

DCM = 31.3 mg fenylmercurichloride per 100 ml DCM; oplossen d.m.v. 5 minuten ultrasoonbad; donker bewaren.

Standaarden

6-TG: 6-thioguanine = 2-amino-6-mercaptapurine:

Sigma art.nr. A-4882

6-MMP: 6-methylmercaptapurine:

Sigma art.nr. M-3877

Stockoplossingen

Stockoplossing 6-TG:

10.0 mg wordt opgelost in 4 ml natriumhydroxide 0.1 M en aangevuld met H₂O tot 100.0 ml resulterend in een eindconcentratie van 100 mg/l 6-TG (= 600 μ mol/l).

Stockoplossing 6-MMP:

10.0 mg wordt opgelost in 4 ml natriumhydroxide 0.1 M (5 minuten ultrasoonbad), toegevoegd wordt 10 ml zoutzuur 1.0 M en aangevuld met H₂O tot 100.0 ml resulterend in een eindconcentratie van 100 mg/l 6-MMP (= 600 μ mol/l).

Standaarden

In 4 kolfjes van 10.0 ml wordt 1.0 ml DTT gepipetteerd. Vervolgens worden respectievelijk 25, 50, 100 en 200 μ l stockoplossing 6-TG en 100, 200, 500 en 1000 μ l stockoplossing 6-MMP in de kolfjes gepipetteerd. Aangevuld wordt met H₂O tot 10.0 ml en gemengd. Indien 200 μ l in gebruik wordt genomen bij de analyse komt dit overeen met resp. 300, 600, 1200 en 2400 pmol 6-TG en respectievelijk 1200, 2400, 6000 en 12000 pmol 6-MMP.

Monstervoorbewerking

Volbloed wordt verzameld in gecoat lithium-heparine buizen. De monsters worden 10 minuten gecentrifugeerd bij 160 g waarna het plasma en "buffy coat" worden verwijderd. De overblijvende rode bloedcellen (RBCs) worden gewassen door toevoeging van eenzelfde volume PBS-oplossing, waarna wordt gemengd en gecentrifugeerd bij 160 g gedurende 10 minuten. De bovenlaag wordt verwijderd en de

RBCs worden nogmaals gewassen volgens de beschreven procedure. Gecentrifugeerd wordt nu bij 640 g. Na verwijderen van de bovenlaag worden de RBCs met een gelijk volume PBS-oplossing verdund en gemengd. De hoeveelheid RBCs worden gemeten met behulp van de Cell Dyn 4000 cell counter (Abbott, Hoofddorp, Nederland). Het monster wordt ingevroren bij -20 °C totdat analyse plaatsvindt.

Extractie

In extractiebuisen van 10 ml worden achtereenvolgens gepipetteerd: 500 μ l H₂O, 300 μ l DTT en 200 μ l voorbehandelde monsteroplossing (= 200 μ l RBCs = ongeveer 8×10^8 RBCs: zie opmerking 2). Na mengen wordt 500 μ l 1.5 M zwavelzuur toegevoegd en gemengd. De buizen worden afgesloten en gedurende precies 1 uur verwarmd bij 100 °C in een verwarmingsblok. Na afkoelen en toevoegen van 500 μ l 3.4 M natriumhydroxide wordt 10 minuten geschud met 5.0 ml extractiemiddel. Na centrifugeren wordt 3.0 ml van de organische laag overgebracht in een nieuwe extractiebuis. Toegevoegd wordt 200 μ l 0.1 M zoutzuur, geschud gedurende 10 minuten en gecentrifugeerd. Aan 100 μ l van de zoutzuurlaag wordt 10 μ l DTT toegevoegd en gemengd. De oplossing wordt vervolgens geïnjecteerd op de HPLC-kolom.

Kalibratie

In extractiebuisen van 10 ml worden gepipetteerd: 300 μ l H₂O, 300 μ l DTT, 200 μ l voorbehandelde

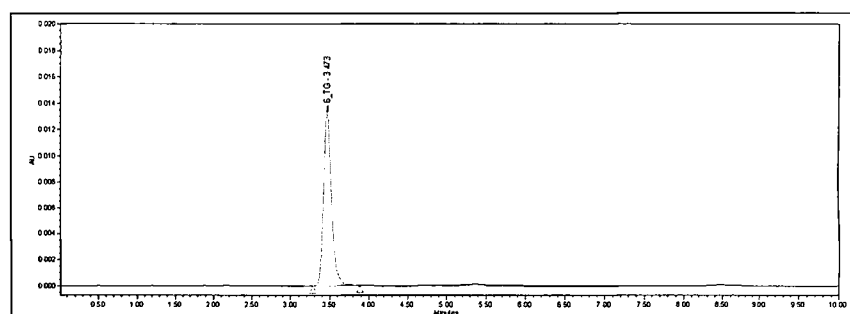
blanco RBCs en 200 μ l van de 4 verschillende standaardoplossingen. Aan de oplossingen wordt na mengen 500 μ l 1.5 M zwavelzuur toegevoegd, verwarmd en geëxtraheerd zoals hierboven beschreven onder het kopje "Extractie".

HPLC-procedure

Gebruik wordt gemaakt van een HPLC-pomp model 510, een detector model 2487 dual absorbance UV detector, een 717plus autosampler en Millennium Chromatography Manager als dataverwerkende software (Waters Chromatography B.V., Etten-Leur, Nederland). Scheiding vindt plaats op een Novapak C₁₈ kolom (3.9x150 mm), 4 μ m deeltjesgrootte (Waters Chromatography B.V.). De flow wordt ingesteld op 1.0 ml/min. Voor de bepaling van 6-TG wordt 40 μ l geïnjecteerd op de kolom waarbij de mobiele fase bestaat uit 50 mM fosforzuur + 0.5 mM dithiothreitol. Gemeten wordt bij 343 nm, de retentietijd is circa 3.5 minuten (figuur 2). Voor de bepaling van 6-MMP wordt 30 μ l geïnjecteerd op de kolom waarbij de mobiele fase bestaat uit een mengsel van methanol:MilliQ-water (4:96 v/v), bevattend 150 mM triethylamine + 0.5 mM dithiothreitol, waarbij met fosforzuur 85% de pH op 3.2 wordt gebracht. Gemeten wordt bij 303 nm, de retentietijd is circa 5 minuten (figuur 3).

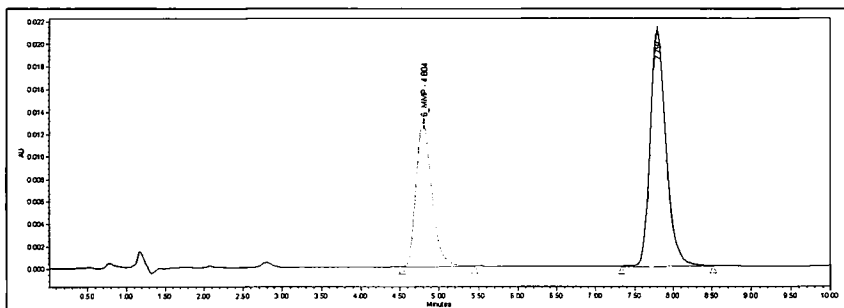
Berekening

Berekening vindt plaats met piekhoogte ten opzichte van de opgestelde kalibratielijijn. De uitslag wordt



Figuur 2: Chromatogram 6-TG

Chromatogram van standaard 1352 pmol 6-TG per 200 μ l RBCs na extractie volgens de beschreven procedure.



Figuur 3: Chromatogram 6-MMP

Chromatogram van standaard 6060 pmol 6-MMP per 200 µl RBCs na extractie volgens de beschreven procedure. De piek op 7.797 is ook in de blanco aanwezig.

omgerekend naar pmol/8x10⁸ RBC, dus gecorrigeerd wordt voor de gemeten hoeveelheid RBCs.

Validatiegegevens

De validatieparameters zijn weergegeven in tabel 1. De day-to-day variatiecoëfficiënt (VC) is bepaald door gedurende een jaar bij iedere reeks een gepooled patiëntenmonster als controlemonster mee te bepalen. De analyse is gedurende die tijd door 4 verschillende personen uitgevoerd. Het monster bevat gemiddeld 400 pmol 6-TG en 7300 pmol 6-MMP per 200 µl RBCs.

Opmerkingen

De hoeveelheid RBCs per 200 µl is gevarieerd tussen 6.8 en 8.8 x10⁸. Binnen dit gebied blijkt er voor de standaarden geen verschil in gevonden piekhoogte voor zowel 6-TG als 6-MMP.

Bij patiëntmonsters wordt zoveel µl in bewerking genomen dat de hoeveelheid RBCs ligt tussen 6.8 en 8.8 x10⁸.

Voor 6-MMP geldt, dat alleen een piek wordt verkregen indien de component wordt behandeld volgens de beschreven procedure. Hier is geen absoluut extractierendement te bepalen.

Referenties

1. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. Eur J Clin Pharmacol 1992;43(4):329-39.
2. Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. Gut 1996;39(3):401-6.
3. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000;118(4):705-13.
4. Derijks LJJ, Engels LGJB, Hommes DW, Lohman JJHM, Hooymans PM. Mercaptopurine bij inflammatoire darmziekten: is het meten van bloedspiegels zinvol? Pharm Weekbl 2003;138:1012-6.
5. Derijks LJJ, Jong de DJ, Gilissen LP, Engels LGJB, Hooymans PM, Jansen JBMJ, et al. 6-Thioguanine seems promising in azathioprine-or 6-mercaptopurine-intolerant inflammatory bowel disease patients: a short-term safety assessment. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15(1):63-7.
6. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. J Chromatogr 1992;583(1):83-90.

	6-TG	6-MMP	6-TG VC % (n=4) herhaalbaarheid	6-MMP VC % (n=4) herhaalbaarheid
Concentratie (pmol/200 µl RBC)	121	722	1.9	3.8
	302	1444	3.2	2.3
	604	2888	3.8	6.1
	1208	7220	8.7	3.8
	2416	17328	6.1	1.3
	3624	36100	3.4	4.6
Lineair (pmol/200 µl RBC)	Tot 3600	Tot 36000		
Onderste bepalingsgrens (pmol/200 µl RBC)	15	200		
Systeem VC (%) (n=10)	Maximaal 1.7 %			
VC (%) day-to-day	10.7 (n=56)	5.4 (n=36)		
Extractierendement (n=58)	66% ± 6% (abs.)			

Tabel 1: Validatieparameters