Desmethyl Venlafaxine, welke een CV had van 31% voor de lage concentratie matrix effect bepaling en 20% voor de hoge concentratie matrix effect bepaling (zie Tabel 50 en Tabel 51).

7.10.1.2 Citalopram en Desmethyl Citalopram op laag niveau

De analyse resultaten van Citalopram en Desmethyl Citalopram zijn voor het hemolytische monster verwijderd. De hemolytische Citalopram en Desmethyl Citalopram monsters vertoonden beide ongeveer 40% signaal enhancement. Omdat geen van de overige resultaten van Citalopram of Desmethyl Citalopram een afwijking vertoonden was dit resultaat merkwaardig.

De plasma soorten waren verkregen door plasma typen van verschillende patiënten samen te voegen (poolen). Zo werden drie hemolytische monsters samengevoegd, om één hemolytisch plasma monster te creëren. Tijdens het samenvoegen van het plasma werd gekeken naar de medicinale achtergrond van de patiënt, waarbij patiënten die antidepressiva slikten gemeden werden.

De blanco analyse van de samengevoegde plasma typen vertoonde dat het hemolytische monster zowel Citalopram als Desmethyl Citalopram bevatte. Een van de drie patiënten met hemolytisch plasma had Citalopram geslikt, ondanks dat dit niet vermeld stond in de patiënt historie. Hierdoor vielen de Citalopram en Desmethyl Citalopram hoog uit, wat de impressie van signaal enhancement creëerden. Om deze reden zijn de resultaten van Citalopram en Desmethyl Citalopram verwijderd voor de matrix effect bepaling op laag niveau.

Omdat de hoog niveau matrix effect bepaling geen enhancement vertoonde voor Citalopram en Desmethyl Citalopram voor het hemolytische monster, werd er vanuit gegaan dat de resultaten op laag niveau geen afwijking zou geven. Voor een validatie zou het matrix effect op laag niveau voor het hemolytische monster opnieuw bepaald moeten worden voor Citalopram en Desmethyl Citalopram.

7.10.1.3 Desmethyl Venlafaxine

Desmethyl Venlafaxine voldeed niet aan de eisen van de EMEA op zowel laag als hoog niveau matrix effect bepaling. De enige eis die de EMEA stelt is dat de CV van de populatie niet groter mag zijn dan 15%. Desmethyl Venlafaxine ondervond op de laag niveau matrix effect bepaling suppressie, waarbij de recovery voor het lipemische monster 37% bevond ten opzichte van het academische monster. Op de hoog niveau matrix effect bepaling ondervond Desmethyl Venlafaxine zowel suppressie als enhancement.

De elutie van Desmethyl Venlafaxine bevond zich in de tweede suppressie dip (zie 7.10.1.1 en Figuur 48). De elutie van Desmethyl Venlafaxine viel niet te ontwijken, doordat de suppressie mee bewoog met de elutie. De enige manier om de suppressie te ontwijken is het effectief verwijderen van de suppressie door een SPE voorbewerkingsmethode toe te passen. De SPE voorbewerkingsmethode is echter geen optie.

Venlafaxine (en daarmee ook Desmethyl Venlafaxine) wordt bepaald door OLVG West. Om deze reden was er besloten om Venlafaxine en Desmethyl Venlafaxine uit de analyse methode te verwijderen en de bepalingen uit te besteden aan OLVG West.

7.10.2 Lineariteit

Om de prestatie kenmerken van de regressielijnen vast te stellen dient een regressiereeks opgenomen te worden van minimaal zes regressie punten en een blanco. De blanco mag niet in de regressie meegenomen worden als regressiepunt. Alle regressiepunten mogen niet meer dan 15% van de regressielijn afwijken, met uitzondering van de LLOQ welke niet meer dan 20% mag afwijken. Minimaal 75% van alle regressiepunten moet aan deze criteria voldoen [17].

Er werd een zeven-punts regressielijn opgenomen, zodat er één punt speling was ingeval van een afwijkend resultaat. Bijna geen van de regressie punten had een overschrijding van de EMEA eis van 15% afwijking ten opzichte van de regressielijn en 20% voor de LLOQ (zie Tabel 52), met uitzondering van punt 4 van Desmethyl Sertraline en Desmethyl Fluoxetine, welke verwijderd werden uit de regressiereeks. De regressiereeks werd opnieuw berekend. De lineariteit voldoet aan de gestelde eisen van de EMEA [17].

Bij geen van de antidepressiva overschrijdt het betrouwbaarheidsinterval van de as-afsnede de as-afsnede. Dit betekent dat elke antidepressiva een as-afsnede heeft. De as-afsnede zijn echter niet groot en zullen geen grote invloed hebben op de analyse resultaten doordat er niet lager dan de LLOQ gerapporteerd wordt. De as-afsnede ten opzichte van de LLOQ is in het ergste geval (Desmethyl Citalopram) -3,54% (zie Tabel 55).

7.10.3 Carry-over

De Carry-over wordt bepaald om te controleren of er geen overdracht van signaal plaats vindt van een analyt op een na komend analyt.

De Carry-over werd bepaald door direct na het meten van de ULOQ in de regressiereeks van de lineariteit een blanco monster te meten. Geen van de antidepressiva overschrijdt de EMEA eis van >20% area Carry-over ten opzichte van de LLOQ. Tevens overschrijdt geen van de interne standaarden de EMEA eis van >5% area Carry-over ten opzichte van de interne standaarden [17]. De Carry-over voldoet aan de gestelde eisen van de EMEA [17].

7.10.4 Specificiteit

De specificiteit wordt bepaald om te controleren of er geen comedicaatie of overige medicatie signaal geeft voor een van de antidepressiva.

De specificiteit werd bepaald door 1000 mg/l paracetamol, acetylsalicylzuur, ibuprofen, morfine, clozapine, cafeïne en metoprolol oplossingen te analyseren met analyse methode 3. Geen van de antidepressiva gaf een signaal voor een van de geanalyseerde oplossingen (zie Figuur 50) ten opzichten van blanco analyse. De signaal verhoging tussen de 6,0 en 6,5 minuten wordt veroorzaakt doordat er een tental antidepressiva in dit gebied elueert, waardoor de detector meer ruis opvangt. De specificiteit voldoet hiermee aan de eisen van de EMEA.

De EMEA richtlijnen zijn algemeen geschreven voor alle analyse technieken. Triple quadrupole MS heeft een groot scheidend vermogen van ongewenste materie door twee stadia aan massa filtratie, hierdoor is de kans op signaal van een ongewenst analyt zeer klein. Om deze reden en door tijdsgebrek is de specificiteit uitgevoerd op enkel de bovengenoemde medicijnen/co-medicatie.

7.10.5 Recovery

De recovery is uitgevoerd (met analyse methode 1, zie 6.6.3.4.2) door een regressie reeks op te nemen in een waterige matrix, en QC monsters op te werken met een PPT methode. Hierdoor is inzichtelijk hoe effectief de PPT methode is (recovery). De recovery is niet bepaald volgens de EMEA richtlijnen, doordat de recovery bepaling niet goed vermeld is in het interne validatie protocol van OLVG Oost.

De enige eis die de EMEA stelt aan de recovery analyse is dat de CV bij 6 uit een lopende typen plasma niet groter mag zijn dan 15%, en 20 % voor de LLOQ. De recovery analyse is vergelijkbaar met de matrix effect bepaling. Bij de matrix effect bepaling zijn geen CV's waargenomen groter dan de EMEA eis, met uitzondering van Desmethyl Venlafaxine. Om de bovenstaande reden wordt er van uit dat de CV's tijdens de recovery analyse ook niet groter zullen zijn dan de EMEA eis. De recovery moet echter nog wel volgens de EMEA richtlijnen uitgevoerd worden.

7.10.6 Precisie en accuraatheid

De precisie en accuraatheid wordt bepaald aan de hand van dezelfde reeks monsters en aan dezelfde analyse resultaten. De precisie en accuraatheid werden bepaald op vier concentratie gebieden: op 5% (LLOQ), 20%, 50% en 100% ten opzichte van ULOQ. De bepalingen werden in zes-voud uitgevoerd, op drie verschillende dagen, door één analist (eis is minimaal twee verschillende analisten ^[17]).

7.10.6.1 Precisie

Met de precisie wordt gekeken hoe herhaalbaar de analyse methode is. Hierbij wordt gekeken hoe groot de spreiding in de resultaten van de analyse methode is. Dit wordt bereikt door een monster herhaaldelijk op te werken en te analyseren. De onderlinge spreiding in de concentratie is de mate van de precisie van de analyse methode. De CV in de precisie resultaten mag volgens de EMEA richtlijnen niet groter zijn dan 15%, en niet groter dan 20% voor de LLOQ ^[17].

7.10.6.2 Accuraatheid

Met de accuraatheid wordt de mate van overeenkomst tussen de theoretische concentratie van de antidepressiva en praktisch concentratie van de antidepressiva vergeleken. De Accuraatheid wordt bepaald door een monster herhaaldelijk op te werken en te analyseren. De afwijking van de praktische concentratie ten opzichte van de theoretische concentratie mag volgens de EMEA richtlijnen niet groter zijn dan 15%, en niet groter dan 20% voor de LLOQ ^[17].

7.10.6.3 Precisie en accuraatheid op dag 1

De precisie en accuraatheid op dag 1 werd op 19-04-2016 uitgevoerd door Martijn Böhm. Zowel de precisie als de accuraatheid voldeden voor bijna alle antidepressiva aan de gestelde eisen van de EMEA, echter met uitzondering van Desmethyl Fluoxetine (zie Tabel 57) voor zowel de precisie als de accuraatheid.

7.10.6.3.1 Desmethyl Fluoxetine

Door de matige resultaten in voorgaande analyse resultaten van Desmethyl Fluoxetine werd geaccepteerd dat deze niet voldoet aan de eisen van de EMEA. Desmethyl Fluoxetine wordt om deze reden verwijderd uit de analyse methode. Doordat Desmethyl Fluoxetine uit de analyse methode verwijderd wordt, wordt Fluoxetine ook verwijderd. Zowel Fluoxetine als Desmethyl Fluoxetine moeten beide in één analyse methode voldoen aan de EMEA eisen.

7.10.6.4 Precisie en accuraatheid op dag 2

De precisie en accuraatheid op dag 2 werd op 21-04-2016 uitgevoerd door Martijn Böhm. Bijna alle antidepressiva voldeden aan de gestelde eisen van de EMEA voor de precisie bepaling, echter met uitzondering van Desmethyl Fluoxetine en Desmethyl Sertraline (zie Tabel 58). Voor de accuraatheid bepaling voldeden 15 van de 23 antidepressiva niet aan de eisen van de EMEA. Alle analyse resultaten waren systematisch te hoog. Hierdoor werd er vanuit gegaan dat er iets mis was gegaan tijdens de uitvoering van deze parameter, doordat de resultaten van dag 1 wel correct waren. De analyse moest opnieuw worden uitgevoerd.

7.10.6.5 **Desmethyl Sertraline**

Door de matige resultaten in voorgaande analyse resultaten van Desmethyl Sertraline werd geaccepteerd dat deze niet voldoet aan de eisen van de EMEA. Desmethyl Sertraline wordt om deze reden verwijderd uit de analyse methode. Doordat Desmethyl Sertraline uit de analyse methode verwijderd wordt dient Sertraline ook uit de methode verwijderd te worden. Beide componenten moeten in één analyse methode voldoen aan de EMEA eisen.

7.10.6.6 **Precisie en accuraatheid op dag 3**

De precisie en accuraatheid op dag 3 werd op 28-04-2016 uitgevoerd door Martijn Böhm. De precisie en accuraatheid werd herhaald wegens onverklaarbare resultaten op dag 2 (zie Tabel 58 en Tabel 59). Bijna alle antidepressiva voldeden aan de gestelde eisen van de EMEA voor wat betreft de precisie bepaling, Desmethyl Sertraline voldeed echter niet aan eisen (zie Tabel 59). Voor de accuraatheid bepaling voldeden 9 van de 23 antidepressiva niet aan de eisen van de EMEA. Alle analyse resultaten waren systematisch laag.

7.10.6.6.1 **Problematiek rondom de accuraatheid bepaling**

7.10.6.6.1.1 *Omdraaien van concentraties van regressie en QC oplossingen*

Doordat de resultaten van dag 2 systematisch hoog waren, en de resultaten van dag 3 systematisch laag, kan de afwijking veroorzaakt worden doordat de concentraties van de regressie oplossing en de concentraties van de QC oplossingen mogelijk omgedraaid waren. De concentraties van de regressielijn en van de QC's waren opnieuw berekend. Het bleek dat de accuraatheid resultaten verder van de theoretische concentratie gingen afwijken. Bovendien was er nauwkeurig en secuur gewerkt. Deze leek hypothese niet logisch is.

7.10.6.6.1.2 *Positie van de ionisatie bron*

Tussen dag 1 en dag 2 werd er preventief onderhoud gepleegd aan de MS. Bij het preventieve onderhoud wordt de ionisatiebron gereinigd, waarvoor de ionisatiebron verwijderd moet worden van de MS. Een tiental dagen na het reinigen van de ionisatiebron (na dag 2 en dag 3 voor precisie en accuraatheid bepaling) werd er geconstateerd dat de ionisatiebron niet recht op het capillaire gericht stond. Hierdoor wordt het geladen analyt in een lichte afwijkende richting geblazen, waardoor mogelijk analyt niet goed de detector kon bereiken.

Wanneer het analyt de detector niet goed kan bereiken resulteert dit in een vermindering van signaal, waardoor de slope van de regressiepunten af zou moeten nemen. Wanneer de slope van dag 2 en 3 vergeleken wordt met de slope van dag 1 is er geen sterke afname waarneembaar (zie Tabel 60). De slope van dag 3 is zelfs gemiddeld 11,3% steiler.

Door naderende deadlines was het niet meer mogelijk de problematiek rondom de accuraatheid te achterhalen. De precisie en accuraatheid is hiermee niet succesvol afgerond, waardoor de methode niet in gebruik genomen kan worden. De precisie en accuraatheid moet eerst twee maal opnieuw succesvol bepaald worden.

8 Conclusie

De “Multi-component analyse methode voor het bepalen van antidepressiva in serum met LC-MS” is niet succesvol afgerond.

De analyse methode kan echter wel in gebruik genomen worden wanneer de accuraatheid twee keer succesvol herhaald wordt. Tevens moet de recovery analyse volgens de EMEA richtlijnen uitgevoerd worden en aan de richtlijnen voldoen.

Wanneer de accuraatheid en recovery bepaling aan de EMEA eisen voldoen, is de “Multi-component analyse methode voor het bepalen van antidepressiva in serum met LC-MS” geschikt om: Amitriptyline en Nortriptyline, Citalopram en Desmethyl Citalopram, Clomipramine en Desmethyl Clomipramine, Dosulepine en Desmethyl Dosulepine, Duloxetine, Fluvoxamine, Imipramine en Desipramine, Maprotiline en Desmethyl Maprotiline, Mirtazapine en Desmethyl Mirtazapine en Paroxetine kwalitatief en kwantitatief te bepalen.

Trazodon, Doxepine, Venlafaxine en Desmethyl Venlafaxine, Fluoxetine en Desmethyl Fluoxetine, Sertraline en Desmethyl Sertraline konden door omstandigheden niet opgenomen worden in de multi-component analyse methode

9 Aanbeveling

De accurateheid en de recovery moeten opnieuw bepaald worden volgens de laatste EMEA richtlijnen om de “Multi-component analyse methode voor het bepalen van antidepressiva in serum met LC-MS” in gebruik te kunnen nemen.

Desmethyl Venlafaxine voldoet niet op het gebied van matrix effecten en Desmethyl Fluoxetine en Desmethyl Sertraline voldoen niet op het gebied van de accurateheid volgens de EMEA richtlijnen ^[17]. Om deze reden moet er voor Venlafaxine, Desmethyl Venlafaxine, Sertraline, Desmethyl Sertraline, Fluoxetine en Desmethyl Fluoxetine een nieuwe analyse methode opgezet worden.

10 Na woord

Graag wil ik Milly Attema, Liesbeth de Wolf, Peter Zweipfenning, Dr. Eric Franssen en Jeroen den Burger bedanken voor het mogelijk maken van mijn afstudeerstage en afstudeerproject.

Daarnaast wil ik Martijn Brancart bedanken voor zijn begeleiding gedurende mijn afstudeerstage. Tevens wil ik Jolanda Dijk, Van Kuilenberg bedanken voor haar hulp tijdens het schrijven van mijn scriptie. Ook wil ik Jeroen Den Burger en Ralph Brandjes bedanken voor de steun en de kennis die zij gedeeld hebbentijdens mijn afstudeerstage.

11 Referenties

- [1] Organisation for Economic Cooperation and Development (2012) Health at a glance : Europe 2012. Paris: OECD Publishing.
- [2] Het Geneesmiddelen en Hulpmiddelen Informatie project data bank, Zorg instituut Nederland: <https://www.gipdatabank.nl/databank.asp>: Geraadpleegd op: 24-09-2015
- [3] Bertolote JM, Fleischmann A, de Leo D, Wasserman D "Suicide and mental disorders: do we know enough?" In Br J Psychiatry 2003
- [4] Het Geneesmiddelen en Hulpmiddelen Informatie project data bank, Zorg instituut Nederland: https://www.gipdatabank.nl/databank.asp?tabel=85_dep&geg=vs&item=bijlage&label=00-totaal: Geraadpleegd op: 24-09-2015
- [5] M.J. Müller et.al. "Therapeutic Drug Monitoring of Tricyclic Antidepressants: How Does it Work under Clinical Conditions?" in Pharmacopsychiatry 2003; 36(3): pg. 98-104, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, USA
- [6] Ruchita Das and Y. K. Agrawal. "Trends and Advances in Separation and Detection of SSRIs and SNRIs in Biological Matrices" in Chromatography Research International Volume 2013, Hindawi Publishing Corporation, Gujarat, India
- [7] Finnigan TSQ Quantum Ultra Hardware Manual: 70111-97123 Revision B, Oktober 2006
- [8] Boyce P, Judd F. "The place for the tricyclic antidepressants in the treatment of depression." in Aust N Z J Psychiatry. Jun 1999
- [9] <http://infoland.olvg.nl/iprova/iDocument/Viewers/Frameworks/ViewDocument>. (Besloten OLVG Oost document)
- [10] Nadège Castaing et.al "Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" in Journal of Analytical Toxicology, Vol. 31, July/August 2007, Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Pellegrin Hospital and University Victor Segalen, 33076 Bordeaux, Frankrijk
- [11] Sebastien Tremolet "Developing and validating an LC-MS/MS method to quantify antidepressants in blood" in Master Analyse & Controle 2012, Institut national de police scientiAque de Toulouse, 23 Bd de l'Embouchure Toulouse, Frankrijk
- [12] Ling-Hui Sheng et.al. "Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" in Molecules - Open Access Organic Chemistry Journal 2014, College of Resources and Environment, Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

- [13] H. Kirchherr, W.N. K'uhn-Velten "Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach" in Journal of Chromatography B, 843 (2006) 100–113, Medical Laboratory Bremen, Haferwende 12 D-28359 Bremen, Duitsland
- [14] Autumn R. Breaud et.al. "A rapid and fully-automated method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using turbulent-flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry" in Clinica Chimica Acta 411 (2010) 825–832, The Johns Hopkins School of Medicine, Department of Pathology Clinical Chemistry, Baltimore, Maryland, Verenigde Staten
- [15] Deepak S. Jain et.al. "Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry" in Journal of Chromatography B, 829 (2005) 69–74, Department of Chemistry, School of Sciences, Gujarat University, Navrangpura, Ahmedabad 380 009, India
- [16] Sartorius balans specificaties & minimale afweeg capaciteiten: <http://sartorius.balances.com/sartorius/minimum-sample-weight.html> : Geraadpleegd op 18-06-2016
- [17] EMEA guideline on bioanalytical method validation: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf: Geraadpleegd op 14-04-2016
- [18] Dr. J.W.A. Klaessens "Statistiek, Validatie en Meetonzekerheid voor het laboratorium" in Heron Reeks, gepubliceerd door Syntax Media, Utrecht, Nederland, ISBN: 978-90-77423-94-3, Pg 93.

12 Bijlage

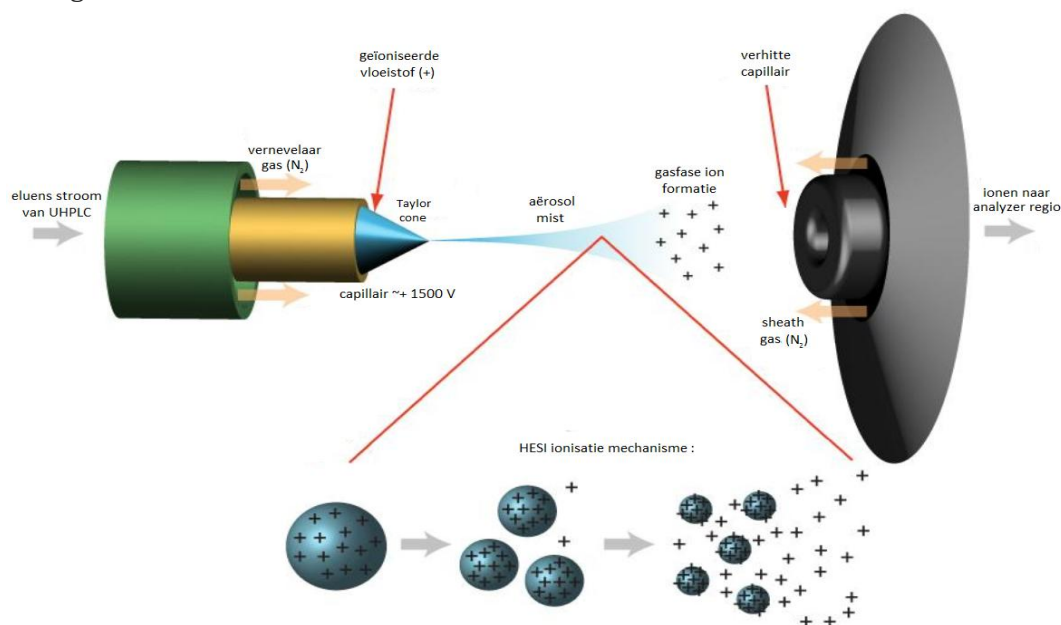
12.1 Instrumenteel verslag 'Thermo Scientific, Quantum Access Max' massaspectrometer

De 'Thermo Scientific, Quantum Access Max' massaspectrometer bestaat uit vijf mechanische onderdelen, het introductiesysteem & de ionisatie bron, de interface regio (ion optics), de analyzer, de detector en de vacuüm systemen. Alle onderdelen worden in de volgende hoofdstukken beschreven

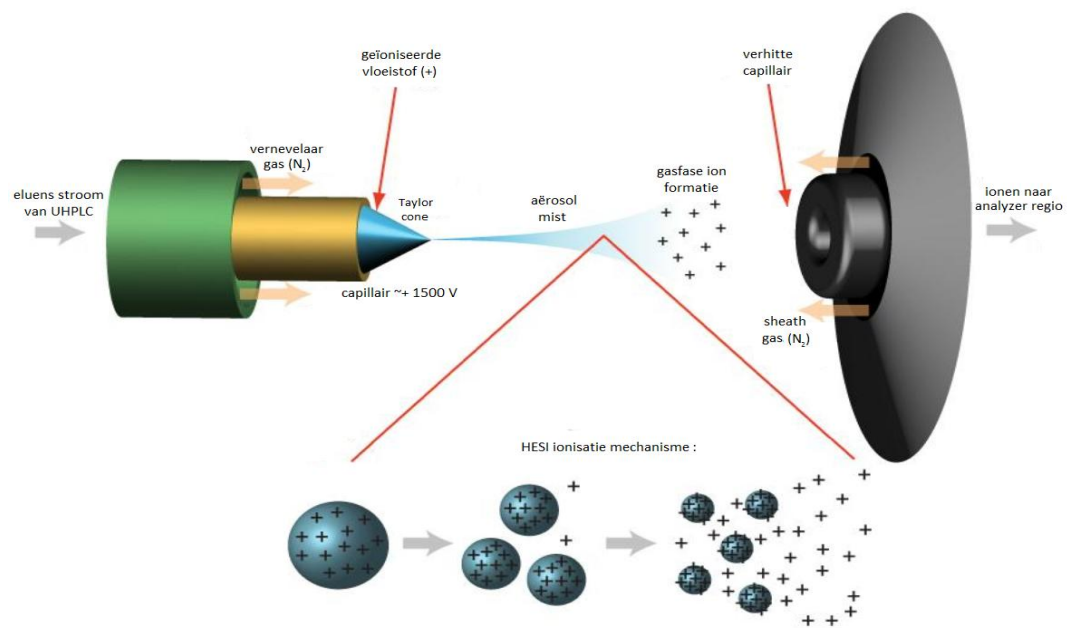
12.1.1 Ionisatiebron; Heated Electro Spray Ionisation

Heated Electro Spray Ionisation is een zachte ionisatie techniek, wat betekent dat de ionisatiebron het analyt niet fragmenteert gedurende de ionisatie. Doordat het analyt niet fragmenteert, is het mogelijk de 'moleculair ion' te meten. De moleculair ion is het/ (de massa van het) oorspronkelijke analyt. Deze informatie is waardevol voor de interpretatie van het massa spectrum, en daarbij voor de identificatie van het analyt.

Nadat het analyt de UHPLC gepasseerd is bereikt deze de ionisatie bron van de massaspectrometer. De HESI ionisatie bron bestaat uit een vernevelaar, welke het analyt in een fijne mist verneveld. Op de punt van deze vernevelaar staat een spanning van ~ 3500 volt. Dit spanningsveld zorgt ervoor dat de mist druppels voorzien worden van een lading. Het oplosmiddel waarin het antidepressiva zich bevindt, wordt verdampt uit de mist druppels door een stroom verwarmd stikstof. Als gevolg hiervan neemt de lading dichtheid op de mist druppels toe. De geladen mist druppels bereiken een kritisch punt waarbij de lading op de druppels te groot wordt. Hierdoor vallen de druppels uiteen, en neemt het antidepressiva de lading over (zie



voor HESI en HESI mechanisme). De antidepressiva ionen worden vervolgens door een vacuüm verder de massa spectrometer ingeleid.



Figuur 52: Schematische weergaven van H-ESI ionisatie bron en mechanische

12.1.2 Interface regio

Nadat het analyt de ionisatiebron gepasseerd is, bereikt deze de interface regio. In de interface regio worden de ionen en de neutrale materie gedeeltelijk van elkaar gescheiden, waarna de ionen gebundeld worden door een magnetisch veld. Daarnaast dient de interface regio als druk barrière tussen de atmosferische regio en de analyzer regio. Door de druk barrière kan er een hoger vacuüm in de analyzer regio bereikt worden, waardoor de limit of detection verlaagt, hiermee verhoogt de gevoeligheid van de analyse techniek.

De 'Q00 ion optics' zijn de lenzen in de massaspectrometer welke het dichtst tegen de HESI ionisatie bron aan gepositioneerd zijn. Onder de Q00 ion optics vallen de 'tube lens', de 'skimmer cone', de 'RF lens' en de 'L0 lens' ^[7] (zie 12.4).

De ionen, waaronder de antidepressiva ionen, worden door een vacuüm de 'ion transfer tube' ingezogen. Het analyt bereikt vervolgens de 'tube lens'. De tube lens is een cilindrische ring waar een spanning op staat, welke de ionen bundelt en versneld. Vervolgens bereiken de ionen de 'skimmer cone'. De skimmer cone is een conisch gevormde lens welke onder een lichte afwijking van de as staat ten opzichte van de tube lens. De skimmer cone is voorzien van een spanning wat een spanningsveld creëert. Dit spanningsveld zorgt ervoor dat de ionen de skimmer cone in gebogen worden. Zwaardere neutrale materie wordt niet afgebogen en kan zo verwijderd worden uit het systeem. De skimmer cone dient tevens als vacuüm barrière. Voor de skimmer cone is de druk gewoonlijk ~1,5 Torr, na de skimmer cone is de druk ~50 mTorr ^[7]. Het geladen analyt bereikt vervolgens de 'L0 lens'. De L0 lens focust de ionen over de lengte van de lens en verhoogt de kinetische energie. Deze verhoging van kinetische energie is nodig om het potentiele energie verschil in de lagere druk regio te compenseren ten opzichte van de hogere druk regio. Tevens dient de L0 lens als een vacuüm barrière.

Het geladen analyt bereikt vervolgens de 'Q0 ion optics' bestaat uit twee lenzen om het geladen analyt verder te focussen en op constante snelheid te brengen. De Q0 quadrupole bestaat uit vier vierkante ijzeren staven (zie 12.4). Op de staven staat een radio frequent (RF) -voltage welke de kinetische energie van de ionen verhoogt alvorens deze de analyzer regio in te geleiden.

12.1.3 Triple quad (analyzer regio)

Na de interface regio worden de ionen de analyzer regio ingeleid. In de analyzer regio worden de gewenste ionen van de ongewenste ionen gescheiden. De analyzer regio bestaat uit drie sectoren; sector 'Q1', 'Q2' en 'Q3' (zie 12.2). Sector Q1 en Q3 zijn identieke hyperbolische quadrupolen. Q1 en Q3 dienen als massa filters, om ongewenste ionen te scheiden van de gewenste ionen, door middel van een specifiek opgewekt magnetisch veld. Q2 bevindt zich in de collision cell welke inkomende ionen kan fragmenteren en doorgeleiden. Tevens dient Q2 als filter voor ongeladen soorten. De analyzer regio staat onder een hoog vacuüm welke opgewekt wordt door een combinatie van peristaltische pompen en een turbo pomp.

12.1.3.1 Quadrupole: Sector Q1 en Q3

De Q1 en Q3 quadrupole massafilters bestaan uit vier parallel geplaatste hyperbolische ijzeren staven van 250 mm lang. Op twee tegenoverstaande ijzeren staven wordt een potentiaal geplaatst welke gelijk is aan: $+(U+V\cos(\omega t))$, waarin 'U' een gelijk spanning is en $V\cos(\omega t)$ een wisselspanning, opgewekt door een RF generator, waarin 'V' de grootte (amplitude) is van de wisselspanning en ' ω ' de frequentie van de wisselspanning. Op de overige twee tegenoverstaande ijzeren staven staat een potentiaal welk gelijk is aan: $-(U+V\cos(\omega t))$.

De spanning op twee tegenoverstaande polen fluctueert continu in intensiteit, wat een fluctuerend magnetisch veld opwekt. De twee negatief geladen tegenoverstaande polen hebben een fluctuerend attractief effect op de positief geladen antidepressiva ionen. De twee positief geladen tegenoverstaande polen hebben een repulsief effect op de positief geladen antidepressiva ionen. Wanneer het magnetisch veld van de positieve en negatieve geladen polen gecombineerd wordt gaan inkomende ionen door dit fluctuerend magnetisch veld een oscillerend traject afleggen, lijkend op de vorm van een kurkentrekker. Het potentiaal op de negatief geladen polen is contra en sinussodiaal in de tijd ten opzichte van de positief geladen polen.

Het magnetisch veld beïnvloedt alle inkomende ionen. Ionen met hogere massa lading verhoudingen worden niet genoeg beïnvloed door het magnetisch veld, en zullen een te grote baan afleggen, waardoor deze niet de detector zullen bereiken. Ionen met lagere massa lading verhouding worden te veel beïnvloed en slaan tegen de quadrupole staven aan, waardoor deze ook de detector niet zullen bereiken. De ionen met de juiste massa lading verhouding worden echter dermate specifiek beïnvloed door het magnetisch veld dat deze een stabiel oscillerend traject afleggen en de detector zullen bereiken. Zo worden gewenste ionen van ongewenste ionen en materie gescheiden. (voor een visuele weergave zie 12.7)

12.1.3.2 Collision cell: Sector Q2

Quadrupole Q2 bevindt zich in de 'collision cell'. Quadrupole Q2 filtert geen specifieke massa-lading verhouding ionen in tegenstelling tot Q1 en Q3. Q2 transporteert ionen van een breed massa lading verhouding spectrum, en dient als doorgeleider van ionen. De collision cell is de plek waar de 'Collision-induced dissociation' (CID) ofwel 'fragmentatie' plaats vind. Doormiddel van fragmentatie is de massa spectrometer in staat zeer kwalitatief alsmede kwantitatief te analyseren.

Quadrupole Q2 bestaat net als Q1 en Q3 uit vier quadrupole staven. De staven zijn vierkant van vorm, in tegenstelling tot de hyperbolisch gevormde quadrupole staven in Q1 en Q3. De Q2 quadrupole staven zijn in een hoek van 90° gebogen over de lengte van de quadrupole (zie bijlage 1). De antidepressiva ionen worden door een positief magnetisch veld mee gebogen over de quadrupole. Neutrale materie wordt niet afgebogen door het magnetisch veld en zal een rechte projectie afleggen, waarna deze uit de massa spectrometer verwijderd kunnen worden. Neutrale materie bereikt zo niet de detector, waardoor het achtergrond signaal verlaagt en lagere detectie grenzen bereikt worden, hiermee verhoogt de gevoeligheid van de analyse systeem ^[7].

De Q2 quadrupole bevindt zich in de 'collision cell chamber'. De Collision Cell is een ruimte welke gevuld wordt met 'collision gas'. De gasdruk in deze ruimte bedraagt ongeveer 1 tot 4 x 10⁻³ Torr. Het collision gas is een inert gas wat geen reacties mag aan gaan met overige materie. Wanneer de antidepressiva ionen door de Q2 quadrupole geleid worden, botsen deze met het neutraal geladen collision gas (argon). De inkomende antidepressiva ionen beschikken over een hoge kinetische energie, welke veroorzaakt wordt door het RF-voltage van de quadrupole. De botsing tussen de antidepressiva ionen en het neutrale collision gas zet de kinetische energie van de antidepressiva ionen om in interne energie. Deze interne energie uit zich in de formatie van meta-stabiele ionen. Wanneer de interne energie groot genoeg is, vallen de meta-stabiele ionen uiteen tot geladen fragmenten. Dit proces wordt ook wel fragmentatie genoemd. De geladen fragmenten worden vervolgens door de Q2 quadrupole heen geleid, waarna deze de Q3 quadrupole bereiken.

12.1.4 Detector

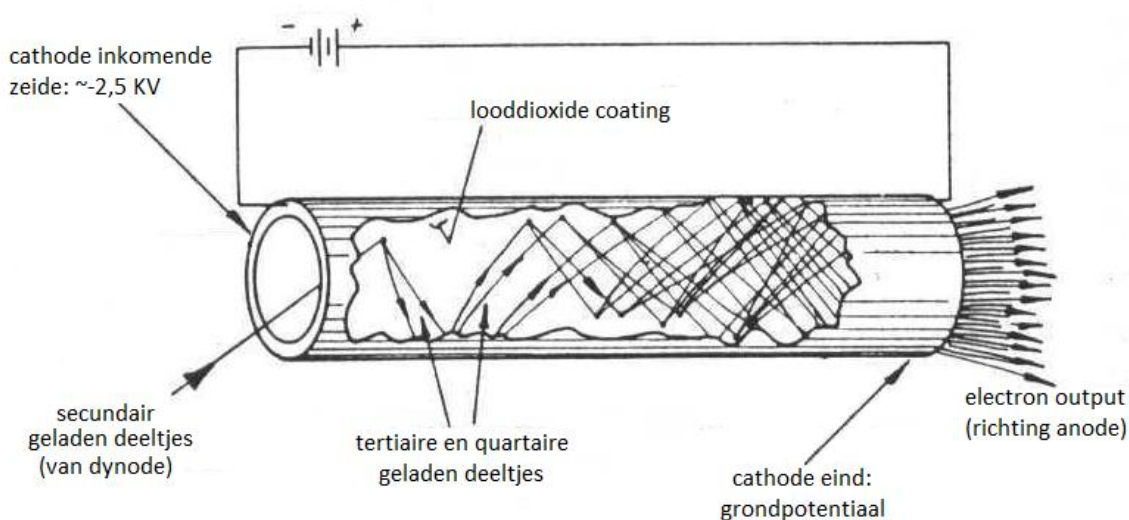
De detector van de massaspectrometer is een 'electron multiplier'. De detectie vindt plaats aan de hand van een elektrisch signaal, afkomstig van de ionen. (zie figuur 4)

Nadat de ionen de analyzer regio gepasseerd zijn bereiken deze de detector. Inkomende antidepressiva ionen slaan tegen een dynode aan door een tegengesteld potentiaal op de dynode ten opzichte van de inkomende antidepressiva ionen. Dit potentiaal bedraagt 15000 volt. Wanneer de positieve antidepressiva ionen tegen de negatief geladen dynode aan slaan, komen er secundaire (negatief) geladen deeltjes vrij. De vrijgekomen negatief geladen deeltjes (negatieve ionen en elektronen) worden door de sterk negatief geladen dynode afgestoten richting de kathode.

De kathode is een negatief geladen trechter vormig object. De kathode is de 'electron multiplier' en versterkt het signaal. De inkomende negatief geladen deeltjes afkomstig van de dynode slaan tegen de negatief geladen kathode aan, waardoor negatief geladen deeltjes vrij komen. De vrijgekomen negatief geladen deeltjes van de kathode vervolgen hun weg en slaan opnieuw tegen de negatief geladen kathode aan, waardoor wederom negatief geladen deeltjes vrijkomen. Deze actie herhaalt zich een aantal keer tot een groot aantal negatief geladen deeltjes de kathode verlaat.

De negatief geladen deeltjes slaan vervolgens tegen de positief geladen anode aan, waarna een elektrisch signaal waarneembaar is. Het elektrische signaal staat gelijk aan de hoeveelheid inkomende negatief geladen deeltjes. De hoeveelheid inkomende negatief geladen deeltjes staat gelijk aan een hoeveelheid ionen die de dynode bereikt. De anode geleid het signaal naar een ultra gevoelige ampère meter. Het elektrische signaal afkomstig van de anode is zo te correleren aan een concentratie met behulp van regressie.

Figuur 53 geeft een schematische weergaven van het mechanisme van de kathode van de 'electron multiplier' weer.



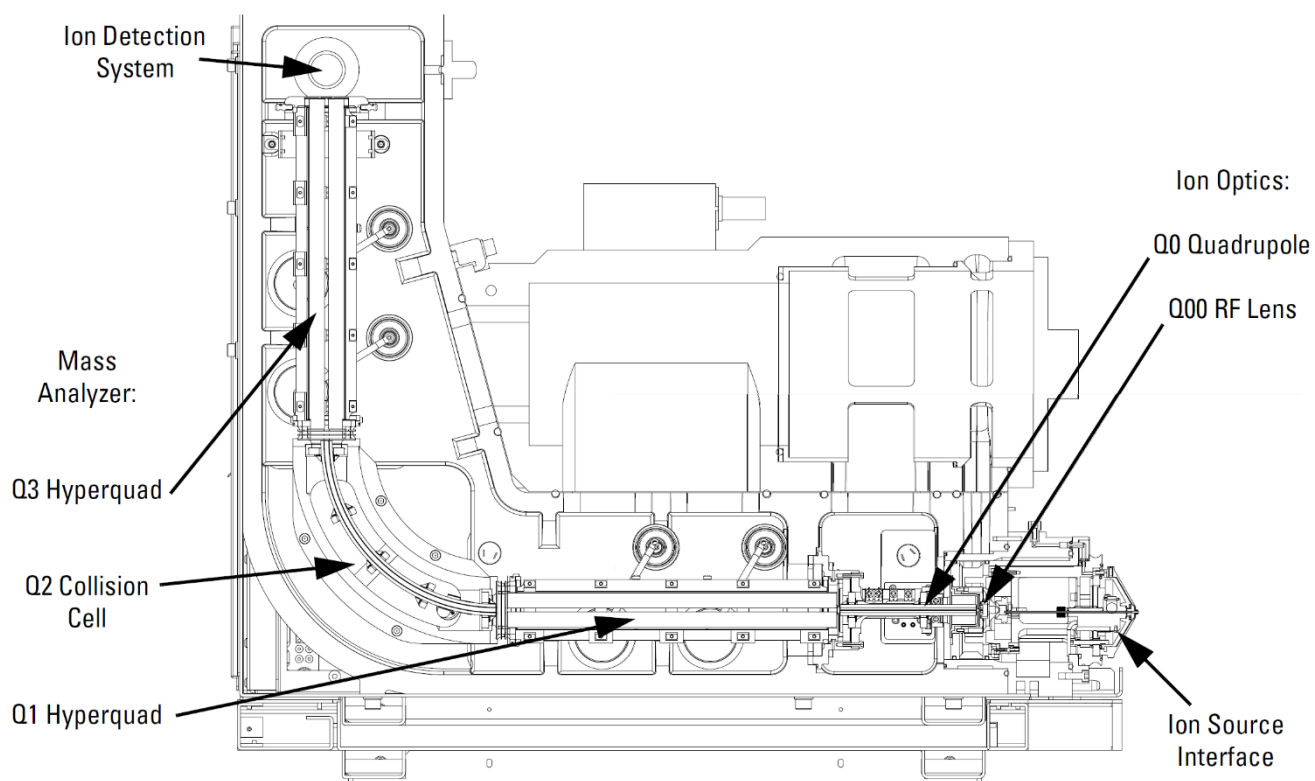
Figuur 53: Schematische weergaven van een 'electron multiplier' en zijn mechanisme

12.1.5 **Vacuüm systeem**

De 'Thermo Scientific, Quantum Access Max' massaspectrometer werkt op een hoog vacuüm. Een hoog vacuüm is essentieel omdat zuurstof, stikstof en andere atmosferische gassen de ionisatie tegen werken. Zonder ionen is het onmogelijk om componenten goed te kunnen filteren en te detecteren. Binnen in het MS systeem zijn er verschillende druk regio (vacuümstages). De vacuümstages zijn aflopend in druk (toenemend in vacuüm) ten opzichte van het introductie systeem. De massaspectrometer bereikt zijn druk door een combinatie van een peristaltische pomp (fore pomp) en een turbo pomp. De peristaltische pomp opereert van atmosferische druk tot 10^{-4} bar. De turbo pomp opereert van 10^{-3} bar tot 10^{-7} bar.

12.2 ‘Thermo Scientific Quantum Access Max’ top weergaven

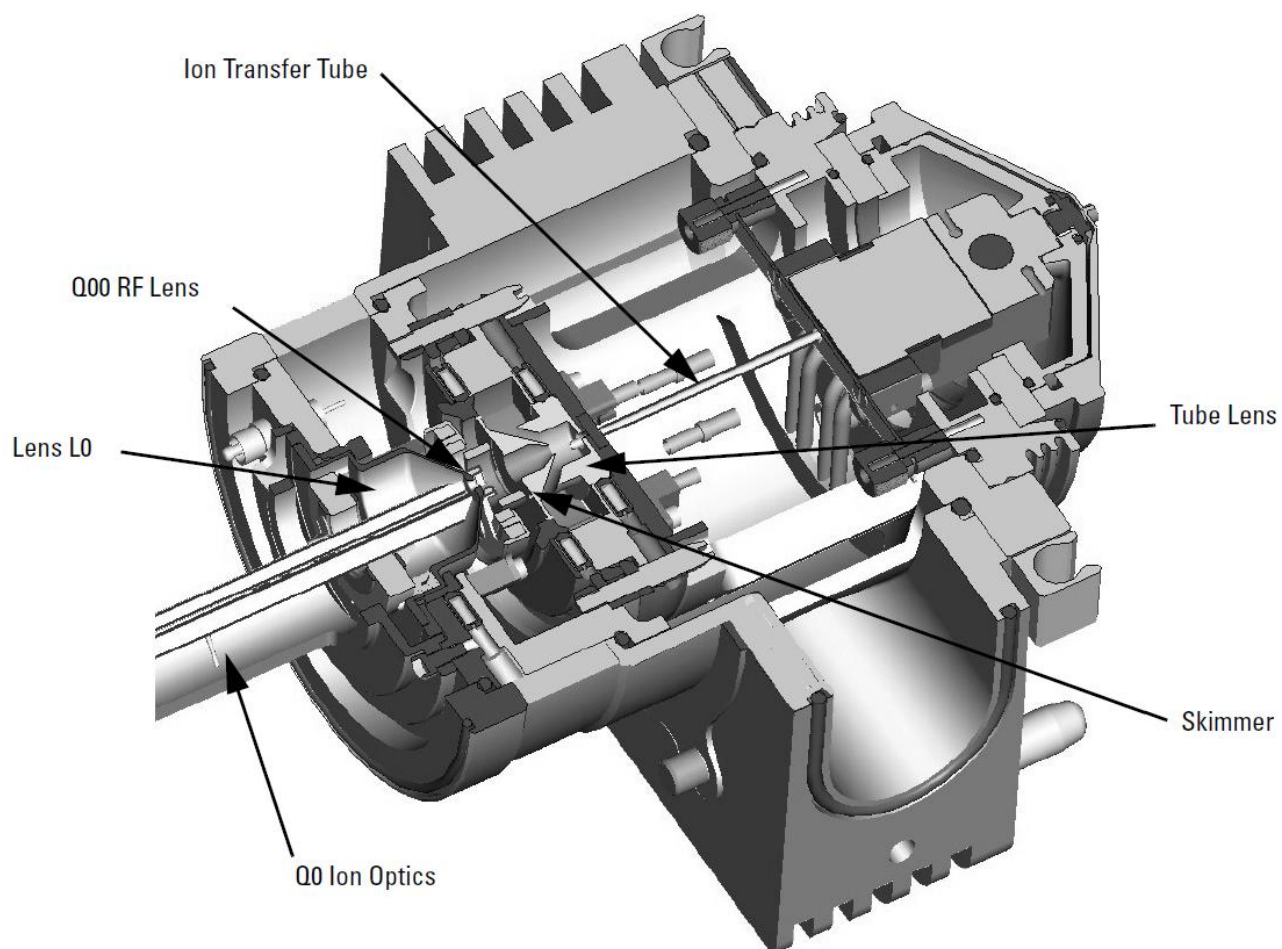
Figuur 54 geeft de top weergaven van de ‘Thermo Scientific’ ‘Quantum Access Max’ massa spectrometer weer.



Figuur 54: weergaven TSQ Quantum access max MS

12.3 'Q00 ion optics' doorsnede

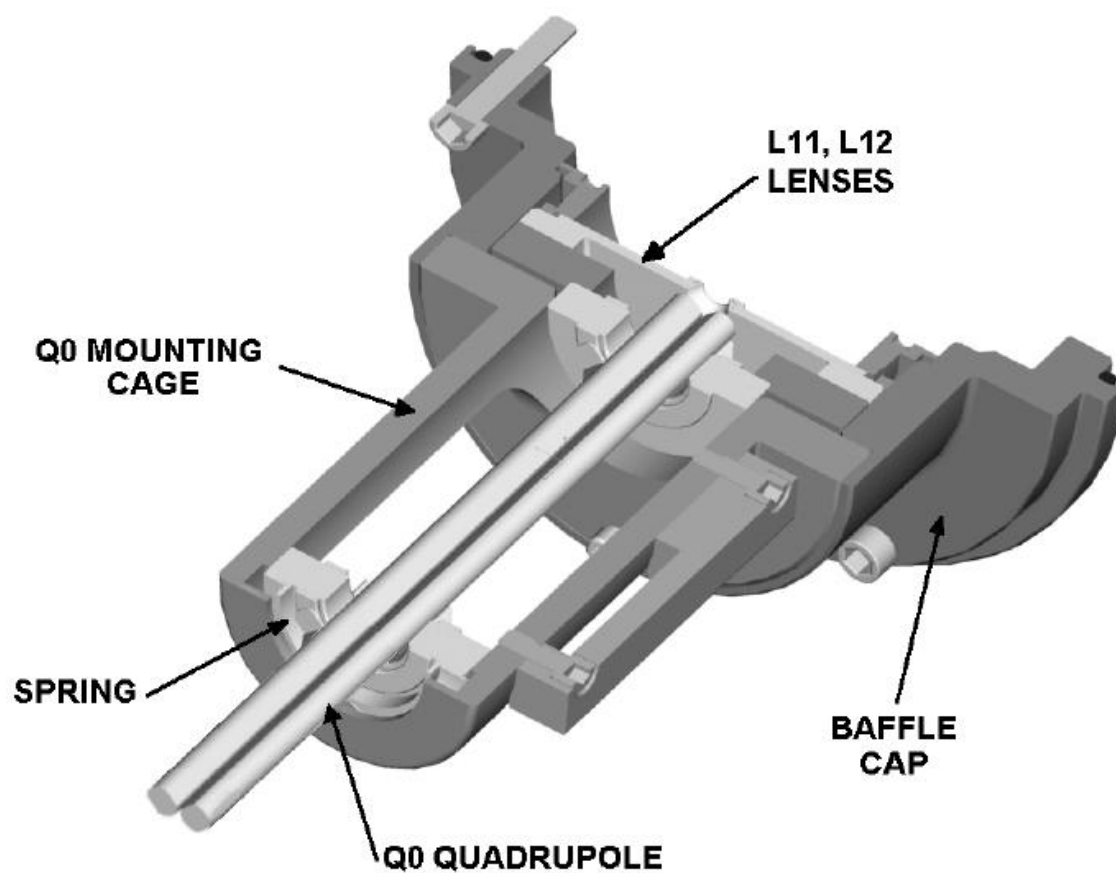
Figuur 55 geeft een weergaven van de doorsnede van de 'Q00 ion optics' weer.



Figuur 55: Doorsnede van de 'Q00 ion optics'

12.4 Bijlage 3: 'Q0 ion optics' doorsnede

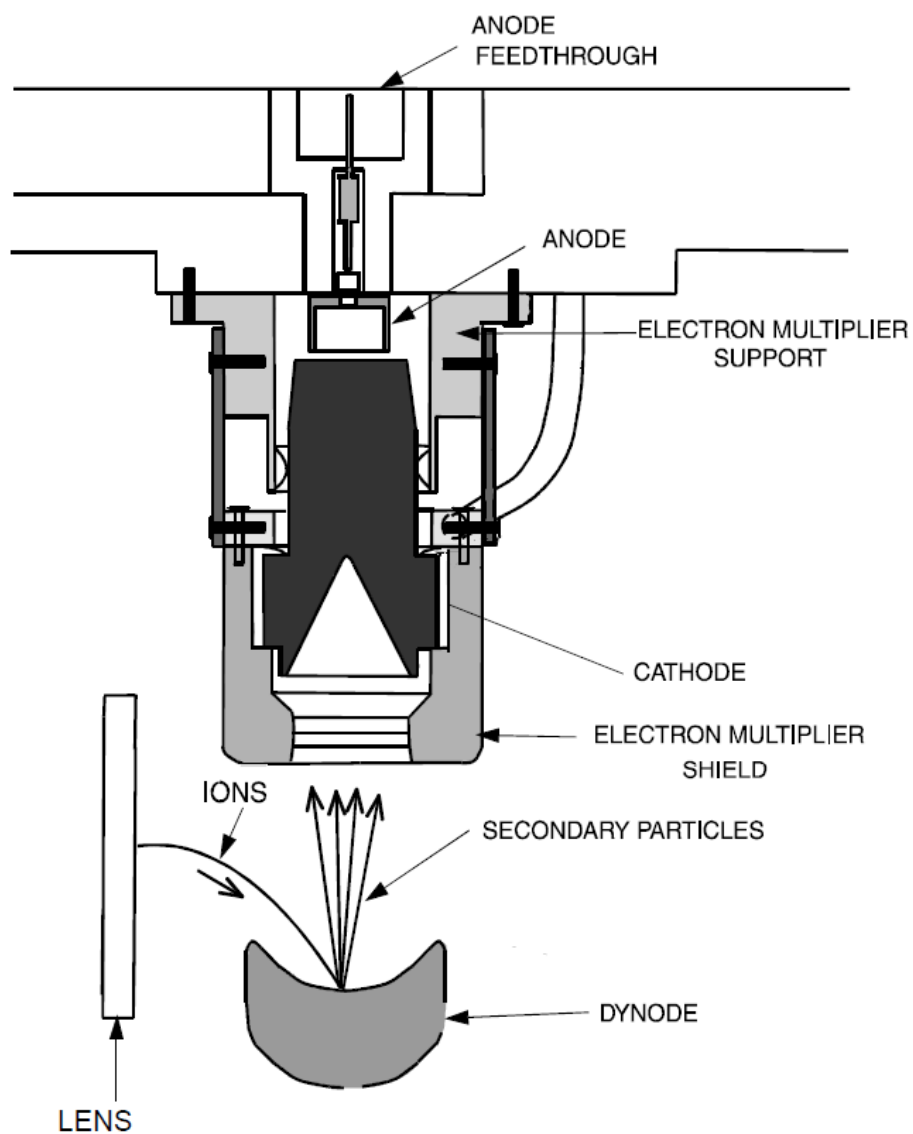
Figuur 56 geeft een weergaven van de doorsnede van de 'Q0 ion optics' weer.



Figuur 56: Doorsnede 'Q0 ion optics'

12.5 Bijlage 4: Schematische weergaven van MS detector

Figuur 57 geeft een schematische weergaven van de Quantum Access Max massa spectrometer detector weer.



Figuur 57: Schematische weergaven TSQ detector

12.6 Chemicaliën

Tabel 61 geeft een overzicht van de antidepressiva en hun status weer. De antidepressiva waren gecontroleerd op woensdag 9 december.

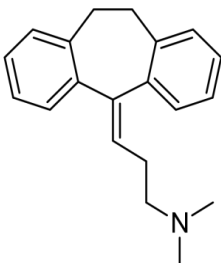
Tabel 61: Resultaten controle van antidepressiva

<i>Antidepressiva</i>						
Stof	groep	status	(lab) Code	Fabrikant	Charge	Houdbaarheid
Amitriptyline	TCA	Aanwezig	A37 KK	Sigma Aldrich	BCBJ8594V	sep-16
Citalopram	SSRI	Bestellen	C74 KK	Sigma Aldrich	091M1131V	sep-16
Clomipramine	TCA	Bestellen	C46	Sigma Aldrich	MKB58660V	sep-26
Dosulepine	TCA	Aanwezig	D60	LGC	26738	sep-19
Duloxetine	SSRI	aanwezig	D61	Sigma Aldrich	KMBR2747V	dec-20
Fluoxetine	SSRI	Bestellen	F28	Sigma Aldrich	SLBL4347V	sep-19
Fluvoxamine	SSRI	Bestellen	F31 KK	Sigma Aldrich	053K1435V	-
Imipramine	TCA	Bestellen	I3	Sigma Aldrich	SLBL0051V	jun-21
Maprotiline	TeCa	Aanwezig	M8	Sigma Aldrich	BCBB9102V	mrt-18
Mirtazapine	NaSSa	Bestellen	M48	LGC	55725	jan-18
Paroxetine	SSRI	Aanwezig	P4	Sigma Aldrich	101M4730V	jul-18
Sertraline	SSRI	Aanwezig	S23	Sigma Aldrich	092M4713V	apr-19
Venlafaxine	SNRI	Aanwezig	V6	Sigma Aldrich	081M4729V	aug-17
<i>Des. Methyl</i>						
Stof	groep	status	(lab) Code	Fabrikant	Charge	Houdbaarheid
Citalopram	SSRI	Aanwezig	D68	Lundbeck Ch.	16884	okt-17
Clomipramine	TCA	Aanwezig	D8	Sigma Aldrich	021M4073	okt-16
Dosulepine	TCA	Aanwezig	D58 KK	LGC	576	sep-19
Fluoxetine	SSRI	Bestellen	N53 DV	Cerlliant	?	sep-16
Imipramine (desipramine)	TCA	Bestellen	D5 KK	Sigma Aldrich	SLBG1580V	mrt-16
Maprotiline	TeCa	Bestellen	D12 KK	LGC	41324	sep-16
Mirtazapine	NaSSa	Bestellen	D64 KK	LGC	17532	sep-16
Nortriptyline	TCA	bestellen	N55	Sigma Aldrich	BCBN0630V	apr-19
Norvenlafaxine	SNRI	Aanwezig	D63 DV	Cerlliant	FN02101502	apr-20
Sertraline	SSRI	Bestellen	D37 DV	Cerlliant	FN10301401	jan-20
<i>Gedeutereerde referentie stoffen</i>						
Stof	groep	status	(lab) Code	Fabrikant	Charge	Houdbaarheid
Amitriptyline D3	REF	Bestellen	A26 DV	Cerlliant	FN039448062	jan-19
Citalopram D6	REF	Bestellen	C25 DV	Cerlliant	FN06091502	jun-19
Venlafaxine D6	REF	Bestellen	V9 DV	Cerlliant	FN04151503	mei-20

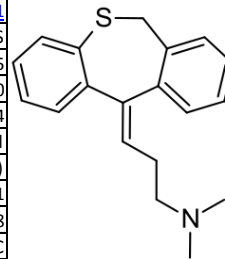
12.6.1 Antidepressiva

12.6.1.1 TCA

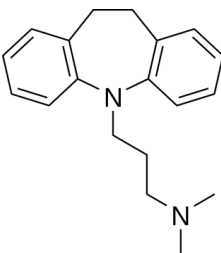
Amitriptyline	
Type	TCA
Cas nummer	50-48-6
Formule	C ₂₀ H ₂₃ N
Mol massa	277,403
Mol massa HCl	313,68
pKa	9,4
Solubility	methanol
lab code	A37 (KK)
Aanwezigheid (g)	± 20
Charge/lot	BCBJ8594
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	549-18-8
Exp.	sep-16



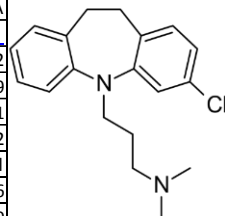
Dosulepine	
Type	TCA
Cas nummer	113-53-1
Formule	C ₁₉ H ₂₁ NS
Mol massa	295,45
Mol massa zout (HCl)	331,90
pKa	9,14
Solubility	methanol
lab code	D60 (KK)
Aanwezigheid (g)	<0,1
Charge/lot	26738
Fabrikant	LGC
Vorm	HCl
Cas nummer	897-15-4
Exp.	sep-19



Imipramine	
Type	TCA
Cas nummer	50-49-7
Formule	C ₁₉ H ₂₄ N ₂
Mol massa	280,407
Mol massa zout (HCl)	316,87
pKa	9,2
solubility	methanol
lab code	I3
Aanwezigheid (g)	>2,0
Charge/lot	SLBL0051V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	113-52-0
Exp.	jun-21

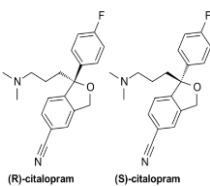


Clomipramine	
Type	TCA
Cas nummer	303-49-1
Formule	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂
Mol massa	314,9
Mol massa zout (HCl)	351,31
pKa	9,2
Solubility	methanol
lab code	C46
Aanwezigheid (g)	>1,0
Charge/lot	MKBs8660V
Fabrikant	Sigma Aldich
Vorm	HCl
Cas nummer	17321-77-6
Exp.	sep-26

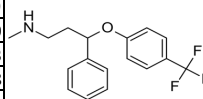


12.6.1.2 SSRI

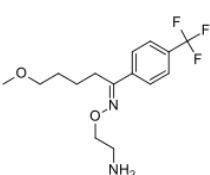
Citalopram	
Type	SSRI
Cas nummer	59729-33-8
Formule	C ₂₀ H ₂₁ FNO ₂
Mol massa	324,392
Mol massa zout (HBr)	405,3
pKa	9,78
Solubility	Methanol
lab code	C74 (KK)
Aanwezigheid (g)	<0,1
Charge/lot	091M1131V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HBr
Cas nummer	59729-32-7
Exp.	sep-16



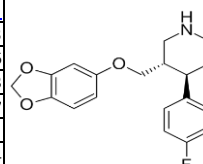
Fluoxetine	
Type	SSRI
Cas nummer	54910-89-3
Formule	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO
Mol massa	345,79
Mol massa zout (HCl)	309,33
pKa	9,8
solubility	methanol
lab code	F28
Aanwezigheid (g)	<0,05
Charge/lot	SLBL4347V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	56296-78-7
Exp.	sep-19



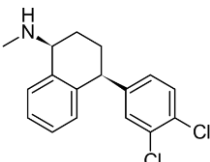
Fluvoxamine	
Type	SSRI
Cas nummer	54739-18-3
Formule	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂
Mol massa	318,34
Mol massa zout (maleaat)	434,41
pKa	9,16
solubility	methanol
lab code	F31 (KK)
Aanwezigheid (g)	<0,1
Charge/lot	053K1435V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	Maleate
Cas nummer	61718-82-9
Exp.	mei-16



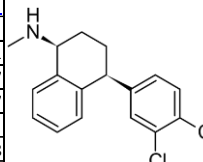
Paroxetine	
Type	SSRI
Cas nummer	61869-08-7
Formule	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃
Mol massa	329,36
mol massa zout (HCL 0,5 H2O)	374,83
pKa	9,77
solubility	methanol
lab code	P4
Aanwezigheid (g)	0,05
Charge/lot	101M4730V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	1 HCl - 0,5 H ₂ O
Cas nummer	110429-35-1
Exp.	jul-18



Sertraline	
Type	SSRI
Cas nummer	79617-96-2
Formule	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N
Mol massa	306,23
Mol massa zout (HCl)	342,69
pKa	9,85
Solubility	methanol
lab code	S23
Aanwezigheid (g)	<0,05
Charge/lot	092M4713V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	79559-97-0
Exp.	apr-19

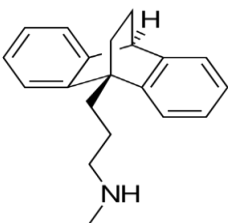


Duloxetine	
Type	SSRI
Cas nummer	79617-96-2
Formule	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N
Mol massa	297,41
Mol massa zout (HCl)	333,87
pKa	9,7
Solubility	methanol
lab code	D28
Aanwezigheid (g)	1 gr.
Charge/lot	RS0498
Fabrikant	Eli Lilly & Comp.
Vorm	HCl
Cas nummer	79559-97-0
Exp.	apr-19

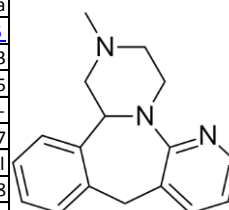


12.6.1.3 Overige soorten

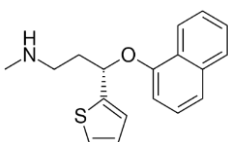
Maprotiline	
Type	TeCa
Cas nummer	10262-69-8
Formule	C ₂₀ H ₂₃ N
Mol massa	277,403
Mol massa zout (HCl)	313,86
pKa	10,54
solubility	methanol
lab code	M8 (KK)
Aanwezigheid (g)	>0,2
Charge/lot	BCBB9102V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	10347-81-6
Exp.	mrt-18



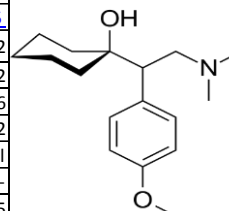
Mirtazapine	
Type	NaSSa
Cas nummer	61337-67-5
Formule	C ₁₇ H ₁₉ N ₃
Mol massa	265,35
Mol massa zout	-
pKa	6,67
solubility	methanol
lab code	M48
Aanwezigheid (g)	0,05
Charge/lot	55725
Fabrikant	LGC
Vorm	V.B. kristal
Cas nummer	85650-52-8
Exp.	nov-17



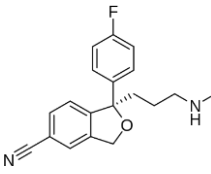
Duloxetine	
Type	SNRI
Cas nummer	116539-59-4
Formule	C ₁₈ H ₁₉ NOS
Mol massa	297,415
Mol massa zout	333,875
pKa	9,7
Solubility	methanol
lab code	D28
Aanwezigheid (g)	1 gram
Charge/lot	RS0498
Fabrikant	Eli Lilly & comp.
Vorm	HCl
Cas nummer	
Exp.	mei-16

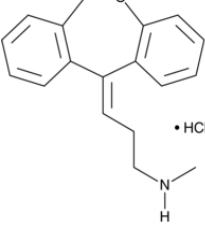


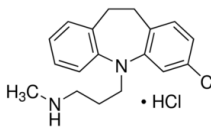
Venlafaxine	
Type	SNRI
Cas nummer	93413-69-5
Formule	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂
Mol massa	277,402
Mol massa zout (HCl)	313,86
pKa	14,42
Solubility	methanol
lab code	-
Aanwezigheid (g)	0,05
Charge/lot	081M4729V
Fabrikant	Sigma Aldrich
Vorm	HCl
Cas nummer	99300-78-4
Exp.	aug-17

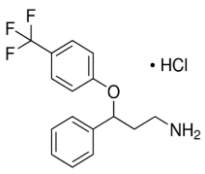


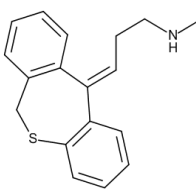
12.6.1.4 Metabolieten (desmethyl)

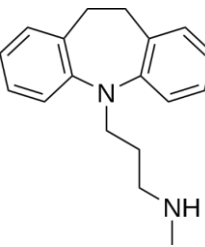
D.M. Citalopram		
Type	SSRI	
Alternatief	-	
Formule	C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O	
Mol massa	310,1481	
Mol massa zout (HCl)	346,83	
pKa	10,54	
Solubility	methanol	
lab code	D68	
Aanwezigheid (g)	± 0,2 g	
Charge/lot	16884	
Fabrikant	Lundbeck	
Vorm	HCl	
Cas nummer	144025149	
Exp.	okt-17	

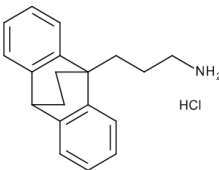
D.M. Doxepine		
Type	TCA	
-	-	
Formule	C ₁₈ H ₁₉ NO	
Mol massa	265,35	
Mol massa zout (HCl)	301,81	
pKa	-	
S	methanol	
lab code	D10 (kk)	
Aanwezigheid (g)	<0,02	
Charge/lot	090M4021	
Fabrikant	Sigma Aldrich	
Vorm	HCl	
Cas nummer	2887-91-4	
Exp.	aug-15	

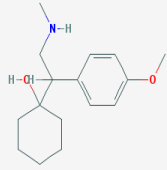
D.M. Clomipramine		
Type	TCA	
Alternatief	-	
Formule	C ₁₈ H ₂₂ ClN ₂	
Mol massa	300,83	
Mol massa zout (HCl)	337,29	
pKa	10,2	
Solubility	methanol 20 mg/ml	
lab code	A37 (KK)	
Aanwezigheid (g)	± 20 g	
Charge/lot	BCB18594	
Fabrikant	Sigma Aldrich	
Vorm	HCl	
Cas nummer	549-18-8	
Exp.	sep-16	

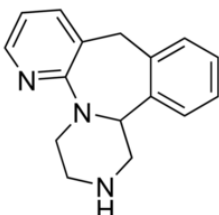
D.M. Fluoxetine (nor)		
Type	SSRI	
Alternatief	norfluoxetine	
Formule	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO	
Mol massa	295,3	
Mol massa zout	331,76	
pKa	9,77	
solubility	methanol	
lab code	N53 (dv)	
Aanwezigheid (ml)	2	
Charge/lot	035K1075	
Fabrikant	Cerilliant	
Vorm	ampul in MeOH	
Cas nummer	57226-68-3	
Exp.	aug-20	

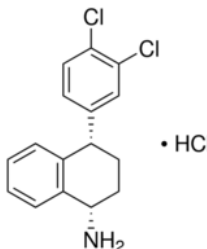
D.M. Dosulpine		
Type	TCA	
Prod. Nr	MM0510.08	
Formule	C ₁₈ H ₁₉ NS	
Mol massa	281,42	
Mol massa zout (HCl)	317,88	
pKa	?	
solubility	methanol	
lab code	D58	
Aanwezigheid (g)	± 0,05 g	
Charge/lot	576	
Fabrikant	LGC	
Vorm	HCl	
Cas nummer	24881-70-7	
Exp.	sep-19	

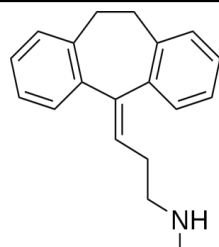
D.M. Imipramine		
Type	TCA	
Alternatief	(desipramine)	
Formule	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	
Mol massa	266,381	
mol massa zout(HCl)	302,84	
pKa	10,02	
solubility	methanol	
lab code	D5 (kk)	
Aanwezigheid (g)	± 1.0 g	
Charge/lot	SLBG1580V	
Fabrikant	Sigma Aldrich	
Vorm	HCl	
Cas nummer	58-28-6	
Exp.	mei-16	

D.M. maprotiline		
Type	TeCa	
Alternatief	-	
Formule	C ₁₉ H ₂₁ N	
Mol massa	263,39	
mol massa zout (HCl)	299,84	
pKa	10,2	
solubility	methanol	
lab code	D12	
Aanwezigheid (g)	<0,01	
Charge/lot	41324	
Fabrikant	LGC	
Vorm	HCl	
Cas nummer	92202-51-2	
Exp.	mei-17	

N-D.M. Venlafaxine (nor)		
Type	SNRI	
Alternatief	norvenlafaxine	
Formule	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	
Mol massa	263,38	
Mol massa zout (HCl)	299,84	
pKa	8,87	
solubility	methanol	
lab code	D63DV	
Aanwezigheid (ml)	3	
Charge/lot	FN02101502	
Fabrikant	Cerilliant	
Vorm	ampul in MeOH	
Cas nummer	93413-90-2	
Exp.	apr-20	

N-D.M. Mirtazepine		
Type	NaSSa	
Alternatief	-	
Formule	C ₁₆ H ₁₇ N ₃	
Mol massa	251,33	
Mol massa zout (maleaat)	367,40	
pKa	8,75	
solubility	methanol	
lab code	d64	
Aanwezigheid (g)	<0,02	
Charge/lot	MM1005,09	
Fabrikant	Sigma Aldrich	
Vorm	ampul in ACN	
Cas nummer	61337-68-6	
Exp.	sep-16	

D.M. Sertraline		
Type	SSRI	
Alternatief	-	
Formule	C ₁₆ H ₁₆ Cl ₂ N	
Mol massa	292,2	
Mol massa zout (HCl)	328,66	
pKa	9,73	
solubility	methanol	
lab code	D36	
Aanwezigheid (ml)	3	
Charge/lot	FN021313-01	
Fabrikant	Cerilliant	
Vorm	ampul in MeOH	
Cas nummer	91797-57-8	
Exp.	aug-20	

D.M. Amitriptyline (nor)		
Type	TCA	
Alternatief	nortriptyline	
Formule	C ₁₉ H ₂₁ N	
Mol massa	263,377	
Mol massa zout (HCl)	299,84	
Pka	10,47	
Solubility	methanol	
lab code	A37 (KK)	
Aanwezigheid (g)	± 20 g	
Charge/lot	BCBJ8594V	
Fabrikant	Sigma Aldrich	
Vorm	HCl	
Cas nummer	549-18-8	
Exp.	sep-16	

12.6.1.5 Inweeg en concentratie voor 100 mg/l antidepressiva oplossingen (A)

Tabel 62 geeft een overzicht van de inwegen en bijbehorende concentratie van de 100 mg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 1 mg antidepressiva ingewogen en opgelost in een 10 ml maatkolf met methanol. De oplossing waren gecodeerd, A1 tot en met A26.

Tabel 62: Inwegen 100 mg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva						
-	Nr.	Stof	Molmassa	Molmassa zout	Inw. (mg)	Cor. Inw. (mg)
A	1	Amitriptyline	277,4	313,68	1,168	1,033
A	2	Citalopram	324,39	405,3	1,078	0,863
A	3	Clomipramine	314,9	351,31	1,204	1,079
A	4	Dosulepine	295,45	331,9	1,159	1,032
A	5	Duloxetine	297,41	333,87	1,233	1,098
A	6	Fluoxetine	309,33	345,79	1,215	1,087
A	7	Fluvoxamine	318,34	434,41	1,412	1,035
A	8	Imipramine	280,41	316,87	1,175	1,04
A	9	Maprotiline	277,4	313,86	1,208	1,068
A	10	Mirtazapine	265,35	265,35	1,082	1,082
A	11	Paroxetine	329,36	374,83	1,191	1,047
A	12	Sertraline	306,23	342,69	1,211	1,082
A	14	Venlafaxine	277,4	313,86	1,166	1,031
Des Methyl						
-	Nr.	Stof	Molmassa	Molmassa zout	Inw. (mg)	Cor. Inw. (mg)
A	15	Citalopram	310,15	346,83	1,114	0,996
A	16	Clomipramine	300,83	337,29	1,075	0,959
A	17	Dosulepine	281,42	317,88	1,109	0,982
A	19	(nor)Fluoxetine	295,3	295,3	**	**
A	20	(desi)Imipramine	266,38	302,84	1,101	0,968
A	21	Maprotiline	263,39	299,84	1,291	1,134
A	22	Mirtazapine	251,33	367,4	1,433	0,98
A	24	(nor)Amitriptyline	263,38	299,84	1,116	0,98
A	25	(Nor)venlafaxine	263,38	299,84	*	*
A	26	Sertraline	306,23	306,23	*	*

* = 100 mg/l ampul

** = 1000 mg/l ampul

12.6.1.6 Concentraties van 1 mg/l antidepressiva oplossingen

Tabel 63 geeft een overzicht van de concentraties van de 1 mg/l antidepressiva oplossingen weer. De hoeveelheden uit tabel Tabel 63 werden in reageerbuizen gepipetteerd, waarna de buizen aangevuld werden tot 5000 ul.

Tabel 63: Concentraties 1 mg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva						
-	Nr.	Stof	Conc. (mg/l)	Pipet (ul)	Aangevuld (ul)	Conc. (mg/l)
A	1	Amitriptyline	103,29	50	4950	1,033
A	2	Citalopram	86,28	50	4950	0,863
A	3	Clomipramine	107,92	50	4950	1,079
A	4	Dosulepine	103,17	50	4950	1,032
A	5	Duloxetine	109,84	50	4950	1,098
A	6	Fluoxetine	108,69	50	4950	1,087
A	7	Fluvoxamine	103,47	50	4950	1,035
A	8	Imipramine	103,98	50	4950	1,040
A	9	Maprotiline	106,77	50	4950	1,068
A	10	Mirtazapine	108,20	50	4950	1,082
A	11	Paroxetine	104,65	50	4950	1,047
A	12	Sertraline	108,22	50	4950	1,082
A	14	Venlafaxine	103,06	50	4950	1,031
Des. Methyl						
-	Nr.	Stof	Conc. (mg/l)	Pipet (ul)	Aangevuld (ul)	Conc. (mg/l)
A	15	Citalopram	99,62	50	4950	0,996
A	16	Clomipramine	95,88	50	4950	0,959
A	17	Dosulepine	98,18	50	4950	0,982
A	19	(nor)Fluoxetine	100,00	5	4995	1,000
A	20	(desi)Imipramine	96,85	50	4950	0,968
A	21	Maprotiline	113,41	50	4950	1,134
A	22	Mirtazapine	98,03	50	4950	0,980
A	24	(nor)Amitriptyline	98,03	50	4950	0,980
A	25	(Nor)venlafaxine	100,00	50	4950	1,000
A	26	Sertraline	100,00	50	4950	1,000

12.6.1.7 Concentraties van 100 µg/l antidepressiva oplossingen

Tabel 64 geeft een overzicht van de concentraties van de 100 µg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 10 µl 100 mg/l antidepressiva oplossing gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml.

Tabel 64: Concentraties 100 µg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva			
-	Nr.	Stof	Conc. (µg/l)
A	1	Amitriptyline	103,29
A	2	Citalopram	86,28
A	3	Clomipramine	107,92
A	4	Dosulepine	103,17
A	5	Duloxetine	109,84
A	6	Fluoxetine	108,69
A	7	Fluvoxamine	103,47
A	8	Imipramine	103,98
A	9	Maprotiline	106,77
A	10	Mirtazapine	108,20
A	11	Paroxetine	104,65
A	12	Sertraline	108,22
A	14	Venlafaxine	103,06
Des. Methyl			
-	Nr.	Stof	Conc. (µg/l)
A	15	Citalopram	99,62
A	16	Clomipramine	95,88
A	17	Dosulepine	98,18
A	19	(nor)Fluoxetine	100,00
A	20	(desi)Imipramine	96,85
A	21	Maprotiline	113,41
A	22	Mirtazapine	98,03
A	24	(nor)Amitriptyline	98,03
A	25	(Nor)venlafaxine	100,00
A	26	Sertraline	100,00

12.6.1.8 Concentraties van 5 µg/l antidepressiva oplossingen

Tabel 65 geeft een overzicht van de concentraties van de 5 µg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 500 µl 100 µg/l antidepressiva oplossing gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml.

Tabel 65: Concentraties 5 µg/l antidepressiva oplossing

Antidepressiva		
-	Nr. Stof	Conc. (µg/l)
A	1 Amitriptyline	5,165
A	2 Citalopram	4,315
A	3 Clomipramine	5,395
A	4 Dosulepine	5,160
A	5 Duloxetine	5,490
A	6 Fluoxetine	5,435
A	7 Fluvoxamine	5,175
A	8 Imipramine	5,200
A	9 Maprotiline	5,340
A	10 Mirtazapine	5,410
A	11 Paroxetine	5,235
A	12 Sertraline	5,410
A	14 Venlafaxine	5,155
Des. Methyl		
-	Nr. Stof	Conc. (µg/l)
A	15 Citalopram	4,980
A	16 Clomipramine	4,795
A	17 Dosulepine	4,910
A	19 (nor)Fluoxetine	5,000
A	20 (desi)Imipramine	4,845
A	21 Maprotiline	5,670
A	22 Mirtazapine	4,900
A	24 (nor)Amitriptyline	4,900
A	25 (Nor)venlafaxine	5,000
A	26 Sertraline	5,000

12.6.1.9 Concentraties van 1 µg/l antidepressiva oplossingen

Tabel 66 geeft een overzicht van de concentraties van de 1 µg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 100 µl 100 µg/l antidepressiva oplossing gepipetteerd in een maatkolf van 10 ml.

Tabel 66: Concentraties 1 µg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva		
-	Nr. Stof	Conc. (µg/l)
A 1	Amitriptyline	1,033
A 2	Citalopram	0,863
A 3	Clomipramine	1,079
A 4	Dosulepine	1,032
A 5	Duloxetine	1,098
A 6	Fluoxetine	1,087
A 7	Fluvoxamine	1,035
A 8	Imipramine	1,040
A 9	Maprotiline	1,068
A 10	Mirtazapine	1,082
A 11	Paroxetine	1,047
A 12	Sertraline	1,082
A 14	Venlafaxine	1,031
Des. Methyl		
-	Nr. Stof	Conc. (µg/l)
A 15	Citalopram	0,996
A 16	Clomipramine	0,959
A 17	Dosulepine	0,982
A 19	(nor)Fluoxetine	1,000
A 20	(desi)Imipramine	0,969
A 21	Maprotiline	1,134
A 22	Mirtazapine	0,980
A 24	(nor)Amitriptyline	0,980
A 25	(Nor)venlafaxine	1,000
A 26	Sertraline	1,000

12.6.1.10 Inweeg en concentratie voor 100 mg/l antidepressiva oplossingen (B)

Tabel 67 geeft een overzicht van de inwegen en bijbehorende concentratie van de 100 mg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 1 mg antidepressiva ingewogen en opgelost in een 10 ml maatkolf met methanol. De oplossing waren gecodeerd, B1 tot en met B26.

Tabel 67: Inweeg 100 mg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva						
-	Nr.	Stof	Molm.	Molm. zout	Inw. (mg)	Cor. Inw. (mg)
B	1	Amitriptyline	277,40	313,68	1,291	1,142
B	2	Citalopram	324,39	405,30	1,346	1,077
B	3	Clomipramine	314,90	351,31	1,220	1,094
B	4	Dosulepine	295,45	331,90	1,196	1,065
B	5	Duloxetine	297,41	333,87	1,241	1,105
B	6	Fluoxetine	309,33	345,79	1,288	1,152
B	7	Fluvoxamine	318,34	434,41	1,350	0,989
B	8	Imipramine	280,41	316,87	1,322	1,170
B	9	Maprotiline	277,40	313,86	1,165	1,030
B	10	Mirtazapine	265,35	265,35	1,134	1,134
B	11	Paroxetine	329,36	374,83	1,072	0,942
B	12	Sertraline	306,23	342,69	1,078	0,963
B	14	Venlafaxine	277,40	313,86	1,092	0,965
Des. Methyl						
-	Nr.	Stof	Molm.	Molm. zout	Inweeg (mg)	Cor. inweeg (mg)
B	15	Citalopram	310,15	346,83	1,141	1,020
B	16	Clomipramine	300,83	337,29	1,123	1,002
B	17	Dosulepine	281,42	317,88	1,073	0,950
B	19	(nor)Fluoxetine	295,30	295,30	**	**
B	20	(desi)Imipramine	266,38	302,84	1,177	1,035
B	21	Maprotiline	263,39	299,84	1,182	1,038
B	22	Mirtazapine	251,33	367,40	1,454	0,995
B	24	(nor)Amitriptyline	263,38	299,84	1,078	0,947
B	25	(Nor)venlafaxine	263,38	299,84	*	*
B	26	Sertraline	306,23	306,23	*	*

* = 100 mg/l ampul

** = 1000 mg/l ampul

12.6.1.11 Concentraties 'regressie oplossing A'

Tabel 68 geeft de concentraties van regressie oplossing A weer. Er werd de hoeveelheden uit Tabel 68 gepipetteerd in maatkolven van 10 ml, welke werden aangevuld met methanol.

Tabel 68: concentraties 'regressie oplossing A'

Antidepressiva

-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Pipet (ul)	Conc. (mg/l)
A	1	Amitriptyline	103,292	250	2,582
A	2	Citalopram	86,280	250	2,157
A	3	Clomipramine	107,922	250	2,698
A	4	Dosulepine	103,172	250	2,579
A	5	Duloxetine	109,835	250	2,746
A	6	Fluoxetine	108,689	500	5,434
A	7	Fluvoxamine	103,471	250	2,587
A	8	Imipramine	103,979	250	2,599
A	9	Maprotiline	106,768	500	5,338
A	10	Mirtazepine	108,200	100	1,082
A	11	Paroxetine	104,652	250	2,616
A	12	Sertraline	108,215	500	5,411
A	14	Venlafaxine	103,056	500	5,153

Des. Methyl

-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Pipet (ul)	Conc. (mg/l)
A	15	Citalopram	99,618	50	0,498
A	16	Clomipramine	95,880	50	4,794
A	17	Dosulpine	98,180	250	2,455
A	19	(nor)Fluoxetine	100,000	50	5,000
A	20	(desi)Imipramine	96,845	500	4,842
A	21	Maprotiline	113,406	500	5,670
A	22	Mirtazepine	98,028	50	4,901
A	24	(nor)Amitriptyline	98,029	250	2,451
A	25	(Nor)venlafaxine	100,000	250	2,500
A	26	Sertraline	100,000	100	1,000

12.6.1.12 Concentraties 'regressie oplossing B'

Tabel 69 geeft de concentraties van regressie oplossing B weer. Er werd de hoeveelheden uit Tabel 69 gepipetteerd in maatkolven van 10 ml, welke werden aangevuld met methanol.

Tabel 69: concentraties 'regressie oplossing B'

Antidepressiva

-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Pipet (ul)	Conc. (mg/l)
B	1	Amitriptyline	114,170	250	2,854
B	2	Citalopram	107,730	250	2,693
B	3	Clomipramine	109,356	250	2,734
B	4	Dosulepine	106,465	250	2,662
B	5	Duloxetine	110,548	250	2,764
B	6	Fluoxetine	115,219	500	5,761
B	7	Fluvoxamine	98,928	250	2,473
B	8	Imipramine	116,987	250	2,925
B	9	Maprotiline	102,968	500	5,148
B	10	Mirtazepine	113,400	100	1,134
B	11	Paroxetine	94,196	250	2,355
B	12	Sertraline	96,330	500	4,817
B	14	Venlafaxine	96,515	500	4,826

Des. Methyl

-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Pipet (ul)	Conc. (mg/l)
B	15	Citalopram	102,032	50	0,510
B	16	Clomipramine	1000,00	50	5,000
B	17	Dosulpine	94,993	250	2,375
B	19	(nor)Fluoxetine	1000,00	50	5,000
B	20	(desi)Imipramine	103,530	500	5,177
B	21	Maprotiline	103,831	500	5,192
B	22	Mirtazepine	1000,00	50	5,000
B	24	(nor)Amitriptyline	94,691	250	2,367
B	25	(Nor)venlafaxine	100,000	250	2,500
B	26	Sertraline	100,000	100	1,000

12.6.1.13 Concentraties van 100 mg/l antidepressiva oplossingen voor houdbaarheidsonderzoek

Tabel 70 geeft een overzicht van de inwegen en bijbehorende concentratie van de 100 mg/l antidepressiva oplossingen weer. Er werd 1 mg antidepressiva ingewogen en opgelost in een 10 ml maatkolf met methanol. De oplossing waren gecodeerd, C1 tot en met C26.

Tabel 70: Inwegen 100 mg/l antidepressiva oplossingen

Antidepressiva

-	Nr.	Stof	Molmassa	Molmassa zout	Inw. (mg)	Cor. Inw. (mg)	Conc. (mg/l)
A	1	Amitriptyline	277,4	313,68	1,102	0,975	97,455
A	2	Citalopram	324,39	405,3	1,199	0,960	95,965
A	3	Clomipramine	314,9	351,31	1,071	0,960	96,000
A	4	Dosulepine	295,45	331,9	1,079	0,961	96,050
A	5	Duloxetine	297,41	333,87	1,205	1,073	107,341
A	6	Fluoxetine	309,33	345,79	1,200	1,073	107,347
A	7	Fluvoxamine	318,34	434,41	1,428	1,046	104,644
A	8	Imipramine	280,41	316,87	1,157	1,024	102,386
A	9	Maprotiline	277,4	313,86	1,191	1,053	105,266
A	10	Mirtazapine	265,35	265,35	1,017	1,017	101,700
A	11	Paroxetine	329,36	374,83	1,084	0,953	95,250
A	12	Sertraline	306,23	342,69	1,234	1,103	110,271
A	14	Venlafaxine	277,4	313,86	1,137	1,005	100,493

Des Methyl

-	Nr.	Stof	Molmassa	Molmassa zout	Inw. (mg)	Cor. Inw. (mg)	Conc. (mg/l)
A	15	Citalopram	310,15	346,83	1,085	0,970	97,025
A	16	Clomipramine	300,83	337,29	**	**	1000,0
A	17	Dosulepine	281,42	317,88	1,124	0,995	99,508
A	19	(nor)Fluoxetine	295,3	295,3	**	**	1000,0
A	20	(desi)Imipramine	266,38	302,84	1,138	1,001	100,100
A	21	Maprotiline	263,39	299,84	1,166	1,024	102,426
A	22	Mirtazapine	251,33	367,4	**	**	1000,0
A	24	(nor)Amitriptyline	263,38	299,84	1,111	0,976	97,589
A	25	(Nor)venlafaxine	263,38	299,84	*	*	100,00
A	26	Sertraline	306,23	306,23	*	*	100,00

* = 100 mg/l ampul

** = 1000 mg/l ampul

12.6.1.14 Regressie 'oplossing C'

Tabel 71 geeft de concentraties van regressie oplossing B weer. Er werd de hoeveelheden uit Tabel 71 gepipetteerd in maatkolven van 10 ml, welke werden aangevuld met methanol.

Tabel 71: Concentraties regressie 'oplossing C'

Antidepressiva				
-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Conc. (mg/l)
C	1	Amitriptyline	97,455	2,4364
C	2	Citalopram	95,965	2,3991
C	3	Clomipramine	96,000	2,4000
C	4	Dosulepine	96,050	2,4013
C	5	Duloxetine	107,341	2,6835
C	6	Fluoxetine	107,347	5,3674
C	7	Fluvoxamine	104,644	2,6161
C	8	Imipramine	102,386	2,5597
C	9	Maprotiline	105,266	5,2633
C	10	Mirtazapine	101,700	1,0170
C	11	Paroxetine	95,250	2,3813
C	12	Sertraline	110,271	5,5135
C	14	Venlafaxine	100,493	5,0246
Des. Methyl				
-	Nr.	Stof	Conc. 100 mg/l AD (mg/l)	Conc. (mg/l)
C	15	Citalopram	97,025	0,4851
C	16	Clomipramine	1000,00	5,0000
C	17	Dosulepine	99,508	2,4877
C	19	(nor)Fluoxetine	1000,00	5,0000
C	20	(desi)Imipramine	100,100	5,0050
C	21	Maprotiline	102,426	5,1213
C	22	Mirtazapine	1000,00	5,0000
C	24	(nor)Amitriptyline	97,589	2,4397
C	25	(Nor)venlafaxine	100,000	2,5000
C	26	Sertraline	100,000	1,0000

12.6.2 Vloeistoffen

Tabel 72 geeft een overzicht van de gebruikte vloeistoffen weer.

Tabel 72: Informatie vloeistoffen

Vloeistof	Zuiverheid %	Fabrikant	Lot/charge	Exp.
2-propanolol	99,9	Fluka	STBD4118V	jul-17
acetonitril	≥99,8	Merck	I802091543	okt-18
acetonitril-UP	100	Merck	1791129532	jul-18
ammoniak	25	Merck	K47165232542	okt-20
azijnzuur	100	Merck	K47265763545	okt-20
fosforzuur	85	Merck	K44309352315	apr-16
methanol	100	Merck	16A110506	jan-21
mierenzuur	≥98	Merck	K45044664453	nov-18
triethylamine	≥99	Sigma Aldrich	STBD4118V	jun-16
water voor injectie	100	OLVG	-	-

12.6.3 Vaste stoffen

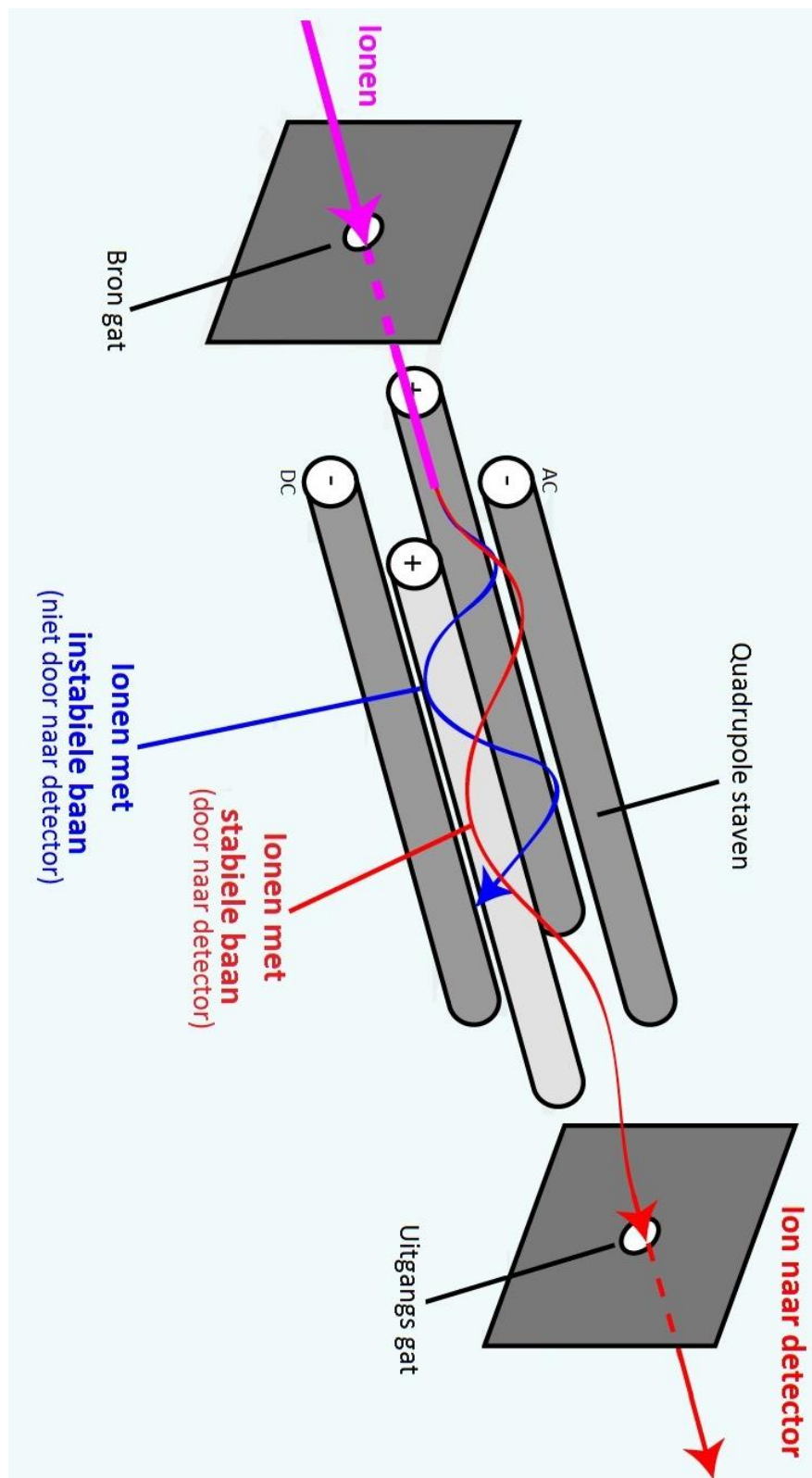
Tabel 73 geeft een overzicht van de gebruikte vloeistoffen weer.

Tabel 73: Informatie vaste stoffen

Vloeistof	Zuiverheid %	Fabrikant	Lot	Exp.
Ammoniumacetaat	≥99,9	Sigma Aldrich	MKBT0466V	nov-19
Ammoniumfluoride	≥99,9	Sigma Aldrich	S34814V	feb-17
Ammoniumformaat	>99,0	Sigma Aldrich	BCBN6845V	aug-17
Zinksulfaat ·7 H ₂ O	>99,0	Sigma Aldrich	074K00121V	dec-16
Uracil	>99,0	Sigma Aldrich	109K0083	apr-15

12.7 Werking quadrupole massa filter

Figuur 58 geeft een visuele weergave van de werking van de quadrupole massa filter.



Figuur 58: Schematische weergave van een quadrupole en zijn mechanisme

12.8 Therapeutische grens gebieden antidepressiva

Tabel 74 geeft de therapeutische grens gebieden van de antidepressiva en metabolieten weer welke opgenomen zijn in de analyse methode.

Tabel 74: Therapeutische grens gebieden antidepressiva

Component	Laag therapeutisch (ug/l) [8]	Hoog therapeutisch (ug/l) [8]	0,5 x laag therapeutisch (ug/l)	2 x hoog therapeutisch (ug/l)
Amitriptyline	50	200	25	400
Desmethy amitriptyline	50	150	25	300
Amitriptyline + Desmethylami.	100	300	50	600
Citalopram	50	200	25	400
Desmethylcitalopram	10	100		200
Clomipramine	100	250	50	500
Desmethylclomipramine	150	550	75	1100
Dosulepine	50	150	25	300
Desmethyldosulpine	100	200	50	400
Doxepine	-	-	-	-
Desmethyldoxepine	200	350	100	700
Duloxetine	30	120	15	240
Fluoxetine	100	450	50	900
Desmethyfluoxetine	50	350	25	700
Fluvoxamine	50	250	25	500
Imipramine	50	150	25	300
Desmethyl(desi)imipramine	150	300	75	600
Maprotiline	75	300	37,5	600
Desmethylmaprotiline	100	400	50	800
Mirtazepine	20	100	10	200
Desmethylmirtazepine	50	300	25	600
Paroxetine	20	200	10	400
Sertraline	50	300	25	600
Desmethylsertraline	-	-	-	-
Trazodone	300	1500	150	3000
Venlafaxine	-	-	-	-
Norvenlafaxine	100	400	50	800

12.9 “Amitriptyline & Nortriptyline” methode

1. Reagentia, hulpstoffen en chemicaliën

Alle benodigde reagentia, hulpstoffen en chemicaliën

Naam stof	Labnummer
Acetonitril	A9
Blanco plasma	N.v.t.
Eluensbuffer pH 3,2 (EB030)	F-RBV-001
Methanol	M11
Neerslagvloeistof (CH026)	F-RBV-027
QC monsters Ami- en nortriptyline (QC096)	F-RBV-025
Stockoplossing Ami- en nortriptyline (ST096)	F-RBV-028

Zie voor de bereiding van de reagentia het betreffende formulier (reagentiabereidingsvoorschrift) in iDocument.

Bereidingswijze standaarden

Stamoplossing amitriptyline/nortriptyline

Pipetteer 200 µl stockoplossing amitriptyline/nortriptyline (ST096) en breng over in een maatkolf van 10 ml en vul aan met methanol. De concentratie is nu ongeveer 5,3 amitriptyline/nortriptyline.

Factor amitriptyline/amitriptyline.HCl: 0,8837

Factor nortriptyline/nortriptyline.HCl : 0,8786

Standaarden amitriptyline/nortriptyline

Pipetteer 10, 10, 25, 50 en 100 µl stamoplossing in plastic rondbodemuisjes. Voeg aan standaard 1 2000 µl en standaard 2 t/m 5 1000 µl blanco serum toe. De concentraties zijn respectievelijk 25, 50, 130, 250 en 480 µg/l amitriptyline / nortriptyline.

QC monsters

QC1 en QC2 van QC096. Deze zijn reeds ingevroren (DV -20).

Bereidingswijze blanco

Blanco plasma. Opwerking: zie 'Uitvoering'.

2. Apparatuur

LC-MS/MS

Eluens	Buffer pH3,2 (EB030) / Acetonitril (55:45)
Flow	0,300 ml/min
Injectievolumen	5,0 µl
Kolom	Agilent Edipse XDB-C18, 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Kolomtemperatuur	50 °C
Methode	amitriptyline.meth
Detector	SRM amitriptyline: 278,2 → 233,1 (16 V) SRM nortriptyline: 264,2 → 233,1 (16 V) SRM ISTD: 340,2 → 239,0 (17 V)
Ionisatie	Positief
Tune-file	Haloperidol (BRO 215) Niet gevalideerd op de UHPLC-MS/MS (BRO 285)

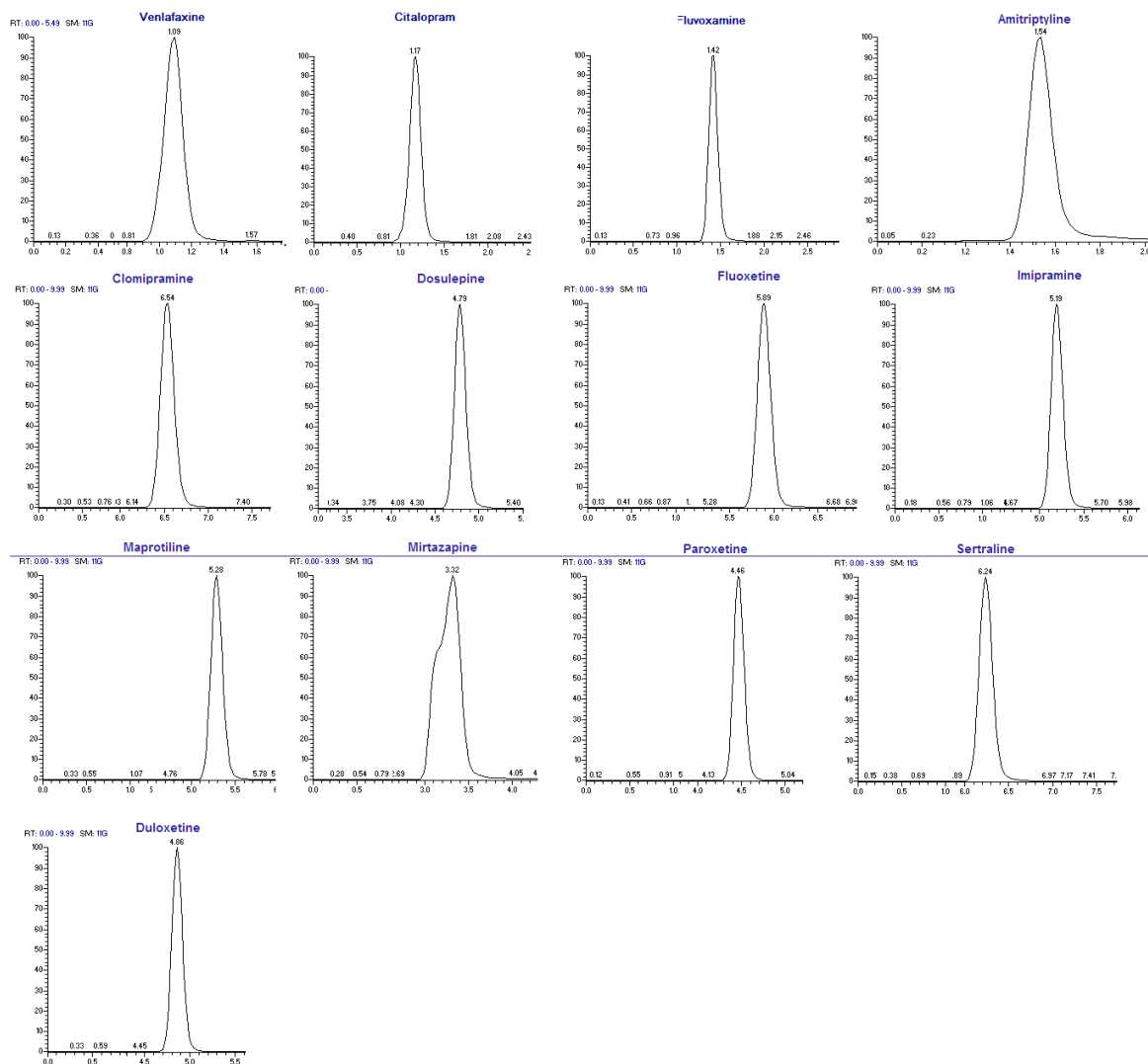
Uitvoering

- Pipetteer 100 µl van de standaarden, blanco en patiëntenmonsters en QC's in een glazen reageerbuisje.
- Voeg 1000 µl neerslagvloeistof (CH026) toe.
- Vortex 10 seconden zie BRO 109 .
- Laat de buizen minimaal 15 minuten staan.
- Werk volgens BRO 103 Centrifuge.
- Centrifugeer de oplossingen 5 minuten bij 5000 tpm.
- Breng zo veel mogelijk van de bovenste laag over in een injectievial.
- Werk volgens BRO 215 LC-MS/MS.
- Injecteer de oplossingen op de LC-MS/MS.

12.10 Chromatogrammen individuele chromatografie

12.10.1 Antidepressiva

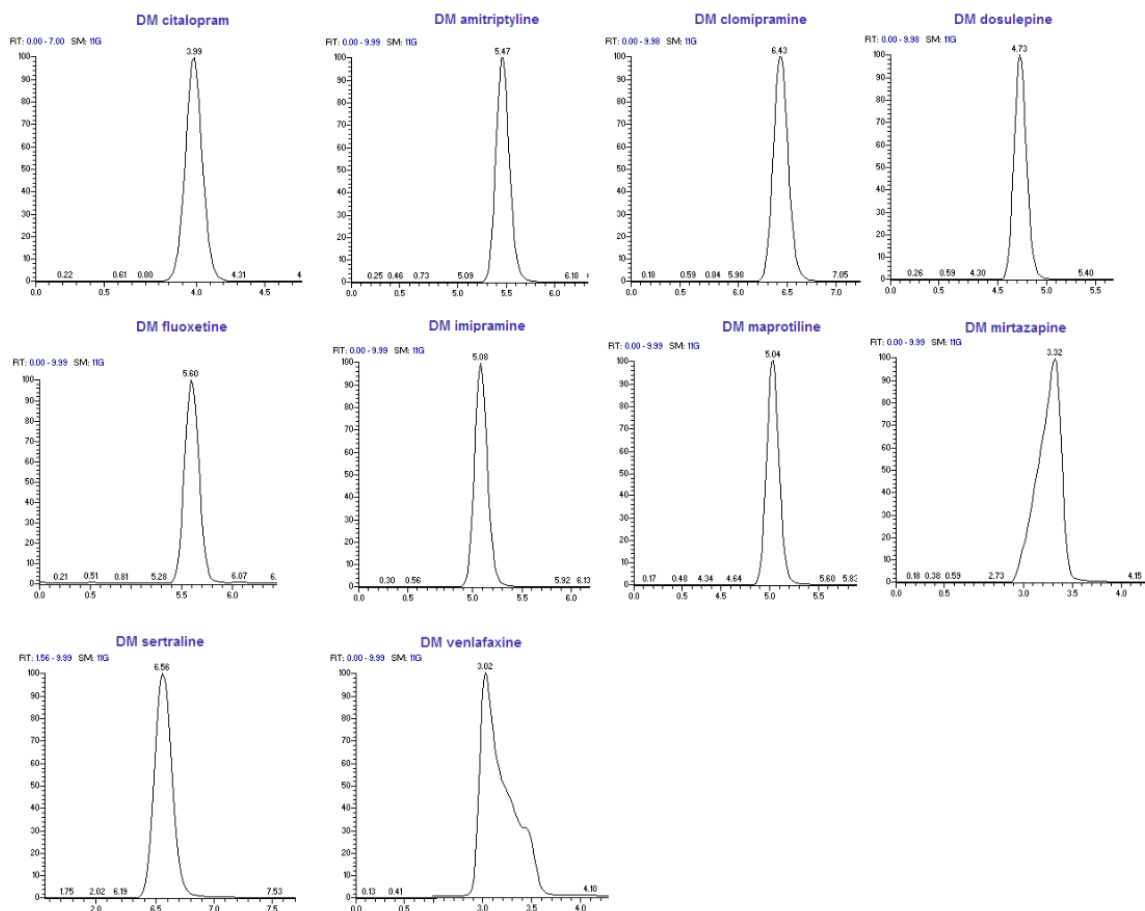
Figuur 59 geeft een overzicht van alle individuele chromatogrammen van de antidepressiva, opgenomen met de 'Amitriptyline & Nortriptyline' methode weer.



Figuur 59: Individuele chromatogrammen van de antidepressiva; op de y assen staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-assen staat de elutie tijd (minuten) uitgesteld.

12.10.2 Metabolieten

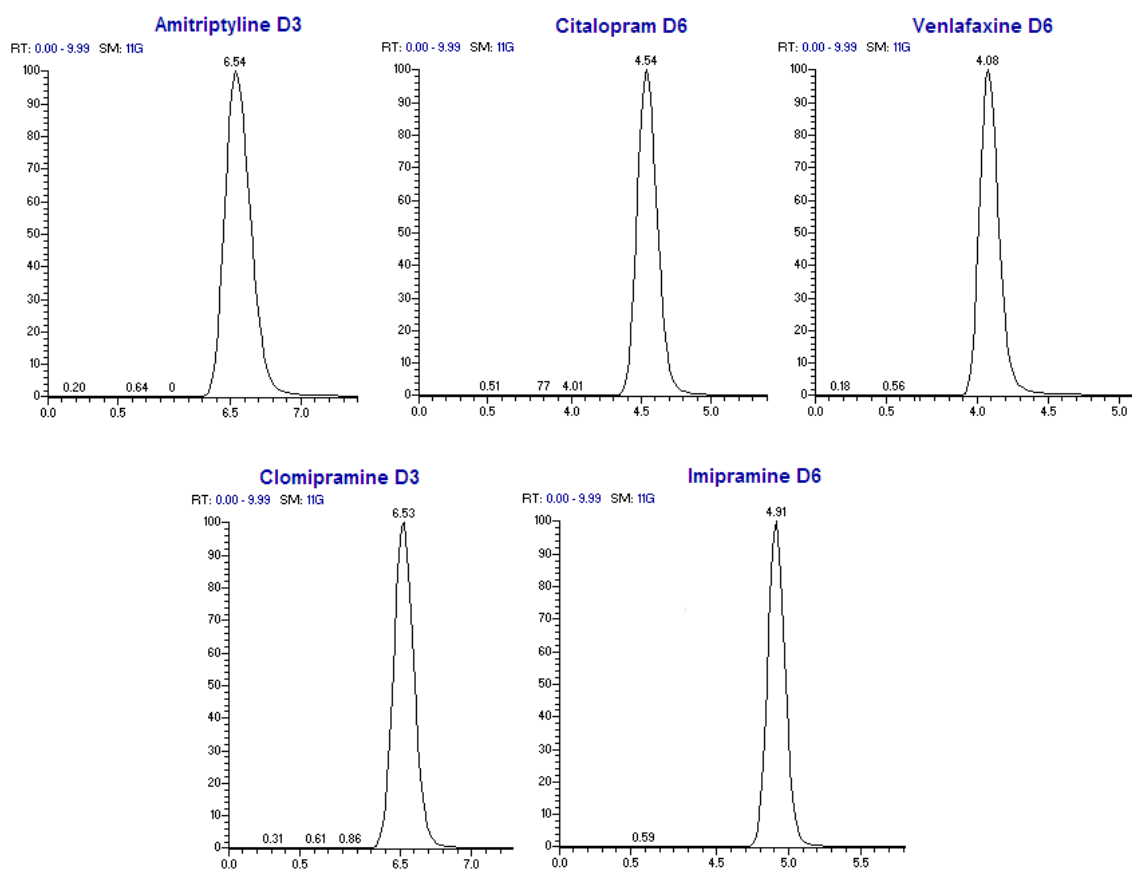
Figuur 60 geeft een overzicht van alle individuele chromatogrammen van de metabolieten, opgenomen met de 'Amitriptyline & Nortriptyline' methode weer.



Figuur 60: Individuele chromatogrammen van de metabolieten; op de y assen staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-assen staat de elutie tijd (minuten) uitgesteld.

12.10.3 Gedeuteerde referentie stoffen

Figuur 61 geeft een overzicht van alle individuele chromatogrammen van de gedeuteerde referentie stoffen, opgenomen met de 'Amitriptyline & Nortriptyline' methode weer.



Figuur 61: Individuele chromatogrammen van de gedeuteerde referentie stoffen; op de y assen staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-assen staat de elutie tijd (minuten) uitgesteld.

12.11 Resultaten samenvatting literatuurstudie

Tabel 75 geeft de resultaten van de literatuurstudie weer.

Tabel 75: resultaten literatuurstudie

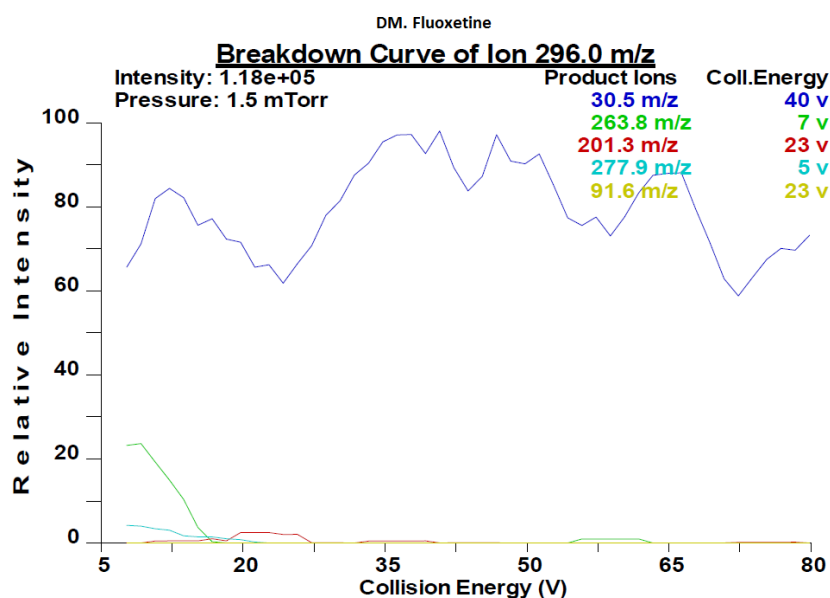
Study	[10] Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry			[11] Developing and validating an LC-MS/MS method to quantify antidepressants in blood			[12] Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry		
Chromatografie									
Kolom fabrikant	Waters			Thermo Scientific			Waters		
Kolom	X terra RP18 100 x 2.1 mm ram column 3,5 µm			hypersil R Gold C18 150 2.1 mm 5 µm			BEH c18 2.1 x 150 mm, 1.7 µm		
Eluens	A: H2O + NH4HCO2 4 mmol Ph 3,2 B: ACN + NH4HCO2 4 mmol			A: H2O + NH4HCO2 2 mmol Ph 3,0 B: ACN + NH4HCO2 2 mmol			A: H2O + 0,1% HCOOH + 10 mM NH4C2H3O2 B: ACN + 10 mM NH4 C2H3O2		
Flow (ml/min)	0,3			0,25			0,3		
Eluens verh. (%)	(min.)	A (%)	B (%)	(min.)	A (%)	B (%)	(min.)	A (%)	B (%)
start	start	85	15	start	95	5	start	80	20
stap 1	1	85	15	2,4	95	5	5	80	20
stap 2	12	65	35	10	20	80	15	40	60
stap 3	13	65	35	13	20	80	20	80	20
stap 4	13,5	85	15	13,2	95	5			
Massaspectrometrie									
spray voltage (v)	3200 positive mode			-			4500 Positive mode		
esi temp (°c)	115			-			600		
Capilaire temp (°c)	280			-			-		
Sheath gas (l/h)	50			-			-		
Aux gas (l/h)	500			-			-		
C.P. (mbar)	3			-			-		
Detectie modus	mrm			mrm			mrm		
Voorbewerking & kwantificatie									
Voorbewerking I.S.	Liquid liquid ext. Methylrisperidone			SPE: Oasis® cartridge MCX 3cc. Gedeuteerde			SPE: Oasis WCX Clozapine		
Study	[13] Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach			[14] A rapid and fully-automated method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using turbulent-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry			[15] Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)		
Chromatografie									
Kolom fabrikant	Merck Millipore			Thermo Scientific			Thermo Scientific		
Kolom	Chromolith Speed C18, 50mm x 4.6mm 5 µm			Hypersil Gold C-18, 50x 2.1 mm 5 µm			Beta Basic C-8, 100mmx4.6mm 5 µm		
Eluens	A: MeOH B: MeOH + 5 mM Hac; pH 3 met NH3			A: H2O + 0,1% HCOOH B: ACN + 0,1% HCOOH			A: H2O + 5 mM NH4C2H3O2; pH 3 met HAC B: ACN + 10 mM NH4 C2H3O2		
Flow (ml/min)	1,0						0,5		
Eluens verh. (%)	(min.)	A (%)	B (%)	(min.)	A (%)	B (%)	(min.)	A (%)	B (%)
start	start	20	80	start	100	0	start	80	20
stap 1	4	70	30	0,75	25	75			
stap 2	5	20	80	1,5	100	0			
stap 3				3	100	0			
stap 4									
Massaspectrometrie									
spray voltage (v)	4500 positive mode			4900 Positive mode			5500 Positive mode		
esi temp (°c)	-			-			-		
Capilaire temp (°c)	-			270			450		
Sheath gas (l/h)	-			-			20 (psi)		
Aux gas (l/h)	-			-			-		
C.P. (psi)	-			-			5		
Detectie modus	mrm			mrm			mrm		
Voorbewerking & kwantificatie									
Voorbewerking I.S.	PPT 1:3 serum/N.V. (9:1 ACN:MeOH) Clonidine			Online SPE (turbulent flow) Gedeuteerde					

12.12 Massaspectrometrie

12.12.1 Transities

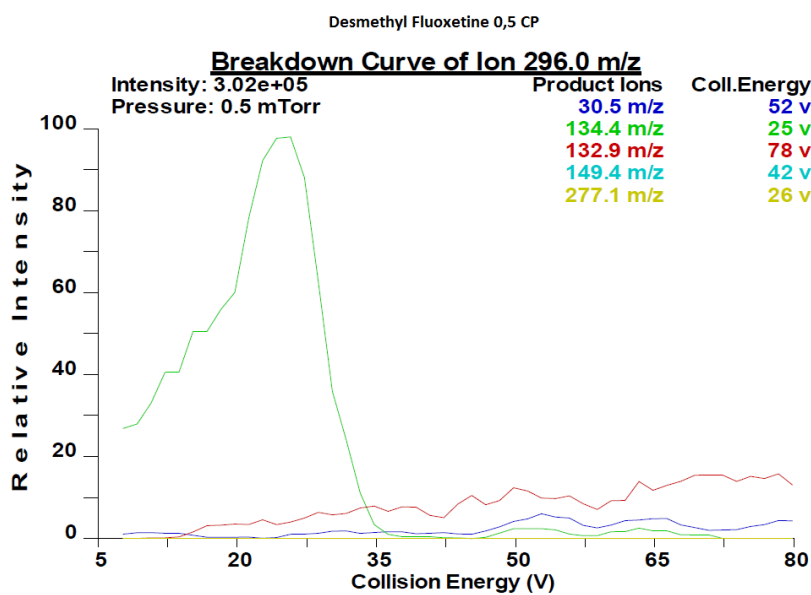
Niet getoonde transities zijn op aanvraag beschikbaar. Alle transities welke expliciet behandeld worden in het verslag, worden getoond in de bijlage.

Figuur 62 geeft de transitie van Desmethyl Fluoxetine weer.



Figuur 62: Transitie van Desmethyl Fluoxetine; Op de y-as staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-as staat het voltage op de collision cell (volt) uitgesteld.

Figuur 63 geeft de transitie van Desmethyl Fluoxetine op 0,5 CP (Collision Pressure) weer



Figuur 63 Transitie van Desmethyl Fluoxetine op 0,5 CP; Op de y-as staat de relatieve intensiteit van de detector uitgesteld, en op de x-as staat het voltage op de collision cell (volt) uitgesteld.

12.12.2 Tube lens optimalisatie

Niet getoonde tube lens optimalisaties zijn op aanvraag beschikbaar. Alle tube lens optimalisaties welke expliciet behandeld worden in het verslag, worden getoond in de bijlage.

12.13 Kwantificatie

12.13.1 Regressie lijnen

Niet getoonde regressie lijnen zijn op aanvraag beschikbaar.

12.14 Bijlage prestatie kenmerken

12.14.1 Specificiteit

Niet getoonde TIC chromatogrammen van de specificiteitsbepaling zijn op aanvraag beschikbaar.

12.15 Samenvatting van de analyse methode 3

12.15.1 Analyse paramters

12.15.1.1 Massaspectrometrie

Tabel 76 geeft de systeeminstellingen van analyse methode 3 weer.

Tabel 76: Systeeminstellingen MS

Parameter	Waarden	Grootheid
Sheath gas	30	Arb
Auxiliary gas	20	Arb
Ionisatie modus	Positive	All
Voltage op bron	3500	Volt
Vaporizer Temperature	350	°C
Collision Pressure	1,5	mTorr
Analyzing method	SRM	-
Q1 Peak Width	0,7	FWHM

Gate valve	Waarden	Grootheid
Gate valve to waste	0	minutes
Gate Valve switch	2,4	minutes
Gate valve to waste	7,6	minutes

Figuur 64 geeft de instellingen van de antidepressiva voor de MS weer.

Scan Editor | Divert Valve | Tune Method | Method Summary

Run Settings

MS Acquire Time (min): 9.50 Experiment Type: SRM

Chrom Filter Peak Width (s): 10.0 Collision Gas Pressure (mTorr): 1.5 ☒ Use Tuned Tube Lens Value

SRM Settings

Q1 Peak Width (FWHM): 0.70 Cycle Time(s): ☒ 1.000 Skimmer Offset (V): 10

#	Parent	Product	SRM Collision Energy	Start Time	Stop Time	Polarity	Trigger	Reference	Name
1	264.200	58.300	18	2.40	3.60	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)venlafaxine
2	252.000	209.100	23	3.20	4.05	+	1.000e+05	No	D.M. mirtazepine
3	266.100	195.100	26	3.40	4.20	+	1.000e+05	No	mirtazepine
4	278.200	58.300	19	4.20	5.00	+	1.000e+05	No	venlafaxine
5	284.000	64.300	19	4.20	5.00	+	1.000e+05	No	venlafaxine D6
6	311.100	109.100	25	4.90	5.60	+	1.000e+05	No	D.M. citalopram
7	325.200	109.100	29	5.00	5.70	+	1.000e+05	No	citalopram
8	331.000	109.100	32	5.00	5.70	+	1.000e+05	No	citalopram D6
9	330.000	192.100	20	5.45	6.20	+	1.000e+05	No	paroxetine
10	282.000	225.000	16	5.50	6.30	+	1.000e+05	No	D.M. dosulepine
11	296.000	222.900	23	5.65	6.45	+	1.000e+05	No	dosulepine
12	267.000	72.300	16	5.70	6.45	+	1.000e+05	No	D.M. (desi)imipramine
13	264.000	169.100	19	5.75	6.35	+	1.000e+05	No	D.M. maprotiline
14	281.000	86.300	17	5.85	6.60	+	1.000e+05	No	imipramine
15	284.200	89.200	17	5.85	6.60	+	1.000e+05	No	imipramine D6
16	298.000	44.400	12	5.90	6.50	+	1.000e+05	No	Duloxetine
17	319.000	200.100	21	5.90	6.60	+	1.000e+05	No	fluvoxamine
18	264.000	233.100	15	5.90	6.65	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)amitriptyline
19	278.000	250.200	19	6.00	6.80	+	1.000e+05	No	maprotiline
20	278.100	233.100	23	6.05	6.90	+	1.000e+05	No	amitriptyline
21	281.000	233.100	17	6.05	6.90	+	1.000e+05	No	amitriptyline D3
22	296.000	134.100	11	6.10	6.90	+	1.000e+05	No	D.M. fluoxetine
23	292.000	159.000	25	6.20	7.00	+	1.000e+05	No	D.M. (nor)sertraline
24	308.000	277.000	13	6.40	7.40	+	1.000e+05	No	sertraline
25	301.000	72.300	17	6.60	7.40	+	1.000e+05	No	D.M. clomipramine
26	310.000	44.400	13	6.60	7.40	+	1.000e+05	No	fluoxetine
27	315.100	86.200	18	6.90	7.60	+	1.000e+05	No	clomipramine
28	318.200	89.300	19	6.90	7.60	+	1.000e+05	No	clomipramine D3

Figuur 64: Antidepressiva MS parameters

12.15.1.2 Chromatografie

Voor de chromatografische instellingen zie Figuur 13

12.15.2 Opwerking

12.15.2.1 Regressiereeks

Voor opwerking van de regressiereeks zie 5.3.6.2.

12.15.2.2 QC's

Voor de opwerking van de QC's zie 5.3.5.3.4.